

**EST-Analyse von *Humulus lupulus* L.-Trichomen –
Identifizierung einer *O*-Methyltransferase, welche die Biosynthese
von Xanthohumol katalysiert**

D i s s e r t a t i o n

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

vorgelegt der

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

von Frau **Jana Nagel**

geb. am: 11.01.1975 in Halle (Saale)

Gutachter:

1. Prof. D. Scheel

2. Dr. J. E. Page

3. Prof. W. Roos

Halle (Saale), 06. Februar 2009

urn:nbn:de:gbv:3-000015291

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000015291>]

Teile dieser Arbeit sind in folgende Veröffentlichungen eingegangen:

Page JE, Nagel J (2006) Biosynthesis of terpenophenolic metabolites in hop and cannabis. Romeo J. T. et al. (Ed.), Recent Adv Phytochem, **40**: 179-210

Nagel J, Culley LK, Lu Y, Liu E, Matthews PD, Stevens JF, Page JE (2008) EST analysis of hop glandular trichomes identifies an *O*-methyltransferase that catalyzes the biosynthesis of xanthohumol. Plant Cell **20**: 186-200

INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|------------|--|-----------|
| 1 | EINLEITUNG | 1 |
| 1.1 | Der Hopfen <i>Humulus lupulus</i> L. | 1 |
| 1.1.1 | Botanische Beschreibung..... | 1 |
| 1.1.2 | Historische und heutige Verwendung des Hopfens | 2 |
| 1.2 | Trichome mit Drüsenfunktion | 3 |
| 1.2.1 | Die verschiedenen Trichomtypen von <i>H. lupulus</i> | 4 |
| 1.3 | Hopfen ist reich an Inhaltsstoffen | 5 |
| 1.3.1 | Xanthohumol und andere Prenylflavonoide aus <i>H. lupulus</i> | 9 |
| 1.3.1.1 | Medizinische Forschung zum Hopfeninhaltsstoff Xanthohumol..... | 11 |
| 1.3.1.2 | Biosynthese von Xanthohumol | 12 |
| 1.4 | Genexpressionsanalyse durch cDNA-Sequenzierung - Identifizierung neuer Gene | 16 |
| 1.5 | Die Familie der Chalkon-Isomerasen und der Chalkon-Isomerase-ähnlichen Proteine . | 17 |
| 1.6 | Methylierung | 19 |
| 1.6.1 | Die Methyltransferase Superfamilie | 19 |
| 1.6.2 | Klassifizierung pflanzlicher OMTs..... | 20 |
| 1.6.2.1 | Klasse I und Klasse-II OMTs..... | 20 |
| 1.6.2.2 | Karboxyl-Methyltransferasen..... | 22 |
| 1.6.3 | Konservierte Motive und strukturelle Charakterisierung pflanzlicher OMTs | 23 |
| 1.7 | Zielstellung der Arbeit | 25 |
| 2 | MATERIAL UND METHODEN | 27 |
| 2.1 | Material | 27 |
| 2.1.1 | Pflanzenmaterial | 27 |
| 2.1.2 | Insektenzellen und Insektenzellkultur..... | 27 |
| 2.1.3 | Bakterienstämme..... | 27 |
| 2.1.4 | Vektoren..... | 28 |
| 2.1.5 | Medien | 29 |
| 2.1.6 | Oligonukleotide..... | 29 |
| 2.1.7 | Chemikalien und Enzyme | 31 |
| 2.1.8 | Geräte..... | 32 |
| 2.2 | Methoden | 33 |
| 2.2.1 | Herstellung von Pflanzenextrakten | 33 |
| 2.2.2 | Chromatographische Methoden und Analytik | 33 |
| 2.2.2.1 | Analytische HPLC..... | 33 |
| 2.2.2.2 | Electrospray Ionisation-MS/MS (ESI-MS/MS) | 33 |
| 2.2.2.3 | Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie (LC-MS) | 34 |
| 2.2.2.4 | MALDI-TOF-Massenspektrometrie | 34 |
| 2.2.2.5 | Größenausschluss-Chromatographie..... | 34 |
| 2.2.2.6 | ¹ H-NMR-Spektroskopie und NOESY1D-Experimente | 35 |
| 2.2.3 | Isolierung von Trichomen..... | 35 |
| 2.2.4 | Grundlegende molekularbiologische Methoden | 36 |
| 2.2.5 | Isolierung von Nukleinsäuren | 36 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 2.2.5.1 | Isolierung von Gesamt-RNA..... | 36 |
| 2.2.5.2 | Isolierung von Poly-(A ⁺)-RNA..... | 37 |
| 2.2.5.3 | Isolierung von Plasmid-DNA..... | 37 |
| 2.2.5.4 | Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen..... | 37 |
| 2.2.6 | Reverse Transkription..... | 37 |
| 2.2.7 | Anhängen von 3'-PolyA-Überhängen..... | 38 |
| 2.2.8 | Herstellung einer SMART cDNA-Bank und Generierung der ESTs..... | 38 |
| 2.2.8.1 | cDNA-Synthese mittels „Long Distance“-PCR..... | 38 |
| 2.2.8.2 | cDNA-Synthese mittels Primerverlängerung..... | 39 |
| 2.2.8.3 | Größenfraktionierung durch Gelelektrophorese..... | 39 |
| 2.2.8.4 | Ligation in λ TriplEx2..... | 39 |
| 2.2.8.5 | <i>In vitro</i> -Verpackung in λ -Phagenhüllen..... | 40 |
| 2.2.8.6 | Generierung der „Expressed Sequence Tags“ (ESTs)..... | 40 |
| 2.2.9 | DNA-Sequenzierung..... | 40 |
| 2.2.10 | Bioinformatische Analyse von Sequenzen und Datenbankvergleiche..... | 41 |
| 2.2.11 | Amplifikation des 5'-Endes von cDNA-Fragmenten..... | 42 |
| 2.2.12 | Real-time PCR (RT-PCR)..... | 42 |
| 2.2.12.1 | SYBR Green I-Reaktion..... | 43 |
| 2.2.12.2 | Datenanalyse..... | 44 |
| 2.2.13 | Allgemeine proteinbiochemische Methoden..... | 44 |
| 2.2.13.1 | Auftrennen von Proteinen auf Polyacrylamidgelen..... | 44 |
| 2.2.13.2 | Bestimmung von Proteinkonzentrationen..... | 45 |
| 2.2.14 | Heterologe Genexpression in Bakterien..... | 45 |
| 2.2.14.1 | Klonierung in den Expressionsvektor pHis8-3 und Transformation..... | 45 |
| 2.2.14.2 | Klonierung in den Expressionsvektor pET44a(+) und Transformation..... | 46 |
| 2.2.14.3 | Klonierung in den Expressionsvektor pHis8-GW und Transformation..... | 46 |
| 2.2.14.4 | Genexpression in <i>E. coli</i> | 47 |
| 2.2.14.5 | Herstellung von <i>E. coli</i> -Proteinrohextrakten..... | 48 |
| 2.2.15 | Kultivierung von Insektenzellen..... | 48 |
| 2.2.16 | Heterologe Genexpression in Insektenzellen..... | 49 |
| 2.2.16.1 | Klonierung in pFast Bac HT und Generierung rekombinanter Bacmid-DNA..... | 49 |
| 2.2.16.2 | Transfektion von Insektenzellen..... | 49 |
| 2.2.16.3 | Amplifikation der Virusstammlösung..... | 50 |
| 2.2.16.4 | Genexpression in Insektenzellen..... | 50 |
| 2.2.17 | Affinitätsreinigung rekombinanter Proteine..... | 51 |
| 2.2.17.1 | Reinigung von Proteinen aus <i>E. coli</i> -Rohextrakten..... | 51 |
| 2.2.17.2 | Reinigung von Proteinen aus Insektenzell-Rohextrakten..... | 51 |
| 2.2.17.3 | Pufferaustausch und Proteinkonzentrierung..... | 52 |
| 2.2.18 | Aktivitätsmessungen von Enzymen..... | 52 |
| 2.2.18.1 | OMT-Aktivitätstest..... | 52 |
| 2.2.18.2 | CHI-Aktivitätstest..... | 53 |
| 3 | ERGEBNISSE..... | 55 |
| 3.1 | Quantifizierung von Xanthohumol in verschiedenen Hopfen-Geweben..... | 55 |
| 3.2 | Analyse der Trichom-cDNA Banken..... | 56 |
| 3.2.1 | ESTs aus dem Sekundärstoffwechsel des Hopfens..... | 59 |
| 3.3 | <i>O</i>-Methyltransferasen aus <i>H. lupulus</i> (HIOMTs)..... | 61 |
| 3.3.1 | Amplifikation des 5'-Endes von HIOMT2 und HIOMT3..... | 62 |
| 3.3.2 | Sequenzanalyse der HIOMTs..... | 63 |
| 3.3.3 | Clusteranalyse und Sequenzvergleich der HIOMTs..... | 68 |
| 3.3.4 | HIOMT-Genexpressionsanalyse in <i>H. lupulus</i> | 72 |
| 3.3.5 | Genexpressionsanalyse der VPS und der CHS_H1 in <i>H. lupulus</i> | 75 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 3.3.6 | Expression der HIOMTs in <i>E. coli</i> | 76 |
| 3.3.7 | Expression der HIOMTs in Insektenzellen | 79 |
| 3.3.8 | Ermittlung der Enzymaktivitäten der HIOMTs | 79 |
| 3.3.9 | Reinigung der rekombinanten HIOMT1 und HIOMT2 | 88 |
| 3.4 | Charakterisierung der HIOMT1 und HIOMT2 | 90 |
| 3.4.1 | Protein- und Zeitlinearität der OMT-Reaktionen..... | 90 |
| 3.4.2 | Bestimmung des Temperaturmaximums | 91 |
| 3.4.3 | Bestimmung des pH-Optimums..... | 92 |
| 3.4.4 | Einfluss von Kationen und EDTA auf die Enzymaktivität..... | 94 |
| 3.4.5 | Molekulargewichtsbestimmung..... | 95 |
| 3.4.6 | Bestimmung der kinetischen Konstanten..... | 97 |
| 3.5 | Charakterisierung der enzymatischen Reaktionsprodukte von HIOMT1 und HIOMT2 | 102 |
| 3.5.1 | Methylierung von Desmethylxanthohumol durch die HIOMT1 | 102 |
| 3.5.2 | Methylierung von Desmethylxanthohumol durch die HIOMT2..... | 106 |
| 3.5.3 | Methylierung von Xanthohumol durch die HIOMT2 | 108 |
| 3.5.3.1 | Untersuchungen mittels HPLC und ESI-MS/MS..... | 108 |
| 3.5.3.2 | Untersuchung mittels NMR | 111 |
| 3.5.4 | Methylierung von Chalkonaringenin durch die HIOMT2 | 113 |
| 3.5.5 | Methylierung von Resveratrol durch die HIOMT2..... | 114 |
| 3.6 | Putative Chalkon-Isomerasen aus <i>H. lupulus</i> (HICHIs)..... | 115 |
| 3.6.1 | Sequenzanalyse..... | 116 |
| 3.6.2 | Clusteranalyse pflanzlicher CHIs und CHI-ähnlicher Proteine | 120 |
| 3.6.3 | Genexpressionsmuster der HICHIs in <i>H. lupulus</i> | 123 |
| 3.6.4 | Heterologe Expression der HICHIs..... | 124 |
| 4 | DISKUSSION | 128 |
| 4.1 | Transkriptomanalyse von Hopfen-Trichomzellen | 128 |
| 4.2 | OMTs aus <i>H. lupulus</i> | 130 |
| 4.2.1 | Heterologe Expression im prokaryontischen und eukaryontischen System | 131 |
| 4.2.2 | Charakterisierung der HIOMT1 und HIOMT2 | 132 |
| 4.2.3 | Substratspezifität der HIOMTs | 133 |
| 4.3 | HIOMT1 katalysiert die Biosynthese von Xanthohumol..... | 138 |
| 4.4 | Sequenzvergleich von Klasse II-OMTs | 140 |
| 4.5 | Sequenzvergleich von SABATH-Karboxyl-MTs..... | 143 |
| 4.6 | Die HICHIs sind keine katalytisch aktiven CHIs | 145 |
| 4.7 | Ausblick..... | 146 |
| 5 | ZUSAMMENFASSUNG | 148 |
| 6 | LITERATUR | 151 |
| 7 | ANHANG..... | 164 |

| | | |
|------------|--------------------------------------|------------|
| 7.1 | Mikroskopische Techniken..... | 164 |
| 7.1.1 | Lichtmikroskopie | 164 |
| 7.1.2 | Rasterelektronenmikroskopie..... | 164 |
| 7.2 | Sequenzen..... | 165 |

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|----------------------|--|
| AdoMet | S-Adenosyl-L-Methionin |
| Amp ^r | Ampicillin-Resistenz |
| bp | Basenpaare |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| cDNA | komplementäre Desoxyribonukleinsäure |
| CHI | Chalkon-Isomerase |
| CID | collision induced dissociation |
| CHS | Chalkon-Synthase |
| dATP | 2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat |
| dCTP | 2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat |
| ddH ₂ O | doppelt destilliertes Wasser |
| d ₆ -DMSO | sechsfach deuteriertes Dimethylsulfoxid |
| dG | 2'-Desoxyguanosin |
| DMAPP | Dimethylallylpyrophosphat |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DNase I | Desoxyribonuklease I |
| dNTP | 2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat |
| dT | 2'-Desoxythymidin |
| DTT | Dithiotreitol |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| ESI-MS/MS | Electrospray-Ionisations-Tandem-Massenspektrometrie |
| EST | Expressed Sequence Tag |
| FPLC | Fast Protein Liquid Chromatography |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase |
| Gent ^r | Gentamycin-Resistenz |
| His | Histidin |
| HICHI | <i>Humulus lupulus</i> Chalkon-Isomerase |
| HIOMT | <i>Humulus lupulus</i> O-Methyltransferase |
| HPLC | Hochdruckflüssigkeitschromatographie |
| IPTG | Isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranosid |
| kb | Kilobasenpaare |
| kDa | Kilodalton |
| LB | Luria-Bertani |
| LC-MS | Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie |
| LiCl | Lithiumchlorid |
| MALDI-TOF | Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation-Time of Flight |
| MEP | 2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat-/1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphatweg |
| MMLV | Moloney Murine Leukemia Virus |
| mRNA | Messenger Ribonukleinsäure |
| MT | Methyltransferase |
| NCBI | National Center for Biotechnology Information |
| NMR | Kernresonanzspektroskopie |
| NOE | Kern-Overhauser-Effekt |
| NOESY | Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy |
| OD | optische Dichte |
| OMT | O-Methyltransferase |

| | |
|------------------|---|
| PAGE | Polyacrylamidgelelektrophorese |
| PBS | Phosphat-gepufferte Salzlösung |
| PDA | Photodiodenarray, Photodiodenzeile |
| PCR | Polymerasekettenreaktion |
| Pfu | <i>Pyrococcus furiosus</i> |
| pH | pondus hydrogenii |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RNase H | Ribonuklease H |
| RP | Umkehrphase |
| rpm | Umdrehungen pro Minute |
| RT | Raumtemperatur |
| SAH | S-Adenosyl-L-Homocystein |
| SAM | S-Adenosyl-L-Methionin |
| SAMT | S-Adenosyl-L-Methionin-Salizylsäure-Karboxylmethyltransferase |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| SMART | Switching Mechanism at 5' end of RNA Transcript |
| Spn ^r | Spectinomycin-Resistenz |
| Str ^r | Streptomycin-Resistenz |
| T | Thymidin |
| Taq | <i>Thermus aquaticus</i> |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin |
| Tet ^r | Tetrazyklin-Resistenz |
| TFA | Trifluoressigsäure |
| Tris | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan |
| U | Einheiten |
| UTR | untranslatierte Region |
| var. | Varietät |
| vol | Volumen |
| VPS | Phlorisovalerophenonsynthase |
| v/v | Volumen pro Volumen |
| w/v | Gewicht pro Volumen |
| X-Gal | 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β-D-galaktopyranosid |

1 Einleitung

1.1 Der Hopfen *Humulus lupulus* L.

1.1.1 Botanische Beschreibung

Der Hopfen *Humulus lupulus* (L.) gehört zur Familie der Cannabaceae, die mit *Humulus* L. und *Cannabis* L. in zwei Gattungen untergliedert ist. *H. lupulus* ist als wild wachsende Pflanze in der nördlichen Hemisphäre zwischen dem 35. und 70. Breitengrad verbreitet, wo sie vor allem in Gebüsch und Auenwäldern vorkommt. Als Nutzpflanze werden die weiblichen Pflanzen heute in vielen Teilen der Welt angebaut, so auch in den gemäßigten Breiten der Südhalbkugel. Die Gattung *Humulus* umfasst mit *H. yunnanensis* und *H. japonicus* noch zwei weitere Arten. Während Erstere in China beheimatet ist, kommt Letztere verbreitet in Asien vor und wird als Gartenpflanze auch in Europa angebaut (Neve, 1991). Bei *H. lupulus* handelt es sich um eine krautige, rechts windende Pflanze, welche ein mehrjähriges unterirdisches Rhizom besitzt, das jährlich mit bis zu 8 m hohen einjährigen Trieben neu austreibt. Die Laubblätter sind gezähnt und ganzrandig bis 3-7-lappig. Die Pflanze ist mit verschiedenen Typen von Trichomen besetzt, die unter anderem zum empor Klimmen und Festhalten dienen oder deren angereicherte Sekrete den Wert des Hopfens als Kulturpflanze begründen. Hopfen gehört zu den diözischen Pflanzenarten (Abb. 1.1).



Abbildung 1.1 *H. lupulus*, Kultivierung auf dem Feld (links) und weibliche Pflanze (rechts).

Die weiblichen Blüten erscheinen in Blütenständen entlang einer gestauchten Achse an der sich paarweise Brakteen befinden, die wiederum je zwei Brakteolen mit je einer Einzelblüte enthalten. Im Zuge der Reife verlängert sich die zentrale Achse und die Brakteen und

Brakteolen vergrößern sich. Es bilden sich die als Hopfenzapfen bezeichneten reifen weiblichen Blütenstände (Abb. 1.2). Die männlichen Blüten bilden lockere Rispen.



Abbildung 1.2 Entwicklung der weiblichen Blütenstände von *H. lupulus* von den Blüten (links) bis zu den reifen Zapfen (rechts).

1.1.2 Historische und heutige Verwendung des Hopfens

Der größte Teil des heute weltweit kultivierten Hopfens wird zum Bierbrauen verwendet. Doch Hopfen wurde auch schon seit Jahrhunderten vom Menschen in verschiedenen anderen Bereichen eingesetzt. Eintragungen in medizinischen Lehrbüchern, wovon die frühesten aus dem 10. und 12. Jahrhundert stammen, lassen auf eine Verwendung als Heilpflanze schließen. Hopfen wurde gegen die verschiedensten Leiden wie Verdauungsbeschwerden, gegen Darmparasiten, als harntreibendes Mittel, gegen Hauterkrankungen, in der Frauenheilkunde usw. eingesetzt. Er wurde auch als Faserpflanze zur Herstellung von Stoffen oder Papier verwendet, aus den Blättern und Ranken wurde ein brauner Farbstoff gewonnen und sie wurden zum Gerben von Häuten genutzt. Junge Hopfentriebe wurden gegessen und Hopfenzapfen zum Brotbacken verwendet (Neve, 1991). Erste Berichte über Hopfengärten stammen aus dem 8./9. Jahrhundert, aber seit wann genau Hopfen zum Bierbrauen eingesetzt wurde, ist nicht bekannt. Erste Hinweise dazu finden sich in Hildegard von Bingen's *Physica Sapia* aus dem 12. Jahrhundert, die die konservierenden Eigenschaften des Hopfens nach dessen Zusatz zu Getränken erwähnte. Vom 13. Jahrhundert an verdrängte Hopfen langsam andere Kräutermischungen, die bis dahin im deutschen Raum dem Bier beigegeben worden waren. In Bayern mündete dies im Reinheitsgebot von 1516, das seit 1906 in ganz Deutschland gilt. Seit Beginn des 20. Jahrhunderts wird Hopfen oft in Verbindung mit Zubereitungen aus anderen Pflanzen, wie z.B. Baldrian, gegen Nervosität und Schlafstörungen eingesetzt. Aufgrund seiner sedativen Wirkung gilt Hopfen heute als Arzneipflanze und es existieren eine Monographie der Kommission E des

Bundesgesundheitsamtes als auch eine ESCOP-Monographie (ESCOP = European Scientific Cooperative on Phytotherapie (ESCOP, 2003).

1.2 Trichome mit Drüsenfunktion

Pflanzen produzieren eine Vielzahl sekundärer Verbindungen mit verschiedenen biologischen Wirkungen, die als das Ergebnis von Koevolution mit Pathogenen, Herbivoren, Bestäubern oder anderen Organismen angesehen werden (Duke, 1994). Um den Kontakt mit der Umwelt zu maximieren, werden sie oftmals nahe oder auf der pflanzlichen Oberfläche synthetisiert. Sie können in spezialisierten Strukturen, beispielsweise Trichomen konzentriert werden. Trichome sind als ein- oder mehrzellige Anhänge definiert, die ausgehend von (einer) epidermalen Zelle(n) gebildet werden. Im Pflanzenreich existiert eine sehr große Vielfalt an Trichomen, die sich hinsichtlich ihrer Morphologie, Größe, Oberflächenstrukturen, Fähigkeit zur Sekretion, Funktion, dem Ort des Vorkommens, usw. unterscheiden. Die Einteilung in sekretorische und nicht-sekretorische Trichome bildet dabei ein Hauptunterscheidungsmerkmal. Durch die Sekretion von Substanzen in Trichome können Pflanzen auch autotoxische Verbindungen in großen Mengen anreichern und auf sichere Weise speichern. *Artemisia* und *Gossypium* sind beispielsweise Gattungen, deren Vertreter verschiedene Sekundärmetabolite ausschließlich in glandulären Trichomen speichern. Einer *Artemisia annua*-Mutante, die keine glandulären Trichome auf ihrer Oberfläche besitzt, fehlen fast alle Monoterpene und mehrere Sesquiterpene des Wildtyps (Duke et al., 1994; Tellez et al., 1999) und bei trichomlosen Baumwollsorten kommen die meisten aus Baumwolle bekannten Terpene nicht vor (Bell et al., 1987).

Von verschiedenen Pflanzenspezies konnte gezeigt werden, dass Trichome nicht nur Speicherort der sekundären Verbindungen sind, sondern diese auch in den Trichomzellen synthetisiert werden. Erstmals wurde der direkte Beweis dafür an isolierten Trichomzellen von Tabak erbracht, die lichtabhängig effizient Diterpene und Saccharoseester unter Zugabe von Karbonat synthetisieren konnten (Keene and Wagner, 1985). Aufgrund des kommerziellen Interesses am ätherischen Öl der Pfefferminze *Mentha x piperita* sind dessen Biosynthese und Sekretion in den glandulären Trichomen der Blätter gut erforscht worden (Gershenzon et al., 1992; McCaskill et al., 1992; McCaskill and Croteau, 1995). Die Trichome haben sich als metabolisch hoch spezifisch für die Biosynthese und den Transport der Monoterpen-Inhaltsstoffe erwiesen. Eine Transkriptanalyse der Trichome mittels cDNA-Sequenzierung zeigte, dass sowohl die Primärstoffwechselwege, die Energie und Bausteine für die Biosynthese der ätherischen Öle liefern, als auch die Maschinerie für den Transport

von Zwischenprodukten und Kofaktoren in den Trichomzellen hoch aktiv sind (Lange et al., 2000). Insgesamt entfielen rund 25% aller Transkripte des EST-Sets auf Sequenzen, die in die Biosynthese der ätherischen Öle involviert sind, darunter sind viele Mono- und Sesquiterpensynthasen sowie Enzyme für sekundäre Transformationen in den finalen Schritten der Monoterpenbiosynthese. Auch die peltaten Trichome der Blätter von *Ocimum basilicum* bilden sowohl Hauptspeicherort als auch Ort der Biosynthese der Phenylpropene und Terpene und sind für diese zwei Biosynthesewege hoch spezialisiert. Die Transkripte von Genen des Phenylpropanoid-Biosyntheseweges machten dabei ein Drittel einer cDNA-Bibliothek aus isolierten peltaten Trichomen dieser Pflanze aus (Gang et al., 2001).

1.2.1 Die verschiedenen Trichomtypen von *H. lupulus*

Auf den oberirdischen Pflanzenteilen von *H. lupulus* finden sich verschiedene Typen von Haaren oder Trichomen. Die Trichome ohne Drüsenfunktion sind als Schutz- und Klimmhaare ausgebildet und befinden sich an allen oberirdischen Teilen der Pflanze. Man unterscheidet einfache, einzellige Haare, kurze, steife Borsten und Stachelhaare, Klimm- und Kletterhaare sowie Zystolithenhaare (Abb. 1.4a). Sekretorische Trichome sind vor allem an Brakteen und Brakteolen der weiblichen Hopfenzapfen zu finden (Abb. 1.3a, b), aber auch männliche Blüten tragen solche an den Furchen der Staubbeutel. Sie sind auch an den Laubblattunterseiten sowie am Spross vorhanden. Dabei fällt die unterschiedliche Form der zwei Typen sekretorischer Trichome auf: Die gelben peltaten (schildartig) Trichome sehen in der präsekretorischen Phase schüsselförmig aus, während die farblosen bis hellgelben Köpfchendrüsen sich in einen Stiel und einen Kopf gliedern (Abb. 1.3c, d und 1.4b, c).

Die peltaten Trichome der Hopfenzapfen ($170 (+/- 20) \times 205 (+/- 20) \mu\text{m}$) sind im Vergleich zu den Köpfchendrüsen (Kopfdurchmesser $25 (+/- 2) \times 31 (+/- 2) \mu\text{m}$, Stiel $24 (+/- 4) \mu\text{m}$ lang) größer und bestehen aus 4 Basalzellen, 4 Stielzellen und einem großen, flachen, einschichtigen Kopf, der sich wiederum bei Zapfentrichomen aus ungefähr 200 Zellen, bei Blatttrichomen aus 30 bis 72 Zellen zusammensetzt (Oliveira and Pais, 1988). Die Köpfchendrüsen werden von 2 Basal- und 2 Stielzellen sowie einem 4-zelligen Kopf gebildet. Eine histochemische Analyse ergab, dass sich innerhalb beider Trichomtypen lipophile Verbindungen anreichern (Oliveira and Pais, 1988). Demnach kommen Bittersäuren in peltaten Trichomen vor, wohingegen ätherische Öle vermutlich in beiden sekretorischen Trichomarten vorhanden sind. Polyphenolische Verbindungen (Tannine) wurden nicht in den Trichomen nachgewiesen und werden wahrscheinlich von anderen Zellen der Hopfenzapfen angereichert.

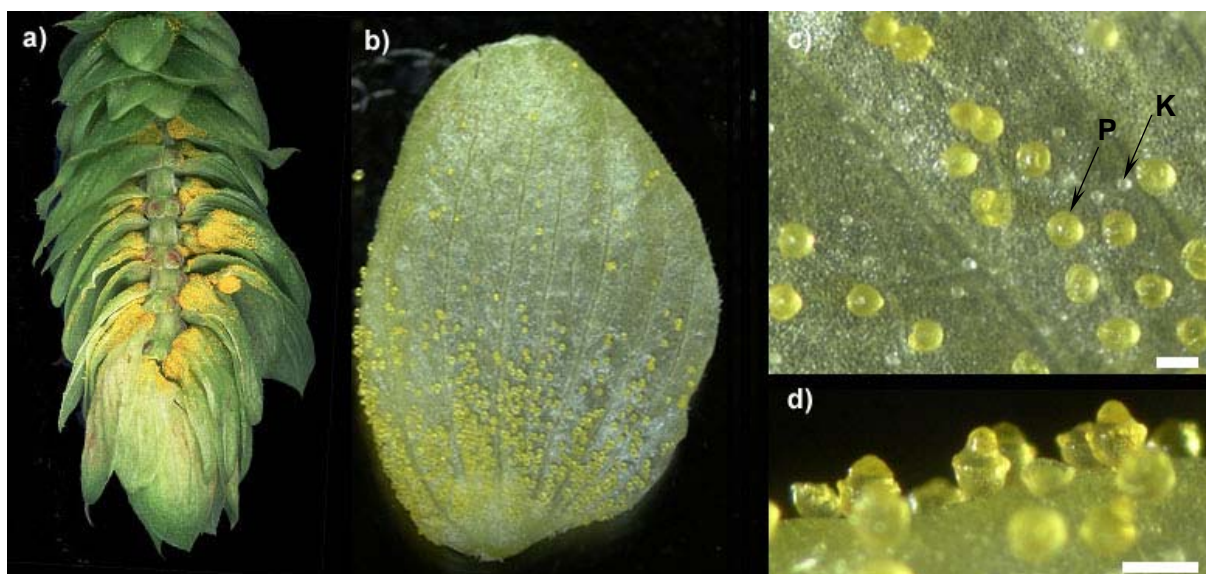


Abbildung 1.3 Lichtmikroskopische Aufnahme von Teilen der weiblichen Blütenstände von *H. lupulus*, die dicht mit Trichomen besetzt sind (7.1.1). a) Aufgeschnittener Hopfenzapfen b) Auf den Brakteen befinden sich die meisten Trichome im unteren Drittel. c) P = peltate und K = Köpfcendrüse (Balken = 500 μm) d) Peltate Trichome (Balken = 200 μm).

Die Sekrete beider Trichomtypen akkumulieren innerhalb des subkutikulären Raums. Mit fortschreitender Entwicklung der peltaten Trichome erheben sich die kutikulären Schichten in der Mitte mehr und mehr, so dass die Trichome ein pyramidales Äußeres annehmen (Abb. 1.4c, d) (Maeda, 1977). Ein Freisetzen der Sekrete wurde bei diesen nicht beobachtet. Anders verhält es sich bei den Köpfcendrüse, welche ihr akkumuliertes Material durch Aufreißen der Kutikula freisetzen und danach degenerieren.

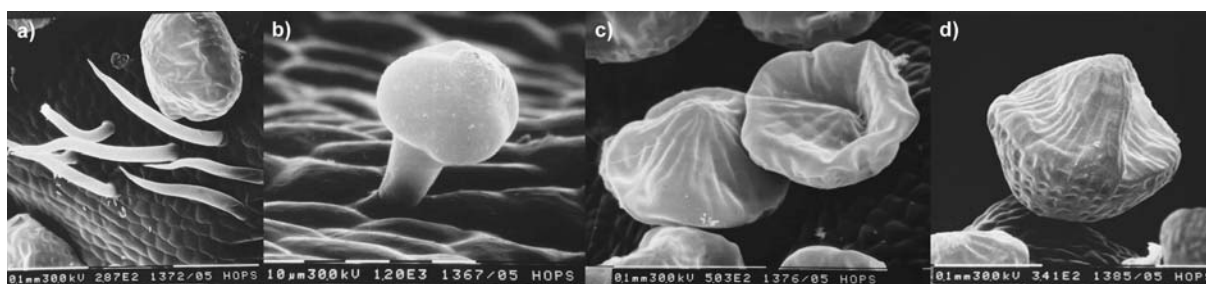


Abbildung 1.4 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen verschiedener Trichomtypen der Brakteen von *H. lupulus* (7.1.2). a) Einfache Schutzhaare, Köpfcendrüse und peltate Trichome b) Einzelne Köpfcendrüse c) Zwei peltate Trichome, von denen das linke mehr und das rechte weniger Sekret im subkutikulären Raum angereichert hat. d) Einzelnes peltates Trichom, fast vollständig mit Sekret gefüllt.

1.3 Hopfen ist reich an Inhaltsstoffen

In den sekretorischen Trichomen der Hopfenzapfen reichern sich die Inhaltsstoffe an, die das traditionell ökonomische Interesse an der Hopfenpflanze begründen. Während in den Zellen der Vor- und Deckblätter polyphenolische Verbindungen zu finden sind, akkumuliert in den

sekretorischen Trichomen das als Lupulin bezeichnete gelbe Sekret. Es wird vom ätherischen Öl und von der Gesamtheit der Verbindungen gebildet, die das Harz ausmachen (Abb. 1.5).

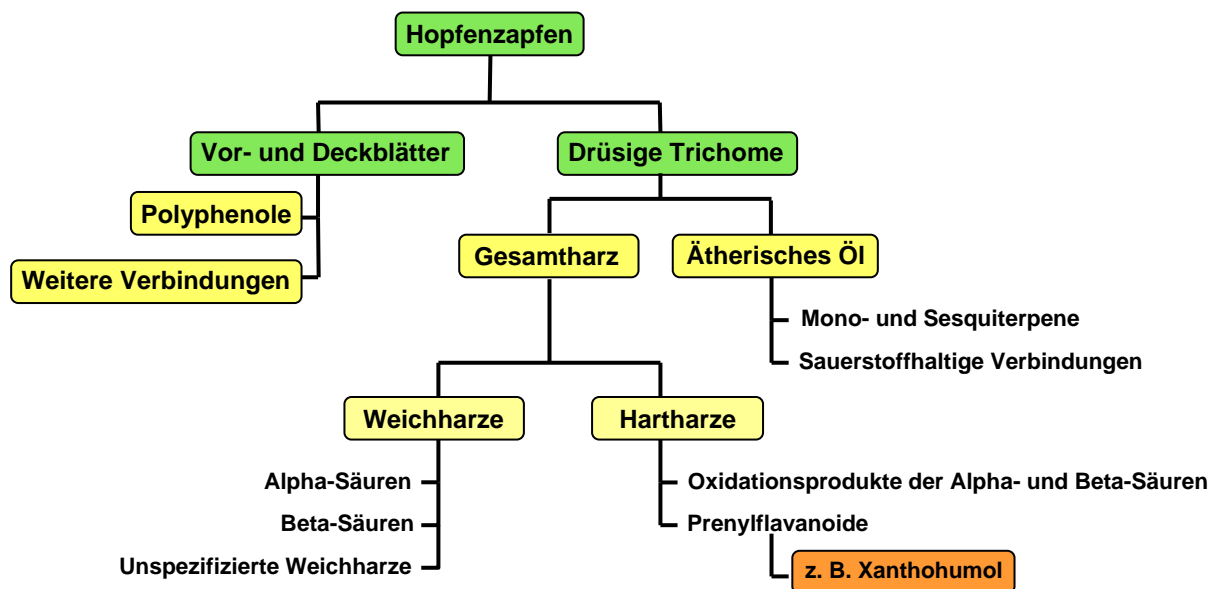


Abbildung 1.5: Übersicht der Inhaltsstoffe der Vor- und Deckblätter sowie der glandulären Trichome von *H. lupulus*-Zapfen.

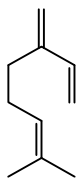
Das ätherische Öl des Hopfens enthält eine große Anzahl flüchtige Verbindungen, neuere Schätzungen reichen bis zu mehr als tausend. Roberts und Mitarbeiter (Roberts et al., 2004) identifizierten 119 Verbindungen in Hopfenöl, darunter 45 erstmalig aus Hopfen beschriebene. Bis zu diesem Zeitpunkt waren bereits 440 Verbindungen aus Hopfenöl bekannt. Es macht rund 0,2 bis 2,5% des Trockengewichts der Zapfen aus. Der größte Teil wird von Mono- und Sesquiterpenen sowie sauerstoffhaltigen Verbindungen gebildet. Die mengenmäßig bedeutendsten Terpene sind das Monoterpen Myrcen und die Sesquiterpene α -Humulen und β -Caryophyllen, bedeutendste sauerstoffhaltige Verbindungen sind Linalool, Humulenepoxid und Caryophyllenepoxid (Abb. 1.6) (Verhagen, 1988). Die genaue Zusammensetzung des ätherischen Öls ist abhängig von der Hopfensorte. Einige Sorten enthalten beispielsweise auch größere Mengen Farnesen oder Selenen oder andere Sesquiterpene (Verzele, 1979).

Das Gesamtharz der Hopfendrüsen besteht aus zwei Fraktionen, die durch ihre Löslichkeit in Hexan unterschieden werden (Abb. 1.5). Während die so genannten Weichharze in Hexan gut löslich sind, lösen sich die Hartharze dagegen darin nicht. Zu den Weichharzen gehören die Hopfenbitterstoffe, die von den Alpha- und Beta-Säuren gebildet werden und die wichtigsten Inhaltsstoffe des Hopfens für das Bierbrauen darstellen. Ihr Anteil am

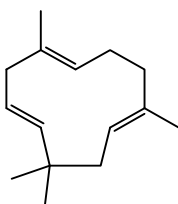
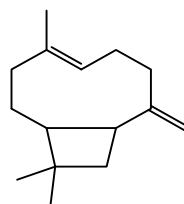
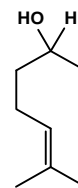
Trockengewicht der Hopfenzapfen ist sortenabhängig und kann bis zu 27,5% (Alpha-Säuren 1,5-18%, Beta-Säuren 2,5–8%, Rest unspezifizierte Weichharze, entnommen aus Biendl und Pinzl, 2007) betragen. Chemisch handelt es sich bei den Alpha-Säuren um di- und bei den Beta-Säuren um triprenylierte Derivate des Phloroglucinols, die jeweils eine Mischung aus Homologen darstellen, die sich in ihrer Oxo-Alkyl-Seitenkette unterscheiden. Zu den Alpha-Säuren gehören Humulon, Cohumulon, Adhumulon, Prähumulon und Posthumulon. Analog dazu wird die Gruppe der Beta-Säuren von Lupulon, Colupulon, Adlupulon, Prälupulon und Postlupulon gebildet (Abb. 1.6) (Verzele, 1979). Erst kürzlich wurden sechs weitere Derivate des Lupulons aus Hopfenzapfen isoliert (Zhao et al., 2005). Für die Bitterkeit des Bieres sind weder die Alpha- noch die Betasäuren, sondern die Isomerisierungsprodukte der Alpha-Säuren, die Iso-Alpha-Säuren verantwortlich, die während des Kochens beim Brauen gebildet werden. Auch in den drüsigen Trichomen der Blätter und männlichen Blüten wurden Alpha- und Betasäuren nachgewiesen, wobei aber hier die Beta-Säuren mengenmäßig bei den meisten Hopfensorten über die Alpha-Säuren dominierten (De Keukeleire et al., 2003). Zu den Hartharzen zählen sowohl Oxidationsprodukte der Alpha- und Beta-Säuren als auch die Prenylflavonoide, die strukturell zu den Polyphenolen gehören und in den Lupulindrüsen angereichert werden.

Die Vor- und Deckblätter der Hopfenzapfen sind reich an phenolischen und polyphenolischen Verbindungen (Abb. 1.6), die sich nicht in Trichomen anreichern. Der Gesamtpolyphenolgehalt der Hopfenzapfen beträgt 3-6% (w/w) (De Keukeleire et al., 1999), wozu phenolische Säuren, Flavonole und Flavonolglykoside, Flavanole und deren Dimere, Oligomere und Polymere (Proanthocyanidine) zählen. Bei den isolierten Flavonolglykosiden handelt es sich um Glykoside von Quercetin und Kaempferol, wobei die Rutinoside und Glukoside die Hauptverbindungen bilden (McMurrough, 1981; Sägesser und Deinzer, 1996). Die Proanthocyanidine sind Oligomere und Polymere aus polyphenolischen Flavan-3-olen, wie Catechin, Gallocatechin und deren Epimeren, die Procyanidine und Prodelphinidine bilden. Proanthocyanidine aus bis zu 20 Einheiten wurden bisher aus Hopfen isoliert (Taylor et al., 2003). Ein Stilben, das *trans*-Resveratrol (bis zu 1 mg/kg) und die glukosilierten Derivate *trans*-Piceid und *cis*-Piceid wurden vor kurzem erstmals als Hopfeninhaltsstoffe nachgewiesen (Callemien et al., 2005; Jerkovic et al., 2005), wobei nicht untersucht wurde, ob sie sich in den Trichomen oder Deckblättern anreichern.

Verbindungen des ätherischen Öls:

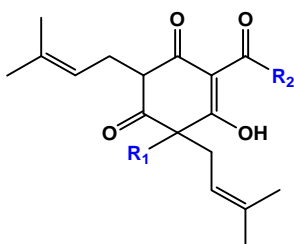


Myrcen

 α -Humulen β -Caryophyllen

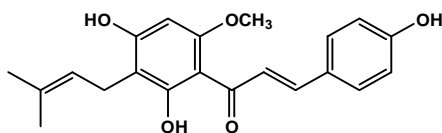
Linalool

Bittersäuren:

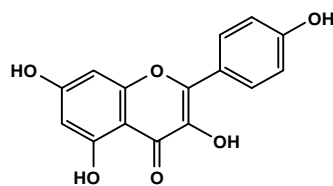
 $R_1 = -OH$ $R_1 = -CHCHCH(CH_3)$

| % | Alpha-Säuren | R_2 | Beta-Säuren | % |
|-------|--------------|-----------------------|-------------|--------------|
| 35-70 | Humulon | $-CH_2CH(CH_3)_2$ | Lupulon | 35-55 |
| 20-55 | Cohumulon | $-CH(CH_3)_2$ | Colupulon | 20-55 |
| 10-15 | Adhumulon | $-CH(CH_3)CH_2CH_3$ | Adlupulon | 10-15 |
| 1-10 | Prähumulon | $-CH_2CH_2CH(CH_3)_2$ | Prälupulon | 1-3 |
| 1-5 | Posthumulon | $-CH_2CH_3$ | Postlupulon | keine Angabe |

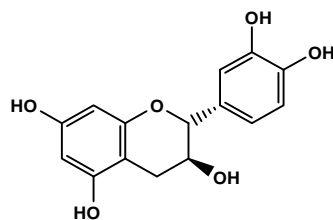
Polyphenole:



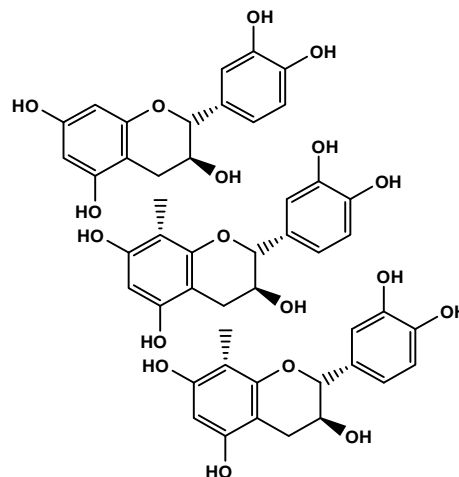
Xanthohumol



Kaempferol



Catechin



Proanthocyanidin

Abbildung 1.6 Ausgewählte Verbindungen des ätherischen Hopfenöls, die Hauptbestandteile und Prozentanteile der individuellen Alpha- und Betasäuren der Hopfen-Bittersäuren (Verzele, 1979), sowie Beispiele für polyphenolische Verbindungen aus *H. lupulus*.

1.3.1 Xanthohumol und andere Prenylflavonoide aus *H. lupulus*

Prenylierte Flavonoide kommen nur bei höheren Pflanzen vor und hier vorwiegend in den Familien der drei Ordnungen: Urticales, Fabales und Asterales (Barron und Ibrahim, 1996). Innerhalb der Urticales haben die Familien Moraceae und Cannabaceae die größte Bedeutung als Quelle von Prenylflavonoiden. Aus Hopfen sind bisher 30 verschiedene prenylierte, geranylierte und oxidierte Chalkone bekannt (Chadwick et al., 2006), die in den glandulären Trichomen als Teil des Lupulins angereichert werden. Das Chalkon Xanthohumol (3'-[3,3-Dimethylallyl]-2',4',4'-Trihydroxy-6'-Methoxychalkon) ist in rund zehn- bis hundertfach höherer Konzentration vorhanden als die anderen Chalkone (Stevens und Page, 2004) und macht 0,1–1% (w/w) des Trockengewichts der Hopfenzapfen aus. Fast alle im Hopfen vorkommenden Chalkone sind Derivate des Desmethylxanthohumol (2',4,4',6'-Tetrahydroxy-3'-Prenylchalkon) (Abb. 1.7). Sie unterscheiden sich u. a. in der Position der Prenylierung (bzw. der Geranylierung), wobei sich die Prenylgruppe (Geranylgruppe) in 5'- oder/und 3'-Position befinden kann. Mono- und dimethylierte Verbindungen mit der Methoxygruppe am 6'- und/oder am 4'-Kohlenstoffatom (z.B. Xanthogalenol) sind isoliert worden. Dabei ist das Vorkommen von 4'-*O*-Methylchalkonen auf bestimmte Verbreitungsgebiete und Unterarten von *H. lupulus* beschränkt. Sie sind nicht in kultivierten Hopfensorten europäischer Herkunft, sowie in wilden europäischen (*H. lupulus* var. *lupulus*) und in Hopfenpflanzen aus Südwestamerika (*H. lupulus* var. *neomexicanus*) vorhanden, kommen aber in japanischen (*H. lupulus* var. *cordifolius*) und amerikanischen Hopfenpflanzen östlich der Rocky Mountains (*H. lupulus*), sowie einigen Hopfensorten mit amerikanischem Erbgut vor (Stevens et al., 2000). Chadwick et al. (2006) unterscheiden Chalkone mit dem Prenylierungs- und Methylierungsmuster von Xanthohumol (Xanthohumol-Serie), dem von Xanthogalenol (Xanthogalenolserie) und dem von Desmethylxanthohumol (Desmethylxanthohumol-Serie) (Abb. 1.7).

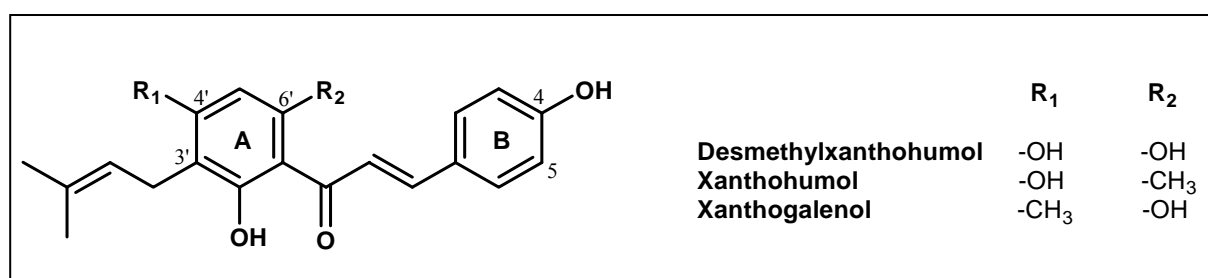


Abbildung 1.7 Struktur beispielhafter Prenylflavonoide aus *H. lupulus*.

Alle Chalkone, die in 2'- und/oder 6'-Position eine freie Hydroxylgruppe besitzen, können zum korrespondierenden Flavanon isomerisieren. Xanthohumol isomerisiert zu Isoxanthohumol und Desmethylxanthohumol zu 6- und 8-Prenylnaringenin im Verhältnis von ca. 3:2 (Abb. 1.8). Das Vorkommen von geringen Mengen dieser Flavanone im Hopfen ist wahrscheinlich auf die nicht enzymatische Umwandlung während der Lagerung und Verarbeitung zurückzuführen (Stevens et al., 1998).

Neben den prenylierten Chalkonen kommen auch Chalkonaringenin (2',4,4',6'-Tetrahydroxychalkon) und ein Derivat dessen, das Flavokawin (4',6'-Di-O-Methylchalkonaringenin) in Hopfen vor (Stevens et al., 2000).

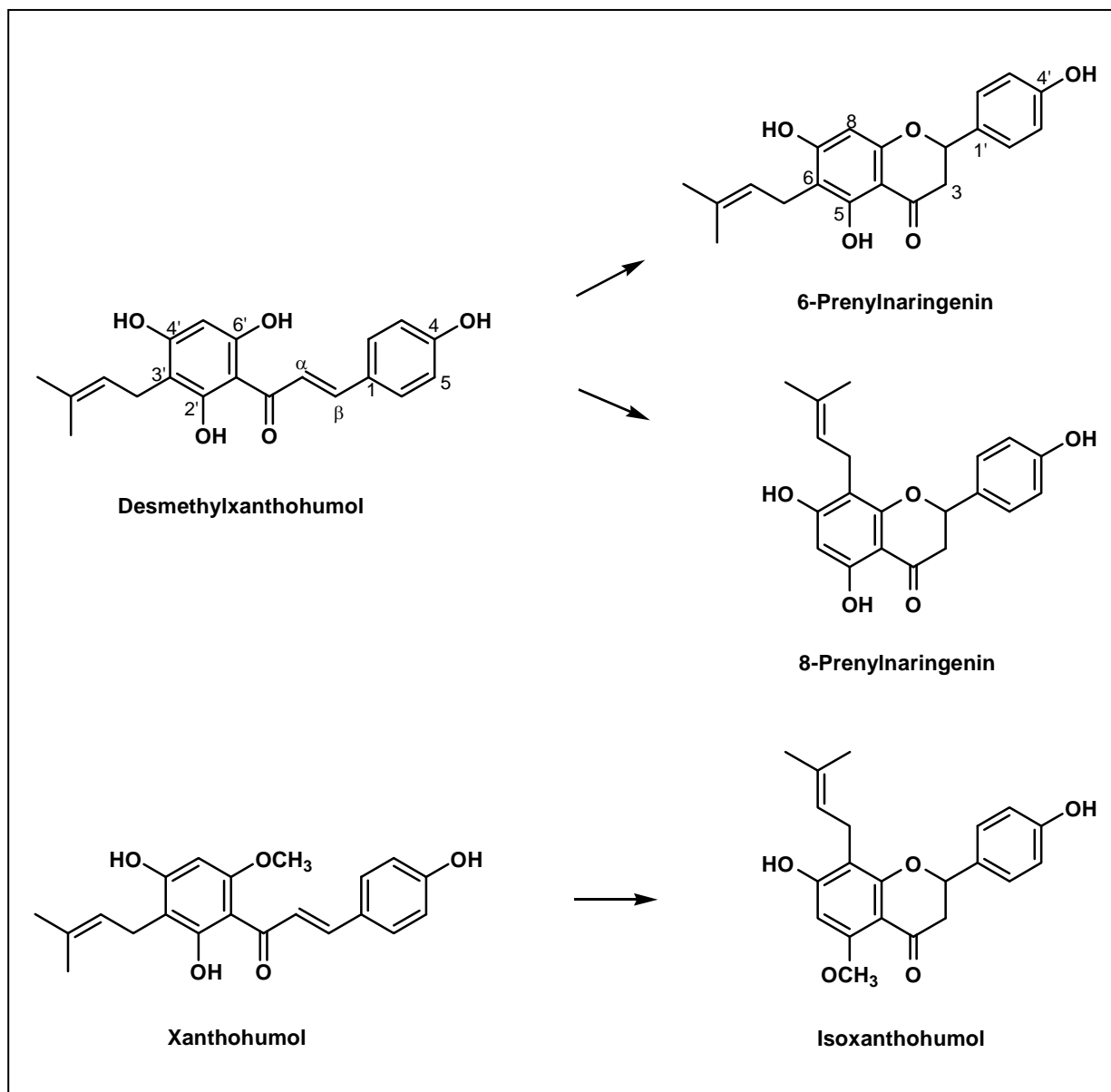


Abbildung 1.8 Isomerisierung von Chalkonen aus *H. lupulus* zu den korrespondierenden Flavanonen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde Pflanzenmaterial der Hopfensorte „Hallertauer Taurus“ verwendet. Es handelt sich dabei um eine deutsche Sorte, die einen hohen Gehalt an Alpha-Säuren aufweist und die sich durch den höchsten Xanthohumol-Gehalt aller bis dato bekannten Hopfensorten auszeichnet. Sie enthält 12-16% (w/w) Alpha-Säuren, 4% (w/w) Beta-Säuren, 0,91% Xanthohumol (w/w) und 1,4% (v/w) Gesamtöl, das aus 30% Myrcen, 30% Humulen, 8,4% Caryophyllen und 0,2% Farnesen besteht (Angaben nach Hopsteiner, VDS 14/01) (Abb. 1.9).

***Humulus lupulus* cv. Taurus - Trichomextrakt**

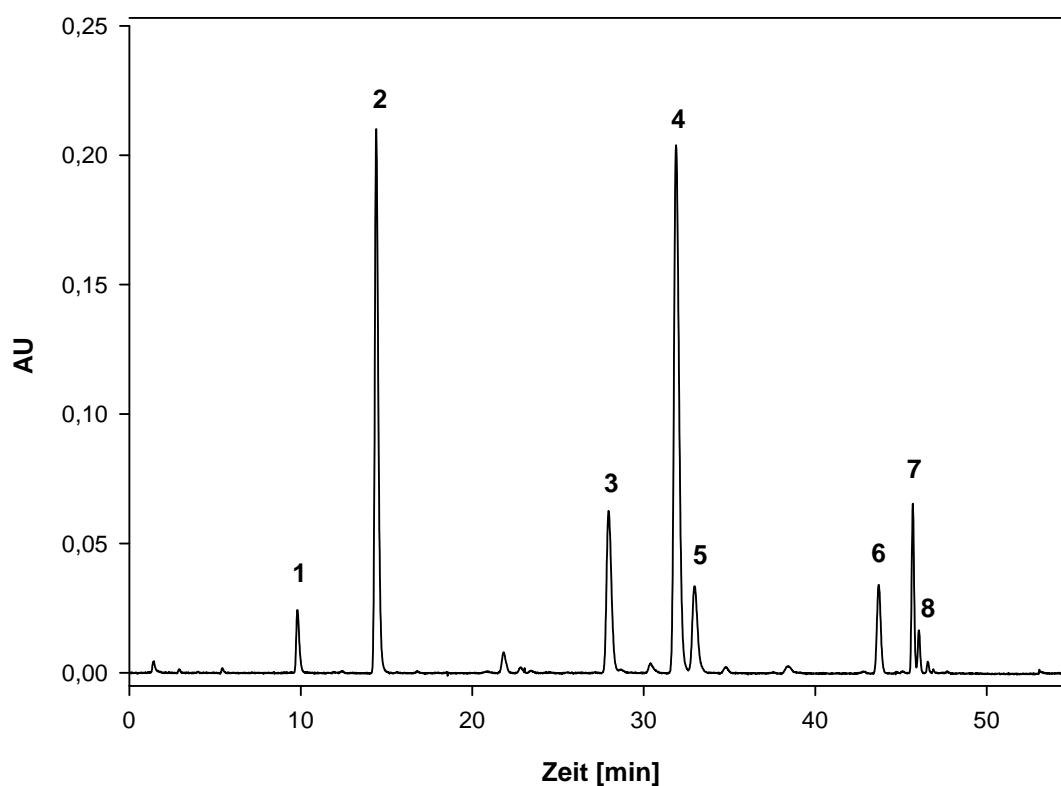


Abbildung 1.9 HPLC-Chromatogramm eines Extrakts aus den glandulären Trichomen von *H. lupulus* cv. „Taurus“. Der Extrakt wurde mit 75% Acetonitril und 25% Wasser/0,1% TFA als Lösungsmittel hergestellt. Die Detektion erfolgte mittels PDA bei 370 nm. 1 = Desmethylxanthohumol, 2 = Xanthohumol, 3 = Cohumulon, 4 = Humulon, 5 = Adhumulon, 6 = Colupulon, 7 = Lupulon, 8 = Adlupulon (2.2.2.1).

1.3.1.1 Medizinische Forschung zum Hopfeninhaltsstoff Xanthohumol

Vor allem in den letzten 15-20 Jahren ist das Interesse der pharmazeutisch-medizinischen Forschung am Hopfen stark gestiegen. Es sind zahlreiche Veröffentlichungen zum Wirkungspotential der Hopfenbittersäuren (Tobe et al., 1997; Yamamoto et al., 2000; Shimamura et al., 2001) und ihrer Isomerisierungsprodukte (Yajima et al., 2004; Namikoshi

et al., 2007) erschienen. Das Flavanon 8-Prenylnaringenin (Abb. 1.8) wurde als wirksamstes aller bisher bekannten Phytoöstrogene identifiziert (Milligan et al., 1999).

Viel versprechende medizinische Wirkungen zeigt das Chalkon Xanthohumol. Es inhibierte die Rattenleber-Diacylglycerol-Acyltransferase aus dem Syntheseweg des Triacylglycerol (IC_{50} : 50,3 μ M), dessen Akkumulation zu Fettleber und Fettleibigkeit führen kann (Tabata et al., 1997). Xanthohumol hemmte die Proliferation von humanen Brustkrebszellen (nach viertägiger Inkubation IC_{50} : 3,5 μ M) und Eierstockkrebszellen (nach zweitägiger Inkubation IC_{50} : 0,52 μ M) (Miranda et al., 1999) und zeigte viel versprechende Wirkungen als chemopräventives Agens bei der Karzinogenese von Prostatazellen, indem es die Lebensfähigkeit der Krebszellen konzentrationsabhängig (2,5-20 μ M) verminderte (Colgate et al., 2007). Die Wirkung von Xanthohumol in den verschiedenen Phasen der Karzinogenese beruht u. a. auf der Induktion von Enzymen, die in den Stoffwechsel und die Detoxifizierung von Karzinogenen involviert sind (Gerhauser et al., 2002). Ein solches Enzym ist die Quinonreduktase, deren spezifische Aktivität durch Xanthohumol in einer Konzentration von $1,7 \pm 0,7$ μ M verdoppelt wird (Dietz et al., 2005). Außerdem wurde durch Xanthohumol *in vivo* das Wachstum eines vaskulären Tumors inhibiert, indem es hemmend auf den Prozess der Angiogenese wirkte (Albini et al., 2006). Mehrfach wurde die antimikrobielle Wirksamkeit von Xanthohumol aufgezeigt. Es ist wirksam gegen *Staphylococcus aureus* (minimale inhibitorische Konzentration: 17,7 μ M), gegen einige Streptococcusarten (minimale inhibitorische Konzentration: 35,3 μ M), inhibiert das Wachstum verschiedener tier- und humanpathogener Viren (IC_{50} : 4,7-7,6 μ M) zeigt fungizide Eigenschaften ($IC_{50} < 150$ μ M) und erwies sich als wirksam gegen den Malariaerreger *Plasmodium* ($IC_{50} < 10$ μ M) (Gerhauser, 2005).

1.3.1.2 Biosynthese von Xanthohumol

Das Prenylflavonoid Xanthohumol wird durch den Phenylpropanoid- und den Polyketidweg synthetisiert. Ausgehend vom Phenylalanin wird in wenigen Reaktionen 4-Cumaroyl-CoA gebildet, das mit drei Molekülen Malonyl-CoA durch das Schlüsselenzym der Flavonoidbiosynthese, die Chalkon-Synthase, unter der Freisetzung von drei CO_2 zu Chalkonaringenin kondensiert (Abb. 1.10C). Die zwei aromatischen Ringe A und B des C_{15} -Grundgerüsts von Chalkonaringenin sind durch eine C_3 -Brücke verbunden. In allen anderen Klassen der Flavonoide erfolgt Ringschluss und Bildung des heterocyclischen Rings C an dieser Stelle. Folgende Oxidations- und Substitutionsreaktionen führen zur großen Vielfalt an Verbindungen der unterschiedlichen Flavonoidklassen. Aus *H. lupulus* wurde das Gen einer

Chalkon-Synthase (*chs_H1*) kloniert, die die Kondensationsreaktion zum Chalkonaringenin katalysiert (Matousek et al., 2002). Das Enzym zeigt hohe spezifische Aktivität während der Zapfenreifung in Trichomen. Bisher wurden insgesamt vier Mitglieder dieser *chs_H1*-Oligogenfamilie nachgewiesen, deren Aminosäuresequenzen zu 99% identisch sind und die wahrscheinlich auch funktionell konserviert sind (Matousek et al., 2006). CHS_H1 besitzt 73% Aminosäureidentität zu Phlorisovalerophenonsynthase (VPS), der Polyketidsynthase, welche Isovaleryl-CoA bzw. Isobutyryl-CoA mit Malonyl-CoA in die Zwischenprodukte der Bittersäure-Biosynthese umsetzt (Abb. 1.10B) (Fung et al., 1994; Zuurbier et al., 1995; Paniego et al., 1999) VPS akzeptiert auch p-Cumaroyl-CoA als Substrat. Seine Chalkon-Synthaseaktivität ist aber verglichen mit der von CHS_H1 gering (Okada et al., 2001). CHS_H1 hingegen könnte auch an der Biosynthese der Bittersäuren beteiligt sein, was kinetische Studien der Umsetzung von Isovaleroyl-CoA und Isobutyryl-CoA mit Malonyl-CoA belegt haben (Novak et al., 2006). Neben *vps* und der *chs_H1*-Oligofamilie sind in Hopfen mindestens vier weitere Gene mit Sequenzähnlichkeit zu Chalkon-Synthase-Genen vorhanden: *chs2*, *chs3*, *chs4* und *chs4-2*. Expression in den Trichomen wurde von *chs2* und *chs4* belegt. Das *chs3*-Gen scheint in den meisten Hopfensorten als Pseudogen vorzuliegen, bisher konnten davon keine Transkripte nachgewiesen werden (Novak et al., 2003; Skopek et al., 2006). In Enzymaktivitätstests der CHS2 und CHS4 mit Isovaleryl-CoA/Isobutyryl-CoA und Malonyl-CoA wurden nur Nebenprodukte der Polyketidsynthasereaktion, die durch vorzeitigen Reaktionsabbruch entstehen, nachgewiesen. Das Substrat p-Cumaroyl-CoA wird von beiden Enzymen nicht akzeptiert. Die *in vivo*-Funktion dieser Proteine ist daher bisher unklar (Okada et al., 2004; Novak et al., 2006).

In der Biosynthese des Xanthohumol folgen ausgehend vom Chalkonaringenin eine Prenylierungsreaktion am 3'-Kohlenstoffatom und eine Methylierung an der 6'-Hydroxylgruppe des A-Rings. Die Abfolge dieser Reaktionen ist bisher unklar, wahrscheinlich ist aber, dass erst die Prenylierungsreaktion und danach die Methylierungsreaktion stattfindet, da aus *H. lupulus* Chalkone mit Prenylgruppe und ohne Methylgruppe isoliert wurden. Hingegen ist die nicht prenylierte, methylierte Form, das 6'-O-Methylchalkonaringenin bisher nicht in *H. lupulus* detektiert worden. Die in den Biosyntheseweg des Xanthohumol involvierte Prenyltransferase wurde noch nicht identifiziert. Die für die Prenylierungsreaktion des Bittersäure-Biosyntheseweges benötigten Dimethylallylpyrophosphat-Bausteine (DMAPP) werden vermutlich via Methylerythritolphosphatweg (MEP-Weg) in den Plastiden gebildet. (Abb. 1.10A) (Goese et al., 1999). Es wird auch angenommen, dass das DMAPP für die Prenylseitenkette des

Xanthohumols auch aus dem MEP-Weg stammt (Page und Nagel, 2006). Auch im Biosyntheseweg der Bittersäuren finden Prenylierungsreaktionen statt. Die entsprechenden Enzymaktivitäten wurden in Proteinextrakten von Blüten und Zapfen in der löslichen Fraktion gemessen (Zuurbier et al., 1995; Fung et al., 1997; Zuurbier et al., 1998), die dafür kodierenden Gene aber noch nicht identifiziert. Erst kürzlich wurde zum ersten Mal das Gen einer aromatischen Prenyltransferase isoliert, die Flavonoide von *Sophora flavescens* prenyliert (Sasaki et al., 2008).

Folgt im Biosyntheseweg von Xanthohumol die *O*-Methylierung auf die Prenylierungsreaktion würde Desmethylxanthohumol das Substrat für eine *S*-Adenosyl-L-Methionin-*O*-Methyltransferase (OMT) bilden. Das Gen einer Chalkon-OMT, die Isoliquiritigenin als Substrat umsetzt, ist aus *Medicago sativa* kloniert worden (Maxwell et al., 1993). Aus *Glycyrrhiza echinata* wurde ein Enzym gereinigt, welches in die Biosynthese des Retrochalkons Echinatin involviert zu sein scheint und neben Licodion (1-(2,4-Dihydroxyphenyl)-3-(4-Hydroxyphenyl)-1,3-Propanon) mit geringerer Substratspezifität auch Isoliquiritigenin methyliert (Ayabe et al., 1980; Ichimura et al., 1997)

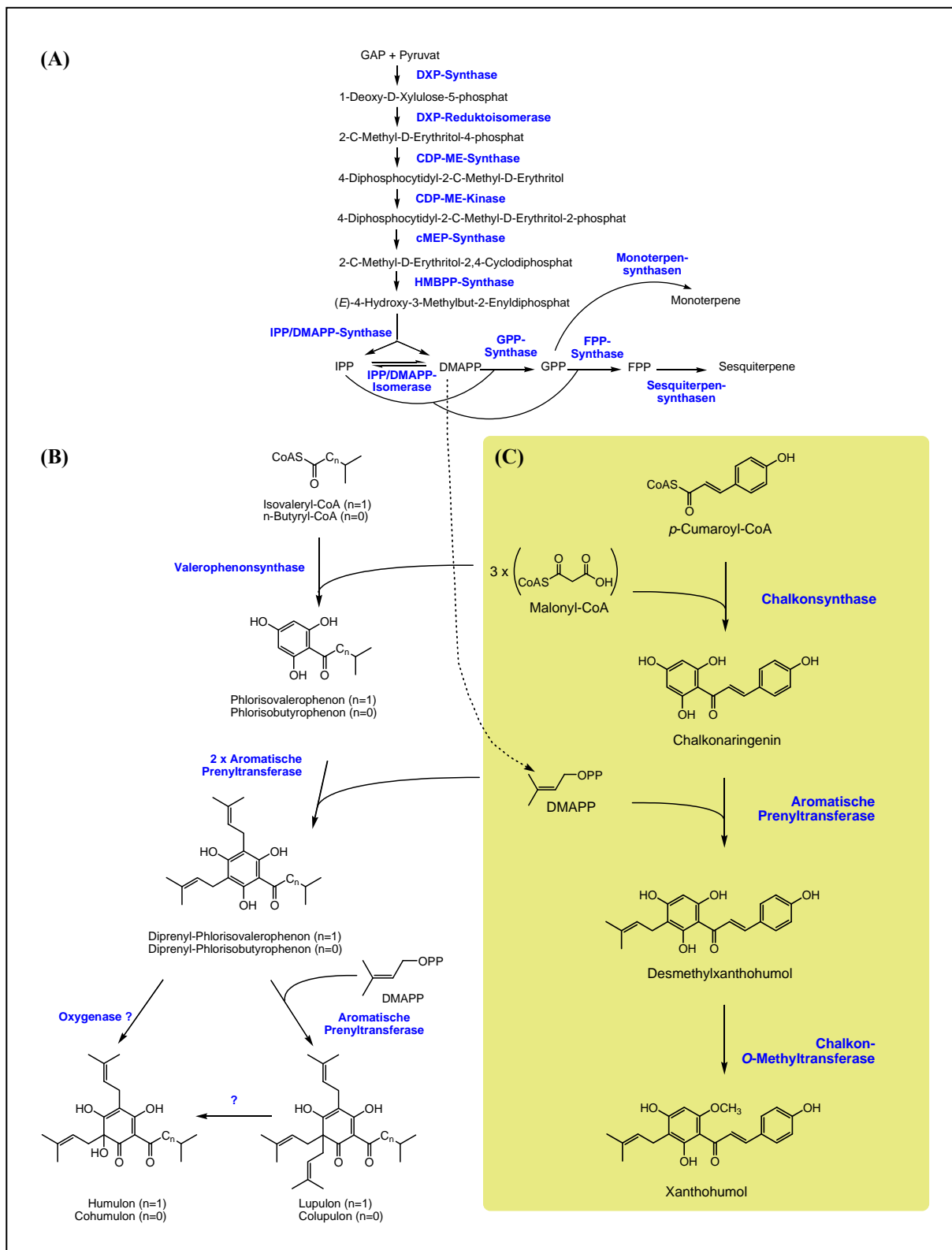


Abbildung 1.10 Schema der Biosynthese der Terpenophenole in *H. lupulus*. (A) Die DMAPP-Moleküle für die Prenylierungen der Bittersäure-Zwischenprodukte stammen wahrscheinlich aus dem plastidären MEP-Weg der Terpenoid-Biosynthese. An der Biosynthese der Bittersäuren (B) und des Prenylflavonoids Xanthohumol (C) sind eine Polyketidsynthasereaktion und mehrere/eine Prenylierungsreaktion(en) sowie weitere, das Grundgerüst dekorierende Reaktionen beteiligt.

1.4 Genexpressionsanalyse durch cDNA-Sequenzierung - Identifizierung neuer Gene

EST-Datenbanken stellen eine nützliche Sequenzinformationsquelle für viele verschiedene Pflanzenarten dar. Besonders für Spezies mit großen Genomen als auch für Nicht-Modellpflanzen bzw. nicht wirtschaftlich genutzte Pflanzen sind sie als Alternative zur Sequenzierung des vollständigen Genoms oder als ergänzende Informationsquelle zum bereits sequenzierten Genom von Bedeutung (Asamizu et al., 2000; Rudd, 2003; Asamizu et al., 2004). Die Ähnlichkeit von ESTs zu Proteinsequenzen mit bekannter Funktion gibt Hinweise darauf, welche Rolle unbekannte Proteine in der Zelle spielen könnten. In umfangreichen EST-Sequenzierprojekten wurden auf diese Weise Kandidaten für vollständige Biosynthesewege identifiziert (Newcomb et al., 2006; Zulak et al., 2007). In Kombination mit der Sequenzierung von ESTs können Macro- oder Microarrays Auskunft über das Genexpressionsprofil zu einem bestimmten Zeitpunkt geben. Gene mit variierendem Expressionsprofil können so identifiziert und funktionell klassifiziert werden (Ralph et al., 2006). Die Korrelation von Metabolitenprofilen einer Spezies oder eines Kultivars mit der Expression spezifischer Gene wurde beispielsweise bei Ziegler et al. genutzt und eine Salutaridin-Reduktase aus dem Morphin-Biosyntheseweg von *P. somniferum* identifiziert (Ziegler et al., 2006). Die Kombination von Metaboliten- und Transkriptanalyse mit EST-Sequenzierung von duftenden und nicht duftenden *Rosa*-Kultivaren war bei der Identifizierung einer Germacren-D-Synthase und weiterer Gene der Duftstoffsynthese erfolgreich (Guterman et al., 2002).

EST-Sequenzierungen bildeten auch mehrfach die Basis zur Identifikation der Funktion von Genen, die in glandulären Trichomen aktiv sind. Ein Beispiel bildet *M. piperita*, bei der fast die gesamte biosynthetische Kapazität der Drüsenhaare der Synthese von Isoprenoiden, z.B. dem Menthol, gewidmet ist (Lange et al., 2000). Zahlreiche Gene der Isoprenoid-Biosynthese, wie die (*E*)- β -Farnesensynthase (Crock et al., 1997) und die 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphatsynthase (Lange et al., 1998), wurden auf diese Weise identifiziert. Die peltaten Drüsen auf den Blättern von *O. basilicum* sind der Hautspeicherort von flüchtigen Verbindungen aus der Klasse der Phenylpropene. Gang et al. (2001) lokalisierten die Aktivität von Enzymen des Phenylpropenstoffwechsels fast ausschließlich in den peltaten Drüsen der Blätter. Sie identifizierten mit Hilfe Trichom-spezifischer EST-Sequenzierung zwei OMTs, die Chavicol bzw. Eugenol methylieren (Gang et al., 2002). Von einer Basilikumvarietät, welche Methylzimtsäure in den Trichomen anreichert, wurden EST-Datenbanken zur

Identifizierung mehrerer ähnlicher Karboxyl-MTs, die Zimtsäure und p-Cumarsäure umsetzen, genutzt (Kapteyn et al., 2007). Der Vergleich zweier Trichom-EST-Sets verschiedener *Lycopersicon hirsutum* f. *glabratum*-Pflanzen, von denen nur eine Methylketone in den Trichomen anreichert, führte zur Identifikation einer Methylketonsynthase (Fridman et al., 2005). Dabei war das für die Methylketonsynthase kodierende Transkript häufig im EST-Set der Pflanze vorhanden, welche Methylketone anreicherte und selten im EST-Set der Pflanze ohne Methylketone. Auch aus *Artemisia annua* wurde mittels EST-Sequenzierung ein Cytochrom P450 Enzym (CYP71AV) identifiziert, welches in die Biosynthese des gegen Malaria wirksamen Artemisins in den Drüsenhaaren involviert ist (Teoh et al., 2006).

1.5 Die Familie der Chalkon-Isomerasen und der Chalkon-Isomerase-ähnlichen Proteine

Bei den Chalkon-Isomerasen (CHIs) handelt es sich um Enzyme, die im Flavonoid-Biosyntheseweg in höheren Pflanzen die stereospezifische Isomerisierung von Chalkonen zu den korrespondierenden Flavanonen katalysieren (Moustafa und Wong, 1967; Hahlbrock et al., 1970). Basierend auf Substratspezifität, Vorkommen und Induzierbarkeit können verschiedene Unterfamilien von CHIs unterschieden werden (Shimada et al., 2003; Ralston et al., 2005). Alle bisher biochemisch charakterisierten Enzyme der Typ I-CHIs setzen als Substrat nur 6'-Hydroxychalkon (4,2',4',6'-Tetrahydroxychalkon, Chalkonarigenin) zu 5-Hydroxyflavanon (5,7,4'-Trihydroxyflavanon, Naringenin) um. Sie sind ubiquitär im Pflanzenreich verbreitet (Abb. 1.11).

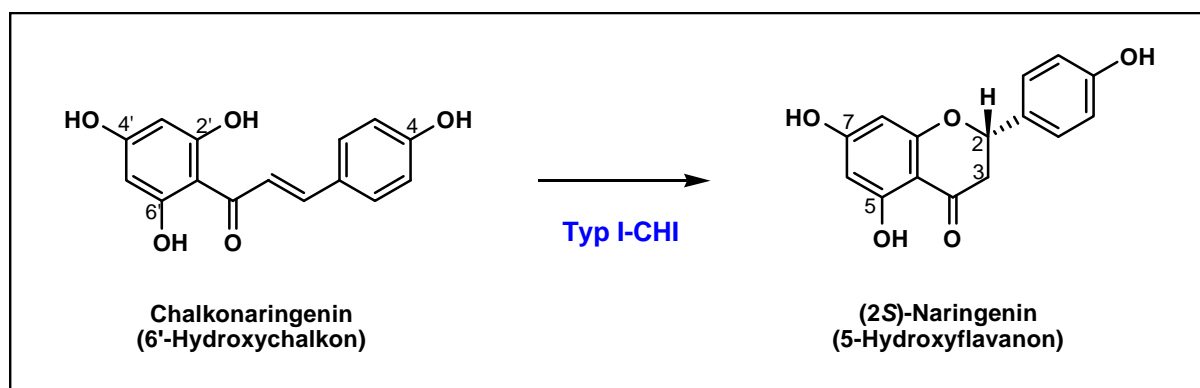


Abbildung 1.11 Typ I-CHIs katalysieren die Isomerisierungsreaktion von Chalkonarigenin zum biologisch aktiven (2S)-Naringenin.

