

**Das Gen der  
Sinapoylglucose:L-Malat-Sinapoyltransferase  
von *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.  
(Ackerschmalwand):**

**Klonierung durch T-DNA-Tagging  
und Versuche zur Expression  
in *Escherichia coli***

**Dissertation**

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

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät  
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

**Claus-Ulrich Leheldt**  
geb. am 15.4.1962 in Schleswig

**Halle (Saale), den 11.04.2001**

**Gutachter:**

1. Prof. Dr. rer. nat. Dieter Strack
2. Prof. Dr. rer. nat. Thomas Hartmann
3. Prof. Dr. rer. nat. Claus Wasternak

## Danksagung

Diese Arbeit wurde am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie in Halle (Saale) unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Dieter Strack angefertigt.

Bei Herrn Prof. Strack möchte ich mich sehr herzlich für die Überlassung des interessanten Themas, für die sehr gute Förderung und Betreuung sowie das stete Interesse am Fortgang der Arbeit bedanken.

Ein Teil dieser Arbeit wurde im Rahmen einer Kooperation unter Anleitung von Herrn Prof. Clint Chapple im Department of Biochemistry der Purdue University in West Lafayette (Indiana, USA) angefertigt.

Herrn Prof. Chapple möchte ich sehr herzlich dafür danken, dass ich in seiner Arbeitsgruppe an der vorliegenden Dissertation arbeiten konnte, außerdem für die sehr gute Betreuung und Zusammenarbeit.

Mein Dank gilt des weiteren Herrn Dr. Max Ruegger für die gewährte Unterstützung bei der Durchführung der Klonierungsarbeiten und Frau Joanne Cusumano für die Ausführung der Northern-Analyse.

Allen anderen Mitarbeitern von Herrn Prof. Chapple, die mir in vielfacher Hinsicht geholfen haben, sei an dieser Stelle ebenfalls sehr herzlich gedankt.

Ein Teil dieser Arbeit wurde zudem von Herrn Dr. Thomas Vogt und Herrn Dr. Jochen Winter am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie betreut, denen ich dafür auch meinen sehr herzlichen Dank ausspreche.

Allen anderen Mitarbeitern der Abteilung Sekundärstoffwechsel danke ich ebenso sehr herzlich für die vielfältig gewährte Unterstützung im Laboralltag.

**Teilergebnisse aus dieser Arbeit sind in folgende Veröffentlichungen eingegangen:**

**Zeitschriftenaufsätze:**

**Lehfeldt C, Shirley AM, Meyer K, Ruegger MO, Cusumano JC, Viitanen PV, Strack D, Chapple C.** 2000. Cloning of the *SNG1* gene of *Arabidopsis* reveals a role for a serine carboxypeptidase-like protein as an acyltransferase in secondary metabolism. *Plant Cell* 12:1295-1306.

**Beiträge zu wissenschaftlichen Tagungen:**

Poster:

**Lehfeldt C, Ruegger MO, Strack D, Chapple C.** Cloning of the *SNG1* locus of *Arabidopsis* [abstract]. In: The North American *Arabidopsis* Steering Committee. 9th International Conference on *Arabidopsis* Research, program and abstracts book; 1998 Jun 24-28; University of Wisconsin-Madison, USA. Madison: [publisher unknown]. p 94. Abstract No. 94.

Vorträge:

**Lehfeldt C, Ruegger MO, Cusumano JC, Strack D, Chapple C.** Cloning of the *SNG1* locus of *Arabidopsis* by T-DNA tagging. In: Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie (IPB). Tag der Wissenschaft; 1997 Sep 3; Halle (Saale), Sachsen-Anhalt, Germany.

**Lehfeldt C, Ruegger MO, Strack D, Chapple C.** Cloning of the *SNG1* locus of *Arabidopsis* [abstract]. In: Deutsche Botanische Gesellschaft. Sekundäre Pflanzenstoffe, Symposium, program and abstracts book; 1999 Sep 30-Okt 2; Jena, Thüringen, Germany. Jena: [publisher unknown]. p 26. Abstract No. 18.

## Abkürzungsverzeichnis

BAC	künstliches bakterielles Chromosom
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaar
cDNA	komplementäre DNA
cfu	<i>colony forming unit</i>
DC	Dünnschichtchromatographie
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMS	Ethylmethansulfonat
F5H	Ferulasäure-5-Hydroxylase
<i>fah</i>	<i>ferulic acid-5-hydroxylase</i>
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie
kDa	Kilodalton
kb	Kilobasenpaar
LB	Luria-Bertani
MS	Murashige und Skoog
NPT	Neomycin-Phosphotransferase
ORF	Offenes Leseraster
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
pfu	<i>plaque forming unit</i>
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
SCE	<i>O</i> -Sinapoylcholin-Esterase
SCT	1- <i>O</i> -Sinapoyl- $\beta$ -D-glucose:Cholin- <i>O</i> -Sinapoyltransferase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SGT	Uridin-5'-diphosphat (UDP)-Glucose:Sinapinsäure-Glucosyltransferase
SNG	<i>Sinapoylglucose Accumulator</i>
SMT	1- <i>O</i> -Sinapoyl- $\beta$ -D-glucose:L-Malat- <i>O</i> -Sinapoyltransferase
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
T-DNA	Transfer-DNA
TE	10 mmol L <sup>-1</sup> Tris-HCl, 1 mmol L <sup>-1</sup> EDTA (pH 8,0)
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Einheit einer Enzymaktivität

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	1
<b>1.1</b>	<b>Der Stoffwechsel der Sinapinsäureester</b>	1
<b>1.2</b>	<b>Die Klonierung des <i>SMT</i>-Gens</b>	6
1.2.1	Klonierung des <i>SMT</i> -Gens ausgehend vom Protein	6
1.2.2	Klonierung des <i>SMT</i> -Gens aus einer Mutante	7
<b>1.3</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit</b>	10
<b>2</b>	<b>Material</b>	12
2.1	<i>Arabidopsis</i>	12
2.2	Bakterien	12
2.3	Bibliotheken	12
2.4	Proteine	12
2.5	Nukleinsäuren	12
2.6	Kits	13
2.7	Chemikalien	13
2.8	Verbrauchsmaterialien	13
2.9	Geräte	14
2.10	Computerprogramme	14
2.11	Datenbanken	14
<b>3</b>	<b>Methoden</b>	16
<b>3.1</b>	<b><i>Arabidopsis</i></b>	16
3.1.1	Kultivierung	16
3.1.1.1	Topfkultur	16
3.1.1.2	Flüssigkultur	16
3.1.1.3	Agarkultur	16
3.1.1.4	Samensterilisation	16
3.1.2	Transformation	16
3.1.2.1	Anzucht der Pflanzen	17
3.1.2.2	Präparation von <i>A. tumefaciens</i>	17
3.1.2.3	Vakuuminfiltration	17
3.1.2.4	Kultivierung infiltrierter Pflanzen	17
3.1.2.5	Selektion auf transformierte Pflanzen	17
3.1.3	Extraktionen	18
3.1.3.1	DNA	18
3.1.3.2	RNA	18
3.1.3.3	Sinapinsäureester	19
3.1.3.4	SMT	19
<b>3.2</b>	<b>Bakterien</b>	19
3.2.1	Kultivierung	19
3.2.2	Transformationen	20
3.2.2.1	Präparation kompetenter Zellen von <i>E. coli</i>	20
3.2.2.2	Hitzeschock-Transformation von <i>E. coli</i>	20

3.2.2.3	Elektroporation von <i>E. coli</i>	20
3.2.2.4	Präparation kompetenter Zellen von <i>A. tumefaciens</i>	20
3.2.2.5	Elektroporation von <i>A. tumefaciens</i>	21
3.2.3	Extraktionen	21
3.2.3.1	Minipräparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	21
3.2.3.2	Minipräparation von Cosmid-DNA aus <i>E. coli</i>	21
3.2.3.3	Midipräparation von Cosmid-DNA aus <i>E. coli</i>	22
3.2.3.4	Minipräparation von Plasmid- und Cosmid-DNA aus <i>A. tumefaciens</i>	22
<b>3.3</b>	<b>Nukleinsäuren</b>	<b>23</b>
3.3.1	Basismethoden für DNA	23
3.3.1.1	Enzymatische Modifikationen	23
3.3.1.2	Konzentration und Reinigung	23
3.3.1.3	Agarosegel-Elektrophorese	23
3.3.1.4	Gelextraktion von DNA-Fragmenten	24
3.3.1.5	Polymerase-Kettenreaktion	24
3.3.1.6	Klonierung von PCR-Fragmenten	24
3.3.1.7	Radioaktive Markierung	25
3.3.1.8	Reinigung radioaktiver Sonden	25
3.3.1.8	Automatische Sequenzierung	25
3.3.1.9	Manuelle Sequenzierung	26
3.3.2	Southern-Analyse	27
3.3.2.1	Southern-Transfer	27
3.3.2.2	Southern-Hybridisierung	27
3.3.3	Northern-Analyse	27
3.3.3.1	Northern-Transfer	27
3.3.3.2	Northern-Hybridisierung	28
3.3.4	Klonierungsmethoden	28
3.3.4.1	Plasmid-Rescue	28
3.3.4.2	Inverse PCR	29
3.3.5	Bibliotheks-Analysen	29
3.3.5.1	Genomische Bibliothek	29
3.3.5.2	cDNA-Bibliothek	29
<b>3.4</b>	<b>Expression in <i>E. coli</i></b>	<b>30</b>
3.4.1	Induktion der Expression	30
3.4.2	Analyse der Induktion	30
3.4.2.1	SDS-PAGE	30
3.4.2.2	Proteinfärbung	31
3.4.3	Analyse der Lokalisation	31
3.4.3.1	Extraktion der Proteine des Periplasmas	31
3.4.3.2	Extraktion der löslichen und unlöslichen Proteine des Zytoplasmas durch Aufschluss in der FRENCH-Druckzelle	31
3.4.3.3	SDS-PAGE der Proteinfraktionen	32

3.4.4	Extraktion und Konzentration der löslichen Proteine	32
3.4.4.1	Extraktion der löslichen Proteine durch Aufschluss mit Ultraschall	32
3.4.4.2	Konzentration der Proteinextrakte durch Ultrafiltration	32
3.4.4.3	Bestimmung des Proteingehaltes der Extrakte	32
3.4.5	Analyse der SMT-Aktivität	33
3.4.5.1	SMT-Enzymtest	33
3.4.5.2	Dünnschichtchromatographie	33
3.4.5.3	Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie	33
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>34</b>
<b>4.1</b>	<b>Versuche zur Klonierung der SMT-Gens aus <i>Brassica rapa</i></b>	<b>34</b>
<b>4.2</b>	<b>Isolation von genomischer DNA aus dem SNG1-Gen von <i>Arabidopsis</i></b>	<b>35</b>
4.2.1	Plasmid-Rescue aus der Mutante <i>sng1-4</i>	35
4.2.2	Southern-Analyse der T-DNA-Insertion in der Mutante <i>sng1-4</i>	36
4.2.3	Inverse PCR mit der Mutante <i>sng1-4</i>	39
<b>4.3</b>	<b>Isolation eines genomischen Klons des SNG1-Gens von <i>Arabidopsis</i></b>	<b>41</b>
4.3.1	Analyse der <i>abil</i> -Bibliothek	41
4.3.2	Klonierung der Cosmidfragmente	43
4.3.3	Sequenzanalyse der Cosmidfragmente	44
4.3.4	Northern-Analyse der Cosmidfragmente	44
4.3.5	Komplementation der Mutante <i>sng1-1</i> mit dem Cosmid 1	45
4.3.6	Analyse der SNG1-Gens von <i>Arabidopsis</i>	46
<b>4.4</b>	<b>Isolation eines cDNA-Klons für das SNG1-Gen von <i>Arabidopsis</i></b>	<b>48</b>
4.4.1	Analyse einer cDNA-Bibliothek	48
4.4.2	Klonierung der cDNA des SNG1-Gens	49
4.4.3	Sequenzanalyse der cDNA des SNG1-Gens	50
4.4.4	Klonierung der cDNA des SNG1-Gens in den Vektor pBI121	54
4.4.5	Komplementation der Mutante <i>sng1-1</i> mit der cDNA des SNG1-Gens	55
<b>4.5</b>	<b>Versuche zur Expression des SNG1-Proteins in <i>E. coli</i></b>	<b>56</b>
4.5.1	Klonierung des SNG1-Gens in den Vektor pET-20b(+)	56
4.5.2	Expression des SNG1-Proteins im Vektor pET-20b(+)	57
4.5.3	Klonierung des SNG1-Gens in den Vektor pCW Ori+	59
4.5.4	Expression des SNG1-Proteins im Vektor pCW Ori+	61
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>62</b>
<b>5.1</b>	<b>Die Klonierung des SMT-Gens</b>	<b>62</b>
<b>5.2</b>	<b>Die Analyse des SMT-Gens</b>	<b>71</b>
<b>5.3</b>	<b>Zukünftige Arbeiten</b>	<b>79</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>81</b>

<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	83
<b>8</b>	<b>Anhang</b>	92
<b>8.1</b>	<b>Primer</b>	92
<b>8.2</b>	<b>N-terminales Peptid der SMT aus <i>Brassica rapa</i></b>	92
<b>8.3</b>	<b>DNA- und Aminosäuresequenz des <i>SNG1</i>-Gens von <i>Arabidopsis</i></b>	93