In Leguminosen finden sich auch Typ II-CHIs, welche neben Chalkonarigenin noch die Isomerisierung von 6'-Desoxychalkonen (4,2',4'-Trihydroxychalkon, Isoliquiritigenin) zu 5-

Desoxyflavanonen (7,4'-Dihydroxyflavanon, Liquiritigenin) katalysieren. Diese Isomerisierungsreaktion findet in Lösung bei entsprechendem pH-Wert auch spontan statt. Es ist aber allgemein anerkannt, dass diese Reaktion in der Pflanze von der CHI katalysiert wird. Im Unterschied zur spontanen Reaktion ist die enzymatische Reaktion hoch stereoselektiv, wobei zu 99,99% die Bildung des biologisch aktiven (2*S*)-Isomers katalysiert wird. In der spontanen Reaktion wird dagegen ein (*RS*)-Enantiomeregemisch gebildet. Die enzymatische Umsatzrate übertrifft die spontane um das 10⁷-fache (Bednar und Hadcock, 1988). Das Gen für die CHI aus *A. thaliana* wurde aus der „transparent testa 5“-Mutante kloniert (Shirley et al., 1992). Diese ist durch Samen mit zitronengelber Farbe gekennzeichnet, die durch das Fehlen der CHI-Aktivität keine Flavonole und Anthocyanidine im Samenmantel anreichern.

CHIs wurden aus verschiedenen Pflanzenspezies gereinigt, die entsprechenden Gene kloniert und ihre biochemischen Eigenschaften analysiert (Bednar und Hadcock, 1988; Dixon et al., 1988; Kimura et al., 2001). Die Kristallstruktur und der Reaktionsmechanismus der *M. sativa* Typ II-CHI wurden analysiert (Jez et al., 2000b; Jez et al., 2002; Jez und Noel, 2002). CHIs bilden Monomere von ca. 220 Aminosäuren. Die Identität zwischen verschiedenen Typ II-CHIs liegt mit ca. 80% relativ hoch, die innerhalb der Typ I-CHIs aus verschiedenen Pflanzenfamilien beträgt ca. 70%, wohingegen die Identität zwischen Vertretern beider Typen nur noch ca. 55% beträgt (Shimada et al., 2003). Dementsprechend wurde postuliert, dass Typ II-CHIs aus einer Genduplikation eines ursprünglichen *chi*-Gens vor der Aufspaltung der Fabaceae hervorgegangen sind. Zusammen mit weiteren Enzymen haben sie eine neue Funktion zur Biosynthese von Leguminosen-spezifischen Isoflavonoiden übernommen, die als Phytoalexine fungieren oder Gene von symbiontischen, stickstofffixierenden Rhizobien induzieren. Typ I-CHIs sind an der Biosynthese von Anthocyaninen und Tanninen beteiligt (Ralston et al., 2005).

Neben den katalytisch aktiven CHIs kommen in vielen verschiedenen Pflanzenspezies und in Grünalgen Sequenzen mit geringer Ähnlichkeit zu den CHIs-Sequenzen vor. Sie scheinen fern verwandte Orthologe zu sein und ordnen sich aufgrund ihrer Ähnlichkeit in Typ III- und Typ IV-CHIs ein (Ralston et al., 2005). Keiner dieser Orthologe wurde bisher biochemisch charakterisiert. Aus *Glycine max* wurde jeweils ein Vertreter dieser Unterfamilien isoliert und deren Sequenz analysiert. Sie enthielten nur einige der in den Sequenzen der anderen Unterfamilien konservierten Motive und es fehlten die konservierten Aminosäuren des aktiven Zentrums funktioneller CHIs. Die rekombinanten CHIs zeigten im Enzymtest keine CHI-Aktivität (Ralston et al., 2005) und ihre *in vivo*-Funktion ist bisher nicht bekannt.

1.6 Methylierung

Reaktionen bei denen eine Methylgruppe von einem Donormolekül auf ein Akzeptormolekül übertragen wird, finden bei allen Organismen statt. Der häufigste Methylgruppendonor ist das *S*-Adenosyl-L-Methionin (SAM, auch AdoMet genannt), welches aus Adenosintriphosphat und der Aminosäure L-Methionin synthetisiert wird. Bei diesen SAM-abhängigen Methylierungsreaktionen werden sowohl Makromoleküle als auch kleine Moleküle modifiziert, die für eine Vielzahl von biologischen Prozessen wichtig sind. Transmethylierungen finden an Proteinen, Kohlenhydraten, Lipiden, Nukleotiden und verschiedenen Naturstoffen statt. Schon Bakterien und Pilze bilden methylierte Kohlenhydrate, Aflatoxine und als Antibiotika wirkende Polyketide. Bei Tieren spielen Methylierungsreaktionen eine Rolle bei der Regulation der biologischen Aktivität der cholinergen und adrenergen Neurotransmitter, sowie bei der Biosynthese von verschiedenen zellulären Bestandteilen, wie Phosphatidylcholin, Chinonen, Aminen und Steroiden. Bei Pflanzen sind sie an der Biosynthese einer Reihe von Naturstoffen, wie z. B. Phenylpropanoiden, Flavonoiden, Ligninen, Alkaloiden und einfachen Phenolen beteiligt. Durch die Methylierung der Hydroxyl- bzw. Karboxylgruppen wird die Reaktivität der pflanzlichen Naturstoffe herabgesetzt und ihre Löslichkeit und intrazelluläre Kompartimentierung beeinflusst (Ibrahim und Muzac, 2000). Der Transfer der Methylgruppe auf das Akzeptormolekül wird von Methyltransferasen (MTs) unter Bildung des methylierten Produkts und *S*-Adenosyl-L-Homocystein (SAH) katalysiert.

1.6.1 Die Methyltransferase Superfamilie

Die MTs, die niedermolekulare Substanzen methylieren, werden entsprechend dem Atom des Akzeptormoleküls auf das die Methylgruppe übertragen wird, in verschiedene Familien unterteilt. Demnach unterscheidet man zwischen *C*-, *S*-, *N*- und *O*-Methyltransferasen (Ibrahim und Muzac, 2000).

Bei den *C*-MTs handelt es sich um eine kleine Familie heterogener Proteine deren Vertreter aus Pflanzen, Bakterien und Hefen bekannt sind. Sie methylieren strukturell nicht verwandte Substanzen wie beispielsweise Steroide, Ubiquinon/Menachinon, Tocopherol oder Uroporphyrinogen III und zeigen zueinander keine signifikante Sequenzähnlichkeit (Ibrahim und Muzac, 2000).

N-MTs katalysieren u. a. die Methylierung von Alkaloiden, wovon hier die Putrescin-*N*-MTs aus *Nicotiana tabacum* (Hibi et al., 1994) und die in die Biosynthese des Purinalkaloids

Koffein involvierten *N*-MTs aus Tee- und Kaffeepflanzen (Kato et al., 2000; Mizuno et al., 2003a) als Beispiele erwähnt werden sollen.

Zu den *S*-MTs aus Pflanzen zählen z.B. die N^5 -Methyltetrahydrofolat-abhängige Methionin-Synthase (Ravanel et al., 1998) und die *S*-Methylmethionin-abhängige Thiol-/Selenolmethyltransferase (Neuhierl et al., 1999). Zwei aus *Brassica oleracea* isolierte Thiol-MTs besitzen keine signifikante Sequenzähnlichkeit zu den anderen bekannten pflanzlichen *S*-MTs (Attieh et al., 2002). Ihr Vorkommen ist wahrscheinlich auf solche Pflanzenfamilien reduziert, die Glucosinolate enthalten. Außer schwefelhaltigen Verbindungen können sie auch Halide methylieren. Die cDNA einer haliden MT die an der Synthese von Methylchlorid beteiligt ist, wurde von Ni und Hager (Ni und Hager, 1998) aus *Batis maritima*, einem Halophyt, isoliert.

Die Familie der SAM-abhängigen MTs mit den meisten Vertretern stellen die OMTs dar. Diese können die Methylierung von Hydroxyl- oder Karboxylgruppen der Akzeptormoleküle katalysieren. Methylierungen von Hydroxylgruppen durch OMTs bei Tieren spielen beispielsweise bei der Inaktivierung mutagener Flavonoide eine Rolle oder aber bei der Biosynthese von Melatonin und einigen Neurotransmittern. Bei Pflanzen sind OMTs an der Biosynthese einer Vielzahl von Verbindungen beteiligt, die für zahlreiche biologische Prozesse, wie z. B. Pflanzenwachstum und -entwicklung, Interaktionen mit der Umwelt, der chemischen Abwehr, der Bildung von Festigungsstrukturen und von Blütenpigmenten und der Synthese von Signalstoffen wichtig sind.

C-, *N*-, *S*- und OMTs besitzen zueinander und z. T. auch untereinander keine signifikante oder nur geringe Sequenzähnlichkeit, die sich oftmals auf das Vorhandensein von in verschiedenem Ausmaß konservierten Regionen, die für die Bindung des Kofaktors SAM wichtig sind, beschränkt. Ausnahmen bilden die in die Synthese von Koffein involvierten *N*-MTs und einige pflanzliche Karboxylmethyltransferasen (Karboxyl-MTs), die Sequenzähnlichkeit zueinander aufweisen (1.4.2.2).

1.6.2 Klassifizierung pflanzlicher OMTs

1.6.2.1 Klasse I und Klasse-II OMTs

Die Zahl der pflanzlichen OMTs in den Datenbanken ist innerhalb der letzten Jahre als Ergebnis zahlreicher EST- und genomischer Sequenzierprojekte rasant angewachsen. Ein Großteil davon stellt putative OMTs dar, die aufgrund der Ähnlichkeit ihrer Sequenzen mit anderen OMTs als solche annotiert wurden, deren katalytische Aktivität aber noch nicht experimentell nachgewiesen wurde.

Aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeit sind verschiedene Gruppen von OMTs unterscheidbar. Joshi & Chiang unterschieden zwischen Klasse I- und Klasse II-OMTs (Tab. 1.1). Spezifisch für die zwei Gruppen sind zum einen die Anzahl an Aminosäuren zwischen drei konservierten Regionen (1.3.3) als auch die Größe des kodierten Proteins. Die untersuchten Proteine der Klasse I-OMTs waren zwischen 231-248 Aminosäuren lang und zeigten hohe Sequenzähnlichkeiten (>90%) zueinander. Sie benötigen Magnesium für ihre Aktivität und ihre Sequenzen zeigen signifikante Ähnlichkeit zu Catechol-OMTs von Säugern. Diese besitzen ähnliche Sequenzlängen und benötigen ebenfalls divalente Kationen für ihre Aktivität.

| Tabelle 1.1. Einteilung der OMTs nach Joshi und Chiang (1998), ihre Substrate und Funktionen | | |
|---|--|---|
| | Klasse I-OMTs | Klasse II-OMTs |
| Substrate | Hydroxylgruppen von CoA-Thioestern der Hydroxyzimtsäure; einige auch Flavonole und Kaffeoylglukose | Hydroxylgruppen von Metaboliten verschiedener Verbindungsklassen: Hydroxyzimtsäuren, Flavonoide, Alkaloide, kleine phenolische Verbindungen, Myo-Inositol |
| Funktion | vorrangig Phenylpropanoidstoffwechsel | vielfältige biologische Prozesse |

Die Einteilung der OMTs nach Joshi und Chiang, ihre Substrate und Funktionen sind in Tab. 1.1 dargestellt. Klasse I-OMTs katalysieren die Methylierung von Zwischenprodukten der Ligninbiosynthese und von Stoffwechselwegen von Abwehrprozessen. Ein Vertreter einer neuen Unterklasse von Enzymen der Klasse I-OMTs wurde aus *Mesembryanthemum crystallinum* isoliert. Dieses Enzym konnte neben Kaffeoyl-CoA auch Flavonole und Kaffeoylglukose als Substrate umsetzen (Ibdah et al., 2003).

Die Sequenzen der Vertreter der Klasse II-OMTs zeigen eine geringere Ähnlichkeit zueinander als die der Klasse I-OMTs. Die ca. 40 kDa großen Proteine benötigen keine divalenten Kationen für ihre Aktivität. Das Substratspektrum gestaltet sich sehr divers (Tab.1.1), dementsprechend vielfältig sind die Stoffwechselwege, in die sie involviert sind und ihre Produkte. Beispielsweise kommen in Pflanzen hunderte von *O*-methylierten Flavonoiden vor. Sie gehören den Chalkonen, Retrochalkonen, Flavanonen, Flavonen, Isoflavonen, Flavonolen, Pterocarpanen und Stilbenen an und können mono- oder polymethyliert sein (Ibrahim und Anzellotti, 2003). OMTs, die Alkaloide umsetzen, wurden aus verschiedenen Pflanzenspezies isoliert, so z. B. die Benzylisochinolinalkaloid-OMTs aus *Coptis japonica*, *Thalictrum tuberosum* und *Papaver somniferum* (Takeshita et al., 1995; Frick und Kutchan, 1999; Ounaroon et al., 2003; Ziegler et al., 2005). Von Coiner und Mitarbeitern wurde erst kürzlich eine MT aus *Catharanthus roseus* isoliert, welche

signifikante Sequenzähnlichkeit zu anderen Vertretern der Klasse II-OMTs aufweist, die aber höhere Aktivität bei der Methylierung von Sulfhydrylgruppen als von Hydroxylgruppen zeigt (Coiner et al., 2006). Bisher handelt es sich um die einzige S-MT in dieser Familie. Burga und Mitarbeiter (2005) fanden bei einer MT aus *Ruta graveolens* eine *in vitro*-Pseudosubstratspezifität für DTT. Die endogene Funktion dieser OMT ist noch nicht identifiziert worden.

Eine neuere Arbeit teilt die pflanzlichen OMTs basierend auf strukturellen Studien und Sequenzähnlichkeiten in drei verschiedene Familien ein, wobei hier auch die Enzyme umfasst werden, die die Methylierung von Karboxylgruppen katalysieren (Noel et al., 2003). Typ 1-MTs werden definiert als Enzyme, die Hydroxylgruppen von Verbindungen mit Phenylpropanoid-Grundgerüst methylieren (entspricht Joshi & Chiangs Klasse II-OMTs), wohingegen Typ 2-MTs CoenzymA-derivatisierte Phenylpropanoide als Substrate akzeptieren (entspricht Joshi & Chiangs Klasse I-OMTs) und Typ 3-MTs neben Karboxylsäure-spezifischen auch Alkaloid-N-MTs umfassen. Die phylogenetische Verwandtschaft dieser drei Typen von OMTs war Gegenstand einer vor kurzem erschienen Arbeit. Ein phylogenetischer Stammbaum aus 61 biochemisch charakterisierten OMTs zeigte die Aufteilung in zwei große Gruppen. Die eine enthält Typ 1-OMTs, während die andere sich in zwei Schwestergruppen aufteilt, die von den Typ 2- und Typ 3-OMTs gebildet werden und die demnach näher miteinander verwandt sind (Lam et al., 2007).

1.6.2.2 Karboxyl-Methyltransferasen

Vertreter der Typ 3-MTs katalysieren die Methylierung von Karboxylgruppen sowie von Stickstoffatomen kleinerer Moleküle zu Methylesterderivaten. Erst 1999 wurde der erste Vertreter dieser Familie von MTs aus *C. breweri* isoliert und erwies sich als involviert in die Synthese von Methylsalizylat in *C. breweri*-Blüten (Ross et al., 1999). Diese Enzyme werden aufgrund der Namen von drei der ersten fünf isolierten und charakterisierten Enzyme **SAMT** („SAM:salicylic acid methyltransferase“), **BAMT** („SAM:benzoic acid methyltransferase“) und **Theobrominsynthase** als **SABATH-MTs** bezeichnet (D'Auria et al., 2003). Bei aliphatischen oder aromatischen Säuren mit methylierter Karboxylgruppe handelt es sich oftmals um flüchtige Verbindungen, die sowohl Bestandteil von Blütendüften sind, wie Methylsalizylat und Methylbenzoat, als Chemoattraktoren wirken oder den Geschmack von Früchten ausmachen. Sie können aber auch bei der Pathogenabwehr bei lokalen oder systemischen Resistenzmechanismen bzw. als Signalmoleküle in intra- und interorganismischer Kommunikation eine Rolle spielen. In den Datenbanken sind viele

Sequenzen mit Ähnlichkeit zu dieser Gruppe MTs vorhanden, beispielsweise enthält das Genom von *Arabidopsis thaliana* 24 Gene, die für Proteine aus dieser Gruppe kodieren. Davon sind bisher ein Jasmonsäure-methylierendes Enzym, ein Salizylsäure- und Benzoessäure-methylierendes Enzym, ein Indolelessigsäure-methylierendes Enzym sowie ein Farnesinsäure-methylierendes Enzym, zwei Enzyme die Gibberellinsäure methylieren und eines welches Nikotinsäure als *in vitro*-Substrat umsetzt, charakterisiert bzw. beschrieben worden. Die aus *Coffea arabica* und *Camellia sinensis* charakterisierten *N*-MTs sind in die Koffein- und Theobrominbiosynthese involviert (Kato et al., 1999; Ogawa et al., 2001). Die bisher charakterisierten Enzyme der SABATH-MT-Familie bilden Homodimere mit Untereinheiten von 40-49 kDa. Bisher wurden keine subzellulären Signalsequenzen identifiziert und für zwei Proteine die zytosolische Lokalisation experimentell bestätigt (Kolossova et al., 2001; Ogawa et al., 2001).

1.6.3 Konservierte Motive und strukturelle Charakterisierung pflanzlicher OMTs

Durch Vergleich von MTs-Sequenzen wurde in mehreren Arbeiten der Versuch unternommen, konservierte Sequenzmotive mit funktioneller Bedeutung zu identifizieren. Abhängig von den zu der Zeit vorliegenden und verglichenen Sequenzen wurden SAM-Bindedomänen und weitere konservierte Regionen identifiziert. Von Bugos und Mitarbeitern wurden durch Vergleich einer pflanzlichen OMT mit bakteriellen und tierischen OMTs fünf konservierte Regionen identifiziert, die als SAM-Binderegionen postuliert wurden (Bugos et al., 1991). Kagan und Clarke gaben drei SAM-Bindedomänen an, die bei 84 OMTs von Pro- und Eukaryonten konserviert waren, wovon nur sechs Enzyme aus Pflanzen stammten (Abb. 1.12) (Kagan und Clarke, 1994). Dementsprechend sind diese Regionen in den pflanzlichen Enzymen nur semikonserviert und Region III ist nur teilweise darin auffindbar. Die Kristallstruktur der Catechol-OMT der Ratte wurde 1994 aufgeklärt und führte zur Identifizierung einer SAM- (XLEXGXGXG) und einer Mg²⁺-Binderegion (KGTVL) (Abb. 1.11) (Vidgren et al., 1994). Ibrahim verglich alle derzeit in den Datenbanken vorhandenen 27 OMT-Sequenzen aus verschiedenen Pflanzenfamilien. Er identifizierte fünf konservierte Regionen (I-V) nahe der karboxyterminalen Region der Proteine, die glycinreich und ähnlich zu den von Bugos et al. identifizierten Regionen sind (Ibrahim, 1997). Hier finden sich auch die bei der Catechol-OMT der Ratte identifizierten SAM- und Metallionenbindedomänen als Regionen I und IV wieder. Ein noch umfangreicherer Vergleich von insgesamt 56 pflanzlichen MT-Sequenzen (inklusive einiger *C*- und *N*-MTs) wurde von Joshi und Chiang durchgeführt (Joshi und Chiang, 1998). Sie schlagen drei neue SAM-Bindemotive vor (A, B

und C). Des Weiteren erkennen sie fünf Motive (D, E, F, G und H) die speziell innerhalb der Klasse I-OMTs und vier Motive (I, J, K und L) die innerhalb der Klasse II-OMTs konserviert sind und potentielle Funktionen bei der Substratbindung haben. Dabei ähneln die Regionen J, K und L in ihren Sequenzen denen von II, III und V von Ibrahim identifizierten. Die von Joshi und Chiang als Motiv A und von Ibrahim als Motiv I bezeichnete konservierte Region scheint bei fast allen MTs konserviert zu sein (Abb. 1.12).

| | | | | |
|----------------|-----------------------|--------------------------|-------------------------------|--------------------------|
| Vidgren et al. | XLEXGXGXG I | | | KGTVL |
| Kagan & Clarke | VLDIGGGTG | PQFDAIFC | LLRPGGRLLI | |
| Joshi & Chiang | LVDVGGGXG A | VPXXDAXXMKWI B | ALPXXGKVLIXXEXILP C | LDRXLRLI I |
| | | IKGINFDLPHVI J | PGVEHVGGDMF K | GGKERTXXEFLA L |
| Ibrahim | LVDVGGGXG I | GINFDLPHV II | EHVGGDMF III | GGKERT V |
| | | | NGKVI IV | |

Abbildung 1.12: Entnommen aus Ibrahim und Muzac (2000).

Dargestellt sind die von den verschiedenen Autoren angegebenen konservierten Regionen von MTs. Sie sind mit großen Buchstaben bzw. römischen Zahlen gekennzeichnet. X bezeichnet beliebige Aminosäuren.

Die ersten Kristallstrukturen pflanzlicher OMTs, zweier Flavonoid-OMTs, wurden 2001 veröffentlicht (Zubieta et al., 2001). Danach folgte die strukturelle Charakterisierung weiterer Vertreter der pflanzlichen OMT-Familie. Die Strukturen der verschiedenen OMT-Typen lassen die Konservierung der SAM-Binderegion erkennen. Unterschiede in den Sequenzen haben veränderte Substraterkennung sowie unterschiedliche katalytische Mechanismen für den Methylgruppentransfer zur Folge. Die Isoliquiritigenin-2'-OMT und die Isoflavon-7-OMT aus *M. sativa* (Maxwell et al., 1992; He und Dixon, 1996; Zubieta et al., 2001) bilden ein symmetrisches Homodimer, im Gegensatz zu den vorher kristallisierten nicht pflanzlichen monomeren OMTs. Die Dimerisierung ist notwendig für die funktionelle Aktivität der Enzyme. Die Tertiärstrukturen beider OMTs sind konserviert und weisen eine kleinere N-terminale und eine große C-terminale katalytische Domäne auf. Die Substratspezifität pflanzlicher OMTs wird mittels Seitenkettenvariation der Aminosäuren um die Substratbindungstasche erreicht. Der Reaktionsmechanismus dieser OMTs erfolgt über eine basenvermittelte (ein konserviertes Histidin) Deprotonierung der Zielhydroxylgruppe, worauf ein nukleophiler Angriff des neu gebildeten Phenolatanions des Substrats auf die

reaktive Methylgruppe des SAM folgt. Auch die Kristallstruktur der Kaffeesäure/5-Hydroxyferulasäure 3/5-OMT aus *M. sativa* wurde ermittelt (Zubieta et al., 2002), welche 3- und 5-hydroxylierte Phenylpropanoide methyliert. Die Methylierung dieser Substrate wird durch ein geräumiges aktives Zentrum erreicht. Die dreidimensionale Struktur der Kaffeoyl-CoA-OMT aus *M. sativa*, einer Klasse 1-OMT, wurde erst vor kurzem bestimmt (Ferrer et al., 2005). Auch dieses Enzym bildet Dimere. Ebenso formt die Salizylsäure-Kaboxyl-MT aus *Clarkia breweri* (Zubieta et al., 2003) Homodimere.

1.7 Zielstellung der Arbeit

Die Nutzung des Hopfens durch den Menschen hat jahrhundertlange Tradition, wobei er heute vorrangig zum Brauen von Bier verwendet wird. Daher waren sowohl die Erforschung der in den Hopfenzapfen reichlich akkumulierenden Inhaltsstoffe als auch Zuchtbemühungen vorrangig auf den Einsatz von *H. lupulus* als Brauereizutat ausgerichtet. Pharmakologische Untersuchungen der letzten zehn Jahre haben hingegen interessante medizinische Wirkungen der Hopfenbittersäuren und der polyphenolischen Inhaltsstoffe, insbesondere des Prenylflavonoids Xanthohumol, nachweisen können. Aufgrund seiner krebspräventiven und tumorinhibierenden Eigenschaften könnte es zukünftig zur Behandlung bestimmter Arten von Krebs eingesetzt werden.

Xanthohumol reichert sich in den Trichomen der weiblichen Hopfenzapfen an. Es besitzt ein Chalkongrundgerüst, an dem sich eine Prenyl- und eine Methylgruppe befinden. Seine Biosynthese ist jedoch bisher nicht vollständig aufgeklärt. Sie beginnt wie der allgemeine Flavonoid-Biosyntheseweg in Pflanzen mit der Kondensation von Malonyl-CoA mit drei Molekülen Cumaroyl-CoA zum Chalkonaringenin. Eine Polyketidsynthase, die CHS_H1, deren Gen aus Hopfen kloniert wurde, katalysiert diese Reaktion. Anschließend finden eine Prenylierungs- und eine *O*-Methylierungsreaktion statt. Es ist aber nicht bekannt in welcher Reihenfolge diese Reaktionen ablaufen und die Gene dieser Enzyme sind bisher aus *H. lupulus* noch nicht isoliert worden.

Um den Biosyntheseweg des Xanthohumol zu klären, sollte in dieser Arbeit eine cDNA-Bibliothek aus Trichomen einer Xanthohumol-reichen Hopfensorte konstruiert werden. Die Analyse der ESTs sollte Kandidaten für die noch nicht identifizierten Enzyme dieses Biosyntheseweges finden. Die ausgewählten cDNAs sollten in einem heterologen System exprimiert und die rekombinanten Proteine charakterisiert werden.

Die Erkenntnisse dieser Arbeit können die Grundlage für Eingriffe in die Prenylflavonoid-Biosynthese in Hopfen bilden, sowie neue Anwendungsbereiche für diese alte Kulturpflanze erschließen helfen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Pflanzenmaterial

Alles in dieser Arbeit verwendete Pflanzenmaterial von *H. lupulus* stammte von der Sorte „Taurus“. Hopfenzapfen wurden am 21. August 2002 und am 23. August 2003 in Mainburg/Bayern sowie am 22. und 31. August 2005 in Baasdorf/Sachsen-Anhalt von auf dem Feld kultivierten Pflanzen gesammelt. Dort wurden im August 2005 auch verschiedene Gewebe (junge und ausgewachsene Blätter, Stängel, Wurzeln, weibliche Blüten) und über einen Zeitraum von vier Wochen Hopfenzapfen verschiedenster Entwicklungsstadien gesammelt. Dabei handelt es sich um kleine Zapfen (~1 cm lang), mittelgroße Zapfen (~2 cm lang) reife Zapfen (~3 cm lang). Die Pflanzengewebe wurden auf Eis gelagert. Von den Hopfenzapfen wurden Trichome isoliert (2.2.3). Alle anderen Pflanzenmaterialien wurden in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Männliche Hopfenblüten wurden von Dr. Paul Matthews in Yakima/USA gesammelt und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Außerdem wurden Hopfenpflanzen aus Samen gezogen und im Gewächshaus unter natürlichen Temperatur- und Lichtbedingungen kultiviert. Davon wurde frisches Blattmaterial für Experimente entnommen. Die Samen waren ebenfalls von Dr. Paul Matthews bezogen worden.

2.1.2 Insektenzellen und Insektenzellkultur

Es wurden Zellen von *Spodoptera frugiperda* der Linie Sf9 (Invitrogen) verwendet und in GIBCO™ SF-900 II SFM Medium (Invitrogen) kultiviert. Dabei kamen T25-Zellkulturgefäße (BD Biosciences), 100 ml- als auch 500 ml-Rührgefäße mit magnetischem Rührer (Bellco Biotechnology) und Zellkulturplatten mit 24 Vertiefungen (Nunc) zum Einsatz.

2.1.3 Bakterienstämme

Die aufgeführten Bakterienstämme (Tab. 2.1) kamen in der Arbeit zum Einsatz und wurden für die jeweils angegebenen Arbeiten verwendet.

Tabelle 2.1 Die verwendeten Bakterienstämme.

| Stamm | Genotyp | Verwendung |
|--|---|---|
| <i>E. coli</i> ElectroMAX™ DH10B™ (Invitrogen) | F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 deoR recA1 endA1</i> <i>ara</i> Δ139 Δ(<i>ara, leu</i>)7697 <i>galU galK λ⁻ rpsL</i> <i>rpsL(Str^R) nupG</i> | Allgemeine Klonierungsarbeiten |
| <i>E. coli</i> XL1-Blue MRF ⁺ (Stratagene) | Δ(<i>mcrA</i>)183 Δ(<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI^fZΔM15 Tn10 (Tet^r)</i>] | Ausplattieren der SMART cDNA-Bank |
| <i>E. coli</i> Max Efficiency® DH10BAC™ (Invitrogen) | F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 deoR recA1 endA1</i> <i>ara</i> Δ139 Δ(<i>ara, leu</i>)7697 <i>galU galK λ⁻ rpsL</i> <i>nupG /bMON14272/ pMON7124</i> | Produktion von rekombinantem Bacmid im Bac-to-Bac® Baculovirus Expressionssystem |
| <i>E. coli</i> BL21-CodonPlus® (DE3)-RIL, (Stratagene) | B F ⁻ <i>ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>dcm⁺ Tet^r gal</i> λ(DE3) <i>endA Hte [argU ileY leuW Cam^r]</i> | Expressionsstamm für rekombinante Genexpression |
| <i>E. coli</i> Rosetta 2 (DE3)pLys (Novagen) | F ⁻ <i>ompT hsdS</i> _B (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3) pLysSpRARE2 ³ (Cam ^R) | Expressionsstamm für rekombinante Genexpression |
| <i>E. coli</i> One Shot® Top Ten (Invitrogen) | F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 deoR recA1 endA1</i> <i>ara</i> Δ139 Δ(<i>ara, leu</i>)7697 <i>galU galK λ⁻ rpsL</i> <i>rpsL(Str^R) nupG</i> | Allgemeine Klonierungsarbeiten |

2.1.4 Vektoren

Die in der Arbeit eingesetzten Vektoren sind unter Angabe des jeweiligen Verwendungszwecks (Tab. 2.2) aufgelistet.

Tabelle 2.2 Die verwendeten Vektoren.

| Plasmidvektor (Hersteller, Literatur) | Merkmale | Verwendung |
|--|--|--|
| pHis8-3 (Jez et al., 2000a) | 5334 bp, modifizierter pET28 Vektor, T7 Promotor, 8 x N-terminaler His-Tag, T7 Terminator, Thrombin-Spaltstelle, Kan ^r | Expressionsvektor für <i>E. coli</i> |
| pHis8-GW (Noel Laboratory, Salk Institut, La Jolla, USA) | 7006 bp, modifizierter pET28 Vektor, T7 Promotor, 8 x N-terminaler His-Tag, attR1 und attR2 Sequenzen, Thrombin-Spaltstelle, Kan ^r | Expressionsvektor des Gateway- Systems für <i>E. coli</i> |
| pET44a(+) (Novagen) | 7311 bp, T7 Promotor, 6 x His-N-terminaler Tag, 6 x His-C-terminaler Tag, 495 AS NUSA-Protein, 15 Aminosäuren S-Tag, T7-Terminator, Thrombin- und Enterokinase-Spaltstellen, Amp ^r | Expressionsvektor für <i>E. coli</i> |
| pGEM-T (Promega) | 3000 bp, 3'T-Überhänge für TA-Klonierung, lacZ- Gen mit integrierter MCS, Amp ^r | Klonierung von PCR-Produkten, Blau-Weiß-Selektion von rekombinanten Klonen |
| pCR®8/GW/TOPO® (Invitrogen) | 2817 bp, attL1 und attL2 Sequenzen, 3'-T- Überhänge für TA-Klonierung, Spn ^r | Klonierung von PCR-Produkten, Eingangsvektor des Gateway- Systems |
| pENTR/D-TOPO (Invitrogen) | 2580 bp, attL1 und attL2 Sequenzen, GTGG-3'- Überhang, Kan ^r | Klonierungsvektor für gerichtetes Klonen von PCR- Produkten, Eingangsvektor des Gateway-Systems |
| pFastBac HT A, pFastBac HT B (Invitrogen) | 4856 bp, Polyhedrin Promotor, 6 x N-terminaler His-Tag, Amp ^r , Gent ^r | Donorplasmid im Bac-to-Bac Baculovirus Expressionssystem |
| λTriplEx2 (Clontech) | 42,3 kb, lacZ-Gen, Cre-Rekombinase- <i>loxP</i> - vermittelte Rekombination zum Ausschneiden von 3,6 kb Plasmid pTriplEx2, Amp ^r | Phagemid-Vektor für Konstruktion der cDNA-Bank |

2.1.5 Medien

LB-Medium/LB-Agar:

Die Kultivierung der Bakterien erfolgte entweder als Suspensionsschüttelkultur (180-220 rpm) oder auf Petrischalen mit Luria-Bertani Agar (Sambrook et al., 1989) bei 37°C. Zur Selektion der rekombinanten Bakterienklone wurden Antibiotika in folgenden Konzentrationen (soweit nicht anders angegeben) zugesetzt: Kanamycin (50 µg/ml), Ampicillin (50 µg/ml), Carbenicillin (50 µg/ml), Chloramphenicol (50 µg/ml), Gentamycin (7 µg/ml), Spectinomycin (100 µg/ml), Streptomycin (50 µg/ml), Tetrazyklin (10 µg/ml), Rifampicin (10 µg/ml).

NZY-Agar/NZY-Top Agar:

Die mit λ -Phagenpartikeln infizierten Bakterienkolonien der Trichom-cDNA-Bank wurden mit NZY-Top Agar (NZY Medium + 0,7% (w/v) Agarose) auf NZY-Agar-Platten (NZY-Medium + 15% (w/v) Agar) ausplattiert (Sambrook et al., 1989).

SOC-Medium:

SOC-Medium wurde gemäß (Sambrook et al., 1989) hergestellt.

SF-900 II SFM Medium:

Für die Kultivierung der Insektenzellen und zur Expression rekombinanter Proteine in Insektenzellen wurde SF-900 II SFM Medium (Invitrogen) verwendet. Zusätze wurden nicht hinzugegeben.

2.1.6 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech AG bzw. von der DNA-Synthese-Service-Abteilung des NRC-PBI in Saskatoon (Kanada) synthetisiert.

Tabelle 2.3 Die verwendeten Oligonukleotide. In Oligonukleotide integrierte Schnittstellen für Restriktionsenzyme sind unterstrichen.

| Bezeichnung | Sequenz (5'-3') | Orientierung | Verwendung |
|-------------------|----------------------------------|--------------|--|
| pTriplEx 5' | CTCGGGAAGCGGCCATTGTGTTG GT | sense | Amplifikation und Sequenzierung der cDNA-Inserts der Trichom-cDNA-Bank |
| pTriplEx 3' | ATACGACTCACTATAGGGCGAATT GGCC | antisense | Amplifikation der cDNA-Inserts der Trichom-cDNA-Bank |
| HIOMT3 5'Race | CGCCATCCCATTGGCTGTGTCAA | antisense | 5'Race |
| HIOMT3 5'Race-npr | GGTCATGGGTTTCCATGGTTGTT GATG | antisense | 5'Race nested Oligonukleotid |
| HIOMT2 5'Race | CGGCAGTGGGGATCCATTCAAAC | antisense | 5'Race |
| HIOMT2 5'Race-npr | CATGGGACACTAGTCCGGTGTAC GTT | antisense | 5'Race nested Oligonukleotid |

Fortsetzung von Tabelle 2.3

| | | | |
|------------------|---|-----------|---|
| HIOMT1 pHis8-3f | CGTTGAATTCATGGAATCTCT AAGAGGCCAAGA | sense | Klonierung von HIOMT1 in pHis8-3 |
| HIOMT1 pHis8-3r | GTGCAAGCTTTCACACTAGAA AGGCCTCAATAA | antisense | Klonierung von HIOMT1 in pHis8-3 |
| HIOMT2 pHis8-3f | GAGAATTCATGGAGTTGGCAC GGAATGATCA | sense | Klonierung von HIOMT2 in pHis8-3 |
| HIOMT2 pHis8-3r | GTC AAGCTTTCATTGTGGATA GGCTTCAATGAC | antisense | Klonierung von HIOMT2 in pHis8-3 |
| HIOMT3 pHis8-3f | CCTAGAATTCATGGAGAAGCT AAAGAGTTT | sense | Klonierung von HIOMT3 in pHis8-3 |
| HIOMT3 pHis8-3r | CGATAAGCTTTTATGGATAGA CCTCAATAAG | antisense | Klonierung von HIOMT3 in pHis8-3 |
| HIOMT4a pHis8-3f | TAGGATCCATGGAAGTAGAGC AAGT | sense | Klonierung von HIOMT4a in pHis8-3 |
| HIOMT4b pHis8-3f | GGCGGATCCATGTACACTAAT ACTATAAAT | sense | Klonierung von HIOMT4b in pHis8-3 |
| HIOMT4 pHis8-3r | GCGCGTCGACCTAATTCTTTGT CAAAGA | antisense | Klonierung von HIOMT4a/b in pHis8-3 |
| HIOMT5 pHis8-3f | GACGAATTCATGGCCAACAAT GGTGAAGGA | sense | Klonierung von HIOMT5 in pHis8-3 |
| HIOMT5 pHis8-3r | GACAAGCTTTTAGCTGATCCG ATGGCATATA | antisense | Klonierung von HIOMT5 in pHis8-3 |
| AtOMT pHis8-3f | TAGAATTCATGGGTTCAACGG CGGAGACACAATT | sense | Klonierung von AtOMT3 in pHis8-3 |
| AtOMT pHis8-3r | CGGAAGCTTTTAGAGCTTCTT GAGTAACTCAATAAGG | antisense | Klonierung von AtOMT3 in pHis8-3 |
| HICHI1f | CACCATGGCAACTGCCCTCAACTC AA | sense | Klonierung von HICHI 1 in pENTR/D-TOPO |
| HICHI1r | TTAGAAGAGAGAAAGCATGGACTG TC | antisense | Klonierung von HICHI 1 in pENTR/D-TOPO |
| HICHI2f | CACCATGGCAACTTCCAGAGTGG AAG | sense | Klonierung von HICHI 2 in pENTR/D-TOPO |
| HICHI2r | TTAGAAGAGAGAAAGCATGGACTG TCC | antisense | Klonierung von HICHI 2 in pENTR/D-TOPO |
| HICHI3f | CACCATGGAAAACAACATGGTGAT G | sense | Klonierung von HICHI 3 in pENTR/D-TOPO |
| HICHI3r | TTATTTAGATAACTCAGCAGAGAG | antisense | Klonierung von HICHI 3 in pENTR/D-TOPO |
| AtCH1f | ATGTCTTCATCCAACGCCTGCG | sense | Klonierung von AtCHI in pCR8-GW |
| AtCH1r | TCAGTTCTCTTTGGCTAGTTTTTCC | antisense | Klonierung von AtCHI in pCR8-GW |
| HIOMT1RTf | TAAAGGAACAGTGGTGGACGTTG | sense | RT-PCR von HIOMT1 |
| HIOMT1RTTr | ACCGCATCAGCACTAGGAATTGA | antisense | RT-PCR von HIOMT1 |
| HIOMT2RTf | TCCAGGGAATCCGGAGTTCAACAA | sense | RT-PCR von HIOMT2 |
| HIOMT2RTTr | CGACAACATGGGGTAGATCATAG | antisense | RT-PCR von HIOMT2 |
| HIOMT3RTf | CATTTGACACAGCCAATGGGATGG | sense | RT-PCR von HIOMT3 |
| HIOMT3RTTr | GCAGCTGCAATTGATGATGCCACA | antisense | RT-PCR von HIOMT3 |
| HIOMT4RTf | TTTGGACCCTGCTTCATCGCA | sense | RT-PCR von HIOMT4 |
| HIOMT4RTTr | AGGAGGGCTGGTCTTCGAAATGTA | antisense | RT-PCR von HIOMT4 |
| HIOMT5RTf | GCCAACAATGGTGAAGGAGAGCA | sense | RT-PCR von HIOMT5 |
| HIOMT5RTTr | TGGATGCTTAGCAGTCACTTCCC | antisense | RT-PCR von HIOMT5 |
| CHS_H1RTf | TCACTTTCCGTGGTCTTAACGACA | sense | RT-PCR von CHS_H1 |
| CHS_H1RTTr | TGGCACCATCACTATCAGGAAGGA | antisense | RT-PCR von CHS_H1 |
| VPS RTf | ATCACAGCTTGTATCTTTCGCGGG | sense | RT-PCR von VPS |
| VPS RTTr | TATGGCTCCATCCGAGTTAGGCAA | antisense | RT-PCR von VPS |
| HICHI1RTf | AAGGCCTTAGTGAAGCACTGGGA | sense | RT-PCR von HICHI1 |

Fortsetzung von Tab. 2.3

| | | | |
|-----------------------|----------------------------|-----------|-------------------|
| HICHI1RT _r | AGAAGTTCACTCTCAACCCTGCTC | antisense | RT-PCR von HICHI1 |
| HICHI2RT _f | GGTTTATGGCTTTGCGTTGTATGCAG | sense | RT-PCR von HICHI2 |
| HICHI2RT _r | TTGACCATGCTCACTTTCAGGCCA | antisense | RT-PCR von HICHI2 |
| HICHI3RT _f | CAAAGGGTCCCAATACGGAGTTCA | sense | RT-PCR von HICHI3 |
| HICHI3RT _r | ACCACAATCTCAGCAGTGGGAGAA | antisense | RT-PCR von HICHI3 |
| GAPDHRT _f | ACCGGAGCCGACTTTGTTGTTGAA | sense | RT-PCR von GAPDH |
| GAPDHRT _r | TCGTACTCTGGCTTGTATTCCTTC | antisense | RT-PCR von GAPDH |

2.1.7 Chemikalien und Enzyme

Chemikalien wurden sofern nicht anders angegeben von den Firmen Sigma, Fluka, Roche, Serva, Roth, Merck und Difco bezogen. Die verwendeten Enzyme stammten von New England Biolabs, Invitrogen, Roche, Promega, Stratagene, Ambion und Qiagen. Alle Lösungen und Medien wurden mit doppelt destilliertem Wasser (ddH₂O) angesetzt (EasyPure UV/UF, Barnstead).

Substrate für Enzymtests

Chalkonaringenin, Desmethylxanthohumol, Xanthohumol, Xanthogalenol, 2', 4-Dihydroxychalkon, 6-Prenylnaringenin, 8-Prenylnaringenin und Isoxanthohumol wurden von Dr. Fred Stevens (Oregon State University, USA) zur Verfügung gestellt. Naringenin, Isoliquiritigenin, Resveratrol, Orcinol, Kaffeesäure, S-(5'-Adenosyl)-L-Methionin (SAM), 9-Decensäure und Geranylsäure wurden von Sigma bezogen. Alle anderen als Substrate für Enzymtests verwendeten Substanzen stammen aus der Chemikaliensammlung des PBI (Saskatoon, Kanada).

Radiochemikalien

S-[Methyl-¹⁴C]-Adenosyl-L-Methionin (52,8 mCi/mmol) PerkinElmer

DNA Längenstandards und Nukleotide

100 bp DNA Ladder Invitrogen
 1 kb Plus DNA Ladder Invitrogen
 1 kb DNA Ladder New England Biolabs
 dNTPs Invitrogen

Protein-Molekulargewichtsmarker

Precision Plus Protein Prestained Standard Dual Color Bio-Rad
 Precision Broad Range Unstained Standard Bio-Rad

Szintillationsflüssigkeit

Opti-Fluor O für organische Proben PerkinElmer

Chromatographie und Ultrafiltration

TALON[®] Metal Affinity Resin Clontech
 Amicon[®] Ultra-4 10K Millipore

Reagenziensätze

| | |
|---|--------------------|
| RNeasy Plant Mini Kit | Qiagen |
| E.Z.N.A. [™] Plant RNA Kit | Omega Bio-Tek |
| RNase-free DNase Set | Qiagen |
| Oligotex [®] mRNA Midi Kit | Qiagen |
| Dynabeads Oligo (dT) ₂₅ | Dynal Biotech |
| QIAprep Spin Miniprep Kit | Qiagen |
| Wizard [®] Plus Miniprep DNA Purification System | Promega |
| QIAquick PCR Purification Kit | Qiagen |
| MinElute Reaction Cleanup Kit | Qiagen |
| QIAquick Gel Extraction Kit | Qiagen |
| MinElute Gel Extraction Kit | Qiagen |
| SMART [™] cDNA Library Construction Kit | Clontech |
| GeneRacer [™] Kit | Invitrogen |
| Bac-to-Bac [®] Baculovirus Expression System | Invitrogen |
| pGEM [®] -T Easy Vector System I | Promega |
| SuperScript [™] III First-Strand Synthesis System for RT-PCR | Invitrogen |
| QuantiTect Reverse Transcription Kit | Qiagen |
| Platinum [®] SYBR [®] Green qPCR SuperMix-UDG | Invitrogen |
| ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit | Applied Biosystems |

2.1.8 Geräte

| | |
|--------------------------|--|
| Zentrifugen | 5415D Tischzentrifuge, Eppendorf 5417C Tischzentrifuge, Eppendorf 5810R, Eppendorf |
| pH-Meter | ORION SA720, Fisher |
| Spektralphotometer | Ultrospec 3100 <i>pro</i> , GE Healthcare |
| PCR-Geräte | GeneAmp [®] PCR System 9700, Applied Biosystems |
| QRT-PCR | Mx3000P [®] QPCR System, Stratagene |
| SDS-Page | Mini-PROTEAN 3, BIO-RAD |
| Gelapparatur | Horizontale Gelelektrophorese Apparatur, Horizon 58, (GIBCO BRL) Spannungsgerät BIO-RAD |
| Geldokumentationsgerät | GelDoc 2000, BioRad |
| Sequenziergerät | ABI PRISM [™] 3100-Avant Genetic Analyzer, Applied Biosystems |
| Szintillationszähler | 19 Rackbeta, LKB Wallac |
| FPLC | ÄKTA, UPC900, GE Healthcare |
| HPLC | Alliance 2695, Waters Agilent 1100, Agilent Technologies |
| NMR | Bruker Avance DRX 500 MHz Spectrometer |
| Massenspektrometer | Quadrupole Tandem Mass Spectrometer, Quattro LC, Micromass, UK |
| Elektronenmikroskop | Philips 505 Rasterelektronenmikroskop |
| 2100 Agilent Bioanalyser | Agilent Technologies |
| Ultraschallgerät | Ultrasonic Processor XL, Mandel Scientific |
| Ultraturrax | T25 Basic (IKA-Werke) |

2.2 Methoden

2.2.1 Herstellung von Pflanzenextrakten

Die verschiedenen Hopfengewebe wurden in Flüssigstickstoff tiefgefroren und anschließend mittels Mörser zu feinem Puder zerrieben. Es wurde 150 mg zerkleinertes Gewebe abgewogen und 400 µl gefiltertes 75% Acetonitril/25% TFA (0,1%, v/v) zugegeben und gut vermischt. Die Extraktionsansätze wurden 30 min lang bei RT inkubiert, zwischenzeitlich immer wieder vermischt und danach über eine 0,45 µm SpinX-Filtersäule (Costar, Cambridge, MA, USA) abfiltriert. Danach wurden die Extrakte bei -20°C gelagert oder sofort der flüssigchromatografischen Analyse unterzogen.

2.2.2 Chromatographische Methoden und Analytik

2.2.2.1 Analytische HPLC

HPLC-Analysen wurden mittels einer Alliance 2695 (Waters) Trennanlage ausgeführt. Diese war mit einer RP-(Umkehrphase) Sunfire C18-Säule (4,6 x 150 mm, 3,5 µm) sowie einer Vorsäule (Waters, Sentry X-Terra RP₁₈, 5 µm) ausgestattet. Alle Analysen wurden bei einer Säulentemperatur von 30°C ausgeführt. Laufmittel (A) bestand aus 0,1% Trifluoressigsäure (v/v) in Wasser und Laufmittel (B) war reines Acetonitril.

Hopfenextrakte wurden innerhalb von 40 min über einen Gradienten von 50% A-50% B zu 20% A-80% B bei einer Flussrate von 1 ml/min aufgetrennt und mittels Photo-Diodenarray (PDA)-Detektion zwischen 200 und 700 nm analysiert, wobei Xanthohumol bei 370 nm detektiert wurde.

Auch die Produkte der Enzymtests sowie die verwendeten Substrat- und Produktstandards wurden über den oben beschriebenen Gradienten analysiert.

Für quantitative Analysen wurde eine Xanthohumol-Standardkurve erstellt. Xanthohumol-Konzentrationen von 1,95 µg/ml bis 125 µg/ml wurden in einem Volumen von jeweils 20 µl injiziert und unter obig beschriebenem Gradienten aufgetrennt. Das Auftragen der injizierten Xanthohumol-Mengen gegen das Integral der jeweiligen Xanthohumol-Peaks lieferte eine Kalibationskurve ($r^2=0,999$), die zur Quantifizierung der Xanthohumol-Konzentrationen in den einzelnen Proben herangezogen wurde.

2.2.2.2 Electrospray Ionisation-MS/MS (ESI-MS/MS)

ESI-MS/MS-Analysen wurden im Negativionenmodus mittels eines Quadrupol-Tandem-Massenspektrometers (Quattro LC, Micromass, UK), das mit einer pneumatisch-betriebenen Elektrospray-Ionenquelle (Z-spray, Micromass) ausgerüstet war, durchgeführt. Proben

wurden durch Flow-Injektion mit Hilfe von Lösungsmittelpumpe und Autosampler (1100 Serie, Hewlett Packard) in entsprechenden Volumina in einen Lösungsmittelstrom injiziert, (Flussrate 20 $\mu\text{l}/\text{min}$). Das Laufmittel bestand aus 50% Acetonitril/50% Wasser (0,1% Methansäure).

2.2.2.3 Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie (LC-MS)

LC-MS-Analysen wurden von G. Bishop (PBI, Saskatoon, Kanada) durchgeführt. Ein Waters Alliance 2695 Chromatographie-System, welches mit einem ZQ 2000 Massendetektor und einem 2996 PDA gekoppelt war, wurde für die Analyse verwendet. Trennläufe wurden über eine Waters Sunfire RP(Umkehr) C18-Säule (2,1 \times 150 mm; 3,5 μm) bei einer Flussrate von 0,2 ml/min und einer Säulentemperatur von 35°C durchgeführt. Laufmittel (A) bestand aus 0,15% Essigsäure in 10% Acetonitril (v/v) und Laufmittel (B) aus 0,14% Essigsäure (v/v) in 100% Acetonitril. Folgender Elutionsgradient wurde angewendet: (1) 0-28 min, von 60% A/40% B zu 40% A/60% B; (2) 28–31 min, zu 100% B; (3) 31–39 min, 100% B. Es wurden Volumina von 0,5-10 μl injiziert. Folgende (ESI-) Massendetektorparameter wurden eingestellt: Kapillarspannung 2,7 kV, Conespannung -15 bis -30 V über ein Massenspektrum von 215-425, Extraktorspannung -3,50 V und RF-Linsenspannung -0,7 V. PDA-Detektion erfolgte bei 200-400 nm, mit spezifischer Detektion bei 290 und 370 nm.

2.2.2.4 MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Proteinproben wurden mittels eines Applied Biosystems (Framingham, MA, USA) Voyager-DE STR MALDI-TOF Massenspektrometers, welches mit einem Stickstofflaser (337 nm, 20 Hz) ausgestattet war, von D. Olson (PBI, Saskatoon, Kanada) analysiert. Es wurde in positivem linearem Ionenmodus operiert und Spektren von m/z 5000 bis m/z 100000 erhalten. Das Instrument wurde mit geladenen M+H und doppelt geladenen Ionen mittels BSA kalibriert. Von den Proteinproben wurden 0,75 μl auf der MALDI-Platte mit 0,75 μl Matrixlösung (20 mg/ml 3,5 Dimethoxy-4-hydroxyzimtsäure in 75% Acetonitril/25% Wasser) gemischt. Insgesamt wurden 200 Laserpulse angereichert, gemittelt, geglättet und Hintergrund korrigiert.

2.2.2.5 Größenausschluss-Chromatographie

Größenausschluss-Chromatographie wurde mittels einer Tricorn Superdex 200 10/300 GL Säule (10 x 300-310 mm, 24 ml) (GE-Healthcare) an einer Äkta-FPLC-Anlage, UPC900 (GE-

Healthcare) durchgeführt. Der Laufpuffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 100 mM KCl, 4°C) wurde gefiltert und entgast. Die Flussrate betrug 0,5 ml/min. Das Volumen außerhalb des Säulenmaterials, das Ausschlussvolumen der Säule, wurde mittels Blue Dextran (2000 kDa) ermittelt.

Für die Molekulargewichtsbestimmung von HIOMT1 und HIOMT2 wurden in einem Volumen von jeweils 500 µl 470 µg bzw. 380 µg der gereinigten Proteine aufgetragen. Als Molekulargewichtsmarker wurden folgende Proteine (MW-GF-200 Kit, Sigma) genutzt: β-Amylase (200 kDa), Alkohol-Dehydrogenase (150 kDa), BSA (66 kDa), Carbonische Anhydrase (29 kDa) und α-Lactalbumin (14,2 kDa) und die Mengen gemäß der Anleitung aufgetragen. Die Elution der Proteine wurde durch Absorption bei 280 nm detektiert. Die Molekulargewichtsbestimmung erfolgte anhand einer Kalibrationskurve, welche durch Auftragen des Verteilungskoeffizienten gegen den Logarithmus des Molekulargewichts der Molekulargewichtsmarker erstellt wurde. Der Verteilungskoeffizient K_{av} wurde nach folgender Formel berechnet:

$$K_{av} = (V_e - V_0) / (V_t - V_0)$$

V_e = Elutionsvolumen des Proteins

V_0 = Ausschlussvolumen

V_t = Gesamtvolumen der Säule

2.2.2.6 ¹H-NMR-Spektroskopie und NOESY1D-Experimente

¹H-NMR-Messungen wurden von Yuanzhu Gai (PBI, Saskatoon, Kanada) durchgeführt. ¹H-NMR- und NOESY1D-Spektren wurden mittels eines Bruker Avance DRX 500 Spektrometers bei einer Messfrequenz von 500,13 MHz bzw. 500,33 MHz und RT aufgenommen. Deutertes Dimethylsulfoxid (DMSO-d₆) wurde sowohl als Lösungsmittel als auch als interner Standard (δ ¹H 2,5 ppm) verwendet. Die chemische Verschiebung des Wassersignals betrug 3,33 ppm.

2.2.3 Isolierung von Trichomen

Drüsige Trichome wurden von Hopfenzapfen isoliert, die besonders an ihrer Basis dicht damit besetzt sind. Von frisch geernteten Zapfen wurden die Brakteen und Brakteolen vorsichtig mit den Fingern von der Mittelachse abgetrennt und in flüssigem Stickstoff schock gefroren. Durch wiederholtes kräftiges Rühren in Flüssigstickstoff lösten sich die Trichome von den Blättchen und konnten durch Sieben von der übrigen Blattmasse abgetrennt werden. Im ersten Schritt wurde das Material durch ein Metallsieb (1 mm) und anschließend durch ein

Nylonfiltertuch (0.5 mm) gefiltert. Nach dem Verdunsten des restlichen Flüssigstickstoffs konnte das gelbe Trichompulver bei -80°C gelagert werden.

2.2.4 Grundlegende molekularbiologische Methoden

Grundlegende molekularbiologische Techniken der Nukleinsäuremanipulation wurden, soweit nicht anders vermerkt, gemäß den Protokollen von Sambrook & Russel (Sambrook und Russell, 2001) durchgeführt. Dies beinhaltet die Amplifikation von DNA durch Polymerasekettenreaktionen (PCR), Schneiden von DNA mit Restriktionsenzymen, Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren, elektrophoretische Trennung von DNA auf Agarosegelen, elektrophoretische Trennung von RNA auf Formaldehyd-Agarosegelen, Ethanol-fällung von Nukleinsäuren, Phenol-Chloroform-Extraktion von Nukleinsäuren, Herstellung kompetenter *Escherichia coli* (*E. coli*)-Zellen sowie chemische Transformation bzw. Elektrotransformation von kompetenten *E. coli*-Zellen.

2.2.5 Isolierung von Nukleinsäuren

2.2.5.1 Isolierung von Gesamt-RNA

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus 1 g Trichome wurden die Zellen mit flüssigem Stickstoff im Mörser fein zerrieben und anschließend in 3,5 ml Lysis-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl, 1% SDS, 4% Polyvinylpolypyrrolidon, 1 mM EDTA, pH 8,0, 14 mM β -Mercaptoethanol, 1 mM Aurintricarboxylsäure, 5 mM Thioharnstoff) aufgenommen und 3,5 ml Phenol-Chloroform zugesetzt. Es folgte eine 30 sec lange Homogenisierung mit Hilfe eines Ultraturrax (24000 1/min). Danach wurde das Gemisch 30 min lang kräftig geschüttelt. Nach Abzentrifugation (10 min, 3220 x g) und Abnahme des klaren Überstandes wurde die Phenol-Chloroform-Extraktion wiederholt, worauf ein Chloroform-Extraktionsschritt folgte. Anschließend wurde eine Polysaccharidfällung mit 0,25 vol Ethanol und 0,11 vol Kaliumacetat für 1 h bei 4°C durchgeführt. Nach 15 min Zentrifugation bei 16100 x g wurden dem klaren Überstand 0,1 vol 3 M Natriumacetat, pH 5,2 zugesetzt und 1-2 h bei -20°C gelagert. Nach 20 min Zentrifugation bei 3220 x g wurde das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen, anschließend getrocknet und in 300 μ l TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA, pH 8,0) aufgelöst. Die RNA wurde sodann nach Zugabe von 300 μ l 6 M LiCl über Nacht bei 4°C gefällt, am nächsten Morgen bei 4°C und 16100 x g für 15 min zentrifugiert und das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen. Daraufhin wurde die isolierte RNA mittels des RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) aufgereinigt. Dazu wurde das RNA-Pellet in den Puffer RLT aufgenommen und gemäß dem Protokoll „RNA-clean up“

weiter verfahren. Die noch an die RNA gebundene Aurintricarboxylsäure wurde im Anschluss mittels Sephadex-Gelfiltration entfernt (Skidmore und Beebee, 1989).

Außerdem wurden aus anderen Hopfengewebe sowie aus Blüten und Früchten von *A. thaliana* Gesamt-RNA mit Hilfe des E.Z.N.A. Plant RNA Kit (Omega Bio-Tek, Doaville, GA, USA) gemäß dem Protokoll für schwierige Proben isoliert. RNA, welche als Ausgangsmaterial für die RT-PCR diente, wurde mit DNase I (RNase-free DNase, Qiagen), wie vom Hersteller angegeben, behandelt.

2.2.5.2 Isolierung von Poly-(A⁺)-RNA

Poly-(A⁺)-RNA wurde sowohl mit dem Oligotex mRNA Midi Kit (Qiagen) als auch mit Dynabeads Oligo (dT)₂₅ (DynaL Biotech) isoliert. Das Prinzip beider Methoden beruht auf der Hybridisierung von dT-Oligomeren, die kovalent an die Oberfläche von Polystyren-Kügelchen gebunden sind, mit dem Poly(A)-Rest der Poly-(A⁺)-RNA. Es wurde entsprechend den Herstellerprotokollen verfahren.

2.2.5.3 Isolierung von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) und mit dem Wizard[®] Plus Miniprep DNA Purification System (Promega) isoliert. Die *E. coli*-Kulturen wurden bei 3250 x g 10 min lang abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Danach wurde gemäß den Angaben des Herstellers vorgegangen.

2.2.5.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die DNA-Proben wurden auf Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt und unter UV-Licht (302 nm) mit Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Zur Elution der DNA aus der Gelmatrix wurde der QIAquick Gel-Extraktionskit (Qiagen) oder bei geringer Konzentration der zu isolierenden DNA der MinElute Gel-Extraktionskit (Qiagen) verwendet. Es wurde nach Herstellerangaben weiter verfahren.

2.2.6 Reverse Transkription

Zur Umschreibung der Information der mRNA in cDNA wurde Gesamt-RNA genutzt, die aus Hopfentrichomzellen isoliert worden war (siehe 2.2.5.1). Es wurden 2 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Die cDNA-Synthese wurde mittels Oligo(dT)₂₀-Nukleotid, das mit dem Poly(A)-Rest der mRNA hybridisieren kann, gestartet und gemäß dem Protokoll des SuperScript III

First-Strand Synthesis Systems weiter verfahren (Invitrogen). Diese cDNA wurde als Matrize zur Amplifikation der vollständigen HIOMT-cDNA Klone genutzt.

Analog dazu wurde auch cDNA von *A. thaliana*-Gesamt-RNA synthetisiert, von der cDNAs von AtOMT und AtCHI amplifiziert wurden, die als Positivkontrollen dienten.

Für die RT-PCR wurde cDNA eingesetzt, die mittels des QuantiTect Reverse Transcription Kits (Qiagen) synthetisiert worden war. Dieses System bietet den Vorteil, dass es zusätzlich zur reversen Transkription von mRNA in DNA Verunreinigungen durch genomische DNA, die während des RNA-Isolationsprozesses nicht vollständig entfernt werden konnte, zu eliminieren hilft. Dies wird durch Inkubation der RNA vor dem cDNA-Syntheseschritt für 2 min bei 42°C in einem Puffer erreicht, der das dafür notwendige nicht genauer definierte Agens enthält. Es wurde jeweils 1 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Die cDNA wurde mittels einer Mischung aus Oligo(dT)- und Random-Primern gestartet.

2.2.7 Anhängen von 3'-PolyA-Überhängen

Das 3'-Ende von DNA-Fragmenten mit glatten Enden, die mit *Pfu*-DNA Polymerase generiert worden waren und in den Vektor pGEM-T (Tab. 2.2) ligiert werden sollten, wurde mit zusätzlichen Adenosintriphosphaten versehen. Dafür wurden Aliquots des gereinigten PCR-Fragments mit 0,2 mM dATP in PCR-Puffer und mit 5 U *Taq*-DNA Polymerase für 30 min bei 70°C inkubiert.

2.2.8 Herstellung einer SMART cDNA-Bank und Generierung der ESTs

Zur Herstellung der cDNA Bank wurde der SMART cDNA Library-Konstruktionskit (Clontech) nach Anleitung verwendet. Es wurde Poly-(A⁺)-RNA eingesetzt, die vorher aus Gesamt-RNA von Hopfentrichomen isoliert worden war (2.2.6.1 und 2.2.6.2).

2.2.8.1 cDNA-Synthese mittels „Long Distance“-PCR

Für die Erststrangsynthese der cDNA von cDNA-Bank 1 wurden 700 ng Poly-(A⁺)-RNA eingesetzt. Diese wurden mittels der PowerScript Reversen Transkriptase, einer Mutante der MMLV-Reversen Transkriptase, die keine RNase H-Aktivität besitzt, in cDNA umgeschrieben. Diese Reaktion wurde mittels eines modifizierten Oligo(dT)-Nukleotids (CDS III/3' PCR-Oligonukletid) gestartet. Die PowerScript Reverse Transkriptase verfügt über eine Transferase-Aktivität, welche am 5'-Ende der neu synthetisierten Einzelstrang-cDNA einige zusätzliche dCTP anfügt. Diese können dann mit einem im Ansatz befindlichen SMART IV-Oligonukleotid, das an seinem 3'-Ende eine Oligo-dG-Sequenz aufweist,

hybridisieren. Die dadurch entstandene verlängerte Matrize wird von der Reversen Transkriptase erkannt und der cDNA-Strang bis zum neuen 5'-Ende hin verlängert. Damit enthält die neu gebildete Einzelstrang-cDNA das gesamte 5'-Ende komplementär zur mRNA als auch die Sequenz komplementär zum SMART IV-Oligonukleotid. Diese dient in der folgenden „Long Distance“-PCR als Hybridisierungsstelle für das dabei verwendete Oligonukleotid. Die „Long Distance“-PCR dient zur Amplifizierung der cDNA, wenn für die Konstruktion der cDNA-Bank nur geringe Mengen an Ausgangsmaterial (<1 µg mRNA) zur Verfügung stehen. Die doppelsträngige cDNA wurde in 22 Zyklen amplifiziert.

2.2.8.2 cDNA-Synthese mittels Primerverlängerung

Für die Erststrangsynthese der cDNA von cDNA-Bank 2 wurde 1 µg Poly-(A⁺)-RNA eingesetzt. Das Prinzip der Reaktion wurde unter 2.2.8.1 beschrieben. Die Synthese doppelsträngiger cDNA wurde hier gemäß der Herstelleranleitung durch Primerverlängerung in 8 Zyklen erreicht.

2.2.8.3 Größenfraktionierung durch Gelelektrophorese

Die Größenfraktionierung der cDNA erfolgte nicht wie im Herstellerprotokoll angegeben durch eine Säulenchromatographie sondern mittels Gelelektrophorese. Dafür wurde die cDNA für 15 min bei 65°C erhitzt und 10 min lang auf Eis gehalten. Danach wurde sie auf ein 1%iges Gel aus Agarose mit niedrigem Schmelzpunkt, das Ethidiumbromid in einer Konzentration von 140 ng/ml enthielt, zusammen mit einem Größenstandard aufgetragen und bei 70 V 1 h lang aufgetrennt. Im Größenbereich von 0,8-3,5 kB wurde die cDNA aus dem Gel ausgeschnitten. Die Gelwürfel wurden bei 65°C für 10 min geschmolzen und dann für 6 min die Temperatur auf 37°C äquilibriert. Dazu wurden jeweils 0,5 vol Gel-Phenol (62,5% Phenol (v/v), 12,5 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8,0) gegeben, gut vermischt und 5 min bei 16100 x g zentrifugiert. Die wässrigen Phasen wurden entnommen und die Extraktion mit Gel-Phenol wiederholt sowie eine Rückextraktion mit ddH₂O abgeschlossen. Die cDNA wurde mit Ethanol gefällt und ihre Konzentration bestimmt.

2.2.8.4 Ligation in λTriplEx2

Die mit dem Restriktionsenzym *Sfi* I geschnittene cDNA wurde wie in der Anleitung angegeben in die λTriplEx2-Vektorarme ligiert. Die mittels des SMART IV-Oligonukleotids und des modifizierten Oligo(dT)-Nukleotids in das 5'- bzw. 3'-Ende der cDNA eingeführten

assymetrischen *Sfi* I-Schnittstellen ermöglichten eine gerichtete Ligation in den λ TriplEx2-Vektor.

2.2.8.5 *In vitro*-Verpackung in λ -Phagenhüllen

Die in den λ TriplEx2-Vektor ligierte cDNA wurde mittels des MaxPlax Lambda Verpackungsextrakts (Epicentre Technologies) unter Verwendung des *E. coli* Stammes XL1 Blue MRF', wie vom Hersteller angegeben, in die Phagenköpfe verpackt. Um Blau-Weiß-Selektion von rekombinanten Phagen zu ermöglichen, wurden dem Top-Agar IPTG und X-Gal bis zu einer Endkonzentration von jeweils 2,5 mM zugesetzt.

2.2.8.6 Generierung der „Expressed Sequence Tags“ (ESTs)

Die Infektion der *E. coli* Bakterien XL1 Blue MRF' mit den λ -Phagen und die darauf folgende Lyse ist an freien Stellen im Bakterienrasen, den so genannten Plaques erkennbar. Dort ist es zur Vermehrung des λ -Phagen gekommen und ausgehend davon können die cDNA-Inserts der λ -Vektoren mittels PCR amplifiziert werden. Dazu wurde mit Pipettenspitzen in die nicht blau gefärbten Plaques eingestochen und diese anschließend 25 min lang in jeweils 25 μ l sterilisierten PSB-Puffer (8 mM MgSO₄, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 100 mM NaCl) getränkt. Von diesen Phagenextrakten wurden jeweils 10 μ l mit 5 μ l 20% DMSO versetzt und bei -80°C zur Archivierung der Phagenextrakte eingefroren. Jeweils 1 μ l Phagenextrakt wurden in einer 50 μ l PCR-Reaktion eingesetzt (5 μ l 10 x Taq-Polymerase Puffer, 1 μ l 10 mM dNTPs, 1 μ l 10 μ M pTriplEx 5', 1 μ l 10 μ M pTriplEx 3', 0,5 μ l Taq-Polymerase (5U/ μ l)). Für die Reaktion wurde folgendes PCR-Programm verwendet: 94°C 3 min; 5 Zyklen 94°C 30 sec, 68°C 30 sec, 72°C 3 min; 25 Zyklen 94°C 30 sec, 64 °C 30 sec, 72°C 3 min und einmalig 72°C 7 min. Nach der Amplifikation wurden die PCR-Reaktionen mit NucleoFast 96 PCR-Platten (Machery-Nagel) unter Vakuum für 7 min filtriert, mit jeweils 100 μ l ddH₂O gewaschen, wieder 15 min unter Vakuum filtriert und anschließend in jeweils 40 μ l 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 aufgenommen. Von jedem gereinigten PCR-Produkt wurde jeweils 1 μ l in einer Sequenzierreaktion eingesetzt (2.2.9).

2.2.9 DNA-Sequenzierung

Für die Sequenzierung wurde der BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) eingesetzt. Das Prinzip beruht dabei auf der Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger et al., 1977). Eine Standard-Sequenzierreaktion enthielt 1-5 μ l DNA (600 ng Plasmid-DNA, ~20 ng PCR-Produkt), 1 μ l vom entsprechenden Oligonukleotid (10 pmol), 4

µl BigDye Mix und 0-5 µl H₂O in einer 10 µl Gesamtreaktion. BigDye Mix setzte sich aus einem Teil BigDye Terminator, einem Teil Sequenzierpuffer und zwei Teilen H₂O zusammen. Oligonukleotide wurden entsprechend der im Ansatz vorliegenden DNA-Matrize eingesetzt, entweder Standard-Sequenzieroligonukleotide wie T7, Sp6, M13f und M13r oder von der spezifischen DNA-Sequenz abgeleitete Oligonukleotide. Sequenziert wurde standardmäßig nach folgendem Programm: 25 Zyklen 96°C 10 sec, 50°C 5 sec und 60°C 4 min.

Der Reaktionsansatz zur Sequenzierung der ESTs enthielt im Gegensatz zum Standardansatz nur 0,5 µl (10 pmol) pTriplEx 5'-Oligonukleotid und nur einen halben Teil BigDye Terminator im BigDye Mix. Die Hybridisierungstemperatur von pTriplEx 5' mit der DNA-Matrize betrug 60°C.

Nach der Sequenzierreaktion wurden die Ansätze durch Gelfiltration gereinigt. Dazu wurden sie durch in Wasser gequollenes Sephadex-G50 Superfine (GE-Healthcare) in einer MultiScreen Filtrationsplatte, die mit einer Membran ausgestattet war, welche eine geringe Affinität zu Proteinen und Nukleinsäuren auszeichnet (Porengröße 0,45 µm, Millipore), filtriert. Die gereinigten Sequenzierreaktionen wurden in einem ABI 3100 Avant Sequenzierer durch Kapillarelektrophorese aufgetrennt und mittels Fluoreszenzdetektion detektiert.

Außerdem wurden Sequenzierreaktionen von der Service-Abteilung „DNA-Technologies“ des PBI (Saskatoon, Kanada) durchgeführt.

2.2.10 Bioinformatische Analyse von Sequenzen und Datenbankvergleiche

DNA- und Proteinsequenzen wurden mit dem Softwarepaket Lasergene Version 6 (DNASTAR Inc., Madison, WI, USA) analysiert. Sequenzvergleiche mit GenBank mittels BLAST wurden über die NCBI-Internetseite (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) durchgeführt.

Die bioinformatische Analyse der generierten EST-Sequenzen erfolgte durch FIESTA 1.0 beta, ein EST-Management- und Analysesystem, welches von der Arbeitsgruppe Bioinformatik des PBI (Saskatoon, Kanada) entwickelt wurde. Es basiert auf den Programmen Phred (Ewing et al., 1998), Lucy (Chou und Holmes, 2001) Crossmatch (<http://www.phrap.org>), Vmatch (<http://www.vmatch.de>), SeqClean Tool (<http://www.tigr.org/tdb/tgi/software>) and TGICL Software (Pertea et al., 2003).

2.2.11 Amplifikation des 5'-Endes von cDNA-Fragmenten

Das 5'-Ende von nicht vollständig vorliegenden cDNA-Sequenzen wurde mit Hilfe des GeneRacer™ Kit (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers amplifiziert. Dafür wurde Poly(A⁺)-RNA verwendet, die vorher aus 35 µg Gesamt-RNA von Trichomzellen isoliert worden war (2.2.5.2). Die mRNA wurde mit *Pfu*Turbo-Polymerase (Stratagene) in cDNA umgeschrieben, die dann in PCR-Reaktionen eingesetzt wurde. Für die Amplifikation des 5'-Endes von HIOMT2 wurde das im Kit enthaltene 5'GeneRacer-Oligonukleotid mit dem genspezifischen Oligonukleotid HIOMT2 5'Race (Tab.2.3) kombiniert und unter den folgenden Bedingungen amplifiziert: 94°C 2 min; 5 Zyklen 94°C 30 sec, 70°C 30 sec, 72°C 1 min; 5 Zyklen 94°C 30 sec, 68°C 30 sec, 72°C 1 min; 20 Zyklen 94°C 30 sec, 66°C 30 sec, 72°C 1 min; 72°C 10 min. Mit 1 µl dieser Reaktion wurde eine weitere PCR angeschlossen, in der das 5'GeneRacer „nested“-Oligonukleotid sowie HIOMT2 5'Race-npr (Tab. 2.3) eingesetzt wurden. HIOMT2 5'Race-npr besitzt eine Sequenz komplementär zu einem Sequenzabschnitt des in der vorhergehenden PCR-Reaktion gebildeten Produktes. Damit sollte die Spezifität der amplifizierten Sequenz gesichert werden. Die PCR-Reaktionen für HIOMT3 wurden analog mit HIOMT3 5'Race und HIOMT3 5'Race-npr (Tab. 2.3) unter gleichen Reaktionsbedingungen wie für die HIOMT2 durchgeführt.

An die erhaltenen PCR-Produkte wurden zusätzliche dATPs angefügt (2.2.7), damit sie danach in den Vektor pGEM-T (Tab. 2.2) ligiert und in kompetente *E. coli* DH10B-Zellen (Tab.2.1) transformiert werden konnten. Sie wurden gemäß 2.2.9 mit M13f und M13r sequenziert.

2.2.12 Real-time PCR (RT-PCR)

Zur Quantifizierung der Transkriptmenge der interessierenden Gene wurde Gesamt-RNA aus verschiedenen Geweben von *H. lupulus* isoliert (2.2.5.1): Wurzeln, Stängel, männliche Blüten, weibliche Blüten, junge Zapfen, mittelgroße Zapfen und reife Zapfen, isolierte Trichome, junge Blätter und alte Blätter (2.1.1). Die Qualität der RNA wurde mittels DNA-Lab Chip im 2100 Agilent Bioanalyzer (Agilent Technologies) untersucht. Dafür wurde nach den Vorgaben des Herstellers jeweils 1 µl (~200-300 ng) einer jeden RNA-Probe auf den Chip aufgetragen, und das Verhältnis von 28s zu 18s rRNA bestimmt sowie die Integrität der RNA getestet.

Die reverse Transkription der Gesamt-RNA wurde wie beschrieben (2.2.6) mit dem QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen) ausgeführt. Es wurden außerdem mit jeder

RNA Reaktionen ausgeführt, zu denen keine Reverse Transkriptase zugesetzt worden war („No RT“-Kontrolle).