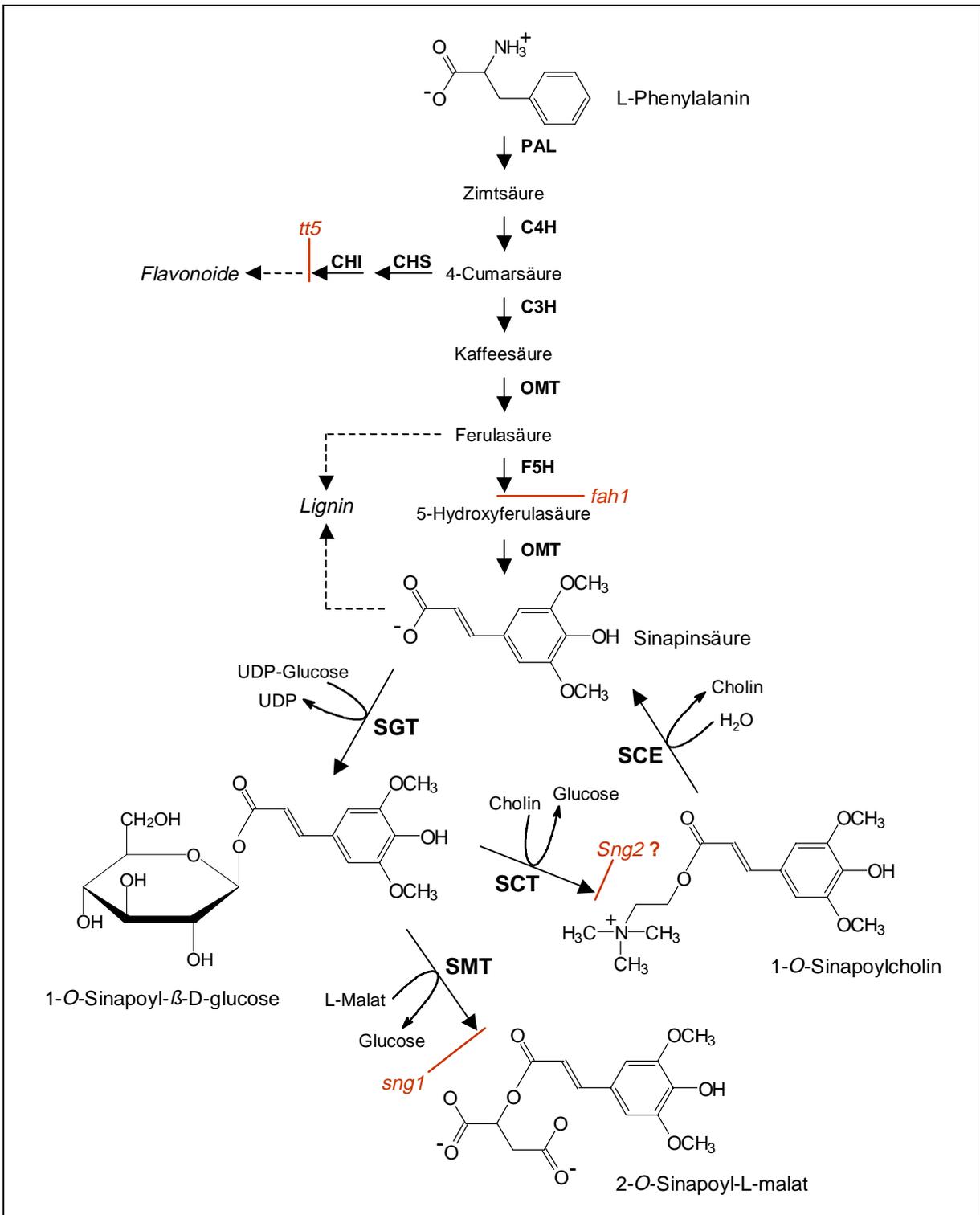
# 1 Einleitung

Eine charakteristische Eigenschaft höherer Pflanzen ist die Produktion einer großen Anzahl von phenolischen Verbindungen mit einem weiten Spektrum von Strukturen und diversen biologischen Funktionen (Strack 1997; Richter 1998). Als Beispiele für die große Bedeutung dieser Stoffe seien zum einen die Flavonoide genannt, die in vielen Arten als ein effektiver Schutzfilter gegen schädigende UV-Strahlung wirken (Landry *et al.* 1995), zum anderen das Biopolymer Lignin, das dem pflanzlichen Gewebe Festigkeit verleiht und damit ein essentieller Bestandteil vieler anatomischer Strukturen ist (Douglas 1996; Meyer *et al.* 1998). Die Biosynthese pflanzlicher Phenole geht (bis auf wenige Ausnahmen) von L-Phenylalanin aus, das durch den Shikimisäure-Stoffwechselweg gebildet wird (Weaver und Herrmann 1997; Herrmann und Weaver 1999). Im Verlaufe des sog. generellen Phenylpropan-Stoffwechsels (Hahlbrock und Scheel 1989; Strack und Mock 1993) entsteht aus dieser Aminosäure eine Reihe von Hydroxyzimtsäuren (s. Abb. 1; 4-Cumar- bis Sinapinsäure). In verschiedenen Stoffwechselwegen wird daraus ein großer Teil der weiteren phenolischen Verbindungen synthetisiert.

Die Hydroxyzimtsäuren sind nicht nur die zentralen Zwischenprodukte des phenolischen Stoffwechsels, in vielen Pflanzen akkumulieren sie in Form verschiedener Konjugate auch als Endprodukte (Strack und Mock 1993). Das Vorkommen bestimmter Verbindungen ist dabei zumeist auf eine bestimmte Anzahl von Arten beschränkt. So werden z.B. in die Zellwände von *Solanum tuberosum* (Kartoffel) Amide von unterschiedlichen Hydroxyzimtsäuren mit Tyramin eingelagert (Schmidt *et al.* 1998), die durch das Enzym Hydroxycinnamoyl-Coenzym A:Tyramin-N-(Hydroxycinnamoyl)-Transferase (THT) gebildet werden (Schmidt *et al.* 1999). Ein anderes Beispiel für derartige Konjugate sind verschiedene lösliche Ester der Sinapinsäure, deren Akkumulation für die Familie der *Brassicaceen* (Kreuzblütler) typisch ist. Das Thema der vorliegenden Arbeit ist das Enzym 1-*O*-Sinapoyl- $\beta$ -D-glucose:L-Malat-Sinapoyltransferase (SMT), das eine der Umesterungsreaktionen dieser Konjugate in der pflanzlichen Entwicklung katalysiert. Der Stoffwechsel der Sinapinsäureester und das Enzym SMT sollen im Folgenden genauer beschrieben werden.

## 1.1 Der Stoffwechsel der Sinapinsäureester

Für die Untersuchung dieses Stoffwechsels haben sich die Keimblätter von *Raphanus sativus* (Radieschen) als ein geeignetes Modellsystem erwiesen, das eingehend biochemisch untersucht wurde (Strack 1977; Strack *et al.* 1978; Linscheid *et al.* 1980). Eine große Anzahl von Arten aus der Familie der *Brassicaceen* akkumuliert in den Samen in erheblichen Mengen den Ester *O*-Sinapoylcholin (Regenbrecht und Strack 1985; Boucherau *et al.* 1991). In der frühen Entwicklung des *Raphanus*-Keimlings wird dieser Ester durch eine spezifische *O*-Sinapoylcholin-Esterase (SCE; EC 3.1.1.49) vollständig abgebaut (s. Abb. 1; Nurmman und Strack 1979; Strack *et al.* 1980). Die freigesetzte Sinapinsäure wird in den *Raphanus*-Keimblättern durch



**Abb. 1.** Biosynthese und Umwandlungen der Sinapinsäureester in *Arabidopsis*, *Raphanus sativus*, *Brassica rapa* und *B. napus*. – Enzyme des generellen Phenylpropan-Stoffwechsels, PAL: L-Phenylalanin-Ammoniak-Lyase, C4H: Zimtsäure-4-Hydroxylase, OMT: Kaffeesäure/5-Hydroxyferulasäure-*O*-Methyltransferase, C3H: 4-Cumarsäure-3-Hydroxylase und F5H: Ferulasäure-5-Hydroxylase; Enzyme des Stoffwechsels der Sinapinsäureester, SGT: Uridin-5'-diphosphat (UDP)-Glucose:Sinapinsäure-Glucosyltransferase, SCT: 1-*O*-Sinapoyl- $\beta$ -D-glucose:Cholin-Sinapoyltransferase, SMT: 1-*O*-Sinapoyl- $\beta$ -D-glucose:L-Malat-Sinapoyltransferase und SCE: *O*-Sinapoylcholin-Esterase; Enzyme des Flavonoid-Stoffwechsels, CHS: Chalkone-Synthase und CHI: Chalkone-Isomerase; rote Balken: biochemische Defekte in den *Arabidopsis*-Mutanten *ferulic acid-5-hydroxylase 1 (fah1)*, *sinapoylglucose accumulator 1 (sng1)*, *transparent testa 5 (tt5)* und (potenziell) *sinapoylglucose accumulator 2 (sng2)*.

eine spezifische Uridin-5'-diphosphat (UDP)-Glucose:Sinapinsäure-Glucosyltransferase (SGT; EC 2.4.1.120) verestert zu 1-*O*-Sinapoyl- $\beta$ -D-glucose (s. Abb. 1; Strack 1980; Nurmamann und Strack 1981). Das Cholin dient größtenteils der Biosynthese von Phosphatidylcholin (Strack 1981). Die Biosynthese des *O*-Sinapoylcholins in den reifenden Samen von *R. sativus* erfolgt durch eine spezifische 1-*O*-Sinapoyl- $\beta$ -D-glucose:Cholin-*O*-Sinapoyltransferase (SCT; EC 2.3.1.91; s. Abb. 1; Strack *et al.* 1983). Der dafür als Substrat erforderliche 1-*O*-Glucoseester der Sinapinsäure wird durch die SGT-Reaktion bereitgestellt.

Die 1-*O*-Sinapoyl- $\beta$ -D-glucose ist in den Keimblättern von *Raphanus sativus* ein Zwischenprodukt, aus dem in einer weiteren Reaktion der Ester 2-*O*-Sinapoyl-L-malat entsteht. Diese Umesterung wird katalysiert von der 1-*O*-Sinapoyl- $\beta$ -D-glucose:L-Malat-*O*-Sinapoyltransferase (SMT; EC 2.3.1.92; s. Abb. 1). Die Aktivität dieses Enzyms wurde zuerst durch Tkotz und Strack (1980) beschrieben und anschließend genauer charakterisiert (Strack 1982). Wie in der SCT-Reaktion wirkt der 1-*O*-Glucoseester der Sinapinsäure auch in dieser Reaktion als ein aktiviertes Substrat mit hohem Gruppenübertragungspotential (Mock und Strack 1993). Das durch die SMT gebildete 2-*O*-Sinapoyl-L-malat akkumuliert als Endprodukt der dargestellten Umwandlungen in den oberen, epidermalen Schichten der Keimblätter von *R. sativus* (Strack *et al.* 1985). Dabei findet nur eine quantitative Umsetzung der genannten Ester ohne eine *de novo*-Synthese statt (Strack *et al.* 1978). Diese setzt erst ein mit der Entwicklung der Folgeblätter, in denen bevorzugt die Ester von L-Malat mit der 4-Cumar-, Kaffee- und Ferulasäure gebildet werden (Brandl *et al.* 1984; Nielsen *et al.* 1984).

Die SMT weist eine Reihe von besonderen Eigenschaften auf. Das Enzym und die an der Reaktion beteiligten Ester sind in den Keimblättern von *Raphanus sativus* ausschließlich in den Zellvakuolen lokalisiert (Sharma und Strack 1985; Strack und Sharma 1985). Die Aktivität des Enzyms und die Akkumulation des Produkts 2-*O*-Sinapoyl-L-malat zeigen eine deutliche und positive Abhängigkeit von der Menge des eingestrahlt Lichts sowie eine enge und positive Korrelation mit dem Gehalt von L-Malat in den Keimblättern (Dahlbender und Strack 1984; Strack *et al.* 1986). So wurde bei der Anzucht von *Raphanus*-Keimlingen im Dunkeln eine deutlich herabgesetzte SMT-Aktivität, eine geringe Menge des Produkts und eine deutliche Reduktion des Gehalts von L-Malat in den Keimblättern beobachtet. Diese Ergebnisse legten die Vermutung nahe, dass die SMT-Aktivität in den *Raphanus*-Keimblättern durch den Gehalt von L-Malat reguliert wird. Der molekulare Mechanismus dieser Regulation ist allerdings nicht bekannt. Über die subzelluläre Lokalisation und die Regulation in Abhängigkeit von äußeren Faktoren der Enzyme SCT, SCE sowie SGT liegen keine Erkenntnisse vor. Die SGT ist in Analogie zu anderen Glucosyltransferasen eventuell im Zytoplasma lokalisiert (Wang und Ellis 1998).

Die SMT konnte in einer geringen Menge aus den Keimblättern von *Raphanus sativus* bis zur Homogenität aufgereinigt und genauer charakterisiert werden (Gräwe *et al.* 1992). Das Maximum der Enzymaktivität wurde bei einem pH-Wert von sechs und bei einer Temperatur von 30 °C beobachtet. Die SMT benötigt keine zweiwertigen Metallionen als Kofaktoren und

keine Stabilisation durch Substanzen mit Sulfhydryl-Gruppen. Es zeigt eine absolute Spezifität für das L(S)(-)-Enantiomer der Äpfelsäure (L-Malat) und eine deutliche Präferenz für 1-O-Sinapoyl- $\beta$ -D-glucose. Daneben werden aber auch die 1-O-Glucoseester anderer Hydroxyzimtsäuren (Ferulasäure [85 %], Kaffeesäure [45 %] und 4-Cumarsäure [2,6 %]) sowie die 1,2-di-O-Sinapoyl- $\beta$ -D-glucose [26 %] umgesetzt. Für L-Malat wurde die Michaelis-Menten-Konstante ( $K_m$ ) bestimmt zu  $54 \text{ mmol L}^{-1}$ , für 1-O-Sinapoyl- $\beta$ -D-glucose ergab sich ein Wert von  $0,45 \text{ mmol L}^{-1}$ . Die SMT von *R. sativus* ist ein monomeres Protein mit einer molaren Masse von ca. 50 kDa. Das aufgereinigte Enzym ließ sich weiter in zwei Isoformen auftrennen, die sich nur geringfügig in den molaren Massen und isoelektrischen Punkten (pI), nicht aber in den katalytischen Eigenschaften unterschieden (SMT 1: 50 kDa, pI: 5,75; SMT 2: 50,5 kDa, pI: 5,90). Für das aus *Brassica rapa* (Rübsen) gereinigte, monomere Protein wurde mit 50 kDa eine vergleichbare molare Masse festgestellt (M. Lorenzen, pers. Mitt.). In Rohextrakten aus Keimblättern von *R. sativus* wurden weiterhin bis zu vier Isoformen der SMT gefunden. Die Existenz von zwei Isoformen wurde zudem für *B. rapa* und *B. napus* festgestellt (M. Lorenzen, pers. Mitt.). Die kinetischen Daten legten insgesamt einen Random-Bi-Bi-Mechanismus für die von der SMT katalysierte Reaktion nahe.

Außer in *Raphanus sativus* wurde die SMT in drei weiteren Arten aus der Familie der *Brassicaceen* nachgewiesen, in denen auch das 2-O-Sinapoyl-L-malat gebildet wird. Dabei handelt es sich um *Brassica napus* (Raps; Strack *et al.* 1990), *B. rapa* (Mock *et al.* 1992) und *Arabidopsis thaliana* (Mock *et al.* 1992; Chapple *et al.* 1992, 1994). Aus *B. napus* wurden zudem die Enzyme SCT (Vogt *et al.* 1993) und SGT (Wang *et al.* 1998) in geringen Mengen aufgereinigt und genauer analysiert. Durch eine Sequenzierung waren dabei von der SCT vier Peptide identifiziert worden. Insgesamt besitzen diese Pflanzen ein vergleichbares System von Sinapinsäureestern, die in ihnen eine wichtige, lösliche, phenolische Komponente darstellen. Auch der Zeitverlauf der Umwandlungen dieser Ester ist bei diesen Pflanzen sehr ähnlich. Das O-Sinapoylcholin wird in den ersten drei Tagen nach der Keimung vollständig abgebaut. Es folgt die vorübergehende Akkumulation von 1-O-Sinapoyl- $\beta$ -D-glucose mit einem Maximum ungefähr am dritten Tag der Entwicklung. Zu diesem Zeitpunkt beginnt in den Keimblättern dieser Pflanzen auch die Biosynthese des 2-O-Sinapoyl-L-malats, die mit dem Auftauchen und Anstieg der SMT-Aktivität einhergeht. Parallel dazu erhöht sich der Gehalt von L-Malat. Eine maximale Aktivität der Enzyme SCE und SGT wurde ungefähr am zweiten Tag der Entwicklung beobachtet. Die *de novo*-Synthese von 2-O-Sinapoyl-L-malat, an der die Enzyme SGT und SMT beteiligt sind, beginnt in *R. sativus* und vermutlich auch in den anderen Arten erst in den Primärblättern dieser Pflanzen.

Einige Aspekte des Stoffwechsels der Sinapinsäureester wurden außerdem in *Arabidopsis* untersucht. In dieser Pflanze wurde ein ähnlicher Einfluss des Lichts auf die SMT-Aktivität beobachtet wie in *Raphanus sativus* (s.o.), das Produkt der Reaktion wird ebenfalls in der oberen Epidermis der Blätter akkumuliert (Ruegger *et al.* 1999). Die Isolation und Analyse des Gens der Ferulasäure-5-Hydroxylase (F5H) aus der Mutante *ferulic acid-5-hydroxylase 1 (fah1)* von

*Arabidopsis* (Meyer *et al.* 1996, Humphreys *et al.* 1999) erlaubte zudem einen Einblick in die Regulation dieses Stoffwechsels. So führte die Überexpression des *F5H*-Gens in *Arabidopsis* zu einer drastischen Veränderung des Lignins, das fast nur noch aus dem Monomer Sinapoylalkohol aufgebaut war (Meyer *et al.* 1998). Die Zusammensetzung des Lignins wird damit in *Arabidopsis* in erster Linie durch die Aktivität des Enzyms F5H im generellen Phenylpropan-Stoffwechsel bestimmt, das eine essentielle Vorstufe für die Bildung des Syringyllignins und der Sinapinsäureester bereitstellt. Die Akkumulation dieser Ester wurde aber in keiner Weise beeinflusst durch die Überexpression des *F5H*-Gens (Ruegger *et al.* 1999). An der Regulation dieses Abschnitts des phenolischen Stoffwechsels müssen daher in *Arabidopsis* zusätzlich noch andere, bisher unbekannte Faktoren beteiligt sein.

Eine wichtige Einsicht in die biologische Funktion der Sinapinsäureester ermöglichte eine vergleichende Analyse der Mutanten *fah1* (s.o.) und *transparent testa 5* (*tt5*) von *Arabidopsis* (Landry *et al.* 1995). In der Mutante *tt5* liegt ein Defekt im Gen der Chalkon-Isomerase (CHI) vor, wodurch die Bildung der Flavonoide völlig unterbleibt, der Gehalt an Sinapinsäureestern aber dem des Wildtyps von *Arabidopsis* entspricht. In der *fah1*-Mutante liegt ein Defekt im *F5H*-Gen vor, wodurch unter anderem keine Sinapinsäureester gebildet werden (s. Abb. 1), aber das natürliche Spektrum der Flavonoide vorhanden ist. Im Vergleich mit dem Wildtyp zeigten beide Mutanten eine deutlich größere Empfindlichkeit gegenüber der Einwirkung von schädigender UV-Strahlung. Sowohl Flavonoide als auch Sinapinsäureester sind damit in *Arabidopsis* ein Schutzfilter gegen diesen Stressfaktor, dem wegen der Zerstörung der Ozonschicht eine immer größere ökologische Bedeutung zukommt. Für die Flavonoide wurde diese Funktion für eine Reihe von Arten bereits in verschiedenen Analysen gezeigt (Landry *et al.* 1995). Die Mutante *fah1* wies in einem direkten Vergleich aber ein weit größeres Ausmaß an morphologischen und physiologischen Schäden auf. Aus der extremen Empfindlichkeit dieser Mutante konnte geschlossen werden, dass Sinapinsäureester in *Arabidopsis* als UV-Schutzstoffe eine größere Rolle spielen als Flavonoide. Damit konnte für diese Ester zum ersten Mal eindeutig eine wichtige biologische Funktion gezeigt werden. Weitere biologische Funktionen dieser Ester wurden bisher nicht nachgewiesen.

Die Entwicklung der Mutante *fah1*, in der diese Ester nicht produziert werden, verläuft andererseits normal, wenn unter künstlichen Bedingungen keine schädigende UV-Strahlung vorhanden ist. Wie der überwiegende Teil phenolischer Verbindungen gehören die Ester der Sinapinsäure damit zum pflanzlichen Sekundärstoffwechsel. Das trifft auch zu auf das in den Samen des *Arabidopsis*-Wildtyps gespeicherte *O*-Sinapoylcholin (s.o.). Anstelle dieses Esters liegt in der *fah1*-Mutante eine gleichgroße Menge an freiem Cholin vor, woraus sich aber kein negativer Einfluss auf die Entwicklung des *fah1*-Keimlings ergibt (Chapple *et al.* 1992). Das freie Cholin kann anscheinend anstelle von *O*-Sinapoylcholin zur Synthese von Membranlipiden verwendet werden.

## 1.2 Die Klonierung des *SMT*-Gens

Im Gegensatz zu dem vielfältigen Wissen über die biochemischen Aspekte des Stoffwechsels der Sinapinsäureester war über die daran beteiligten strukturellen und regulatorischen Gene bisher nichts bekannt. Zahlreiche Gene aus anderen Bereichen des Stoffwechsels pflanzlicher Phenole wurden bereits kloniert und näher charakterisiert. Das hat wichtige neue Erkenntnisse ermöglicht, wie z.B. die Klonierung des *F5H*-Gens von *Arabidopsis* zeigt (s. Abschn. 1.1). Obwohl in ihrem Vorkommen nicht darauf beschränkt, sind speziell am Stoffwechsel pflanzlicher Phenole viele Acyltransferasen beteiligt, die in Analogie zur *SMT* als aktiviertes Substrat einen 1-*O*- $\beta$ -Acylglucoseester benötigen (s. Abschn. 5.2). Auch über die Gene dieser Enzyme und ihre katalytischen Mechanismen liegen bisher kaum Erkenntnisse vor (Steffens 2000). Es war deshalb die Annahme berechtigt, dass die Klonierung des *SMT*-Gen unter diesen Umständen neue Einsichten vermitteln könnte. Zu den interessanten Eigenschaften der *SMT* gehören weiterhin die Lokalisation des Enzyms in der Vakuole, die ausgeprägte Regulation der Aktivität, die Existenz von Isoformen und die Funktion des Produktes der katalysierten Reaktion als ein effektiver UV-Filter (s. Abschn. 1.1). Ziel der vorliegenden Arbeit war aus diesen Gründen die Klonierung des *SMT*-Gens. Dazu wurden Vorversuche und Vorarbeiten durchgeführt, die im Folgenden zusammengefasst sind.

### 1.2.1 Klonierung des *SMT*-Gens ausgehend vom Protein

Zur Klonierung von pflanzlichen Genen sind unterschiedlichste Strategien entwickelt und mit Erfolg angewendet worden (Foster und Twell 1996). Der am häufigsten beschrittene Weg setzt voraus, dass zumindest Teile der Aminosäuresequenz des Genprodukts bekannt sind. Lassen sich daraus geeignete Primer für eine PCR ableiten, so kann mit diesen unter Umständen ein Fragment des Gens aus einer cDNA-Bibliothek amplifiziert werden. Während die Ausbeute bei Aufreinigung der *SMT* aus *Raphanus sativus* (s. Abschn. 1.1) für eine Sequenzierung nicht ausreichte, wurde in entsprechenden Experimenten bei *Brassica rapa* ein N-terminales Peptid des Enzyms von 17 Aminosäuren erhalten (M. Lorenzen, pers. Mitt.; s. Abschn. 8.2). Ausgehend von diesem Peptid wurden verschiedene Vorversuche zur Klonierung des *SMT*-Gens aus *B. rapa* durchgeführt.

In einem ersten Ansatz wurde versucht, ein Fragment der *SMT* aus einer cDNA-Bibliothek zu amplifizieren, die aus fünf bis zehn Tage alten *Brassica rapa*-Keimlingen im Vektor  $\lambda$  ZAP Express (Strategene; Short *et al.* 1988) hergestellt worden war (Dr. T. Vogt, pers. Mitt.). Da das Peptid zum Teil aus Aminosäuren besteht, für die der genetische Kode degeneriert ist, wurden in einem ersten Ansatz Kollektionen von Primern verwendet, die ein Spektrum von einzelnen DNA-Sequenzen abdeckten. Damit konnte in einer Reihe von Experimenten kein Fragment der *SMT* amplifiziert werden (Dr. T. Vogt, pers. Mitt.). In einem zweiten Ansatz wurden Primer verwendet, die an degenerierten Positionen mit der Base Inosin besetzt waren.

Die damit durchgeführten Experimente führten ebenfalls nicht zur Klonierung des *SMT*-Gens (s. Abschn. 4.1, eigene Versuche).

Das *SMT*-Peptid wurde darüber hinaus zur Herstellung eines polyklonalen Antikörpers verwendet (M. Lorenzen, pers. Mitt.), wozu das Peptid an ein Trägerprotein (Hämocyanin) gekoppelt wurde. Das Antiserum der Kaninchen, denen dieses Antigen appliziert wurde, ergab im Western Blot mit Proteinextrakten aus *Brassica rapa* eine unspezifische Reaktion mit einer Reihe von Banden (M. Lorenzen, pers. Mitt.). Es erwies sich weiterhin als nicht möglich, die *SMT*-Aktivität mit dem Antikörper aus den Extrakten zu präzipitieren. In einem Vorversuch für das Immunoscreening der cDNA-Bibliothek wurde trotz einer Vorinkubation des Antiserums mit einem Proteinextrakt aus *E. coli* nur eine völlig unspezifische Reaktion beobachtet (eigene Versuche). Auch Vorversuche zu einem Oligoscreening mit den unterschiedlichen, *SMT*-spezifischen Primern (s.o.) führten nicht zu positiven Ergebnissen (eigene Versuche). Daraus konnte gefolgert werden, dass das bekannte N-terminale Peptid der *SMT* aus *B. rapa* aufgrund der Degeneration des genetischen Kodes und geringer Antigenität zur Klonierung des *SMT*-Gens nicht geeignet ist. Die verschiedenen Screenings wurden alle nach den Vorschriften von Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt.