2.2.12.1 SYBR Green I-Reaktion

In den PCR-Reaktionen wurde SYBR Green I zur Signaldetektion eingesetzt. Dabei handelt es sich um eine fluoreszierende Substanz, deren Fluoreszenz um ein 1000-faches zunimmt, wenn sie an doppelsträngige DNA gebunden ist, im Vergleich zum ungebundenen Zustand. Wenn die Menge an doppelsträngiger DNA in einer Probe während der PCR-Reaktion steigt, nimmt damit auch das Fluoreszenzsignal zu. Es wurde der Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen) verwendet.

Oligonukletide wurden mit Hilfe des Programms Primerquest (Integrated DNA Technologies, <http://www.idtdna.com/Scitools/Applications/Primerquest>) nach den Kriterien für quantitative PCR-Reaktionen ausgewählt. Als Referenzgen wurde Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) ausgewählt. Dabei lag die erwartete Größe aller PCR-Produkte zwischen 164 und 204 bp. Es kamen die folgenden Oligonukleotide zum Einsatz (Tab. 2.3): für HIOMT1 HIOMT1RTf und HIOMT1RTr, für HIOMT2 HIOMT2RTf und HIOMT2RTr, für HIOMT3 HIOMT3RTf und HIOMT3RTr, für HIOMT4 HIOMT4RTf und HIOMT4RTr, für HIOMT5 HIOMT5RTf und HIOMT5RTr, für CHS_H1 CHS_H1RTf und CHS_H1RTr, für VPS VPSRTf und VPSRTr, für HICHI1 HICHI1RTf und HICHI1RTr, für HICHI2 HICHI2RTf und HICHI2RTr, für HICHI3 HICHI3RTf und HICHI3RTr und für GAPDH GAPDHRTf und GAPDHRTr. PCR-Reaktionen wurden in einem Mx3000P[®] QPCR-System (Stratagene) ausgeführt. Als Referenzfarbstoff wurde ROX in einer Endkonzentration von 50 nM eingesetzt. Die Konzentration an Oligonukleotiden im Ansatz wurde entsprechend optimiert. Von den cDNA-Lösungen wurden 4-fache Verdünnungen hergestellt und davon jeweils 1 µl pro 25 µl Gesamtreaktion eingesetzt. Die Reaktionen wurden unter den aufgeführten Bedingungen von 50°C 2 min; 40 Zyklen 95°C 2 min, 55°C 1 min, 72°C 20 sec amplifiziert und anschließend eine Schmelzkurve durch Erhitzen der PCR-Produkte erstellt: 95°C 1 min, 55°C 30 sec, 95°C 30 sec. Mit steigender Temperatur werden die Bindungen zwischen den zwei DNA-Einzelsträngen gelöst und das SYBR Green-Fluoreszenzsignal nimmt ab. Die Schmelztemperatur eines PCR-Produktes ist abhängig von seiner Länge und Basenfolge. Daher ist es möglich, anhand der Schmelzkurve die Spezifität der Amplifikation zu überprüfen.

Es wurden außerdem Reaktionen ohne cDNA-Matrize durchgeführt, um auf Kontamination aller Reagenzien und Oligonukleotide zu testen („No Template“-Kontrolle). Alle Reaktionen wurden zweifach ausgeführt.

2.2.12.2 Datenanalyse

Die Verläufe der PCR-Reaktionen wurden mit der MxPro QPCR Software v. 3.00 (Stratagene) analysiert. Dabei wurden die Standardeinstellungen zur Hintergrundkorrektur der Fluoreszenzintensität (Adaptive Baseline) und zum Bestimmen des PCR-Zyklus, in dem der Fluoreszenzschwellenwert (Ct-Wert) erreicht wird, genutzt.

Die relative Genexpressionsanalyse basierte auf der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode (Livak und Schmittgen, 2001). Variationen in der Menge der eingesetzten cDNA in den PCR-Reaktionen wurden mittels der Expressionsrate der als Referenzgen genutzten GAPDH korrigiert. Als Kalibrator wurde die jeweilige Transkriptmenge des zu untersuchenden Gens in jungen Blättern bzw. in Stängeln genutzt.

2.2.13 Allgemeine proteinbiochemische Methoden

2.2.13.1 Auftrennen von Proteinen auf Polyacrylamidgelen

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte durch diskontinuierliche, denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page) (Sambrook et al., 1989). Dabei wurden 10 bzw. 12%ige Trenngele und 5%ige Sammelgele hergestellt. Die Proteinproben wurden in 2 x Probenpuffer (100 mM Tris-HCl, pH 6,8, 3% (w/v) SDS, 0,01 % (w/v) Bromphenolblau, 25% (v/v) Glycerol, 5% (v/v) β -Mercaptoethanol) aufgenommen, bei 95°C für 5 min erhitzt, danach auf Eis gehalten und auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Spannung von 200 V in einer Mini-PROTEAN 3-Gelapparatur (BIO-RAD).

Es kamen ebenfalls Fertiggele (Ready Gel Tris-HCl, BIO-RAD) mit 7,5 bzw. 10%igen Trenngelen und 4%igen Sammelgelen zum Einsatz. Nach der Auftrennung wurden die Gele gemäß Anleitung in Ruby Protein Gel Färbelösung (Molecular Probes) gefärbt, in 10% (v/v) Methanol und 7% (v/v) Essigsäure entfärbt und im Geldokumentationssystem unter UV-Licht (300 nm) fotografiert. Alternativ dazu wurden die Gele mit Bio-Safe Coomassie-Lösung (BIO-RAD) gefärbt, in ddH₂O entfärbt und danach zwischen zwei Lagen Zellophan (GelAir Cellophane Support BIO-RAD) getrocknet und mittels Scanner digitalisiert.

Zum Auftrennen von Proteinen unter nativen Bedingungen wurden 12%ige Gele (Sambrook et al., 1989) ohne den Zusatz von SDS hergestellt. SDS wurde ebenfalls nicht zum

Elektrophoresepuffer und zum Probenpuffer hinzu gegeben, der auch kein β -Mercaptoethanol enthielt. Die Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel nicht durch Erhitzen denaturiert. Die Auftrennung erfolgte hier bei konstanter Spannung von 100 V unter Kühlung auf Eis.

2.2.13.2 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Proteinkonzentrationen wurden mittels des RC DC Protein Assay (BIO-RAD) nach Anleitung quantifiziert. Dabei handelt es sich um einen kolorimetrischen Assay, der auf der Methode von Lowry (Lowry et al., 1951) beruht. Mit BSA-Konzentrationsstandards von 0,2–1,5 mg/ml wurde eine Eichgerade erstellt. Die Absorption der Proteine wurde bei 750 nm vermessen und die Proteinkonzentrationsbestimmung mit Hilfe einer eingebauten Funktion des Ultrospec 3100 pro (GE Healthcare) durchgeführt.

2.2.14 Heterologe Genexpression in Bakterien

2.2.14.1 Klonierung in den Expressionsvektor pHis8-3 und Transformation

Die kodierenden Sequenzbereiche aller fünf HIOMTs wurden in den Expressionsvektor pHis8-3 (Tab. 2.2) ligiert. Zu diesem Zwecke wurden Oligonukleotide synthetisiert, welche entweder eine *EcoRI*- (HIOMT1, HIOMT2, HIOMT3, HOMET5, AtOMT) oder *BamHI*-Schnittstelle (HIOMT4a und HIOMT4b) am 5'-Ende der PCR-Produkte generierten, sowie entweder eine *HindIII*- (HIOMT1, HIOMT2, HIOMT3, HIOMT5, AtOMT) oder eine *Sall*-Schnittstelle am 3'-Ende (HIOMT4a und HIOMT4b) hinzufügten. Die PCR-Produkte wurden von cDNA amplifiziert, die von RNA isoliert aus Trichomen synthetisiert worden war. Zur Amplifikation wurde *Pfu*Turbo-Polymerase (Stratagene) verwendet. Die folgenden Primer (Tab. 2.3) wurden eingesetzt: HIOMT1 pHis8-3f und HIOMT1 pHis8-3r, HIOMT2 pHis8-3f und HIOMT2 pHis8-3r, HIOMT3 pHis8-3f und HIOMT3 pHis8-3r, HIOMT4a pHis8-3f und HIOMT4 pHis8-3r, HIOMT4b pHis8-3f und HIOMT4 pHis8-3r, HIOMT5 pHis8-3f und HIOMT5 pHis8-3r, AtOMT pHis8-3f und AtOMT pHis8-3r und unter folgenden Bedingungen amplifiziert: 94°C 3 min; 40 Zyklen 94°C 30 sec, 58°C für HIOMT1, (60°C für HIOMT2, 55°C für HIOMT3, 44°C für HIOMT4a und HIOMT4b, 49°C für HIOMT5, 67°C für AtOMT) 30 sec, 72°C 1,5 min; 72°C 7 min. Die PCR-Produkte wurden gereinigt, mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut und in den linearisierten Vektor pHis8-3 ligiert. Die Produkte der Ligation wurden in den *E. coli*-Stamm DH10B (Tab 2.1) transformiert, die resultierenden Kolonien durch PCR mittels vektorspezifischen T7-Primern auf das Vorhandensein der ligierten Sequenzen getestet und

die Plasmide aus den Bakterien isoliert (2.2.5.3). Die Vollständigkeit der Sequenzen und die Korrektheit des Leserahmens wurden durch Sequenzierung überprüft. Danach konnten die Plasmide in den Expressionsstamm *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL (Stratagene) transformiert werden. Dieser Expressionsstamm besitzt zusätzliche Gene für tRNAs, welche Arginin-, Isoleucin- und Leucincodons erkennen und ermöglicht dadurch eine stärkere Expression der rekombinanten Proteine. Auch hier wurde das Vorhandensein der gewünschten Plasmidsequenzen in den Bakterien mittels PCR und Sequenzierung getestet.

2.2.14.2 Klonierung in den Expressionsvektor pET44a(+) und Transformation

Die Klonierung der kodierenden Bereiche von HIOMT1, HIOMT2, HIOMT4a und HIOMT4b erfolgte analog zu der in 2.2.14.1 beschriebenen. Es wurden die mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnittenen PCR-Produkte in den ebenso behandelten Vektor pET44a(+) (Novagen) (Tab. 2.2) ligiert und danach in den Expressionsstamm *E. coli* Rosetta 2 (DE3)pLys (Novagen) (Tab. 2.1) transformiert. Klonierungs- und Transformationserfolg wurden mittels PCR mit vektorspezifischen Oligonukleotiden überprüft und die Korrektheit und Vollständigkeit des Leserahmens durch Sequenzierung überprüft.

2.2.14.3 Klonierung in den Expressionsvektor pHis8-GW und Transformation

Die putativen CHIs aus *H. lupulus* wurden mittels *Pfu*Ultra (Stratagene) von cDNA amplifiziert, die von RNA isoliert aus Hopfentrichomzellen synthetisiert worden war. Die Oligonukleotide HICHI1f, HICHI2f und HICHI3f enthielten an ihrem 5'-Ende das Tetranukleotid ‚CACC‘ (Tab. 2.3), welches mit der überhängenden Sequenz ‚GTGG‘ des Vektors pENTR/D-TOPO (Invitrogen) hybridisieren kann und auf diese Weise gerichtetes Klonieren möglich macht. Sie wurden mit den entsprechenden Primern HICHI1r, HICHI2r sowie HICHI3r kombiniert und bei 94°C 3 min; 60 Zyklen 94°C 30 sec, 68°C für HICHI1 (68°C für HICHI2, 60°C für HICHI3) 30 sec, 72°C 1 min; 72°C 7 min amplifiziert. Die gereinigten PCR-Produkte wurden in pENTR/D-TOPO kloniert und in *E. coli* Top10-kompetente Zellen (Tab. 2.1) transformiert. Positive Transformanten wurden durch PCR mit M13-Primern identifiziert und aus den Bakterienkolonien Plasmide isoliert. Die Vollständigkeit und Korrektheit des Leserahmens der putativen Chalkon-Isomerasen wurde durch Sequenzierung überprüft. Da das Plasmid pENTR/D-TOPO als Eingangsvektor des ‚Gateway‘-Systems ebenso wie der Expressionsvektor pHis8-GW ein Gen für Kanamycin-Resistenz enthält, musste das Kanamycin-Resistenzgen aus dem pENTR/D-TOPO

Eingangsvektor durch Schneiden mit dem Restriktionsenzym *Bsp*HI entfernt werden. Danach wurde der linearisierte Vektor religiert, die putativen Chalkon-Isomerase-Sequenzen durch Rekombination in den Vektor pHis8-GW kloniert und die Konstrukte in *E. coli* DH10B transformiert. Der Erfolg der Rekombination und Transformation wurde mit Hilfe von T7-Primern in einer PCR getestet. Korrektheit und Vollständigkeit der Leserrahmen wurden durch Sequenzierung der isolierten Plasmide überprüft und diese danach in den Expressionsstamm *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL (Stratagene) transformiert. Auch danach wurden in einer PCR mit T7-Primern und anschließender Sequenzierung der Transformations- und Klonierungserfolg geprüft.

Zur Klonierung von AtCHI wurde RNA aus Blüten und Früchten von *A. thaliana* isoliert (2.2.5.1), diese in cDNA umgeschrieben (2.2.6) und in einer PCR (94°C 3 min; 40 Zyklen 94°C 30 sec, 58°C 30 sec, 72°C 50 sec; 72°C 7 min) mit *Taq*-Polymerase und den Primern AtCHIf und AtCHIr eingesetzt. Die Sequenz wurde in pCR8/GW/TOPO kloniert und in *E. coli* One Shot TOP 10 kompetente Zellen (Tab. 2.1) transformiert. Positive Transformanten wurden mittels PCR mit M13-Oligonukleotiden identifiziert und die Vollständigkeit bzw. korrekte Orientierung durch Sequenzierung bestätigt. Danach wurde wie oben beschrieben mit der Rekombinationsreaktion mit dem Vektor pCR8-GW fortgefahren.

2.2.14.4 Genexpression in *E. coli*

Zur rekombinanten Genexpression in *E. coli* wurden jeweils 2 ml LB-Medium, versetzt mit Antibiotika entsprechend dem verwendeten Vektor, mit einer Bakterienkolonie beimpft und über Nacht bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurden zu 10 ml LB-Medium die entsprechenden Antibiotika gegeben, diese mit 0,5 ml der Übernachtskultur beimpft und die Bakterien bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 herangezogen. Nach Induktion der Expression mit 1 mM IPTG wurden die Kulturen weitere 4 h bei 37°C inkubiert, danach abzentrifugiert und die Zellen entsprechend weiterverwendet.

Variationen dieses Protokolls betreffen die Dichte der Bakterienkultur zum Zeitpunkt der Induktion (OD₆₀₀ 0,6-1,7), die Konzentration an induzierendem IPTG (0-1 mM), die Temperatur während der Expression der Proteine (18-37°C) und die Inkubationsdauer während der Expression (1h-über Nacht), sowie Zusätze zur Expressionskultur (Glukose, Glycylglycin).

2.2.14.5 Herstellung von *E. coli*-Proteinrohextrakten

Die Expressionskulturen (2.2.14.4) wurden 2 min lang bei 3250 x g zentrifugiert und die Zellen danach in 1 ml Lysepuffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8,0 mit NaOH) resuspendiert. Es wurde Lysozym in einer Endkonzentration von 1 mg/ml zugegeben und der Ansatz 30 min lang auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen durch Ultraschallbehandlung (Pulse von 5 sec, Pause von 15 sec, 2 min Pulse insgesamt) auf Eis gekühlt, aufgeschlossen. Die Zellsuspension wurde 25 min lang bei 10000 x g und 4°C zentrifugiert und dann der Überstand, der die löslichen Proteine enthält, abgenommen. Das Pellet besteht aus Zelltrümmern und unlöslichen Bestandteilen und wurde in 1 ml Lysepuffer resuspendiert. Ein Teil der löslichen und der unlöslichen Fraktionen wurde mittels SDS-PAGE (2.2.13.1) aufgetrennt.

2.2.15 Kultivierung von Insektenzellen

Insektenzellen der Linie Sf9 (Invitrogen) wurden in GIBCO SF-900 II SFM Medium (Invitrogen) bei einer Temperatur von 27°C kultiviert. Erhaltungszellkulturen wurden in sterilen T25-Zellkulturgefäßen (BD Biosciences) angezogen. Routinemäßig wurden 2-2,5 x 10⁶ Zellen unter sterilen Bedingungen ausgesät. Nachdem sie sich am Boden angeheftet hatten, wurde das alte Medium entfernt, 5 ml frisches Medium zugesetzt und für 4-5 Tage inkubiert, bis die Zellen den Boden des Kulturgefäßes vollständig in einer einfachen Zellschicht bewachsen hatten (Dichte von ~10 x 10⁶ Zellen). Dann wurden die Insektenzellen vorsichtig mit Hilfe des Pipettenstrahls vom Gefäßboden abgelöst. Davon wurden 0,4 ml in ein neues T25-Zellkulturgefäß mit 4,6 ml Medium gegeben und wieder bei 27°C inkubiert.

Insektenzell-Suspensionskulturen wurden in 100 ml-Rührgefäßen mit magnetischem Rührer (Bellco Biotechnology) angezogen. Dafür wurden die abgelösten Zellen eines voll bewachsenen T25-Zellkulturgefäßes in 50 ml frisches Medium gegeben und bei 76 rpm inkubiert. Die Zelldichte und der Anteil lebender Zellen wurden täglich durch Aufnahme einer Zellprobe in ein gleiches Volumen 0,2%iges Trypan Blau (Invitrogen) in PBS und Auszählen der Zellen dokumentiert. Trypan Blau dringt in tote Zellen ein, wodurch diese blau angefärbt werden. Eine Suspensionskultur, die das Dichtemaximum von 3-4 x 10⁶ Zellen/ml erreicht hatte, wurde auf eine Zelldichte von 0,5 x 10⁶ Zellen/ml eingestellt und erneut bei 27°C und 76 rpm inkubiert.

2.2.16 Heterologe Genexpression in Insektenzellen

Die heterologe Genexpression in Insektenzellen erfolgte nach Anleitung des Bac-to-Bac Baculovirus Expressionssystems (Invitrogen).

2.2.16.1 Klonierung in pFast Bac HT und Generierung rekombinanter Bacmid-DNA

Die kodierenden Sequenzbereiche von HIOMT1, HIOMT2 und AtOMT wurden in das Donorplasmid pFastBac HT A (Tab. 2.2) kloniert und die von HIOMT4a und HIOMT4b in pFastBac HT B. Dafür wurden die amplifizierte Sequenzen und die Vektoren mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten. Nach der Ligation wurden die Konstrukte in den *E. coli*-Stamm DH10B transformiert und der Transformations- bzw. Ligationserfolg durch PCR mit genspezifischen Oligonukleotiden bzw. durch Sequenzierung der isolierten Plasmide kontrolliert. Diese wurden im folgenden Schritt in *E. coli* Max Efficiency DH10Bac (Invitrogen) transformiert. Blau-Weiß-Selektion ermöglichte die Identifizierung von positiven Transformanten, wobei weiße Kolonien nochmals auf Kulturschalen mit IPTG und X-gal ausgestrichen wurden, um den weißen Phänotyp zu verifizieren. Von diesen weißen Kolonien wurden Kulturen in LB-Medium angezogen und daraus die Bacmid-DNA isoliert. Anschließend wurde diese in PCR-Reaktionen mit M13f- und M13r-Primern sowie einer Kombination aus jeweils einem M13 und einem genspezifischen Oligonukleotid eingesetzt. Anhand der Größe der erhaltenen PCR-Produkte wurde überprüft, ob es sich um rekombinante Bacmid-DNA handelt, welche die kodierenden Sequenzbereiche der entsprechenden HIOMT enthält.

2.2.16.2 Transfektion von Insektenzellen

In einer Zellkulturschale mit 24 Vertiefungen wurden 2×10^5 Insektenzellen pro Vertiefung in einem Volumen von 1 ml SF-900 II SFM Medium mit 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin gegeben und bei 27°C 1h lang inkubiert. Dann wurde das alte Medium entfernt und die Zellen mit 1 ml frischem SF-900 II SFM Medium ohne Antibiotikazusatz gewaschen. Es wurden 5 µl der jeweiligen Bacmid-DNA sowie je 6 µl Cellfectin Reagenz (Invitrogen) mit jeweils 100 µl SF-900 II SFM Medium versetzt, anschließend beide Lösungen vermischt und 45 min bei RT inkubiert. Dazu wurden 800 µl SF-900 II SFM Medium gegeben und von dieser Mischung 500 µl in die Schalenvertiefung mit Insektenzellen pipetiert. Dieser Ansatz wurde 5 h lang bei 27°C inkubiert, danach das Cellfectin-DNA-Gemisch entfernt und 1 ml frisches SFI-900 II SFM Medium mit den oben angegebenen Antibiotika hinzu gegeben. Die Zellkulturschale wurde für 3-5 Tage bei 27°C

in einer feuchten Kammer inkubiert und täglich auf Zeichen viraler Infektion (angeschwollene, lysierte Zellen) untersucht. Schließlich wurde das Medium abgenommen und wie beschrieben damit weiter verfahren.

2.2.16.3 Amplifikation der Virusstammlösung

Das Volumen der Virusstammlösung und die Konzentration an Viruspartikeln wurden in insgesamt vier Schritten erhöht. Im ersten Amplifikationsschritt wurden 5×10^5 Zellen in einer Zellkulturschale mit 24 Vertiefungen ausgesät und nach dem Absetzen mit 0,5 ml frischem SF-900 II SFM Medium und 0,5 ml der originalen Virusstammlösung (2.2.16.2) versetzt. Es wurde täglich auf Infektionszeichen kontrolliert und nach 3-5 Tagen das Medium durch Zentrifugation bei $500 \times g$ für 5 min isoliert. Im zweiten Amplifikationsschritt wurden $\sim 5 \times 10^6$ Insektenzellen in einem T25-Zellkulturgefäß mit dem 1 ml Virenlösung aus dem ersten Amplifikationsschritt in insgesamt 5 ml Gesamtvolumen wie beschrieben inkubiert, die Infektion überwacht und das Medium geerntet. Für die dritte und vierte Amplifikation wurden jeweils $\sim 1,5 \times 10^6$ Zellen/ml in einem Volumen von 50 bzw. 100 ml in einem Suspensionskulturgefäß mit Magnetprüher vorgelegt. Die 5 ml Virusstammlösung aus dem zweiten Amplifikationsschritt bzw. ein Teil Virusstammlösung, dessen Volumen abhängig vom Titer der Virusstammlösung aus dem dritten Amplifikationsschritt war, zugesetzt und wie vorher inkubiert. Die jetzt hoch konzentrierte Virenlösung wurde durch Zentrifugation bei $1000 \times g$ geerntet und bei 4°C im Dunkeln gelagert.

2.2.16.4 Genexpression in Insektenzellen

Dafür wurden Zellkulturen verwendet, in denen der Anteil lebender Zellen $>90\%$ betrug. In kleinem Maßstab wurden $\sim 8 \times 10^6$ Zellen in 5 ml Volumen in einem T25-Kulturgefäß verwendet. Das zugesetzte Volumen virale Stammlösung war abhängig von der Konzentration der Lösung (für HIOMT1, HIOMT2, HIOMT4a und HIOMT4b 30-50 μl). Nach 72 h bei 27°C wurden die Zellen vorsichtig durch Pipetieren vom Boden des Kulturgefäßes abgelöst, die Suspension bei $1000 \times g$ 10 min lang zentrifugiert und das Zellpellet in Lysepuffer bzw. Bindepuffer aufgelöst.

Routinemäßig wurden Expressionskulturen von 50 ml bzw. 200 ml in 100 ml- bzw. 500 ml-Rührgefäßen mit Magnetprüher angesetzt. Dafür wurden Insektenzellen in einer Dichte von 1,5 bis 2×10^6 Zellen/ml in Sf-900 II SFM verdünnt oder bis zu dieser Dichte herangezogen und mit dem entsprechenden Volumen an hochkonzentrierter Viruslösung infiziert. Ein Kulturvolumen von 200 ml Insektenzellen wurde mit 1,2 ml HIOMT1- bzw. 1,5 ml

HIOMT2-Viruslösung infiziert. Wenn der Anteil lebender Zellen in der Kultur auf 70-80% gesunken war, gewöhnlich nach einer Inkubationszeit von 72 h bei 27°C und 76 rpm wurde die Expressionskultur geerntet und bei 1000 x g zentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurde je nach Zweck weiter verwendet und das Medium verworfen.

2.2.17 Affinitätsreinigung rekombinanter Proteine

Die rekombinanten Proteine enthielten am N-terminalen Ende alle zusätzlich sechs (pFastBac HT A/B) bzw. acht Histidinreste (pHis8-3, pHis8-GW). Die dafür kodierenden Triplets stammten vom jeweiligen Vektor und waren in den Leserahmen der in den Vektor ligierten Sequenzen integriert. Dies ermöglichte die Reinigung mittels immobilisierter Metall-Chelat-Affinitätschromatographie. Hierfür wurde Talon Resin (Clontech) verwendet, welches die reversible Interaktion von Kobaltionen mit Histidinresten ausnutzt.

2.2.17.1 Reinigung von Proteinen aus *E. coli*-Rohextrakten

Die *E. coli*-Expressionskultur wurde bei 3250 x g und 4°C 10 min lang zentrifugiert und wie beschrieben (2.2.14.5) lösliche Proteinrohextrakte hergestellt. Die NaCl-Konzentration des Überstandes wurde dann auf 500 mM erhöht und es wurden 10% (v/v) Glycerol zugesetzt. Die Talon-Matrix wurde in Lysepuffer äquilibriert und vermischt mit der Proteinlösung 30-45 min bei 4°C unter Drehen inkubiert. Durch Zentrifugation bei 4°C und 700 x g für 5 min wurde der nicht gebundene Anteil des Proteins von der Talon-Matrix getrennt und dieses anschließend zweimal mit je 10 Volumen Waschpuffer (20 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10% (v/v) Glycerol, 10 mM Imidazol, 150 mM NaCl) 10 min bei 4°C gewaschen. Danach wurde die Talon-Matrix in eine Einwegsäule (Clontech) überführt und nach einem zusätzlichen Waschschrift das gebundene Protein in 4-5 Volumen Elutionspuffer (20 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10% Glycerol, 100 mM Imidazol, 150 mM NaCl) eluiert. Der Verlauf der Reinigung wurde mittels SDS-Page (2.2.13.1) durch Probenahmen nach den einzelnen Reinigungsschritten dokumentiert.

2.2.17.2 Reinigung von Proteinen aus Insektenzell-Rohextrakten

Insektenzell-Expressionskulturen wurden bei 3250 x g und 4°C 10 min lang zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in PBS-Puffer gewaschen und in Bindepuffer (20 mM Tris-HCl pH 8,0, 7,5 mM Imidazol und 500 mM NaCl) unter Zusatz von 1/200 (v/v) Protease-Inhibitor (Calbiochem) resuspendiert. Die Zellen wurden durch Ultraschallbehandlung (Pulse von 5 sec, Pause von 15 sec, 2 min Pulse insgesamt) aufgeschlossen und die Suspension in ihren

löslichen und unlöslichen Anteil durch Zentrifugation bei 20000 x g und 4°C für 25 min getrennt. Die Talon-Matrix wurde durch Äquilibrierung in Bindepuffer vorbereitet (~1 ml Matrix pro 200 ml Expressionskultur) und anschließend mit der Proteinlösung 30-45 min lang unter Drehen bei 4°C inkubiert. Das Abtrennen der ungebundenen Proteine erfolgte durch Zentrifugation für 5 min bei 700 x g und 4°C und zweimaliges Waschen der Matrix mit 10 Volumen Waschpuffer für 10 bzw. 5 min bei 4°C unter Drehen (20 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10% (v/v) Glycerol, 7,5 mM Imidazol, 150 mM NaCl). Nach dem zweiten Waschschrift wurde die Suspension in eine Einweg-Säule geladen, eine dritte Waschung angeschlossen und das rekombinante Protein in 4-5 Volumen Elutionspuffer (20 mM Tris-HCl, pH 8,0, 20% Glycerol, 100 mM Imidazol, 150 mM NaCl) von der Säule eluiert. Der Verlauf der Reinigung wurde mittels SDS-Page (2.2.13.1) durch Probenahmen nach den einzelnen Reinigungsschritten dokumentiert.

2.2.17.3 Pufferaustausch und Proteinkonzentrierung

Gereinigtes Protein wurde konzentriert und einem Pufferaustausch unterzogen. Dazu wurde ein 10 kDa Amicon Ultra Zentrifugationsfilter (Millipore) verwendet, der mit einer Membran ausgestattet ist, die Proteine eines Molekulargewichts von >10 kDa selektiv zurückhält. Die Lösungen wurden bei 3250 x g und 4°C zentrifugiert, in Puffer (100 mM Natriumglycinat, pH 9,0 für HIOMT1 und pH 8,5 für HIOMT2, 20% (v/v) Glycerol, 2 mM DTT, 50 mM NaCl) gewaschen und anschließend in diesem Puffer, mit Zusatz von 50% (v/v) Glycerol konzentriert und bei -20°C gelagert.

Die gereinigten putativen HICHIs wurden analog zu den HIOMT-Proteinlösungen behandelt. Der verwendete Puffer war 100 mM Tris-HCl, pH 7,5. Sie wurden auf Eis gelagert und anschließend umgehend in Experimenten eingesetzt.

2.2.18 Aktivitätsmessungen von Enzymen

2.2.18.1 OMT-Aktivitätstest

Der OMT-Standardenzymtest wurde in einem Volumen von 50 µl durchgeführt. Von den Substraten wurden 50 mM Stammlösungen in Ethanol hergestellt. Es wurden *E. coli*- bzw. Insektenzell-Rohextrakte oder gereinigtes Protein eingesetzt. *E. coli*-Rohextrakte wurden wie beschrieben (2.2.14.5) hergestellt. Zur Herstellung von Insektenzell-Rohextrakten wurden die Insektenzell-Expressionskulturen geerntet und in 1 ml Insektenzell-Lysispuffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 130 mM NaCl, 1% Triton X-100 (v/v), 10 mM NaF, 10 mM Natriumphosphat, pH 7,5, 10 mM Natriumpyrophosphat) resuspendiert. Für 1×10^7 Zellen wurde 1 ml Puffer

verwendet und Protease Inhibitor (1/100-1/1000 v/v) zugesetzt, dann 45 min lang auf Eis inkubiert und bei 20000 x g und 4°C 30 min lang zentrifugiert. Der Überstand enthielt die löslichen Proteine und wurde im Enzymtest eingesetzt.

Eine Reaktion setzte sich zusammen aus:

| | |
|--------|--|
| 1 mM | Substrat |
| 7,6 µM | ¹⁴ C-S-adenosyl-L-methionin (52,8 mCi/mmol) |
| 10 µl | Proteinrohextrakt (~27 µg Protein) |
| 50 mM | Tris-HCl, pH 7,5 |
| 2 mM | DTT |

Die Reaktionen wurden durch Zugabe des Substrats gestartet, 30 min bei 30°C inkubiert und durch Zugabe von 2,5 µl 6 N HCl gestoppt. Die ¹⁴C-markierten, methylierten Produkte wurden mit 100 µl Ethylacetat extrahiert. Aliquots der organischen Phase (20 µl) wurden mit 3 ml Szintillationsflüssigkeit (Opti-Fluor O, PerkinElmer) versetzt und in einem Szintillationszählgerät (1219 Rackbeta, LKB Wallac) 45 sec lang vermessen.

2.2.18.2 CHI-Aktivitätstest

Der CHI-Aktivitätstest wurde nach Bednar und Hadcock (Bednar und Hadcock, 1988) in einem Volumen von 500 µl mit Rohextrakten von *E. coli*-Expressionskulturen durchgeführt. Als Substrate wurden 4 mM Stammlösungen in Ethanol von Chalkonaringenin, Butein, Isoliquiritigenin und 2',4-Dihydroxychalkon verwendet.

Eine Reaktion enthielt:

| |
|--|
| 40 µM Substrat |
| 50 mM Tris-HCl, pH 7,6 |
| 40 mM KCN |
| 0,065 µg <i>E. coli</i> -Proteinrohextrakt |

Der Zusatz von KCN zum Reaktionsansatz dient der Inhibierung kontaminierender Chalkon-Peroxidaseaktivität, die zum Verlust des Chalkon-Substrates führen würde. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von Substrat in einer 1 cm-Glasküvette, die in einem Ultrospec 3100 *pro* (GE Healthcare) positioniert wurde, gestartet. Als Blindwert wurde der gleiche Reaktionsansatz ohne die Zugabe von Substrat verwendet. Der Reaktionsverlauf wurde durch Messung der Absorptionsmaxima der eingesetzten Substrate und der gebildeten Produkte über

einen Zeitraum von mindestens 5 min in Abständen von jeweils 15 sec (bis 1 min), 30 sec (bis 5 min) bzw. 1 min (bis 10 min) dokumentiert. Außerdem wurde das Absorptionsspektrum zu Beginn der Reaktion und noch einmal nach 10 min über einen Bereich von 250–600 nm vermessen. Die Absorptionsspektren der verwendeten Substrate wurden auch ohne Zugabe von Enzym gemessen.

3 Ergebnisse

3.1 Quantifizierung von Xanthohumol in verschiedenen Hopfen-Geweben

Zur Quantifizierung von Xanthohumol in verschiedenen Hopfengeweben wurden Extrakte aus Frischmaterial oder bei -80°C gelagertem Gewebematerial (2.2.1) hergestellt und mittels HPLC über einen Gradienten aufgetrennt (2.2.2.1). Neben den Geweben der unterschiedlichen Pflanzenorgane wurden auch vier verschiedene Entwicklungsstadien der weiblichen Blütenstände hinsichtlich ihres Xanthohumolgehalts analysiert (2.2.1). Mit Hilfe definierter Konzentrationen eines Xanthohumol-Standards wurde eine Kalibrationskurve erstellt (2.2.2.1). Aus Abbildung 3.1 sind die Xanthohumol-Gehalte dreier separater Extraktionen und die entsprechenden Standardabweichungen zu entnehmen. Xanthohumol ist in unterschiedlichen Konzentrationen in allen untersuchten Geweben vorhanden. Alle Gewebe mit Ausnahme der Wurzeln sind in verschiedener Dichte mit sekretierenden Trichomen besetzt. Auch in Wurzeln wurden geringe Mengen Xanthohumol detektiert. Unerwartet hoch ist der Xanthohumol-Gehalt in männlichen Blüten, der den der weiblichen Blüten um ein Vielfaches übertrifft. Die Analyse der Entwicklungsreihe der Zapfen zeigt, dass der Gehalt an Xanthohumol/g Gewebe von der Entwicklung der kleinen zu den mittelgroßen Zapfen am stärksten um das etwa Zehnfache ansteigt und von mittelgroßen zu reifen Zapfen noch einmal um das etwa Dreifache zunimmt. Der höchste Gehalt wurde mit $11,7 \pm 0,33$ mg Xanthohumol/g Frischgewicht in reinem Trichomgewebe gemessen.

In einem weiteren Experiment wurden von der einen Hälfte eines frisch geernteten Hopfenblattes mit Hilfe eines Pinsels und Klebeband die Trichome entfernt. Von beiden Blatthälften wurden jeweils Extrakte hergestellt. Die Analyse ergab eine Reduktion des Xanthohumol-Gehaltes um durchschnittlich 88% in den Blatthälften bei denen die Trichome vorher zum Großteil entfernt worden waren im Vergleich zu denen mit Trichomen. Dies verdeutlicht, dass sich Xanthohumol überwiegend in den Trichomen anreichert.

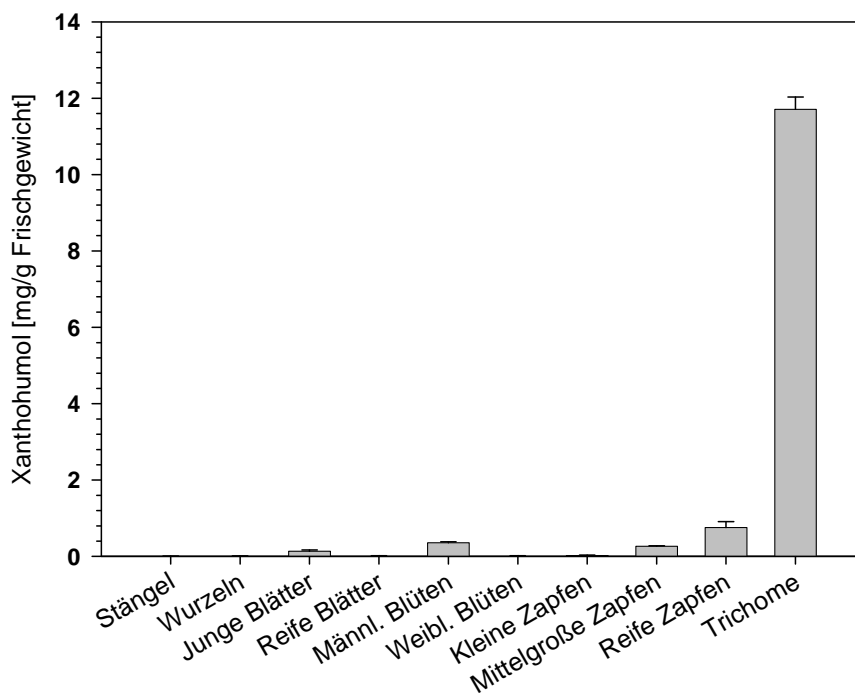


Abbildung 3.1 Quantifizierung von Xanthohumol (mg/g Frischgewicht) in verschiedenen Hopfgeweben, in den unterschiedlichen Entwicklungsstadien weiblicher Blütenstände und in Zapfen.

3.2 Analyse der Trichom-cDNA Banken

Die Trichome des Hopfens, in denen die Biosynthese und Akkumulation von Sekundärmetaboliten stattfindet, dienten als Ausgangsmaterial zur Herstellung zweier cDNA-Banken. cDNA-Bank 1 wurde mit Poly(A)⁺-RNA aus isolierten Trichomen hergestellt, wofür die Zapfen im August des Jahres 2003 geerntet worden waren. Da die Temperaturen im Frühjahr und Sommer 2003 überdurchschnittlich hoch waren, befanden sich die Hopfenzapfen zum Zeitpunkt der Ernte in einem relativ fortgeschrittenen Entwicklungsstadium. Es wurde eine zweite cDNA-Bank mit RNA aus Hopfentrichomen des Jahres 2002 hergestellt, die vergleichsweise unter kühleren Witterungsbedingungen herangereift waren. Von 30 g reifen Hopfenzapfen konnten durchschnittlich 1,7 g Trichome isoliert werden (Ernte 2003, 2.1.1, 2.2.3). Die Qualität des erhaltenen Materials wurde unter dem Lichtmikroskop kontrolliert. Das Trichommateriale enthielt nur zu einem Minimum Verunreinigungen von Blatt- oder anderem Pflanzenmaterial. Von den verschiedenen Trichomtypen des Hopfens waren neben dem Großteil glandulärer Trichome auch nichtdrüsiges Klimmhaare (Abb. 1.4a) vorhanden. Aus einem Gramm Trichome wurden durchschnittlich 350 µg RNA gewonnen und daraus ~0,5% Poly(A)⁺-RNA isoliert (2.2.5.1,

2.2.5.2). Für die Konstruktion von cDNA-Bank 1 und 2 wurden jeweils 0,7 bzw. 1 µg Poly(A)⁺-RNA eingesetzt (2.2.8).

Die Inserts von insgesamt 2103 zufällig gewählten Klonen (Phagenplaques) (1335 von cDNA-Bank 1 und 768 von cDNA-Bank 2) wurden sequenziert. Die Eliminierung der Klone, die qualitativ minderwertige oder Inserts mit weniger als 100 bp enthielten, ergab 1882 qualitativ hochwertige Sequenzen. Die Inserts einer Stichprobe von 124 Klonen wurden mittels PCR amplifiziert und deren Größe nach der Gelelektrophorese abgeschätzt. Von den Inserts waren 7% weniger als 500 bp lang, eine Größe zwischen 500 und 1000 bp wiesen 56% auf und größer als 1000 bp waren 37%.

Eine Clusteranalyse der 1882 ESTs wurde mit Hilfe von TGICL-Software (Pertea et al., 2003) unter Nutzung des NCBI's Megablast (Wheeler et al., 2006) und Assemblierung durch das CAP3 Assemblierungsprogramm (Huang und Madan, 1999) durchgeführt. Aus Abbildung 3.2 ist ersichtlich, dass weniger als die Hälfte der ESTs als Einzelsequenzen vorlagen und die andere Hälfte von Sequenzen ausgemacht wird, die in Cluster assemblieren. Es ist aufgeschlüsselt, wie groß die Prozentzahl der Sequenzen in Clustern ist, die in die unterschiedlich großen Cluster assemblieren. Die meisten Cluster enthielten wenige ESTs. Doch die größten vier Cluster machten immerhin 29% aller in Clustern vorliegenden Sequenzen aus. Der größte Cluster wird von 145 Sequenzen gebildet. Insgesamt waren im EST-Set 954 einzigartige Sequenzen vorhanden.

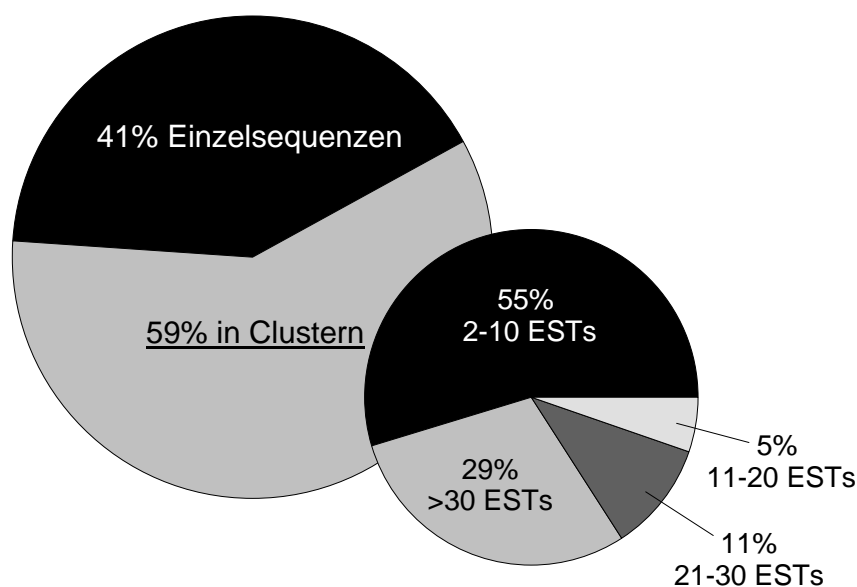


Abbildung 3.2 Clusteranalyse der 1882 ESTs der zwei cDNA-Banken von *H. lupulus*. Das große Diagramm gibt die Prozentzahl der einzelnen bzw. der zu Clustern assemblierten ESTs an. Im kleinen Diagramm sind die Cluster nach der Anzahl der in ihnen enthaltenen ESTs aufgeschlüsselt und die Prozentzahl der Sequenzen in Clustern angegeben, die diese Cluster ausmachen.

Sowohl die Einzel-ESTs als auch die Konsensussequenzen der in Clustern zusammengefassten Sequenzen wurden mit der nicht-redundanten Proteindatenbank (GenBank) verglichen, wofür die Nukleotidsequenzen in alle sechs möglichen Leserahmen in Proteine translatiert worden waren. Die fünfzehn Cluster mit der höchsten Anzahl an ESTs und dem entsprechenden Datenbankeintrag mit der höchsten Sequenzähnlichkeit sind in Tab. 3.1 dargestellt. Die weitaus größte Zahl an ESTs zeigte Ähnlichkeit zu einem MtN19-ähnlichen Protein aus *Pisum sativum*. Vier der aufgeführten Cluster wiesen keine unter den eingestellten Suchkriterien signifikante Ähnlichkeit zu Sequenzen in der Datenbank auf. Führt man allerdings eine Suche mit weniger stringenten Kriterien durch (Expect = 10^{-4}), zeigen sich Ähnlichkeiten des Clusters mit 55 ESTs zu Metallothioneinproteinen (*Populus balsamifera*) oder des Clusters mit 25 ESTs zu Glycin-reichen Proteinen (*Citrus unshiu*). Von einigen aus dem Hopfensekundärstoffwechsel bekannten Enzymen, wie der Chalkon-Synthase und der Phlorisovalerophenonsynthase (VPS) waren ebenfalls mehrere ESTs vorhanden. Bemerkenswert war die Häufigkeit von ESTs mit Ähnlichkeit zu putativen Chalkon-Isomerasen.

Tabelle 3.1 Cluster mit der größten Anzahl an ESTs in den Hopfen cDNA-Banken.

| Anzahl ESTs in Cluster | Accession-Nr. | Annotation |
|------------------------|---------------|---|
| 145 | AAU14999 | MtN19-ähnliches Protein (<i>Pisum sativum</i>) |
| 69 | - | N/A |
| 68 | NP_567300 | Oxidoreduktase (<i>Arabidopsis thaliana</i>) |
| 55 | - | N/A |
| 29 | ABB78006 | Major Allergen pru p1 (<i>Prunus persica</i>) |
| 25 | - | N/A |
| 25 | AAQ55182 | Putative Chalkon-Isomerase (<i>Lycopersicon esculentum</i>) |
| 22 | - | N/A |
| 21 | NP_850770 | Unbekanntes Protein (<i>Arabidopsis thaliana</i>) |
| 19 | AAG38521 | Cystatin-ähnliches Protein (<i>Citrus x paradisi</i>) |
| 18 | BAB47195 | Chalkon-Synthase (<i>Humulus lupulus</i>) |
| 13 | AAQ55182 | Putative Chalkon-Isomerase (<i>Lycopersicon esculentum</i>) |
| 11 | ABB16993 | Unbekannt (<i>Solanum tuberosum</i>) |
| 9 | JC7639 | Phlorisovalerophenonsynthase (<i>Humulus lupulus</i>) |
| 9 | AAZ23935 | At1g10370 (<i>Arabidopsis thaliana</i>) |

N/A = keine Ähnlichkeit zu Datenbankeinträgen vorhanden

3.2.1 ESTs aus dem Sekundärstoffwechsel des Hopfens

Der Vergleich der ESTs mit Sequenzeinträgen der Datenbank führte zur Identifizierung von Sequenzen mit bekannter bzw. potentieller Funktion im Sekundärstoffwechsel des Hopfens. Mehrere ESTs zeigten Ähnlichkeit zu Genen aus dem Terpenoid-Biosyntheseweg, der die Ausgangsstufen für die Biosynthese der Bittersäuren und Prenylflavonoide liefert. So kamen Transkripte für alle Enzyme des Methylerythritolphosphatweges (MEP) vor, ausgenommen der 4-Diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritolsynthase (ISPD), in welchem Isopentenylidiphosphat (IPP) synthetisiert wird, das zu Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) isomerisiert. Im Gegensatz dazu war nur eine Sequenz für ein Enzym des Mevalonat-Biosyntheseweges vorhanden. Vier ESTs zeigten Ähnlichkeit zu Terpensynthasen: eines zu Sesquiterpensynthasen (Terpenoid Synthetase, *Vitis vinifera*), zwei zu Monoterpensynthasen (Putative Chloroplast-Terpensynthase, *Quercus ilex*) und eines zeigte Ähnlichkeit zu Triterpensynthasen (Lupeolsynthase, *Taraxacum officinale*).

Die insgesamt 61 ESTs mit Ähnlichkeit zu putativen CHIs spielen vermutlich auch eine Rolle im Sekundärstoffwechsel von *H. lupulus*, die jedoch noch unbekannt ist (siehe 3.6).

Transkripte von bereits charakterisierten Enzymen der Bittersäure- bzw. Prenylflavonoidbiosynthese, wie VPS und CHS_H1, waren zahlreich vertreten. Auch ESTs, die denen von zwei CHS-ähnlichen Proteinen entsprechen, deren Funktion im Hopfensekundärstoffwechsel noch unbekannt ist, kamen vor. Am häufigsten war CHS2 mit 18 ESTs vertreten. Ein EST der CHS4 war vorhanden. Es wurde kein Transkript mit Ähnlichkeit zu CHS3 identifiziert, was die Vermutung bekräftigt, dass es sich dabei um ein Pseudogen handelt (Novak et al., 2003). Als Kandidaten für neue Enzyme aus der Xanthohumol-Biosynthese wurden insgesamt 20 ESTs identifiziert. Davon wiesen 18 Ähnlichkeit zu verschiedenen OMTs auf (3.3), während zwei ESTs mit Ähnlichkeit zu einer aromatischen Prenyltransferase identifiziert wurden. Algorithmen zur Erkennung integraler Membranproteine haben transmembranöse Regionen für deren translatierte Sequenz vorhergesagt (<http://www.expasy.ch/tools>). Bei den meisten der bisher charakterisierten aromatischen Prenyltransferasen handelt es sich um membrangebundene Proteine (Sasaki et al., 2008). Prenyltransferase-Enzymaktivitäten wurden jedoch in der löslichen Fraktion von Proteinextrakten aus Blüten und Zapfen von *H. lupulus* gemessen (Zuurbier et al., 1998) und aufgrund dessen wird erwartet, dass es sich bei der Prenyltransferase aus dem Xanthohumol-Biosyntheseweg um ein lösliches Enzym handelt. Die Prenylierungsreaktion wurde deshalb in dieser Arbeit nicht weiter verfolgt.

Ergebnisse

Tabelle 3.2 Gene mit bekannter oder potentieller Funktion im Hopfen-Sekundärstoffwechsel.

| Stoffwechselweg | Annotation ¹ | Accession-Nr. | Anzahl ESTs in cDNA-Banken |
|--|---|---------------|----------------------------|
| SAM-Zyklus | S-Adenosyl-Methioninsynthetase (<i>Actinidia chinensis</i>) | AAA81379 | 6 |
| | SAM-abhängige O-Methyltransferasen (siehe Tab. 3.3) | verschiedene | 18 |
| Phenylpropanoidstoffwechsel | Phenylalaninammoniumlyase (<i>Populus kitakamiensis</i>) | BAA21643 | 2 |
| Methylerythritolphosphatweg | 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat-Synthase (DXS) (<i>Pueraria montana var. lobata</i>) | AAQ84169 | 3 |
| | 1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat-Reduktoisomerase (DXR) (<i>Catharanthus roseus</i>) | AAF65154 | 1 |
| | 4-Diphosphocytidyl-2C-Methyl-D-Erythritolkinase (ISPE) (<i>Arabidopsis thaliana</i>) | AAG01340 | 1 |
| | 2C-Methyl-D-Erythritol-2,4-Cyclodiphosphat-Synthase (ISPF) (<i>Catharanthus roseus</i>) | AAF65155 | 1 |
| | GCPE-Protein (ISPG) (<i>Catharanthus roseus</i>) | AAO24774 | 2 |
| | LYTB-ähnliches Protein 1 (ISPH) (<i>Brassica rapa</i> subsp. <i>Pekinensis</i>) | AAK94426 | 3 |
| | Isopentenylidiphosphat-Isomerase II (IDI) (<i>Camptotheca acuminata</i>) | AAB94133 | 5 |
| Mevalonatbiosyntheseweg | Mevalonatdiphosphatdecarboxylase (<i>Hevea brasiliensis</i>) | AAL18927 | 1 |
| Terpenbiosynthese | Terpenoid Synthetase (<i>Vitis vinifera</i>) | AAS66358 | 1 |
| | Putative Chloroplast-Terpensynthase (<i>Quercus ilex</i>) | CAC41012 | 2 |
| | Lupeolsynthase (<i>Taraxacum officinale</i>) | BAA86932 | 1 |
| Bittersäurebiosynthese | Phloroisovalerophenonsynthase (VPS) (<i>H. lupulus</i>) | JC7639 | 10 |
| Prenylflavonoidbiosynthese | Chalkon-Synthase (CHS_H1) (<i>H. lupulus</i>) | CAC19808 | 7 |
| Flavonoidbiosynthese | Flavanone-3-beta-Hydroxylase (<i>Petunia x hybrida</i>) | A42110 | 1 |
| | Putative Flavonoid-3'-Hydroxylase (<i>Callistephus chinensis</i>) | AAG49298 | 1 |
| Potentielle Funktion im Sekundärstoffwechsel | Chalkon-Synthase (CHS2) (<i>H. lupulus</i>) | BAB47195 | 18 |
| | CHS-ähnliches Protein (CHS4) (<i>H. lupulus</i>) | CAD23044 | 1 |
| | Putative Chalkon-Isomerasen (siehe Tab. 3.1 und 3.18) | verschiedene | 61 |
| | Homogentisatphytyltransferase VTE2-2 (<i>Glycine max</i>) | ABB70128 | 2 |

¹-Blastx-Vergleich zur nichtredundanten Datenbank nr, Stand 25.08.06

3.3 *O*-Methyltransferasen aus *H. lupulus* (HIOMTs)

Die zahlreichen Transkripte mit Homologie zu OMTs bildeten eine gute Ausgangsbasis zur Erforschung des *O*-Methylierungsschritts des Xanthohumol-Biosynthesewegs. Die Identifikation dieser OMT bildete deshalb das Hauptziel dieser Arbeit.

Die 18 identifizierten ESTs (Tab. 3.2) zeigten zu insgesamt fünf verschiedenen OMTs anderer Pflanzen Sequenzähnlichkeit (Tab. 3.3). Ein Sequenzvergleich der 18 ESTs zeigte, dass sie in fünf Clustern gruppieren sowie zwei Einzelsequenzen vorhanden waren. Die zwei Sequenzen des Cluster 185 und die Sequenz 028-A08 zeigten Ähnlichkeit zu Orcinol-OMTs von *Rosa*-Hybriden. Aufgrund der relativ kurzen Länge der ESTs konnte noch nicht beurteilt werden, ob es sich um verschiedene ESTs eines Clusters oder aber um verschiedene Sequenzen handelte. Nach vollständiger Sequenzierung der cDNAs überlappten die drei Sequenzen und assemblierten in einem gemeinsamen Cluster. Ähnlich verhielt es sich mit Cluster 49 und 50, deren Sequenzen nach vollständiger Sequenzierung ebenfalls einen einzigen Cluster bildeten. Der Vergleich mit den Datenbankeinträgen zeigte, dass in drei Fällen (Cluster 58, Cluster 49/50 und Cluster 121) die Konsensussequenzen jeweils einen vollständigen offenen Leserahmen enthielten, im Falle des ESTs 011-G04, sowie der Konsensussequenz des Clusters 185/028-A08, jedoch nur Fragmente der vollständigen cDNA-Sequenzen vorlagen. Das 5'-Ende dieser cDNAs musste also noch ermittelt werden (3.2.1). Im Folgenden werden die ausgewählten Sequenzen als HIOMT1 bis HIOMT5 bezeichnet (HIOMT = *Humulus lupulus O*-Methyltransferase).

Tabelle 3.3 ESTs aus den Hopfen cDNA-Bibliotheken mit Homologie zu OMTs.

| Cluster-oder Sequenzname | Anzahl ESTs | Ähnlichkeit zu Datenbankeintrag ¹ | E-Wert | Offener Leserahmen | Name |
|--------------------------|-------------|--|--------|--------------------|---------------|
| Cluster 58 | 4 | (R,S)-Retikulin-7-OMT <i>Papaver somniferum</i> (AAQ01668) | 1e-42 | vollständig | HIOMT1 |
| 011-G04 | 1 | Kaffeesäure-OMT <i>Rosa chinensis</i> var. <i>spontanea</i> (BAC78828) | 2e-49 | unvollständig | HIOMT2 |
| Cluster 185 | 2 | Putative Orcinol-OMT <i>Rosa hybrid cultivar</i> Kazanlik (CAH05081) | 1e-112 | unvollständig | HIOMT3 |
| 028-A08 | 1 | Orcinol-OMT <i>Rosa hybrid cultivar</i> (AAM23005) | 7e-24 | | |
| Cluster 49 | 4 | SAM-abhängige Karboxyl-OMT <i>Medicago truncatula</i> (ABE84080) | 5e-35 | vollständig | HIOMT4 |
| Cluster 50 | 4 | (ABD33161) | 1e-45 | | |
| Cluster 121 | 2 | Kaffeoyl-CoA-3-OMT <i>Boehmeria nivea</i> (AAT75320) | 4e-77 | vollständig | HIOMT5 |

¹-Blastx-Vergleich zur nichtredundanten Datenbank nr, Stand 03.01.07.

3.3.1 Amplifikation des 5'-Endes von HIOMT2 und HIOMT3

Das 5'-Ende von HIOMT2 und HIOMT3 wurde unter Verwendung des GeneRacer Kit (Invitrogen) amplifiziert (2.2.11). Die dafür verwendeten Oligonukleotide HIOMT2_5'Race/HIOMT2_5'Race-npr bzw. HIOMT3_5'Race/HIOMT3_5'Race-npr (Tab.2.3) wurden anhand von Sequenzabschnitten synthetisiert, die bereits vom EST bekannt waren und entsprechend mit den Oligonukleotiden aus dem GeneRacer Kit kombiniert.

Ausgehend vom Vergleich mit den Sequenzen aus den Datenbanken und von den bereits vorliegenden Sequenzabschnitten wurde für HIOMT2 ein PCR-Produkt von ~800 bp Länge erwartet und für HIOMT3 von ~200 bp. Für HIOMT2 wurde ein PCR-Produkt der erwarteten Größe erhalten (Abb.3.3). Die Sequenzierung lieferte eine Sequenz, die sowohl die Primersequenzen als auch den bereits bekannten Sequenzabschnitt der cDNA enthielt und in diesen Bereichen mit ihnen eindeutig übereinstimmte. Die Sequenz lieferte weitere 612 bp. Die so erhaltene Gesamtsequenz enthielt ein Startcodon und ein Poly-A-Signal und ein Vergleich mit OMTs aus der Datenbank zeigte das Vorhandensein eines kompletten offenen Leserahmens an.

Die PCR-Reaktionen für HIOMT3 lieferten drei Banden, von denen die längste die erwartete Größe aufwies. Sequenzierung aller Banden ergab, dass es sich in allen drei Fällen um

dieselbe Sequenz von jeweils unterschiedlicher Länge handelte. Auch hier waren die in der PCR verwendeten Oligonukleotidsequenzen als auch der Abschnitt bereits bekannter Sequenz der HIOMT3 vorhanden. Das cDNA-Fragment konnte so um 74 bp verlängert werden. Ein Vergleich mit OMT-Sequenzen aus der Datenbank zeigte auch hier das Vorliegen eines vollständigen offenen Leserahmens an.

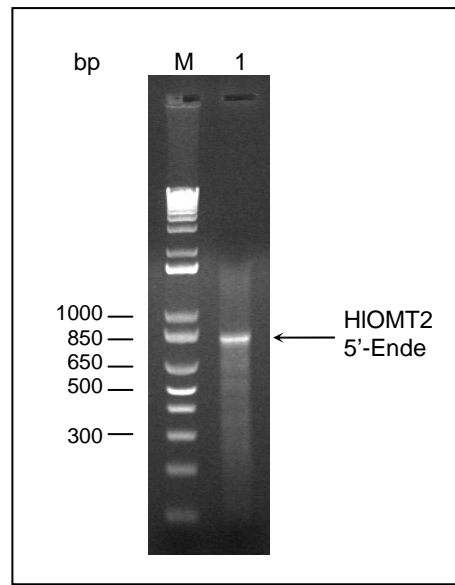


Abbildung 3.3 Agarose-Gelelektrophorese des mittels GeneRacer Kit (Invitrogen) amplifizierten 5'-Endes von HIOMT2. M = 1 kb Plus DNA-Längenstandard (Invitrogen), Spur 1 = mit HIOMT2_5'Race-npr und dem „nested“ Oligonukleotid aus dem GeneRacer Kit amplifiziertes PCR-Produkt.

3.3.2 Sequenzanalyse der HIOMTs

Die cDNAs der HIOMTs wurden nach Klonierung in den Vektor pGEM-T mit vektorspezifischen Primern vom 5'- und vom 3'-Ende sequenziert. Danach lagen alle fünf Nukleotidsequenzen komplett vor. Angaben zur Gliederung der cDNAs in 5'- und 3'-UTR und das jeweils durchgehende Leseraster sind aus Tab. 3.4 zu entnehmen. Der Translationsstart von HIOMT4 konnte nicht eindeutig bestimmt werden, da zwei Startcodons im Abstand von 105 bp im selben Leseraster aufeinander folgten. Obwohl ein Sequenzvergleich der translatierten Nukleotidsequenz von HIOMT4 mit bereits funktionell charakterisierten Karboxyl-OMTs aus der Datenbank auf die Nutzung des weiter stromabwärts gelegenen Startcodons bei Nukleotid 144 hinweist, war das Startcodon nicht zweifelsfrei bestimmbar. Für die folgenden Experimente wurden beide Möglichkeiten in Betracht gezogen und der offene Leseraster von 1101 bp als HIOMT4a und der mit 1206 bp als HIOMT4b bezeichnet. Mit Hilfe von mehreren über das Internet nutzbaren Programmen (TargetP, Predator, iPSORT und ChloroP, <http://www.expasy.ch/tools>) sollte festgestellt

werden, ob im verlängerten N-Terminus von HIOMT4b ein Signalpeptid, dass die subzelluläre Lokalisation bestimmt, vorhanden ist. Es wurde kein einheitliches Ergebnis erhalten. Während iPSORT ein Chloroplastentransitpeptid vorhersagte, konnte dies mit ChloroP nicht bestätigt werden. TargetP gab Hinweise auf das Vorhandensein eines Signalpeptids des sekretorischen Signalwegs und Predator lokalisierte das Protein mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht ins Endoplasmatische Retikulum, die Plastiden oder die Mitochondrien. Auch die übrigen HIOMT-Proteinsequenzen wurden mit den vier Programmen getestet. Für keines dieser Sequenzen wurde ein Signalpeptid vorhergesagt.

Tabelle 3.4 Gliederung und Eigenschaften der aus *H. lupulus* isolierten cDNA-Sequenzen und der abgeleiteten Proteine.

| Name | 5'UTR [bp] | Offener Leserahmen [bp] | 3'UTR [bp] | Aminosäuren/ Berechnete Molekulare Masse [kDa] | Datenbankvergleich Identität [%]/Ähnlichkeit [%] |
|--------------------|------------|-------------------------|------------|--|--|
| HIOMT1 | 49 | 1059 | 114 | 352/39,3 | (<i>R,S</i>)-Retikulin-7-OMT <i>Papaver somniferum</i> (AAQ01668) 51/69 |
| HIOMT2 | 62 | 1083 | 157 | 360/39,8 | Kaffeesäure-OMT <i>Rosa chinensis</i> var. <i>spontanea</i> (BAC78828) 55/72 |
| HIOMT3 | 13 | 1134 | 137 | 377/42,1 | Orcinol-OMT <i>Rosa hybrid cultivar</i> (AAM23005) 72/83 |
| HIOMT4a HIOMT4b | 143 38 | 1101 1206 | 179 179 | 366/41,6 401/45,4 | Salizylsäure-Methyltransferase <i>Hoya carnosa</i> (CAI05934) 44/66 45/66 |
| HIOMT5 | 34 | 744 | 289 | 247/27,8 | Kaffeoyl-CoA-OMT <i>Broussonetia papyrifera</i> (AAT37172) 91/96 |

¹-Blastp-Vergleich zur nichtredundanten Datenbank nr, Stand 03.01.07

Die Nukleotid- bzw. davon abgeleiteten Aminosäuresequenzen der HIOMTs sind in den Abbildungen 7.1–7.5 im Anhang dargestellt. Die Sequenzinformationen sind in den GenBank/DDBJ/EMBL-Datenbanken unter den folgenden Genbank-Nummern zu finden: HIOMT1 (EU309725), HIOMT2 (EU309726), HIOMT3 (EU309727), HIOMT4 (EU309728) und HIOMT5 (EU309729). Die berechnete Molekulare Masse der Proteine von HIOMT1, HIOMT2, HIOMT3 und HIOMT4a/b beträgt jeweils rund 40 kDa und liegt damit im Bereich anderer bereits funktionell charakterisierter Klasse II-OMTs bzw. SABATH-Karboxyl-MTs.

Ergebnisse

Klasse I-OMTs besitzen eine Molekulare Masse von 23-27 kDa. Die Molekulare Masse der HIOMT5 liegt mit 27,8 kDa in diesem Bereich.

Ein Sequenzvergleich der HIOMTs mit den OMTs aus der Datenbank zu denen sie die höchste Sequenzhomologie aufweisen, ist in den Abbildungen 3.4–3.7 dargestellt.

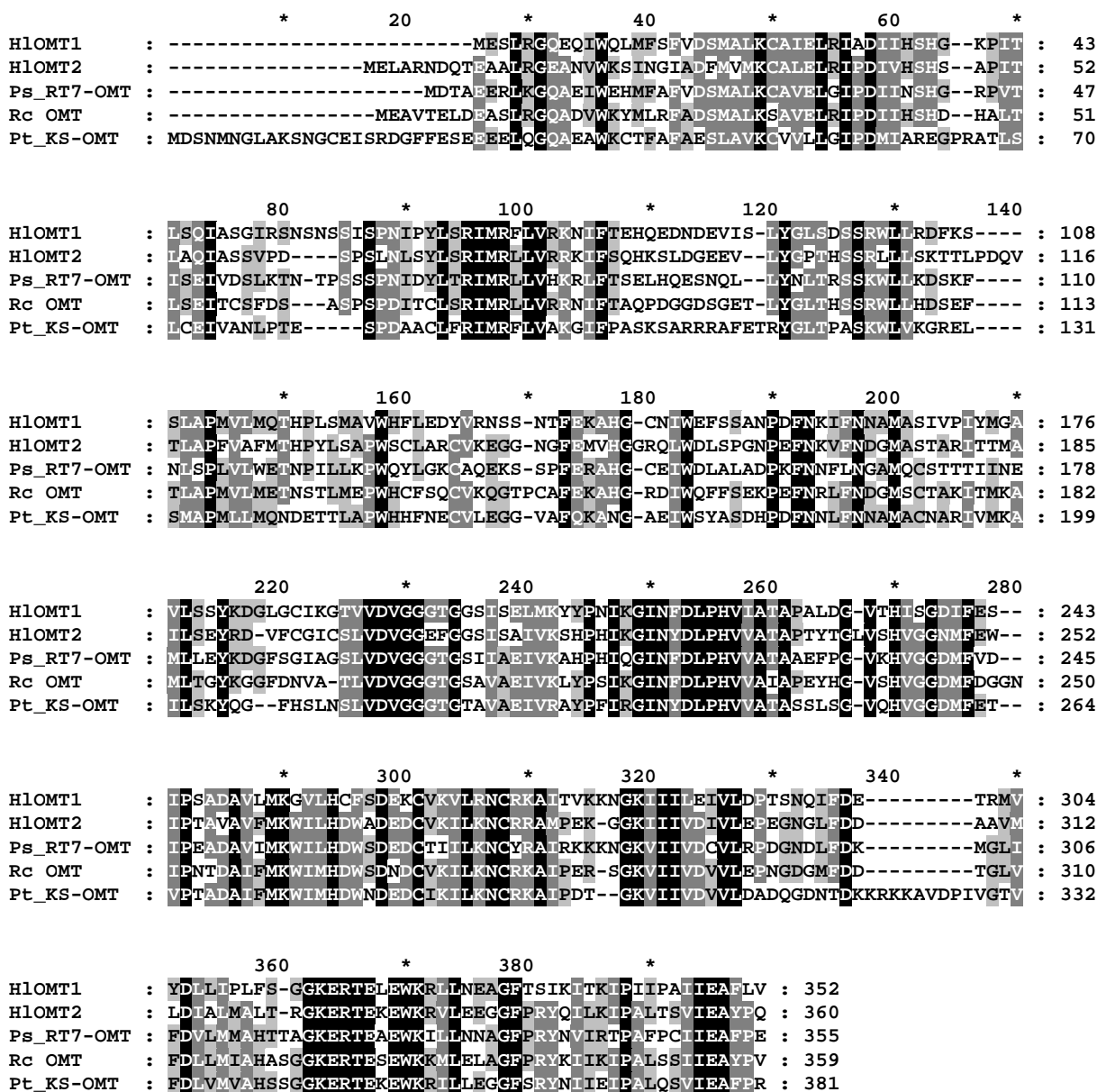


Abbildung 3.4 Sequenzvergleich der HIOMT1 und HIOMT2 mit *P. somniferum* (R,S)-Retikulin-7-OMT (AAQ01668), *R. chinensis* Kaffesäure-OMT (BAC78828) und *P. taeda* Kaffesäure-OMT (AAC49708). Aminosäuren sind entsprechend ihrem Konservierungsgrad mit Grauabstufungen unterlegt (Ähnlichkeitsdefinition siehe GeneDoc). Schwarze Blöcke zeigen absolute Konservierung an, dunkelgraue und hellgraue Blöcke kennzeichnen teilweise konservierte Aminosäuren und konservative Aminosäureaustausche. Nummern und Sterne (*) oberhalb der Sequenzblöcke markieren die Position im Sequenzvergleich, Zahlen am rechten Rand sind spezifisch für die einzelnen Sequenzen.

Mit 51% Identität auf Proteinebene zeigte die HIOMT1 zur Retikulin-7-OMT aus *P. somniferum* die größte Ähnlichkeit, die HIOMT2 mit 55% zu einer Kaffeesäure-OMT aus *R. chinensis* und die HIOMT3 ist zu 72% identisch mit einer Orcinol-OMT aus *R. hybrid cultivar*.

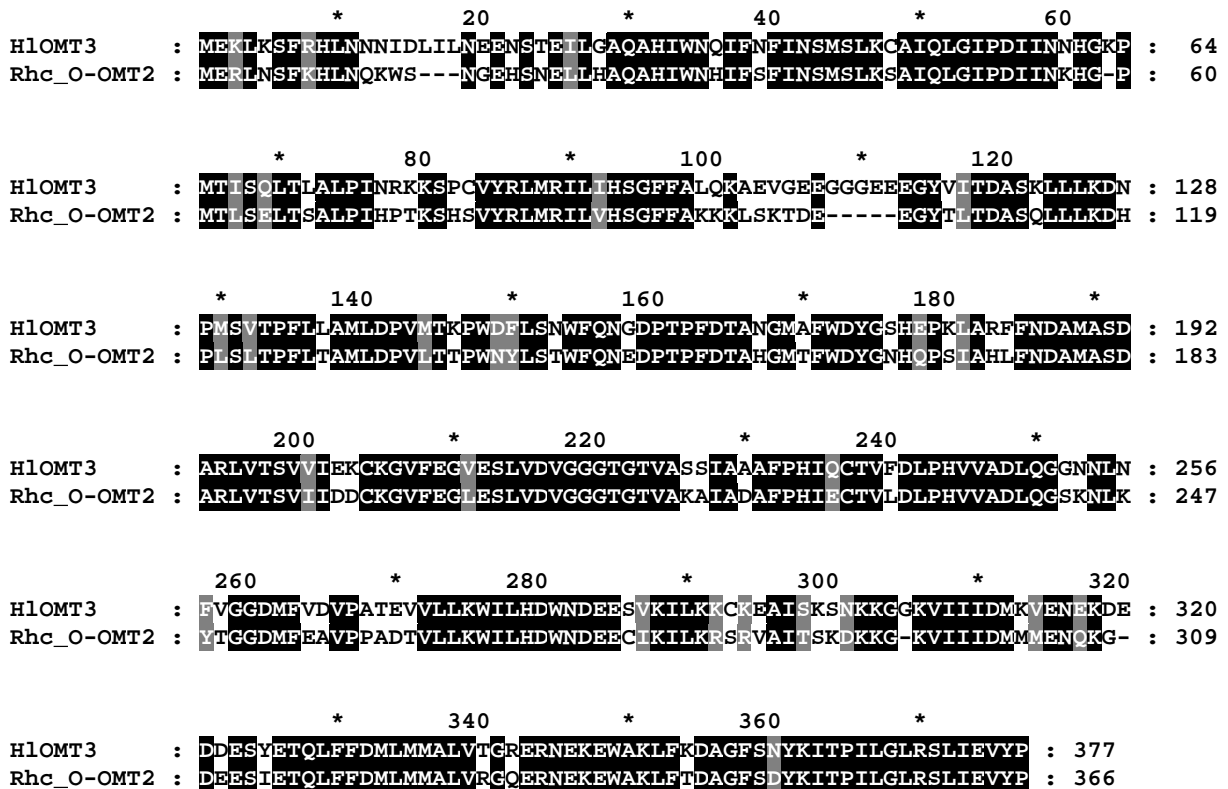


Abbildung 3.5 Sequenzvergleich der HIOMT3 mit *R. hybrid cultivar* Orcinol-OMT2 (AAM23005). Aminosäuren sind entsprechend ihrem Konservierungsgrad mit Grauabstufungen unterlegt (Ähnlichkeitsdefinition siehe GeneDoc). Identische Aminosäuren sind schwarz und chemisch ähnliche grau markiert. Nummern und Sterne (*) oberhalb der Sequenzblöcke markieren die Position im Sequenzvergleich, Zahlen am rechten Rand sind spezifisch für die einzelnen Sequenzen.

Relativ geringe 44% Identität besitzt die HIOMT4 zu einer Salizylsäure-Karboxyl-MT aus *Hoya carnosa*, wohingegen die HIOMT5 zu 91% identisch mit einer Kaffeoyl-CoA-OMT aus *Broussonetia papyrifera* ist. Von den fünf HIOMTs besitzen die HIOMT1, HIOMT2 und die HIOMT3 zueinander signifikante Ähnlichkeit. HIOMT1 und HIOMT2 sind auf Proteinebene zu 47% (55% auf Nukleotidebene) identisch, HIOMT1 und HIOMT3 zu 33% (49%) und HIOMT2 und HIOMT3 zu 35% (49%).