### 1.2.2 Klonierung des *SMT*-Gens aus einer Mutante

Die in Abschn. 1.2.1 beschriebenen Ergebnisse legten es nahe, einen Weg zur Klonierung des *SMT*-Gens zu wählen, der nicht die Aufreinigung des Proteins voraussetzte. Eine geeignete Alternative sind unter Umständen Mutanten, in der das zu isolierende Gen von der Insertion einer T-DNA betroffen ist. In diesem Fall können verschiedene Methoden angewendet werden, um das Gen zu klonieren (Feldmann 1992; Feldmann und Dilkes 1998). Große Sammlungen von T-DNA-Mutanten existieren in erster Linie von *Arabidopsis* (Feldmann und Marks 1987; Feldmann 1991, 1992; Feldmann *et al.* 1994; Azpiroz und Feldmann 1997). Diese Pflanze ist im letzten Jahrzehnt zu einem Modellsystem für die Analyse von biologischen, insbesondere molekulargenetischen Fragestellungen geworden (Meyerowitz und Somerville 1994; Jürgens 1998). Es stehen daher zahlreiche Materialien und Methoden zur Verfügung (Koncz *et al.* 1992, Martinez-Zapater und Salinas 1998), die zur Klonierung eines Gens eingesetzt werden können. So sind z.B. von *Arabidopsis* genomische Bibliotheken vorhanden, deren DNA mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens* und der Vakuumfiltrations-Technik in diese Pflanze transformiert werden kann. Das trifft auch zu auf die in dieser Arbeit analysierte *abi1*-Bibliothek, deren Cosmide die dazu notwendigen Sequenzen der T-DNA im Vektor pBIC20 enthalten (Meyer 1994; Meyer *et al.* 1994). Durch das zur Zeit laufende *Arabidopsis*-Genomprojekt sind zudem genaue chromosomale Karten sowie in einem großen Umfang DNA-Sequenzen von dieser Pflanze zugänglich (Meinke *et al.* 1998).

Dass in *Arabidopsis* eine Akkumulation von *O*-Sinapoyl-L-malat erfolgt, die auf die *SMT* zurückzuführen ist, hatten die biochemischen Analysen gezeigt (s. Abschn. 1.1). Das *SMT*-Gen kann damit aus dieser Pflanze kloniert werden. Darüber hinaus wurde in *Arabidopsis* nur eine

Form des Enzyms gefunden (M. Lorenzen, pers. Mitt.). Das weist darauf hin, dass im Genom dieser Pflanze vermutlich nur eine Kopie des *SMT*-Gens vorhanden ist. Zu demselben Ergebnis führte auch die genetische Analyse der Mutanten *sng1-1* und *sng1-2* (s.u.). Die Singularität des Gens ist eine essentiell Voraussetzung für die Identifikation einer geeigneten T-DNA-Mutante, da die gleichzeitige Mutation von mehreren redundanten Genen äußerst unwahrscheinlich ist. Eine Mutante zu isolieren, bedeutet in der Regel die Analyse einer großen Anzahl von Pflanzen. Das wird in diesem Fall dadurch erleichtert, dass die Sinapinsäureester mit einfachen Methoden aus pflanzlichem Gewebe extrahiert und mittels DC aufgetrennt werden können (s. Abschn. 3.1.3.3 u. 3.4.5.2). Die Identifikation dieser Ester ist anschließend anhand der charakteristischen, blauen Fluoreszenz der Banden im langwelligen UV-Licht möglich (Chapple *et al.* 1992).

In der Arbeitsgruppe von Prof. C. Chapple an der Purdue University (West Lafayette, Indiana, USA) wurden auf diese Weise ca. 7600 Mutanten von *Arabidopsis*, die durch chemische Mutagenese mit EMS hergestellt worden waren, auf genetisch bedingte Veränderungen des Stoffwechsels der Sinapinsäureester hin analysiert. Dabei wurden zwei Pflanzen gefunden, die anstelle von 2-*O*-Sinapoyl-L-malat ausschließlich 1-*O*-Sinapoyl- $\beta$ -D-glucose akkumulierten (Lorenzen *et al.* 1996). Zu keinem Zeitpunkt der Entwicklung konnte in diesen Pflanzen eine SMT-Aktivität nachgewiesen werden. Der Gehalt von L-Malat wies dabei keine Veränderungen gegenüber dem des *Arabidopsis*-Wildtyps auf. Aus der genetischen Analyse der Mutanten ging hervor, dass beide neue Allele eines singulären, rezessiv vererbten Gens von *Arabidopsis* sind. Dieses Gen wurde als *Sinapoylglucose Accumulator 1* (*SNG1*) bezeichnet, die beiden Mutanten entsprechend als *sng1-1* und *sng1-2*. Deren Phänotyp wies klar darauf hin, dass in den Mutanten ein Defekt im *SMT*-Gen vorliegt. Es konnte allerdings zu diesem Zeitpunkt nicht völlig ausgeschlossen werden, dass das *SNG1*-Gen ein regulatorisches Protein kodiert, das für die Expression oder Aktivität der SMT erforderlich ist.

Die Existenz der beiden Mutanten zeigte gleichwohl, dass in *Arabidopsis* eine Mutation erzeugt werden konnte, in der wahrscheinlich das *SMT*-Gen betroffen ist. Eine *sng1*-Mutante sollte daher auch in einer Sammlung von T-DNA-Mutanten vorhanden sein. Um eine solche zu finden, muss aber eine sehr große Anzahl von Pflanzen analysiert werden (s.u.), weshalb ein leicht zu identifizierender Phänotyp der Mutante dafür eine essentielle Voraussetzung ist. Die weitere Analyse der *sng1*-Mutante führte in diesem Zusammenhang zu einem wichtigen Ergebnis. So wurde beobachtet, dass im Vergleich mit dem Wildtyp die Mutante im UV-Licht eine geringere Fluoreszenz in den Blättern aufweist (s. Abb. 2 u. Lehfeldt *et al.* 2000). Dieser Effekt, dessen Ursache bisher nicht bekannt ist, konnte bei der Suche nach einer T-DNA-Mutante mit *sng1*-Phänotyp verwendet werden. In einer Analyse der Sinapinsäureester-Umwandlungen, die in der Keimlingsentwicklung ablaufen (s. Abschn. 1.1), wurde zwischen dem Wildtyp und der Mutante zwar ein Unterschied festgestellt (Lorenzen *et al.* 1996). So beginnt die *de novo*-Synthese von 1-*O*-Sinapoyl- $\beta$ -D-glucose in der *sng1*-Mutante einige Tage später als diejenige von 2-*O*-Sinapoyl-L-malat im Wildtyp. Daraus ergibt sich in der Mutante im Vergleich mit



**Abb. 2.** Blätter von 4 Wochen alten Pflanzen des Wildtyps (links) und der Mutante *sng1-1* (rechts) von *Arabidopsis* photographiert im UV-Licht. – Wildtyp: Ökotyp Columbia; Lichtquelle: von oben, Transilluminator, Wellenlänge 312 nm, s. Abschn. 3.4.5.2; Anzucht der Pflanzen: s. Abschn. 3.1.1.1; Photographie: Kamera F4, Objektiv Mikro-Nikkor 105 mm/f2,8, gelber Filter, Hersteller u. Typ unbekannt, entspr. möglicherweise B+W Gelbfilter Nr. 021, 35 mm Diafilm Fujichrome Velvia Professional (RVP) 50 ISO/18°, Belichtung 90 Sekunden, Blende 16.

dem Wildtyp zeitweilig ein geringerer Gehalt an Sinapinsäureestern, der auch zu einer schwächeren Fluoreszenz führen sollte. Obwohl naheliegend, kann die Differenz in den Keimblättern damit aber vermutlich nicht erklärt werden, da in *Arabidopsis* die *de novo*-Synthese dieser Ester wie in *Raphanus sativus* wahrscheinlich erst in den Primärblättern beginnt (s. Abschn. 1.1). Zudem wird der Effekt auch bei adulten Pflanzen beobachtet (s.o.), obwohl in der *sng1*-Mutante die 1-*O*-Sinapoyl- $\beta$ -D-glucose in dieser Phase der Entwicklung zu dem gleichen Stand wie das 2-*O*-Sinapoyl-L-malat im Wildtyp akkumuliert.

In der Arbeitsgruppe von Prof. C. Chapple wurde dazu die aus 6500 T-DNA-Mutanten bestehende Sammlung des *Arabidopsis* Biological Resource Centers (ABRC) der Ohio State University (Columbus, USA) analysiert (Feldmann und Marks 1987; Feldmann 1991, 1992; Feldmann *et al.* 1994; Azpiroz-Leehan und Feldmann 1997). Das Saatgut dieser Sammlung, die aus 65 Kollektionen mit jeweils 100 Mutanten bestand, ergab ca. 75 000 Keimlinge, die im Alter von sieben Tagen im UV-Licht auf eine verminderte Fluoreszenz in den Keimblättern analysiert wurden. Insgesamt 125 Keimlinge mit einem Phänotyp dieser Art wurden identifiziert. Im Alter von 14 Tagen wurden diese Keimlinge mittels DC auf die Akkumulation der Sinapinsäureester getestet. Zwei Keimlinge aus verschiedenen Kollektionen synthetisierten nur 1-*O*-Sinapoyl- $\beta$ -D-glucose, die anderen wie der Wildtyp 2-*O*-Sinapoyl-L-malat.

Die beiden isolierten Mutanten wurden anschließend genetisch charakterisiert. In einem ersten Experiment wurden sie mit der Mutante *sng1-1* gekreuzt. Alle in den F1-Generationen analysierten Keimlinge produzierten ausschließlich 1-*O*-Sinapoyl- $\beta$ -D-glucose. Das Ausbleiben

der Komplementation zeigte, dass beide Mutanten neue Allele des *SNG1*-Gens sind, die daher als *sng1-3* und *sng1-4* bezeichnet wurden. Für die Mutante *sng1-3* wurden dabei 46 Keimlinge getestet, 21 für die Mutante *sng1-4*. In einem zweiten Experiment wurden beide Mutanten mit dem *Arabidopsis*-Wildtyp (Ökotyp Wassilewskija) gekreuzt. Für die weitere Analyse wurden jeweils drei Pflanzen aus den F1-Generationen ausgewählt. Durch Selbstbefruchtung gingen daraus F2-Generationen hervor, von denen jeweils 50 Keimlinge auf die Segregation der Kanamycin-Resistenz getestet wurden. Die F2-Populationen der Mutante *sng1-3* segregierten alle in einem Verhältnis von ca. 15 : 1 (resistent : sensitiv), die der Mutante *sng1-4* alle in einem Verhältnis von ca. 3 : 1. Die Resistenz wird dabei in dominanter Weise durch das *NPT II*-Gen, das in der T-DNA vorhanden ist, vermittelt. Dieses genetische Experiment demonstrierte, dass in der Mutante *sng1-4* die Insertion von einer T-DNA vorliegt, in der Mutante *sng1-3* dagegen zwei voneinander unabhängige T-DNA-Insertionen.

Für eine Reihe von T-DNA-Mutanten wurde in genetischen Analysen festgestellt, dass die Kanamycin-Resistenz nicht mit dem Phänotyp der Mutante segregiert (Feldmann *et al.* 1994). In diesen Fällen ist offensichtlich nicht die T-DNA-Insertion, sondern ein anderer mutagener Effekt unbekannter Natur für die beobachtete Mutation verantwortlich. Um einen solchen Fall ausschließen zu können, wurde von den Mutanten *sng1-3* und *sng1-4* jeweils eine Pflanze aus den F2-Populationen (s.o.) mit der Mutante *sng1-1* gekreuzt. Diese segregierten sowohl für die Kanamycin-Resistenz als auch für den Phänotyp des Wildtyps von *Arabidopsis*. Für die Mutante *sng1-4* wurde anschließend eine Population von Keimlingen in der F1-Generation mit Selektion durch Kanamycin angezogen. Alle 58 resistenten Keimlinge, die mittels TLC getestet wurden, akkumulierten ausschließlich 1-*O*-Sinapoyl- $\beta$ -D-glucose. Das zeigte die in genetischer Hinsicht enge Verbindung (sog. *Linkage*) zwischen dem *sng1*-Phänotyp und dem Resistenzmarker der T-DNA. In diesem Fall ist es nach Feldmann *et al.* (1994) wahrscheinlich, dass sich die Insertion auch im *SNG1*-Gen von *Arabidopsis* befindet (sog. *T-DNA-Tagging*). Die Mutante war damit zur Klonierung des *SNG1*-Gens geeignet. Für die Mutante *sng1-3* wurde eine Population von Keimlingen in der F1-Generation ohne eine Selektion angezogen. Keimlinge mit *sng1*-Phänotyp wurden auf Medium mit Kanamycin übertragen. Von 121 Keimlingen, die getestet wurden, erwiesen sich 32 als nicht resistent. Von den beiden T-DNA-Insertionen in der Mutante war demnach keine genetisch mit dem *SNG1*-Gen verbunden, so dass sich diese für die Klonierung des Gens als nutzlos erwies.