Ergebnisse

```

*           20           *           40           *           60           *
HlOMT4 : MYTNTINNSSPTLLVSKVHQLILIFSVKNIAKAIMEVFEQVLHMNGGVGETSYAINSSLQRAVLSCTRET : 70
Hc_SAMT : -----MEVVDVLHMNGGIGDASYASNSLQKRVMLLAKPI : 35

*           80           *           100          *           120          *           140
HlOMT4 : LEESTKEVYNDKAVFPECLRTADLGCSSGPNTLTLVSYIIDIVQATCQCSNKIIPPTFQVFLNDLPGND : 140
Hc_SAMT : TEEATTELY--TRLFPKSICLADLGCSSGPNTFLAVSELIKDVBEKCKSLG--HKSPEYQIYVFLNDLPSND : 101

*           160          *           180          *           200          *
HlOMT4 : FNVVFOQLSNFYERLKKKCKDDFGPCFLAAMPGSFYGKLFPPNNSMEIVHSSYSLEHWSLQVPREVLVNNKG : 210
Hc_SAMT : FNTIEKSLPSEFKSFAEOMCSGEGHCFFTGVPGSFYGRLFPNKSLEHVVHSSYSVMWLSRVPDLEEVN-KG : 170

*           220          *           240          *           260          *           280
HlOMT4 : NIYISKTSPPIVEKAYLEQFRKDFTNFLRWRSEELVGGIMIIITMGSIKSDSHKN---ICEIMGRALK : 276
Hc_SAMT : NIYLSSTSPLSVLISSYLKQFQDFTLFLQCRAEELVPGVMVLTFLCRKSEDHSGKESGYVWELLARALN : 240

*           300          *           320          *           340          *
HlOMT4 : DMVKENIIEAESLIDNFNMFVYFANSTEVESVVOEEGFSFVQKLNSEFMAWDSGFTSHEHNSNNEKCR-- : 344
Hc_SAMT : ELVSEGQIEGEQLDCFNIPQYTPSPAENVKYFVEEEGFSFITRLEATTIHWYAYDHDHDEHVTGHHHAFKDG : 310

*           360          *           380          *           400
HlOMT4 : GKVSDYIRAAEPIILVKQFGKIVMBEELFKRIADKVTESMAKEKWQYLNLIIVISLTKN- : 401
Hc_SAMT : GYSVSNCMRAVAEPLLVSHFGEAIMDEVFRKYREILTDCMTKEKTEFINVTVSMTRRV : 368

```

Abbildung 3.6 Sequenzvergleich der HlOMT4 mit *H. carnosus* SAM:Salizylsäure-Karboxyl-MT (CAI05934). Aminosäuren sind entsprechend ihrem Konservierungsgrad mit Grauabstufungen unterlegt (Ähnlichkeitsdefinition siehe GeneDoc). Identische Aminosäuren sind schwarz und chemisch ähnliche grau markiert. Nummern und Sterne (*) oberhalb der Sequenzblöcke markieren die Position im Sequenzvergleich, Zahlen am rechten Rand sind spezifisch für die einzelnen Sequenzen.

```

*           20           *           40           *           60
HlOMT5 : MANNGEQEQNQVSRHQEVGHKSLQLSDALYQYILETSVYPREPESMKELREVTAKHPWNIMTTSA : 65
Bp_KCoA-OMT : MATNGEGKQNEAGRHOEVGHKSLQLSDALYQYILETSVYPREPEAMKELREITAKHPWNIMTTSA : 65
Vv_KCoA-OMT : MAIN---Q-EAGRHOEVGHKSLQLSDALYQYILETSVYPREPESMKELRELTAKHPWNIMTTSA : 60

*           80           *           100          *           120          *
HlOMT5 : DEGQFLNMLLKLINAKNTMEIGVYTGYSLLATALALPDDGKILAMDINKENYELGLPIEKAGVA : 130
Bp_KCoA-OMT : DEGQFLNMLLKLINAKNTMEIGVYTGYSLLATALALPDDGKILAMDINKENYELGLPIEKAGVA : 130
Vv_KCoA-OMT : DEGQFLNMLLKLINAKNTMEIGVYTGYSLLATALALPDDGKILAMDINKENYELGLPIEKAGVA : 125

*           140          *           160          *           180          *
HlOMT5 : HKIDFREGPALPVLDQMIEDGKYHGSFDFIFVDADKDNLYNHYKRLIDLKVGGVIGYDNTLWNG : 195
Bp_KCoA-OMT : HKIDFREGPALPVLDQMIEDGKYHGSFDFIFVDADKDNLYNHYKRLIDLKVGGVIGYDNTLWNG : 195
Vv_KCoA-OMT : HKIDFREGPALPVLDQMIEDGKYHGSFDFIFVDADKDNLYNHYKRLIDLKVGGVIGYDNTLWNG : 190

*           200          *           220          *           240
HlOMT5 : SVVAPPDAPLRKYVRYRDFVIELNKALAADPRIEICMLPVGDGVTICRHS : 247
Bp_KCoA-OMT : SVVAPPDAPLRKYVRYRDFVIELNKALAADPRIEICMLPVGDGITVCRVRS : 247
Vv_KCoA-OMT : SVVAPPDAPLRKYVRYRDFVIELNKALAADPRIEICMLPVGDGITICRRLS : 242

```

Abbildung 3.7 Sequenzvergleich der HlOMT5 mit *B. papyrifera* Kaffeoyl-CoA-OMT (AAT37172) und *V. vinifera* Kaffeoyl-CoA-OMT (CAA90966). Aminosäuren sind entsprechend ihrem Konservierungsgrad mit Grauabstufungen unterlegt (Ähnlichkeitsdefinition siehe GeneDoc). Identische Aminosäuren sind schwarz markiert, teilweise konservierte Aminosäuren und konservative Austausche sind grau unterlegt. Nummern und Sterne (*) oberhalb der Sequenzblöcke markieren die Position im Sequenzvergleich, Zahlen am rechten Rand sind spezifisch für die einzelnen Sequenzen.

3.3.3 Clusteranalyse und Sequenzvergleich der HIOMTs

Um die Ähnlichkeit der Hopfen-OMTs zu anderen pflanzlichen OMTs zu verdeutlichen, wurde eine Clusteranalyse mit den Aminosäuresequenzen von Vertretern der Klasse I- und II-OMTs sowie SABATH-MTs durchgeführt. Mehrheitlich wurden dafür funktionell charakterisierte OMTs ausgewählt. Ein multipler Sequenzvergleich wurde mit Clustel W (Thompson et al., 1994) und der Stammbaum mit Hilfe der Software „TREECON for Windows“ (Van de Peer und De Wachter, 1994) erstellt (Einstellungen: Distanzberechnung durch Poisson Correction, Insertionen und Deletionen nicht miteinbezogen, Baumtopologie abgeleitet durch Neighbor-joining Methode).

Die HIOMTs gruppieren in drei unterschiedlichen OMT-Familien (Abb. 3.8-3.10), die außerhalb der SAM-Binderegionen keine Sequenzähnlichkeit zueinander aufweisen. HIOMT1, HIOMT2 und HIOMT3 gruppieren mit Klasse II-OMTs (Joshi und Chiang, 1998), deren Vertreter Derivate von Hydroxyzimtsäuren, Flavonoide oder Alkaloide methylieren. HIOMT5 ist innerhalb der Klasse I-OMTs zu finden, welche Hydroxylgruppen von Phenylpropanoid-CoenzymA-Estern methylieren, während HIOMT4 mit SABATH-MTs gruppiert, die Karboxylgruppen verschiedener niedermolekularer Verbindungen oder Stickstoffatome von Alkaloiden methylieren.

HIOMT1 und HIOMT2 nehmen eine basale Position im Kladogramm ein und befinden sich im selben Subcluster (Abb.3.8). Sie zeigen Ähnlichkeit zu Sequenzen von Vertretern der Papaveraceae, welche in die Benzylisochinolin-Biosynthese involviert sind und zu einer OMT aus *Rosa chinensis*, welche *in vitro* Kaffeesäure methylierte und mit ortho-Diphenolderivaten geringe Aktivität zeigte (Wu et al., 2003). Ihre Funktion in der Pflanze ist noch nicht bekannt, aber ihre hohe Expression in sich entfaltenden Rosenblüten lässt vermuten, dass das Enzym eine Funktion bei der Blütenentwicklung spielt. Die Sequenzidentität der HIOMT1 zu den anderen OMTs des Subclusters ist mit 34-52% und die der HIOMT2 mit 30-55% nicht sehr hoch. Aufgrund dieser geringen Identität und der unterschiedlichen Substratspezifitäten der OMTs dieses Subclusters ist es nicht möglich auf die Substrate der HIOMT1 und HIOMT2 zu schließen. Das einzige bisher als Chalkon-OMT charakterisierte Enzym, die Isoliquiritigenin-2'-OMT aus *M. sativa* (Maxwell et al., 1992; Maxwell et al., 1993), befindet sich in einem anderen Subcluster und zeigt keine große Ähnlichkeit zu den HIOMTs. HIOMT3 besetzt eine stärker abgeleitete Position im Kladogramm. Sie befindet sich in einem von zwei großen benachbarten Subclustern, in denen Enzyme mit diversen Substratspezifitäten enthalten sind.

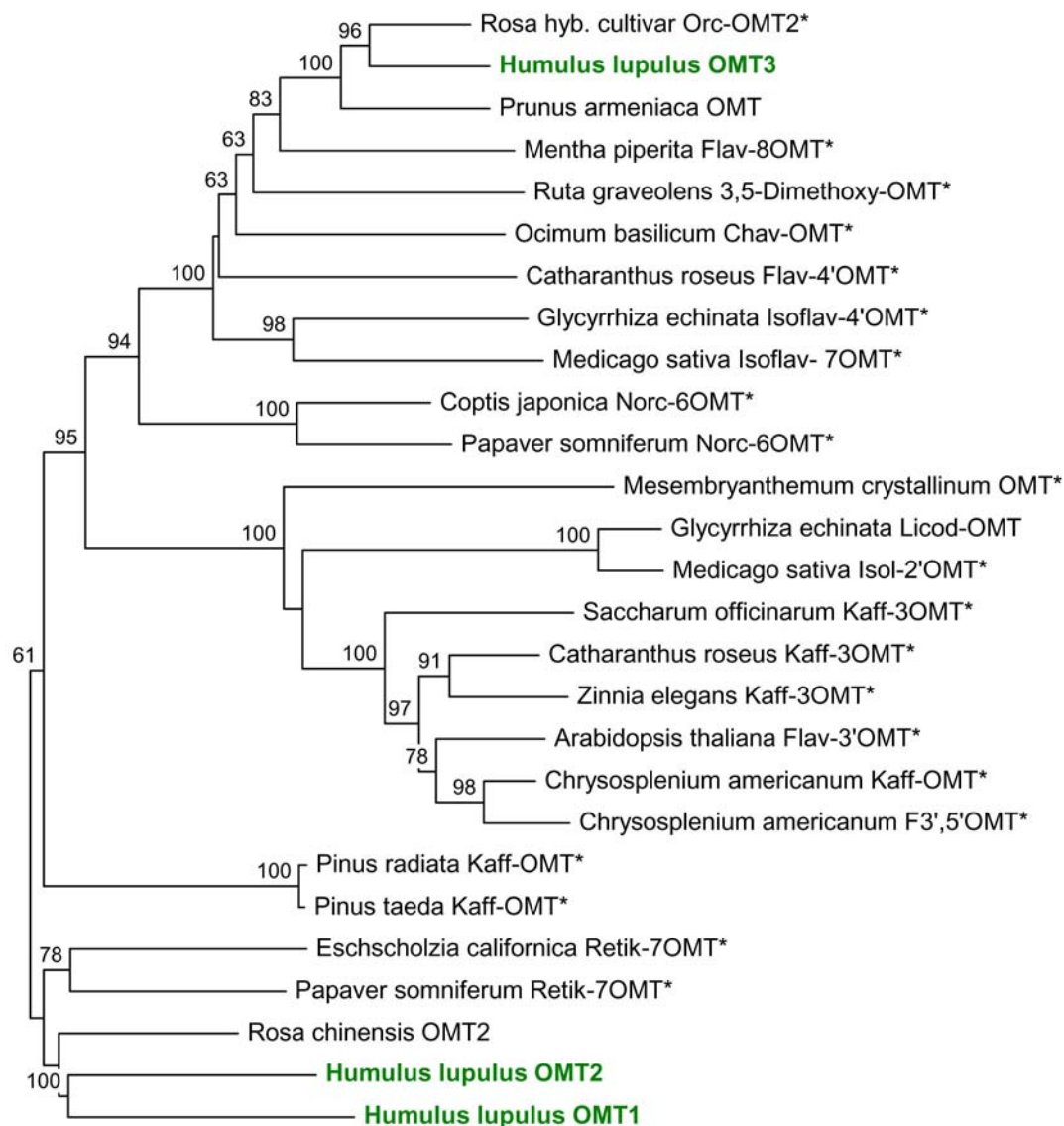


Abbildung 3.8 Clusteranalyse ausgewählter pflanzlicher Klasse II-OMTs. Die Aminosäuresequenzen von 27 OMTs und die der HIOMT1, HIOMT2 und HIOMT3 wurden in die Analyse einbezogen. Sterne (*) kennzeichnen funktionell charakterisierte OMTs. Die Bootstrapwerte [%] geben an, wie oft die entsprechende Gruppierung in 100 Pseudoreplikationen des Datensatzes auftrat. Werte oberhalb von 50% werden angezeigt. Die verwendeten Sequenzen und ihre zugehörigen Genbank-Nummern sind: *R. hybrid cultivar* Orcinol-OMT (AAM23005), *H. lupulus* OMT3, *P. armeniaca* OMT (AAB71213), *M. piperita* Flavonoid-8-OMT (AAR09600), *R. graveolens* 3,5-Dimethoxyphenol-OMT (AAX82431), *O. basilicum* Chavicol-OMT (AAL30423), *C. roseus* Flavonoid-4'-OMT (AAR02420), *G. echinata* 2,7,4'-Trihydroxyisoflavanon-4'-OMT (BAC58011), *M. sativa* Isoflavon-OMT (AAC49928), *C. japonica* (R,S)-Norcochlorin-6-OMT (Q9LEL6), *P. somniferum* (R,S)-Norcochlorin-6-OMT (AAQ01669), *M. crystallinum* Inositol-4-OMT (P45986), *G. echinata* Licodion-OMT (BAA13683), *M. sativa* Isoliquiritigenin-2'-OMT (AAB48059), *S. officinarum* Kaffeesäure-3-OMT (O82054), *C. roseus* Kaffeesäure-3-OMT (Q8W013), *Z. elegans* Kaffeesäure-3-OMT (Q43239), *A. thaliana* Flavonol-3'-OMT (AAB96879), *C. americanum* Kaffeesäure-OMT (AAA86982), *C. americanum* Flavonol-3',5'-OMT (AAA80579), *P. radiata* Kaffeesäure-OMT (AAD24001), *P. taeda* Kaffeesäure-OMT (AAC49708), *E. californica* Retikulin-7-OMT (BAE79723), *P. somniferum* (R,S)-Retikulin-7-OMT (AAQ01668), *R. chinensis* var. *spontanea* OMT (BAC78828), *H. lupulus* OMT2, *H. lupulus* OMT1.

Im Subcluster der HIOMT3 kommen Isoflavonoid- und Alkaloid-methylierende Enzyme vor, aber auch solche, die in die Synthese von flüchtigen phenolischen Verbindungen involviert sind, wie z.B. die Orcinol-OMT aus *R. hybrida*. Orcinol ist eine unmethylierte Vorstufe von 3,5-Dimethoxytoluen, welches ein Hauptbestandteil des Duftstoffes vieler Rosensorten ist. Die Funktion des Enzyms aus *P. armeniaca*, einem anderen Vertreter der Rosaceae, die auch wie die Familie der Cannabaceae zur Ordnung der Rosales gehört, ist bisher unbekannt. Die Identität der HIOMT3 zu anderen OMTs dieses Clusters liegt zwischen 50 und 71%. Im zweiten Subcluster sind neben Flavonoid- und Chalkon-methylierenden Enzymen mehrere OMTs enthalten, die Derivate der Hydroxyzimtsäure methylieren und in die Synthese von Lignin involviert sind.

Die Enzyme der Klasse I-OMT-Familie zeigen große Ähnlichkeit zueinander, auch wenn sie von evolutionär weit voneinander entfernten Spezies stammen (Abb. 3.9). Die Aminosäuresequenz von HIOMT5 ist zu den Sequenzen anderer Vertreter dieser OMT-Familie zu 81-91% identisch. Die charakterisierten Vertreter methylieren Kaffeoyl-CoA und 5-Hydroxyferuloyl-CoA, wobei das aus *M. sativa* stammende Enzym auch die dazu korrespondierenden Hydroxyzimtsäuren als Substrate annimmt, wenn auch weitaus weniger effizient (Inoue et al., 1998).

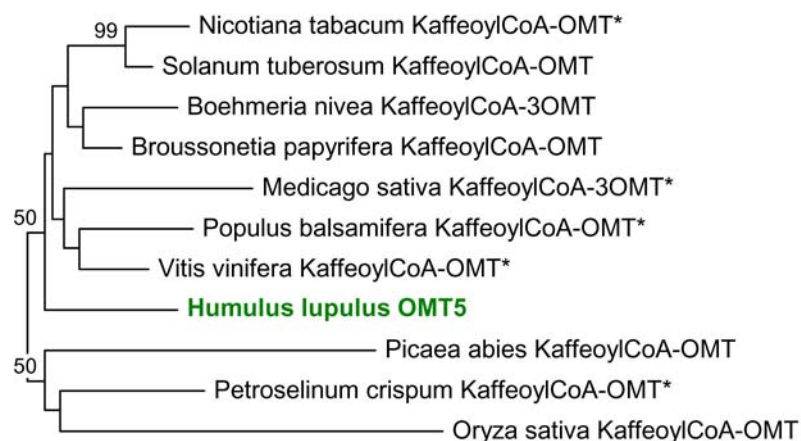


Abbildung 3.9 Clusteranalyse ausgewählter pflanzlicher Klasse I-OMTs. Die Aminosäuresequenzen von 10 KaffeoylCoA-OMTs und die der HIOMT4 wurden in die Analyse einbezogen. Sterne (*) kennzeichnen funktionell charakterisierte OMTs. Die Bootstrapwerte [%] geben an, wie oft die entsprechende Gruppierung in 100 Pseudoreplikationen des Datensatzes auftrat. Werte oberhalb von 50% werden angezeigt. Die verwendeten Sequenzen und ihre zugehörigen Genbank-Nummern sind: *N. tabacum* Kaffeoyl-CoA-OMT1 (O24144), *S. tuberosum* Kaffeoyl-CoA-OMT (BAC23054), *B. nivea* Kaffeoyl-CoA-3-OMT (AAT75320), *B. papyrifera* Kaffeoyl-CoA-OMT (AAT37172), *M. sativa* Kaffeoyl-CoA-3-OMT (AAC28973), *P. balsamifera* Kaffeoyl-CoA-3-OMT (CAA12198), *V. vinifera* Kaffeoyl-CoA-OMT (CAA90969), *H. lupulus* OMT5, *P. abies* Kaffeoyl-CoA-OMT (CAK18782), *P. crispum* Kaffeoyl-CoA-OMT (M69184), *O. sativa* Kaffeoyl-CoA-OMT (AAT68022).

Diverser gestaltet sich das Kladogramm der SABATH-MTs zu welchem HIOMT4 gehört (Abb.3.10). Die Karboxyl-OMTs aus *H. carnosus*, *C. breweri*, *Petunia x hybrida* und *S. floribunda* gehören zum SAMT-Typ der SABATH-MTs, dessen Vertreter Salizylsäure als Substrat gegenüber Benzoesäure bevorzugen (Effmert et al., 2005). Dem BAMT-Typ gehören die Enzyme aus *N. suaveolens*, *Arabidopsis lyrata* und *A. majus* an, die mit Benzoesäure eine höhere katalytische Effizienz aufweisen als mit Salizylsäure. Mit Ausnahme der Sequenz aus *N. suaveolens*, die zur Sequenz aus einem anderen Vertreter der Solanaceae, *P. hybrida*, die größte Ähnlichkeit aufweist, gruppieren die Sequenzen des jeweiligen Typs miteinander. HIOMT4 gruppiert mit OMTs aus *C. arabica*, die N-Atome methylieren. Die Identität der Aminosäuresequenz von HIOMT4 mit den Sequenzen der anderen OMTs ist mit 43-45% eher niedrig.

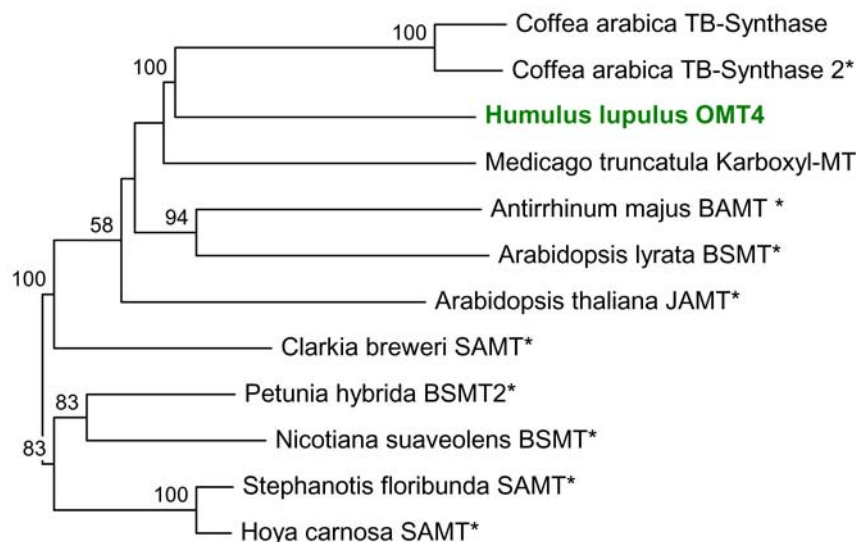


Abbildung 3.10 Clusteranalyse ausgewählter SABATH-MTs. Die Aminosäuresequenzen von 11 Karboxyl-MTs und die der HIOMT4 wurden in die Analyse einbezogen. Sterne (*) kennzeichnen funktionell charakterisierte OMTs. Die Bootstrapwerte [%] geben an, wie oft die entsprechende Gruppierung in 100 Pseudoreplikationen des Datensatzes auftrat. Werte oberhalb von 50% werden angezeigt. Die verwendeten Sequenzen und ihre zugehörigen Genbank-Nummern sind: *C. arabica* Theobrominsynthase (BAB39214), *C. arabica* Theobrominsynthase 2 (BAC43757), *H. lupulus* OMT4, *M. truncatula* Karboxyl-MT (ABD33161), *A. majus* SAM:Benzoessäure-Karboxyl-MT (AAF98284), *A. lyrata* SAM:Benzoessäure/Salizylsäure-Karboxyl-MT (AAP57211), *A. thaliana* Jasmonsäure-Karboxyl-MT (AAG23343), *C. breweri* SAM:Salizylsäure-Karboxyl-MT (AAF00108), *P. x hybrida* SAM:Benzoessäure/Salizylsäure-Karboxyl-MT 2 (AAO45013), *N. suaveolens* SAM:Benzoessäure/Salizylsäure-Karboxyl-MT (CAF31508), *S. floribunda* SAM:Salizylsäure-Karboxyl-MT (CAC33768), *H. carnosus* SAM:Salizylsäure-Karboxyl-MT (CAI05934).

3.3.4 HIOMT-Genexpressionsanalyse in *H. lupulus*

Um die gewebespezifische Transkriptakkumulation der fünf isolierten HIOMTs zu untersuchen, wurde Gesamt-RNA aus jungen und ausgewachsenen Blättern, Wurzeln und Stängeln, männlichen und weiblichen Blüten sowie verschiedenen Entwicklungsstadien von Hopfenzapfen (2.1.1) extrahiert und in Real-time PCR-Experimenten (2.2.12) eingesetzt. Das Pflanzengewebe setzte sich jeweils aus Gewebeproben mehrerer Pflanzen zusammen, die vereinigt worden waren. Die erhaltenen Werte wurden zur Transkription der GAPDH im entsprechenden Gewebe normalisiert und das Expressionslevel relativ zu dem in jungen Blättern (HIOMT1, 2, 3 und 5) bzw. Stängeln (HIOMT4) berechnet. Die Sequenz der GAPDH ist über Artgrenzen hinweg hoch konserviert. Das stellte insofern ein Problem bei der Durchführung der Experimente dar, als dass in den Kontrollansätzen ohne cDNA-Template („No Template“-Kontrolle) sehr häufig Produkte amplifiziert wurden. Der Grund dafür war das eingesetzte Oligonukleotidpaar, das von stark konservierten Sequenzbereichen abgeleitet worden war. Die große Sensitivität der Reaktionen führte dann zur Amplifikation geringster im Ansatz enthaltener Spuren von Fremd-DNA. Erst das Design eines neuen GAPDH-Primerpaares, welches von weniger stark konservierten Sequenzbereichen abgeleitet und damit spezifischer für die *H. lupulus*-Sequenz war, führte zu nicht kontaminierten Reaktionen. Bei der Auswertung der Messungen wurde eine minimale Differenz von fünf Ct-Werten zwischen unbekannter Probe und den Ansätzen mit dem entsprechenden Primerpaar, die ohne Reverse Transkriptase generiert worden waren („No RT“-Kontrolle), für die Auswertung fest gelegt (Bustin und Nolan, 2004). Bei allen Proben die geringere Differenzen aufwiesen, konnte nicht festgestellt werden, ob die geringe Transkriptakkumulation im entsprechenden Gewebe oder aber Kontamination der RNA (bzw. cDNA) mit genomischer DNA ursächlich waren. Diese Reaktionen wurden nicht mit in die Auswertung einbezogen.

Alle hier untersuchten Gewebe außer Wurzeln sind von drüsigen Trichomen in unterschiedlicher Dichte besetzt. Junge Blätter enthalten pro Flächeneinheit zahlenmäßig mehr Trichome als ältere Blätter, da sich während des Wachstums die Blattspreite vergrößert, jedoch die Anzahl der Trichome nicht weiter zunimmt und im Laufe der Vegetationsperiode durch mechanische Beanspruchung und Alterung weiter verringert. Das Trichommaterial war von reifen Zapfen isoliert worden. Aus den Graphen (Abb. 3.11) ist ersichtlich, dass von allen HIOMTs außer HIOMT5 die größte Transkriptmenge in Trichomen vorliegt. Die Menge an Transkripten der HIOMT1 steigt während der Entwicklung der Hopfenzapfen von den Blüten bis zu den mittelgroßen Zapfen an und fällt in den reifen Zapfen etwas ab. Vergleichsweise sehr geringe Mengen an Transkript wurden in reifen Blättern, männlichen Blüten und

Wurzeln nachgewiesen. Im Gegensatz dazu nimmt die Menge an HIOMT2-mRNA über den Zeitraum der Zapfenentwicklung kontinuierlich zu und ist auch in männlichen Blüten, Stängeln sowie Wurzeln relativ groß. Das Expressionsmuster der HIOMT3 weist ebenfalls ansteigende Mengen an Transkripten von der Entwicklung der weiblichen Blüten bis zu mittelgroßen Zapfen auf, wonach es ungefähr bis zur Reifung der Zapfen gleich bleibt. Auch in Wurzelgewebe und zu geringeren Mengen in Stängeln und männlichen Blüten ist das Transkript nachweisbar. Im Unterschied dazu akkumulieren Transkripte der HIOMT4 erst später während der Zapfenreifung und sind bis dahin nur in geringen Mengen nachweisbar. In Wurzeln waren sie nicht detektierbar und in jungen und ausgewachsenen Blättern waren die gemessenen Werte zu gering (Ct-Differenz zu „No RT“-Kontrolle <5), um sie eindeutig vom genomischen Hintergrund differenzieren zu können. HIOMT5-mRNA ist in allen untersuchten Geweben nachweisbar, die größten Mengen finden sich in reifen Zapfen. An dieser Stelle soll nicht unerwähnt bleiben, dass sich die 168 bp-Fragmente der HIOMT5 aus verschiedenen Geweben in einigen Nukleotiden unterscheiden. In jungen Blättern, männlichen Blüten und Trichomen waren jeweils 2-3 unterschiedliche Fragmente amplifiziert worden, die Polymorphismen in bis zu 12 Positionen aufwiesen. Dabei kamen in verschiedenen Geweben mehrere Versionen vor. Es könnte sich dabei um Fragmente von Isoenzymen handeln.

Ergebnisse

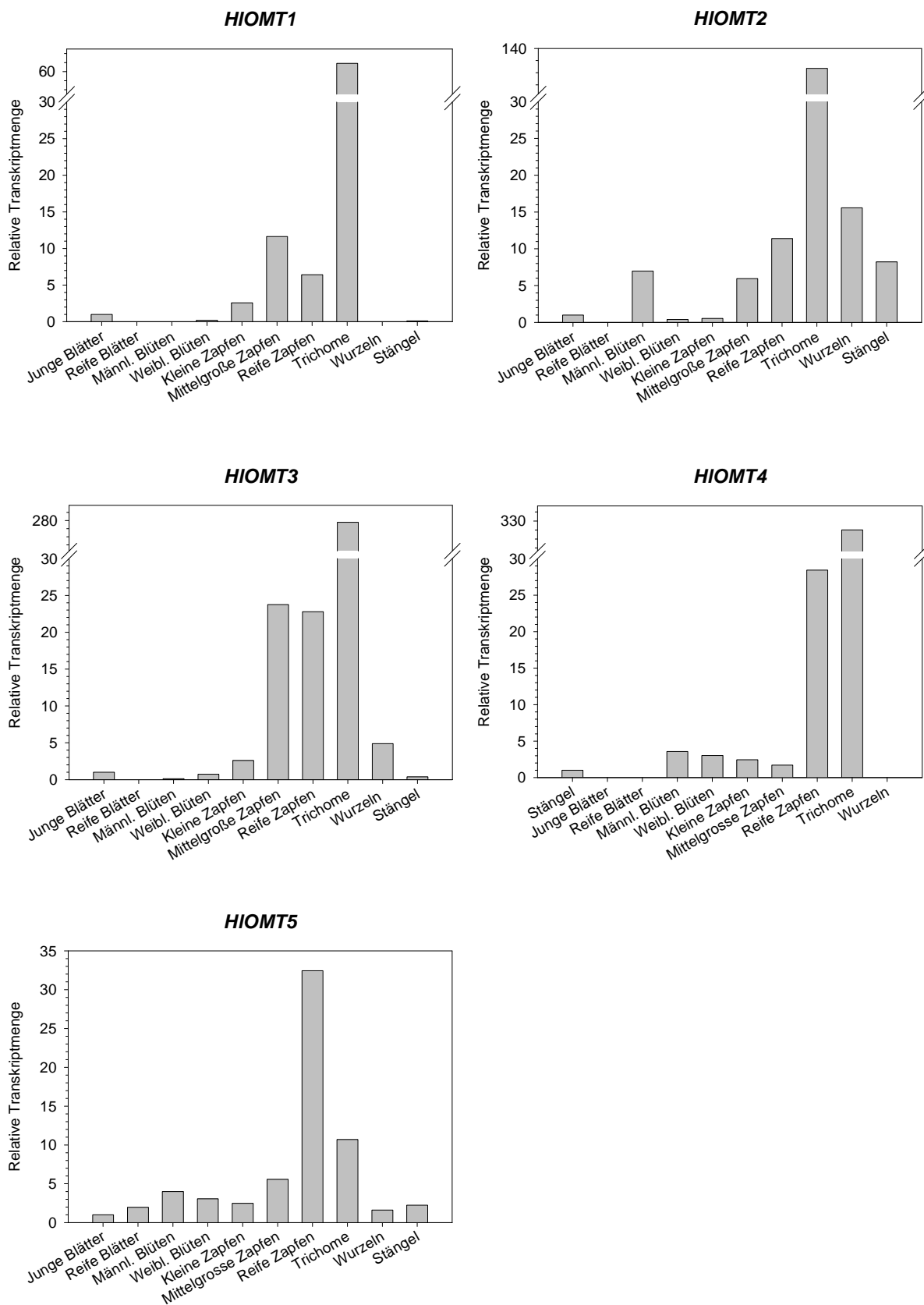


Abbildung 3.11 Relative Transkriptakkumulation der HIOMT1-5 in verschiedenen Hopfgeweben. Gemessene Ct-Werte wurden relativ zur Expression von GAPDH im entsprechenden Gewebe normalisiert ($=\Delta Ct$ -Werte). Zur Vergleichbarkeit der relativen Expression in verschiedenen Geweben wurden die ΔCt -Werte zur Expression in einem Kontrollgewebe (junge Blätter für HIOMT1, 2, 3 und 5 bzw. Stängel für HIOMT4) in Beziehung gesetzt ($2^{-\Delta\Delta Ct}$).

Die gegen die Expression von GAPDH normalisierten Transkriptmengen der fünf HIOMTs in Trichomen sind in Abbildung 3.12 dargestellt. Daraus wird ersichtlich, dass die HIOMT1 die am stärksten exprimierte der OMTs in den Trichomen ist und davon ungefähr fünfmal so viele Transkripte wie von der HIOMT2 und HIOMT3 vorliegen. Von der HIOMT4 waren rund halb so viele Transkripte wie von der HIOMT2 und HIOMT3 vorhanden, während die HIOMT5 in Trichomen am geringsten exprimiert war.

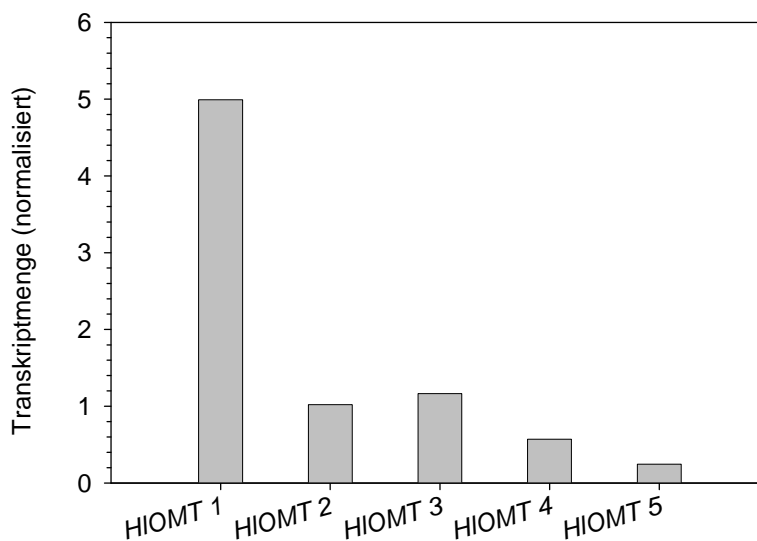


Abbildung 3.12 Transkriptakkumulation der HIOMT1-5 in reifen Trichomzellen von *H. lupulus*. Die Differenz zwischen den jeweiligen Ct-Werten der HIOMT-Expression und dem Ct-Wert von GAPDH in Trichomen veranschaulicht die normalisierten Mengen an Transkripten ($2^{-\Delta Ct}$) in diesem Gewebe.

3.3.5 Genexpressionsanalyse der VPS und der CHS_H1 in *H. lupulus*

In dieser Arbeit wurden ebenfalls die Expressionslevel der zwei Polyketidsynthasen CHS_H1 und VPS untersucht, weil sie wichtige Enzyme der Bittersäure- bzw. Xanthohumol-Biosynthese darstellen. Die Transkriptmenge der CHS_H1 (Abb. 3.13) bleibt in den weiblichen Blütenständen während der Entwicklung und Reifung der Hopfenzapfen relativ unverändert. Auch hier ist die Expression in reinem Trichomgewebe am höchsten, während sie in männlichen Blüten und Stängeln geringer und in alten Blättern am niedrigsten ist. Das Expressionsprofil der VPS unterscheidet sich durch die relativ geringe Transkriptmenge in weiblichen Blüten und die starke Zunahme von Transkript vom Stadium der kleinen Zapfen zu dem der mittelgroßen Zapfen. Bis zur Reifung der Zapfen bleibt die Transkriptmenge relativ konstant. Auch hier wird in reinem Trichomgewebe am meisten Transkript angereichert, wohingegen geringste Mengen in reifen Blättern und Wurzeln und etwas mehr in männlichen Blüten und Stängeln akkumulieren.

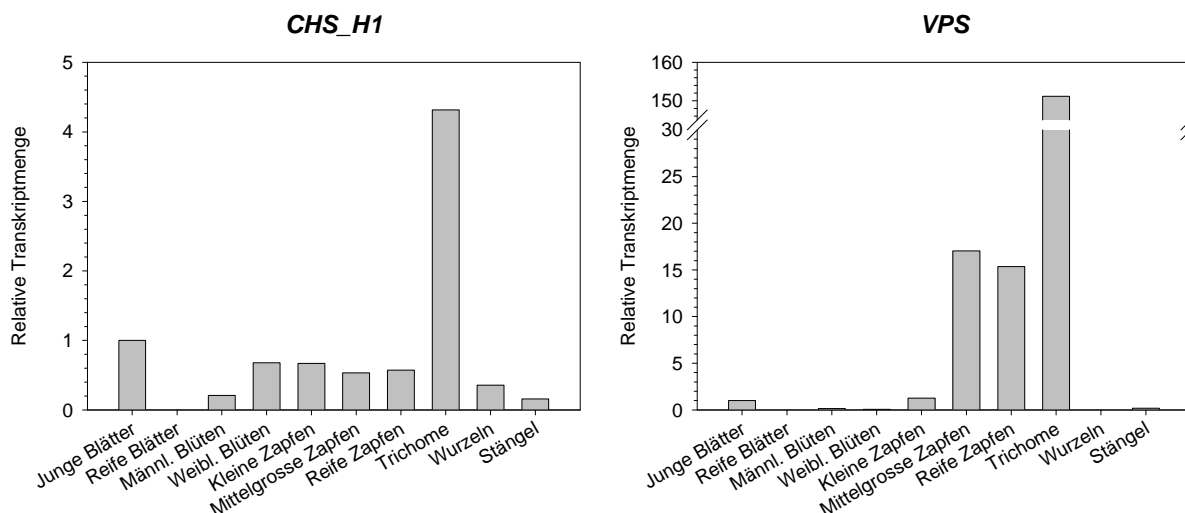


Abbildung 3.13 Relative Transkriptakkumulation der CHS_H1 und der VPS in verschiedenen Hopfengeweben. Gemessene Ct-Werte wurden relativ zur Expression von GAPDH im entsprechenden Gewebe normalisiert (=ΔCt-Werte). Zur Vergleichbarkeit der relativen Expression in verschiedenen Geweben wurden die ΔCt-Werte zur Expression in einem Kontrollgewebe (junge Blätter) in Beziehung gesetzt ($2^{-\Delta\Delta C_t}$).

3.3.6 Expression der HIOMTs in *E. coli*

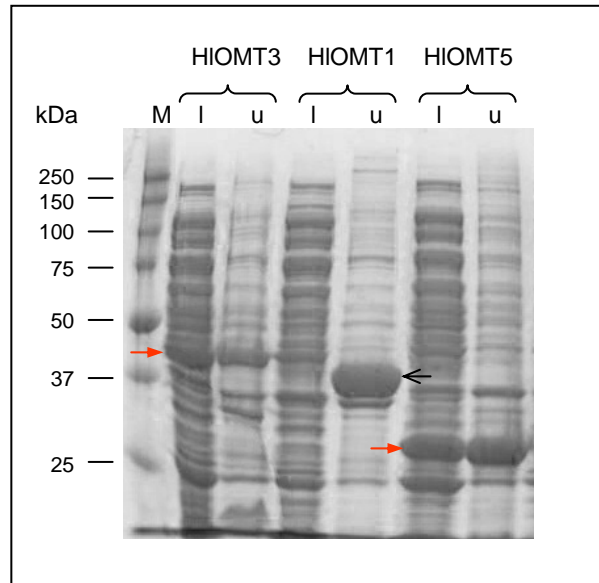
Viele bereits charakterisierte OMTs konnten funktionell in einem prokaryontischen System exprimiert werden. Deshalb wurde zunächst *E. coli* zur Expression der fünf HIOMTs sowie der Flavonol-3'-OMT (AAB96879) aus *A. thaliana*, welche Quercetin methyliert (Muzac et al., 2000) und als Positivkontrolle mitgeführt wurde, gewählt. Die Klonierung der offenen Leserahmen in den Expressionsvektor pHis8-3 und die Transformation in den Expressionsstamm *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL erfolgte gemäß 2.2.14.1. Der Vektor pHis8-3 enthält die Kodierungen für acht zusätzliche Histidinreste am N-Terminus der rekombinanten Proteine und ermöglicht dadurch deren Reinigung durch Metallaffinitätschromatographie. Die Expression wurde mit 1 mM IPTG induziert und zur Kontrolle auch ohne IPTG-Induktion durchgeführt (2.2.14.4). Als Negativkontrolle der Expression wurde eine *E. coli*-BL21-Kultur mitgeführt, welche mit pHis 8-3, der kein Insert enthält, transformiert worden war.

Nach SDS-Page der Rohextrakte der *E. coli*-Expressionskulturen und Vergleich mit der Negativkontrolle wurden Proteinbanden von der jeweils erwarteten Größe der rekombinanten Proteine in den Spuren der induzierten als auch der nicht-induzierten Kulturen detektiert. Diese waren also auch ohne Induktion durch IPTG vom Expressionssystem in geringerer Menge synthetisiert worden. Das Auftrennen der löslichen und unlöslichen Proteinfractionen (2.2.15.5) durch SDS-Page ergab, dass nur HIOMT5 und die *A. thaliana* Flavonol-3'-OMT in löslicher Form und alle anderen HIOMTs als Einschlusskörperchen vorlagen.

Um die rekombinanten Proteine in löslicher Form zu synthetisieren, wurden Änderungen am beschriebenen Expressionsprotokoll (2.2.14.4) vorgenommen. Da der Anteil löslichen rekombinanten Proteins oftmals durch niedrigere Inkubationstemperaturen erhöht werden kann (Schein und Noteborn, 1988), wurde die Inkubationstemperatur von 37°C auf niedrigere Werte gesenkt. Auch die Menge an IPTG wurde reduziert oder es wurde ganz auf die Induktion mit IPTG verzichtet. Weiterhin wurde durch Zugabe von 0,4 bis 1% Glucose zur Starterkultur versucht, die Expression ohne vorherige Induktion zu unterdrücken. Folgende Versuche wurden unternommen: Induktion der Expressionskulturen bei $OD_{600} = 0,6$ mit 0,1 mM IPTG und Inkubation bei 27°C für 5 h; keine Induktion durch IPTG und Inkubation bei 27°C über Nacht; Induktion der Expressionskulturen bei $OD_{600} = 0,6$ mit 0,1 mM IPTG und Inkubation bei 18°C über Nacht sowie keine Induktion durch IPTG und Inkubation bei 18°C über Nacht. Der Literatur kann man entnehmen, dass durch die Zugabe des Dipeptids Glycylglycin zum Medium die Löslichkeit von rekombinant synthetisierten Proteinen signifikant erhöht werden kann (Ghosh et al., 2004). Deshalb wurde versuchsweise 0,5 M Glycylglycin zur Expressionskultur zugesetzt und mit als auch ohne Induktion durch 0,1 mM IPTG bei 18°C über Nacht inkubiert. Auch durch die Induktion von Expressionskulturen während der späten log-Phase (Galloway et al., 2003) sowie durch die Induktion mit sehr geringen Konzentrationen an IPTG (Sawyer et al., 1994) konnten schon Erfolge erzielt werden. Deshalb wurden Versuche durchgeführt, in denen die Expression bei einer $OD_{600} = 1,7$ mit 0,02 mM IPTG induziert und bei 30°C eine Stunde lang inkubiert wurde.

Das Ergebnis dieser Versuche war die verbesserte Löslichkeit der HIOMT5 und auch die HIOMT3 lag durch die Inkubation der Expressionskulturen bei 27°C für 5h ohne IPTG-Zugabe zu rund 50% in löslicher Form vor. Die Expression der HIOMT1, HIOMT2, HIOMT4a und der HIOMT4b in löslicher Form konnte jedoch durch keine dieser Maßnahmen erreicht werden (Abb. 3.14).

(A)



(B)

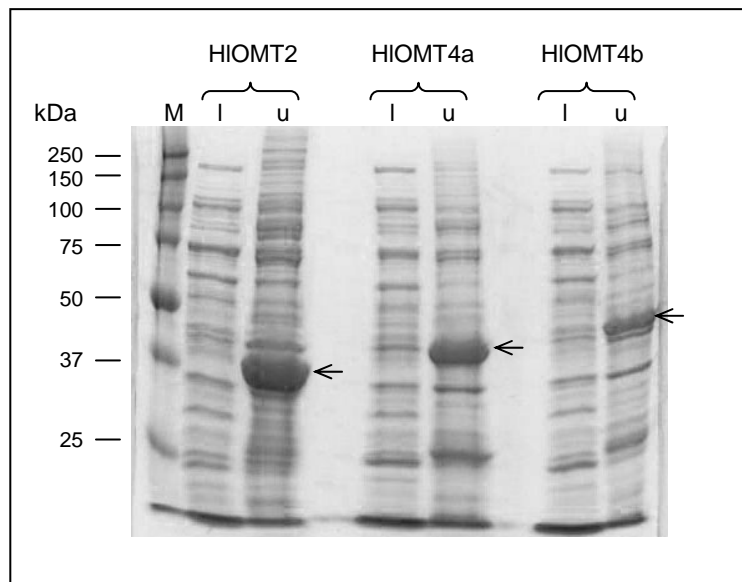


Abbildung 3.14 SDS-Page der *E. coli*-Proteinrohextrakte der HIOMT-Expressionskulturen (2.2.14.5). Die 10%igen Gele wurden mit Coomassie-Lösung gefärbt. M = Molekulargewichtsmarker, l = lösliche Fraktion, u = unlösliche Fraktion. Die schwarzen offenen Pfeile markieren die in unlöslicher Form vorliegenden rekombinanten HIOMT1, HIOMT2, HIOMT4a und HIOMT4b. Die roten geschlossenen Pfeile kennzeichnen die in löslicher Form vorliegenden rekombinanten HIOMT3 und HIOMT5.

Alternativ zu diesem Expressionssystem sollten die vier bisher unlöslichen HIOMTs in Fusion mit einem *E. coli*-eigenen Protein synthetisiert werden. Durch die fusionierte Expression konnte die Löslichkeit vieler rekombinanter Proteine verbessert werden (Davis et al., 1999; De Marco et al., 2004). Die Leserahmen der vier cDNAs wurden gemäß 2.2.14.2 in den Vektor pET-44(+) kloniert, welcher die genetische Information zur Expression des *E. coli*-NusA-Proteins enthält. Als Expressionsstamm wurde *E. coli* Rosetta 2 (DE3)pLys

genutzt. Die Analyse der *E. coli*-Rohextrakte mittels SDS-Page zeigte, dass die HIOMTs mit hoher Rate exprimiert worden waren. Alle vier Fusionsproteine lagen jedoch wieder als unlösliche Einschlusskörperchen vor und waren enzymatisch inaktiv.

3.3.7 Expression der HIOMTs in Insektenzellen

Aufgrund der Unlöslichkeit der in *E. coli* exprimierten HIOMT1, HIOMT2, HIOMT4a und HIOMT4b wurde anschließend auf ein eukaryontisches Expressionssystem zurückgegriffen. Dabei fiel die Wahl auf *Spodoptera frugiperda*-Sf9-Zellen. In diesem Insektenzellsystem konnten schon einige andere pflanzliche OMTs erfolgreich exprimiert werden, so beispielsweise die (R,S)-Retikuin-7-OMT und die (R,S)-Norcoclaurin-6-OMT aus *Papaver somniferum* (Ounaron et al., 2003). Es wurde das Bac-to-Bac Baculovirus Expressionssystem (Invitrogen) verwendet und entsprechend 2.2.16.1-2.2.16.4 vorgegangen. Die kodierenden Regionen aller vier HIOMT-cDNAs konnten erfolgreich in den Vektor pFastBac HT A bzw. pFastBac HT B integriert werden. Nach Transformation des *E. coli*-Stammes DH10Bac und Isolation der rekombinanten Bacmid-DNA wurden damit die Sf9 Zellen transfektiert. In allen vier Ansätzen waren deutliche Zeichen viraler Infektionen erkennbar und es konnten Virusstammlösungen gewonnen werden, deren Titer wie im Methodenteil beschrieben, durch 4-fache Amplifikation erhöht wurde. Insektenzell-Suspensionskulturen einer Dichte von 1,5 bis 2×10^6 Zellen/ml in 200 ml Sf-900 II SFM wurden mit dem entsprechenden Volumen Virusstammlösung versetzt und die Kultur 72 h bei 27°C und 76 rpm inkubiert. Danach wurden die infizierten Zellen geerntet und das rekombinante Protein isoliert.

3.3.8 Ermittlung der Enzymaktivitäten der HIOMTs

Die aus Sf9-Insektenzellkulturen bzw. aus *E. coli*-Kulturen in löslicher Form gewonnenen rekombinanten Proteine wurden auf Methyltransferaseaktivität getestet. Dazu wurden jeweils 10 µl des jeweiligen Proteinrohextrakts in dem in 2.2.18.1 beschriebenen Enzymtest eingesetzt. Es wurden 36 Substanzen aus verschiedenen Verbindungsklassen (Tab. 3.5–3.13) als Substrate getestet, wovon einige spezifisch im Hopfen vorkommen. Desmethylxanthohumol und Chalkonaringenin stellen dabei mögliche Vorstufen in der Biosynthese von Xanthohumol dar. Um auszuschließen, dass die Substrate durch die Proteinrohextrakte aus *E. coli* oder den Sf9-Insektenzellen methyliert werden, wurden Negativkontrollen mitgeführt. Diese bestanden aus Rohextrakten von Insektenzellkulturen, die mit Baculoviren infiziert worden waren, welche kein rekombinantes Protein exprimieren

oder aus *E. coli*-Rohextrakten, die mit Vektor ohne Insert transformiert worden waren. Durch die Proteinrohextrakte wurde keines der Substrate umgesetzt.

Chalkone

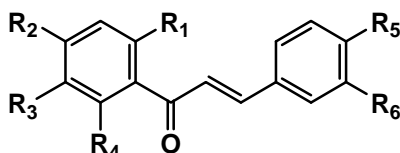


Tabelle 3.5 Strukturen der als Substrate eingesetzten Chalkone.

| Substrat | R ₁ | R ₂ | R ₃ | R ₄ | R ₅ | R ₆ |
|--|------------------|------------------|---|----------------|------------------|----------------|
| Chalkonaringenin | OH | OH | H | OH | OH | H |
| Desmethylxanthohumol | OH | OH | (CH ₃) ₂ -C=CH-CH ₂ | OH | OH | H |
| Xanthohumol | OCH ₃ | OH | (CH ₃) ₂ -C=CH-CH ₂ | OH | OH | H |
| Xanthogalenol | OH | OCH ₃ | (CH ₃) ₂ -C=CH-CH ₂ | OH | OH | H |
| 2',4-Dihydroxychalkon | OH | H | H | H | OH | H |
| Butein (2',3,4,4'-Tetrahydroxychalkon) | H | OH | H | OH | OH | OH |
| Isoliquiritigenin | OH | OH | H | H | OH | H |
| 2'-Hydroxy-4,4'-Dimethoxychalkon | H | OCH ₃ | H | OH | OCH ₃ | H |
| 2'-Hydroxy-4,4',6'-Trimethoxychalkon | OCH ₃ | OCH ₃ | H | OH | OCH ₃ | H |

Flavanone

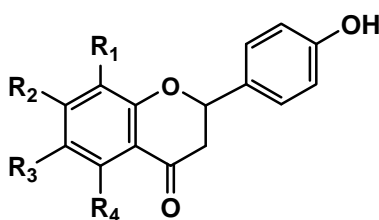


Tabelle 3.6 Strukturen der als Substrate eingesetzten Flavanone.

| Substrat | R ₁ | R ₂ | R ₃ | R ₄ |
|--------------------|---|----------------|---|------------------|
| 6-Prenylnaringenin | H | OH | (CH ₃) ₂ -C=CH-CH ₂ | OH |
| 8-Prenylnaringenin | (CH ₃) ₂ -C=CH-CH ₂ | OH | H | OH |
| Isoxanthohumol | (CH ₃) ₂ -C=CH-CH ₂ | OH | H | OCH ₃ |
| Naringenin | H | OH | H | OH |

Flavonole/Flavone

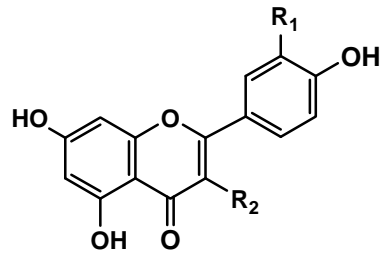


Tabelle 3.7 Strukturen der als Substrate eingesetzten Flavonole und Flavone.

| Substrat | R ₁ | R ₂ |
|------------|----------------|----------------|
| Kaempferol | H | OH |
| Quercetin | OH | OH |
| Apigenin | H | H |

Catechine

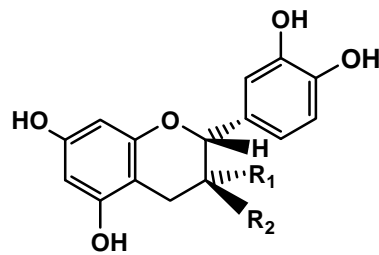
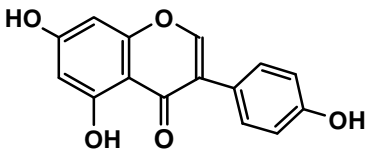
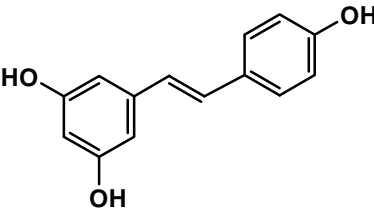
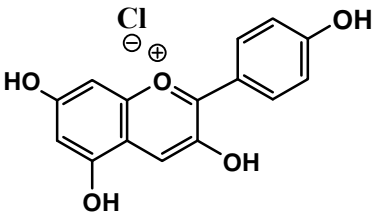
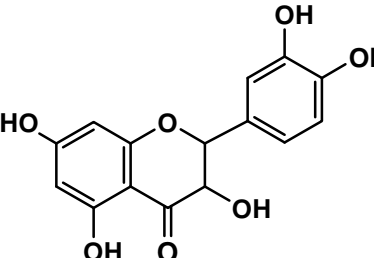


Tabelle 3.8 Strukturen der als Substrate eingesetzten Catechine.

| Substrat | R ₁ | R ₂ |
|-----------------|----------------|----------------|
| (+)-Catechin | H | OH |
| (-)-Epicatechin | OH | H |

Weitere Flavonoide

Tabelle 3.9 Strukturen weiterer Flavonoide, die als Substrate getestet wurden.

| Verbindungsklasse | Struktur | Substrat |
|-------------------|---|---------------------|
| Isoflavone |  | Genistein |
| Stilbene |  | Resveratrol |
| Anthocyanidine |  | Pelargonidinchlorid |
| Dihydroflavonole |  | Taxifolin |

Zimtsäurederivate

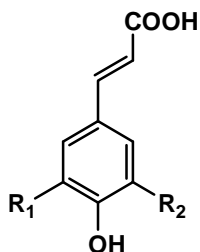


Tabelle 3.10 Strukturen der als Substrate getesteten Derivate der Zimtsäure.

| Substrat | R ₁ | R ₂ |
|--------------|------------------|------------------|
| p-Cumarsäure | H | H |
| Kaffeesäure | OH | H |
| Ferulasäure | H | OCH ₃ |
| Sinapinsäure | OCH ₃ | OCH ₃ |

Benzoessäurederivate

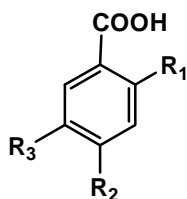


Tabelle 3.11 Strukturen der als Substrate eingesetzten Derivate der Benzoessäure.

| Substrat | R ₁ | R ₂ | R ₃ |
|---------------|----------------|----------------|-------------------|
| Salizylsäure | OH | H | H |
| Vanillinsäure | H | OH | CH ₃ O |

Andere aromatische Verbindungen mit geringem Molekulargewicht

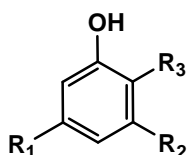


Tabelle 3.12 Strukturen der als Substrate eingesetzten substituierten Phenole.

| Substrat | R ₁ | R ₂ | R ₃ |
|----------------|----------------|------------------|------------------|
| Brenzcatechin | H | H | OH |
| Guajacol | H | H | OCH ₃ |
| Resorcin | OH | H | H |
| Orcinol | OH | OCH ₃ | H |
| Phloroglucinol | OH | OH | H |

Weitere Substrate

Tabelle 3.13 Strukturen weiterer als Substrate für die HIOMTs getesteten Verbindungen.

| | | |
|----------------------------|--|--------------|
| Cumarinderivate | | Aesculetin |
| Polyphenolische Verbindung | | Ellaginsäure |
| Phenylpropan | | Eugenol |

Die Ergebnisse der Aktivitätstests der HIOMT1 und der HIOMT2 sind in Tab. 3.14 zusammengestellt. HIOMT1 zeigt Aktivität mit wenigen der getesteten Substrate. Das Enzym konnte Xanthogalenol und Desmethylxanthohumol umsetzen. Aufgrund der geringen Menge an verfügbarem Xanthogalenol wurde nur eine Konzentration von 0,5 mM eingesetzt. Die anderen Substrate wurden in 1 mM Konzentration getestet. Desmethylxanthohumol und Xanthogalenol unterscheiden sich in der 4'-Position des A-Ringes, in der Xanthogalenol eine Methoxygruppe und Desmethylxanthohumol eine Hydroxylgruppe besitzt. Im Gegensatz zu Xanthogalenol wurde Xanthohumol, welches in der 6'-Position methyliert und in 4'-Position eine Hydroxylgruppe aufweist, nicht als Substrat akzeptiert. Drei weitere Verbindungen aus der Gruppe der Chalkone mit Hydroxylgruppe in 2' bzw. 6'-Position wurden mit vergleichsweise sehr geringer Aktivität methyliert: 2', 4-Dihydroxychalkon, Isoliquiritigenin und Chalkonaringenin. Keine weitere der getesteten Verbindungen aus der Gruppe der Flavonoide wurde von HIOMT1 als Substrat akzeptiert. Auch Kaffeesäure, Brenzcatechin und Resorcin wurden zu geringen Teilen umgesetzt. HIOMT2 methylierte im Gegensatz zur HIOMT1 ein breiteres Spektrum an Substraten. Das Enzym zeigte Aktivität mit verschiedenen Chalkonen, einem Stilben (Resveratrol), einem Isoflavon (Genistein) und einer Reihe kleinerer phenolischer Verbindungen. Es konnte Isoliquiritigenin, Butein, 2', 4-Dihydroxychalkon, Chalkonaringenin, Xanthohumol und Desmethylxanthohumol aus der Gruppe der Chalkone methylieren. Xanthogalenol wurde nur in sehr geringem Maße und 2'-Hydroxy-4,4'-Dimethoxychalkon sowie 2'-Hydroxy-4,4',6'-Trimethoxychalkon wurden nicht vom Enzym umgesetzt. Die Aktivität mit Vertretern aus anderen Flavonoidgruppen war dagegen sehr gering. Von einer Reihe charakterisierter OMTs ist bekannt, dass sie auch Substrate akzeptieren, deren Moleküle kleiner als die des physiologischen Substrats sind und in das aktive Zentrum passen. So zeigen einige Klasse II-OMTs beispielsweise hohe Aktivität mit Guajacol (Ounaron et al., 2003). Auch die HIOMT2 konnte Guajacol, Eugenol, Orcinol, Brenzcatechin und Resorcin methylieren. Nicht akzeptiert wurden hingegen Phenylpropanoide wie alle Zimtsäurederivate und die getesteten Benzoessäurederivate.

Die HIOMT3 zeigte mit keinem der getesteten Substrate Aktivität. Ebenfalls inaktiv mit allen Substraten erwiesen sich die HIOMT4a und die HIOMT4b. HIOMT5 ist aufgrund ihrer Einordnung in die Gruppe der KaffeoylCoA-OMTs mit großer Wahrscheinlichkeit nicht in den Biosyntheseweg des Xanthohumol in *H. lupulus* involviert. Um dies auch experimentell zu zeigen, wurde HIOMT5 mit den zwei möglichen Vorstufen von Xanthohumol im Enzymassay getestet. Das Enzym zeigte weder mit Chalkonaringenin noch mit Desmethylxanthohumol Aktivität.

Ergebnisse

Die durchgeführten Aktivitätstests sollten mögliche Substrate für die HIOMTs aufzeigen. Ausgehend von den Ergebnissen kann jedoch noch keine Aussage zu Substratspezifitäten gemacht werden. Dazu wurden kinetische Untersuchungen durchgeführt, deren Ergebnisse im Folgenden dargestellt werden.

Tabelle 3.14 Relative Aktivität der rekombinanten HIOMT1 und HIOMT2. Die Aktivität von HIOMT1 mit Desmethylxanthohumol und die von HIOMT2 mit Isoliquiritigenin wurden auf 100% gesetzt. Alle Substrate wurden in 1 mM Konzentration getestet, ausgenommen Xanthogalenol (0,5 mM).

| Substrat | HIOMT1 | HIOMT2 |
|------------------------------------|------------------|------------------|
| Chalkonaringenin | 4,8 | 39,6 |
| Desmethylxanthohumol | 100 ¹ | 24,7 |
| Xanthogalenol | 445 | 5,8 |
| Xanthohumol | 0 | 35,9 |
| 2', 4-Dihydroxychalkon | 5,3 | 45,3 |
| Isoliquiritigenin | 6,4 | 100 ² |
| Butein | 0 | 50,4 |
| 2'-Hydroxy-4,4'-Dimethoxychalkon | nicht getestet | 0 |
| 2-Hydroxy-4,4',6-Trimethoxychalkon | nicht getestet | 0 |
| Resveratrol | 0 | 86,7 |
| 6-Prenylnaringenin | 0 | 0 |
| 8-Prenylnaringenin | 0 | <2 |
| Isoxanthohumol | 0 | 0 |
| Naringenin | 0 | 3,1 |
| Kaempferol | 0 | 4,6 |
| Quercetin | 0 | 0 |
| Apigenin | 0 | 2,8 |
| (+)Catechin | 0 | 0 |
| (-)Epicatechin | 0 | 0 |
| Genistein | 0 | 25,1 |
| Pelargonidinchlorid | 0 | 2,1 |
| Taxifolin | 0 | 0 |
| Ferulasäure | 0 | <2 |
| Sinapinsäure | 0 | <2 |
| p-Cumarsäure | 0 | 2,1 |
| Kaffeesäure | 6,6 | <2 |
| Salizylsäure | 0 | 0 |
| Vanillinsäure | 0 | <2 |
| Brenzcatechin | 8 | 11,6 |
| Guajacol | 0 | 42,4 |
| Resorcin | 5,1 | 11,1 |
| Phloroglucinol | 0 | <2 |
| Orcinol | 0 | 14,5 |
| Aesculetin | 0 | 0 |
| Eugenol | 0 | 14,8 |
| Ellaginsäure | 0 | 0 |

¹ 100% entspricht einer spezifischen Aktivität von 0,073 pkat/mg Gesamtprotein.

² 100% entspricht einer spezifischen Aktivität von 0,023 pkat/mg Gesamtprotein.

Da HIOMT3 und HIOMT4a/b keines der getesteten Substrate akzeptiert hatten, wurden Enzymtests mit weiteren Substraten durchgeführt. Diese wurden entsprechend ihrer Substanzklasse und Löslichkeit zu Gruppen vereinigt (Tab. 3.15) (Yang et al., 2006). Es wurden 50 mM Stammlösungen von jeder Substanz mit dem aufgeführten Lösungsmittel hergestellt. Davon wurden jeweils 20 µl vereint und von dieser Substratmischung jeweils 1 µl im 50 µl-Enzymtest (2.2.18.1) eingesetzt, wodurch sich eine Endkonzentration abhängig von der Anzahl der Substrate der jeweiligen Gruppe von 0,167 mM bis 1 mM ergab. Die HIOMT3 und HIOMT4a/b zeigten jedoch auch keine Aktivität mit diesen Substraten.

Ergebnisse

Tabelle 3.15 In Gruppen zusammengefasste Substrate, die mit HIOMT3 bzw. HIOMT4a/4b im Enzymtest getestet wurden. Die jeweiligen Lösungsmittel sind angegeben.

| Gruppe | Substrate | Lösungsmittel | Enzymtest mit HIOMT |
|--------|--|--------------------------|----------------------|
| 1 | Zeatin, Tryptophan, Dopa | DMSO | HIOMT3 HIOMT4a/4b |
| 2 | Abscisinsäure, Giberellinsäure, Indol-3-Essigsäure | Ethanol | HIOMT3 HIOMT4a/4b |
| 3 | Shikimisäure, Chinasäure, 2,2-Dihydroxybenzoesäure, 3,5-Dihydroxybenzoesäure, 4-Hydroxybenzoesäure, Nikotinsäure | Ethanol | HIOMT3 HIOMT4a/4b |
| 4 | 2,3,4-Trihydroxybenzaldehyd, 2,4,5-Trihydroxybenzaldehyd, 2-Hydroxy-4-methoxybenzaldehyd, 2,4-Dihydroxy-3-methoxybenzaldehyd, 2,4-Dihydroxy-6-methoxybenzaldehyd | Ethanol | HIOMT3 |
| 5 | Isovanillin, 6-Hydroxyvanillin, 4-Allyl-beta-resorcaldehyd, Syringaldehyd | Ethanol | HIOMT3 |
| 6 | 4-Allyl-2,6-Dimethoxyphenol, Dihydroconiferylalkohol, Phenol, 4-n-Propylguajacol, 2-Methylresorcin | Ethanol | HIOMT3 |
| 7 | Syringinsäure, Isoferulasäure, o-Cumarsäure, 2-Hydroxyzimtsäure, Chlorogensäure, Isochlorogensäure | Ethanol | HIOMT3 HIOMT4a/4b |
| 8 | Asparaginsäure, Glutaminsäure, Phenylalanin, Valin, Asparagin | ddH ₂ O | HIOMT3 |
| 9 | p-Methoxyzimtsäure, Benzoesäure Brenztraubensäure, Zimtsäure, 4-Aminobenzoesäure | Ethanol | HIOMT4a/4b |
| 10 | Capronsäure, Önanthsäure, Butensäure, Pelargonsäure, Sebacinsäure | Ethanol:Chloroform (1:1) | HIOMT4a/4b |
| 11 | Geranolsäure, 9-Decensäure, Laurinsäure, Isoheptadecensäure, Palmitinsäure | Ethanol:Chloroform (1:1) | HIOMT4a/4b |
| 12 | Arachidinsäure, Ölsäure, Behensäure, Elaidinsäure, Stearinsäure, Linolsäure | Ethanol:Chloroform (1:1) | HIOMT4a/4b |
| 13 | Jasmonsäure | Ethanol | HIOMT3 HIOMT4a/4b |

3.3.9 Reinigung der rekombinanten HIOMT1 und HIOMT2

Die rekombinanten HIOMT1 und HIOMT2 mit His-Tag am N-Terminus wurden mittels Metallaffinitätschromatographie an Talon-Matrix gereinigt. Der Hauptteil der Enzymaktivität befand sich in den Suspensionen der aufgeschlossenen Insektenzellen und nur zu geringem Teil im Kulturüberstand. Daher wurden von den geernteten Insektenzell-Expressionskulturen nach Zentrifugation die Zellrückstände weiter verwendet und der Überstand verworfen.

Zur Reinigung wurde wie im Methodenteil beschrieben (2.2.17) verfahren. Auch im Insektenzell-Expressionssystem war die Expressionsrate der HIOMTs hoch. Aus einer 200 ml-Expressionskultur konnten ~2,5 mg rekombinante HIOMT1 gereinigt werden, was einer Ausbeute von ~12,5 mg/l rekombinantes Protein entspricht. Von der HIOMT2 wurden ~6,7 mg pro 200 ml-Kultur gereinigt. Die Ausbeute beträgt hier ~34 mg/l Zellkultur.

Die Effizienz der einzelnen Reinigungsschritte wurde durch SDS-Page überprüft (Abb. 3.15 und 3.16) und die Aktivität des gereinigten Proteins vermessen. Im aufgetragenen Proteinrohextrakt beider Expressionskulturen ist durch Vergleich mit dem Molekulargewichtsmarker jeweils eine deutliche Bande von rund 40 kDa erkennbar (Spur 1 in Abb. 3.15 bzw. Spur 3 in Abb. 3.16), welche im Unterschied dazu nicht in den Rohextrakten der nicht infizierten bzw. mit Baculoviren, die leeren Vektor enthielten, infizierten Insektenzellen vorhanden ist (Abb. 3.16 Spuren 1 und 2). Die berechnete Größe der HIOMT1 beträgt durch die zusätzlichen Aminosäuren des 6-fachen Histidin-Tags sowie durch weitere Aminosäuren die vom Vektor kodiert werden 43 kDa und die der HIOMT2 43,5 kDa. In den Spuren 2 (Abb. 3.15) bzw. 4 (Abb. 3.16) ist der Proteinrohextrakt nach Bindung an die Talon-Matrix aufgetrennt. Der Großteil des rekombinanten Proteins wurde von der Matrix gebunden. In den beiden folgenden Waschsritten (Spuren 3, 4 in Abb. 3.15 bzw. Spuren 5, 6 in Abb. 3.16) konnte eine stringente Waschung mit jeweils 7,5 mM Imidazol im Waschpuffer durchgeführt werden. Dadurch geht auch ein Teil des rekombinanten Proteins verloren, der aber aufgrund der hohen Expressionsrate vernachlässigbar ist. Beide HIOMTs wurden durch Metallaffinitätschromatographie fast bis zur Homogenität gereinigt (Spur 5 in Abb. 3.15 und Spur 7 in Abb. 3.16).

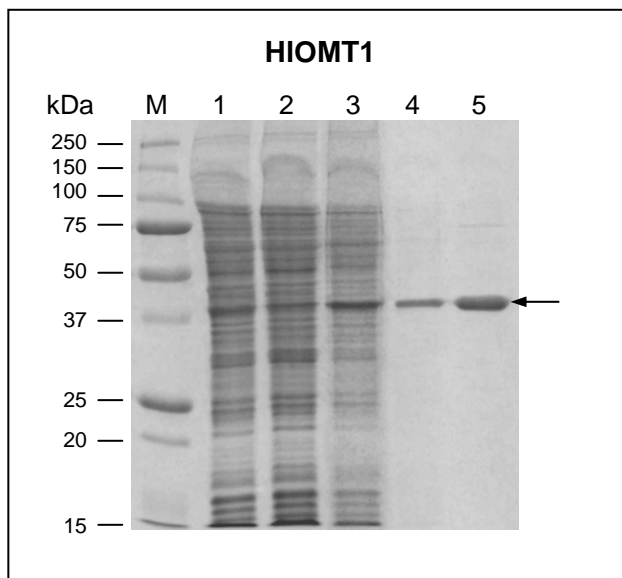


Abbildung 3.15 SDS-Page der Reinigung der HIOMT1 mittels Metallaffinitätschromatographie. Das 12%ige Gel wurde mit Coomassie-Lösung gefärbt. M: Molekulargewichtsmarker; Spur 1: Proteinrohextrakt von Sf9-Zellen, die mit rekombinatem HIOMT1-Baculovirus infiziert waren; Spur 2: Proteinrohextrakt nach Entfernung der Talon-Matrix; Spur 3: Durchlauf erste Waschung; Spur 4: Durchlauf zweite Waschung; Spur 5: Der Pfeil markiert 2 µg eluierte gereinigte HIOMT1.

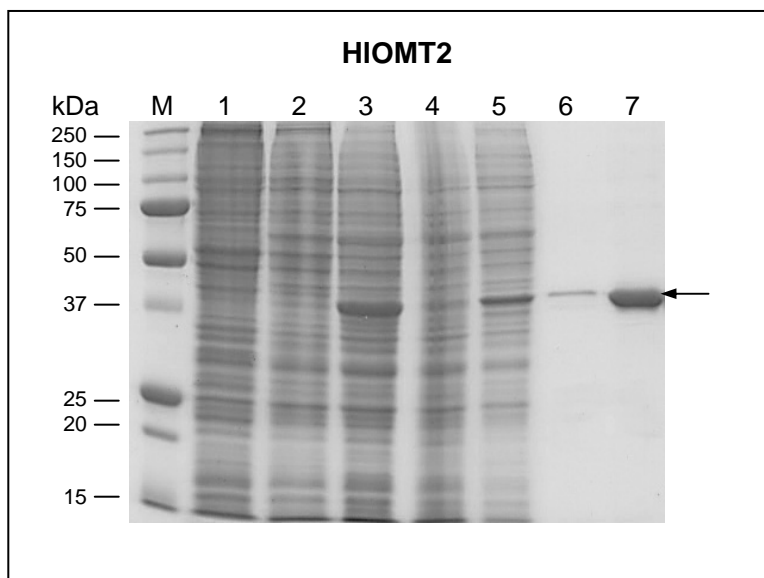


Abbildung 3.16 SDS-Page der Reinigung der HIOMT2 mittels Metallaffinitätschromatographie. Das 12%ige Gel wurde mit Coomassie-Lösung gefärbt. M: Molekulargewichtsmarker, Spur 1: Proteinrohextrakt nicht infizierter Sf9-Zellen; Spur 2: Proteinrohextrakt von Sf9-Zellen, die mit leerem Baculovirus infiziert waren; Spur 3: Proteinrohextrakt von Sf9-Zellen, die mit rekombinatem HIOMT2-Baculovirus infiziert waren; Spur 4: Proteinrohextrakt nach Entfernung der Talon-Matrix; Spur 5: Durchlauf erste Waschung; Spur 6: Durchlauf zweite Waschung; Spur 7: Der Pfeil markiert 4 µg eluierte gereinigte HIOMT2.

Einen großen Einfluss auf die Stabilität der gereinigten HIOMTs übten Verdünnungsgrad und Lagerungsbedingungen aus, wobei diese Faktoren noch wichtiger für die Stabilität der

HIOMT1 als die der HIOMT2 waren. Eine Lagerung bei 4°C über Nacht ohne stabilisierende Zusätze führte zu 50% Aktivitätsverlust der HIOMT2, unter Zusatz von 20% Glycerol gingen 64% der Aktivität der HIOMT1 verloren. Einfrieren bei -20°C über Nacht ohne bzw. mit Zusatz von 10% Glycerol hatte den vollständigen Aktivitätsverlust beider Enzyme zur Folge, eine Lagerung unter diesen Bedingungen bei -80°C einen Aktivitätsverlust von 50% Prozent. Durch den Zusatz von bis zu 50% Glycerol und eine starke Konzentrierung bis auf 10 mg/ml konnten die Proteine stabilisiert werden. Eine Lagerung unter diesen Bedingungen bei -20°C ohne signifikanten Aktivitätsverlust wurde für die HIOMT1 über 3 Wochen und für die HIOMT2 über 2 Monate dokumentiert.

3.4 Charakterisierung der HIOMT1 und HIOMT2

3.4.1 Protein- und Zeitlinearität der OMT-Reaktionen

Zur Charakterisierung der HIOMT1- und HIOMT2-Enzymaktivitäten wurden zunächst ihre Zeit- und Proteinabhängigkeit bestimmt. Für alle folgenden Untersuchungen wurden die durch Affinitätschromatographie gereinigten Proteine verwendet. Es wurden jeweils entweder die Inkubationszeiten der Reaktionsansätze oder die zugesetzten Enzymmengen variiert. Zur Bestimmung der Zeitlinearität wurden die Ansätze (100 mM Tris-HCl, pH 7,5, 2 mM DTT, 100 µM SAM, 1,9 µM ¹⁴C-SAM, 200 µM Desmethylxanthohumol für HIOMT1 bzw. 400 µM Xanthohumol für HIOMT2, 4 µg HIOMT-Protein) von 0 bis 60 min bei 30°C inkubiert. Alle Enzymtests wurden 3-fach ausgeführt. Unter den gewählten Bedingungen erfolgte die Umsetzung der Substrate durch beide Enzyme linear über einen Zeitraum von 20 min (Abb. 3.17). Für die folgenden Reaktionen wurde eine Inkubationszeit von 15 min gewählt.

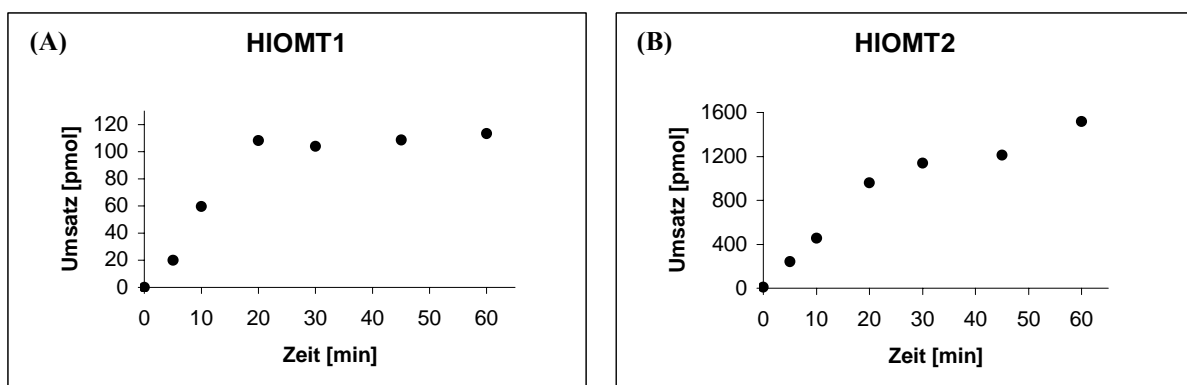


Abbildung 3.17 Abhängigkeit der (A) HIOMT1- bzw. (B) HIOMT2-Aktivität von der Zeit. Dargestellt ist die Umsetzung von Desmethylxanthohumol durch die HIOMT1 und von Xanthohumol durch die HIOMT2.

Unter gleichen Testbedingungen aber mit variierenden HIOMT-Proteinkonzentrationen von 0-20 μg (HIOMT2) bzw. 0-30 μg (HIOMT1) wurde die Proteinlinearität über eine Inkubationszeit von 15 min bestimmt. Es wurde gezeigt, dass die Enzymreaktionen über die getesteten Zeiträume hinweg linear verliefen (Abb. 3.18). Im Folgenden wurden in den Enzymreaktionen 10 μg HIOMT1 bzw. 5 μg Protein der HIOMT2 eingesetzt.

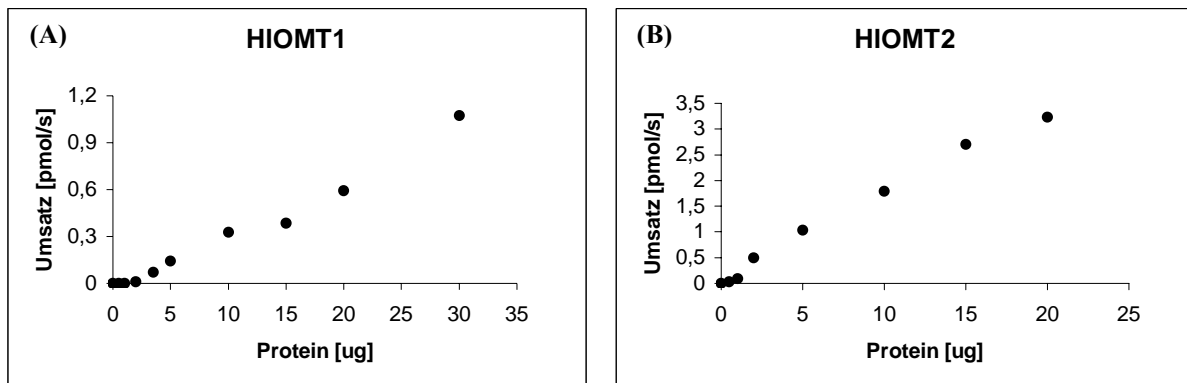


Abbildung 3.18 Abhängigkeit der (A) HIOMT1- bzw. (B) HIOMT2-Aktivität von der Proteinkonzentration. Dargestellt ist die Umsetzung von Desmethylxanthohumol durch die HIOMT1 und von Xanthohumol durch die HIOMT2.

3.4.2 Bestimmung des Temperaturmaximums

Die Abhängigkeit der Umsatzrate der HIOMT1 und HIOMT2 von der Temperatur wurde unter den in 3.4.1 beschriebenen Testbedingungen mit jeweils 10 μg HIOMT1 bzw. 5 μg HIOMT2 von 0-60°C untersucht. HIOMT1 war im gesamten gemessenen Temperaturbereich aktiv. Die Aktivität stieg kontinuierlich bis auf 30°C an. Zwischen 30 und 37°C erreichte sie maximale Werte und fiel danach wieder ab (Abb. 3.19).

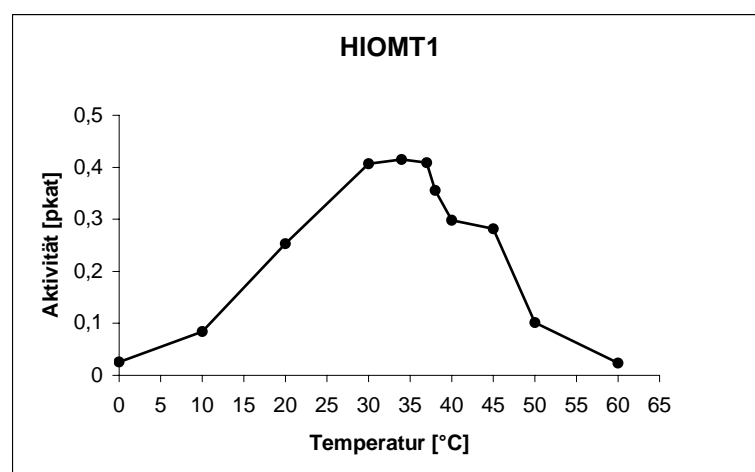


Abbildung 3.19 Abhängigkeit der HIOMT1-Aktivität von der Temperatur. Die Aktivität wurde mit Desmethylxanthohumol als Substrat gemessen.

Die rekombinante HIOMT2 weist Aktivität bis 45°C auf. Höhere Temperaturen von 50°C und mehr führen zu starkem Aktivitätsverlust bzw. Inaktivität des Enzyms. Im Gegensatz zur HIOMT1 ist der Bereich der größten Aktivität enger definiert. Bei Temperaturen höher als 34°C steigt die Aktivität stark an, um bei Temperaturen über 41°C wieder deutlich abzusinken. Das Temperaturmaximum beträgt hier 39°C (Abb. 3.20). Die folgenden Versuche wurden entsprechend des Temperaturoptimums der HIOMT1 bei 34°C und des der HIOMT2 bei 39°C durchgeführt.

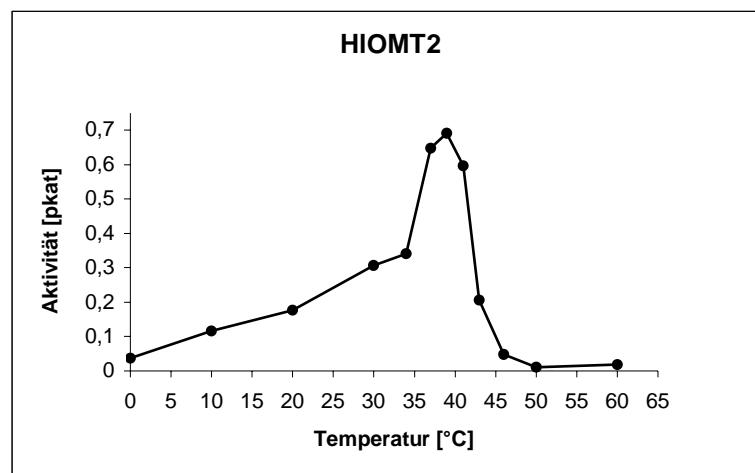


Abbildung 3.20 Abhängigkeit der HIOMT2-Aktivität von der Temperatur. Die Aktivität wurde mit Xanthohumol als Substrat gemessen.

3.4.3 Bestimmung des pH-Optimums

Zur Bestimmung des optimalen pH-Bereichs der Enzymaktivitäten der HIOMTs wurden Enzymtests von pH 4,0 bis 10,0 durchgeführt. Zur Abdeckung des pH-Bereichs wurden verschiedene Puffer entsprechend ihrer Pufferkapazität in einer Konzentration von 100 mM eingesetzt: im sauren bis neutralen Bereich Natriumcitrat (pH 4,0-6,0), Kaliumphosphat (pH 5,7-7,5) und Bis-Tris-HCl (pH 6,0-7,0) sowie im neutralen bis alkalischen Bereich Tris-HCl (pH 7,0-8,5) und Natriumglycinat (pH 8,5-10,0). HIOMT1 zeigt Aktivität vom schwach sauren bis weit in den alkalischen Bereich von pH 6,5 bis 10,0. Das Optimum für die Umsetzung von Desmethylxanthohumol wird bei alkalischen pH-Werten von 7,5 bis 9,5 erreicht. Maximale Aktivität zeigte die HIOMT1 in Natriumglycinatpuffer bei pH 9,0 (Abb. 3.21).

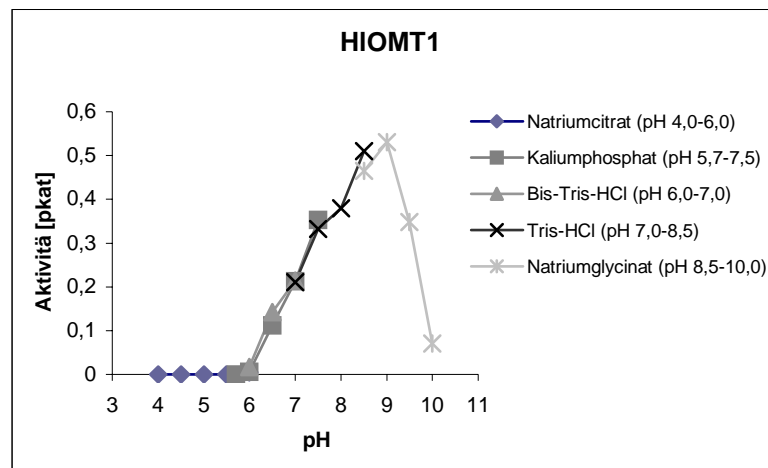


Abbildung 3.21 Abhängigkeit der HIOMT1-Aktivität vom pH-Wert. Die Aktivität wurde mit Desmethylxanthohumol als Substrat gemessen.

Bei der Umsetzung von Xanthohumol durch die HIOMT2 ist geringe Aktivität ab pH-Werten um 6,0 zu beobachten, bei einem pH-Wert von 10,0 ist das Enzym inaktiv. Hohe Enzymaktivitäten sind auch hier im alkalischen Bereich von pH 7,5 bis 9,0 mit maximaler Aktivität bei pH 8,5 in Natriumglycinatpuffer zu beobachten (Abb. 3.22). Die folgenden Enzymtests mit HIOMT1 wurden in Natriumglycinat-Puffer bei pH 9,0, die mit HIOMT2 in Natriumglycinat-Puffer bei pH 8,5 durchgeführt.

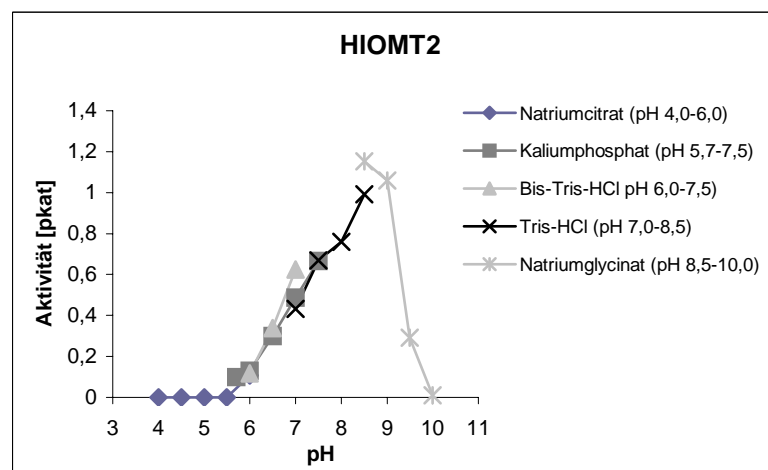


Abbildung 3.22 Abhängigkeit der HIOMT2-Aktivität vom pH-Wert. Die Aktivität wurde mit Xanthohumol als Substrat gemessen.

3.4.4 Einfluss von Kationen und EDTA auf die Enzymaktivität

Die katalytische Aktivität pflanzlicher Klasse I-OMTs ist von der Verfügbarkeit von Kationen insbesondere Mg^{2+} abhängig. OMTs der Klasse II benötigen diese dagegen nicht, sie werden teilweise davon sogar in ihrer Aktivität gehemmt (Hehmann et al., 2004; Burga et al., 2005). Hier wurde der Einfluss zweiwertiger Kationen auf die Aktivität von HIOMT1 und HIOMT2 untersucht. Dazu wurden Salzlösungen bis zu einer Endkonzentration von $100 \mu M$ bzw. $1,5 \text{ mM}$ sowie EDTA in 1 mM Endkonzentration zum Enzymtest hinzugegeben. Die Enzymreaktionen wurden wie unter 3.4.1 angesetzt und bei optimalem pH-Wert und optimaler Temperatur inkubiert. Der Zusatz von EDTA sowie der der $100 \mu M$ Metallionenlösung hatte keinen deutlichen Einfluss auf die Enzymaktivität der HIOMT1. Deutliche Aktivitätsverluste zeigten sich jedoch bei $1,5 \text{ mM}$ -Metallionenkonzentration. So führten Cu^{2+} , Fe^{2+} und Zn^{2+} zur Verringerung der Enzymaktivität auf jeweils 24%, 66% bzw. 44% der Aktivität ohne Zusatz von Metallionen (Abb. 3.23).

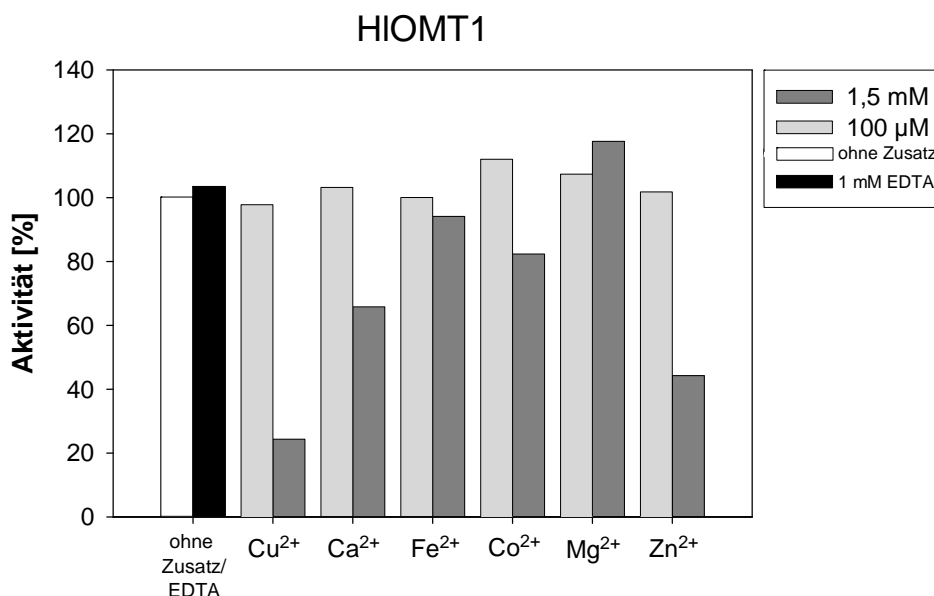


Abbildung 3.23 Einfluss von Metallionen auf die HIOMT1-Enzymaktivität. Aktivitätsverluste sind bei Zusatz von Metallionen in $1,5 \text{ mM}$ Konzentration zu beobachten.

Auch die Aktivität der HIOMT2 wurde erwartungsgemäß nicht durch die Gegenwart zweiwertiger Kationen erhöht. Im Gegensatz zur HIOMT1 zeigte sich schon bei geringeren Kationenkonzentrationen eine Hemmung der Enzymaktivität. So verringern Fe^{2+} -, Mg^{2+} - und Zn^{2+} -Ionen in $100 \mu M$ Konzentration die Aktivität auf jeweils 82%, 88% bzw. 87%. Alle getesteten Ionen in $1,5 \text{ mM}$ Konzentration bewirken deutliche Abnahmen der HIOMT2-Aktivität, wobei Cu^{2+} und Zn^{2+} die Enzymaktivität vollständig bzw. fast vollständig

inhibieren. Aber auch Fe^{2+} -, Co^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen reduzieren die Aktivität auf jeweils 20%, 40% sowie 66% (Abb. 3.24).

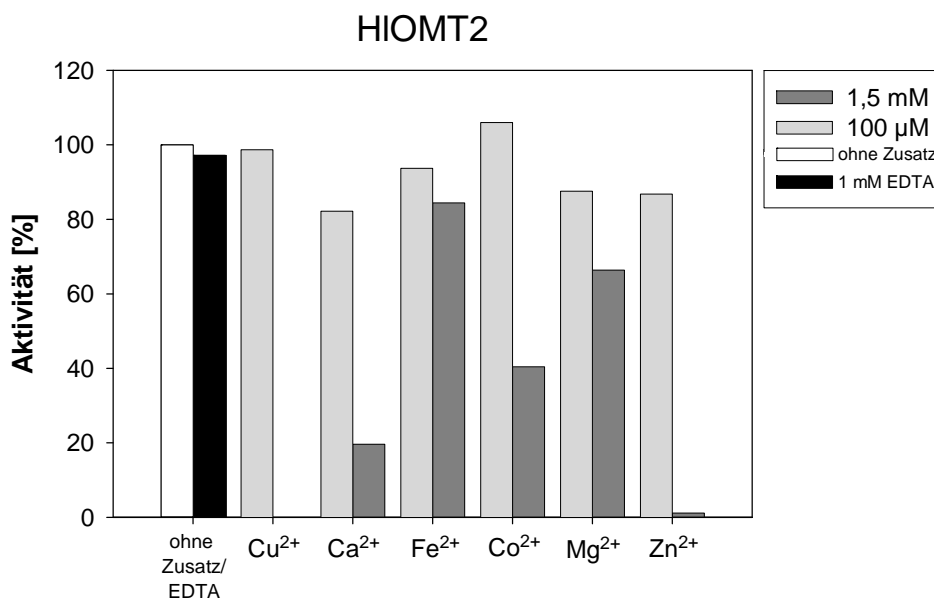


Abbildung 3.24 Einfluss von Metallionen auf die HIOMT2-Enzymaktivität. Ein leichter Rückgang der enzymatischen Aktivität ist bei Zusatz von Metallionen in 100 µM Konzentration zu beobachten, während Metallionen in 1,5 mM Konzentration die Aktivität deutlich hemmen.

3.4.5 Molekulargewichtsbestimmung

Bilden die HIOMT1 und die HIOMT2, so wie die anderen röntgenstrukturanalytisch untersuchten pflanzlichen OMTs, auch Homodimere? Zur Beantwortung dieser Frage wurde das Molekulargewicht der rekombinanten Proteine bestimmt. Das Molekulargewicht der Monomere wurde mittels MALDI-TOF-MS, wie beschrieben (2.2.2.4), ermittelt und ergab 42,7 kDa für HIOMT1 und 43,1 kDa für die HIOMT2. Das stimmt gut mit den Werten überein, die inklusive der zusätzlichen Aminosäuren des Expressionsvektors pFastBac HT A für die rekombinanten Proteine berechnet worden waren (43 kDa für die HIOMT1 und 43,5 kDa für die HIOMT2). Die Bildung von Dimeren wurde mittels Größenausschlusschromatographie der gereinigten Proteine an einer Tricorn Superdex 200 10/300 GL Säule untersucht (2.2.2.5). Der berechnete Verteilungskoeffizient wurde gegen den Logarithmus des Molekulargewichts der als Molekulargewichtsmarker verwendeten Proteine aufgetragen und so eine Kalibrationskurve erstellt anhand derer das native Molekulargewicht der zwei HIOMTs bestimmt werden konnte (Abb. 3.25). Die graphische Auswertung ergab ein Molekulargewicht von 76 kDa für die HIOMT1 und von 64 kDa für die HIOMT2. Diese Molekulargewichte befinden sich zwischen dem von Monomeren und

Dimeren, tendieren jedoch stärker zu dem der Dimere. Außerdem waren im Gelchromatographie-Elutionsprofil jeweils mindestens zwei weitere Proteinpeaks sichtbar, die Molekulargewichten von 184 und 291 kDa für die HIOMT1 bzw. 176 und 307 kDa für die HIOMT2 entsprachen. Das Auftrennen der von der Säule eluierten Proteine durch eine denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese ergab jeweils nur eine einzige Bande vom entsprechenden Molekulargewicht der Monomere. Das Auftrennen der gereinigten Proteine der zwei HIOMTs mittels nativer Polyacrylamidgelelektrophorese (2.2.13.1) zeigte für die HIOMT1 drei und für die HIOMT2 mindestens fünf verschiedene Proteinbanden. Dies bestätigt das Ergebnis der Gelfiltration, dass beide rekombinante Proteine *in vitro* Aggregate aus mehreren Monomeren bilden. Dabei könnte es sich um einen Artefakt handeln, zu dem es aufgrund der hohen Konzentrationen der reinen Proteinlösungen, die zum Erhalten der Aktivität der rekombinanten Proteine notwendig waren (siehe 3.3.9), gekommen ist.

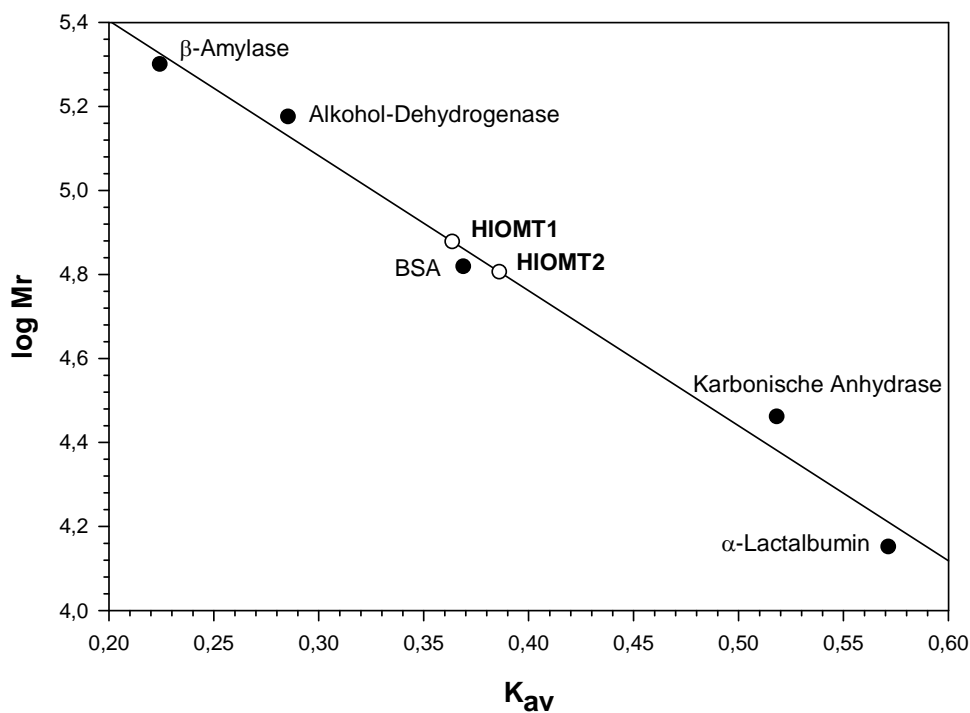


Abbildung 3.25 Molekulargewichtsbestimmung der rekombinanten HIOMT1 und HIOMT2 durch Größenausschlusschromatographie. Als Eichproteine wurden β -Amylase (200 kDa), Alkohol-Dehydrogenase (150 kDa), BSA (66 kDa), Carbonische Anhydrase (29 kDa) und α -Lactalbumin (14,2 kDa) verwendet. Der Verteilungskoeffizient K_{av} wurde gegen den Logarithmus des Molekulargewichts aufgetragen.

3.4.6 Bestimmung der kinetischen Konstanten

Die kinetischen Parameter für die rekombinanten HIOMTs wurden mit einigen ausgewählten als Substrat akzeptierten Verbindungen bestimmt. Die HIOMT1 hatte große Aktivität mit Desmethylxanthohumol und Xanthogalenol gezeigt (Tab. 3.14). Xanthogalenol stand jedoch nicht in ausreichenden Mengen zur Verfügung, deshalb wurde die kinetische Analyse nur mit Desmethylxanthohumol durchgeführt. Für die HIOMT2 wurden Chalkonaringenin, Desmethylxanthohumol, Xanthohumol und Resveratrol als Substrate gewählt, wofür auch das Vorkommen dieser Verbindungen in *H. lupulus* sprach. Die Abhängigkeit der Umsatzrate von der Desmethylxanthohumol-Konzentration konnte nur bis zu Konzentrationen von 250 μM (HIOMT1) bzw. 200 μM (HIOMT2) bestimmt werden, da bei höheren Konzentrationen eine starke Hemmung der Enzymaktivität beobachtet wurde. Eine schwächere Hemmung der Aktivität der HIOMT2 wurde auch bei Xanthohumol-Konzentrationen $>500 \mu\text{M}$ festgestellt. Die Konzentrationen an Chalkonaringenin und Resveratrol wurden bis zu Werten von 3 mM variiert. Die Versuche wurden bei gesättigten SAM-Konzentrationen durchgeführt. Zur Ermittlung der K_m -Werte für SAM wurden die Konzentrationen des ersten Substrats konstant gehalten und die SAM-Konzentrationen variiert. In den Abbildungen 3.26, 3.27a und 3.27b sind die Substrat-Geschwindigkeitskurven mit eingefügten Lineweaver-Burk-Plots dargestellt.

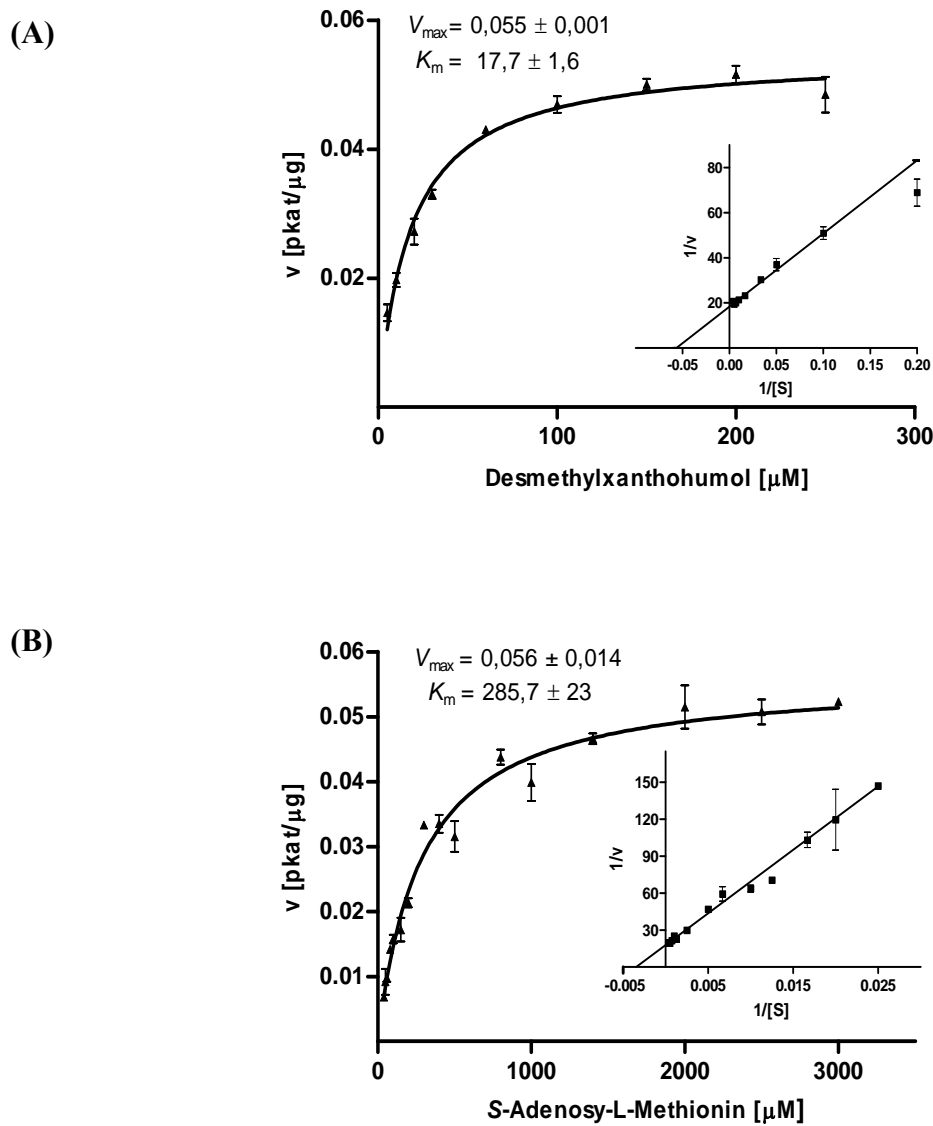


Abbildung 3.26 Substrat-Geschwindigkeitsdiagramme und Lineweaver-Burk-Plots von HIOMT1 bei variierenden (A) Desmethylxanthohumol- bzw. (B) SAM-Konzentrationen. Fehlerbalken kennzeichnen den Standardfehler. Alle Enzymassays wurden 3-fach durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit GraphPad Prism, Version 4.03 für Windows.

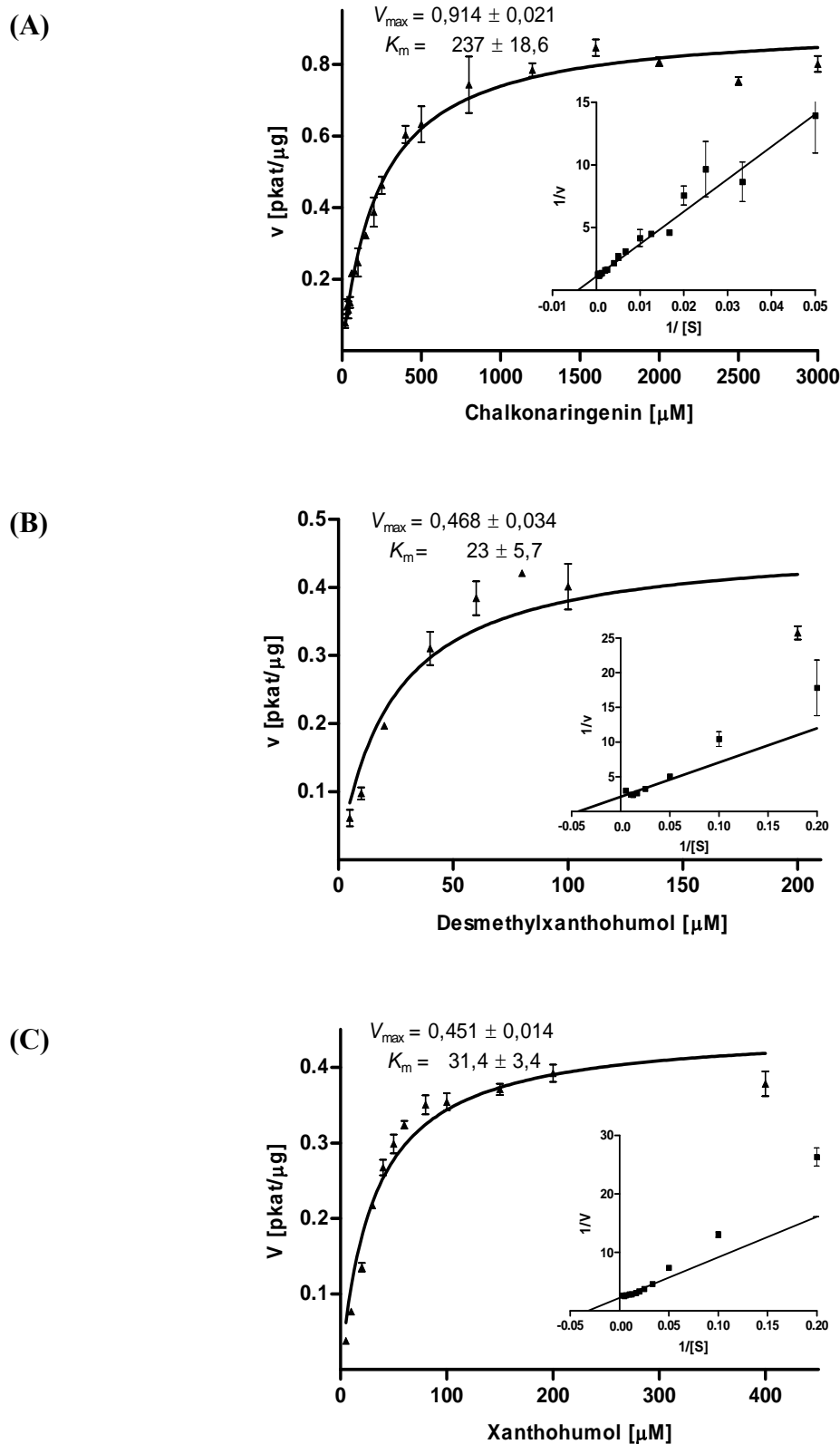
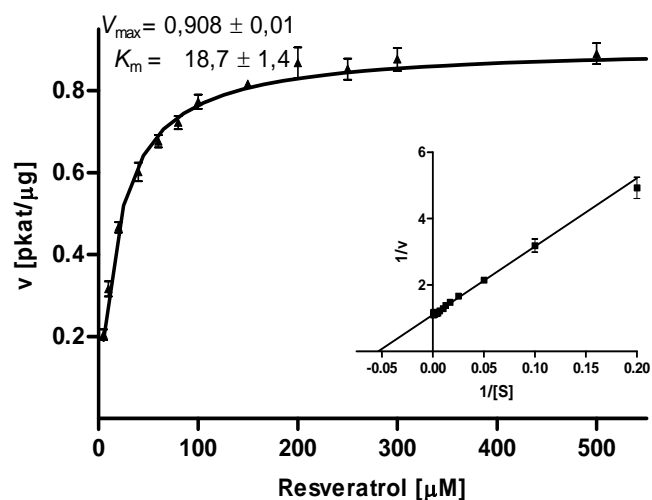


Abbildung 3.27a Substrat-Geschwindigkeitsdiagramme und Lineweaver-Burk-Plots von HIOMT2 bei variierenden (A) Chalkonaringenin-, (B) Desmethylxanthohumol-, (C) Xanthohumol-Konzentrationen und konstanter SAM-Konzentration. Fehlerbalken kennzeichnen den Standardfehler. Alle Enzymassays wurden 3-fach durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit GraphPad Prism, Version 4.03 für Windows.

(D)



(E)

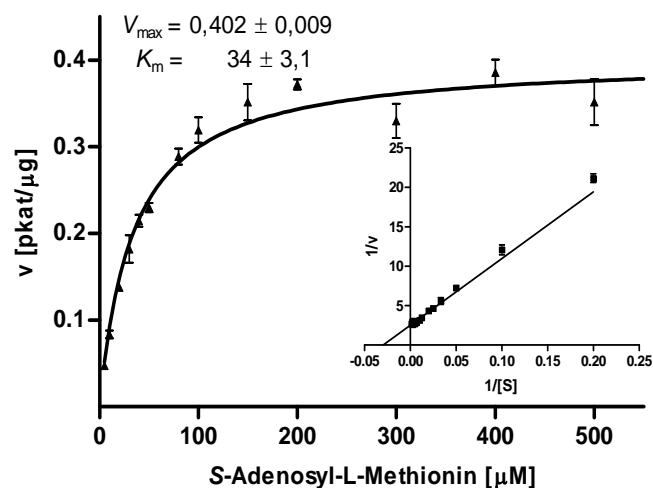


Abbildung 3.27b Substrat-Geschwindigkeitsdiagramme und Lineweaver–Burk–Plots von HIOMT2 bei variierender (D) Resveratrol-Konzentration und konstanter SAM-Konzentration sowie (E) variierender SAM-Konzentration und konstanter Xanthohumol-Konzentration. Fehlerbalken kennzeichnen den Standardfehler. Alle Enzymassays wurden 3-fach durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit GraphPad Prism, Version 4.03 für Windows.

Die Auswertung der Messreihen erfolgte mit GraphPad Prism Version 4.03 für Windows, GraphPad Software (San Diego, California, USA, www.graphpad.com). Das Programm bestimmt die kinetischen Konstanten durch nichtlineare Regression der Messwerte anhand der Michaelis-Menten-Gleichung. Die Ergebnisse für die K_m -, V_{\max} - und K_{cat} -Werte sowie die katalytischen Effizienzen sind in Tab. 3.16 zusammengefasst. Die Affinitäten der HIOMT1 und der HIOMT2 für das Substrat Desmethylxanthohumol sind ähnlich, wobei der K_m -Wert der HIOMT1 etwas geringer ist als der der HIOMT2. Auch der K_m -Wert der HIOMT2 für Resveratrol liegt in diesem Größenbereich, der für Xanthohumol ist etwas 1,5-fach so hoch.

Eine geringere Affinität zeigt die HIOMT2 für Chalkonaringenin, mit einem etwa 10-fach höheren K_m -Wert. Von allen getesteten Substraten wird von der HIOMT2 Resveratrol am effizientesten methyliert (K_{cat}/K_m , Tab. 3.16). Es wird $\sim 2,4$ -mal effizienter als Desmethylxanthohumol und ~ 3 -mal effizienter als Xanthohumol methyliert. Hingegen ist Chalkonaringenin das am wenigsten effizient methylierte Substrat (130-mal weniger effizient als Resveratrol). Es gilt allerdings zu beachten, dass die ermittelten K_m -Werte für Chalkonaringenin, Desmethylxanthohumol und Xanthohumol mit einem experimentellen Fehler behaftet sind, der sich aus der in wässriger Lösung bei dem entsprechenden pH-Wert spontan ablaufenden Isomerisierung dieser Substrate ergibt, wobei Chalkonaringenin zu Naringenin, Desmethylxanthohumol zu 6- und 8-Prenylnaringenin und Xanthohumol zu Isoxanthohumol isomerisieren. Damit steht dem Enzym nicht die gesamte zu Beginn zugegebene Substratmenge zur Verfügung. Besonders bei geringen Substratkonzentrationen dürfte damit der Fehler der gemessenen Reaktionsgeschwindigkeit relativ hoch sein und auch die hier ermittelten K_m -Werte dürften für diese Substrate dadurch zu hoch sein.

Tabelle 3.16 Kinetische Parameter der HIOMT1 und HIOMT2 für ausgewählte Substrate und das Kosubstrat SAM. Zur Bestimmung wurde durch Metallaffinitätschromatographie gereinigtes Protein verwendet.

| | K_m [μM] | V_{max} [pkat/mg] | K_{cat} [s^{-1}] | $\frac{K_{cat}}{K_m}$ [$\text{s}^{-1} \text{mM}^{-1}$] |
|----------------------|------------------------------|---------------------|-------------------------------|--|
| HIOMT1 | | | | |
| Desmethylxanthohumol | 18 ± 2 | 55 ± 1 | 0,0012 | 0,07 |
| SAM | 286 ± 23 | 56 ± 14 | 0,0012 | 0,004 |
| HIOMT2 | | | | |
| Chalkonaringenin | 237 ± 19 | 914 ± 21 | 0,0199 | 0,08 |
| Desmethylxanthohumol | 23 ± 6 | 468 ± 34 | 0,0102 | 0,44 |
| Xanthohumol | 31 ± 3 | 451 ± 14 | 0,0980 | 0,32 |
| Resveratrol | 19 ± 1 | 908 ± 10 | 0,0196 | 1,04 |
| SAM | 34 ± 3 (mit Xanthohumol) | 402 ± 9 | 0,0087 | 0,26 |

3.5 Charakterisierung der enzymatischen Reaktionsprodukte von HIOMT1 und HIOMT2

Wie bereits beschrieben, katalysieren die HIOMT1 und die HIOMT2 die Methylierung verschiedener Substrate aus dem Sekundärstoffwechsel des Hopfens. Die Identifizierung der Produkte der Enzymassays sollte Aufschluss darüber geben, in welcher Position die Methylierung der Hydroxylgruppen erfolgt und welche Produkte dabei gebildet werden. Zur Aufklärung der Strukturen wurden RP-HPLC, LC-MS, ESI-MS/MS sowie NMR-Analysen durchgeführt.

3.5.1 Methylierung von Desmethylxanthohumol durch die HIOMT1

Zur Produktidentifizierung wurde durch Metallaffinitätschromatographie gereinigtes Protein (38 µg) mit 150 µM Desmethylxanthohumol und 2 mM SAM in 100 mM Natriumglycinatpuffer, pH 9,0 80 min inkubiert. Nach der Hälfte der Inkubationszeit wurden weitere 120 µM Desmethylxanthohumol zugesetzt. Ebenso wurde ein Ansatz ohne Zugabe des Kosubstrats SAM mitgeführt. Die Enzymreaktionen wurden mit jeweils 4 µl 6 N HCl abgestoppt, zweimal mit doppeltem Volumen Ethylacetat extrahiert, unter Vakuum eingetrocknet, in Acetonitril aufgenommen und mittels RP-HPLC (2.2.2.1) aufgetrennt (Abb. 3.28).

Das HPLC-Chromatogramm der Reaktion ohne SAM, zeigt zwei Peaks. Durch Vergleich der Retentionszeiten und der UV-Spektren mit authentischen Standards konnten sie als 6- und 8-Prenylnaringenin, die Substanzen, in welche Desmethylxanthohumol in wässriger Lösung spontan isomerisiert, identifiziert werden. Die Enzymreaktion, die auch den Kofaktor SAM enthalten hatte, zeigt einen zusätzlichen Produktpeak mit einer Retentionszeit von 14,6 min sowie einem Absorptionsspektrum mit einem Maximum bei 370 nm vergleichbar mit einem authentischen Standard von Xanthohumol. Dies deutet darauf hin, dass es sich bei dem durch die HIOMT1 methylierten Desmethylxanthohumol um Xanthohumol handelt.

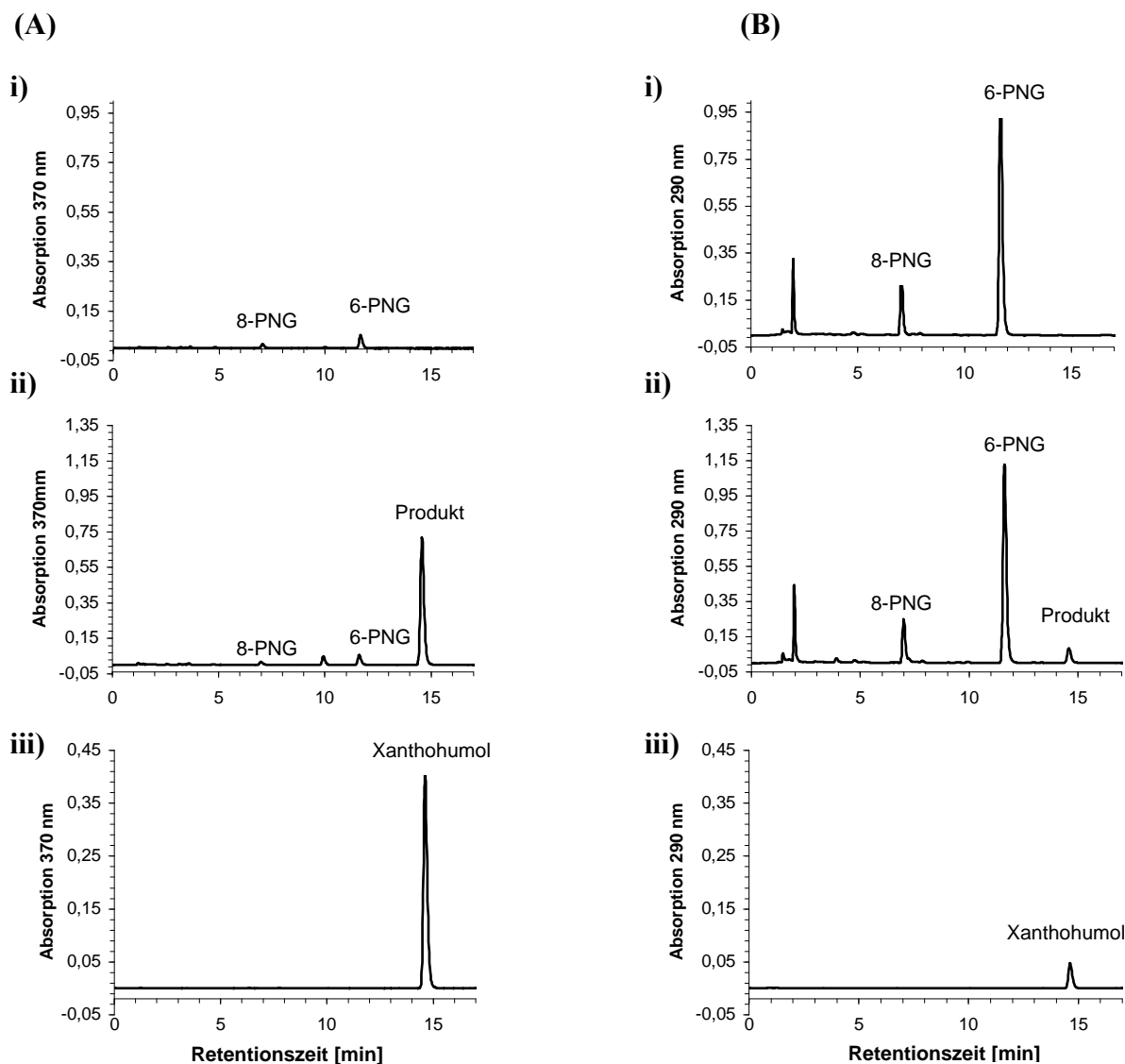
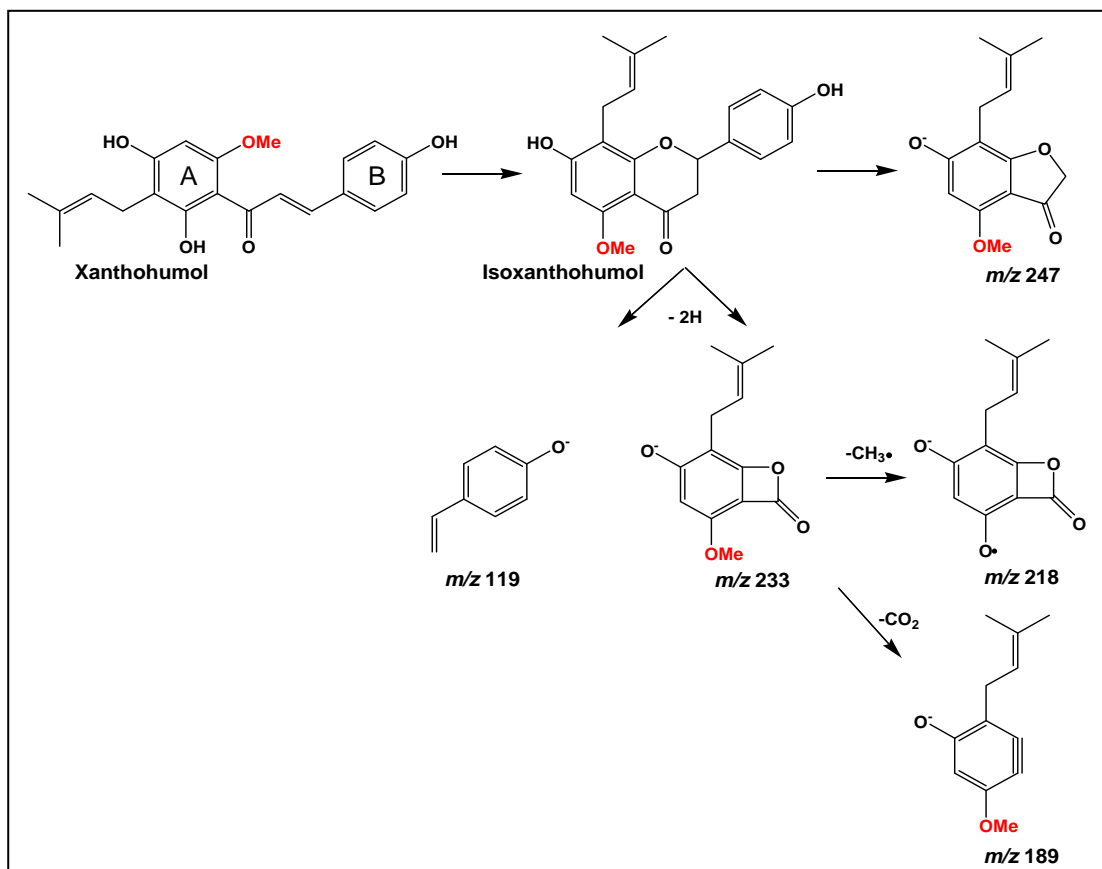


Abbildung 3.28 HPLC-Elutionsprofile der Umsetzung von Desmethylxanthohumol durch die rekombinante HIOMT1. (A) Detektion bei 370 nm und (B) Detektion bei 290 nm. i) Enzymtest ohne Zugabe von Desmethylxanthohumol, ii) Enzymtest mit Zugabe von Desmethylxanthohumol, iii) authentischer Xanthohumol-Standard, (6-PNG = 6-Prenylnaringenin, 8-PNG = 8-Prenylnaringenin). Desmethylxanthohumol isomerisiert in wässriger Lösung zu 8-Prenylnaringenin und 6-Prenylnaringenin, die bei 294 nm ihr Absorptionsmaximum haben. Das Produkt der Enzymreaktion zeigt ein Absorptionsmaximum bei 370 nm und hat die gleiche Retentionszeit und das gleiche Absorptionsspektrum wie Xanthohumol.

Die Enzymreaktion wurde auch durch ESI-MS/MS im Negativionen-Modus analysiert (2.2.2.2). In Abbildung 3.29A sind die Fragmentierung von Xanthohumol (Nikolic et al., 2005) und in 3.29B das CID („Collision Induced Dissociation“-)Massenspektrum eines authentischen Xanthohumolstandards dargestellt. Die Fragmentionen bei m/z 233 und m/z 119 entstehen durch retro-Diels-Alder-Reaktion von Isoxanthohumol, das in der Gasphase durch Cyclisierung aus Xanthohumol entsteht. Durch Verlust eines Methylradikals aus dem Ion m/z 233 entsteht das Fragmention bei m/z 218, durch Abspaltung von CO_2 m/z 189.

(A)



(B)

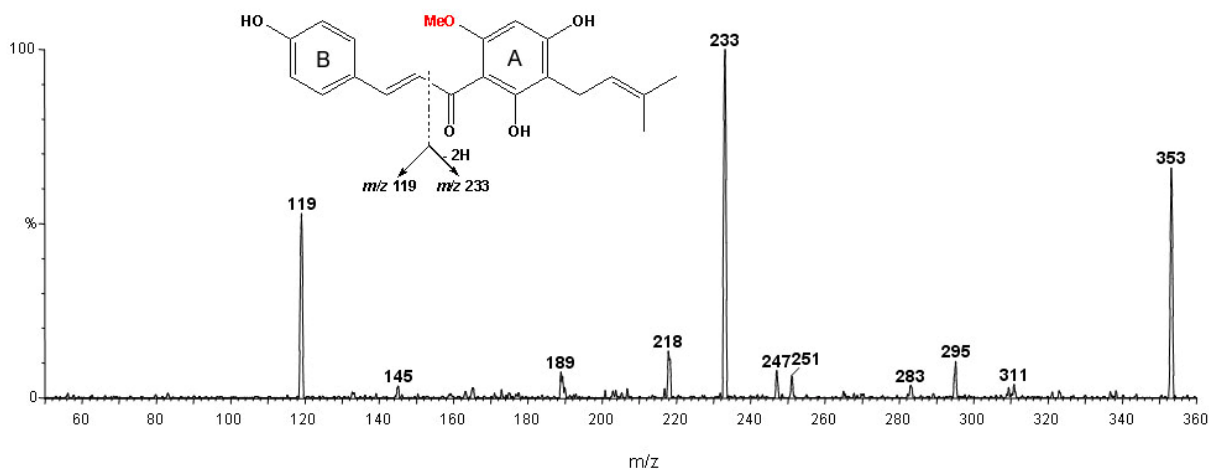


Abbildung 3. 29 (A) Hauptfragmentierung (Nikolic et al., 2005) und (B) CID-Massenspektrum (25 eV) von Xanthohumol (Isoxanthohumol) des $[M-H]^-$ -Ions (m/z 353).

In Abb. 3.30A ist das Massenspektrum der HIOMT1-katalysierten Enzymreaktion bei der Desmethylxanthohumol als Substrat eingesetzt wurde, dargestellt. Es sind die $[M-H]^-$ -Ionen (m/z 339) von Desmethylxanthohumol und die des methylierten Produkts bei m/z 353 zu erkennen. Dies zeigt, dass Desmethylxanthohumol an einer Hydroxylgruppe methyliert

wurde, Mehrfachmethylierungen wurden nicht katalysiert. Das CID-Massenspektrum von m/z 353 ($[M-H]^-$) ist in Abb. 3.30B zu sehen. Das Fragmentierungsmuster zeigt in Analogie zu Xanthohumol (vgl. Abb. 3.29B) Schlüsselionen bei m/z 119 und m/z 233, was auf eine Methylierung am A-Ring hinweist. Anhand der HPLC-Retentionszeiten und Absorptionsspektren lässt sich zusammenfassend schlussfolgern, dass die HIOMT1 die Methylierung von Desmethylxanthohumol zu Xanthohumol katalysiert.

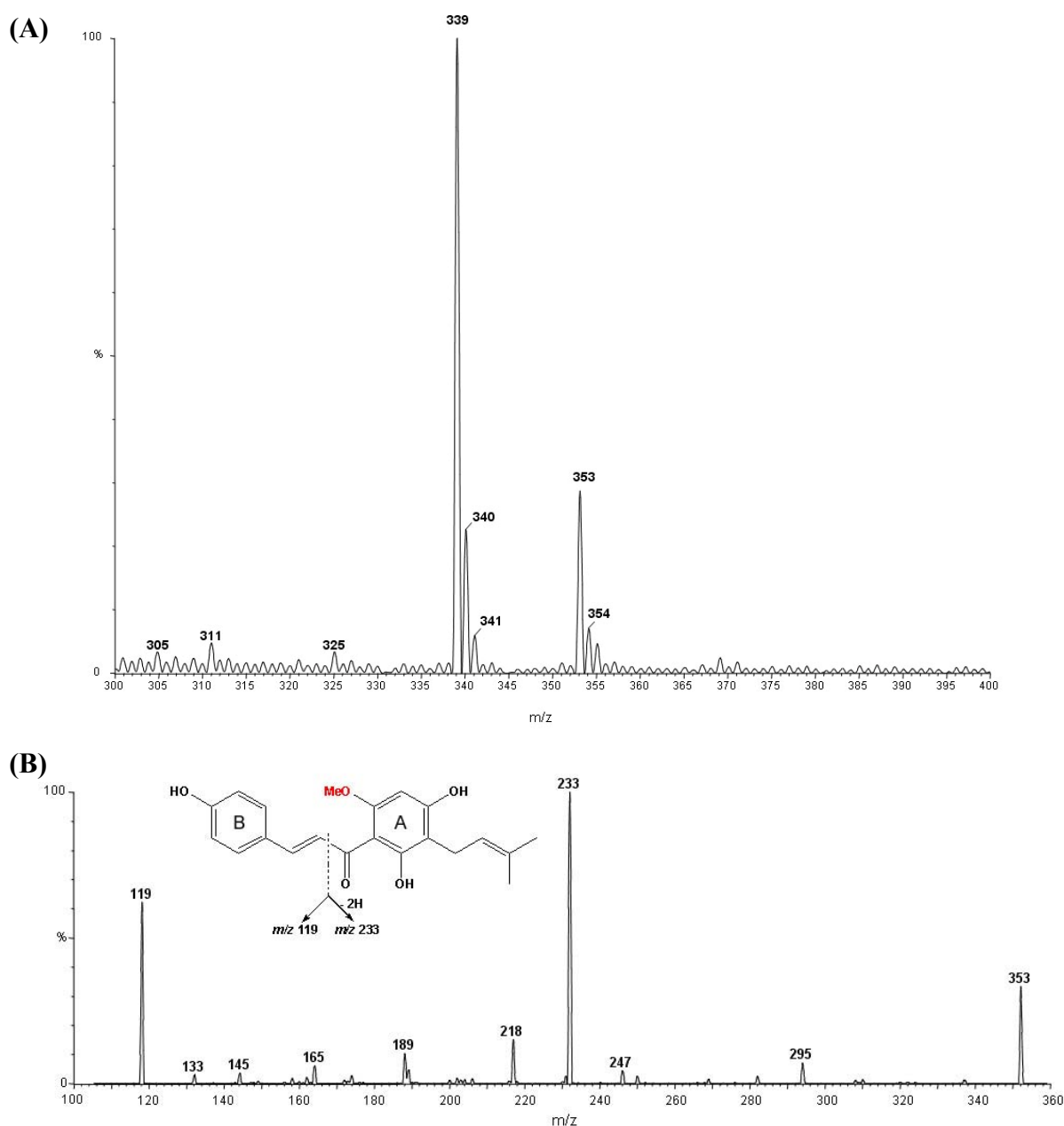


Abbildung 3.30 Negativionen ESI-MS/MS der Umsetzung von Desmethylxanthohumol durch die HIOMT1. **(A)** In der Enzymreaktion wurde Desmethylxanthohumol $[M-H]^-$ m/z 339 als Substrat eingesetzt. Das Produkt der Enzymreaktion ist $[M-H]^-$ m/z 353. **(B)** CID-Massenspektrum (20 eV) von m/z 353 ($[M-H]^-$).

3.5.2 Methylierung von Desmethylxanthohumol durch die HLOMT2

Zur Charakterisierung des Produkts der HLOMT2-katalysierten Reaktion mit Desmethylxanthohumol als Substrat wurden ebenfalls zwei Parallelreaktionen – eine ohne Zugabe von SAM – mit jeweils 31,5 µg gereinigtem Protein, 200 µM Desmethylxanthohumol und 400 µM SAM angefertigt und wie unter 3.5.1 beschrieben weiter behandelt. Im HPLC-Chromatogramm (Abb. 3.31) wurden die Isomerisierungsprodukte von Desmethylxanthohumol, 6- und 8-Prenylnaringenin, detektiert. Im Unterschied zur Reaktion der HLOMT1 mit Desmethylxanthohumol waren zwei Produktpeaks mit Retentionszeiten von 16,4 min und 19,5 min vorhanden, die bei 290 nm detektiert wurden. Ihre Absorptionsspektren zeigten Maxima bei 228-230 nm sowie bei 293-294 nm. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass es sich um Flavanone handelt. Ein dritter Produktpeak mit einer Retentionszeit von 17,9 min und einem Absorptionsspektrum eines Chalkons mit einem Maximum bei 364 nm (in Abb. 3. 31 nicht dargestellt) deutet darauf hin, dass es sich bei den zwei Flavanon-Peaks um die Isomerisierungsprodukte eines methylierten Chalkons handelt. An authentischen methylierten Desmethylxanthohumol-Standards stand neben Xanthohumol noch 3'-Prenyl-4'-O-Methylchalconaringenin (Xanthogalenol) zur Verfügung, welches durch Methylierung der 4'-OH Gruppe gebildet werden würde. Xanthogalenol hat im HPLC-Chromatogramm eine Retentionszeit von 17,6 min und seine Isomerisierungsprodukte von 16,7 min bzw. 21,6 min. Diese entsprechen nicht den Retentionszeiten der zwei vermutlichen Isomerisierungsprodukte des durch die Methylierung von Desmethylxanthohumol gebildeten Chalkons. Methylierung der 2'-Hydroxylgruppe kann ebenfalls ausgeschlossen werden, da bei 2'-Methyl-desmethylxanthohumol die Ringbildung bei der Isomerisierung zum Flavanon nur am C-6'-Atom des Phenolringes stattfinden könnte und nur ein Flavanon durch Isomerisierung gebildet werden würde.

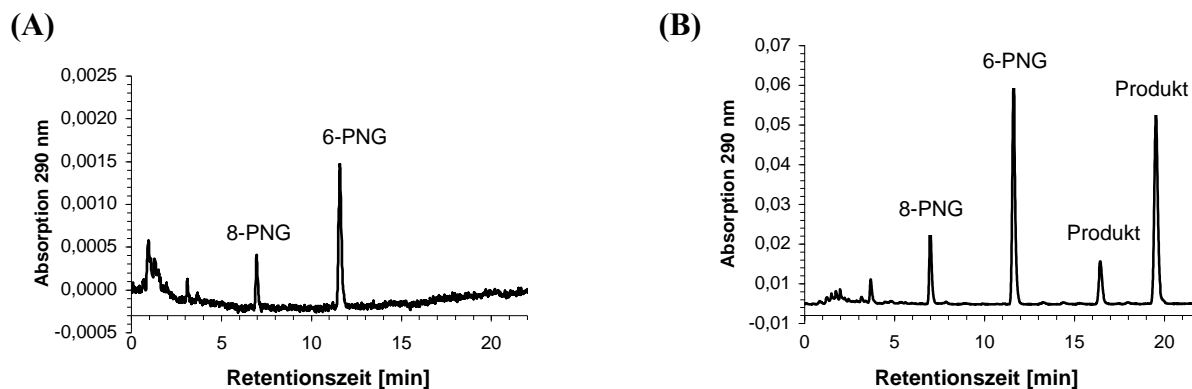


Abbildung 3.31 HPLC-Elutionsprofile der Umsetzung von Desmethylxanthohumol durch die HIOMT2. **(A)** Inkubation rekombinanten Enzyms mit Desmethylxanthohumol ohne Zugabe des Kosubstrates SAM. **(B)** Inkubation rekombinanten Enzyms mit Desmethylxanthohumol und SAM. Desmethylxanthohumol isomerisiert in wässriger Lösung zu 8-Prenylnaringenin und 6-Prenylnaringenin (8-PNG und 6-PNG), deren Absorptionsmaxima bei 294 nm liegen. Das Produkt der Enzymreaktion isomerisiert vermutlich in wässriger Lösung ebenfalls in zwei Flavanone, die bei 294 nm absorbieren.

Die massenspektrometrische Analyse mittels ESI-MS/MS im Negativionen-Modus (Abb. 3.32A) zeigt die $[M-H]^-$ -Ionen des Substrats Desmethylxanthohumol (m/z 339) und des Produkts der Enzymreaktion mit m/z 353. Die Differenz von 14 Masseneinheiten entspricht einer Methylierung. Demnach wurde Desmethylxanthohumol in der HIOMT2-Reaktion in einer Position methyliert. Im Gegensatz zur HIOMT1-katalysierten Reaktion zeigt das CID-Massenspektrum (Abb. 3.32B) die entsprechenden retro-Diels-Alder Fragmente bei m/z 219 und 133. Dies deutet darauf hin, dass die Methylierung im Gegensatz zur HIOMT1-katalysierten Reaktion am B-Ring und nicht am A-Ring stattgefunden hat, weil hier das A-Ring enthaltene Fragmentation m/z 219 um 14 Masseinheiten verringert und das B-Ring enthaltende m/z 133 um 14 Masseinheiten zu höheren m/z -Werten verschoben ist. Dementsprechend führt der Verlust von CO_2 von m/z 219 zu einem Fragmentation bei m/z 175. Diese Ergebnisse deuten auf die Methylierung von Desmethylxanthohumol in der HIOMT2-Reaktion an der 4-Hydroxylgruppe des B-Ringes hin. Damit besitzen die HIOMT1 und die HIOMT2 verschiedene Regiospezifitäten.

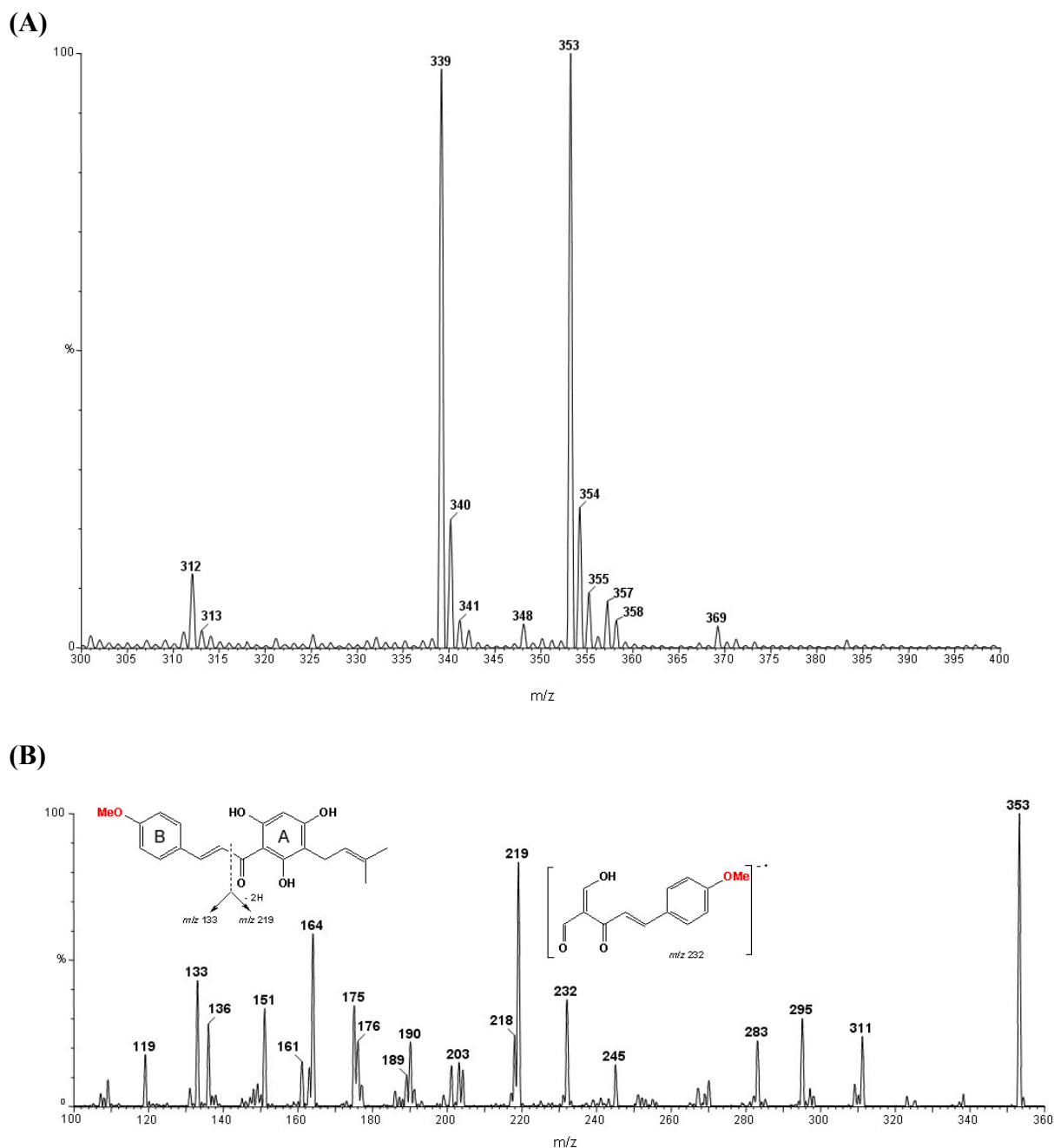


Abbildung 3.32 Negative ESI-MS/MS der Umsetzung von Desmethylxanthohumol durch die HIOMT2. **(A)** In der Enzymreaktion wurde Desmethylxanthohumol m/z 339 ($[M-H]^-$) als Substrat eingesetzt. Das Produkt der Enzymreaktion ist $[M-H]^-$ m/z 353. **(B)** CID-Massenspektrum (20 eV) von m/z 353 ($[M-H]^-$).

3.5.3 Methylierung von Xanthohumol durch die HIOMT2

3.5.3.1 Untersuchungen mittels HPLC und ESI-MS/MS

Der 250 μ l Reaktionsansatz zur Charakterisierung des Produktes der HIOMT2-Reaktion mit Xanthohumol als Substrat enthielt 79 μ g gereinigtes Protein, 400 μ M SAM und 200 μ M Xanthohumol in 100 mM Natriumglycinat, pH 8,5 und wurde 2 h lang bei 39°C inkubiert.

Parallelansätze ohne SAM oder ohne Protein wurden mitgeführt. Die Reaktionen wurden wie beschrieben (3.5.1) weiter behandelt und mittels HPLC/LC-MS analysiert. Die Ansätze ohne den Cofaktor SAM bzw. ohne die Zugabe von Protein lieferten keine Produkte (Abb. 3.33A). Im HPLC-Chromatogramm des kompletten Enzymansatzes ist neben dem Xanthohumol-Substratpeak mit einer Retentionszeit von 14,6 min ein Produktpeak bei einer Retentionszeit von 25,7 min zu sehen (Abb. 3.33B). Sein Absorptionsspektrum entspricht dem eines Chalkons mit den zwei Maxima bei 207 und 368 nm. Seine Masse von $[M-H]^-$ $m/z = 367$ entspricht der von Xanthohumol plus einer zusätzlichen Methylgruppe. Xanthohumol wurde demnach durch die HIOMT2 in einer Position methyliert. Authentische Standards von methyliertem Xanthohumol standen nicht zur Verfügung.

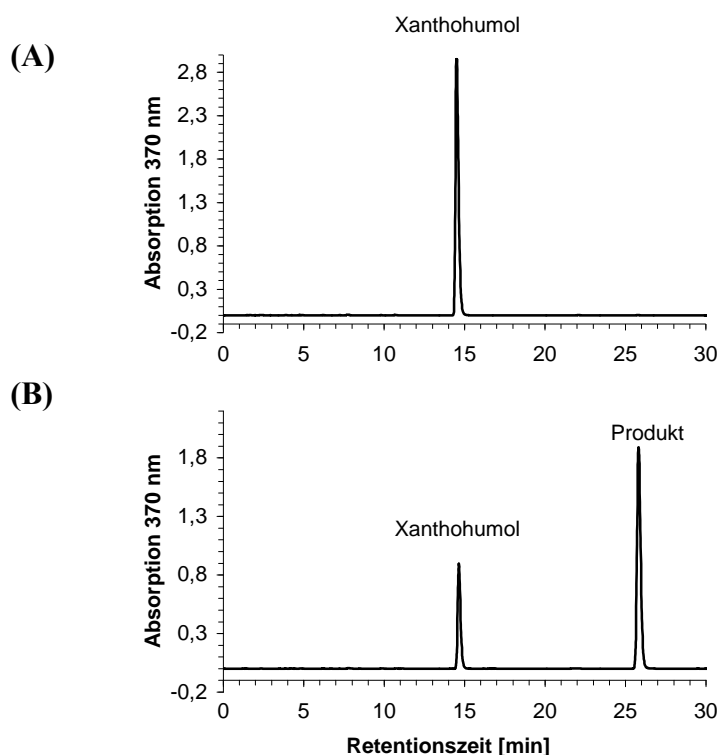
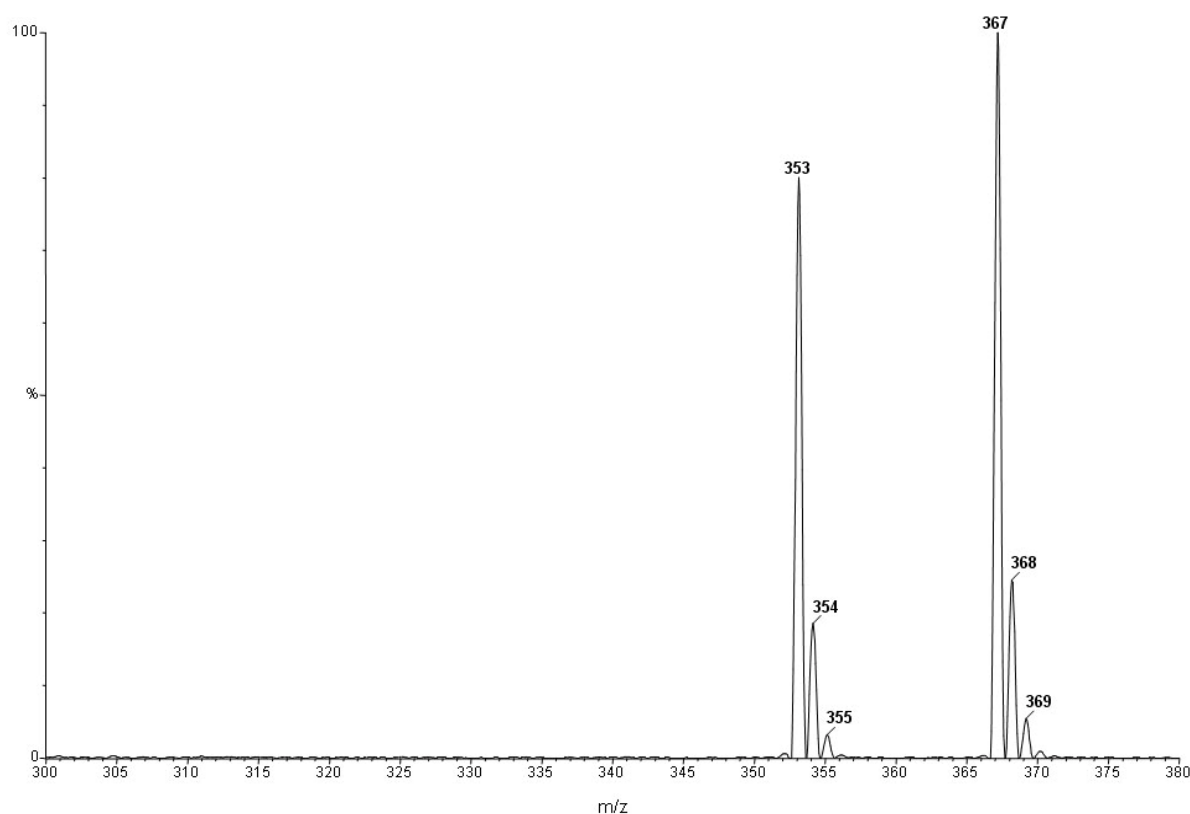


Abbildung 3.33 HPLC-Elutionsprofile der Umsetzung von Xanthohumol durch die HIOMT2. **(A)** Inkubation rekombinanter HIOMT2 mit Xanthohumol ohne SAM, **(B)** Inkubation rekombinanter HIOMT2 mit Xanthohumol und SAM.