### 1.3 Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurde davon ausgegangen, dass das *SNG1*-Gen von *Arabidopsis* die SMT kodiert. Es war das Ziel, in einer Kooperation mit Prof. C. Chapple (Purdue University, West Lafayette, Indiana, USA) mittels der Mutante *sng1-4* dieses Gen aus *Arabidopsis* zu klonieren. Das *SNG1*-Gen sollte anschließend möglichst genau charakterisiert werden, wozu vornehmlich der Nachweis gehörte, dass das Genprodukt tatsächlich die SMT ist. Die dabei verfolgte Strategie bestand aus mehreren Schritten. Zuerst musste, von der T-DNA-Insertion

in der Mutante ausgehend, ein Fragment genomischer DNA aus dem *SNGI*-Gen oder dessen Umgebung kloniert werden. Für diesen kritischen Schritt war in erster Linie die Methode des Plasmid-Rescues vorgesehen (Behringer und Medford 1992; Feldmann 1992; Feldmann und Dilkes 1998). Von Prof. Chapple war damit z.B. das *F5H*-Gen aus *Arabidopsis* isoliert worden (s. Abschn. 1.1). Bei einem Misserfolg kam als alternative Methode unter anderem die inverse PCR in Frage (Ochmann *et al.* 1990; Gasch *et al.* 1992; Lindsay und Topping 1996; Topping und Lindsay 1997).

Mit dem klonierten Fragment sollte im nächsten Schritt aus einer genomischen Bibliothek von *Arabidopsis* ein Klon isoliert werden, der das *SNGI*-Gen enthielt. Es war geplant, diesen genomischen Klon zu charakterisieren und in die Komplementation einer *sngI*-Mutante einzusetzen, um die Klonierung des *SNGI*-Gens nachzuweisen. Dazu eigneten sich in erster Linie die Mutanten *sngI-1* und *sngI-2*, die mit Hilfe von EMS hergestellt worden waren (s. Abschn. 1.2.2). Durch die T-DNA enthalten nämlich die Mutanten *sngI-3* und *sngI-4* das *NPT II*-Gen, das eine Resistenz gegen Kanamycin vermittelt. Dieses Markergen ist auch in den Vektoren enthalten, die in dieser Arbeit dazu verwendet wurden, das intakte *SNGI*-Gen wieder in *Arabidopsis* einzubringen. Eine Selektion auf transgene Pflanzen war damit nur möglich in den EMS-Mutanten, nicht aber in einer der T-DNA-Mutanten.

Mit einem Fragment des potenziellen *SNGI*-Gens aus dem genomischen Klons sollte im nächsten Schritt eine cDNA aus einer Bibliothek von *Arabidopsis* isoliert werden. Dieser cDNA-Klon war anschließend umfassend zu charakterisieren. Für den Fall, dass der genomische Klon neben dem potenziellen *SNGI*-Gen noch weitere Gene enthielt, war die erneute Komplementation einer *sngI*-Mutante mit der isolierten cDNA vorgesehen. Da von der SMT nur ein kleiner Teil der Aminosäuresequenz bekannt war (s. Abschn. 1.2.1), sollte in einem weiteren Schritt außerdem versucht werden, die *SNGI*-cDNA in *E. coli* zu exprimieren. Der Nachweis von SMT-Aktivität sollte eindeutig zeigen, dass die SMT in *Arabidopsis* durch das *SNGI*-Gen kodiert wird.

## 2 Material

### 2.1 Arabidopsis

Die Ökotypen Columbia (Col), Landsberg *erecta* (Ler) und Wassilewskija (Ws) wurden bezogen vom *Arabidopsis* Biological Resource Center (ABRC; Columbus, Ohio, USA). Das Saatgut ist im Katalog des ABRC in der zweiten Auflage von 1997 unter den Nrn. CS1092 (Col), CS1298 (Ler) und CS1602 (Ws) zu finden. Die Mutanten *sngl-1*, *sngl-2*, *sngl-3* und *sngl-4* stellte Prof. C. Chapple (Department of Biochemistry, Purdue University, West Lafayette, Indiana, USA) zur Verfügung. Die Isolation der mit Hilfe von EMS erzeugten Mutanten *sngl-1* und *sngl-2* ist von Lorenzen *et al.* (1996) beschrieben worden. Die Mutanten *sngl-3* und *sngl-4* wurden in einer Sammlung von T-DNA-Mutanten des ABRC identifiziert (s. Abschn. 1.2.2). Das Saatgut derselben ist im ABRC-Katalog unter der Nr. CS6502 zu finden.

### 2.2 Bakterien

Der Stamm DH5 $\alpha$  von *Escherichia coli* wurde bezogen von Life Technologies, Inc. (Rockville, Maryland, USA), der Stamm BL21( $\lambda$ DE3) von Novagen, Inc. (Madison, Wisconsin, USA), der Stamm DM1 von der Promega Corp. (Madison, Wisconsin, USA) und der Stamm C600*hflA+* von Stratagene (La Jolla, Kalifornien, USA). Der Stamm C58 pGV3850 (Zambrisky *et al.* 1983) von *Agrobacterium tumefaciens* wurde von Prof. C. Chapple (s. Abschn. 2.1) zur Verfügung gestellt.

### 2.3 Bibliotheken

Die genomische Bibliothek *abil* und eine cDNA-Bibliothek aus Keimlingen von *Arabidopsis* wurden von Dr. K. Meyer (E.I. du Pont de Nemours & Co., [Inc.], Central Research and Development, Wilmington, Delaware, USA) zur Verfügung gestellt, eine cDNA-Bibliothek aus Keimlingen von *Brassica rapa* von Dr. T. Vogt und Dr. J. Winter (Leipniz-Institut für Pflanzenbiochemie, Deutschland, Halle [Saale]).

### 2.4 Proteine

Restriktionsenzyme, die Bakteriophage T4 Polynukleotidkinase und T4 DNA-Ligase, die *Taq* und *Pfu* DNA-Polymerase wurden von gängigen Herstellern, normalerweise der Promega Corp. (Madison, Wisconsin, USA), bezogen, in gleicher Weise die alkalische Phosphatase aus Kalbsthymus, RNase A und Lysozym in der Regel von der Boehringer Mannheim GmbH (Deutschland). Für die SDS-PAGE kam als Standard der Mid Range Protein Molecular Weight Marker von Promega zum Einsatz.

### 2.5 Nukleinsäuren

Der Vektor pBluescript II KS(-) wurde von Stratagene (La Jolla, Kalifornien, USA) bezogen, von der Novagen, Inc. (Madison, Wisconsin, USA) die Vektoren pT7Blue(R) und pET-20b(+). Darüber hinaus wurden die Vektoren pCW Ori+ und pBI121 verwendet. Der Vektor pBI121 wurde zur Verfügung gestellt von Dr. M.M. Champbell (Department of Plant Sciences, University of Oxford, UK). Als Größenstandard für die Agarosegel-Elektrophorese von DNA wurden die 1 kb-DNA-Leiter der Promega Corp. (Madison, Wisconsin, USA) oder vergleichbare Produkte anderer Hersteller eingesetzt. Als Standard wurde außerdem DNA des Bakteriophagen Lambda verwendet, die mit dem Restriktionsenzym *HindIII* verdaut worden war. Diese DNA wurde von Life Technologies, Inc. (Rockville, Maryland, USA) bezogen. Standard für die Agarosegel-Elektrophorese von RNA war die 0,24-9,5 kb-RNA-Leiter von Life Technologies. Fragmente der T-DNA des Ti-Plasmids pGV3850:pAK1003 wurden aus den Plasmiden

pCC1, pRi, pL3 und pCS610 präpariert. Das Plasmid pCS610 enthielt im Vektor pSP64 von Promega ein Fragment der linken T-DNA-Seite und wurde vom *Arabidopsis* Biological Resource Center (s. Abschn. 2.1, Katalog Nr. CD3-15) bezogen. Der Vektor pCW Ori+ und die Plasmide pCC1, pRi sowie pL3 wurden von Prof. C. Chapple (s. Abschn. 2.1) zur Verfügung gestellt. Primer wurden vom Center for Macromolecular Structure der Purdue University (West Lafayette, Indiana, USA) oder kommerziellen Herstellern wie Integrated DNA Technologies, Inc. (Coralville, Idaho, USA) synthetisiert.

## 2.6 Kits

Es wurden verwendet das DECAprime II DNA Labeling Kit von Ambion, Inc. (Austin, Texas, USA), das Wizard *Plus* Minipreps DNA Purification System der Promega Corp. (Madison, Wisconsin, USA), das Plasmid Midi Kit und das Quiaex II Gel Extraction Kit der Quiagen GmbH (Hilden, Deutschland), das Original TA Cloning Kit der Invitrogen Corp. (San Diego, Kalifornien, USA), das Sequenase Version 2.0 DNA Sequencing Kit von Nycomed Amersham plc (Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) und das Expand High Fidelity PCR Kit der Boehringer Mannheim GmbH (Deutschland).

## 2.7 Chemikalien

Es wurden verwendet die Chemikalien Clorox Household Bleach von The Clorox Company (Oakland, Kalifornien, USA), Miracle-Gro All-Purpose Plant Food von The Scotts Company (Marysville, Ohio, USA), Marathon Greenhouse Insecticide von Olympic Horticultural Products Co. (Mainland, Pennsylvania, USA), Vac-In-Stuff von Lehle Seeds (Round Rock, Texas, USA), MS-Salze, modifizierte MS-Salze (ohne Ammoniumnitrat), MS- und B5-Vitamine, *p*-Aminosalicylsäure (Natriumsalz) (PAS), 8-Hydroxyquinolin, Äpfelsäure (Dinatriumsalz) und *m*-Cresol von Sigma (St. Louis, Missouri, USA), tri-Isopropyl-naphthalinsulfonat (Natriumsalz) (TIPS) von Fisher Scientific, Inc. (Pittsburgh, Pennsylvania, USA) sowie der Long Ranger und Gel Slick von FMC BioProducts (Rockland, Maine, USA). 1-*O*-Sinapoyl- $\beta$ -D-glucose und 2-*O*-Sinapoyl-L-malat wurden von M. Lorenzen (Leipniz-Institut für Pflanzenbiochemie, Halle [Saale], Deutschland) zur Verfügung gestellt. Das [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-Desoxyadenosin-5'-triphosphat wurde von ICN Pharmaceuticals, Inc. (Costa Mesa, Kalifornien, USA) bezogen, das <sup>35</sup>SequeTide Nucleotide Premix von NEN Life Science Products, Inc. (Boston, Massachusetts, USA). Außerdem kamen gebräuchliche Laborchemikalien zum Einsatz, die von verschiedenen, gängigen Herstellern bezogen wurden.

## 2.8 Verbrauchsmaterialien

Es wurden als Materialien verwendet die Membran Hybond N<sup>+</sup> von Nycomed Amersham plc (Little Chalfont, Buckinghamshire, UK), der Medical X-Ray Film RX und der Diafilm Fujichrome Velvia Professional (RVP) von Fujifilm (Tokyo, Japan), der Film X-Omat AR von Eastman Kodak (Rochester, New York, USA), Miracloth der Calbiochem-Novabiochem Corp. (San Diego, Kalifornien, USA), Konzentratoren des Typs Microcon YM-10 der Millipore Corp. (Bedford, Massachusetts, USA), K6-Kieselgel DC-Platten ohne Fluoreszenz-Indikator von Whatman plc (Maidstone, Kent, UK), das Plug and Germination Growing Medium Pro-Mix 'PGX' von Premier Tech Ltd (Rivière-du-Loup, Québec, Canada), Nunc Bio-Assay Kulturschalen von Nalge Nunc International (Rochester, New York, USA) und eine Nucleosil 120-5 Reversed Phase-C<sub>18</sub>-Trennsäule von der Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (Düren, Deutschland). Darüber hinaus kamen gebräuchliche Labormaterialien zum Einsatz, die von verschiedenen, gängigen Herstellern bezogen wurden.

## 2.9 Geräte

Es wurden verwendet die Geräte BTX Transporator Plus von Genetronics, Inc. (San Diego, Kalifornien, USA), die Laboport-Vakuumpumpe N820.3FTP der KNF Neuberger GmbH (Freiburg, Deutschland), der Scienceware 'Space Saver'-Vacuumexsikkator von Bel-Art Products, Inc. (Pequannock, New Jersey, USA), die SLM-AMINCO FRENCH-Druckzelle FA-303 (40 K) und FRENCH-Laborpresse FA-078 von Spectronic Instruments, Inc. (Rochster, New York, USA), ein HPLC-Gerät von Waters Instruments, Inc. (Plymouth, Minnesota, USA) mit der Software 2010 der Millipore Corp. (Bedford, Massachusetts, USA) bestehend aus den Modulen Waters Pump 616, Waters Autosampler 717, Waters Photodioden Array Detector 996 und Waters Controller 600S, der Sonoplus Ultraschall-Homogenisator HD2070 mit Mikrospitze MS 73 der Bandelin Electronic GmbH & Co. KG (Berlin, Deutschland), der Stratalinker UV-Crosslinker von Stratagene (La Jolla, Kalifornien, USA), das Minigel System SE 260 Mighty Small II Dual von Hoefer Scientific Instruments (San Francisco, USA, Kalifornien), das Sequenziergel-Elektrophoresesystem 2 von Life Technologies, Inc. (Rockville, Maryland, USA), ein Geltrockensystem und die Vakuumpumpe Vac-Man der Promega Corp. (Madison, Wisconsin, USA), das UV/Vis-Spektrophotometer DU 640 von Beckmann Coulter, Inc. (Fullerton, Kalifornien, USA), die Kamera F4 und das Objektiv Mikro-Nikkor 105 mm/f2,8 der Nikon Corp. (Tokyo, Japan), ein gelber Filter, der eventuell dem Gelbfilter Nr. 021 der B+W Filterfabrik J. Weber GmbH & Co. KG (Bad Kreuznach, Deutschland) entsprach, und das Survey Meter Model 3 mit Pancake-Detector Model 44-9 von Ludlum Measurements, Inc. (Sweetwater, Texas, USA). Weiterhin kamen gebräuchliche Laborgeräte zum Einsatz, die von verschiedenen, gängigen Herstellern bezogen wurden.