Die massenspektrometrische Analyse zeigt $[M-H]^-$ -Ionen bei m/z 353, (Xanthohumol als Substrat) und m/z 367, was auf eine zusätzliche Methylgruppe hinweist (Abb. 3.34A). Das CID-Massenspektrum von m/z 367 (Abb. 3.34B) ergibt Fragmentationen von m/z 233 und 133, die daraufhin deuten, dass sowohl Ring A als auch Ring B methyliert sind. Dies lässt auch hier auf die Methylierung der 4-Hydroxylgruppe des Xanthohumol durch die HIOMT2 schließen. Allerdings ist ebenfalls ein Peak höherer Intensität mit m/z 119 im Spektrum enthalten, der

dem unmethylierten Fragment des B-Ringes entsprechen könnte. Seine Herkunft entspringt möglicherweise aber einer anderen Fragmentierung. Diese Vermutung wird auch durch das Auftreten eines solchen Fragmentations im CID-Massenspektrum von m/z 353 der HIOMT2-katalysierten Reaktion mit Desmethylxanthohumol als Substrat (Abb. 3.32B) gestützt. Um die Frage nach der Regiospezifität der HIOMT2 genauer zu untersuchen, wurden NMR-Analysen am Xanthohumol-Methylierungsprodukt durchgeführt (3.5.3.2).

(A)



(B)

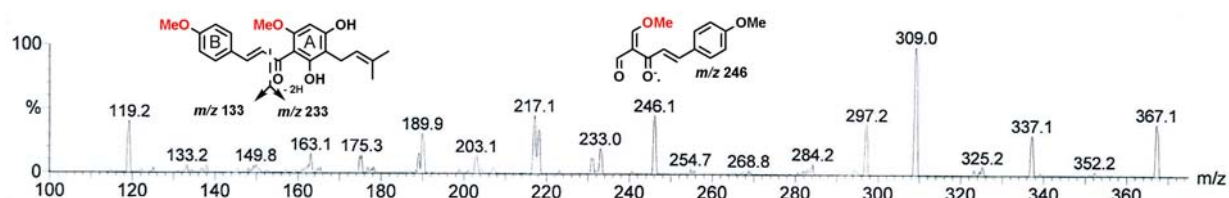


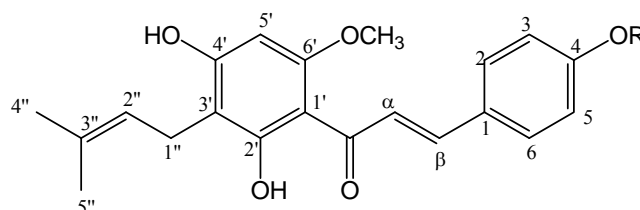
Abbildung 3.34 Negativionen-ESI-MS/MS der Umsetzung von Xanthohumol durch die HIOMT2. **(A)** In der Enzymreaktion wurde Xanthohumol ($[M-H]^-$ bei m/z 353) als Substrat eingesetzt. Das Produkt der Enzymreaktion zeigt einen $[M-H]^-$ -Peak bei m/z 367. **(B)** CID-Massenspektren (25 eV) von m/z 367 $[M-H]^-$.

3.5.3.2 Untersuchung mittels NMR

Das Produkt der Methylierung von Xanthohumol in der HIOMT2-Reaktion wurde mittels ^1H -NMR und „Nuclear Overhauser Effect“-Spektroskopie (NOESY1D) (2.2.2.6) analysiert. Dazu wurde ein 4 ml-Enzymassay hergestellt, der nach Inkubation und Abstoppen der Reaktion dreimal mit doppeltem Volumen Ethylacetat extrahiert wurde. Das Lösungsmittel wurde mit Hilfe eines Rotoevaporators eingetrocknet und in 100 μl Acetonitril aufgenommen. Das Produkt wurde mittels semipreparativer HPLC isokratisch (30% Wasser mit 0,1% TFA, 70% Acetonitril) mit einer Flussrate von 3 ml/min vom Rest des unmethylierten Substrats abgetrennt, das Lösungsmittel unter Vakuum verdampft und der Rückstand in d_6 -DMSO aufgenommen. In Tab. 3.17 sind die ^1H -NMR-Daten eines Xanthohumol-Standards und die des durch die HIOMT2 methylierten Xanthohumols mit den aus der Literatur entnommenen Daten von 4-*O*-Methylxanthohumol vergleichend dargestellt. Daraus wird ersichtlich, dass beim methylierten Xanthohumol im Unterschied zum Xanthohumol-Standard bei einer chemischen Verschiebung von 10,1 ppm kein Singulett-Signal auftritt. Ein zusätzliches Signal mit der relativen Intensität von 3 Protonen tritt hingegen bei 3,80 ppm auf. Dies zeigt an, dass die 4-OH-Gruppe am B-Ring nicht mehr vorhanden ist und sich stattdessen an dieser Position eine Methoxygruppe befindet. Dies wird durch den Vergleich mit den ^1H -NMR-Daten von 4-*O*-Methylxanthohumol bestätigt. Die geringfügigen Abweichungen zwischen den chemischen Verschiebungen von 4-*O*-Methylxanthohumol und denen des methylierten Xanthohumol werden durch die unterschiedlichen Lösungsmittel (DMSO-d_6 und Methanol-d_4) verursacht.

Tabelle 3.17 ¹H-NMR-Daten von Xanthohumol und 4-O-Methylxanthohumol

| Chemische Verschiebung δ [ppm], Multiplizität, (Kopplungskonstanten J [Hz]) | | | |
|--|---|--|---|
| | Xanthohumol ¹ (in d ₆ -DMSO) | Produktpeak mit Rt = 25,7 min (in DMSO-d ₆) | 4-O-Methylxanthohumol ² (in Methanol-d ₄) |
| H- α | 7,75 d (16,0) | 7,80 d (15,6) | 7,83 d (15,5) |
| H- β | 7,65 d (16,0) | 7,69 d (15,6) | 7,67 d (15,5) |
| H-2, 6 | 7,56 d (8,5) | 7,67 d (8,4) | 7,57 d (8,6) |
| H-3, 5 | 6,82 d (8,5) | 7,01 d (8,4) | 6,96 d (8,6) |
| H-5' | 6,07 s | 6,07 s | 6,01 s |
| H-1'' | 3,13 d (7,0) | 3,12 d (6,9) | 3,23 d (6,4) |
| H-2'' | 5,15 t (7,0) | 5,12 t (6,9) | 5,19 t (6,4) |
| Me-4'' | 1,60 s | 1,59 s | 1,64 s |
| Me-5'' | 1,69 s | 1,68 s | 1,75 s |
| 4-OH | 10,10 s | - | - |
| 2'-OH | 14,63 s | 14,55 s | (nicht detektierbar in Methanol) |
| 4'-OH | 10,60 s | 10,62 s | (nicht detektierbar in Methanol) |
| 6'-OCH ₃ | 3,85 s | 3,85 s | 3,90 s |
| 4-OCH ₃ | - | 3,80 s | 3,84 s |



1) (Stevens et al., 2003)

2) (Nookandeh et al., 2004)

s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett

Rt = Retentionszeit

Die NOE-Experimente (Abb. 3.35) ergaben bei Einstrahlung auf die 4-OCH₃-Protonen (δ 3.80 ppm, s) eine NOE-Verstärkung für die Signale von H-3, H-5 (δ 7.01 ppm d (8.4 Hz)). Selektive Einstrahlung auf die H-3, 5-Protonen ergab eine NOE-Verstärkung für das 4-OCH₃-Signal und die Einstrahlung auf die 6'-OCH₃-Protonen resultierte in einem NOE-Effekt für H-5' (δ 6.07 ppm s). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass sich in enger räumlicher

Nachbarschaft zu H-3, H-5 eine Methylgruppe befindet. Demnach katalysiert die HIOMT2 die Methylierung von Xanthohumol in 4-OH-Position zum 4-O-Methylxanthohumol.

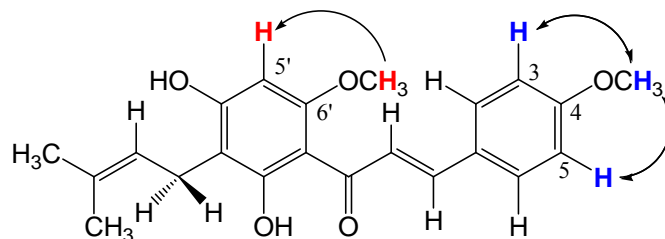


Abbildung 3.35 Veranschaulichung der Korrelationen in den NOESY1D-Experimenten von 4-O-Methylxanthohumol, dem Methylierungsprodukt der HIOMT2 mit Xanthohumol als Substrat.

3.5.4 Methylierung von Chalkonaringenin durch die HIOMT2

Die Reaktionsansätze wurden mit 400 μM SAM und 1,6 mM Chalkonaringenin entsprechend 3.5.3.1 angefertigt und durchgeführt. Kontrollen wurden ebenso wie vorher beschrieben mitgeführt. Die Inkubation erfolgte für 20 min bei 39°C. Kontrollansätze zeigten neben dem Substratpeak keine zusätzlichen Produktpeaks. Chalkonaringenin isomerisiert im Enzymansatz zum Flavanon Naringenin. Dementsprechend zeigt der Substratpeak in Abb. 3.36 Ai eine Retentionszeit von 3,35 min und ein Absorptionsspektrum mit zwei Maxima von 227 nm und 289 nm entsprechend einem authentischen Naringenin-Standard. Ein zusätzlicher Produktpeak mit einer verzögerten Retentionszeit von 6,6 min ist im HPLC-Profil des Enzymassays bei einer Detektion von 290 nm zu sehen (Abb. 3.36 Aii). Dieses Produkt zeigt ebenfalls das Absorptionsspektrum eines Flavanons. Naringenin wird *in vitro* nicht durch die HIOMT2 methyliert (3.3.8). Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass Chalkonaringenin methyliert wurde und das methylierte Produkt danach aufgrund seiner Instabilität ebenfalls zum korrespondierenden Flavanon isomerisiert ist. In Abb. 3.36 Bii sind $[\text{M}-\text{H}]^-$ -Ionen bei m/z 285 zu sehen, was auf eine zusätzliche Methylgruppe zu m/z 271 des Naringenin hinweist (Abb. 3.36 Bi). Demnach katalysiert die HIOMT2 die Methylierung von Chalkonaringenin in einer Position. Entsprechende Referenzsubstanzen standen nicht zur Verfügung.

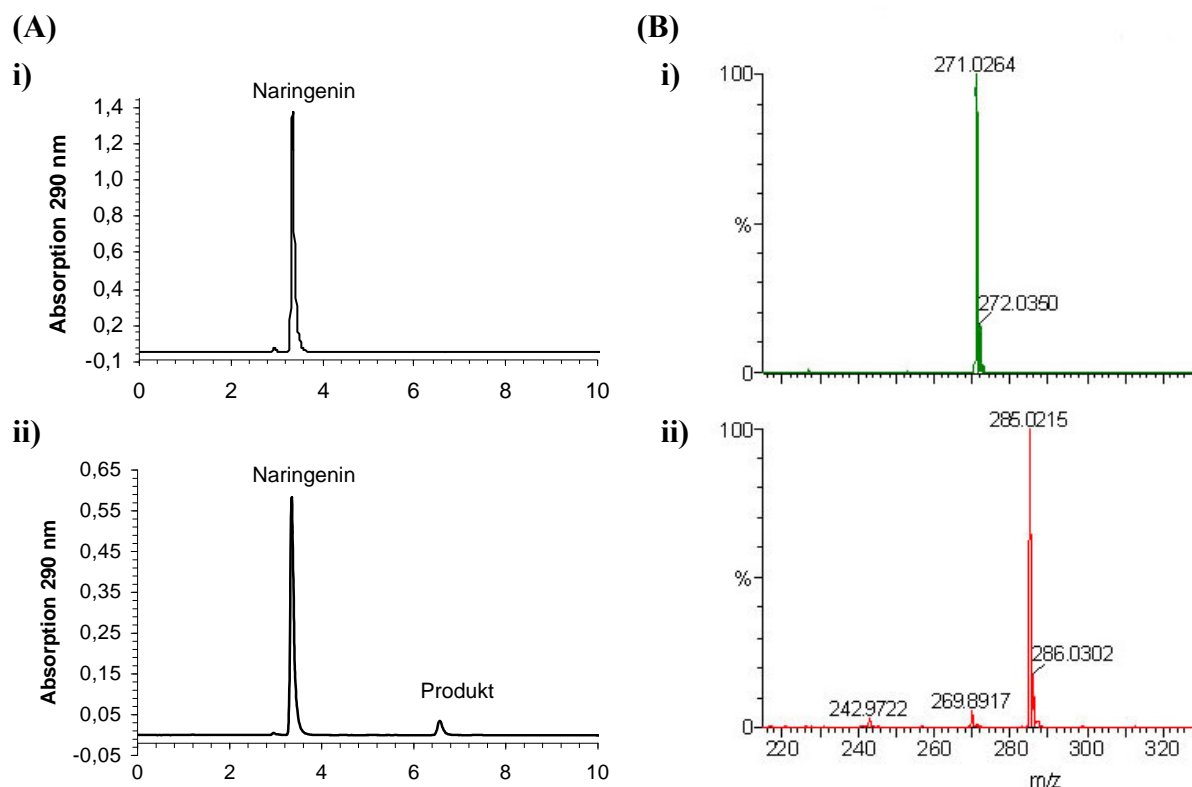


Abbildung 3.36 Umsetzung von Chalkonaringenin durch die HIOMT2. **(A)** HPLC-Elutionsprofile, **i)** Inkubation rekombinanter HIOMT2 mit Chalkonaringenin ohne SAM und **ii)** Inkubation rekombinanter HIOMT2 mit Chalkonaringenin und SAM. **(B)** Massenspektren von **i)** dem Substrat Naringenin und **ii)** dem Produkt = methyliertes Chalkonaringenin, isomerisiert.

3.5.5 Methylierung von Resveratrol durch die HIOMT2

Reaktionsansätze wurden mit 400 μM SAM und 500 μM Resveratrol entsprechend 3.5.3.1 angefertigt und durchgeführt. Kontrollen wurden wie vorher beschrieben mitgeführt. Die Inkubation erfolgte für 2 h bei 39°C. Kontrollansätze zeigten neben dem Substratpeak keine zusätzlichen Produktpeaks (Abb. 3.37 Ai). Im HPLC-Chromatogramm des vollständigen Enzymtests (Abb. 3.37 Aii) ist neben dem Substratpeak mit einer Retentionszeit von 2,4 min ein zusätzlicher Produktpeak vorhanden, der nach 4,4 min eluiert. Substrat und Produkt zeigen ähnliche Absorptionsspektren mit Maxima bei 221 nm und 307 nm. Im Massenspektrum des Produkts sind $[\text{M}-\text{H}]^-$ -Ionen bei m/z 241 vorhanden (Abb. 3.37 Bii), was einer zusätzlichen Methylgruppe im Vergleich mit m/z 227 des Substrats Resveratrol entspricht (Abb. 3.37 Bi) und wiederum die Methylierung in einer Position anzeigt. Demnach wird Resveratrol in der HIOMT2-katalysierten Reaktion in einer Position methyliert. Entsprechende authentische Standards zum Vergleich standen nicht zur Verfügung.

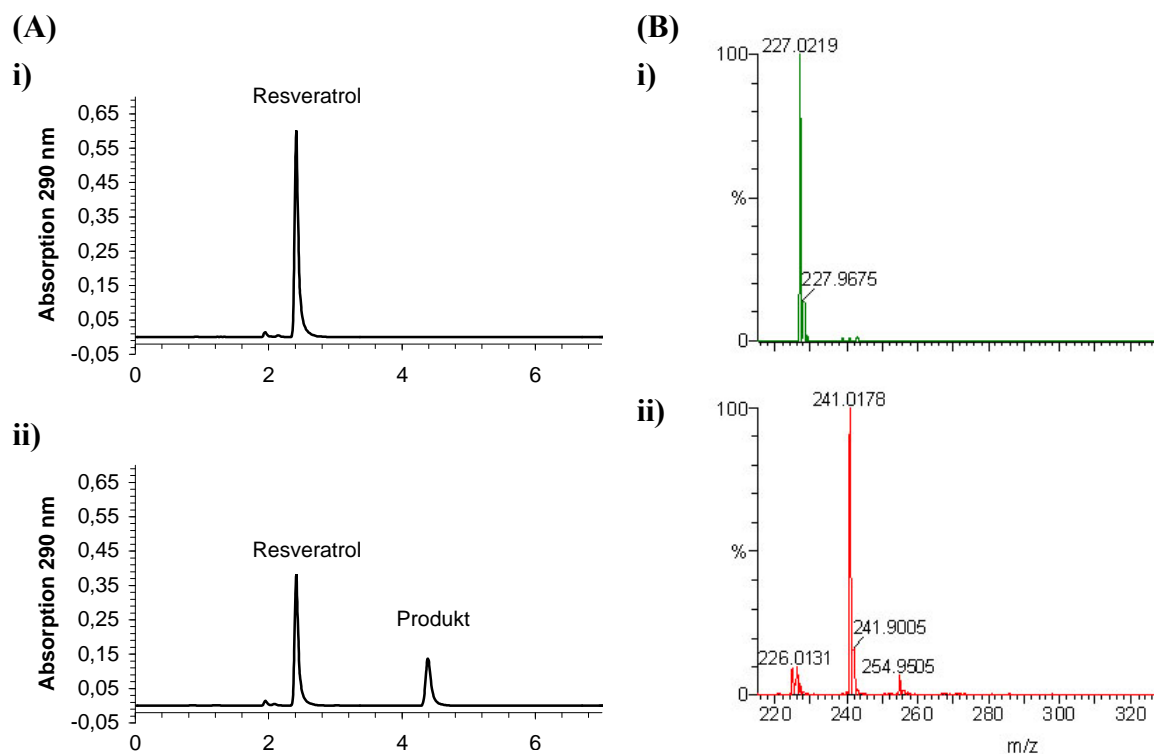


Abbildung 3. 37 Umsetzung von Resveratrol durch die HIOMT2. **(A)** HPLC-Chromatogramme, i) Inkubation rekombinanter HIOMT2 mit Resveratrol ohne SAM und ii) Inkubation rekombinanter HIOMT2 mit Resveratrol und SAM, **(B)** Massenspektren von i) dem Substrat Resveratrol und ii) dem Produkt = methyliertes Resveratrol.

3.6 Putative Chalkon-Isomerasen aus *H. lupulus* (HICHIs)

Im EST-Set waren eine große Anzahl ESTs mit Ähnlichkeit zu putativen CHIs vorhanden (Tab. 3.18). Aufgrund der Anreicherung von Chalkonen in den Trichomen stellt dies ein unerwartetes Ergebnis dar. Da Flavonole und andere Flavonoide nach der Stufe der Chalkone noch nicht darin nachgewiesen wurden, ist unklar, ob eine funktionelle CHI in den Trichomen vorhanden ist. Der Frage, ob diese CHI-ähnlichen Proteine katalytisch aktiv sind, wurde in dieser Arbeit nachgegangen. So wurden insgesamt 61 ESTs identifiziert, die zwei verschiedene Gruppen bilden: Cluster 5, zu dem 38 ESTs gehören, sowie Cluster 7 mit 23 ESTs. Cluster 5 spaltet noch einmal in zwei Untergruppen auf, in Contig 1 und Contig 2, die beide zur selben putativen CHI aus *L. esculentum* Homologie besitzen. Sie werden im Folgenden wie in Tab. 3.18 angegeben als HICHI1, HICHI2 und HICHI3 bezeichnet.

Tabelle 3.18 ESTs aus den cDNA-Bibliotheken mit Sequenzähnlichkeit zu putativen CHIs.

| Cluster-/ Sequenzname | Anzahl ESTs | Ähnlichkeit zu Datenbankeintrag ¹ (Accession-Nr.) | E-Wert | Offener Leserahmen | Name |
|------------------------------------|-------------|--|----------------|----------------------------|--------------------------------|
| Cluster 5 Contig 1/ Contig 2 | 13 25 | Putative Chalkon-Isomerase (<i>Lycopersicon esculentum</i>) (AAQ55182) | 8e-64 9e-64 | vollständig vollständig | HICHI2 HICHI1 |
| Cluster 7 | 23 | Ähnlichkeit zu Chalkon- Flavanon-Isomerase (<i>Arabidopsis thaliana</i>) (AAM65565) | 1e-66 | vollständig | HICHI3 |

¹-Blastx-Vergleich zur nichtredundanten Datenbank nr, Stand 25.08.06

3.6.1 Sequenzanalyse

Ausgewählte ESTs eines jeden Clusters wurden in den Vektor pGEM-T kloniert und von beiden Richtungen sequenziert. Nach Alignierung der Einzelsequenzen lagen die vollständigen cDNA-Sequenzen von HICHI1, HICHI2 und HICHI3 vor (siehe Anhang Abb. 7.6-7.8). Die Konsensussequenzen enthielten partielle 5'- und 3'-UTRs und einen vollständigen offenen Leserahmen. Genaue Angaben sind aus Tab. 3.19 zu entnehmen. Variabilität wiesen alle Sequenzen im Bereich der 3'UTR auf, während es innerhalb der 5'-UTR keine variablen Nukleotide gab. Für HICHI1 waren Klone mit verschiedenen langen 3'-UTRs vorhanden, wovon eine um 69 Nukleotide kürzer und eine um 41 Nukleotide länger als die dargestellte Sequenz (siehe Anhang Abb. 7.6) waren. Auch für HICHI2 waren Klone mit unterschiedlich langen 3'UTR-Sequenzen vorhanden, wovon eine um 55, eine um 148 und eine um 159 bp kürzer als die hier dargestellte Sequenz (siehe Anhang Abb. 7.7) waren. Die Länge der Sequenzen im Bereich der 3'-UTR in HICHI3 variierte um bis zu 6 Nukleotide zwischen den einzelnen Klonen.

Die Nukleotidsequenz der offenen Leserahmen kodierte bei allen drei Sequenzen für Proteine von ca. 210 Aminosäuren. Dies entspricht in etwa der Größe bereits charakterisierter CHIs aus anderen Spezies wie beispielsweise *M. sativa* CHI2 mit 222 Aminosäuren und *A. thaliana* CHI2 mit 247 Aminosäuren.

Tabelle 3.19 Gliederung und Eigenschaften der drei aus *H. lupulus* isolierten cDNA-Sequenzen und der davon abgeleiteten Proteine.

| Name | 5'UTR [bp] | Offener Leserahmen [bp] | 3'UTR [bp] | Aminosäuren/ Berechnetes Molekulargewicht [kDa] | Datenbankvergleich ¹ Identität [%]/ Ähnlichkeit [%] |
|--------|------------|-------------------------|-------------------------------|--|--|
| HICHI1 | 48 | 645 | variabel (72, 141, 182) | 214/23,4 | 64/82 Putative Chalkon-Isomerase <i>Lycopersicon esculentum</i> (AAQ55182) |
| HICHI2 | 61 | 651 | variabel (111, 122, 215, 270) | 216/23,6 | 64/80 Putative Chalkon-Isomerase <i>Lycopersicon esculentum</i> (AAQ55182) |
| HICHI3 | 97 | 630 | variabel (148 ± 6) | 209/23,6 | 69/80 Chalkon-Flavanon-Isomerase Familie-Protein <i>Arabidopsis thaliana</i> (NP_568154) |

¹-Blastx-Vergleich zur nichtredundanten Datenbank nr, Stand 08.05.07

Die Proteinsequenzen der HICHI1 und HICHI2 zeigen eine relativ hohe Identität zueinander (Tab. 3.20), wohingegen beide Sequenzen nur eine geringe Identität zur Proteinsequenz der HICHI3 aufweisen. Die geringe Identität der Sequenzen auf Aminosäureebene verglichen mit der der Nukleotide und das daraus folgende geringe Verhältnis von Aminosäureidentität zu Nukleotididentität lässt auf einen hohen Anteil an nicht-synonymen Basenaustauschen schließen.

Tabelle 3.20 Sequenzhomologie der HICHIs. Identität auf Aminosäure- [%]/Nukleotidebene [%]

| | HICHI1 | HICHI2 | HICHI3 |
|--------|--------|--------|--------|
| HICHI1 | - | 78/76 | 15/45 |
| HICHI2 | - | - | 15/41 |

Angaben nach Clustal W, Multiple Alignment

Ein Datenbankvergleich (Genbank, nr-Datenbank) ergab, dass die HICHI1 und die HICHI2 die größte Identität mit jeweils 64% zu einer putativen CHI aus *L. esculentum* aufweisen. HICHI3 ist zu 69% identisch mit einem Protein, das zur Familie der Chalkon-Flavanon-Isomerasen aus *A. thaliana* gehört (Tab. 3.19). Ein Sequenzvergleich mit diesen Proteinen ist in den Abbildungen 3.38 und 3.39 dargestellt. Sowohl bei der Sequenz aus *L. esculentum* als auch bei der aus *A. thaliana* handelt es sich um putative CHIs, die aufgrund ihrer Ähnlichkeit

zu anderen funktionellen CHIs als solche annotiert wurden, deren katalytische Aktivität bisher aber nicht gezeigt wurde. In beiden Sequenzvergleichen befinden sich lange Sequenzabschnitte, in denen die Aminosäuren absolut konserviert sind. Die putative CHI aus *L. esculentum* besitzt verglichen mit der HICHI1 und der HICHI2 im N-terminalen Bereich einen zusätzlichen 49 Aminosäuren langen Sequenzabschnitt. Eine Untersuchung mit drei über das Internet anwendbaren Programmen zur Erkennung von N-terminalen Signalsequenzen (ChloroP, MITOPROT, TargetP, (<http://www.expasy.ch/tools>)) ergab keinen Hinweis auf eine vorhandene Signalsequenz in HICHI1 und HICHI2.

Ein Vergleich aller drei HICHIs mit den Proteinsequenzen zweier funktioneller CHIs des Typ I-CHI, CHI2 aus *A. thaliana* und CHI2 aus *G. max*, ist in Abb. 3.40 dargestellt. Die Homologie der HICHIs zu diesen zwei Sequenzen fällt insgesamt gering aus. An 11 Positionen des Sequenzvergleichs sind die Aminosäuren in allen fünf Sequenzen absolut konserviert (27 Positionen unter Berücksichtigung konservativer Aminosäureaustausche). Keine dieser absolut konservierten Aminosäuren bildet jedoch Teil des aktiven Zentrums von Typ I-CHIs (Jez et al., 2000b). Davon sind insgesamt sechs Aminosäuren (vier absolut konservierte und zwei chemisch ähnliche) in HICHI3 konserviert und zwei bzw. keine in HICHI1 und HICHI2. Weiterhin sind im Sequenzvergleich Aminosäuren vorhanden, welche spezifisch bei Typ I-CHIs konserviert sind sowie solche die nur in den HICHIs konserviert sind.

Ergebnisse

```

                *           20           *           40           *           60           *
HlCHI1 : MATA LN--SKNASS-----NTAVHIE : 19
HlCHI2 : MATFQSGSSNA AAK-----EVAVHIE : 21
Le_CHI : MPTT MEDVTAKIDAVEIDSKSVVALKEKAIEGEVKT TETTQ EKTNEAKSNPEKESNGATFKEEVVPVEVE : 70

                80           *           100           *           120           *           140
HlCHI1 : PKTGLAFPVKLDDGKSLNSVGLRKKSL LGMG I K V G F G L Y A D N E K L K N L L K L K I G K S P A K P T E E M Y Q L V I : 89
HlCHI2 : SKTGLAFPVKLNDGKSLNCVGLNKKSL L G L N I K V Y G F A L Y A D N E K L K S L L K L K I C K S P A K P T E E M Y Q L A I : 91
Le_CHI : PKTGV S F P V K L E D G K Q L K A V G L R K K S M L G M G I K I Y G F G I Y A D N E K L K D L M Q S K I A K A P A K P T K E M Y Q M V I : 140

                *           160           *           180           *           200           *
HlCHI1 : DGD T G L T H K I V T A V S G L K M N M F K K A F S E A L G E S I M K L N G G R K N E E L A N K V L G P A S D Q I K L A T G S E M E I S K : 159
HlCHI2 : DGD F G M T I K I V T V F S G L K V S M V K K N F S E A V V E S I M K L T G G Q K N E D L A N K I L G S A S D K I K L A T G S E L E I S K : 161
Le_CHI : D S D L G M M R L V I V F S N L T M N M V R K N F D E G L C A A I K K L T G G - K N E E L T K K I M G E A S D D I K L N S G S V I E I S R : 209

                220           *           240           *           260
HlCHI1 : L P G Y V L E T K V H G E L A S R V E S E L L C R A Y F G I Y L G E N T M E C Y K E S K E M F G Q S M L S L F : 214
HlCHI2 : L P G Y V L E T K V N G E L V S R V E S E L L C R A Y F R M Y L G E D T M E C D K E S R E M F G Q S M L S L F : 216
Le_CHI : L P G Y V L Q T K V K G E L V S K V E S E L L C R A F I Y M Y L G D D - - P F D K E A K E K F G T S M L S L F : 262

```

Abbildung 3.38 Sequenzvergleich der HlCHI1 und HlCHI2 mit der putativen CHI aus *L. esculentum* (AAQ55182). Aminosäuren sind entsprechend ihrem Konservierungsgrad mit Grauabstufungen unterlegt (Ähnlichkeitsdefinition siehe GeneDoc). Schwarze Blöcke zeigen absolute Konservierung an, dunkelgraue und hellgraue Blöcke kennzeichnen teilweise konservierte Aminosäuren und konservative Aminosäureaustausche. Zahlen und Sterne (*) oberhalb der Sequenzblöcke markieren die Position im Sequenzvergleich, Zahlen am rechten Rand sind spezifisch für die einzelnen Sequenzen.

```

                *           20           *           40           *           60           *
HlCHI3 : M E N N M V M V H E I P F P P E I K T I K P L S L L G Y G I T D M E I H F L Q I K F T A I G V Y L D - S D V V K H L Q Q W K G K K G N E L A : 69
At_CHI4 : M G T E M V M V H E V P F P P Q I I T S K P L S L L G Q I G I T D I E I H F L Q V K F T A I G V Y L D P S D V K T H L D N W K G K T G K E L A : 70

                80           *           100           *           120           *           140
HlCHI3 : E D D D F F D A L I S A P V E K Y L R I V V I K E I K G S Q Y G V Q L E S S V R D R L A A E D M Y E E E E E A A L E K I V E F L Q S K Y F K : 139
At_CHI4 : G D D D F F D A L A S A E M E K V I R V V I K E I K G A Q Y G V Q L E N I V R D R L A E E D K Y E E E E E T E L E K V V G F F Q S K Y F K : 140

                *           160           *           180           *           200           *
HlCHI3 : K D T L I T F H F P A T S P T A E I V V T L E G K E E S K L K V E N K N V V D M I K K W Y L G G T S G V S P S T I S S L A D N L S A E L S K : 209
At_CHI4 : A N S V I T Y H F S A K D G I C E I G F E T E G K E E E K L K V E N A N V V G M M O R W Y L S G S R G V S P S T I V S I A D S I S A V L T - : 209

```

Abbildung 3.39 Sequenzvergleich der HlCHI3 mit einer Sequenz der Chalkon-Flavanon-Proteinfamilie aus *A. thaliana* (NP_568154). Aminosäuren sind entsprechend ihrem Konservierungsgrad mit Grauabstufungen unterlegt (Ähnlichkeitsdefinition siehe GeneDoc). Identische Aminosäuren sind schwarz und chemisch ähnliche grau markiert. Zahlen und Sterne (*) oberhalb der Sequenzblöcke markieren die Position im Sequenzvergleich, Zahlen am rechten Rand sind spezifisch für die einzelnen Sequenzen.

Ergebnisse

```

*           20           *           40           *           60           *
Gm_CHI2 : -----MAFPSVTSVTVENVTFPPTVKPPCSPNTFFLAGAGVRGLQIHHAFVKFTAICTYLQYDAL : 60
At_CHI2 : MSSSNACASPSFPFAVTKLEVDVSVTFVPSVKSPASSNPLFLGGAGVRGLDIQGFVIFTVIGVYLEGNAV : 70
HlCHI1  : ---MATALN--SKNASSNTAVHIEPKTGIAPPVKLDDGKSLNSVGLRKKSILGMGLKVFVGFGLYADNEKL : 65
HlCHI2  : ---MATFQSGSSNAAAKEVAVHIESKTGIAPPVKLNDGKSLNCVGLNKKSILGLNLIKVYGFALYADNEKL : 67
HlCHI3  : -----MENNVMVHEIIPFPPEIK---TTKPLSLGLGYGLTDMEIHFLOIKFTAIGVYLDSDVV : 54

*           80           *           100          *           120          *           140
Gm_CHI2 : SPISVKKWKKSTHQLTESDQFESDIVTCPFEKFMQVTMIKP-ITGQQYSEKVAENCVAIWRSIGIYTDSE : 129
At_CHI2 : PPSISVKKWKKTEELTESIPEREIVTCAFEKFIKVTMKLP-ITGQQYSEKVTENCVAIWKQGLYTDCE : 139
HlCHI1  : KNLLKLKIKSPAKPE--EMQLVDDCDIGLTHKIVIAYSGKMNMFKKAFSCALGESIMKNGGRKNE : 133
HlCHI2  : KSLKLKIKSPAKPE--EMQLADDDFGMTIKIVTVFSGKVSMVKKNFSAVVESIMKTGGQKNE : 135
HlCHI3  : KHLQQWKKKGNELAEDDDEDALISAPVEKYLRVVIKE-IKGSQYGVQLESSVRDLAAEDMYEEEE : 122

*           160          *           180          *           200          *
Gm_CHI2 : AEAIDKFLSVFKDLTFPPGSSILLFTVSNGSLTISFSGDETIPEVTSAVIENKLLSEAVLESMC-KNGV : 198
At_CHI2 : AKAVEKFLEIFKEETFPPGSSILFALSETGSLTVAFSKDDSIPETGIAVIENKLLAEAVLESIG-KNGV : 208
HlCHI1  : ELANKVLGPASDQIKLATGSEMEISKLG-----YVLETKVHGELASRVESELLCRAYFGIYLG-ENTM : 196
HlCHI2  : DLANKILGSASDKIKLATGSEMEISKLG-----YVLETKVNGELVSRVESELLCRAYFRMYLG-EDTM : 198
HlCHI3  : EAALEKIVEFLQSKYFKDDLITTFHPATSP-TAEIVVTLEGKEESKLKVENKNVDMIKKWYLGGTSGV : 191

*           220          *           240          *
Gm_CHI2 : SP--AAKQSLASRLSHLFK----EPGVCDFQSHK----- : 226
At_CHI2 : SP--GTRLSVAERISQMMKNKDEKEVSDHSLEEKLAKEN : 246
HlCHI1  : ECYKESKEMFGQSMLSLF----- : 214
HlCHI2  : ECDKESREMFGQSMLSLF----- : 216
HlCHI3  : SP--STISSLADNLSAELSK----- : 209

```

Abbildung 3.40 Sequenzvergleich der HlCHI1, HlCHI2 und HlCHI3 mit CHI2 aus *A. thaliana* (AAA32766) und CHI2 aus *G. max* (AAT94360). Aminosäuren sind entsprechend ihrem Konservierungsgrad mit Grauabstufungen unterlegt (Ähnlichkeitsdefinition siehe GeneDoc). Schwarze Blöcke zeigen absolute Konservierung an, dunkelgraue und hellgraue Blöcke kennzeichnen teilweise konservierte Aminosäuren und konservative Aminosäureaustausche. Rot gekennzeichnete Aminosäuren bilden das aktive Zentrum der katalytisch aktiven CHIs (Jez et al., 2000b). Zahlen und Sterne (*) oberhalb der Sequenzblöcke markieren die Position im Sequenzvergleich, Zahlen am rechten Rand sind spezifisch für die einzelnen Sequenzen.

3.6.2 Clusteranalyse pflanzlicher CHIs und CHI-ähnlicher Proteine

Ein Stammbaum basierend auf den Proteinsequenzen charakterisierter CHIs und CHI-ähnlicher Sequenzen inklusive der drei HlCHIs ist in Abb. 3.41 dargestellt. Ein multipler Sequenzvergleich von insgesamt 30 Proteinsequenzen wurde mit Clustal W (Thompson et al., 1994) und der Stammbaum mit Hilfe der Software „TREECON for Windows“ (Van de Peer und De Wachter, 1994) mit den angegebenen Einstellungen (Distanzberechnung durch Poisson Correction, Insertionen und Deletionen nicht miteinbezogen, Baumtopologie abgeleitet durch Neighbor-joining Methode) erstellt. Es lassen sich deutlich vier große Gruppen, die Typen I-IV-CHIs voneinander unterscheiden (Ralston et al., 2005). Typ I-CHIs sind aus vielen unterschiedlichen Pflanzenspezies bekannt. Alle bisher charakterisierten Typ I-CHIs katalysieren die stereospezifische Cyclisierung von (2*S*)-2',4,4',6'-Tetrahydroxychalkon ((2*S*)-Chalkonaringenin) zu (2*S*)-5,7,4'-Trihydroxyflavanon ((2*S*)-

Naringenin). Sie bilden die Subfamilie 2 der CHIs. Die Identität der Sequenzen dieses Clusters zueinander beträgt durchschnittlich 62%. Dagegen akzeptieren CHIs des Typ II (Subfamilie 1) neben (2*S*)-Chalkonaringenin auch Substrate die in 6'-Position keine Hydroxylgruppe aufweisen (6'-Deoxychalkone), wie z.B. Isoliquiritigenin (Kimura et al., 2001; Ralston et al., 2005). Angehörige dieser Unterfamilie der CHIs sind nur aus der Familie der Fabaceae bekannt. Sie haben ihren Ursprung vermutlich in der Duplikation eines ursprünglichen CHI-Gens, welche vor der Radiation der Familie der Fabaceae stattgefunden hat (Shimada et al., 2003). Die Typ II-CHIs dieser Clusteranalyse sind durchschnittlich zu 73% identisch. HICHI3 ist innerhalb des Typs IV-CHIs zu finden und HICHI1 und HICHI2 gruppieren mit Sequenzen des Typ III CHI-Subclusters. Vertreter davon kommen in den verschiedensten Pflanzenspezies vor und in den Datenbanken gibt es viele als hypothetische oder unbekannte Proteine annotierte Sequenzen aus *A. thaliana* oder *Oryza sativa*, die Ähnlichkeit dazu zeigen. Bisher ist die *in vivo*-Funktion von keinem dieser Proteine bekannt. HICHI1 und HICHI2 zeigen moderate Identität zu den Sequenzen aus *L. esculentum* und *C. sinensis* (HICHI1 64% zu *L. esculentum* CHI) und geringe Identität (29-48%) zu den anderen Sequenzen dieses Clusters. Wie aus der Abbildung ersichtlich, trennt sich der Typ III-CHIs in zwei gut definierte Cluster. Durchschnittlich beträgt die Identität der Sequenzen dieses Clusters zueinander nur 27%. Einige Mitglieder dieses Clusters weisen eine N-terminale Chloroplasten-Signalsequenz (Abb. 3.38) (Ralston et al., 2005) auf, die in HICHI1 und HICHI2 aber nicht vorhanden sind (siehe oben). Die Identität von HICHI3 mit den anderen Mitgliedern des Typ IV-CHI ist mit 66-69% höher und die durchschnittliche Identität der Sequenzen zueinander beträgt 57%.

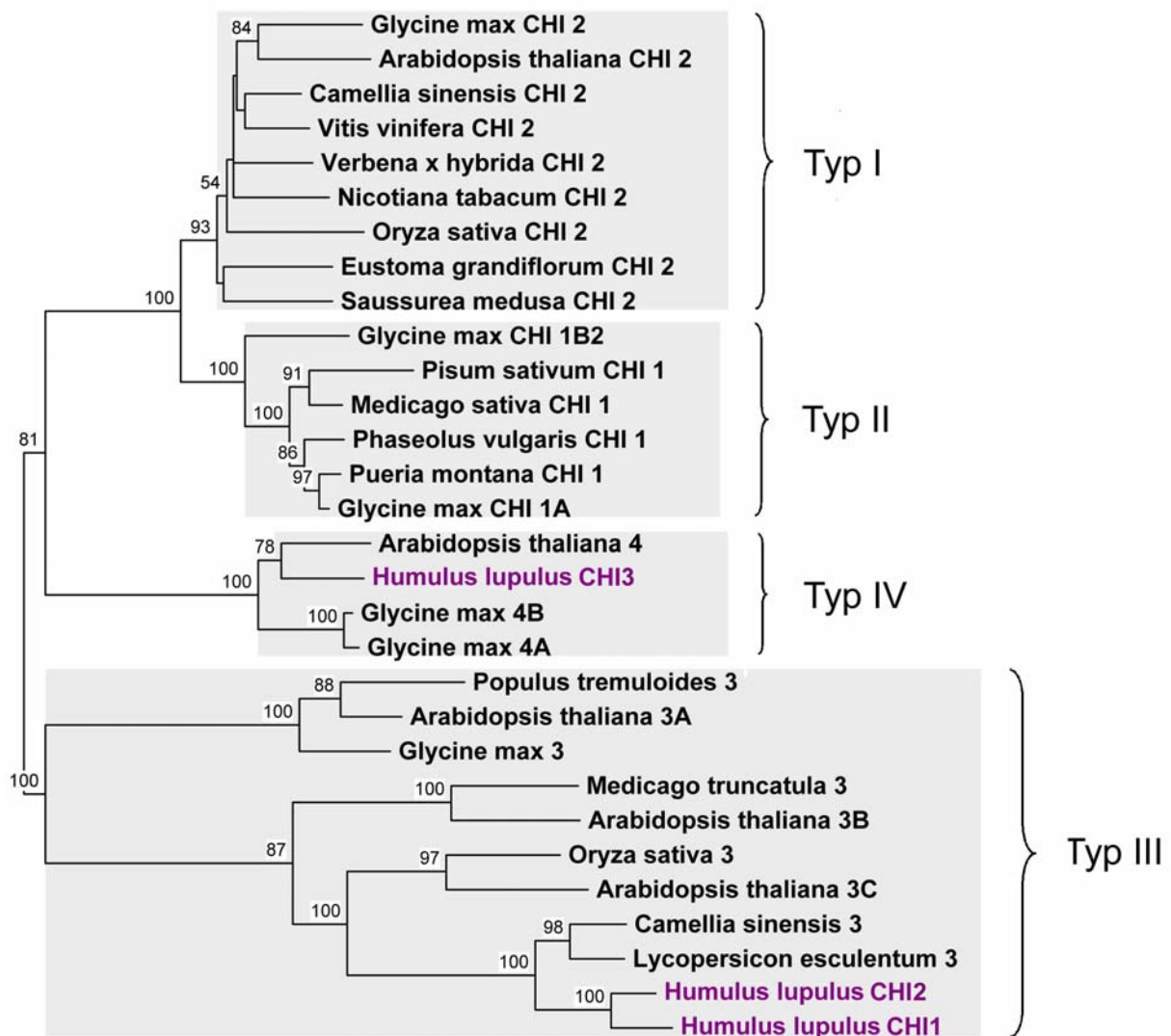


Abbildung 3.41 Clusteranalyse von CHIs und CHI-ähnlichen Sequenzen 30 pflanzlicher Aminosäuresequenzen inklusive der drei HICHI, die farblich abgesetzt sind. Die Bootstrapwerte geben an, wie oft diese Gruppierung bei 100 Durchläufen auftrat. Die verwendeten Sequenzen und ihre zugehörigen Genbank-Nummern sind: *G. max* CHI2 (AAT94360), *A. thaliana* CHI2 (AAA32766), *C. sinensis* CHI2 (AAZ17563), *V. vinifera* CHI (P51117), *V. hybrida* CHI2 (BAE72880), *N. tabacum* CHI2 (BAE48085), *O. sativa* CHI2 (AAM13448), *E. grandiflorum* CHI2 (BAD34458), *S. medusa* CHI2 (AAM48130), *G. max* CHI1B2 (AAT94364), *P. sativum* CHI1 (AAA50174), *M. sativa* CHI1 (AAB41524), *P. vulgaris* CHI1 (P14298), *P. montana* var. *lobata* CHI1 (BAA09795), *G. max* CHI1A (AAT94358), *A. thaliana* 4 Chalkon-Flavanon-Isomerase Familie-Protein (NP_568154), *H. lupulus* CHI2, *G. max* CHI4B (AAT94363), *G. max* Putative CHI4A (AAT94362), *P. tremuloides* 3 (BU814723), *A. thaliana* 3A Putative CHI (AAM61303), *G. max* Putative CHI3 (AY595416), *M. truncatula* 3 Konserviertes Hypothetisches Protein (ABE80234), *A. thaliana* 3B Hypothetisches Protein (AAO86844), *O. sativa* 3 Os07g0571600 (NP_001060052), *A. thaliana* 3C Unbekanntes Protein (NP_567140), *C. sinensis* 3 CHI (ABI33225), *L. esculentum* 3 Putative CHI (AAQ55182), *H. lupulus* CHI1B, *H. lupulus* CHI1A.

3.6.3 Genexpressionsmuster der HICHIs in *H. lupulus*

Die Transkriptmenge der drei putativen CHIs in den verschiedenen Hopfengeweben wurde ebenfalls analysiert. Dabei wurde methodisch wie bei der Expressionsanalyse der HIOMTs beschrieben (2.2.12 und 3.3.4) verfahren. Die Abbildungen verdeutlichen (Abb. 3.42), dass die Transkriptmengen der HICHIs während der Zapfenentwicklung alle nach einem ähnlichen Schema variieren. Vom Blütenstadium bis zum Stadium der mittelgroßen Zapfen steigen sie an und fallen bei reifen Zapfen wieder ab. Die Expression ist in reinem Trichomzellgewebe jeweils am höchsten. Vergleichsweise sehr niedrige Transkriptmengen sind in reifen Blättern detektiert worden. Ebenfalls relativ geringe Mengen an Transkripten wurden in männlichen Blüten, Wurzeln und Stängeln nachgewiesen.

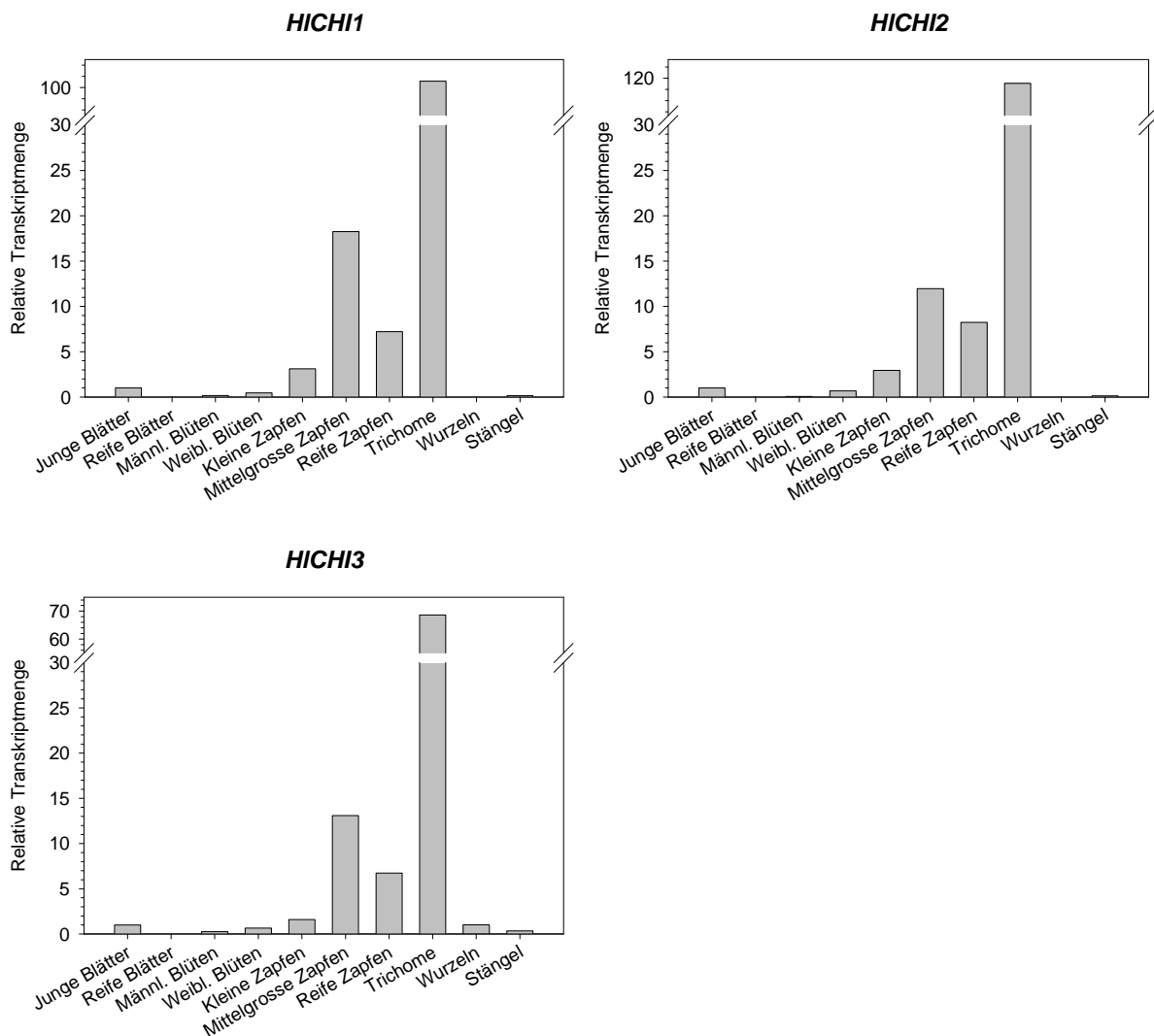


Abbildung 3.42 Relative Transkriptakkumulation der HICHI1, HICHI2 und HICHI3 in verschiedenen Hopfengeweben. Gemessene Ct-Werte eines Gewebes wurden relativ zu denen von GAPDH im entsprechenden Gewebe normalisiert ($=\Delta\text{Ct}$ -Werte). Zur Vergleichbarkeit der relativen Transkriptmengen in verschiedenen Geweben wurden die ΔCt -Werte zu denen in einem Kontrollgewebe (junge Blätter) in Beziehung gesetzt ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$).

3.6.4 Heterologe Expression der HICHIs

Die kodierenden Sequenzen der HICHIs wurden wie beschrieben (2.2.14.3) in den Expressionsvektor pHis8-GW kloniert und in kompetente *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL transformiert. Als Positivkontrolle für die nachfolgenden Enzymtests wurde die cDNA einer Typ I-CHI, die von *A. thaliana* CHI 2 (AAA32766), kloniert und in *E. coli* exprimiert. Das Mitführen einer *E. coli*-Expressionskultur, in deren Zellen der leere Vektor pHis8-GW transformiert worden war, diente als Negativkontrolle der Expression. Die Expression erfolgte in Volumina bis zu 100 ml Kulturmedium durch Animpfen mit Starterkulturen (2.2.14.4). Die Expressionskulturen wurden bei einer $OD_{600} = 1$ mit 0,2 mM IPTG induziert und über Nacht bei 20°C inkubiert. In Vorversuchen hatten sich diese Kulturbedingungen als optimal zur Gewinnung eines möglichst großen Anteils löslichen, rekombinanten Proteins erwiesen. Alle vier Proteine konnten auf diese Weise in löslicher Form in relativ großen Mengen in *E. coli* synthetisiert werden, wie am Beispiel der HICHI3 in Abb. 3.43 dargestellt wird. Eine Auftrennung der löslichen Fraktion der *E. coli*-Rohextrakte durch Polyacrylamidgelelektrophorese ergab für die HICHIs Banden von 27 kDa und für die CHI2 aus *A. thaliana* von 30 kDa. Dies entspricht den errechneten Größen der translatierten Proteine, die sich nach Klonierung der Leserahmen in den Expressionsvektor pHis8-GW ergeben (HICHI1 27,3 kDa, HICHI2 27,5 kDa, HICHI3 27,5 kDa und *A. thaliana*-CHI2 30,6 kDa).

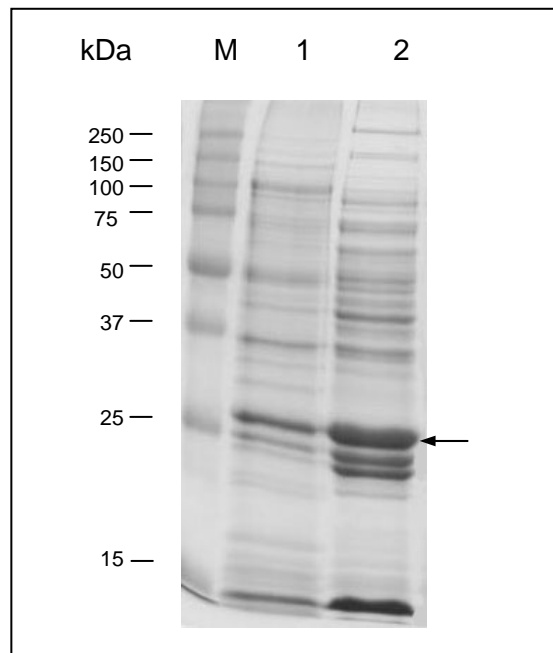


Abbildung. 3.43 SDS-Page der HICHI3-*E.coli*-Expressionskultur. Das 12%ige Gel wurde mit Coomassie-Lösung gefärbt. M: Molekulargewichtsmarker, Spur 1: unlöslicher Rückstand der aufgeschlossenen Expressionskulturen; Spur 2: löslicher Proteinrohextrakt der aufgeschlossenen Zellkulturen. Der Pfeil kennzeichnet die lösliche rekombinante HICHI3.

3.6.5 Test der HICHIs auf CHI-Aktivität

Mittels eines Enzym-Aktivitätstests sollte überprüft werden, ob die drei putativen HICHIs katalytisch aktiv sind. Zur Sicherung der Testbedingungen wurde die CHI2 aus *A. thaliana* als Positivkontrolle eingesetzt. Der Test wurde unter Zusatz von Kaliumcyanat (40 mM) zur Inhibierung der Oxidation von Chalkonen durch kontaminierende Peroxidasen durchgeführt (Bednar und Hadcock, 1988) (2.2.18.2). Der Reaktionsverlauf wurde durch Messen der Absorptionsmaxima des Substrats und des möglichen Produkts mittels eines Ultrospec 3100 *pro* (GE Healthcare) dokumentiert. Die Absorptionsmaxima von Chalkonaringenin und Naringenin unter den herrschenden Testbedingungen wurden bei 392 nm bzw. 324 nm ermittelt, wie aus Abb. 3.44 hervorgeht.

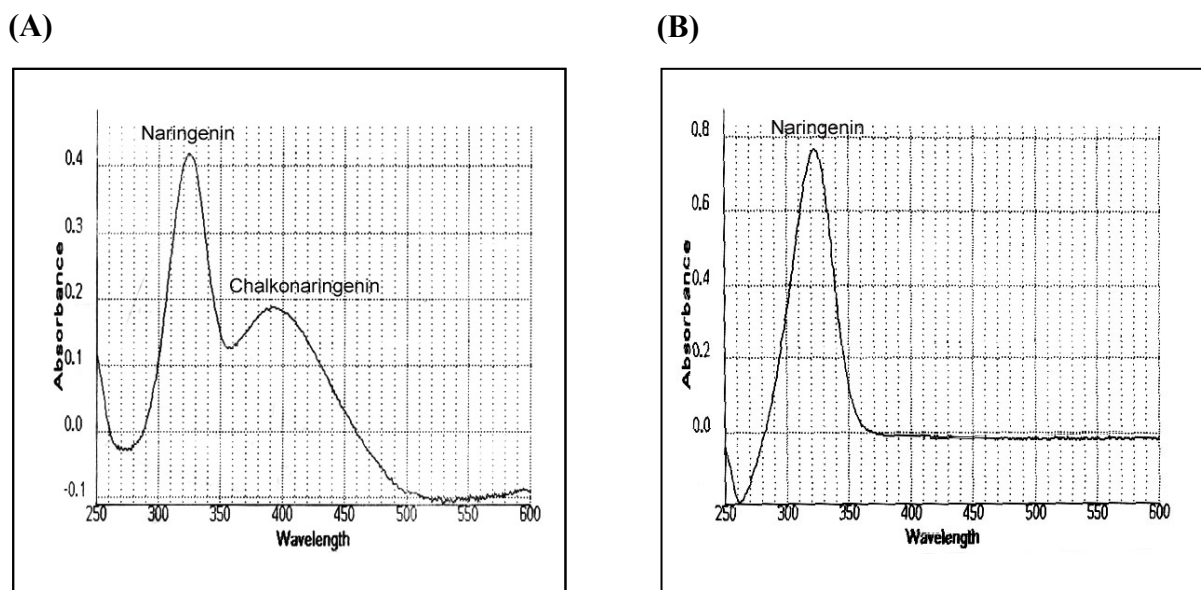
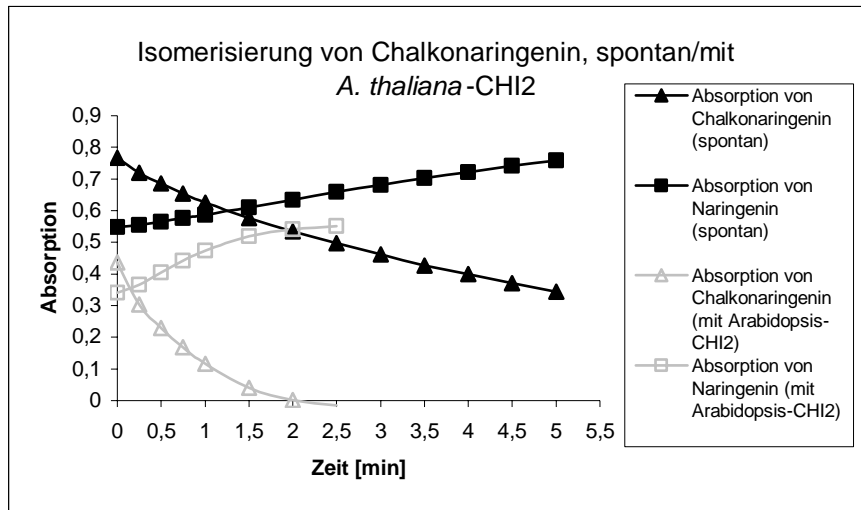


Abbildung 3.44 Absorptionsspektren von 250–600 nm **(A)** von Chalkonaringenin, welches teilweise zu Naringenin isomerisiert ist und **(B)** von Naringenin. Das Absorptionsmaximum von Chalkonaringenin liegt bei 392 nm und das von Naringenin bei 324 nm.

Im Enzymtest wurden Proteinrohextrakte der *E. coli*-Expressionskulturen eingesetzt. Ein 100 μ l-Ansatz enthielt jeweils 0,065 μ g Proteinrohextrakt. Das Substrat wurde in einer Endkonzentration von 40 μ M zu Beginn der Messung zugesetzt und die Absorptionsmaxima über einen Zeitraum von mindestens 5 min dokumentiert (in Abständen von jeweils 15 sec (bis 1 min Gesamtmesszeit) bzw. 30 sec (bis 5 min Gesamtmesszeit)). Außerdem wurde die bei diesem pH-Wert spontan ablaufende Isomerisierung des Substrats Chalkonaringenin ohne Zugabe von Protein dokumentiert, sowie unter Zugabe einer rekombinanten OMT als Protein-Negativkontrolle. Wie aus Abb. 3.45 ersichtlich ist, war nach einer Messzeit von 2 min das gesamte Chalkonaringenin durch die CHI2 aus *A. thaliana* in Naringenin überführt worden. Das Absorptionsmaximum von Chalkonaringenin hatte durch die spontan ablaufende Isomerisierung im gleichen Zeitraum um 30% abgenommen. Im Enzymtest, der mit HICHI1-Protein-Rohextrakt durchgeführt wurde, ist im Vergleich zur spontan ablaufenden Isomerisierung von Chalkonaringenin eine vergleichbare Abnahme des Absorptionsmaximums von Chalkonaringenin bzw. Zunahme des Absorptionsmaximums von Naringenin zu erkennen. Daraus ist zu schließen, dass die HICHI1 die Umsetzung von Chalkonaringenin zu Naringenin nicht katalysiert. Auch der Einsatz von HICHI2- sowie HICHI3-Proteinrohextrakt im Enzymtest beschleunigte den Isomerisierungsverlauf von Chalkonaringenin nicht. Der Einsatz größerer Proteinrohextraktmengen der HICHIs (32,3 μ g) änderte das Ergebnis nicht, während diese Mengen von Protein-Rohextrakt der *A. thaliana*-

Expressionskultur die gesamte Substratmenge schon zum Zeitpunkt der ersten Messung umgesetzt hatte. Als weitere Substrate wurden Isoliquiritigenin, Desmethylxanthohumol (mit HICHI1), Butein und 2',4-Dihydroxychalkon getestet. Die HICHIs zeigten mit keinem dieser Substrate Aktivität.

(A)



(B)

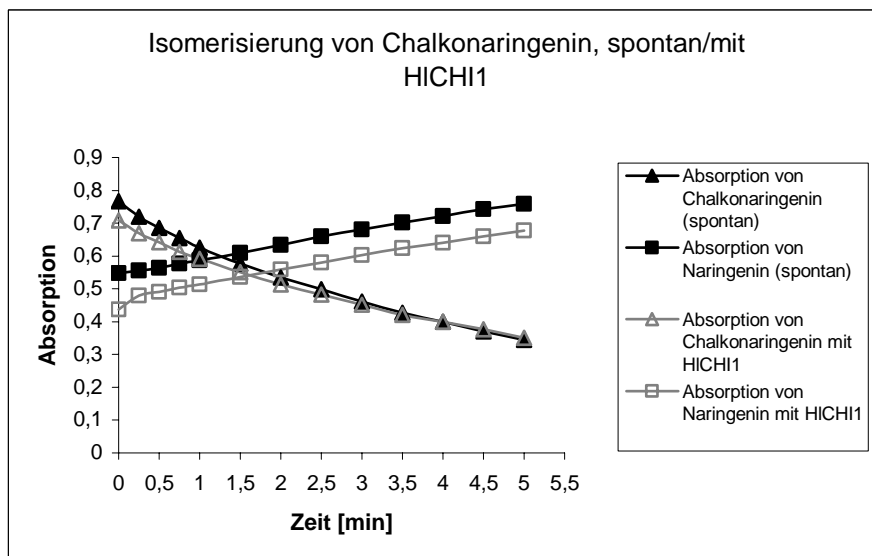


Abbildung 3.45 Verlauf der Absorptionsmaxima von Chalkonaringenin (bei 392 nm) und Naringenin (bei 324 nm) im Enzymtest. (A) Spontane Isomerisierung von Chalkonaringenin bzw. unter Zusatz von Proteinrohextrakt der *A. thaliana* CHI2-*E. coli*-Expressionskultur. (B) Spontane Isomerisierung von Chalkonaringenin bzw. unter Zusatz von Proteinrohextrakt der HICHI1-*E. coli*-Expressionskultur.

4 Diskussion

4.1 Transkriptomanalyse von Hopfen-Trichomzellen

H. lupulus besitzt glanduläre Trichome auf allen oberirdischen Pflanzenteilen mit besonders hoher Dichte auf den weiblichen Zapfen. Die im Rahmen dieser Arbeit ausgeführte Quantifizierung von Xanthohumol in verschiedenen Geweben der Hopfenpflanze hat gezeigt, dass seine Konzentration mit der Entwicklung der weiblichen Zapfen ansteigt und reife Zapfen das meiste Xanthohumol enthalten. Xanthohumol reichert sich in den darauf befindlichen Trichomen an, denn maximale Gehalte wurden in den isolierten Trichomen gemessen. Dafür spricht auch die bedeutende Reduktion des Xanthohumolgehaltes nach der Entfernung der Trichome von den Blättern.

Um den Sekundärstoffwechsel innerhalb der glandulären Trichome von *H. lupulus* zu untersuchen und Gene aus dem Biosyntheseweg des Xanthohumol zu identifizieren, wurde in dieser Arbeit eine cDNA-Bibliothek von aus glandulären Trichomen isolierter RNA hergestellt. Die Trichome wurden von reifen Hopfenzapfen mittels einer einfachen Methode isoliert. Die Blättchen der Hopfenzapfen wurden von der Mittelachse abgezupft und in flüssigem Stickstoff gefroren. Durch Rühren lösten sich die Trichome vom Pflanzenmaterial und konnten durch Absieben vom übrigen Gewebe getrennt werden. Dies resultierte in fast reinem Trichomgewebe, das so gut wie keine Verunreinigungen von Zapfenblattmaterial enthielt.

Die Isolierung qualitativ hochwertiger RNA aus diesem Trichommateriale erwies sich vorerst aufgrund anderer mitisolierter Substanzen als schwierig und machte eine Verbesserung des Isolierungsprotokolls notwendig. Es wurden der RNase-Inhibitor Aurintricarboxylsäure und der Phenoxidase-Inhibitor Thioharnstoff zum Isolierungspuffer hinzugesetzt. Außerdem wurde Polyvinylpolypyrrolidon zugegeben, welches freigesetzte Phenole binden kann. Die Einführung eines zusätzlichen Polysaccharid-Fällungsschrittes unter Zugabe von Kaliumacetat und Ethanol (Lopez-Gomez und Gomez-Lim, 1992) reduzierte die Viskosität der RNA-Lösung und lieferte RNA guter Qualität.

Der Vergleich der resultierenden Sequenzen mit der nr-Datenbank ergab, dass die 145 ESTs des größten Clusters Ähnlichkeit zu einem MtN19-ähnlichen Protein aus *P. sativum* aufweisen (Ähnlichkeit 57%). MtN19 (*M. truncatula* Nodulin 19) ist ein Gen unbekannter Funktion, welches zuerst aus *M. truncatula* beschrieben wurde. Dort wird es während der Symbiose mit *Rhizobium*-Bakterien in einem frühen Stadium der Wurzelknöllchenbildung verstärkt exprimiert (Gamas et al., 1996). In *P. sativum*-Früchten wird die Expression des Gens mit Ähnlichkeit zu MtN19 durch die Behandlung mit Bruchin B, einem Insektenelicitor,

der lokal Zellteilungen und Kallusbildung verursacht, stark erhöht (Doss, 2005). Zu MtN19 homologe Sequenzen sind von weiteren Vertretern der Mono- und Dikotyledonen und einem Moos in den Datenbanken vorhanden. Die Expression dieser Gene scheint auch hier von Stressfaktoren beeinflusst zu werden und wird durch Licht- und Trockenstress, Behandlung mit Stickoxiden oder Seneszenzvorgänge erhöht. Unter den zwanzig häufigsten ESTs einer Trichom-cDNA-Bank von *M. sativa* L. befanden sich vier, die eine potentielle Funktion bei der Reaktion auf biotische oder abiotische Stressfaktoren hatten (Aziz et al., 2005). Von den Autoren wurde die exponierte Position der Trichome auf der Pflanzenoberfläche als Hintergrund für die hohe Expression von Genen, die in die Stressbewältigung involviert sind, diskutiert. Ein Gen mit Ähnlichkeit zu MtN19 befand sich zudem unter den zwanzig Genen mit dem höchsten differentiellen Transkriptlevel in *M. sativa*-Stängeln mit und ohne Trichome, das durch Microarray-Analyse bestimmt worden war (Aziz et al., 2005).

Transkripte mit Ähnlichkeit zu Methallothioneinen waren mit 55 ESTs ebenfalls zahlreich in der Hopfen-cDNA-Bank vertreten. Metallothioneine sind kleine, cysteinreiche Proteine, die Schwermetallionen binden. In höheren Pflanzen kommen verschiedene Isoformen vor, die mehreren Genfamilien angehören (Guo et al., 2008). Sie scheinen eine Rolle bei der Metallhomöostase und Detoxifizierung zu spielen. So verleihen beispielsweise Metallothioneine der Klasse 1 *A. thaliana*-Pflanzen erhöhte Toleranz gegenüber Cadmium (Zimeri et al., 2005; Zhigang et al., 2006). Die einzelnen Metallothioneingene zeigen unterschiedliche Expressionsmuster und einige werden verstärkt in Trichomen der Blätter exprimiert, wie bei *A. thaliana* (Garcia-Hernandez et al., 1998) und *Vicia faba* (Foley und Singh, 1994) gezeigt wurde. Mögliche Funktionen der Metallothioneine im Zusammenhang mit der Rolle von Trichomen bei der Detoxifizierung überschüssiger sich darin anreichernder Metallionen, die auf diese Weise unschädlich aus der Pflanze entfernt werden, wurden diskutiert.

Eine physiologische Bedeutung von Trichomen bei Detoxifizierungsprozessen wurde für *A. thaliana*-Trichomzellen durch die Untersuchung der Glutathionbiosynthese aufgezeigt (Gutierrez-Alcala et al., 2000). Glutathion ist ein Tripeptid, welches mit toxischen Verbindungen und Xenobiotika mittels einer Glutathion-S-Transferase konjugiert und anschließend in die Vakuole überführt wird. In den *A. thaliana*-Trichomzellen werden die Enzyme der Glutathionbiosynthese stark exprimiert und die Konzentration an Glutathion ist gegenüber angrenzenden Zellen erhöht. Auch in den Hopfentrichomen wurde eine hohe Anzahl ESTs mit Ähnlichkeit zu Glutathiontransferasen detektiert (20 ESTs für Glutathiontransferasen und Peroxidasen).

Das EST-Set der Hopfentrichome zeigte, dass die Biosynthesewege zu den Terpenen und Terpenophenolen in den Trichomen aktiv sind und erwies sich als gute Quelle für Sequenzen, die für bekannte oder putative Enzyme aus diesen Biosynthesewegen kodieren. ESTs, korrespondierend zu allen Enzymen des MEP-Weges, ausgenommen einem, waren vertreten, wohingegen nur ein Transkript Ähnlichkeit zu einem Enzym aus dem Mevalonat-Biosyntheseweg zeigte. Dies deutet darauf hin, dass der MEP-Weg in Hopfen-Trichomen der vorherrschende Weg ist, der die Bausteine zur Synthese der Terpene und Terpenophenole liefert. Auch in den glandulären Trichomen von *M. piperita* und *O. basilicum* waren die Gene des MEP-Weges stark exprimiert (Lange et al., 2000; Gang et al., 2001).

Nur zwei ESTs mit Ähnlichkeit zu aromatischen Prenyltransferasen waren im EST-Set vorhanden. Algorithmen zur Erkennung integraler Membranproteine haben transmembranöse Regionen für die translatierte Sequenz vorhergesagt (<http://www.expasy.ch/tools>). Bei den meisten der bisher charakterisierten aromatischen Prenyltransferasen handelt es sich um membrangebundene Proteine. Prenyltransferase-Enzymaktivitäten wurden jedoch in der löslichen Fraktion von Proteinextrakten aus Blüten und Zapfen von *H. lupulus* gemessen (Zuurbier et al., 1998).

Viele Transkripte der *chs2* und eines der *chs4* waren im EST-Set vorhanden. Es bleibt eine interessante Aufgabe ihre Funktion im Hopfen-Sekundärstoffwechsel zu entschlüsseln.

Nur wenige Transkripte, die für putative Enzyme aus der Flavonol-Biosynthese kodieren, wurden identifiziert. Der Flavonol-Biosyntheseweg ist in Blättern und Zapfen aktiv, wie durch ihren Gehalt an Flavonolen gezeigt wurde (Sägesser und Deinzer, 1996). Da die aus Hopfenzapfen isolierten Flavonole nicht in Trichommaterial nachgewiesen wurden, kann man annehmen, dass die ESTs für eine Flavanon-3-beta-Hydroxylase und eine Flavonoid-3'-Hydroxylase aus Spuren von Zapfengewebe in den isolierten Trichomen stammen.

Das hier erstellte EST-Set gewährt Einblick in die metabolische Spezialisierung von glandulären Trichomen. Es ergänzt die genomischen Ressourcen von *H. lupulus* und steht zur Bearbeitung weiterer Fragestellungen zur Verfügung.

4.2 OMTs aus *H. lupulus*

Die in der EST-Kollektion identifizierten Transkripte mit Sequenzähnlichkeit zu OMTs lieferten die Basis zur Identifizierung der OMT aus dem Biosyntheseweg des Xanthohumol. Die Untersuchung der Genexpression der Hopfen-OMTs hatte gezeigt, dass HIOMT1, HIOMT2, HIOMT3 und HIOMT4 vorrangig in den Trichomen exprimiert werden. Auch der Vergleich des Transkriptlevels in jungen und ausgewachsenen Blättern unterstützt diese

Aussage. In jungen Blättern werden die OMTs stärker exprimiert, was mit der Abnahme der Trichomdichte in älteren Blättern aufgrund der Ausdehnung der Blattspreite während des Wachstums erklärt werden kann. Die hauptsächliche Expression der vier Hopfen-OMTs in den Trichomen korreliert mit der Anreicherung von Xanthohumol in den Trichomen. Besonders die HIOMT1, HIOMT2 und die HIOMT3 stellen aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu anderen Flavonoid-OMTs gute Kandidaten für die OMT aus dem Xanthohumol-Biosyntheseweg dar und davon insbesondere die HIOMT1 als am stärksten exprimierte OMT in reifen Trichomzellen.

4.2.1 Heterologe Expression im prokaryontischen und eukaryontischen System

Pflanzliche OMTs gelten als lösliche Proteine und es existieren zahlreiche Arbeiten, in denen OMTs erfolgreich in *E. coli* exprimiert und als funktionelle Proteine gewonnen wurden. Aufgrund dieser Erfahrungen und der Vorteile, die ein prokaryontisches Expressionssystem bietet, wurden die sechs cDNAs aus *H. lupulus* zunächst in *E. coli* exprimiert. Jedoch konnten nur die HIOMT3 und die HIOMT5 in löslicher Form gewonnen werden, die anderen vier OMTs aus *H. lupulus* lagen komplett in Form von Einschlusskörperchen vor. Hilfreich bei der Expression mancher Proteine kann die Fusion mit einem *E. coli*-eigenen Protein sein. Beispielsweise können Proteine, die aufgrund ihrer biophysikalischen Eigenschaften schwierig in *E. coli* exprimierbar sind, durch Kopplung an NusA effektiv in löslicher und stabiler Form gewonnen werden (De Marco et al., 2004). Doch auch der Wechsel des Expressionsvektors und die Expression der vier unlöslichen OMTs in Fusion mit dem *E. coli*-Protein NusA führten zur Bildung von Proteinaggregaten. Eine Ursache für die Bildung von Einschlusskörperchen könnte in der hohen Expressionsrate liegen, mit der die OMTs in *E. coli* exprimiert wurden. Die Bildung von Einschlusskörperchen wird als das Ergebnis einer hohen Translationsrate angesehen, die die Kapazitäten der Zelle, die neu gebildeten Proteine korrekt zu falten, überschreitet (Kiefhaber et al., 1991; Ghosh et al., 2004). Deshalb wurde versucht, durch geeignete Maßnahmen die Proteinexpressionsrate zu vermindern. Doch auch die Kultivierung der Expressionskulturen bei geringeren Temperaturen oder die Induktion mit geringeren IPTG-Konzentrationen führten nicht zu löslichem Protein. Möglich ist auch, dass Chaperone hier eine Rolle spielen, denn sie haben eine Funktion bei der korrekten Faltung von Proteinen, der Bildung von Aggregaten und der Rückfaltung von Proteinen aus Aggregaten (Villaverde und Carrio, 2003). Unter den Bedingungen der Proteinüberexpression in der Zelle könnten Chaperone den limitierenden Faktor zur korrekten Faltung großer Mengen von Proteinen darstellen. Die Zugabe des Dipeptids Glycylglycin zur

Expressionskultur hat zur Verbesserung der löslichen Expression von Proteinen geführt. Es wurde angeführt, dass dadurch der osmotische Stress in der Zelle erhöht wird und dies die Expression von Hitzeschockproteinen mit chaperon-ähnlicher Aktivität zur Folge haben könnte oder aber Glycylglycin direkt als Chaperon wirken könnte (Ghosh et al., 2004). Doch auch die Zugabe von Glycylglycin zu den *E. coli*-Expressionskulturen führte nicht zur Expression der Hopfen-OMTs in löslicher Form.

In der Literatur wird gelegentlich davon berichtet, dass es pflanzliche OMTs gibt, die nicht funktionell in *E. coli* exprimiert werden konnten (Schroder et al., 2004; Deavours et al., 2006). Wie häufig dies jedoch vorkommt, ist schwer abschätzbar. Einige pflanzliche OMTs wurden erfolgreich mittels des Baculovirus Expressionssystems in Insektenzellkulturen exprimiert, es wurde jedoch nicht erwähnt, ob vorher eine heterologe Expression in *E. coli* versucht worden war (Frick und Kutchan, 1999; Ounaroon et al., 2003). Erst die Expression der *H. lupulus*-cDNAs in diesem eukaryontischen Expressionssystem, den Sf9-Insektenzellen, lieferte auch diese Proteine in löslicher Form. Jedoch wiesen die gereinigten HIOMT1 und HIOMT2 eine große Instabilität auf. Alle Reinigungsschritte mussten möglichst schnell hintereinander ausgeführt werden. Eine zu starke Verdünnung der Lösungen musste vermieden werden, da dies zur schnellen Inaktivierung beider Enzyme führte. Nur die Konzentrierung bis auf hohe Proteinkonzentrationen und die Lagerung in fast 50% Glycerol bei -20 °C stabilisierte die Enzyme für mehrere Wochen (HIOMT1) bis Monate (HIOMT2).

4.2.2 Charakterisierung der HIOMT1 und HIOMT2

HIOMT1 und HIOMT2 zeigen hinsichtlich ihrer biochemischen Charakteristika Gemeinsamkeiten als auch Unterschiede. Die Molekulargewichtsbestimmung der Monomere mittels MALDI-TOF-MS ergab 42,7 kDa für die HIOMT1 und 43,1 kDa für die HIOMT2. Mittels Gelfiltration wurde ermittelt, dass beide OMTs Homodimere bilden. Die in den Lösungen der gereinigten Proteine detektierten höhermolekularen Aggregate sind wahrscheinlich Artefakte, die sich aufgrund der hohen Proteinkonzentrationen gebildet haben. Von pflanzlichen OMTs ist nicht bekannt, dass sie Tetramere oder höhermolekulare Aggregate bilden. Alle bisher röntgenkristallographisch untersuchten Proteine bilden Homodimere, wie die Chalkon- und die Isoflavon-OMTs (Zubieta et al., 2001), die Kaffeesäure/5-Hydroxyferulasäure-3/5-OMT (Zubieta et al., 2002) und die KaffeoylCoA-3-OMT aus *M. sativa* (Ferrer et al., 2005), die Salizylsäure-Karboxyl-MT aus *C. breweri* (Zubieta et al., 2003) und die Hydroxyisoflavanon-4'-OMT (Liu et al., 2006) aus *M. truncatula*.

Die HIOMT1 und die HIOMT2 unterscheiden sich hinsichtlich des Temperaturbereichs, in dem sie aktiv sind. Während die HIOMT1 über einen breiten Bereich von 30 bis 37°C maximale Aktivität zeigt, erreicht die HIOMT2 erst maximale Werte bei Temperaturen über 35°C und hat ihr Optimum bei 39°C. Pflanzliche OMTs zeigen maximale Aktivität über einen weiten Temperaturbereich. Das Temperaturoptimum kann mit dem Substrat variieren und für rekombinante pflanzliche OMTs wurden schon Werte von 50°C ermittelt. (Frick und Kutchan, 1999; Ounaroon et al., 2003). Beide Hopfen-OMTs zeigen maximale Aktivität im alkalischen Bereich mit pH-Optima von 8,5 für HIOMT1 bzw. 9,0 für HIOMT2. Auch die aus *M. sativa* gereinigte Chalkon-OMT, die Isoliquiritigenin 2'-OMT, besitzt ein pH-Optimum von 9,0 bzw. 8,0 im pflanzlichen Rohextrakt (Maxwell et al., 1992) und die native Licodion-OMT aus *G. echinata*, die in die Biosynthese des Retrochalkons Echinatin involviert scheint, besitzt *in vitro* ein pH-Optimum von 8,0 (Ayabe et al., 1980). Klasse I OMTs benötigen Mg^{2+} -Ionen für ihre Aktivität. Für einen Vertreter der Klasse I-OMTs wurde auch eine Änderung der Substratspezifität mit dem im Enzymtest vorhandenen Metallionenkofaktor beschrieben (Lukacin et al., 2004). Vertreter der Klasse II-OMTs zeigen keine Abhängigkeit von Metallionen und erwartungsgemäß wurde die Aktivität beider OMTs aus *H. lupulus* nicht durch Zugabe zweiwertiger Kationen erhöht. Die Aktivität der HIOMT2 wurde vergleichsweise schon bei geringeren Ionenkonzentrationen gehemmt als die der HIOMT1, wobei besonders Cu^{2+} und Zn^{2+} wie bei der HIOMT1 inhibierend wirkten, aber auch Fe^{2+} - und Co^{2+} -Ionen. Auch die Isoliquiritigenin 2'-OMT und die Licodion-OMT wurden durch diese Metallionen gehemmt. Die Aktivität der Isoliquiritigenin 2'-OMT wurde um >50% durch Cu^{2+} -, Zn^{2+} -, Fe^{2+} - und Co^{2+} -Ionen in jeweils 1 mM Konzentration reduziert und die der Licodion-OMT durch Cu^{2+} - und Zn^{2+} -Ionen in 0,4 mM Konzentration (keine Angaben über Proteinmolaritäten) auf 20 bzw. 70% der maximalen Aktivität (Ayabe et al., 1980; Maxwell et al., 1992). Auch andere pflanzliche OMTs zeigen reduzierte Aktivität nach Zugabe von Metallionen, wobei sie besonders stark durch Cu^{2+} -Ionen gehemmt wurden (Hermann et al., 2004; Burga et al., 2005).

4.2.3 Substratspezifität der HIOMTs

Um die Substratspezifitäten der Hopfen-OMTs zu ermitteln, wurden sie mit 34 (HIOMT1) bzw. 36 (HIOMT2) verschiedenen Substraten unterschiedlicher Substanzklassen im Enzymassay getestet. HIOMT1 zeigt große Substratspezifität und setzt Desmethylxanthohumol und Xanthogalenol um. Xanthogalenol ist ein prenyliertes Chalkon, welches in Hopfensorten, die Erbgut nordamerikanischer Wildpflanzen enthalten, vorkommt

(Stevens et al., 2000) und nicht in der hier verwendeten Hopfensorte ‚Taurus‘ nachgewiesen wurde. HIOMT2 war hinsichtlich des Substrats weniger selektiv und zeigte im wesentlichen Aktivität mit 13 der getesteten Substrate. Die verschiedenen Vertreter der Klasse II-OMTs methylieren eine Vielfalt an Substraten aus unterschiedlichen Substanzklassen. Oft liegt der Fall vor, dass ein Enzym mehrere Substrate mit ähnlichen Strukturen und Substitutionsmustern am Grundgerüst akzeptiert. Beispielsweise methyliert die 4'-OMT aus *C. roseus* Flavonoide, die die B-Ring Konfiguration von Homoeriodictyol und ein bestimmtes Substitutionsmuster im A-Ring aufweisen (Schroder et al., 2004). Fünf aus *M. piperita* isolierte OMTs können Verbindungen aus verschiedenen Flavonoidgruppen methylieren. Sie zeichnen sich aber durch eine große Regioselektivität aus und methylieren nur jeweils die Hydroxylgruppen einer bestimmten Position (Willits et al., 2004). Beispiele für OMTs, die Substrate verschiedener Substanzklassen methylieren, sind die in die Ligninbiosynthese involvierte OMT aus *Pinus taeda*, welche neben Hydroxyzimtsäuren auch deren CoA-Ester methyliert (Li et al., 1997), zwei OMTs aus *Chrysosplenium americanum*, die Flavonoide und Phenylpropanoide als Substrate annehmen (Gauthier et al., 1998), alkaloidmethylierende OMTs, die auch Aktivität mit Phenylpropanoiden zeigen (Frick und Kutchan, 1999) und eine OMT aus *Pinus sylvestris*, die Aktivität mit Stilbenen, Phenylpropanoiden, Flavonoiden und weiteren niedermolekularen Verbindungen zeigt (Chiron et al., 2000).

Die Bestimmung der kinetischen Konstanten ergab eine mittlere Affinität der HIOMT1 für Desmethylxanthohumol ($K_m = 18 \mu\text{M}$) und eine geringe Affinität für SAM ($K_m = 286 \mu\text{M}$). Die Isoflavon-OMT aus *M. sativa* besitzt eine ähnliche Affinität für das phenolische Substrat Daidzein ($K_m = 20 \mu\text{M}$) und eine rund zweifach höhere Affinität für den Methylgruppendonor SAM ($K_m = 150 \mu\text{M}$). Von den Autoren wurde eine Regulation des Enzyms durch die Verfügbarkeit des Isoflavonsubstrats postuliert (Edwards und Dixon, 1991; Maxwell et al., 1992). Auch die HIOMT1 könnte durch die Menge an verfügbarem Desmethylxanthohumol im zellulären Kompartiment in dem sie aktiv ist, reguliert werden. Die K_m -Werte der HIOMT2 für Desmethylxanthohumol, Resveratrol, Xanthohumol und SAM liegen etwa im gleichen Größenbereich. Stellt eines dieser Chalkone bzw. das Stilben das endogene Substrat der HIOMT2 dar, dann wird ihre Aktivität nicht auf die für die HIOMT1 vorgeschlagene Weise reguliert werden. Die katalytische Effizienz mit der die HIOMT1 Desmethylxanthohumol methyliert, ist verglichen mit der der HIOMT2 gering. Die Identifizierung der Methylierungsprodukte hat jedoch gezeigt, dass in der HIOMT2 katalysierten Reaktion kein Xanthohumol gebildet wird, sondern Desmethylxanthohumol an der 4-Hydroxylgruppe des B-Ringes methyliert wird. Xanthohumol ist aber das sich

mengenmäßig am stärksten anreichernde Chalkon in den Trichomen von *H. lupulus*. Die Ursachen für die geringe katalytische Effizienz der HIOMT1 mit Desmethylxanthohumol sind nicht eindeutig zu benennen. Es könnten verschiedene Faktoren dazu beitragen. Ein solcher wäre der schnelle Aktivitätsverlust des Enzyms nach der Reinigung aus den Insektenzellen. Auch die *in vitro*-Bedingungen des Enzymtests, die verschieden von den Bedingungen im entsprechenden Kompartiment in der Pflanzenzelle sind, könnten sich negativ auf die Methylierungseffizienz auswirken. Auch von anderen heterolog exprimierten Enzymen wurde berichtet, dass sie ihr putatives endogenes Substrat *in vitro* mit nur geringer Effizienz umsetzen. Es wurde kalkuliert, dass mit der Menge an Methylketonsynthase 1 in den glandulären Trichomen von *L. hirsutum*-Blättern und dem *in vitro* ermittelten V_{\max} nur 1 % der tatsächlich in der Pflanze synthetisierten Methylketone gebildet werden könnte (Fridman et al., 2005). Auch von anderen Enzymen der Fettsäurebiosynthese und einigen Polyketidsynthasen sind geringe *in vitro*-Werte für V_{\max} gemessen worden, welche die Biosyntheseraten der Fettsäuren und Polyketide im jeweiligen Organismus nicht erklären konnten. Die Ursachen dafür blieben unbestimmt oder wurden mit dem Fehlen von Komponenten eines Multienzymkomplexes begründet (Roughan und Ohlrogge, 1996). Ein Enzym als Teil eines solchen Komplexes könnte zu veränderten kinetischen Parametern führen (Roughan, 1997; Fridman et al., 2005). Die Ergebnisse zahlreicher Untersuchungen deuten auf die Organisation von bestimmten Enzymen des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels in Multienzymkomplexen oder Metabolons hin. Beispiele sind hier der Phenylpropanoid- und der Flavonoidstoffwechsel (Burbulis und Winkel-Shirley, 1999; Saslowsky und Winkel-Shirley, 2001; Winkel, 2004). Metabolonformierung bietet den Vorteil des „metabolic channeling“, was bedeutet, dass Zwischenprodukte gezielt vom aktiven Zentrum des einen Enzyms zum aktiven Zentrum des nächsten weitergeleitet werden. Dies ermöglicht die schnelle Umwandlung von toxischen oder labilen Substanzen. Für die Existenz eines Multienzymkomplexes bei der Biosynthese der Sekundärmetabolite in den Trichomen von *H. lupulus* gibt es bisher keine Anhaltspunkte. Es wäre aber denkbar, dass die instabilen Chalkone (insbesondere Desmethylchalkonaringenin und Chalkonaringenin) mittels Multienzymkomplex und „metabolic channeling“ effektiv in stabilere Verbindungen (z.B. Xanthohumol) überführt werden und die Isomerisierung in die korrespondierenden Flavanone nicht stattfinden. Auch die Verfügbarkeit von Substraten, um die verschiedene Biosynthesewege konkurrieren, könnte so kontrolliert und reguliert werden, wie beispielsweise die von DMAPP, das sowohl Baustein für die Synthese von Xanthohumol als auch für die Synthese der Bittersäuren ist. Neben stabilen Komplexen, wie sie vor allem von

Enzymen des Primärstoffwechsels gebildet werden, gibt es Hinweise auf dynamische Komplexe, die sich mittels schwacher Interaktionen zwischen den Partnern formen und wieder dissoziieren können, je nach Bedarf und metabolischem Status der Zelle. Eine solche schwache Protein-Protein Interaktion konnte zwischen einer Isoform der Phenylalaninammonium-Lyase und der Cinnamat-4-Hydroxylase, zwei Enzymen des Phenylpropanoid-Biosyntheseweges, die aufeinander folgende Reaktionen katalysieren, mittels Fluoreszenz-Energie-Resonanz-Transfer demonstriert werden (Achnine et al., 2004). Auch für die Synthese der polymethylierten Flavonolglukoside in *C. americanum* wurde ein Modell eines Multienzymsystems, das durch nicht kovalente Kräfte gebildet wird, propagiert (Ibrahim et al., 1987). Es ist also vorstellbar, dass die HIOMT1 als lösliches Enzym zeitweilig mit anderen Enzymen des Xanthohumol-Biosyntheseweges assoziiert. Um diese Hypothese zu untermauern oder sie zu widerlegen, wären weitere Untersuchungen zur Kompartimentierung dieses Biosyntheseweges nötig. Entkräftet wurde kürzlich die Hypothese, dass die Isoflavon-7-OMT aus *M. sativa* aufgrund von „metabolic channeling“ in der Pflanze in ihrer Regiospezifität beeinflusst wird. Aufgrund von indirekten Hinweisen war postuliert worden, dass das Enzym in der Pflanzenzelle in die Synthese von 4'-methylierten Isoflavonoiden involviert ist, anstatt wie im *in vitro*-Enzymtest die 7-Hydroxylgruppe zu methylieren. Überexprimierung der Isoflavon-7-OMT in transgenen Pflanzen hatte zur verstärkten Produktion von 4'-O-methylierten Isoflavonoiden nach Elizitierung geführt und mit GFP markierte Isoflavon-7-OMT wurde am Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert. Daraufhin wurde eine Assoziation des Enzyms mit der membrangebundenen P450 Isoflavonsynthase postuliert (He und Dixon, 1996, 2000; Liu und Dixon, 2001). Die Klonierung einer Isoflavon-4'-OMT aus *G. echinata* und der Nachweis dazu homologer Enzyme in anderen Leguminosen bilden starke Gegenargumente zu der aufgestellten Hypothese (Akashi et al., 2003).

Andere Faktoren, die Einfluss auf die Stabilität der Chalkone ausüben könnten, sind das Zellkompartiment in dem sie synthetisiert werden und der darin als auch im subkutikulären Raum, in den sie sekretiert werden, herrschende pH-Wert.

Im Falle der HIOMT2 lassen die Ergebnisse nicht auf das endogene Substrat schließen. HIOMT2 methyliert die 4-Hydroxylgruppe von Xanthohumol und 4-O-Methylxanthohumol wird gebildet. 4-O-Methylxanthohumol ist keine neu beschriebene Verbindung. Es wurde als Stoffwechselprodukt von Ratten ausgeschieden, denen Xanthohumol gefüttert worden war (Nookandeh et al., 2004). Es ist jedoch noch nicht aus Hopfen isoliert worden, so wie auch keine anderen Chalkone mit 4-Methoxygruppe. Das beste in dieser Arbeit getestete *in vitro*-

Substrat für die HIOMT2 stellte Resveratrol dar. Resveratrol wurde aus Hopfenzapfen von *H. lupulus* ‚Taurus‘ isoliert (Callemien et al., 2005; Jerkovic et al., 2005; Jerkovic und Collin, 2007), dabei wurde aber nicht untersucht, ob es in den Trichomen oder im übrigen Zapfenmaterial vorkommt. Methylierte Resveratrolerivate sind hingegen noch nicht aus Hopfen bekannt und wurden auch nicht in transgenen Hopfenpflanzen, die große Mengen an Resveratrol in Blättern und Zapfen akkumulieren, identifiziert (Schwekendiek et al., 2007). In der EST-Kollektion war nur eine Sequenz für HIOMT2 vorhanden und man könnte annehmen, dass ihre Methylierungsprodukte nur in geringen Mengen in *H. lupulus* vorkommen. Die Präferenz der HIOMT2 Chalkone zu methylieren, die Effizienz mit der das Enzym die Methylierung von Desmethylxanthohumol und Xanthohumol katalysiert, sowie die Vielfalt an verschiedenen Chalkonverbindungen im Hopfen lassen vermuten, dass das Produkt der Methylierung der HIOMT2 ein Chalkon ist, das noch nicht aus Hopfen isoliert worden ist. Auch aus *C. roseus* wurde vor kurzem eine OMT kloniert, welche 3',4'-O-methylierte Flavonoide produziert, die nicht aus der Pflanze bekannt sind (Schroder et al., 2004). Intensive Untersuchungen des Metabolitenprofils stehen jedoch noch aus. Angesichts der großen Effizienz mit der die HIOMT2 die Methylierung von Resveratrol katalysiert, ist nicht auszuschließen, dass Resveratrol das endogene der HIOMT2 darstellt, diese Verbindung aber nicht in Hopfentrichomen vorkommt, weil der entsprechende Biosyntheseweg an einer oder mehreren Stellen blockiert ist. Eine OMT kann auch verschiedene endogene Substrate haben, wie dies erst kürzlich für eine OMT aus *Fragaria x ananassa* gezeigt wurde. Das Enzym zeigte eine breite *in vitro*-Substratspezifität. Transformierte *F. ananassa*-Pflanzen mit reduzierter Menge an OMT-Transkripten wiesen in den reifen Früchten einen stark erniedrigten Gehalt an 2,5-Dimethyl-4-methoxy-3(2*H*)-Furanon, einer Aromaverbindung, als auch an Feruloyl-1-*O*- β -D-Glukose auf. Dies demonstrierte die duale Funktion dieser OMT (Wein et al., 2002; Lunkenbein et al., 2006). Um die Funktion der HIOMT2 in *H. lupulus* genauer zu untersuchen, könnte man entsprechende Suppressionslinien herstellen. Zur Transformation von *H. lupulus* sind zwei verschiedene Protokolle beschrieben worden (Horlemann et al., 2003; Batista et al., 2008).

Da die HIOMT3 und die HIOMT4a/4b mit allen getesteten Substraten inaktiv waren, muss entweder davon ausgegangen werden, dass beide Enzyme spezifisch ein oder einige wenige Substrate methylieren, die hier nicht getestet worden sind oder aber, dass die rekombinanten Proteine nicht in funktioneller Form exprimiert worden waren. Somit können sie keinem Biosyntheseweg zugeordnet werden.

4.3 HIOMT1 katalysiert die Biosynthese von Xanthohumol

Die in dieser Arbeit klonierte und charakterisierte HIOMT1 methyliert die 6'-Hydroxylgruppe von Desmethylxanthohumol, wobei Xanthohumol gebildet wird (Abb. 4.1). Die Desmethylxanthohumol-6'-OMT ist nach der Isoliquiritigenin 2'-OMT aus *M. sativa* (Maxwell et al., 1993) die zweite klonierte pflanzliche Chalkon-OMT. Es wurde bereits vorher postuliert, dass in der Xanthohumol-Biosynthese die Prenylierungsreaktion vor der Methylierung stattfindet (Stevens und Page, 2004). Die Substratspezifität der Desmethylxanthohumol-6'-OMT stützt diese Hypothese und klärt damit die Abfolge der Reaktionen im Biosyntheseweg des Xanthohumol auf. Im Einklang mit diesem Ergebnis steht auch, dass Desmethylxanthohumol in *H. lupulus* vorkommt, wohingegen 6'-*O*-Methylchalkonaringenin (noch) nicht aus Hopfen isoliert wurde. Des Weiteren methylierte keine der hier getesteten OMTs Chalkonaringenin in der 6'-Position. Die HIOMT2 akzeptierte zwar Chalkonaringenin als Substrat, methylierte aber entsprechend der Umsetzung von Xanthohumol zu 4-*O*-Methylxanthohumol keines der Substrate an der äquivalenten 6'-OH-Gruppe. Daher kann davon ausgegangen werden, dass nach der Polyketidreaktion in der Chalkonaringenin gebildet wird, die Prenylierungsreaktion stattfindet und dabei Desmethylxanthohumol gebildet wird. Dieses dient dann als Substrat in der folgenden Methylierungsreaktion, die durch die HIOMT1 katalysiert wird und zur Bildung von Xanthohumol führt.

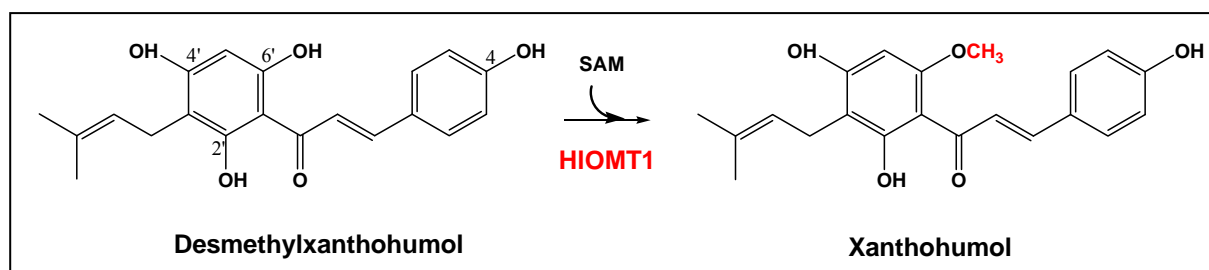


Abbildung 4.1 Die HIOMT1 katalysiert die Methylierung von Desmethylxanthohumol an der 6'-OH-Gruppe zu Xanthohumol.

Bei der Biosynthese der prenylierten Chalkone in den Trichomen von *H. lupulus* wird Chalkonaringenin als erstes Zwischenprodukt des Flavonoid-Biosyntheseweges nicht durch eine CHI zu Naringenin zyklisiert. Die Zyklisierung zu Naringenin und weitere Folgereaktionen, die zur Synthese von Verbindungen der verschiedenen Flavonoidgruppen führen, finden jedoch auch in *H. lupulus* statt, da Flavonole, deren Glykoside und Proanthocyanidine in den Blättern und im restlichen Zapfenmaterial vorkommen (McMurrough, 1981; Sägesser und Deinzer, 1996).

Die Methylierung von Desmethylxanthohumol hat Auswirkungen auf die Eigenschaften der Verbindung. Xanthohumol ist hydrophober und vergleichsweise stabiler als Desmethylxanthohumol. Durch die Methoxygruppe in der 6'-Position ist der Ringschluss und damit die Bildung des Flavanons in dieser Position nicht mehr möglich. Auch die Ausbildung einer intramolekularen Wasserstoffbrückenbindung zwischen der 2'-Hydroxylgruppe und dem Sauerstoffatom der Carbonylgruppe trägt zur Stabilisierung der Chalkonstruktur bei. Aus der Gruppe der Chalkone sind viele Verbindungen bekannt, die zytotoxische und chemopräventive Wirkungen (Go et al., 2005) zeigen. Die Chalkonstruktur des Xanthohumol ist für seine vielfältigen biologischen Wirkungen wichtig, die in zahlreichen Veröffentlichungen aus den letzten Jahren beschrieben wurden (Gerhauser, 2005; Gerhauser und Frank, 2005). Verdeutlicht wird dies auch in der unterschiedlichen Wirkung von Xanthohumol im Gegensatz zu seinem Flavanon-Analogon Isoxanthohumol (Dietz et al., 2005; Gerhauser, 2005). Von Bedeutung für die Eigenschaften und die Wirkung der Verbindung sind neben der Chalkonstruktur die Art und Anzahl der Substituenten am polyphenolischen Grundgerüst. Xanthohumol besitzt eine Methyl- und eine Prenylgruppe, die die Lipophilität des Moleküls erhöhen und ihm eine hohe Affinität zu biologischen Membranen verleihen. Das Vorhandensein von Hydroxyl- und Prenylgruppen wird mit den antioxidativen Eigenschaften der Chalkone in Verbindung gebracht (Go et al., 2005). Verdeutlicht wird der Einfluss der zusätzlichen Methylgruppe bzw. der Prenylgruppe von Xanthohumol durch seine biologischen Wirkungen, wie z.B. den stärkeren wachstumshemmenden Effekt den Xanthohumol im Vergleich zu Desmethylxanthohumol auf zwei Krebszelllinien ausübt (Miranda et al., 1999) sowie die stärkere Induktion der Quinonreduktaseaktivität durch Xanthohumol im Vergleich zu Chalkonaringenin und Naringenin (Miranda et al., 2000). Die ungesättigte α,β -Bindung der Chalkonstruktur von Xanthohumol ist auch wichtig für die Reaktion mit dem Transkriptionsfaktor Keap1, durch die ein Mechanismus zur Induktion chemopräventiver Enzyme zur Verhinderung von Krebskrankheiten verstärkt wird (Liu et al., 2005). Untersuchungen zu Struktur-Wirkungsbeziehungen von synthetischen als auch einigen Chalkonen aus *H. lupulus* wurden erst kürzlich durchgeführt (Vogel et al., 2008), wobei weiterhin noch viel Forschungsbedarf dazu besteht.

Die ökologische Bedeutung der Prenylflavonoide von *H. lupulus*, insbesondere von Xanthohumol, ist bisher nicht untersucht worden. Durch das hauptsächliche Vorkommen der Trichome auf den weiblichen Blüten und Zapfen während der Samenentwicklung ist es vorstellbar, dass die darin enthaltenen Prenylflavonoide und anderen Sekundärmetabolite der

Abwehr von Fraßfeinden und mikrobiellen Pathogenen und damit dem Schutz der heranreifenden Samen dienen. Der Abwehr von Herbivoren könnte neben dem Gehalt an Tanninen im Blattmaterial der Zapfen zur Abwehr größerer Fraßfeinde (Levin, 1973), auch die astringente Wirkung und der bittere Geschmack von Xanthohumol dienen (Fritsch et al., 2005), wobei eventuell besonders herbivore Insekten abgehalten werden sollen. Dem entspricht auch die größere Dichte von glandulären Trichomen auf jungen, sich entwickelnden Blättern, die besonders vor Fraß geschützt werden müssen im Vergleich zu älteren Blättern. Für die größere Bedeutung der prenylierten Flavonoide als Fraßschutz im Gegensatz zur Funktion bei der Abwehr von Pathogenen spricht auch, dass sie konstitutiv synthetisiert werden, ausgenommen davon sind prenylierte Isoflavone und Pterocarpane, welche als Phytoalexine wirken (Barron und Ibrahim, 1996). Durch die Messung der Aktivitäten von Enzymen des Sekundärstoffwechsels, u. a. der Chalkon-Synthase, Chorismatmutase und Prenyltransferasen aus Hopfenzellkulturen nach Elizitierung mit dem Pilz *Verticillium albo-atrum* sollte versucht werden, Sekundärstoffwechselwege zu identifizieren, die in die Produktion von Phytoalexinen involviert sind. In den ersten Stunden nach der Infektion zeigte nur die Phenylalaninammoniumlyase eine 2-3-fach höhere Aktivität im Vergleich zu nicht infizierten Kulturen (Trevisan et al., 1997). Der Schutz vor Herbivoren durch Sekrete von glandulären Trichomen wurde auch bei anderen Spezies demonstriert, beispielsweise dienen acylierte Zucker aus *Datura wrightii*-Trichomen dem Schutz vor Fraß durch zwei Coleopterenpezies (Hare, 2005).

4.4 Sequenzvergleich von Klasse II-OMTs

Ein Sequenzvergleich der HIOMT1, HIOMT2 und HIOMT3 mit anderen Vertretern der Klasse II-OMTs ist in Abb. 4.2 dargestellt. Aminosäuren, die in die Bindung der Substrate und des Kofaktors SAM involviert sind, sowie wichtig für den katalytischen Mechanismus sind, wurden identifiziert (Zubieta et al., 2001) und sind im Sequenzvergleich farbig markiert. Außerdem sind zwei Sequenzmotive (Motiv 1 und Motiv 2) gekennzeichnet, welche die Substratspezifität von pflanzlichen Klasse II-OMTs mit bestimmen sollen und die ausgehend von den Kristallstrukturen ermittelt wurden (Schroder et al., 2002). Die HIOMT1 und die HIOMT2 unterscheiden sich in neun von insgesamt neunzehn in Abb. 4.2 markierten konservierten Aminosäuren (inklusive konservativer Austausch). Beide Proteine sind über die gesamte Sequenz aber nur zu 47% identisch. Der Sequenzvergleich lässt erkennen, dass die Aminosäuren, die in die Bindung von SAM involviert sind, bei den HIOMTs konserviert sind. Die Faltung der katalytischen SAM-Bindedomäne ist sogar über alle Klassen von SAM-

abhängigen OMTs konserviert (Kagan und Clarke, 1994; Schluckebier et al., 1995). Eine größere Variabilität zeigen die HIOMTs hinsichtlich der Aminosäurereste, die für die Bindung des Substrats wichtig sind. Von den sieben Aminosäureresten, die als wichtig dafür identifiziert wurden und von denen anzunehmen ist, dass sie die Unterschiede im Substratspektrum beider Enzyme mit bestimmen, unterscheiden sie sich in fünf (inklusive konservativer Austausch). Eine Änderung der Komposition dieser Aminosäuren hat eine sterische Änderung des aktiven Zentrums und eine Änderung der ausgebildeten Wasserstoffbrückenbindungen zur Folge, woraus sich verschiedene Substratspezifitäten ergeben können (Zubieta et al., 2001). Zusätzliche Diversität der Topologie des aktiven Zentrums der Isoliquiritigenin-OMT und der Isoflavon-7-OMT wird durch Modulation der Kontaktstelle der beiden Dimere erreicht (Zubieta et al., 2001). Die Rückseite des aktiven Zentrums wird von drei Aminosäuren des jeweils anderen Monomers gebildet, die jedoch nicht im Sequenzvergleich alignieren und somit bei den HIOMTs nicht identifiziert werden können.

Die an der Substratbindung beteiligten und durch Alignierung identifizierten Aminosäurereste der HIOMT3 und der *R. hybrid cultivar* Orcinol-OMT2 unterscheiden sich kaum voneinander. Sie sind alle identisch bis auf die Aminosäure in Position 48 des Sequenzvergleichs, welche die Substratbindung durch Dimerbildung mit beeinflusst und ein Cystein in HIOMT3 und ein Serin in der Orcinol-OMT2 ist. Doch selbst wenige Aminosäureunterschiede können unterschiedliche Substratpräferenzen von OMTs bedingen. Ein Beispiel dafür sind zwei OMTs aus *O. basilicum* (Gang et al., 2002), bei denen ein Aminosäureunterschied verschiedene Substratspektren zur Folge hatte. Wurde die entsprechende Aminosäure durch Mutagenesestudien in dem einen Enzym zu der Aminosäure mutiert, welche sich an der äquivalenten Position des anderen Enzym befand und umgekehrt, verkehrten sich auch die Substratspektren beider OMTs. Die Orcinol-OMT2 methyliert Orcinol und weitere niedermolekulare phenolische Verbindungen. Orcinol-Dimethylether ist Bestandteil des Dufts der meisten Rosensorten. Hilfreich bei der Identifizierung des Substrats der HIOMT3 könnten Modellierungen und Substrat-Dockingstudien sein.

Diskussion

| | 5 | 15 | 25 | 35 | 45 | |
|-------------------------------|-------------|----------------|------------------|-------------------|-------------|------------|
| HLOMT1 | ----- | ----- | ---MESLRGQ | EQIWQLMFSF | VDSMALKCAI | |
| HLOMT2 | ----- | ----MELARN | DQTEAALRGE | ANVWKSINGI | ADFMVMKCAL | |
| <i>P. somniferum</i> RT7OMT | ----- | -----M | DTAERLRKQ | AEIWEHMFAF | VDSMALKCAV | |
| <i>M. sativa</i> ILQ2'OMT | ----MGNSY | ITKEDNQISA | TSEQTEDSAC | LSAMVLTNTL | VYPAVFLNAAI | |
| <i>M. sativa</i> IF7OMT | -----M | ASSIN---- | G RKPSEIFKAQ | ALLYKHIIYAF | IDSMSLKWAV | |
| <i>R. hyb. cultivar</i> OOMT2 | MERLNSFKHL | NQKWS--- | NG EHSNELLHAQ | AHIWNHIFSF | INSM SLKSAI | |
| HLOMT3 | MEKLSFRHL | NNNIDLILNE | ENSTEILGAQ | AHIWNQIFNF | INSM SLKCAI | |
| | 55 | 145 | 155 | 175 | 185 | |
| HLOMT1 | ELRIADIIH- | --SLAPMVL | M QTHPLSMAVW | S-NTFEKAHG | -CNIWEFSSA | |
| HLOMT2 | ELRIPDIVH- | QVTLAPFVAF | MTHPYLSAPW | G-NGFEMVHG | GRQLWDLSPG | |
| <i>P. somniferum</i> RT7OMT | ELGIPDIIN- | --NLSPLVL | W ETNPILLKPW | S-SPFERAHG | -CEIWDLALA | |
| <i>M. sativa</i> ILQ2'OMT | DLNLFEEIIAK | --YLASF | TTT L CYPALLQVW | DIDLFKNVHG | -VTKYEFMGK | |
| <i>M. sativa</i> IF7OMT | GMNIPNIIH- | --CLAPMVE | C VLDPTLSGSY | DLTLFGVTLG | -SGFWDFLDK | |
| <i>R. hyb. cultivar</i> OOMT2 | QLGIPDIIN- | --SLTPFLTA | MLDPVLTTPW | DPTPFDTAHG | -MTFWDYGNH | |
| HLOMT3 | QLGIPDIIN- | --SVTPFLLA | MLDPVMTKPW | DPTPFDTANG | -MAFWDYGSH | |
| | 195 | 205 | 225 | 235 | 255 | |
| HLOMT1 | NPDFNKIFNN | AMASIVPIYM | LGCIKGTVD | VGGTGGSSIS | GINFDLPHVI | |
| HLOMT2 | NPEFNKVFND | GMASTARITT | VFCGICSLVD | VGGEFGGSIS | GINYDLPHVV | |
| <i>P. somniferum</i> RT7OMT | DPKFNNFLNG | AMQCSTTTII | FSGIAGSLVD | VGGTGSIIA | GINFDLPHVV | |
| <i>M. sativa</i> ILQ2'OMT | DKKMNQIFNK | SMVDV | CATEM -FEGISTLVD | VGGSGRNLE | GINFDLPQVI | |
| <i>M. sativa</i> IF7OMT | NPEYNTSFND | AMASDSKLIN | VFDGLESIVD | VGGTGTTAK | CIVFDRPQVV | |
| <i>R. hyb. cultivar</i> OOMT2 | QPSIAHLFND | AMASDARLVT | VFEGLESIVD | VGGTGTVAK | CTVLDLPHVV | |
| HLOMT3 | EPKLARFFND | AMASDARLVT | VFEGVESLVD | VGGTGTVAS | CTVFDLPPHV | |
| | 275 | 285 | 295 | 325 | 345 | |
| HLOMT1 | THISGDI | FES IPSADAVLMK | GVLHCF | SDEK KIIILEIVLD | ETRMV | |
| HLOMT2 | SHVGGNMF | FEW IPTAVAVFMK | WILHD | WADED KIIIVDIVLE | DAAV | |
| <i>P. somniferum</i> RT7OMT | KHVGGDMF | VVD IPEADAVIMK | WILHD | WSDDED KVIIVDCVLR | KMGLI | |
| <i>M. sativa</i> ILQ2'OMT | EHVGGDMF | FAS VPQGDAMILK | AVCHN | WSDEK KVIIVEFILP | KV | |
| <i>M. sativa</i> IF7OMT | TYVGGDMF | TFS IPNADAVLLK | YILHN | WTDKD KVTIIDMVIN | QIKL | |
| <i>R. hyb. cultivar</i> OOMT2 | KYTGGDMF | FEA VPPADTVLLK | WILHD | WDEE KVIIIDMME | ETQL | |
| HLOMT3 | NFVGGDMF | VVD VPATEVVLLK | WILHD | WDEE KVIIIDMKVE | ETQL | |
| | 355 | 365 | 375 | 385 | | |
| HLOMT1 | PX | SGG-KER | TELEWKRLLN | EAGFTSIKIT | KIPIIPAIE | AFLV (352) |
| HLOMT2 | MA | TRG-KER | TEKEWKRVLE | EGGFPRYQIL | KIPALTSVIE | AYPQ (360) |
| <i>P. somniferum</i> RT7OMT | MA | TAGKER | TEAEWKILLN | NAGFPRYNVI | RTPAFPCIE | AFPE (355) |
| <i>M. sativa</i> ILQ2'OMT | F | YGG-RER | TEKQYEKLSK | LSGFSKFQVA | CRAFNSLGMV | EFYK (372) |
| <i>M. sativa</i> IF7OMT | A | NG--KER | NEEWWKLF | FI EAGFQHYKIS | PLTGFLSLIE | IYP- (352) |
| <i>R. hyb. cultivar</i> OOMT2 | MA | VRG-QER | NEKEWAKLFT | DAGFSYKIT | PILGLRSLIE | VYP- (366) |
| HLOMT3 | MA | VTG-RER | NEKEWAKLFK | DAGFSNYKIT | PILGLRSLIE | VYP- (377) |





katalytische Reste ; Substratbindung ; Substratbindung Dimer 
SAM-Bindung 

Abbildung 4.2 Proteinsequenzvergleich der HLOMT1, HLOMT2 und HLOMT3 mit vier ausgewählten pflanzlichen OMTs: *P. somniferum* (*R,S*)-Retikulin-7-OMT (AAQ01668), *M. sativa* Isoliquiritigenin-2'-OMT (AAB48059), *M. sativa* Isoflavon-7-OMT (AAC49927), *R. hybrid cultivar* Orcinol-OMT2 (AAM23004). Farblich unterlegte Aminosäuren sind an der Substratbindung (grün), Substratbindung durch Dimerbildung (blau), SAM/SAH-Bindung (rot) und an der Katalyse beteiligt (gelb). Mit roten Buchstaben gekennzeichnete Aminosäuren entsprechen den Motiven 1 und 2 mit Einfluss auf die Substratspezifität (Schroder et al., 2002).

4.5 Sequenzvergleich von SABATH-Karboxyl-MTs

Die Ergebnisse der Arbeit machen keine Aussage über die Rolle der HIOMT4 in *H. lupulus* möglich. Einige charakterisierte Vertreter der Familie der Karboxyl-MTs methylieren Karbonsäuren wie Salizylsäure (Ross et al., 1999), Benzoessäure (Murfitt et al., 2000) oder Zimtsäure (Kapteyn et al., 2007) und deren Derivate. Die resultierenden flüchtigen Methylester sind meist Bestandteile von Blütendüften oder tragen zum Geschmack der Pflanzen bei. *H. lupulus* verströmt als windbestäubte Art keinen starken Blütenduft und stellt auch keine Aromapflanze dar. Andere Vertreter der Karboxyl-MTs methylieren Pflanzenhormone wie Giberellinsäure (Varbanova et al., 2007), Indol-3-essigsäure (Qin et al., 2005) oder Jasmonsäure (Seo et al., 2001). Methylsalizylat und Methyljasmonat spielen auch bei der Abwehr von Herbivoren oder Pathogenen eine Rolle, indem sie die Expression von in die Abwehrantwort involvierten Genen bei geschädigten Pflanzen induzieren (Maleck und Dietrich, 1999; Mattiacci et al., 2001). Doch mit diesen Verbindungen zeigte die HIOMT4 keine Aktivität. In Abbildung 4.3 ist ein Sequenzvergleich der HIOMT4 mit verschiedenen SABATH-MTs dargestellt. Davon gehören zwei Enzyme zum so genannten SAMT-Typ, dessen Vertreter Salizylsäure gegenüber Benzoessäure bevorzugen (*C. breweri*- und *H. carnososa*-SAMT), sowie zwei Enzyme zum BAMT-Typ (*N. suaveolens*- und *A. lyrata*-BAMT), von dem die meisten Vertreter Salizylsäure und Benzoessäure methylieren, wobei Benzoessäure das bevorzugte Substrat darzustellen scheint (Effmert et al., 2005). Weiterhin sind die Jasmonsäure-Karboxyl-MT aus *A. thaliana*, die Jasmonsäure spezifisch methyliert und die Theobrominsynthase aus *C. arabica* im Sequenzvergleich enthalten (Mizuno et al., 2003b).

Im Vergleich (Abb. 4.3) sind die für die Bindung von Substrat und Kofaktor SAM identifizierten Aminosäuren markiert. Bei der HIOMT4 sind 17 (plus drei konservative Austausche) von den 22 bei der *C. breweri*-Karboxyl-MT identifizierten Aminosäureresten konserviert. Die SAM-Binderegion erweist sich zwischen den verschiedenen Vertretern der Karboxyl-MTs als hoch konserviert, was auch im Sequenzvergleich deutlich wird. Die Methylakzeptor-Binderegionen variieren stärker. In Position 202 besitzt die HIOMT4 ein Histidin. Alle Vertreter des SAMT-Typs besitzen an dieser Stelle ein Methionin, wobei die anderen Karboxyl-MTs des Sequenzvergleichs ein Histidin in der äquivalenten Position aufweisen. Eine Zimtsäure-Karboxyl-MT aus *O. basilicum*, bei der das entsprechende Histidin des Wildtypenzym *in vitro* zu Methionin mutiert worden war, wies größere Aktivität mit Benzoessäure auf als das Wildtypenzym und zeigte außerdem Aktivität mit Salizylsäure, die das Wildtypenzym nicht methylieren konnte (Kapteyn et al., 2007).

Diskussion

| | | | | | |
|---------------------------|-------------|-------------|-------------|--|-------------|
| | | | | | |
| | 5 | 15 | 25 | 35 | 45 |
| HLOMT4 | MYTNTINNSS | PTLLVSKVHQ | LILIFSIVKN | IAKAIMEVEQ | VLHMNGGVGE |
| <i>C. arabica</i> TBS2 | ----- | ----- | ----- | -----MELQA | VLHMNGGED |
| <i>C. breweri</i> SAMT | ----- | ----- | ----- | -----MDVRQ | VLHMKGGAGE |
| <i>H. carnos</i> a SAMT | ----- | ----- | ----- | -----MEVVD | VLHMNGGIGD |
| <i>N. suaveolens</i> BSMT | ----- | ----- | ----- | -----MEVAK | VLHMNEGIGK |
| <i>A. lyrata</i> BSMT | ----- | ---MDPRFIN | TIPSLSYNDD | KCDDEYAFVK | ALCMSGGDGT |
| <i>A. thaliana</i> JMT | ----- | ----- | ----- | -----MEVMR | VLHMNKNGGE |
| | | | | | |
| | 55 | 95 | 135 | 185 | 195 |
| HLOMT4 | TSYATNSSLO | RIADLGCS | QVFLNDLPGN | SFYGKLFPPN | SMHIVHSSYS |
| <i>C. arabica</i> TBS2 | TSYAKNSSYN | KVADLGCASG | QIFLNDLFGN | SFYGRLFPPEE | SMHFIHSCYS |
| <i>C. breweri</i> SAMT | NSYAMNSFIQ | AIADLGCS | QIFLNDLPGN | SFYGRLFPRN | TLHFIHSSYS |
| <i>H. carnos</i> a SAMT | ASYASNSLVQ | CIADLGCS | QIYLNDLPSN | SFYGRLFPNK | SLHFVHSSYS |
| <i>N. suaveolens</i> BSMT | ASYAKNSLFQ | CIADLGCS | QVFLNDLPGN | SFYNRLFPSN | SVHFVHSSFS |
| <i>A. lyrata</i> BSMT | NSYSANSRLQ | KVADLGCSSG | DCCLNDLPEN | SFY SRLFSRN | SLHIHSSYA |
| <i>A. thaliana</i> JMT | TSYAKNSTAQ | GIADLGCS | RVSLNDLPSN | SFYGRLFPRR | SLHFVHSSSS |
| | | | | | |
| | 205 | 275 | 285 | 315 | 385 |
| HLOMT4 | LHWLSQVPRE | TIMGSIRS-D | SHKN---IC | LDNFNMPVYF | IRAAAEPILV |
| <i>C. arabica</i> TBS2 | FHWLSQVPSG | TCICKVDEYD | EPNP---L | LASFNLPFFT | IRSVYEPILA |
| <i>C. breweri</i> SAMT | LMWLSQVPIG | TILGRRSE-D | RASTECCLIW | MDKFNIPQYT | MRAVAEPLLL |
| <i>H. carnos</i> a SAMT | VMWLSRV PDL | TFLGRKSE-D | HSGKESGYVW | LDCFNIPQYT | MRAVAEPLLV |
| <i>N. suaveolens</i> BSMT | LHWLSRVPHG | TVMGRNNE-D | RFSKASCYIL | VAAFNIPVYD | MRAFI EPLVV |
| <i>A. lyrata</i> BSMT | LHWLSKVPEK | TFIGRNTLND | PLYRDCCHFV | LDAFNMPFYD | IRAVSEPMLV |
| <i>A. thaliana</i> JMT | LHWLSQVPCR | SFLGRRSL-D | PTTEESCYQW | IDAFNAPYYA | IRAVVEPMLE |
| | | | | | |
| | 425 | 435 | | | |
| HLOMT4 | YLNLVISLTK | N----- | (401) | | |
| <i>C. arabica</i> TBS2 | YNNLIISLAK | KPEKSDM-- | (384) | ■ SAM/SAH-Bindung | |
| <i>C. breweri</i> SAMT | FINVIVSLIR | KSD----- | (359) | ■ Substratbindung | |
| <i>H. carnos</i> a SAMT | FINVTVMSTR | RV----- | (368) | ■ weitere Aminosäuren des katalytischen Zentrums | |
| <i>N. suaveolens</i> BSMT | SINVVVSLTK | TN----- | (355) | | |
| <i>A. lyrata</i> BSMT | TVSLVVSLTK | K----- | (380) | | |
| <i>A. thaliana</i> JMT | YAIIVILSLVR | TG----- | (389) | | |

Abbildung 4.3 Partieller Proteinsequenzvergleich der HIOMT4 mit repräsentativen Karboxyl-MTs. Farbige unterlegte Aminosäuren binden SAM/SAH (rot), sind an der Substratbindung (grün unterlegte weiße Buchstaben) beteiligt oder sind Aminosäuren des katalytischen Zentrums (grau). *C. arabica* Theobrominsynthase (BAC43757), *C. breweri* SAM:Salizylsäure-Karboxyl-MT (AAF00108), *H. carnos*a SAM:Salizylsäure-Karboxyl-MT (CAI05934), *N. suaveolens* SAM:Benzoessäure/Salizylsäure-Karboxyl-MT (CAF31508), *A. lyrata* SAM:Benzoessäure/Salizylsäure-Karboxyl-MT (AAP57211), *A. thaliana* SAM:Jasmonsäure-Karboxyl-MT (AAG23343).

In der Position 290 im Sequenzvergleich besitzt die HIOMT4 ein Cystein und in Position 384 ein Alanin. Diese zwei Aminosäurereste kommen bei keiner der anderen hier verglichenen Sequenzen an dieser Position vor. In Position 273 besitzt die HIOMT4 ebenso wie die *N. suaveolens*-BSMT ein Methionin, wobei die anderen Sequenzen ein Leucin oder Isoleucin an dieser Position aufweisen. Der vorhandene Schwefel könnte zu verstärkten hydrophoben Interaktionen mit den anderen Aminosäureresten des aktiven Zentrums führen und dadurch

Wasser leichter ausgeschlossen werden, was für die Bindung und den Umsatz aromatischer Substrate mit Karboxylgruppe wichtig ist (Zubieta et al., 2003).

Anhand der Aminosäuresequenz ist es nicht möglich, definitive Aussagen über die Substrate der HIOMT4 zu machen. Nicht zu vergessen ist, dass auch nicht konservierte Aminosäuren des aktiven Zentrums die Substratspezifität mit bestimmen könnten (Kapteyn et al., 2007). Erst relativ wenige Vertreter der SABATH-Karboxyl-MT-Familie wurden bisher charakterisiert, wobei in den Datenbanken viele putative Karboxyl-MTs vorhanden sind. Allein das Genom von *A. thaliana* enthält 24 Gene aus dieser Familie (D'Auria et al., 2003) und es ist zu erwarten, dass in Zukunft Karboxyl-MTs mit bisher unbekanntem Substratspezifitäten identifiziert werden. Um die Suche nach Substraten zu spezifizieren, könnte man auch mit der Sequenz der HIOMT4 Modellierungen und Substrat-Dockingstudien durchführen. Der Hopfen ist hinsichtlich seiner Nutzung in der Bierbrauerei und den dafür wichtigen Inhaltsstoffen gut erforscht worden, wodurch aber die Stoffwechselfvorgänge in den Trichomen von *H. lupulus* noch nicht in ihrer Gesamtheit erfasst worden sind. Deshalb ist es schwierig, das Zielmolekül der HIOMT3 und HIOMT4 zu identifizieren.

4.6 Die HICHIs sind keine katalytisch aktiven CHIs

Dass in der EST-Kollektion der *H. lupulus*-Trichome eine so hohe Anzahl Sequenzen mit Homologie zu putativen CHIs vorhanden waren, stellte ein unerwartetes Ergebnis dar. Die Akkumulation von Chalkonen und das Fehlen von anderen Flavonoiden stellen infrage, ob eine funktionelle CHI in den Trichomen vorhanden ist. Die Clusteranalyse funktioneller und putativer CHIs hatte die drei HICHIs in die Typen III und IV der CHI-Familie (Ralston et al., 2005) eingeordnet und zeigte deren große evolutionäre Distanz zu den Typ I- und Typ II-CHIs anderer Pflanzenspezies, welche katalytische CHI-Funktion aufweisen. In *A. thaliana* finden sich sechs Vertreter aus der Familie der CHIs, von denen nur einer CHI-Aktivität zeigt. Das CHI-Gen (*tt5*) in *A. thaliana* ist essentiell für die Biosynthese von Anthocyaninen und anderen Flavonoiden (Shirley et al., 1992). Von keinem der Vertreter der Typ III- und IV-CHIs ist bisher die Funktion in der Pflanzenzelle bekannt. *G. max*-CHI 3 und -4A wurden *in vitro* auf CHI-Funktion mit (2S)-Chalkonaringenin und weiteren neun 6-Desoxychalkonen getestet, erwiesen sich jedoch mit all diesen Substraten als inaktiv (Ralston et al., 2005). Die HICHI1 und HICHI2 sind zu 64% identisch mit einer putativen CHI aus *L. esculentum*. Deren Sequenz wurde durch „subtractive suppression hybridization“ aus einem violettfarbigen Phänotyp isoliert, bei dem durch Überexpression eines MYB-Transkriptionsfaktors bestimmte Gene der Anthocyanidin-Biosynthese sowie der Glykosylierung und des

Transports von Anthocyaninen in die Vakuole verstärkt transkribiert wurden (Mathews et al., 2003). Es wird vermutet, dass diese putative CHI direkt in die Biosynthese und Akkumulation der Anthocyanine in den Blättern der Tomate involviert ist.

Der Sequenzvergleich der drei HICHIs mit Typ I-CHIs, CHI2 aus *A. thaliana* und CHI2 aus *G. max*, hat gezeigt, dass nicht alle (bei HICHI3 und HICHI1) oder auch keine (bei HICHI2) für die Katalyse wichtigen Aminosäuren konserviert sind. Dieser Fakt als auch die große evolutionäre Distanz zu den authentischen CHIs ließen schon vermuten, dass die drei HICHIs keine CHI-Funktion besitzen, was im Enzymtest auch bestätigt wurde.

Im Unterschied zu den anderen Vertretern der CHI-Typ III-Unterfamilie besitzen HICHI1 und HICHI2 keine Chloroplasten-Signalsequenz und werden daher nicht in den Chloroplasten aktiv sein. Die Untersuchung der Expression der *G. max chi3*- und *chi4*-Gene hatte ergeben, dass sie in keinem der untersuchten Gewebe signifikant exprimiert wurden. Daraus wurde geschlussfolgert, dass beide Proteine wahrscheinlich keine bedeutende Rolle im Phenylpropanoidstoffwechsel unter normalen Bedingungen in der Sojabohne spielen (Ralston et al., 2005). Im Gegensatz dazu waren alle drei HICHIs in den Trichomen von *H. lupulus* stark exprimiert, wie in den Expressionsanalysen gezeigt worden war.

Trotz der weiten Verbreitung der CHI-verwandten Proteine im Pflanzenreich ist derzeit erst wenig über sie bekannt und infolgedessen gibt es in der Literatur kaum Anhaltspunkte über ihre Funktion. Die starke Expression der HICHI-Gene in den Hopfen-Trichomen lässt vermuten, dass sie eine Rolle in den in Trichomen aktiven Sekundärstoffwechselwegen spielen. Auch eine andere als eine katalytische Funktion wäre denkbar, wie z.B. als strukturelles Gerüst für Enzyme, die in verschiedenen Zweigen eines Biosyntheseweges aktiv sind (Irani und Grotewold, 2003) oder als Flavonoidchaperone u./o. Transporter (Ralston et al., 2005). Die Herstellung von Überexpressions- oder Suppressionslinien wäre ein Ansatz zur Aufklärung dieser interessanten Fragestellungen.

4.7 Ausblick

Neben *Humulus* die einzig andere zur Familie der Cannabaceae gehörende Gattung *Cannabis* reichert ebenfalls hunderte verschiedene Sekundärmetabolite in Trichomen an, von denen auch die Terpenophenole für den Menschen die größte Bedeutung haben (Page und Nagel, 2006). Xanthohumol ist jedoch bisher nur aus *H. lupulus* isoliert worden und seine Synthese stellt somit im Pflanzenreich eine Besonderheit dar.

Aus dem Biosyntheseweg des Xanthohumol sind nunmehr fast alle Gene isoliert worden. Einzig das den Prenylierungsschritt katalysierende Enzym ist noch nicht bekannt. Die aus *H.*

lupulus-Trichomen erstellte EST-Kollektion (Nagel et al., 2008) kann jedoch zur Grundlage der Klonierung der entsprechenden cDNA herangezogen werden. Die Aufklärung des Biosynthesewegs von Xanthohumol und die Möglichkeit der Transformation von *H. lupulus* eröffnen neue Wege zur gentechnischen Nutzung der Pflanze. Denkbar wäre die Herstellung transgener Pflanzen mit einem höheren Gehalt an Xanthohumol, da die in der Wildtyppflanze angereicherten Konzentrationen für eine kommerzielle Nutzung zu gering sind. Auch die Inhibierung des Methylierungsschritts durch Ausschalten der Desmethylxanthohumol-6'-OMT wäre möglich. Dies würde vermutlich zur Anreicherung von Desmethylxanthohumol führen, woraus größere Mengen des Phytoöstrogens 8-Prenylnaringenin gewonnen werden könnten, an dem derzeit großes pharmakologisches Interesse besteht. Ein Beispiel für den Erfolg dieses Ansatzes stellt die Synthese von großen Mengen Resveratrol durch die Transformation einer Stilbensynthase aus *V. vinifera* in *H. lupulus* dar (Schwekendiek et al., 2007). Auch die heterologe Produktion von wertvollen Metaboliten in Trichomen, die in *H. lupulus*-Wildtyppflanzen nicht synthetisiert werden, deren Vorkommen jedoch in der Natur begrenzt sind, wäre denkbar. Ein solcher Ansatz zur Nutzung von Trichomen wurde von McCaskill und Croteau (1999) vorgeschlagen. Die Nutzung der in dieser Arbeit charakterisierten HIOMT1 und HIOMT2 als Biokatalysatoren zur spezifischen Methylierung von Hydroxylgruppen niedermolekularer phenolischer Substrate stellt eine weitere Anwendungsmöglichkeit dar.

5 Zusammenfassung

H. lupulus reichert viele verschiedene Sekundärmetabolite an. Dazu zählen u. a. prenylierte Flavonoide. Das Hauptprenylflavonoid ist das bioaktive Xanthohumol, das positive Wirkungen auf die menschliche Gesundheit ausübt. Die Quantifizierung von Xanthohumol in verschiedenen Geweben von *H. lupulus* hat ergeben, dass in den glandulären Trichomen reifer Hopfenzapfen die höchsten Konzentrationen vorhanden sind. Ein EST-Sequenzierungsprojekt gewährte Einblick in die biosynthetischen Prozesse innerhalb der Trichome, insbesondere die Xanthohumol-Biosynthese und bildete den Ausgangspunkt dieser Arbeit.

- Durch EST-Sequenzierung wurden 1882 qualitativ hochwertige Sequenzen aus Trichomen gewonnen. Die EST-Kollektion enthielt viele Transkripte von Genen der Terpenoidbiosynthese, wie von fast allen Genen des MEP-Weges, der zur Synthese des universellen Terpenoidbausteins IPP führt. Ebenso waren zahlreiche ESTs vorhanden, die Enzyme mit bekannter Funktion im Hopfen-Sekundärstoffwechsel repräsentieren, z.B. von den Polyketidsynthasen CHS_H1 und VPS, welche in die Biosynthese von Xanthohumol bzw. die der Bittersäuren involviert sind. Des Weiteren wurden viele Transkripte von putativen CHIs und von mehreren Genen mit Ähnlichkeit zu OMTs identifiziert, die Kandidaten für die Katalyse des O-Methylierungsschritts bei der Synthese von Xanthohumol bildeten. Die Trichom-spezifischen EST-Daten von *H. lupulus* stehen als genomische Ressource zur Verfügung und bieten Einblick in die metabolische Spezialisierung dieser Trichome.

- Um den Xanthohumol-Biosyntheseweg aufzuklären, wurden die fünf cDNA-Klone mit Sequenzähnlichkeit zu OMTs ausgewählt. Die HIOMT1, HIOMT2 und HIOMT3 waren zu anderen charakterisierten Flavonoid-methylierenden Enzymen ähnlich, während die HIOMT4 in die Familie der Karboxyl-methylierenden Enzyme gruppierte und die HIOMT5 Ähnlichkeit zu OMTs zeigte, die CoA-Thioester von Hydroxyzimtsäuren methylieren. Expressionsstudien, die mittels RT-PCR durchgeführt wurden, zeigten, dass die HIOMT1 die OMT war, die in Trichomen von allen fünf OMTs am stärksten exprimiert war. Alle fünf OMTs wurden in einem heterologen System exprimiert, die HIOMT3 und die HIOMT5 in *E. coli* und die HIOMT1, HIOMT2 und HIOMT4 mit Hilfe des Baculovirus-Expressionssystems in Sf9-Insektenzellen.

- Die HIOMT1 und die HIOMT2 akzeptierten als Substrate verschiedene Chalkone, darunter die potentiellen Vorstufen von Xanthohumol. Die HIOMT1 methylierte Desmethylxanthohumol und Xanthogalenol und die HIOMT2 war neben Chalkonaringenin und Desmethylxanthohumol noch mit verschiedenen anderen Chalkonen sowie mit niedermolekularen phenolischen Verbindungen aktiv. Die HIOMT3 und die HIOMT4 zeigten keine Aktivität mit den getesteten Substraten und die HIOMT5 methylierte die zwei als Substrate getesteten Chalkone Desmethylxanthohumol und Chalkonaringenin nicht.

- Die mittels Metallaffinitätschromatographie gereinigten, rekombinanten Enzyme zeigten ähnliche Charakteristika wie andere charakterisierte OMTs. HIOMT1 besitzt maximale Aktivität zwischen 30 und 37°C bei einem pH-Optimum von 9,0. Die HIOMT2 ist bei 39°C und einem pH-Wert von 8,5 am aktivsten. Die Ergebnisse der Molekulargewichtsbestimmung deuten auf die Bildung von Homodimeren hin. Die Monomere der HIOMT1 besitzen eine molekulare Masse von 42,7 kDa, die der HIOMT2 von 43,1 kDa.

- HPLC und LC-MS der HIOMT1-Reaktionsprodukte ergaben, dass Desmethylxanthohumol an der 6'-Hydroxylgruppe methyliert wird, wodurch Xanthohumol gebildet wird. Die HIOMT1 katalysiert damit die letzte Reaktion in der Xanthohumol-Biosynthese. Die HIOMT2 methyliert auch Desmethylxanthohumol, wobei aber kein Xanthohumol gebildet wird. ESI-MS/MS und NMR-Untersuchungen ergaben, dass in der Reaktion der HIOMT2 mit Xanthohumol 4-Methylxanthohumol gebildet wird. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass auch Chalkonaringenin, relativ ineffizient von der HIOMT2 an der 4-Hydroxylgruppe methyliert wird. Von allen getesteten Substraten wird von der HIOMT2 am effizientesten Resveratrol methyliert. Methyliertes Resveratrol als auch methyliertes Chalkonaringenin und 4-Methylxanthohumol sind jedoch (noch) nicht aus *H. lupulus* bekannt. Das endogene Substrat der HIOMT2 kann deshalb nicht bestimmt werden. Ihre Präferenz für Chalkone deutet aber daraufhin, dass sie eine Rolle im Sekundärstoffwechsel von *H. lupulus* spielt.

- Neben der Arbeit mit den HIOMTs auf denen der Fokus des Projektes lag, hatte sich aus der hohen Anzahl von Sequenzen mit Ähnlichkeit zu putativen CHIs im EST-Set ein Nebenprojekt ergeben. Dabei wurde der Frage nachgegangen, ob aufgrund der vorrangigen Akkumulation von Chalkonen in den glandulären Trichomen von *H. lupulus* die putativen CHIs auch katalytisch als solche aktiv sind. Drei cDNA-Klone wurden isoliert, die eine relativ große evolutionäre Distanz zu den funktionellen CHIs anderer Spezies aufweisen. In

den Proteinsequenzen der drei HICHis sind nur wenige Aminosäurereste des aktiven Zentrums funktioneller CHIs konserviert. Der Aktivitätstest der rekombinant exprimierten HICHis zeigte, dass sie nicht die Isomerisierung von Chalkonaringenin sowie weiteren getesteten Chalkonen katalysieren. Ihre Funktion bleibt damit unklar, ihre hohe Expression in den Zapfen-Trichomen deutet aber auf eine Rolle im Sekundärstoffwechsel hin, wobei auch eine nicht-katalytische Rolle denkbar ist.

6 Literatur

- Achnine L, Blancaflor EB, Rasmussen S, Dixon RA** (2004) Colocalization of L-phenylalanine ammonia-lyase and cinnamate 4-hydroxylase for metabolic channelling in phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Cell* **16**: 3098-3109
- Akashi T, Sawada Y, Shimada N, Sakurai N, Aoki T, Ayabe S** (2003) cDNA cloning and biochemical characterization of S-adenosyl-L-methionine: 2,7,4'-trihydroxyisoflavanone 4'-O-methyltransferase, a critical enzyme of the legume isoflavonoid phytoalexin pathway. *Plant Cell Physiol* **44**: 103-112
- Albini A, Dell'Eva R, Vene R, Ferrari N, Buhler DR, Noonan DM, Fassina G** (2006) Mechanisms of the antiangiogenic activity by the hop flavonoid xanthohumol: NF-kappaB and Akt as targets. *FASEB J* **20**: 527-529
- Asamizu E, Nakamura Y, Sato S, Tabata S** (2000) A large scale analysis of cDNA in *Arabidopsis thaliana*: generation of 12,028 non-redundant expressed sequence tags from normalized and size-selected cDNA libraries. *DNA Res* **7**: 175-180
- Asamizu E, Nakamura Y, Sato S, Tabata S** (2004) Characteristics of the *Lotus japonicus* gene repertoire deduced from large-scale expressed sequence tag (EST) analysis. *Plant Mol Biol* **54**: 405-414
- Attieh J, Djiana R, Koonjul P, Etienne C, Sparace SA, Saini HS** (2002) Cloning and functional expression of two plant thiol methyltransferases: a new class of enzymes involved in the biosynthesis of sulfur volatiles. *Plant Mol Biol* **50**: 511-521
- Ayabe S, Yoshikawa T, Kobayashi M, Furuya T** (1980) Biosynthesis of a retrochalcone echinatin: involvement of O-methyltransferase to licodione. *Phytochemistry* **19**: 2331-2336
- Aziz N, Paiva NL, May GD, Dixon RA** (2005) Transcriptome analysis of alfalfa glandular trichomes. *Planta* **221**: 28-38
- Barron D, Ibrahim RK** (1996) Isoprenylated flavonoids - A survey. *Phytochemistry* **43**: 921-982
- Batista D, Fonseca S, Serrazina S, Figueiredo A, Pais MS** (2008) Efficient and stable transformation of hop (*Humulus lupulus* L.) var. Eroica by particle bombardment. *Plant Cell Rep* **27**:1185-96
- Bednar RA, Hadcock JR** (1988) Purification and characterization of chalcone isomerase from soybeans. *J Biol Chem* **263**: 9582-9588
- Bell AA, Stipanovic RD, Elzen GW, Williams HJ** (1987) Structural and genetic variation of natural pesticides in pigment glands of cotton (*Gossypium*). American Chemical Society Symposium Series **330**: 477-490
- Biendl, M. Pinzl, C** (2007) Arzneipflanze Hopfen. Schriftenreihe des Deutschen Hopfenmuseums Wolnzach, **6**
- Bugos RC, Chiang VL, Campbell WH** (1991) cDNA cloning, sequence analysis and seasonal expression of lignin-bispecific caffeic acid/5-hydroxyferulic acid O-methyltransferase of aspen. *Plant Mol Biol* **17**: 1203-1215
- Burbulis IE, Winkel-Shirley B** (1999) Interactions among enzymes of the *Arabidopsis* flavonoid biosynthetic pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 12929-12934
- Burga L, Wellmann F, Lukacin R, Witte S, Schwab W, Schroder J, Matern U** (2005) Unusual pseudosubstrate specificity of a novel 3,5-dimethoxyphenol O-methyltransferase cloned from *Ruta graveolens* L. *Arch Biochem Biophys* **440**: 54-64
- Bustin SA, Nolan T** (2004) Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *J Biomol Tech* **15**: 155-166
- Callemien D, Jerkovic V, Rozenberg R, Collin S** (2005) Hop as an interesting source of resveratrol for brewers: optimization of the extraction and quantitative study by liquid

- chromatography/atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem* **53**: 424-429
- Chadwick LR, Pauli GF, Farnsworth NR** (2006) The pharmacognosy of *Humulus lupulus* L. (hops) with an emphasis on estrogenic properties. *Phytomedicine* **13**: 119-131
- Chiron H, Drouet A, Claudot AC, Eckerskorn C, Trost M, Heller W, Ernst D, Sandermann H, Jr.** (2000) Molecular cloning and functional expression of a stress-induced multifunctional O-methyltransferase with pinosylvin methyltransferase activity from Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Plant Mol Biol* **44**: 733-745
- Chou HH, Holmes MH** (2001) DNA sequence quality trimming and vector removal. *Bioinformatics* **17**: 1093-1104
- Coiner H, Schroder G, Wehinger E, Liu CJ, Noel JP, Schwab W, Schroder J** (2006) Methylation of sulfhydryl groups: a new function for a family of small molecule plant O-methyltransferases. *Plant J* **46**: 193-205
- Colgate EC, Miranda CL, Stevens JF, Bray TM, Ho E** (2007) Xanthohumol, a prenylflavonoid derived from hops induces apoptosis and inhibits NF-kappaB activation in prostate epithelial cells. *Cancer Lett* **246**: 201-209
- Crock J, Wildung M, Croteau R** (1997) Isolation and bacterial expression of a sesquiterpene synthase cDNA clone from peppermint (*Mentha x piperita*, L.) that produces the aphid alarm pheromone (E)-beta-farnesene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 12833-12838
- D'Auria JC, Chen F, Pichersky E** (2003) The SABATH family of methyltransferases in *Arabidopsis thaliana* and other plant species. *Recent Adv Phytochem* **37**: 253-283
- Davis GD, Elisee C, Newham DM, Harrison RG** (1999) New fusion protein systems designed to give soluble expression in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng* **65**: 382-388
- De Keukeleire D, De Cooman L, Rong H, Heyerick A, Kalita J, Milligan SR** (1999) Functional properties of hop polyphenols. *Plant Polyphenols 2: Chemistry, Biology, Pharmacology, Ecology*; Kluwer Academic, Plenum Publishers: New York.
- De Keukeleire J, Ooms G, Heyerick A, Roldan-Ruiz I, Van Bockstaele E, De Keukeleire D** (2003) Formation and accumulation of alpha-acids, beta-acids, desmethylxanthohumol, and xanthohumol during flowering of hops (*Humulus lupulus* L.). *J Agric Food Chem* **51**: 4436-4441
- De Marco V, Stier G, Blandin S, de Marco A** (2004) The solubility and stability of recombinant proteins are increased by their fusion to NusA. *Biochem Biophys Res Commun* **322**: 766-771
- Deavours BE, Liu CJ, Naoumkina MA, Tang Y, Farag MA, Sumner LW, Noel JP, Dixon RA** (2006) Functional analysis of members of the isoflavone and isoflavanone O-methyltransferase enzyme families from the model legume *Medicago truncatula*. *Plant Mol Biol* **62**: 715-733
- Dietz BM, Kang YH, Liu G, Egger AL, Yao P, Chadwick LR, Pauli GF, Farnsworth NR, Mesecar AD, van Breemen RB, Bolton JL** (2005) Xanthohumol isolated from *Humulus lupulus* inhibits menadione-induced DNA damage through induction of quinone reductase. *Chem Res Toxicol* **18**: 1296-1305
- Dixon RA, Blyden ER, Mark PR, Van Tunen AJ, Mol JN** (1988) Comparative biochemistry of chalcone isomerases. *Phytochemistry* **27**: 2801-2808
- Doss RP** (2005) Treatment of pea pods with bruchin B results in up-regulation of a gene similar to MtN19. *Plant Physiol Bioch* **43**: 225-231
- Duke MV, Paul RN, Elsohly HK, Sturtz G, Duke SO** (1994) Localization of artemisinin and artimesitene in foliar tissues of glanded and glandless biotypes of *Artemisia annua*. *Int J Plant Sci* **155**: 365-373

- Duke SO** (1994) Commentary: Glandular trichomes - a focal point of chemical and structural interactions. *Int J Plant Sci* **155**: 617-620
- Edwards R, Dixon RA** (1991) Purification and characterization of S-adenosyl-L-methionine: caffeic acid 3-O-methyltransferase from suspension cultures of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Arch Biochem Biophys* **287**: 372-379
- Effmert U, Saschenbrecker S, Ross J, Negre F, Fraser CM, Noel JP, Dudareva N, Piechulla B** (2005) Floral benzenoid carboxyl methyltransferases: from in vitro to in planta function. *Phytochemistry* **66**: 1211-1230
- ESCOP** (2003) Thieme Verlag, Stuttgart. **2. Auflage**
- Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P** (1998) Base-calling of automated sequencer traces using phred I. Accuracy assessment. *Genome Res* **8**: 175-185
- Ferrer JL, Zubieta C, Dixon RA, Noel JP** (2005) Crystal structures of alfalfa caffeoyl coenzyme A 3-O-methyltransferase. *Plant Physiol* **137**: 1009-1017
- Foley RC, Singh KB** (1994) Isolation of a *Vicia faba* metallothionein-like gene: expression in foliar trichomes. *Plant Mol Biol* **26**: 435-444
- Frick S, Kutchan TM** (1999) Molecular cloning and functional expression of O-methyltransferases common to isoquinoline alkaloid and phenylpropanoid biosynthesis. *Plant J* **17**: 329-339
- Fridman E, Wang J, Iijima Y, Froehlich JE, Gang DR, Ohlrogge J, Pichersky E** (2005) Metabolic, genomic, and biochemical analyses of glandular trichomes from the wild tomato species *Lycopersicon hirsutum* identify a key enzyme in the biosynthesis of methylketones. *Plant Cell* **17**: 1252-1267
- Fritsch H, Biendl M, Stephan A, Stettner G, Methner FJ** (2005) Sensory characterization of xanthohumol and isoxanthohumol. Proceedings of the 30th EBC Congress – Prague 2005, chapter 106, Fachverlag Hans Carl, Nuremberg, Germany
- Fung SY, Brussee J, van der Hoeven RAM, Niessen WMA, Scheffer JJC, Verpoorte R** (1994) Analysis of proposed aromatic precursors of hop bitter acids. *J Nat Prod* **57**: 452-459
- Fung SY, Zuurbier KW, Paniego NB, Scheffer JJC, Verpoorte R** (1997) Enzymes from the biosynthesis of hop alpha- and beta-acids. European Brewery Convention Proceedings of the 26th Congress - Maastricht 1997 **215-221**
- Galloway CA, Sowden MP, Smith HC** (2003) Increasing the yield of soluble recombinant protein expressed in *E. coli* by induction during late log phase. *Biotechniques* **34**: 524-526, 528, 530
- Gamas P, Niebel Fde C, Lescure N, Cullimore J** (1996) Use of a subtractive hybridization approach to identify new *Medicago truncatula* genes induced during root nodule development. *Mol Plant Microbe Interact* **9**: 233-242
- Gang DR, Wang J, Dudareva N, Nam KH, Simon JE, Lewinsohn E, Pichersky E** (2001) An investigation of the storage and biosynthesis of phenylpropenes in sweet basil. *Plant Physiol* **125**: 539-555
- Gang DR, Lavid N, Zubieta C, Chen F, Beuerle T, Lewinsohn E, Noel JP, Pichersky E** (2002) Characterization of phenylpropene O-methyltransferases from sweet basil: facile change of substrate specificity and convergent evolution within a plant O-methyltransferase family. *Plant Cell* **14**: 505-519
- Garcia-Hernandez M, Murphy A, Taiz L** (1998) Metallothioneins 1 and 2 have distinct but overlapping expression patterns in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **118**: 387-397
- Gauthier A, Gulick PJ, Ibrahim RK** (1998) Characterization of two cDNA clones which encode O-methyltransferases for the methylation of both flavonoid and phenylpropanoid compounds. *Arch Biochem Biophys* **351**: 243-249