## 2.10 Computerprogramme

Sequenzen wurden mit der Lasergene Biocomputing Software von Dnastar, Inc. (Madison, Wisconsin, USA) analysiert. Das Paket umfasste die Programmversionen für Windows 32 EditSeq 3.96, MapDraw 3.11, SeqMan II 3.56, MegAlign 3.14 und PrimerSelect 3.03 aus den Jahren 1989 bis 1997. Darüber hinaus wurden die Programme ORF Finder, CLUSTALW in der Version 1.7, ScanProsite, PSORT und SignalP in der Version 1.1 verwendet. Internet-Links zu den Programmen wurden durch das Schweizerische Institut für Bioinformatik (SIB, Genf) im Expert Protein Analysis System (ExPASy; Appel *et al.* 1994) zur Verfügung gestellt. Die ExPASy-Seite ist im Internet unter der Adresse <http://www.expasy.ch/> zu finden. Für den Einsatz des Programms CLUSTALW wurde der Link zum Network Protein Sequence @analysis (NPS@)-Internet-Server von Pôle Bio-Informatique Lyonnais (PBIL, Frankreich) verwendet. Der ORF Finder befand sich auf der Internet-Seite des National Center for Biotechnology Information (s. Abschn. 2.11). Das Programm CLUSTALW kam mit der Matrix GONNET zum Einsatz, ansonsten wurden die vorgegebenen Werte für die Parameter der Programme verwendet.

## 2.11 Datenbanken

Zur Analyse von Sequenzen wurden verwendet die Datenbanken GenBank (Benson *et al.* 2000; Wheeler *et al.* 2000) des National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, Maryland, USA), die *Arabidopsis thaliana*-Database (AtDB, Flanders *et al.* 1998) der Stanford University (Stanford, Kalifornien, USA), SWISS-PROT (Bairoch und Apweiler 2000) und Prosite (Hofmann *et al.* 1999) des Schweizerischen Instituts für Bioinformatik (SIB, Genf) sowie der *Arabidopsis* Gene Index (AtGI, Quakenbush *et al.* 2000) des Institut for Genomic Research (TIGR, Rockville, Madison, USA). GenBank ist auf der Internet-Seite des NCBI mit der Adresse <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> zu finden, die AtDB unter <http://genome-www.stanford.edu/arabidopsis/>, der AtGI auf der Internet-Seite des TIGR mit der Adresse <http://www.tigr.org/>, SWISS-PROT und Prosite standen auf der ExPASy-Seite zur Verfügung

---

(s. Abschn. 2.10). Aus der AtDB ist inzwischen The *Arabidopsis* Information Resource (TAIR) mit der Adresse <http://www.arabidopsis.org> entstanden. Die Analyse von GenBank, AtGI und AtDB erfolgte mit dem BLAST-Algorithmus (Altschul 1990, 1997), diejenige von Prosite mit dem Programm Scan-Prosite (s. Abschn. 2.10). Dabei wurden die voreingestellten Werte für die Parameter der Programme verwendet.

## 3 Methoden

### 3.1 *Arabidopsis*

#### 3.1.1 Kultivierung

Die Kultivierung von *Arabidopsis* erfolgte bei einer Temperatur von 23 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 65-75 %. Die Photoperiode bestand aus 16 Stunden Licht und 8 Stunden Dunkelheit, die Intensität des eingestrahlenen Lichts betrug 100  $\mu\text{E}$  (Mikroeinsteinstunden)  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Nicht sofort in Versuche eingesetztes Pflanzenmaterial wurde abgeerntet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

##### 3.1.1.1 Topfkultur

Zur Anzucht von Pflanzen im Topf wurde das Plug and Germination Growing Medium Pro-Mix PGX verwendet, das aus 65-75 % (v/v) Torfmoos, Kalkstein, Vermiculite sowie Makro- und Mikroelementen bestand. Die Plastiktöpfe hatten eine Länge und Breite von 9 cm sowie eine Höhe von 7,5 cm. Die Erde wurde vor der Aussaat nach Angaben der Hersteller mit dem Pflanzendünger Miracle-Gro All-Purpose Plant Food gedüngt und mit Marathon Greenhouse Insecticide behandelt, das 1 % (w/w) Imidacloprid enthielt. Die Pflanzen wurden nach Bedarf, d.h. normalerweise wöchentlich, gewässert.

##### 3.1.1.2 Flüssigkultur

Die Anzucht von Pflanzen in Flüssigkultur erfolgte in 2-3 Wochen im Dauerlicht auf einem langsam rotierenden Schüttler. Dazu wurden 10-20 mg Samen äußerlich sterilisiert (s. Abschn. 3.1.1.4) und in einem 125 ml-Erlenmeyerkolben in 25 ml MS-Medium ausgesät. Diese Ansätze wurden vor der Kultivierung 3 Tage bei 4 °C inkubiert. Das Medium bestand aus 0,5 g  $\text{L}^{-1}$  2-Morpholinoethansulfonsäure (MES), MS-Salzen und MS-Vitaminen (Murashige und Skoog 1962) sowie 10 g  $\text{L}^{-1}$  Saccharose. Ein pH-Wert von 5,7 wurde mit 1 mol  $\text{L}^{-1}$  Kaliumhydroxid eingestellt.

##### 3.1.1.3 Agarkultur

Keimlinge wurden nach Lorenzen *et al.* (1996) in 7-14 Tagen auf 50 ml modifiziertem MS-Medium in Petrischalen mit einem Durchmesser von 15 cm angezogen. Anstelle der Standardmischung enthielt das Medium modifizierte MS-Salze ohne Ammoniumnitrat. Dieses Salz wurde ersetzt durch 20,6 mmol  $\text{L}^{-1}$  Kaliumnitrat. Das Medium bestand ansonsten aus den im Abschn. 3.1.1.2 angeführten Substanzen und 7 g  $\text{L}^{-1}$  (0,7 % [w/v]) Agar. In einer Schale wurden ca. 50 mg Samen ausgesät, die äußerlich sterilisiert worden waren (s. Abschn. 3.1.1.4). Die Menge entsprach einer Anzahl von ca. 2500 Samen (s. Abschn. 3.1.2.1). Die Agaroberfläche wurde vor der Aussaat mit einer Scheibe Miracloth abgedeckt.

##### 3.1.1.4 Samensterilisation

Die äußerliche Sterilisation von Samen erfolgte in einer frisch angesetzten Lösung, die sich aus dem Bleichmittel Clorox Household Bleach und 0,1 % (v/v) Triton X-100 im Verhältnis von 1 : 2 (v/v) zusammensetzte. Das Bleach enthielt 5,25 % (v/v) Natriumhypochlorit. In einem 15 ml-Probenröhrchen mit Schraubverschluss wurden bis zu 50 mg Samen in 5 ml der Lösung 30 Minuten auf einem Schüttler behutsam gemischt, 3-mal mit 10 ml sterilem Wasser gewaschen und ausgesät.

#### 3.1.2 Transformation

Die Transformation von *Arabidopsis* durch Vakuuminfiltration von *A. tumefaciens* wurde durchgeführt mit Modifikationen nach dem Protokoll von Prof. P. J. Green (MSU-DOE Plant Research Laboratory,

Michigan State University, East Lansing, Michigan, USA). Das Protokoll ist unter der Adresse <http://www.bch.msu.edu/pamgreen/> im Internet zu finden. Es beruht auf der Originalvorschrift von Bechtold *et al.* (1993) mit den Modifikationen von Bent *et al.* (1994).

### 3.1.2.1 Anzucht der Pflanzen

Pflanzen wurden zur Transformation in Töpfen angezogen (s. Abschn. 3.1.1.1). Die Erde wurde vor der Aussaat mit einem Nylonnetz abgedeckt, das am Rand mit einem Gummiband befestigt wurde. In einem Topf wurden ca. 30 Samen ausgesät, wobei angenommen wurde, dass 50 Samen einem Milligramm entsprechen. Die Samen wurden dazu in 10 ml einer Lösung suspendiert, die  $1 \text{ g L}^{-1}$  (0,1 % [w/v]) Agar enthielt, und mit einer Pipettierhilfe ausgesät. Die Pflanzen waren zum Zeitpunkt der Infiltration 4-6 Wochen alt, 5-15 cm groß und hatten gerade begonnen zu blühen.

### 3.1.2.2 Präparation von *A. tumefaciens*

In Pflanzen einzubringende DNA wurde frisch in den Stamm C58 pGV3850 (Zambrisky *et al.* 1983) des Bakteriums transformiert (s. Abschn. 3.2.2.5). Von einer Kolonie wurde in 12 Stunden eine Kultur in 5 ml Medium angezogen. Mit 1 ml der Vorkultur wurden 500 ml Medium angeimpft und der Ansatz in 1-2 Tagen bis zu einer Absorption von größer als 2 bei einer Wellenlänge von 600 nm kultiviert. Die Bakterien wurden danach in 10 Minuten mit  $4000 \text{ g}$  bei  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  aus der Kultur abzentrifugiert und in 1 L Infiltrationsmedium resuspendiert. Dieses wurde frisch hergestellt und bestand aus  $0,5 \text{ g L}^{-1}$  2-Morpholinoethansulfonsäure (MES), 0,5fach konzentrierten MS-Salzen (Murashige und Skoog 1962),  $50 \text{ g L}^{-1}$  Saccharose, B5-Vitaminen (Gamborg *et al.* 1968),  $44 \text{ nmol L}^{-1}$  6-Benzylaminopurin (BAP) und 0,02 % (v/v) Vac-In-Stuff. Ein pH-Wert von 5,7 wurde mit  $1 \text{ mol L}^{-1}$  Kaliumhydroxid eingestellt.

### 3.1.2.3 Vakuuminfiltration

Zur Vakuuminfiltration wurden die Töpfe umgedreht und auf eine Plastikschiene gestellt, die 200 ml der Bakteriensuspension enthielt. Die oberirdischen Pflanzenteile wurden so weit wie möglich in die Flüssigkeit eingetaucht. Die Infiltration erfolgte in einem Scienceware-Vakuumexsikkator, der angeschlossen worden war an eine Laboport-Vakuumpumpe. Einige Minuten nach Anlegen des Vakuums entwickelten sich Luftblasen in der Suspension und an den eingetauchten Pflanzenteilen. Das Vakuum wurde über diesen Zeitpunkt hinaus 3 Minuten aufrechterhalten und dann so schnell wie möglich durch Entfernung des verbindenden Vakuumschlauchs aufgehoben. Bis zu 2 Töpfe wurden in dem gleichen Aliquot der Suspension infiltriert.

### 3.1.2.4 Kultivierung infiltrierter Pflanzen

Die Töpfe mit den infiltrierten Pflanzen wurden in Plastikfolie eingewickelt und auf der Seite liegend 24 Stunden im Gewächshaus kultiviert. Die Folien wurden danach entfernt, die Töpfe in eine aufrechte Position gebracht und die Pflanzen bis zur Entwicklung reifer Schoten 4-6 Wochen weiter kultiviert. Die Pflanzen aus einem Topf wurden dazu zusammengebunden, von den Pflanzen anderer Töpfe getrennt gehalten und nach der Samenreife 2-3 Wochen nicht mehr gewässert. Zur Samenernte wurden die ausgetrockneten, oberirdischen Pflanzenteile von einem Topf abgeschnitten und in ein Stück Papier eingewickelt. Die Samen wurden mechanisch aus den Schoten herausgelöst und in einem Exsikkator für einige Tage getrocknet. Von einem Topf wurden 100-500 mg Samen erhalten.

### 3.1.2.5 Selektion auf transformierte Pflanzen

Zur Selektion auf transformierte Keimlinge wurden 50 mg Samen von einem Topf infiltrierter Pflanzen in einer Petrischale mit einem Durchmesser von 15 cm auf 50 ml Agar ausgesät. Diese Menge entsprach

einer Anzahl von ca. 2500 Samen (s. Abschn. 3.1.2.1). Der Agar enthielt MS-Salze (Murashige und Skoog 1962), B5-Vitamine (Gamborg *et al.* 1968),  $10 \text{ g L}^{-1}$  Saccharose,  $0,5 \text{ g L}^{-1}$  2-Morpholinoethansulfonsäure (MES),  $7 \text{ g L}^{-1}$  (0,7 % [w/v]) Agar und  $50 \text{ mg L}^{-1}$  Kanamycin. Ein pH-Wert von 5,7 wurde mit  $1 \text{ mol L}^{-1}$  Kaliumhydroxid eingestellt. Die Samen wurden äußerlich sterilisiert (s. Abschn. 3.1.1.4), in 7,5 ml Topagar resuspendiert und ausplattiert. Der Topagar wurde dazu auf  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  vorgewärmt und enthielt  $3,5 \text{ g L}^{-1}$  (0,35 % [w/v]) Agarose. Die Schalen wurden anschließend mit Parafilm versiegelt. Keimlinge mit Resistenz gegen Kanamycin wurden in 10-14 Tagen angezogen, nach der Selektion in Töpfe umgepflanzt und 1-2 Wochen bis zur Analyse der Komplementation weiter kultiviert.