- Gerhauser C, Alt A, Heiss E, Gamal-Eldeen A, Klimo K, Knauft J, Neumann I, Scherf HR, Frank N, Bartsch H, Becker H** (2002) Cancer chemopreventive activity of xanthohumol, a natural product derived from hop. *Mol Cancer Ther* **1**: 959-969
- Gerhauser C** (2005) Broad spectrum antiinfective potential of xanthohumol from hop (*Humulus lupulus* L.) in comparison with activities of other hop constituents and xanthohumol metabolites. *Mol Nutr Food Res* **49**: 827-831
- Gerhauser C, Frank N** (2005) Xanthohumol, a new all-rounder? *Mol Nutr Food Res* **49**: 821-823
- Gershenzon J, McCaskill D, Rajaonarivony JI, Mihaliak C, Karp F, Croteau R** (1992) Isolation of secretory cells from plant glandular trichomes and their use in biosynthetic studies of monoterpenes and other gland products. *Anal Biochem* **200**: 130-138
- Ghosh S, Rasheedi S, Rahim SS, Banerjee S, Choudhary RK, Chakhaiyar P, Ehtesham NZ, Mukhopadhyay S, Hasnain SE** (2004) Method for enhancing solubility of the expressed recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechniques* **37**: 418, 420, 422-413
- Go ML, Wu X, Liu XL** (2005) Chalcones: an update on cytotoxic and chemoprotective properties. *Curr Med Chem* **12**: 481-499
- Goese M, Kammhuber K, Bacher A, Zenk MH, Eisenreich W** (1999) Biosynthesis of bitter acids in hops. A (13)C-NMR and (2)H-NMR study on the building blocks of humulone. *Eur J Biochem* **263**: 447-454
- Guo WJ, Meenam M, Goldsbrough PB** (2008) Examining the Specific Contributions of Individual *Arabidopsis* Metallothioneins to Copper Distribution and Metal Tolerance. *Plant Physiol* **146**: 1697-1706
- Guterman I, Shalit M, Menda N, Piestun D, Dafny-Yelin M, Shalev G, Bar E, Davydov O, Ovadis M, Emanuel M, Wang J, Adam Z, Pichersky E, Lewinsohn E, Zamir D, Vainstein A, Weiss D** (2002) Rose scent: genomics approach to discovering novel floral fragrance-related genes. *Plant Cell* **14**: 2325-2338
- Gutierrez-Alcala G, Gotor C, Meyer AJ, Fricker M, Vega JM, Romero LC** (2000) Glutathione biosynthesis in *Arabidopsis* trichome cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 11108-11113
- Hare, JD** (2005) Biological activity of acyl glucose esters from *Datura wrightii* glandular trichomes against three native herbivores. *J Chem Ecol* **31**: 1475-1491
- Hahlbrock K, Zilg H, Grisebach H** (1970) Stereochemistry of the enzymatic cyclisation of 4,2',4'-trihydroxychalcone to 7,4'-dihydroxyflavanone by isomerases from mung bean seedlings. *Eur J Biochem* **15**: 13-18
- He XZ, Dixon RA** (1996) Affinity chromatography, substrate/product specificity, and amino acid sequence analysis of an isoflavone O-methyltransferase from alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Arch Biochem Biophys* **336**: 121-129
- He XZ, Dixon RA** (2000) Genetic manipulation of isoflavone 7-O-methyltransferase enhances biosynthesis of 4'-O-methylated isoflavonoid phytoalexins and disease resistance in alfalfa. *Plant Cell* **12**: 1689-1702
- Hemann M, Lukacin R, Ekiert H, Matern U** (2004) Furanocoumarin biosynthesis in *Ammi majus* L. Cloning of bergaptol O-methyltransferase. *Eur J Biochem* **271**: 932-940
- Hibi N, Higashiguchi S, Hashimoto T, Yamada Y** (1994) Gene expression in tobacco low-nicotine mutants. *Plant Cell* **6**: 723-735
- Horlemann C, Schwekendiek A, Hohnle M, Weber G** (2003) Regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of hop (*Humulus lupulus* L.). *Plant Cell Rep* **22**: 210-217

- Huang X, Madan A** (1999) CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Res* **9**: 868-877
- Ibdah M, Zhang XH, Schmidt J, Vogt T** (2003) A novel Mg(2+)-dependent O-methyltransferase in the phenylpropanoid metabolism of *Mesembryanthemum crystallinum*. *J Biol Chem* **278**: 43961-43972
- Ibrahim RK, De Luca V, Khouri HE, Latchinian L, Brisson L, Charest PM** (1987) Enzymology and compartmentation of polymethylated flavonol glycosides in *Chrysosplenium americanum*. *Phytochemistry* **26**: 1237-1245
- Ibrahim RK** (1997) Plant O-methyltransferase signatures. *Trends Plant Sci* **2**: 249-250
- Ibrahim RK, Muzac I** (2000) The methyltransferase gene superfamily: A tree with multiple branches. Romeo J. T. et al. (Ed.), *Recent Adv Phytochem* **34**: 349-384
- Ibrahim RK, Anzellotti D** (2003) The enzymatic basis of flavonoid biodiversity. Romeo J. T. et al. (Ed.), *Recent Adv Phytochem* **37**: 1-36
- Ichimura M, Furuno T, Takahashi T, Dixon RA, Ayabe S** (1997) Enzymic O-methylation of isoliquiritigenin and licodione in alfalfa and licorice cultures. *Phytochemistry* **44**: 991-995
- Inoue K, Sewalt VJ, Murray GB, Ni W, Sturzer C, Dixon RA** (1998) Developmental expression and substrate specificities of alfalfa caffeic acid 3-O-methyltransferase and caffeoyl coenzyme A 3-O-methyltransferase in relation to lignification. *Plant Physiol* **117**: 761-770
- Irani NG, Grotewold E** (2003) Chalcone isomerase: more than just an enzyme? *Phytochemical Society of North America 2003 Annual Meeting August 9-13, Peoria, IL*
- Jerkovic V, Callemien D, Collin S** (2005) Determination of stilbenes in hop pellets from different cultivars. *J Agric Food Chem* **53**: 4202-4206
- Jerkovic V, Collin S** (2007) Occurrence of resveratrol and piceid in American and European hop cones. *J Agric Food Chem* **55**: 8754-8758
- Jez JM, Ferrer JL, Bowman ME, Dixon RA, Noel JP** (2000a) Dissection of malonyl-coenzyme A decarboxylation from polyketide formation in the reaction mechanism of a plant polyketide synthase. *Biochemistry* **39**: 890-902
- Jez JM, Bowman ME, Dixon RA, Noel JP** (2000b) Structure and mechanism of the evolutionarily unique plant enzyme chalcone isomerase. *Nat Struct Biol* **7**: 786-791
- Jez JM, Bowman ME, Noel JP** (2002) Role of hydrogen bonds in the reaction mechanism of chalcone isomerase. *Biochemistry* **41**: 5168-5176
- Jez JM, Noel JP** (2002) Reaction mechanism of chalcone isomerase. pH dependence, diffusion control, and product binding differences. *J Biol Chem* **277**: 1361-1369
- Joshi CP, Chiang VL** (1998) Conserved sequence motifs in plant S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases. *Plant Mol Biol* **37**: 663-674
- Kagan RM, Clarke S** (1994) Widespread occurrence of three sequence motifs in diverse S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases suggests a common structure for these enzymes. *Arch Biochem Biophys* **310**: 417-427
- Kapteyn J, Qualley AV, Xie Z, Fridman E, Dudareva N, Gang DR** (2007) Evolution of cinnamate/p-coumarate carboxyl methyltransferases and their role in the biosynthesis of methylcinnamate. *Plant Cell* **19**: 3212-3229
- Kato M, Mizuno K, Fujimura T, Iwama M, Irie M, Crozier A, Ashihara H** (1999) Purification and characterization of caffeine synthase from tea leaves. *Plant Physiol* **120**: 579-586
- Kato M, Mizuno K, Crozier A, Fujimura T, Ashihara H** (2000) Caffeine synthase gene from tea leaves. *Nature* **406**: 956-957

- Keene CK, Wagner GJ** (1985) Direct demonstration of divatrienediol biosynthesis in glandular heads of tobacco trichomes. *Plant Physiol* **79**: 1026-1032
- Kiefhaber T, Rudolph R, Kohler HH, Buchner J** (1991) Protein aggregation in vitro and in vivo: a quantitative model of the kinetic competition between folding and aggregation. *Biotechnol (N Y)* **9**: 825-829
- Kimura Y, Aoki T, Ayabe S** (2001) Chalcone isomerase isozymes with different substrate specificities towards 6'-hydroxy- and 6'-deoxychalcones in cultured cells of *Glycyrrhiza echinata*, a leguminous plant producing 5-deoxyflavonoids. *Plant Cell Physiol* **42**: 1169-1173
- Kolosova N, Sherman D, Karlson D, Dudareva N** (2001) Cellular and subcellular localization of S-adenosyl-L-methionine:benzoic acid carboxyl methyltransferase, the enzyme responsible for biosynthesis of the volatile ester methylbenzoate in snapdragon flowers. *Plant Physiol* **126**: 956-964
- Lam KC, Ibrahim RK, Behdad B, Dayanandan S** (2007) Structure, function, and evolution of plant O-methyltransferases. *Genome* **50**: 1001-1013
- Lange BM, Wildung MR, McCaskill D, Croteau R** (1998) A family of transketolases that directs isoprenoid biosynthesis via a mevalonate-independent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 2100-2104
- Lange BM, Wildung MR, Stauber EJ, Sanchez C, Pouchnik D, Croteau R** (2000) Probing essential oil biosynthesis and secretion by functional evaluation of expressed sequence tags from mint glandular trichomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 2934-2939
- Levin, DA** (1973) The role of trichomes in plant defense. *Q Rev Biol* **48**:3-15
- Li L, Popko JL, Zhang XH, Osakabe K, Tsai CJ, Joshi CP, Chiang VL** (1997) A novel multifunctional O-methyltransferase implicated in a dual methylation pathway associated with lignin biosynthesis in loblolly pine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 5461-5466
- Liu CJ, Dixon RA** (2001) Elicitor-induced association of isoflavone O-methyltransferase with endomembranes prevents the formation and 7-O-methylation of daidzein during isoflavonoid phytoalexin biosynthesis. *Plant Cell* **13**: 2643-2658
- Liu CJ, Deavours BE, Richard SB, Ferrer JL, Blount JW, Huhman D, Dixon RA, Noel JP** (2006) Structural basis for dual functionality of isoflavonoid O-methyltransferases in the evolution of plant defense responses. *Plant Cell* **18**: 3656-3669
- Livak KJ, Schmittgen TD** (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**: 402-408
- Lopez-Gomez R, Gomez-Lim MA** (1992) A method for extracting intact RNA from fruits rich in polysaccharides using ripe mango mesocarp. *Hortscience* **27**: 440-442
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ** (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**: 265-275
- Lukacin R, Matern U, Specker S, Vogt T** (2004) Cations modulate the substrate specificity of bifunctional class I O-methyltransferase from *Ammi majus*. *FEBS Lett* **577**: 367-370
- Lunkenbein S, Salentijn EM, Coiner HA, Boone MJ, Krens FA, Schwab W** (2006) Up- and down-regulation of *Fragaria x ananassa* O-methyltransferase: impacts on furanone and phenylpropanoid metabolism. *J Exp Bot* **57**: 2445-2453
- Maeda E** (1977) Scanning electron microscope studies on lupulin glands in *Humulus lupulus* L. *Jpn J Crop Sci* **46**: 249-253
- Maleck K, Dietrich RA** (1999) Defense on multiple fronts: how do plants cope with diverse enemies? *Trends Plant Sci* **4**: 215-219

- Mathews H, Clendennen SK, Caldwell CG, Liu XL, Connors K, Matheis N, Schuster DK, Menasco DJ, Wagoner W, Lightner J, Wagner DR** (2003) Activation tagging in tomato identifies a transcriptional regulator of anthocyanin biosynthesis, modification, and transport. *Plant Cell* **15**: 1689-1703
- Matousek J, Novak P, Briza J, Patzak J, Niedermeierova H** (2002) Cloning and characterisation of chs-specific DNA and cDNA sequences from hop (*Humulus lupulus* L.). *Plant Sci* **162**: 1007-1018
- Matousek J, Vrba L, Skopek J, Orctova L, Pesina K, Heyerick A, Baulcombe D, De Keukeleire D** (2006) Sequence analysis of a "true" chalcone synthase (chs_H1) oligofamily from hop (*Humulus lupulus* L.) and PAP1 activation of chs_H1 in heterologous systems. *J Agric Food Chem* **54**: 7606-7615
- Mattiacci L, Rocca BA, Scascighini N, D'Alessandro M, Hern A, Dorn S** (2001) Systemically induced plant volatiles emitted at the time of "danger". *J Chem Ecol* **27**: 2233-2252
- Maxwell CA, Edwards R, Dixon RA** (1992) Identification, purification, and characterization of S-adenosyl-L-methionine: isoliquiritigenin 2'-O-methyltransferase from alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Arch Biochem Biophys* **293**: 158-166
- Maxwell CA, Harrison MJ, Dixon RA** (1993) Molecular characterization and expression of alfalfa isoliquiritigenin 2'-O-methyltransferase, an enzyme specifically involved in the biosynthesis of an inducer of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. *Plant J* **4**: 971-981
- McCaskill D, Gershenzon J, Croteau R** (1992) Morphology and monoterpene biosynthetic capabilities of secreting cell clusters isolated from glandular trichomes of peppermint (*Mentha piperita* L.). *Planta* **187**
- McCaskill D, Croteau R** (1995) Monoterpene and sesquiterpene biosynthesis in glandular trichomes of peppermint (*Mentha x piperita*) rely exclusively on plastid-derived isopentenyl diphosphate. *Planta* **197**: 49-56
- McCaskill D, Croteau R** (1999) Strategies for bioengineering the development and metabolism of glandular tissues in plants. *Nat Biotechnol* **17**: 31-36
- McMurrough I** (1981) High-performance liquid chromatography of flavonoids in barley and hops. *J Chromatogr* **218**: 683-693
- Milligan SR, Kalita JC, Heyerick A, Rong H, De Cooman L, De Keukeleire D** (1999) Identification of a potent phytoestrogen in hops (*Humulus lupulus* L.) and beer. *J Clin Endocrinol Metab* **84**: 2249-2252
- Miranda CL, Stevens JF, Helmrich A, Henderson MC, Rodriguez RJ, Yang YH, Deinzer ML, Barnes DW, Buhler DR** (1999) Antiproliferative and cytotoxic effects of prenylated flavonoids from hops (*Humulus lupulus*) in human cancer cell lines. *Food Chem Toxicol* **37**: 271-285
- Miranda CL, Aponso GL, Stevens JF, Deinzer ML, Buhler DR** (2000) Prenylated chalcones and flavanones as inducers of quinone reductase in mouse Hepa 1c1c7 cells. *Cancer Lett* **149**: 21-29
- Mizuno K, Kato M, Irino F, Yoneyama N, Fujimura T, Ashihara H** (2003a) The first committed step reaction of caffeine biosynthesis: 7-methylxanthosine synthase is closely homologous to caffeine synthases in coffee (*Coffea arabica* L.). *FEBS Lett* **547**: 56-60
- Mizuno K, Okuda A, Kato M, Yoneyama N, Tanaka H, Ashihara H, Fujimura T** (2003b) Isolation of a new dual-functional caffeine synthase gene encoding an enzyme for the conversion of 7-methylxanthine to caffeine from coffee (*Coffea arabica* L.). *FEBS Lett* **534**: 75-81

- Mol JNM, Robbins MP, Dixon RA, Veltkamp E** (1985) Spontaneous and enzymic rearrangement of naringenin chalcone to flavanone. *Phytochemistry* **24**: 2267-2269
- Moustafa E, Wong E** (1967) Purification and properties of chalcone-flavanone isomerase from soya bean seed. *Phytochemistry* **6**: 625-632
- Murfitt LM, Kolosova N, Mann CJ, Dudareva N** (2000) Purification and characterization of S-adenosyl-L-methionine:benzoic acid carboxyl methyltransferase, the enzyme responsible for biosynthesis of the volatile ester methyl benzoate in flowers of *Antirrhinum majus*. *Arch Biochem Biophys* **382**: 145-151
- Muzac I, Wang J, Anzellotti D, Zhang H, Ibrahim RK** (2000) Functional expression of an *Arabidopsis* cDNA clone encoding a flavonol 3'-O-methyltransferase and characterization of the gene product. *Arch Biochem Biophys* **375**: 385-388
- Nagel J, Culley LK, Lu Y, Liu E, Matthews PD, Stevens JF, Page JE** (2008) EST analysis of hop glandular trichomes identifies an O-methyltransferase that catalyzes the biosynthesis of xanthohumol. *Plant Cell* **20**: 186-200
- Namikoshi T, Tomita N, Fujimoto S, Haruna Y, Ohzeki M, Komai N, Sasaki T, Yoshida A, Kashiwara N** (2007) Isohumulones derived from hops ameliorate renal injury via an anti-oxidative effect in Dahl salt-sensitive rats. *Hypertens Res* **30**: 175-184
- Neuhierl B, Thanbichler M, Lottspeich F, Bock A** (1999) A family of S-methylmethionine-dependent thiol/selenol methyltransferases. Role in selenium tolerance and evolutionary relation. *J Biol Chem* **274**: 5407-5414
- Neve RA** (1991) Hops. Chapman and Hall, London
- Newcomb RD, Crowhurst RN, Gleave AP, Rikkerink EH, Allan AC, Beuning LL, Bowen JH, Gera E, Jamieson KR, Janssen BJ, Laing WA, McCartney S, Nain B, Ross GS, Snowden KC, Souleyre EJ, Walton EF, Yauk YK** (2006) Analyses of expressed sequence tags from apple. *Plant Physiol* **141**: 147-166
- Ni X, Hager LP** (1998) cDNA cloning of *Batis maritima* methyl chloride transferase and purification of the enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 12866-12871
- Nicholas, KB, Nicholas, HB Jr** (1997) GeneDoc: A tool for editing and annotating multiple sequence alignments. Distributed by the author. www.psc.edu/biomed/genedoc
- Nikolic D, Li Y, Chadwick LR, Pauli GF, van Breemen RB** (2005) Metabolism of xanthohumol and isoxanthohumol, prenylated flavonoids from hops (*Humulus lupulus* L.), by human liver microsomes. *J Mass Spectrom* **40**: 289-299
- Noel JP, Dixon RA, Pichersky E, Zubieta C, Ferrer JL** (2003) Structural, functional, and evolutionary basis for methylation of plant small molecules. Romeo J. T. et al. (Ed.), *Recent Adv Phytochem* **37**: 37-58
- Nookandeh A, Frank N, Steiner F, Ellinger R, Schneider B, Gerhauser C, Becker H** (2004) Xanthohumol metabolites in faeces of rats. *Phytochemistry* **65**: 561-570
- Novak P, Matousek J, Briza J** (2003) Valerophenone synthase-like chalcone synthase homologues in *Humulus lupulus*. *Biol Plant* **46**: 375-381
- Novak P, Krofta K, Matousek J** (2006) Chalcone synthase homologues from *Humulus lupulus*: some enzymatic properties and expression. *Biol Plant* **50**: 48-54
- Ogawa M, Herai Y, Koizumi N, Kusano T, Sano H** (2001) 7-Methylxanthine methyltransferase of coffee plants. Gene isolation and enzymatic properties. *J Biol Chem* **276**: 8213-8218
- Okada Y, Yamazaki Y, Suh DY, Sankawa U** (2001) Bifunctional activities of valerophenone synthase in hop (*Humulus lupulus* L.). *J Am Soc Brew Chem* **59**: 163-166
- Okada Y, Sano Y, Kaneko T, Abe I, Noguchi H, Ito K** (2004) Enzymatic reactions by five chalcone synthase homologs from hop (*Humulus lupulus* L.). *Biosci Biotechnol Biochem* **68**: 1142-1145

- Oliveira MM, Pais MS** (1988) Glandular trichomes of *Humulus lupulus* var. Brewer's Gold: Ontogeny and histochemical characterization of the secretion. *Nord J of Bot* **8**: 349-359
- Ounaroon A, Decker G, Schmidt J, Lottspeich F, Kutchan TM** (2003) (R,S)-reticuline 7-O-methyltransferase and (R,S)-norcoclaurine 6-O-methyltransferase of *Papaver somniferum* - cDNA cloning and characterization of methyl transfer enzymes of alkaloid biosynthesis in opium poppy. *Plant J* **36**: 808-819
- Page JE, Nagel J** (2006) Biosynthesis of terpenophenolic metabolites in hop and cannabis. Romeo J. T. et al. (Ed.), *Recent Adv Phytochem*, **40**: 179-210
- Paniego NB, Zuurbier KW, Fung SY, van der Heijden R, Scheffer JJ, Verpoorte R** (1999) Phlorisovalerophenone synthase, a novel polyketide synthase from hop (*Humulus lupulus* L.) cones. *Eur J Biochem* **262**: 612-616
- Pertea G, Huang X, Liang F, Antonescu V, Sultana R, Karamycheva S, Lee Y, White J, Cheung F, Parvizi B, Tsai J, Quackenbush J** (2003) TIGR Gene Indices clustering tools (TGICL): a software system for fast clustering of large EST datasets. *Bioinformatics* **19**: 651-652
- Qin G, Gu H, Zhao Y, Ma Z, Shi G, Yang Y, Pichersky E, Chen H, Liu M, Chen Z, Qu LJ** (2005) An indole-3-acetic acid carboxyl methyltransferase regulates *Arabidopsis* leaf development. *Plant Cell* **17**: 2693-2704
- Ralph S, Oddy C, Cooper D, Yueh H, Jancsik S, Kolosova N, Philippe RN, Aeschliman D, White R, Huber D, Ritland CE, Benoit F, Rigby T, Nantel A, Butterfield YS, Kirkpatrick R, Chun E, Liu J, Palmquist D, Wynhoven B, Stott J, Yang G, Barber S, Holt RA, Siddiqui A, Jones SJ, Marra MA, Ellis BE, Douglas CJ, Ritland K, Bohlmann J** (2006) Genomics of hybrid poplar (*Populus trichocarpax* x *deltoides*) interacting with forest tent caterpillars (*Malacosoma disstria*): normalized and full-length cDNA libraries, expressed sequence tags, and a cDNA microarray for the study of insect-induced defences in poplar. *Mol Ecol* **15**: 1275-1297
- Ralston L, Subramanian S, Matsuno M, Yu O** (2005) Partial reconstruction of flavonoid and isoflavonoid biosynthesis in yeast using soybean type I and type II chalcone isomerases. *Plant Physiol* **137**: 1375-1388
- Ravanel S, Gakiere B, Job D, Douce R** (1998) The specific features of methionine biosynthesis and metabolism in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 7805-7812
- Roberts MT, Dufour JP, Lewis AC** (2004) Application of comprehensive multidimensional gas chromatography combined with time-of-flight mass spectrometry (GC x GC-TOFMS) for high resolution analysis of hop essential oil. *J Sep Sci* **27**: 473-478
- Ross JR, Nam KH, D'Auria JC, Pichersky E** (1999) S-Adenosyl-L-methionine:salicylic acid carboxyl methyltransferase, an enzyme involved in floral scent production and plant defense, represents a new class of plant methyltransferases. *Arch Biochem Biophys* **367**: 9-16
- Roughan PG** (1997) Stromal concentrations of coenzyme A and its esters are insufficient to account for rates of chloroplast fatty acid synthesis: evidence for substrate channelling within the chloroplast fatty acid synthase. *Biochem J* **327 (Pt 1)**: 267-273
- Roughan PG, Ohlrogge JB** (1996) Evidence that isolated chloroplasts contain an integrated lipid-synthesizing assembly that channels acetate into long-chain fatty acids. *Plant Physiol* **110**: 1239-1247
- Rudd S** (2003) Expressed sequence tags: alternative or complement to whole genome sequences? *Trends Plant Sci* **8**: 321-329
- Sägesser M, Deinzer M** (1996) HPLC-ion spray-tandem mass spectrometry of flavonol glycosides in hops. *J Am Soc Brew Chem* **54**: 129-134

- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T** (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. **2nd edition**: New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Sambrook J, Russell D** (2001) Molecular cloning: a laboratory manual. **3rd edition**: New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 5463-5467
- Sasaki K, Mito K, Ohara K, Yamamoto H, Yasaki K** (2008) Cloning and characterization of naringenin 8-prenyltransferase, a flavonoid-specific prenyltransferase of *Sophora flavescens*. *Plant Physiol* **146**: 1075-1084
- Saslowsky D, Winkel-Shirley B** (2001) Localization of flavonoid enzymes in *Arabidopsis* roots. *Plant J* **27**: 37-48
- Sawyer JR, Schlom J, Kashmiri SV** (1994) The effects of induction conditions on production of a soluble anti-tumor sFv in *Escherichia coli*. *Protein Eng* **7**: 1401-1406
- Schein CH, Noteborn MHM** (1988) Formation of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli* is favored by lower growth temperature. *Bio/Technology* **6**: 291-294
- Schluckebier G, O'Gara M, Saenger W, Cheng X** (1995) Universal catalytic domain structure of AdoMet-dependent methyltransferases. *J Mol Biol* **247**: 16-20
- Schroder G, Wehinger E, Schroder J** (2002) Predicting the substrates of cloned plant O-methyltransferases. *Phytochemistry* **59**: 1-8
- Schroder G, Wehinger E, Lukacin R, Wellmann F, Seefelder W, Schwab W, Schroder J** (2004) Flavonoid methylation: a novel 4'-O-methyltransferase from *Catharanthus roseus*, and evidence that partially methylated flavanones are substrates of four different flavonoid dioxygenases. *Phytochemistry* **65**: 1085-1094
- Schwekendiek A, Spring O, Heyerick A, Pickel B, Pitsch NT, Peschke F, de Keukeleire D, Weber G** (2007) Constitutive expression of a grapevine stilbene synthase gene in transgenic hop (*Humulus lupulus* L.) yields resveratrol and its derivatives in substantial quantities. *J Agric Food Chem* **55**: 7002-7009
- Seo HS, Song JT, Cheong JJ, Lee YH, Lee YW, Hwang I, Lee JS, Choi YD** (2001) Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: a key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 4788-4793
- Shimada N, Aoki T, Sato S, Nakamura Y, Tabata S, Ayabe S** (2003) A cluster of genes encodes the two types of chalcone isomerase involved in the biosynthesis of general flavonoids and legume-specific 5-deoxy(iso)flavonoids in *Lotus japonicus*. *Plant Physiol* **131**: 941-951
- Shimamura M, Hazato T, Ashino H, Yamamoto Y, Iwasaki E, Tobe H, Yamamoto K, Yamamoto S** (2001) Inhibition of angiogenesis by humulone, a bitter acid from beer hop. *Biochem Biophys Res Commun* **289**: 220-224
- Shirley BW, Hanley S, Goodman HM** (1992) Effects of ionizing radiation on a plant genome: analysis of two *Arabidopsis* transparent testa mutations. *Plant Cell* **4**: 333-347
- Skidmore AF, Beebee TJ** (1989) Characterization and use of the potent ribonuclease inhibitor aurintricarboxylic acid for the isolation of RNA from animal tissues. *Biochem J* **263**: 73-80
- Skopek J, Fussy Z, Matousek J** (2006) Analysis of proteomics of hop chalcone synthases and prenyltransferase(s) - key enzymes of bitter acid and prenylflavonoid biosynthesis in lupulin. Future trends in phytochemistry, a young scientists symposium, Olumouc, Czech Republic
- Stevens JF, Miranda CL, Buhler DR** (1998) Chemistry and biology of hop flavonoids. *J Am Soc Brew Chem* **56**: 136-145

- Stevens JF, Taylor AW, Nickerson GB, Ivancic M, Henning J, Haunold A, Deinzer ML** (2000) Prenylflavonoid variation in *Humulus lupulus*: distribution and taxonomic significance of xanthogalenol and 4'-O-methylxanthohumol. *Phytochemistry* **53**: 759-775
- Stevens JF, Miranda CL, Frei B, Buhler DR** (2003) Inhibition of peroxynitrite-mediated LDL oxidation by prenylated flavonoids: the alpha,beta-unsaturated keto functionality of 2'-hydroxychalcones as a novel antioxidant pharmacophore. *Chem Res Toxicol* **16**: 1277-1286
- Stevens JF, Page JE** (2004) Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health! *Phytochemistry* **65**: 1317-1330
- Tabata N, Ito M, Tomoda H, Omura S** (1997) Xanthohumols, diacylglycerol acyltransferase inhibitors, from *Humulus lupulus*. *Phytochemistry* **46**: 683-687
- Takehita N, Fujiwara H, Mimura H, Fitchen JH, Yamada Y, Sato F** (1995) Molecular cloning and characterization of S-adenosyl-L-methionine:scoulerine-9-O-methyltransferase from cultured cells of *Coptis japonica*. *Plant Cell Physiol* **36**: 29-36
- Taylor AW, Barofsky E, Kennedy JA, Deinzer ML** (2003) Hop (*Humulus lupulus* L.) proanthocyanidins characterized by mass spectrometry, acid catalysis, and gel permeation chromatography. *J Agric Food Chem* **51**: 4101-4110
- Tellez MR, Canel C, Rimando AM, Duke SO** (1999) Differential accumulation of isoprenoids in glanded and glandless *Artemisia annua* L. *Phytochemistry* **52**: 1035-1040
- Teoh KH, Polichuk DR, Reed DW, Nowak G, Covello PS** (2006) *Artemisia annua* L. (Asteraceae) trichome-specific cDNAs reveal CYP71AV1, a cytochrome P450 with a key role in the biosynthesis of the antimalarial sesquiterpene lactone artemisinin. *FEBS Lett* **580**: 1411-1416
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ** (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**: 4673-4680
- Tobe H, Muraki Y, Kitamura K, Komiyama O, Sato Y, Sugioka T, Maruyama HB, Matsuda E, Nagai M** (1997) Bone resorption inhibitors from hop extract. *Biosci Biotechnol Biochem* **61**: 158-159
- Trevisan MTS, Ramos Valdivia AC, Scheffer JJC, Verpoorte R** (1997) Enzyme activities in cell suspension cultures of two hop cultivars after elicitation by a fungal culture filtrate. *Biotechnology Letters* **19**: 207-211
- Van de Peer Y, De Wachter R** (1994) TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Comput Appl Biosci* **10**: 569-570
- Varbanova M, Yamaguchi S, Yang Y, McKelvey K, Hanada A, Borochoy R, Yu F, Jikumaru Y, Ross J, Cortes D, Ma CJ, Noel JP, Mander L, Shulaev V, Kamiya Y, Rodermel S, Weiss D, Pichersky E** (2007) Methylation of gibberellins by *Arabidopsis* GAMT1 and GAMT2. *Plant Cell* **19**: 32-45
- Verhagen LC** (1988) Hop Analysis. *Modern Methods of Plant Analysis*. New Series. Beer Analysis **7**: 67-87
- Verzele M** (1979) The chemistry of hops. *Brew Sci* **1**: 279-323
- Vidgren J, Svensson LA, Liljas A** (1994) Crystal structure of catechol O-methyltransferase. *Nature* **368**: 354-358
- Villaverde A, Carrio MM** (2003) Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies. *Biotechnol Lett* **25**: 1385-1395

- Vogel S, Ohmayer S, Brunner G, Heilmann J (2008) Natural and non-natural prenylated chalcones: synthesis, cytotoxicity and anti-oxidative activity. *Bioorg Med Chem* **16**: 4286-4293
- Wein M, Lavid N, Lunkenbein S, Lewinsohn E, Schwab W, Kaldenhoff R (2002) Isolation, cloning and expression of a multifunctional O-methyltransferase capable of forming 2,5-dimethyl-4-methoxy-3(2H)-furanone, one of the key aroma compounds in strawberry fruits. *Plant J* **31**: 755-765
- Wheeler DL, Barrett T, Benson DA, Bryant SH, Canese K, Chetvernin V, Church DM, DiCuccio M, Edgar R, Federhen S, Geer LY, Helmberg W, Kapustin Y, Kenton DL, Khovayko O, Lipman DJ, Madden TL, Maglott DR, Ostell J, Pruitt KD, Schuler GD, Schriml LM, Sequeira E, Sherry ST, Sirotkin K, Souvorov A, Starchenko G, Suzek TO, Tatusov R, Tatusova TA, Wagner L, Yaschenko E (2006) Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res* **34**: D173-180
- Willits MG, Giovanni M, Prata RT, Kramer CM, De Luca V, Steffens JC, Graser G (2004) Bio-fermentation of modified flavonoids: an example of in vivo diversification of secondary metabolites. *Phytochemistry* **65**: 31-41
- Winkel BS (2004) Metabolic channeling in plants. *Annu Rev Plant Biol* **55**: 85-107
- Wu S, Watanabe N, Mita S, Ueda Y, Shibuya M, Ebizuka Y (2003) Two O-methyltransferases isolated from flower petals of *Rosa chinensis* var. *spontanea* involved in scent biosynthesis. *J Biosci Bioeng* **96**: 119-128
- Yajima H, Ikeshima E, Shiraki M, Kanaya T, Fujiwara D, Odai H, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Oikawa S, Kondo K (2004) Isohumulones, bitter acids derived from hops, activate both peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma and reduce insulin resistance. *J Biol Chem* **279**: 33456-33462
- Yamamoto K, Wang J, Yamamoto S, Tobe H (2000) Suppression of cyclooxygenase-2 gene transcription by humulon of beer hop extract studied with reference to glucocorticoid. *FEBS Lett* **465**: 103-106
- Yang Y, Yuan JS, Ross J, Noel JP, Pichersky E, Chen F (2006) An *Arabidopsis thaliana* methyltransferase capable of methylating farnesoic acid. *Arch Biochem Biophys* **448**: 123-132
- Zhao F, Watanabe Y, Nozawa H, Daikonnya A, Kondo K, Kitanaka S (2005) Prenylflavonoids and phloroglucinol derivatives from hops (*Humulus lupulus*). *J Nat Prod* **68**: 43-49
- Zhigang A, Cuijie L, Yuangang Z, Yejie D, Wachter A, Gromes R, Rausch T (2006) Expression of BjMT2, a metallothionein 2 from *Brassica juncea*, increases copper and cadmium tolerance in *Escherichia coli* and *Arabidopsis thaliana*, but inhibits root elongation in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *J Exp Bot* **57**: 3575-3582
- Ziegler J, Diaz-Chavez ML, Kramell R, Ammer C, Kutchan TM (2005) Comparative macroarray analysis of morphine containing *Papaver somniferum* and eight morphine free *Papaver* species identifies an O-methyltransferase involved in benzyloquinoline biosynthesis. *Planta* **222**: 458-471
- Ziegler J, Voigtlander S, Schmidt J, Kramell R, Miersch O, Ammer C, Gesell A, Kutchan TM (2006) Comparative transcript and alkaloid profiling in *Papaver* species identifies a short chain dehydrogenase/reductase involved in morphine biosynthesis. *Plant J* **48**: 177-192
- Zimeri AM, Dhankher OP, McCaig B, Meagher RB (2005) The plant MT1 metallothioneins are stabilized by binding cadmiums and are required for cadmium tolerance and accumulation. *Plant Mol Biol* **58**: 839-855

- Zubieta C, He XZ, Dixon RA, Noel JP** (2001) Structures of two natural product methyltransferases reveal the basis for substrate specificity in plant O-methyltransferases. *Nat Struct Biol* **8**: 271-279
- Zubieta C, Kota P, Ferrer JL, Dixon RA, Noel JP** (2002) Structural basis for the modulation of lignin monomer methylation by caffeic acid/5-hydroxyferulic acid 3/5-O-methyltransferase. *Plant Cell* **14**: 1265-1277
- Zubieta C, Ross JR, Koscheski P, Yang Y, Pichersky E, Noel JP** (2003) Structural basis for substrate recognition in the salicylic acid carboxyl methyltransferase family. *Plant Cell* **15**: 1704-1716
- Zulak KG, Cornish A, Daskalchuk TE, Deyholos MK, Goodenowe DB, Gordon PM, Klassen D, Pelcher LE, Sensen CW, Facchini PJ** (2007) Gene transcript and metabolite profiling of elicitor-induced opium poppy cell cultures reveals the coordinate regulation of primary and secondary metabolism. *Planta* **225**: 1085-1106
- Zunzain PA, Ghuman J, Komatsu T, Tsuchida E, Curry S**(2003) Crystal structural analysis of human serum albumin complexed with hemin and fatty acid. *BMC Struct Biol* **3**: 6
- Zurbier KWM, Fung SY, Scheffer JJC, Verpoorte R** (1995) Formation of aromatic intermediates in the biosynthesis of bitter acids in *Humulus lupulus*. *Phytochemistry* **38**: 77-82
- Zurbier KWM, Fung SY, Scheffer JJ, Verpoorte R** (1998) *In vitro* prenylation of aromatic intermediates in the biosynthesis of bitter acids in *Humulus lupulus*. *Phytochemistry* **49**: 2315-2322

7 Anhang

7.1 Mikroskopische Techniken

7.1.1 Lichtmikroskopie

Die sich auf den Blättchen der Hopfenzapfen befindlichen Trichome wurden in frischem Zustand unter einem Lichtmikroskop (Zeiss), ausgestattet mit einer Fuji Digital-Kamera (HC-300Z, Zeiss), fotografiert.

7.1.2 Rasterelektronenmikroskopie

Frisch geerntete Hopfenzapfen wurden einzeln in Glasgefäßen in 3% Glutaraldehyd (v/v), 25 mM Natriumphosphat, pH 7,0 bei Raumtemperatur fixiert und dabei 25 min lang unter Vakuum entgast. Nach dem Entfernen der Glutaraldehydlösung wurden die Hopfenzapfen zweimal jeweils 15 min mit 25 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,0 gewaschen. Danach erfolgte ein weiterer Fixierungsschritt in 1% Osmiumtetroxid (v/v), 25 mM Natriumphosphat, pH 7,0 bei Raumtemperatur für ~2 h. Danach wurde die Osmiumtetroxidlösung entfernt und das Material dreimal für jeweils 15 min in ddH₂O gewaschen. In einer aufsteigenden Acetonreihe von 10-100% wurden die Hopfenzapfen für jeweils 10-15 min auf Eis dehydriert und zum Abschluss ein zusätzliches Mal in 100% Aceton gegeben. Um das Material zu Trocknen wurde es in einen „Kritischer Punkt-Trockner“ gegeben und unter Einlass von flüssigem CO₂ für 4,5 h getrocknet. Danach wurden die Hopfenzapfen vorsichtig zerlegt und einzelne Nebenblätter mit Harzdrüsen auf Aluminiumträger geklebt. Die Beschichtung mit Gold erfolgte in einem Edwards Sputter Coater S150 B. Anschließend konnten die Proben bei 30 kV mittels eines Philips 505 Rasterelektronenmikroskops betrachtet und auf Polaroid 665 P/N Film fotografiert werden.

7.2 Sequenzen

| | | |
|------|--|---------------|
| 1 | GGACACAATTCAATCTATTTTACCCAAAAAATAACTAAGAAAGACCAAT ATGGAATCTCTAAGAGGCCA | |
| 1 | | M E S L R G Q |
| 70 | AGAACAGATATGGCAACTCATGTTTCAGCTTTGTTCGACTCCATGGCCTTGAAATGCGCCATCGAGCTTCG | |
| 8 | E Q I W Q L M F S F V D S M A L K C A I E L R | |
| 139 | CATTGCTGACATCATTCACTCTCATGGCAAACCTATAACTCTCTCCCAAATAGCTTCTGGCATTTCGATC | |
| 31 | I A D I I H S H G K P I T L S Q I A S G I R S | |
| 208 | AAACTCCAACCTCCTCCATATCTCCGAATATTCCTTACCTCTCTCGCATCATGAGATTTCTTGTTTCGAAA | |
| 54 | N S N S S I S P N I P Y L S R I M R F L V R K | |
| 277 | GAATATCTTCACTGAACATCAAGAAGATAATGATGAGGTGATCTCATTGTACGGGCTAAGTGATAGCTC | |
| 77 | N I F T E H Q E D N D E V I S L Y G L S D S S | |
| 346 | GAGATGGCTGTTGCGGGATTTTAAGTCAAGCCTGGCTCCCATGGTGCTCATGCAGACTCATCCATTGTC | |
| 100 | R W L L R D F K S S L A P M V L M Q T H P L S | |
| 415 | GATGGCGGTGTGGCATTTCCTTGAGGATTATGTGAGAAACAGCAGCAACACTTTCGAAAAGGCTCACGG | |
| 123 | M A V W H F L E D Y V R N S S N T F E K A H G | |
| 484 | TTGTAACATTTGGGAGTTTTCTCAGCCAATCCAGATTTCAACAAGATCTTCAACAATGCCATGGCGAG | |
| 146 | C N I W E F S S A N P D F N K I F N N A M A S | |
| 553 | TATTGTGCCAATATACATGGGGGCTATGCTTTCAAGTTATAAGGATGGTCTTGGTTGTATTAAAGGAAC | |
| 168 | I V P I Y M G A M L S S Y K D G L G C I K G T | |
| 622 | AGTGGTGGACGTTGGGGGTGGTACGGGCGGCTCCATATCAGAGCTTATGAAATATTATCCAAACATCAA | |
| 189 | V V D V G G G T G G S I S E L M K Y Y P N I K | |
| 691 | AGGGATTAACTTTGACCTGCCACATGTGATTGCCACAGCACCGGCATTGGATGGTGTACCCATATTAG | |
| 212 | G I N F D L P H V I A T A P A L D G V T H I S | |
| 760 | TGGTGACATATTCGAGTCAATTCCTAGTGCTGATGCGGTTTTAATGAAGGGTGTACTACATTGCTTCAG | |
| 235 | G D I F E S I P S A D A V L M K G V L H C F S | |
| 829 | CGATGAAAAATGTGTAAAAGTATTGAGAAATTGTGCGAAAAGCAATAACAGACAAAAAGAATGGGAAGAT | |
| 257 | D E K C V K V L R N C R K A I T V K K N G K I | |
| 898 | TATCATTTTGGAGATTGTGTTGGACCCAACCAGCAATCAAATATTTGACGAGACTCGAATGGTGTACGA | |
| 280 | I I L E I V L D P T S N Q I F D E T R M V Y D | |
| 967 | TTTATTGATTCCACTCTTTAGTGGTGGAAAAGAGAGAACTGAGCTTGAATGGAAAAGGCTATTAAACGA | |
| 303 | L L I P L F S G G K E R T E L E W K R L L N E | |
| 1036 | GGCTGGTTTTACTTCTATCAAAATCACCAAAATTCCAATTATACCTGCTATTATTGAGGCCTTTCTAGT | |
| 326 | A G F T S I K I T K I P I I P A I I E A F L V | |
| 1105 | GTGACAACATCGATCTATCTATATATATATAAACTAGGTTATGTTGCTTTCAACAATAAGTTCCTATT | |
| 349 | * | |
| 1174 | ACTGTTACGGTTATGTATGGTTTGCTGTGATTAATATAATATGTTGGCAAAAA | |

Abbildung 7.1 Nukleinsäuresequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz von HIOMT1. Nukleotide in Fettdruck kennzeichnen den offenen Leserahmen, darunter sind die Aminosäuren dem entsprechenden Triplet im Einbuchstabencode zugeordnet. Das Stoppcodon ist mit einem Stern (*) gekennzeichnet. Zahlen am linken Rand beziehen sich auf die Nukleinsäure- (fett gedruckt) bzw. die Aminosäuresequenz.

Anhang

1 ATCAATCATTGACCTTTCTATAACATAAAAAGAAAAAGAAAAAAGTGAGATTAGTGTAATGGAGT
 1 M E
70 TGGCACGGAATGATCAAACCGAGGCAGCTCTAAGAGGTGAAGCGAACGTATGGAAAAGCATTAAATGGAA
 3 L A R N D Q T E A A L R G E A N V W K S I N G
139 TAGCAGATTTTCATGGTCATGAAATGCGCCTTAGAGTTGAGAATCCCTGATATCGTACACTCGCACTCCG
 26 I A D F M V M K C A L E L R I P D I V H S H S
208 CCCCAATCACTTTGGCCCAAATTGCTTCTTCTGTTCCAGATTCTCCCTCTCTGAACCTCTCCTACCTAT
 49 A P I T L A Q I A S S V P D S P S L N L S Y L
277 CTCGCATCATGCGTCTACTTGTACGTCGTAAGATATTCTCTCAACACAAATCACTAGACGGTGAAGAAG
 72 S R I M R L L V R R K I F S Q H K S L D G E E
346 TTCTCTACGGCCTACTCACTCATCTAGGTTGCTCTTAAAGCAAACTACGTTGCCGGATCAGGTAACCTT
 95 V L Y G P T H S S R L L L S K T T L P D Q V T
415 TGGCTCCGTTTGTTCATTTCATGACCCATCCCTACTTGTTCGGCTCCATGGAGCTGCTTGGCCAGGTGTG
 118 L A P F V A F M T H P Y L S A P W S C L A R C
484 TCAAAGAAGGCGGCAACGGTTTTGAGATGGTCCACGGCGGCCCAATTATGGGACTTGGCTCCAGGGA
 141 V K E G G N G F E M V H G G R Q L W D L A P G
553 ATCCGGAGTTCAACAAGGTTTTCAACGATGGCATGGCGAGCACGGCCAGAATAACAATGATGGCAATTT
 164 N P E F N K V F N D G M A S T A R I T M M A I
622 TGTCCGAATACAGAGATGTCTTTTGTGGGATCGGTTCTTTGGTTCGACGTCGGTGGTGGGTTTGGCGGCT
 187 L S E Y R D V F C G I G S L V D V G G G F G G
691 CAATATCTGCGATTGTGAAATCTCATCCGCACATAAAAAGGCATCAACTATGATCTACCCCATGTTGTCCG
 210 S I S A I V K S H P H I K G I N Y D L P H V V
760 CCACCGCTCCAACGTACACCGGACTAGTGTCCCATGTTGGTGGTAAACATGTTTGAATGGATCCCCACTG
 233 A T A P T Y T G L V S H V G G N M F E W I P T
829 CCGATGCAGTTTTTCATGAAGTGGATACTTCACGATTGGGCCGATGAAGATTGTGTGAAGATCTTGAAAA
 256 A D A V F M K W I L H D W A D E D C V K I L K
898 ATTGTAGAAGAGCAATACCTGAGAAGGGTGGAAAAATTATCATAGTTGACATAGTTTTGGAGCCAGAGG
 279 N C R R A I P E K G G K I I I V D I V L E P E
967 GCAATGGGTTATTTGATGATGCAGCTGTGATGCTCGATATTGCACTAATGGCACTAACACGTGGAAAGG
 302 G N G L F D D A A V M L D I A L M A L T R G K
1036 AGAGAACCAGAGAAGGAGTGAAGAGGGTGTGGGAAGAAGGAGGTTTCCCTCGCTACCAAATCCTCAAAA
 325 E R T E K E W K R V L E E G G F P R Y Q I L K
1105 TTCCAGCTTTAAACATCTGTCATTGAAGCCTATCCACAATGATCATCACTGTATACCTACCCTATTATGA
 348 I P A L T S V I E A Y P Q *
1174 TGTTCTAGTAGTTCATAGTCACTTTCTTAAAGGTGCAATATGGATGAATAAGTTAATTATATTTAAAAAT
1243 AATATGATATCTCCTATATATAATAAATGGCTATGGAATGGAAAATTGATAGTTTAAATGGAAAAA

Abbildung 7.2 Nukleinsäuresequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz von HIOMT2. Nukleotide in Fettdruck kennzeichnen den offenen Leserahmen, darunter sind die Aminosäuren dem entsprechenden Triplet im Einbuchstabencode zugeordnet. Das Stoppcodon ist mit einem Stern (*) gekennzeichnet. Zahlen am linken Rand beziehen sich auf die Nukleinsäure- (fett gedruckt) bzw. die Aminosäuresequenz.

Anhang

1 TATAGATTACTT**CATGGAGAAGCTAAAGAGTTTTAGGCATCTCAACAACAATATAGATTTGATTCTAAA**
1 M E K L K S F R H L N N N I D L I L N

70 TGAAGAGAACAGCACAGAAATACTAGGAGCTCAAGCCCACATATGGAACCAAATCTTCAACTTCATCAA
20 E E N S T E I L G A Q A H I W N Q I F N F I N

139 CTCCATGTCCCTAAAATGTGCCATTCAATTAGGTATAACCAGATATCATCAACAACCATGGAAAACCCAT
43 S M S L K C A I Q L G I P D I I N N H G K P M

208 GACCATTTCTCAACTCACACTTGCACCTCCCATCAATCGAAAAAAATCCCCTTGTGTCTATCGCCTCAT
66 T I S Q L T L A L P I N R K K S P C V Y R L M

277 GCGAATTTTAATTCACCTCTGGCTTTTTTGTCTGCAAAAAGCCGAAGTAGGAGAAGAAGGAGGAGGAGA
89 R I L I H S G F F A L Q K A E V G E E G G G E

346 AGAAGAAGGCTATGTTATTACCGACGCTTCCAAATTAATTTCTCAAGGACAATCCCATGAGTGTACACCC
112 E E G Y V I T D A S K L L L K D N P M S V T P

415 CTTCTTGCTAGCCATGCTTGATCCGGTGATGACTAAGCCTTGGGATTTTCTTAGCAATTGGTTTCAAAA
135 F L L A M L D P V M T K P W D F L S N W F Q N

484 CGGCGATCCTACCCATTTGACACAGCCAATGGGATGGCGTTTTGGGATTATGGTAGCCATGAGCCAAA
158 G D P T P F D T A N G M A F W D Y G S H E P K

553 GCTAGCGCGATTTTTCAACGACGCCATGGCTAGCGATGCACGACTGGTGACGAGCGTGGTGATCGAAAA
181 L A R F F N D A M A S D A R L V T S V V I E K

622 GTGTAAGGGGGTGTGTTGAGGGAGTCGAGTCGTTGGTTGATGTTGGTGGAGGGACTGGGACTGTGGCATC
204 C K G V F E G V E S L V D V G G G T G T V A S

691 ATCAATTGCAGCTGCTTTTTCCCATATTCAATGCACTGTTTTCGATTTACCACATGTTGTAGCTGATT
227 S I A A A F P H I Q C T V F D L P H V V A D L

760 GCAAGGTGGGAATAACCTCAACTTTGTGGTGGGGACATGTTTGTGATGTTCTGCGACTGAAGTAGT
250 Q G G N N L N F V G G D M F V D V P A T E V V

829 TTTGTTGAAGTGGATATTGCATGATTGGAACGATGAAGAAAGTGTA AAAATACTAAAGAAATGCAAAGA
273 L L K W I L H D W N D E E S V K I L K K C K E

898 AGCCATAAGCAAAGCAACAAAAAGGGAGGGAAGGTGATTATAATAGACATGAAAGTTGAAAATGAGAA
296 A I S K S N K K G G K V I I I D M K V E N E K

967 AGACGAAGATGACGAGTCGTATGAAACACAACCTTTCTTCGACATGTTGATGATGGCTTTGGTCACCGG
319 D E D D E S Y E T Q L F F D M L M M A L V T G

1036 ACGAGAGAGAAATGAGAAAGAATGGGCTAAGCTCTTTAAAGATGCAGGTTTCTCAAATTATAAGATTAC
342 R E R N E K E W A K L F K D A G F S N Y K I T

1105 TCCTATTTTGGGTCTAAGATCTCTTATTGAGGTCTATCCATAATTGTAAGTAATATTGTCTCTCATAAG
365 P I L G L R S L I E V Y P *

1174 TTGGTATTGTAATAAGGAAACATAATTATCTAGCGAGTGAGTATGTAAGCCAATGTAATAAGATGGGAA

1243 CAATTGTTAGTGTGTTTACATAAGACTCAAACCTTTATTATCCCGAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAA

Abbildung 7.3 Nukleinsäuresequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz von HIOMT3. Nukleotide in Fettdruck kennzeichnen den offenen Leserahmen, darunter sind die Aminosäuren dem entsprechenden Triplet im Einbuchstabencode zugeordnet. Das Stoppcodon ist mit einem Stern (*) gekennzeichnet. Zahlen am linken Rand beziehen sich auf die Nukleinsäure- (fett gedruckt) bzw. die Aminosäuresequenz.

Anhang

H1OMT4b

1 GGTA AAAATCATGTTTTTTGTATACAAATAACATATAT**ATGT**TACTACTAATACTATAAAATAATAGTTCTC
 1 M Y T N T I N N S S

70 CAACACTATTGGTAAGCAAAGTTCATCAATTAATATTGATATTTTCAATAGTAAAAATATAGCAAAG
 11 P T L L V S K V H Q L I L I F S I V K N I A K

H1OMT4a

139 CAATA**ATG**GAAAGTAGAGCAAGTCTCCACATGAATGGTGGTGGTGGTGGAACTAGCTATGCAACCAATT
 34 A I M E V E Q V L H M N G G V G E T S Y A T N

208 CCTCTCTTCAAAGAGCGGTCTTATCATGTACGAGGGAAACATTGGAAGAAAGCATCAAGGAGGTTTACA
 57 S S L Q R A V L S C T R E T L E E S I K E V Y

277 ATGATAAGCAGTCTTCCCGGAGTGTTTAAAGAATAGCAGACTTAGGCTGCTCCTCAGGCCCTAACACAC
 80 N D K A V F P E C L R I A D L G C S S G P N T

346 TGACTCTTGATCTTACATTATTGACATCGTACAAGCCATTTGCCAATGTTTGAACAAGATCATCAAAC
 103 L T L V S Y I I D I V Q A I C Q C S N K I I K

415 CACCAACTTTTCAAGTCTTTCTCAATGATCTTCCGGGGAACGATTTCAATGTCGTCTTCCAATCCCTTT
 126 P P T F Q V F L N D L P G N D F N V V F Q S L

484 CCAACTTCTATGAGAGGCTTAAGAAAGAAAAGGGTGACGATTTTGGACCCTGCTTCATCGCAGCAATGC
 149 S N F Y E R L K K E K G D D F G P C F I A A M

553 CTGGGAGTTTCTATGGGAAGCTTTTCCCTAACAAATTCTATGCATATTGTTCAATCTTCTTATAGTTTGC
 172 P G S F Y G K L F P N N S M H I V H S S Y S L

622 ATTGGTTGTACAGGTTCCAAGGGAGGTATTAGTGAATAACAAGGAAATATTTACATTTGGAAGACCA
 195 H W L S Q V P R E V L V N N K G N I Y I S K T

691 GCCCTCCTCTGGTTTTTCAAAGCATATTTGGAGCAGTTTTCGAAAGGATTTACAAAATTTCTTGAGATGGC
 218 S P P L V F K A Y L E Q F R K D F T N F L R W

760 GTTCGGAGGAAATAGAAGTTGGTGGTATCATGATAATAACAATCATGGGTAGTATTAGAAGTGATTCTC
 241 R S E E I E V G G I M I I T I M G S I R S D S

829 ATAAAAATATTTGTGAGATAATGGGAAGGGCACTAAAAGACATGGTCAAGGAGAATATAATTGAAGCAG
 264 H K N I C E I M G R A L K D M V K E N I I E A

898 AAAGCTTAGACAATTTCAACATGCCAGTATACTTTGCAAATTTCAACAGAAAGTGGAAAAGTGTGGTTCAAG
 287 E S L D N F N M P V Y F A N S T E V E S V V Q

967 AAGAAGGATCTTTCTGTACAGAAGCTCAATAGTTTTCGAAATGGCTTGGGATTCAGGTTTCACTAGTC
 310 E E G S F S V Q K L N S F E M A W D S G F T S

1036 ATGAACATAATAGTAATAATGAAAAGTGTGAGAGAGGGAAATATGTTTCTGATTACATAAGAGCAGCTG
 333 H E H N S N N E K C E R G K Y V S D Y I R A A

1105 CAGAGCCTATTTTGGTGAACAGTTTGGAAAACTGTAATGGAAGAATTATTTAAGAGGATTGCTGATA
 356 A E P I L V K Q F G K T V M E E L F K R I A D

1174 AGGTCACTGAGTCCATGGCCAAAGAAAAATGGCAGTACCTCAACTTGGTTATTTCTTTGACAAAGAATT
 379 K V T E S M A K E K W Q Y L N L V I S L T K N

1243 AGTCAAGTACAGTACTCTTCATTTGGGCAACTTAGATACTTAAGGATTGGGTAATAAATCACTCCTTTT
 402 *

1312 TTTTTTAATATTTTGGTTGGTAGTTTGTATTTTTCATATATTATATATATATGACAAATTATTACGGGTA

1381 ATATTGTAATATCATTACAAATTTCAATAAAGGAATTTTTTGTCAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Abbildung 7.4 (siehe vorige Seite) Nukleinsäuresequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz von HIOMT4. Nukleotide in Fettdruck kennzeichnen den offenen Leserahmen, darunter sind die Aminosäuren dem entsprechenden Triplet im Einbuchstabencode zugeordnet. Das Stoppcodon ist mit einem Stern (*) gekennzeichnet. Zahlen am linken Rand beziehen sich auf die Nukleinsäure- (fett gedruckt) bzw. die Aminosäuresequenz. Die verschiedenen Startcodons von HIOMT4a und HIOMT4b und die entsprechenden Methionine sind rot hervorgehoben

```

1  GACCCAAAAAGAAGAACTTCACTTATCCACAAAAATGGCCAACAATGGTGAAGGAGAGCAAAACCAAGT
1                               M A N N G E G E Q N Q V

70  CAGCAGGCACCAGGAGGTTGGCCACAAGAGTCTTCTCCAAAGCGATGCTCTGTACCAGTATATTCTTGA
13  S R H Q E V G H K S L L Q S D A L Y Q Y I L E

139 GACTAGTGTCTACCCAAGAGAACCTGAAAGCATGAAGGAGCTCAGGGAAGTGACTGCTAAGCATCCATG
36  T S V Y P R E P E S M K E L R E V T A K H P W

208 GAACATCATGACGACCTCAGCTGATGAAGGTCAATTCTGAAACATGCTTCTCAAGCTCATCAATGCCAA
59  N I M T T S A D E G Q F L N M L L K L I N A K

277 GAACACCATGGAGATCGGTGTTTACACTGGCTACTCTTTCTCGCCACGGCTCTCGCTATTCCCGAAGA
82  N T M E I G V Y T G Y S L L A T A L A I P E D

346 CGGAAAGATTCTGGCTATGGATATTAACAGAGAGAATTACGAACTAGGTCTCCCTATTATTGAAAAAGC
105 G K I L A M D I N R E N Y E L G L P I I E K A

415 TGGCGTTGCTCACAAGATCGATTTTCAAGAGAAGGCCCTGCTCTCCCTGTTCTTGATCAAATGATCGAAGA
128 G V A H K I D F R E G P A L P V L D Q M I E D

484 TGGAAAGTACCATGGGAGCTTTGACTTTATCTTCGTTGACGCTGACAAGGACAACACTACTTGAAC TACCA
151 G K Y H G S F D F I F V D A D K D N Y L N Y H

553 CAAGAGTTGATTGACCTAGTCAAGGTGGCGGTGTAATTGGCTACGACAACACTCTCTGGAACGGTTC
174 K R L I D L V K V G G V I G Y D N T L W N G S

622 TGTGGTGGCGCCACCAGACGCACCACTCCGGAAGTACGTTAGGTACTACAGGGACTTTCGTTATTGAACT
197 V V A P P D A P L R K Y V R Y Y R D F V I E L

691 CAACAAGGCACTCGCTGCTGACCCTAGGATCGAGATCTGTACGCTTCCCGTTGGTGATGGAGTCACTAT
220 N K A L A A D P R I E I C T L P V G D G V T I

760 ATGCCATCGGATCAGCTAAGTTCATTAATAAAAAACAACAACAACAACAAGAAAGAAAAAGAGAAAAGT
243 C H R I S *

829 TTGGGACCTAATCCAGTTCGATACCCCAATGTTGATTGCTGCATATGATAATTGACAAGAAAAGTCAA

898 TAATTTTTTCTTATTTTGATTTCTTCTTTTAAATGTTTTACAATATTTTACACAATTTGTGTTTGC GCA

967 TTAATTTGTATTTGGCAATTGGCCTAAGAAAAAGGTTGGACTTGGGCGTAATATCTTCAAATTTTATAT

1036 ATAATTTGGTGCTTTCTGATTTTTCTTTTATTAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

Abbildung 7.5 Nukleinsäuresequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz von HIOMT5. Nukleotide in Fettdruck kennzeichnen den offenen Leserahmen, darunter sind die Aminosäuren dem entsprechenden Triplet im Einbuchstabencode zugeordnet. Das Stoppcodon ist mit einem Stern (*) gekennzeichnet. Zahlen am linken Rand beziehen sich auf die Nukleinsäure- (fett gedruckt) bzw. die Aminosäuresequenz.

Anhang

| | |
|------------|---|
| 1 1 | CAACACA ACTCCATCTCTCTTTTCATTTTCAACACAAACTTTTCAGAAAAATGGCAACTGCCCTCAACTCA M A T A L N S |
| 70 8 | AAGAATGCAAGCTCCAACACCGCGGTTACATTGAGCCGAAGACCGGCATTGCTTTTCCGGTTAAATTG K N A S S N T A V H I E P K T G I A F P V K L |
| 139 31 | GACGATGGCAAAAGCTTGAACAGTGTGGCTTGAGGAAGAAATCCCTACTTGGCATGGGAATTAAGTT D D G K S L N S V G L R K K S L L G M G I K V |
| 208 54 | TTTGGTTTTGGGTTGTATGCAGATAATGAGAAGTTGAAAAATCTTTTGAAGTTAAAAATAGGGAAATCC F G F G L Y A D N E K L K N L L K L K I G K S |
| 277 77 | CCAGCAAAACCAACAGAGGAGATGTATCAGCTGGTAATCGATGGTGATATAGGGTTGACACACAAAATA P A K P T E E M Y Q L V I D G D I G L T H K I |
| 346 100 | GTAATTGCCTATTCTGGCCTGAAAATGAATATGTTCAAAAAGGCCTTTAGTGAAGCACTGGGAGAATCT V I A Y S G L K M N M F K K A F S E A L G E S |
| 415 123 | ATAATGAAACTCAATGGTGGCCGAAAGAACGAGGAGCTTGCAAACAAAGTTTTAGGTCCTGCATCTGAT I M K L N G G R K N E E L A N K V L G P A S D |
| 484 146 | CAAATCAAGTTAGCAACTGGTTCTGAAATGGAGATATCTAAACTACCAGGATATGTTCTTGAAACAAAA Q I K L A T G S E M E I S K L P G Y V L E T K |
| 553 169 | GTGCATGGAGAACTTGCAGCAGGGTTGAGAGTGAACCTTTTGCAGAGCCTATTTTCGGAATATATCTA V H G E L A S R V E S E L L C R A Y F G I Y L |
| 622 192 | GGAGAGAATACGATGGAGTGTTACAAGGAATCGAAAGAGATGTTCCGACAGTCCATGCTTTCTCTCTTC G E N T M E C Y K E S K E M F G Q S M L S L F |
| 691 215 | TAAGAGATTGGTGAAACAGTTTTCAATCAATAAGGTTCAAGTCTGCACTACTTATTAGGAACAAAGCTAC * |
| 760 | TTATTCAATAAGAATGGAGACAATGAGAATGTTTTTCTTCTTTCTGTCATAAAATCCAAGTGTGTTTTTA |
| 829 | TGCTACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA |

Abbildung 7.6 Nukleinsäuresequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz von HICHI1. Nukleotide in Fettdruck kennzeichnen den offenen Leserahmen, darunter sind die Aminosäuren im Einbuchstabencode zugeordnet. Das Stoppcodon ist mit einem Stern (*) gekennzeichnet. Zahlen am linken Rand beziehen sich auf die Nukleinsäure- (fett gedruckt) bzw. die Aminosäuresequenz.

Anhang

| | |
|------------|--|
| 1 | GACCATCAAAACTCCATTTCTCTTTTCATTTCTTTTCATCATATTAACACAAACTCAAATAATGGCAAC |
| 1 | M A T |
| 70 | TTTCCAGAGTGGAAAGCTCCAACGCCGCCGCCAAGGAGGTGGCGGTTACATTGAGTCAAAGACTGGCAT |
| 4 | F Q S G S S N A A A K E V A V H I E S K T G I |
| 139 | TGCTTTTCCGGTTAAATTA AACGATGGCAAAAGCTTGA ACTGTGTTGGCTTGAACAAGAAATCTATACT |
| 27 | A F P V K L N D G K S L N C V G L N K K S I L |
| 208 | TGGCCTGAACATTAAGGTTTATGGCTTTGCGTTGTATGCAGATAATGAGAAGTTGAAAAGTCTTTTGAA |
| 50 | G L N I K V Y G F A L Y A D N E K L K S L L K |
| 277 | GTTAAAAATAGGAAAATCCCCAGCAAAACCAACAGAGGAGATGTATCAGTTGGCAATCGATGGTGATTT |
| 73 | L K I G K S P A K P T E E M Y Q L A I D G D F |
| 345 | TGGTATGACTATCAAAATAGTAACTGTCTTTTCTGGCCTGAAAAGTGAGCATGGTCAAAAAGA ACTTCAG |
| 96 | G M T I K I V T V F S G L K V S M V K K N F S |
| 415 | TGAAGCTGTGGTAGAATCTATAATGAAACTCACTGGTGGCCAAAAGAATGAGGACCTTGCAAACAAAAT |
| 119 | E A V V E S I M K L T G G Q K N E D L A N K I |
| 484 | TTTAGGTTCTGCATCTGATAAAATCAAGTTAGCAACTGGTTCTGAATTGGAGATATCTAAACTACCAGG |
| 142 | L G S A S D K I K L A T G S E L E I S K L P G |
| 553 | ATATGTTCTTGAAAACAAAAGTGAATGGAGAGCTTGTGAGCAGGGTTGAGAGTGA ACTTCTTTGCAGAGC |
| 165 | Y V L E T K V N G E L V S R V E S E L L C R A |
| 622 | CTATTTTTCGAATGTATCTAGGAGAGGATACGATGGAGTGTGACAAGGAATCGAGAGAGATGTTCCGGTCA |
| 188 | Y F R M Y L G E D T M E C D K E S R E M F G Q |
| 691 | GTCCATGCTTTCTCTCTTCTAAGAGATTGGAGAAACAGTTTCAATCAATAAGATTCAAGTCTGCACTAC |
| 211 | S M L S L F * |
| 760 | TATTATTAGGAACAAAGCTACTTACTTATTCAATAAGAATGGAGACAATGAGAATGTTTTTCTTCTTTT |
| 829 | TGTCATAGATTGCAAGTGTGTTTAATGCTTCACATACTTTGTTTAAGCATACAATCCGAGGAGCTCATT |
| 898 | TCATACAAACAAACAGCAGTTAGTGCATTACCGAAAATACAAGAAGCAAAGCTCTTCTTTTGTCTTGAA |
| 967 | TTTTTACTCTTTACCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA |

Abbildung 7.7 Nukleinsäuresequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz von HlCHI2. Nukleotide in Fettdruck kennzeichnen den offenen Leserahmen, darunter sind die Aminosäuren im Einbuchstabencode zugeordnet. Das Stoppcodon ist mit einem Stern (*) gekennzeichnet. Zahlen am linken Rand beziehen sich auf die Nukleinsäure- (fett gedruckt) bzw. die Aminosäuresequenz.

Anhang

| | |
|-----|--|
| 1 | ACACTCACTTAAATAACACCAGGCACTAATTTTTTTCTCTTCAATTGCTTTCTGTTCTTCTTTATTCAA |
| 70 | ATTCCCAACCACCCTAATATACTGCATCATGGAAAACAACATGGTGATGGTGATGAAATCCCTTTTCC |
| 1 | M E N N M V M V H E I P F P |
| 139 | TCCTGAGATCAAGACCACCAAGCCATTATCTCTATTGGGTTATGGTATCACAGACATGGAGATACACTT |
| 15 | P E I K T T K P L S L L G Y G I T D M E I H F |
| 208 | TCTTCAAATCAAGTTCACAGCAATTGGAGTGTACTTGGACTCCGATGTTGTGAAACATCTACAACAATG |
| 38 | L Q I K F T A I G V Y L D S D V V K H L Q Q W |
| 277 | GAAAGGGAAAAAGGGGAACGAACTAGCTGAAGACGATGACTTCTTTTGATGCCCTTATCTCAGCCCCTGT |
| 61 | K G K K G N E L A E D D D F F D A L I S A P V |
| 346 | GGAGAAGTATTTAAGGATTGTGGTGATCAAGGAGATCAAAGGGTCCCAATACGGAGTTCAGCTAGAGAG |
| 84 | E K Y L R I V V I K E I K G S Q Y G V Q L E S |
| 415 | TTCAGTAAGGGATCGTTTGGCTGCAGAGGACATGTATGAAGAAGAAGAAGAGCTGCTTTGGAGAAAAT |
| 107 | S V R D R L A A E D M Y E E E E E A A L E K I |
| 484 | CGTTGAGTTTCTCCAGTCCAAATATTTTAAGAAAAGACACTCTTATTACTTTCCATTTCAGCTACTTC |
| 130 | V E F L Q S K Y F K K D T L I T F H F P A T S |
| 553 | TCCCCTGCTGAGATTGTGGTGACGCTCGAAGGGAAAGAAGAGTCGAAGCTAAAAGTGGAGAATAAAAA |
| 153 | P T A E I V V T L E G K E E S K L K V E N K N |
| 622 | TGTGGTTGACATGATCAAAAAATGGTATCTGGGAGGGACCAGTGGGGTGTCTCCATCAACCATTTCTTC |
| 176 | V V D M I K K W Y L G G T S G V S P S T I S S |
| 691 | CTTGGCTGATAACCTCTCTGCTGAGTTATCTAAATAAAGCTTTTGTCTGCTGCTTATGAAAATGTGGT |
| 199 | L A D N L S A E L S K * |
| 760 | GCCTCCAATCTAGTTCTCTATTTTTCTTTTTTTCTTGCCCATGGAAAATGGGACACATAGTCACTGTAT |
| 829 | CTCTCTGCCTTTGGTTATGAATAAAATTAATGAAGCTTAATATATCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA |
| 898 | AAAAAAA |

Abbildung 7.8 Nukleinsäuresequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz von HlCHI3. Nukleotide in Fettdruck kennzeichnen den offenen Leserahmen, darunter sind die Aminosäuren im Einbuchstabencode zugeordnet. Das Stoppcodon ist mit einem Stern (*) gekennzeichnet. Zahlen am linken Rand beziehen sich auf die Nukleinsäure- (fett gedruckt) bzw. die Aminosäuresequenz.

Danksagung

Diese Arbeit wurde am Institut für Pflanzenbiochemie in Halle und am NRC-Plant Biotechnology Institute in Saskatoon, Kanada angefertigt. Mein besonderer Dank gilt Dr. Jonathan Page, der es mir mit der Überlassung des Themas ermöglichte, mich eingehend mit dieser interessanten Problematik auseinanderzusetzen. Bedanken möchte ich mich für die intensive wissenschaftliche Betreuung und die stete Bereitschaft zur Diskussion. Nicht zuletzt hat erst sein großes Engagement die Fortführung des Projektes am PBI ermöglicht. Sein Optimismus hat den Fortgang der Arbeit sehr positiv beeinflusst.

Prof. Dr. Kutchan und Prof. Dr. Wasternack danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am Institut für Pflanzenbiochemie in Halle in der Anfangs- und Endphase der Arbeit.

Bei Prof. Dr. Dierk Scheel möchte ich mich für die Übernahme der Aufgabe des betreuenden Hochschullehrers bedanken.

Dr. Thomas Vogt bin ich für das kritische Lesen der Arbeit sehr dankbar.

An Enwu Liu richtet sich ein großes Dankeschön. Von seiner langjährigen Erfahrung im molekularbiologischen Arbeiten konnte ich viel profitieren. Außerdem hat er wesentlich zur Schaffung eines wunderbaren Arbeitsklimas beigetragen. Sandra Polvi danke ich für die Betreuung der Pflanzen und ihre stete Hilfsbereitschaft. Yuping Lu sei gedankt für die Anleitung bei der Vorbereitung und Analyse der NMR-Proben. Auch allen anderen Mitarbeitern meiner Arbeitsgruppe am PBI möchte ich für die schöne Zeit im und außerhalb des Labors danken.

Allen Mitarbeitern und besonders den ehemaligen Doktoranden der Abteilung NBT am IPB sei recht herzlich gedankt für ihre Hilfe und Unterstützung im Laboralltag, ein extra Dank geht hier an Verona Wilde.

Vielen Dank an Greg Bishop und Richard Hughes für die Durchführung der massenspektrometrischen Analysen. Auch der Service-Abteilung für DNA-Sequenzierung sowie der Bioinformatikabteilung des PBI bin ich sehr zu Dank verpflichtet. Dr. Patricia Polowick danke ich für die Anleitung bei den elektronischenmikroskopischen Arbeiten.

Dr. Andrea Porzel und Dr. Jürgen Schmidt bin ich für die Hilfe mit den NMR- bzw. massenspektrometrischen Analysen sehr dankbar.

Dr. Fred Stevens danke ich für die Bereitstellung von Substraten. Dr. Martin Biendl, Timo Lambertsen (Mainburg) und Hopfenhof Regner (Edderitz) sei gedankt für die Bereitstellung von Pflanzenmaterial.

Die Arbeit wurde finanziell von der Firma S. S. Steiner getragen.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und vor allem bei Stefan für seine Geduld und Ausdauer und so vieles mehr bedanken.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Jana Nagel
geboren am 11.01.1975 in Halle (Saale)
ledig

Bildungsgang und Tätigkeiten

| | |
|-----------------|--|
| 1981-1990 | Polytechnische Oberschule in Domnitz und Rothenburg/Saale |
| 1990-1993 | BBS V und Christian Wolff-Gymnasium in Halle/Saale, Abitur |
| 1993-1995 | Kinderbetreuung und AuPair in Vermont/USA |
| 1995-1996 | Studium der Ernährungswissenschaften an der Friedrich-Schiller-Universität Jena |
| 1996-2002 | Studium der Biologie an der Friedrich-Schiller-Universität Jena |
| Sept. 1999 | Praktikum bei der Firma „Probiodrug AG“ in Halle |
| Feb.–Juli 2000 | Auslandsstudium an der Universidad Complutense de Madrid, Spanien |
| 2001-2002 | Diplomarbeit am Institut für Molekulare Biotechnologie Jena, Abt. Genomanalyse zum Thema: „Identifizierung von konservierten Regionen des X-Chromosoms (q28) durch spezieübergreifende Sequenzanalyse“ |
| 2003-2007 | Promotion am Institut für Pflanzenbiochemie in Halle, Abt. Naturstoffbiotechnologie und am NRC-Plant Biotechnology Institute in Saskatoon/Kanada |
| seit Sept. 2007 | Elternzeit |

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich mich mit der vorliegenden Dissertation erstmals um die Erlangung eines Doktorgrades bewerbe.

Ferner erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, 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 zu haben.

Halle (Saale), den 31.07.2007