### 3.1.3 Extraktionen

#### 3.1.3.1 DNA

Die Extraktion von genomischer DNA aus *Arabidopsis* wurde durchgeführt nach Doyle und Doyle (1990). Eine Menge von 0,5 bis 2,5 g Pflanzenmaterial wurde in einem Porzellanmörser unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff mit einem Pistill zermahlen. Das Pulver wurde in 5 ml Extraktionspuffer überführt, der auf  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  vorgewärmt worden war. Der Puffer bestand aus  $100 \text{ mmol L}^{-1}$  Tris-HCl (pH 8,0),  $20 \text{ g L}^{-1}$  Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB),  $1,4 \text{ mol L}^{-1}$  Natriumchlorid, 0,2 % (v/v) 2-Mercaptoethanol und  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  EDTA (pH 8,0). Das Gemisch wurde 30 Minuten bei  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  inkubiert, auf Raumtemperatur abgekühlt, versetzt mit einem Volumen an Chloroform : Isoamylalkohol im Verhältnis von 24 : 1 (v/v), das Ganze eine Minute kräftig gemischt (Vortex) und 10 Minuten mit 1600 g bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Der wässrigen Phase wurde das 0,7fache Volumen an Isopropanol zugesetzt, der Ansatz 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und 5 Minuten mit 500 g bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Das getrocknete Pellet wurde in 15 ml Waschpuffer resuspendiert, der Ansatz 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und 10 Minuten mit 1600 g zentrifugiert. Der Waschpuffer bestand aus  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  Ammoniumacetat und 76 % (v/v) Ethanol. Das getrocknete Pellet wurde in 1 ml TE-Puffer (pH 8,0) gelöst, mit  $10 \text{ } \mu\text{g}$  DNase-freier RNase A versetzt und der Ansatz 30 Minuten bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  inkubiert. Der Verdau wurde mit TE-Puffer (pH 8,0) auf ein Volumen von 3 ml aufgefüllt, mit 1,5 ml  $7,5 \text{ mol L}^{-1}$  Ammoniumacetat (pH 7,7) und 11,25 ml Ethanol versetzt, das Ganze 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und 10 Minuten mit 10 000 g bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Das getrocknete Pellet wurde in  $100 \text{ } \mu\text{l}$  Wasser gelöst, ein Aliquot von 1-5  $\mu\text{l}$  der Präparation ohne und mit Verdau durch ein Restriktionsenzym (s. Abschn. 3.3.1.1) in einer Agarosegel-Elektrophorese (s. Abschn. 3.3.1.3) auf die Ausbeute und Reinheit der isolierten DNA überprüft. Eine Minipräparation von genomischer DNA erfolgte mit einem auf den 25ten Teil reduzierten Ansatz aus 10-25 mg des Pflanzenmaterials. Nach der Aufarbeitung wurde die DNA in  $20 \text{ } \mu\text{l}$  Wasser gelöst, ein Aliquot von 15  $\mu\text{l}$  reichte aus für eine Southern-Analyse (s. Abschn. 3.3.2.1), ein Aliquot von 5  $\mu\text{l}$  für die PCR (s. Abschn. 3.3.1.5).

#### 3.1.3.2 RNA

Die Extraktion von RNA aus *Arabidopsis* erfolgte mit Modifikationen nach Goldsbrough und Cullis (1981). Eine Menge von 0,5 bis 2,5 g Pflanzenmaterial wurden in einem Porzellanmörser unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff mit einem Pistill zermahlen. Das erzeugte Pulver wurde mit 5 ml Extraktionspuffer und  $10 \text{ } \mu\text{l}$  2-Mercaptoethanol versetzt, zu einer Paste vermischt, dabei zugleich aufgetaut und in 5 ml eines Phenol-Chloroform-Gemisches überführt. Der Puffer bestand aus  $50 \text{ mmol L}^{-1}$  Tris-HCl (pH 8,4), 5 % (v/v) Kirbys Phenol,  $10 \text{ g L}^{-1}$  (1% [w/v]) tri-Isopropyl-naphthalinsulfonat (Natriumsalz) (TIPS) und  $60 \text{ g L}^{-1}$  (6 % [w/v]) *p*-Aminosalicylsäure (Natriumsalz) (PAS). Kirbys Phenol wurde mit folgendem Ansatz oder einem Vielfachen davon hergestellt: 50 g Phenol, 50 mg 8-Hydroxyquinolin und

7 ml m-Cresol. Die Phenol-Lösung wurde mit  $50 \text{ mmol L}^{-1}$  Tris-HCl (pH 8,4) äquilibriert. Das Gemisch aus Phenol und Chloroform setzte sich aus Kirbys Phenol : Chloroform : Isoamylalkohol im Verhältnis von 25 : 24 : 1 (v/v/v) zusammen. Der Ansatz wurde eine Minute kräftig gemischt (Vortex) und 20 Minuten mit  $10\,000 \text{ g}$  bei  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Die wässrigen Phase wurde anschließend mit dem 0,1fachen Volumen an  $3 \text{ mol L}^{-1}$  Natriumacetat (pH 5,2) und einem Volumen an Isopropanol versetzt. Nach 30 Minuten Inkubation bei  $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$  folgte eine Zentrifugation für 10 Minuten wie beschrieben. Das getrocknete Pellet wurde in  $500 \text{ }\mu\text{l}$  Wasser gelöst, der Ansatz mit  $250 \text{ }\mu\text{l}$   $8 \text{ mol L}^{-1}$  Lithiumchlorid versetzt, mindestens eine Stunde bei  $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert und 10 Minuten mit  $16\,000 \text{ g}$  bei  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Dem Überstand wurde ein Volumen an Chloroform : Isoamylalkohol im Verhältnis von 24 : 1 (v/v) zugesetzt, der Ansatz kräftig gemischt und 5 Minuten zentrifugiert wie zuvor. Diesem Schritt folgte die Fällung der RNA aus der wässrigen Phase wie beschrieben. Das Pellet wurde mit  $1 \text{ ml}$  70 % (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in  $100 \text{ }\mu\text{l}$  Wasser gelöst. Mit einem Aliquot von  $1\text{-}5 \text{ }\mu\text{l}$  der Präparation wurde die Ausbeute und Integrität der isolierten RNA in einer Agarosegel-Elektrophorese (s. Abschn. 3.3.1.3) überprüft, die Konzentration und Reinheit derselben wurde photometrisch nach Sambrook *et al.* (1989) bestimmt.

### 3.1.3.3 Sinapinsäureester

Sinapinsäureester wurden nach Lorenzen *et al.* (1996) aus Blättern von *Arabidopsis* extrahiert. Gewebe mit einem Gewicht von  $5\text{-}10 \text{ mg}$  (z.B. 1-2 Keimblätter) wurde mit  $50 \text{ }\mu\text{l}$  einer Mischung aus Methanol : Wasser im Verhältnis von 1 : 1 (v/v) versetzt und in einem  $1,5 \text{ ml}$ -Reaktionsgefäß mit einem Mikropistill homogenisiert. Die Überreste wurden danach in 5 Minuten mit  $16\,000 \text{ g}$  bei  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  abzentrifugiert, Aliquots von  $5\text{-}10 \text{ }\mu\text{l}$  der Extrakte mittels DC (s. Abschn. 3.4.5.2) analysiert.

### 3.1.3.4 SMT

Die SMT wurde nach Lorenzen *et al.* (1996) aus Blättern von *Arabidopsis* extrahiert. Eine Menge von  $10\text{-}100 \text{ mg}$  Blattmaterial wurde mit dem 5fachen Volumen pro Gewicht einer Suspension versetzt, die in  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  Kaliumphosphat-Puffer (pH 6,0) 20 % (w/v) Polyvinylpolypyrrolidon (PVPP) enthielt. Die Homogenisation erfolgte wie für die Sinapinsäureester beschrieben (s. Abschn. 3.1.3.3). Der Aufschluss wurde 30 Minuten im Eis inkubiert, die Überreste der Extraktion danach in 10 Minuten mit  $16\,000 \text{ g}$  bei  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  abzentrifugiert. Aliquots von  $5 \text{ }\mu\text{l}$  der Extrakte wurden eingesetzt in SMT-Enzymtests (s. Abschn. 3.4.5.1).

## 3.2 Bakterien

### 3.2.1 Kultivierung

Die Kultivierung von *E. coli* und *A. tumefaciens* erfolgte in LB-Medium, das hergestellt wurde nach der Vorschrift von Sambrook *et al.* (1989). *A. tumefaciens* wurde bei  $29 \text{ }^{\circ}\text{C}$  angezogen, das LB-Medium enthielt in diesem Fall zusätzlich  $10 \text{ mg L}^{-1}$  Rifampicin. Flüssige Kulturen wurden mit 220 Umdrehungen pro Minute geschüttelt. Auf die Vektoren pBluescript II KS(-), pT7Blue(R), pCRII, pET-20b(+) und pCW Ori+ sowie die Plasmide pCC1, pL3 und pCS610 wurde in *E. coli* mit  $100 \text{ mg L}^{-1}$  Ampicillin selektiert, auf Cosmide des Vektors pBIC20 mit  $12 \text{ mg L}^{-1}$  Tetracyclin und auf den Vektor pBI121 mit  $50 \text{ mg L}^{-1}$  Kanamycin. Auf den Vektor pBI121 und Cosmide erfolgte die Selektion in *A. tumefaciens* mit der gleichen Konzentration an Kanamycin.

## 3.2.2 Transformationen

### 3.2.2.1 Präparation kompetenter Zellen von *E. coli*

Kompetente Zellen des Stamms DH5 $\alpha$  von *E. coli* zur Transformation mittels Hitzeschock wurden nach Inoue *et al.* (1990) hergestellt, die Zellen der Stämme DH5 $\alpha$ , DM1 oder BL21( $\lambda$ DE3) zur Elektroporation nach Behringer und Medford (1992). Die kompetenten Zellen wurden bei -80 °C aufbewahrt und hatten zum Zeitpunkt der Transformation eine Effizienz von mindestens 10<sup>8</sup> cfu/ $\mu$ g für superzirkuläre DNA des Plasmids pUC18.

### 3.2.2.2 Hitzeschock-Transformation von *E. coli*

Die Hitzeschock-Transformation von *E. coli* erfolgte mit Modifikationen nach Inoue *et al.* (1990). Ein Aliquot von 100  $\mu$ l kompetenter Zellen (s. Abschn. 3.2.2.1) wurde im Eis aufgetaut und mit der in das Bakterium einzubringenden DNA versetzt, die in nicht mehr als 5  $\mu$ l Wasser vorlag. Der Ansatz wurde 30 Minuten im Eis inkubiert, dem folgte in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß bei 42 °C für 30 Sekunden der Hitzeschock. Nach erneuter Inkubation im Eis für eine Minute wurden 900  $\mu$ l SOC-Medium zugesetzt, das nach der Vorschrift von Sambrook *et al.* (1989) hergestellt worden war. Zur Expression des Selektionsmarkers wurden die Zellen danach eine Stunde kultiviert und in geeigneten Aliquots auf Agarplatten mit einem Durchmesser von 9 cm enthaltend das zur Selektion erforderliche Antibiotikum ausplattiert. Dazu wurden Glasperlen mit einem Durchmesser von 5 mm verwendet, die Zellen großer Aliquots zuvor in 5 Minuten mit 4000 g bei 4 °C abzentrifugiert und in einem Restvolumen von 200  $\mu$ l des Ansatzes resuspendiert. Die Anzucht von Kolonien transformierter Bakterien erfolgte in 12-16 Stunden, nicht rekombinante Plasmide in Klonierungen wurden soweit möglich durch Anfärbung mit 5-Brom-4-chlor-3-indoyl- $\beta$ -D-galactosid (X-Gal) identifiziert. Der Agar enthielt dazu 0,1 g L<sup>-1</sup> X-Gal und 100  $\mu$ mol L<sup>-1</sup> Isopropylthiogalactosid (IPTG). Weiterhin wurde dabei verfahren wie in der Vorschrift von Sambrook *et al.* (1989) angegeben.

### 3.2.2.3 Elektroporation von *E. coli*

Die Elektroporation wurde im BTX Transporator Plus mit Modifikationen nach Dower *et al.* (1988) und der Anleitung des Herstellers durchgeführt. Dazu wurden Küvetten mit 1 mm Abstand zwischen den Polflächen verwendet. Für den Puls wurde eine Amplitude von 1,46 kV eingestellt. Die Werte anderer Parameter, wie z.B. die Pulslänge von 5 Millisekunden, waren durch das Gerät vorgegeben. Ein Aliquot von 100  $\mu$ l kompetenter Zellen (s. Abschn. 3.2.2.1) wurde im Eis aufgetaut und mit der in das Bakterium einzubringenden DNA in einem Volumen von bis zu 5  $\mu$ l Wasser versetzt. Nach Inkubation im Eis für eine Minute erfolgte die Elektroporation in eisgekühlten Küvetten. Danach wurden umgehend 900  $\mu$ l SOC-Medium (s. Abschn. 3.2.2.2) zugesetzt. Zur Expression des Selektionsmarkers wurde der Ansatz eine Stunde in einem Reagenzröhrchen mit einem Durchmesser von 1,7 cm und einer Höhe von 10 cm kultiviert. Die Anzucht von Kolonien transformierter Bakterien erfolgte wie beschrieben für die Transformation mittels Hitzeschock (s. Abschn. 3.2.2.2).

### 3.2.2.4 Präparation kompetenter Zellen von *A. tumefaciens*

Kompetente Zellen des Stamms C58 pGV3850 (Zambrisky *et al.* 1983) zur Elektroporation wurden nach Meyer (1994) und Meyer *et al.* (1994) hergestellt. Mit einer Kolonie des Bakteriums, das dazu in ca. 48 Stunden frisch auf Agar angezogen worden war, wurde eine Kultur in 100 ml Medium angeimpft und in ca. 24 Stunden bis zu einer Absorption von 1,5 bei einer Wellenlänge von 600 nm kultiviert. Die Bakterien wurden dann in 10 Minuten mit 4000 g bei 4 °C abzentrifugiert und in 50 ml an eiskaltem

Wasser bei ständiger Kühlung im Eis vorsichtig resuspendiert. Dieser Waschschrift wurde noch 2-mal wiederholt, anschließend wurden die Zellen in 1 ml Wasser aufgenommen und in Aliquots zu 100 µl in flüssigem Stickstoff eingefroren, die aufbewahrt wurden bei -80 °C.

### 3.2.2.5 Elektroporation von *A. tumefaciens*

Die Elektroporation wurde nach Meyer (1994) und Meyer *et al.* (1994) durchgeführt. Ein Aliquot der kompetenten Zellen (s. Abschn. 3.2.2.4) wurde im Eis aufgetaut und versetzt mit 0,5 µg Cosmid-DNA oder 0,1 µg Plasmid-DNA in einem Volumen von bis zu 5 µl Wasser. Die Elektroporation erfolgte wie für *E. coli* beschrieben (s. Abschn. 3.2.2.3), die Zellen wurden anschließend 3 Stunden zur Expression des Selektionsmarkers kultiviert. Kolonien transformierter Bakterien wurden in 24-48 Stunden angezogen, einzelne Kolonien erneut ausplattiert und dann umgehend zur Transformation von *Arabidopsis* mittels Vakuuminfiltration (s. Abschn. 3.1.2.2) verwendet.

## 3.2.3 Extraktionen

### 3.2.3.1 Minipräparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Zur Minipräparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde das Wizard *Plus* Miniprep DNA Purification System nach der Anleitung des Herstellers (Technisches Bulletin Nr. 117) in der Ausgabe von 1996 verwendet. Die aktuelle Version des Bulletins ist unter der Adresse <http://www.promega.com/> im Internet zu finden. Die Prozedur bestand aus der alkalischen Lyse der Zellen nach Birnboim und Doly (1979), wonach die Plasmid-DNA an einer Wizard-Minisäule chromatographisch aufgereinigt wurde. Mit einer Bakterienkolonie wurde eine Kultur in 5 ml Medium gestartet und in 12-16 Stunden bis zur späten exponentiellen Phase kultiviert. Die Zellen wurden danach in 5 Minuten mit 16 000 g bei 4 °C abzentrifugiert und in 300 µl eines Puffers resuspendiert, der aus 50 mmol L<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH 7,5), 10 mmol L<sup>-1</sup> EDTA (pH 8,0) und 0,1 g L<sup>-1</sup> DNase-freier RNase A bestand. Die Suspension wurde mit 300 µl einer Lösung vermischt, die 0,2 mol L<sup>-1</sup> Natriumhydroxid und 1 % (w/v) SDS enthielt, dem folgte der Zusatz von 300 µl eines Puffers mit 1,32 mol L<sup>-1</sup> Kaliumacetat (pH 4,8). Der Überstand nach 5 Minuten Zentrifugation mit 16 000 g bei 4 °C wurde auf eine Wizard-Minisäule geladen, in der 1 ml des Wizard-Harzes vorgelegt worden waren, das aus einer Mischung von Glas- und Kieselgelpartikeln bestand. Die Säule wurde dann mit 2 ml eines Puffers gewaschen, der 8,3 mmol L<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH 7,5), 80 mmol L<sup>-1</sup> Kaliumacetat, 40 µmol L<sup>-1</sup> EDTA (pH 8,0) und 55 % (v/v) Ethanol enthielt. Flüssigkeiten wurden mit der Vakuumpumpe Vac-Man durch das Harz gesaugt, durch 30 Sekunden Zentrifugation mit 16 000 g bei 4 °C die Plasmid-DNA dann in 50 µl Wasser von der Minisäule eluiert. Ein Aliquot von 1-5 µl der Präparation wurde mit und ohne den Verdau durch ein Restriktionsenzym (s. Abschn. 3.3.1.1) in einer Agarosegel-Elektrophorese (s. Abschn. 3.3.1.3) überprüft auf die Ausbeute und Reinheit der isolierten Plasmid-DNA.

### 3.2.3.2 Minipräparation von Cosmid-DNA aus *E. coli*

Die Minipräparation von Cosmid-DNA aus *E. coli* wurde nach Meyer (1994) durchgeführt. Eine Kultur wurde wie für die Minipräparation von Plasmid-DNA beschrieben (s. Abschn. 3.2.3.1) angezogen. Aus den Zellen der Kultur wurde durch alkalische Lyse nach der Vorschrift von Sambrook *et al.* (1989) ein Extrakt hergestellt, der 2-mal mit Phenol-Chloroform (vorsichtig) extrahiert wurde (s. Abschn. 3.3.1.2). Die Cosmid-DNA wurde aus dem Extrakt mit Ethanol gefällt (s. Abschn. 3.3.1.2), das getrocknete Pellet danach in 200 µl TE-Puffer (pH 8,0) gelöst. Diese Präparation wurde für eine Stunde bei 37 °C mit 20 µg DNase-freier RNase A verdaut, gereinigt und konzentriert wie beschrieben, das getrocknete Pel-

let anschließend in 20 µl Wasser gelöst. Die Ausbeute an Cosmid-DNA wurde in der Agarosegel-Elektrophorese (s. Abschn. 3.3.1.3) mit einem Aliquot von 1 µl überprüft, die Hälfte der Präparation reichte normalerweise aus für den Verdau der Cosmide mit einem Restriktionsenzym (s. Abschn. 3.3.1.1) und die Analyse der erzeugten Fragmente genomischer DNA in der Agarosegel-Elektrophorese (s. Abschn. 3.3.1.3).

### 3.2.3.3 Midipräparation von Cosmid-DNA aus *E. coli*

Die Cosmid-DNA wurde aus *E. coli* mit dem Plasmid Midi Kit nach dem Handbuch des Herstellers in der Ausgabe von 1995 präpariert. Dabei wurde das Protokoll für Plasmide und Cosmide mit einer sehr geringen Kopienzahl pro Zelle verwendet. Die aktuelle Version des Handbuchs ist im Internet unter der Adresse <http://www.quiagen.com> zu finden. Die Prozedur bestand aus der Herstellung eines alkalischen Lysats, aus dem die Cosmid-DNA mittels Anionen-Austauschchromatographie aufgereinigt wurde. Von einer Kolonie des zu präparierenden Klones wurde in einigen Stunden eine Vorkultur in 5 ml Medium angezogen und mit 1 ml davon eine Kultur in 500 ml Medium gestartet, die in 12-16 Stunden bis in die späte exponentielle Phase kultiviert wurde. Die Zellen wurden anschließend durch eine Zentrifugation für 15 Minuten mit 6000 g bei 4 °C daraus abzentrifugiert und in 20 ml Puffer P1 resuspendiert. Dieser enthielt 50 mmol L<sup>-1</sup> Tris-HCl pH 8,0, 10 mmol L<sup>-1</sup> EDTA (pH 8,0) und 100 mg L<sup>-1</sup> DNase-freier RNase A. Die Suspension wurde mit 20 ml Puffer P2 vermischt, nach einer Inkubation für 5 Minuten mit 20 ml Puffer P3, dem 30 Minuten Inkubation im Eis folgten. Der Puffer P2 bestand aus 0,2 mol L<sup>-1</sup> Natriumhydroxid und 10 g L<sup>-1</sup> (1 % [w/v]) SDS, der Puffer P3 enthielt 3 mol L<sup>-1</sup> Kaliumacetat (pH 5,5). Der Überstand nach Zentrifugation für 30 Minuten mit 20 000 g bei 4 °C war das alkalische Lysat, aus dem die Nukleinsäuren bei Raumtemperatur mit dem 0,7fachen Volumen an Isopropanol gefällt und in 30 Minuten mit 15 000 g bei 4 °C abzentrifugiert wurden. Das getrocknete Pellet wurde gelöst in 500 µl TE-Puffer (pH 7,0), die Präparation mit 3,5 ml an QBT-Puffer versetzt, der aus 750 mmol L<sup>-1</sup> Natriumchlorid, 50 mmol L<sup>-1</sup> 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS) (pH 7,0), 15 % (v/v) Isopropanol und 0,15 % (v/v) Triton X-100 bestand. Eine Quiagen 100-Säule wurde dann mit 4 ml des gleichen Puffers äquilibriert, nach dem Auftrag der Präparation die Säule 2-mal mit 10 ml QC-Puffer gewaschen und die Cosmid-DNA in 5 ml QF-Puffer eluiert. Der QC-Puffer bestand aus 50 mmol L<sup>-1</sup> MOPS (pH 7,0), 1 mol L<sup>-1</sup> Natriumchlorid und 15 % (v/v) Isopropanol, der QF-Puffer setzte sich aus 50 mmol L<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH 8,0), 1,25 mol L<sup>-1</sup> Natriumchlorid und 15 % (v/v) Isopropanol zusammen. Die Cosmid-DNA wurde aus dem Eluat mit Isopropanol gefällt wie beschrieben und dann in 100 µl Wasser gelöst. Aliquots der Präparation von 1-5 µl ohne und mit Verdau durch ein Restriktionsenzym (s. Abschn. 3.3.1.1) wurden auf die Menge und Reinheit der Cosmid-DNA überprüft in einer Agarosegel-Elektrophorese (s. Abschn. 3.3.1.3) überprüft, die Konzentration photometrisch bestimmt nach Sambrook *et al.* (1989). Mit dem Protokoll konnten ca. 100 µg Cosmid-DNA isoliert werden. Weitere Informationen zur Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* auf der Basis des Quiagen-Systems sind z.B. in Budelier und Schorr (1998) sowie Heilig *et al.* (1998) zu finden.

### 3.2.3.4 Minipräparation von Plasmid- und Cosmid-DNA aus *A. tumefaciens*

Die Minipräparation von Plasmid- und Cosmid-DNA aus *A. tumefaciens* erfolgte mit dem gleichen Protokoll wie die Minipräparation von Cosmid-DNA aus *E. coli* (s. Abschn. 3.2.3.2).

### 3.3 Nukleinsäuren

#### 3.3.1 Basismethoden für DNA

##### 3.3.1.1 Enzymatische Modifikationen

Der Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen, die Dephosphorylierung mit alkalischer Phosphatase, die Phosphorylierung mit T4 Polynukleotidkinase und die Ligation mit T4 DNA-Ligase erfolgten mit Modifikationen nach den Vorschriften von Sambrook *et al.* (1989) und den Angaben der Hersteller dieser Enzyme. Der Verdau von 0,2-1 µg Plasmid-DNA erfolgte für zumindest eine Stunde bei der dazu notwendigen Temperatur von normalerweise 37 °C mit jeweils 10 U der Restriktionsenzyme in einem Volumen von 20 µl, wobei ein dafür geeigneter Reaktionspuffer des Enzymherstellers (z.B. Promega) verwendet wurde. Vektor-DNA wurde direkt im Verdau mit Restriktionsenzymen durch 1 U der Phosphatase (z.B. von Boehringer) in einer Stunde bei 37 °C dephosphoryliert. Die Phosphorylierung eines Fragments erfolgte durch Inkubation von 0,25 µg DNA desselben mit 20 U der Kinase (z.B. von Promega) für 30 Minuten bei 37 °C in einem Volumen von 40 µl. Der Kinasepuffer bestand aus 70 mmol L<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH 7,6), 10 mmol L<sup>-1</sup> Magnesiumchlorid, 5 mmol L<sup>-1</sup> Dithiothreitol (DTT) und 0,1 mmol L<sup>-1</sup> Desoxyadenosin-5'-triphosphat (ATP). Ein Ligationsansatz enthielt 100 ng des Vektorfragments (s. Abschn. 2.5) und die 2fache molare Menge des zu klonierenden DNA-Fragments. Die Ligation erfolgte durch 1 U (Weiss) T4 DNA-Ligase (z.B. von Promega) bei 16 °C für 12 Stunden in einem Volumen von 10 µl. Der Ligasepuffer bestand aus 30 mmol L<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH 7,8), 10 mmol L<sup>-1</sup> Magnesiumchlorid, 10 mmol L<sup>-1</sup> Dithiothreitol (DTT) und 0,1 mol L<sup>-1</sup> ATP. Ein Aliquot des Ansatzes von 1-5 µl wurde anschließend in die Hitzeschock-Transformation von *E. coli* (s. Abschn. 3.2.2.2) eingesetzt.

##### 3.3.1.2 Konzentration und Reinigung

Die Konzentration von DNA erfolgte durch Fällung mit dem 2,5fachen Volumen an eiskaltem Ethanol nach Zusatz des 0,1fachen Volumens an 3 mol L<sup>-1</sup> Natriumacetat (pH 5,2). Die gefällte DNA wurde nach 30 Minuten Inkubation bei -20 °C in 30 Minuten mit 16 000 g bei 4 °C abzentrifugiert, das Pellet mit 1 ml 70 % (v/v) Ethanol bei Raumtemperatur gewaschen, der Ansatz 10 Minuten zentrifugiert wie zuvor, bei Raumtemperatur getrocknet und in einem geeigneten Volumen an Wasser gelöst. Die Reinigung von DNA erfolgte durch Extraktion mit demselben Volumen einer Mischung aus Kirbys Phenol (s. Abschn. 3.1.3.2) : Chloroform : Isoamylalkohol im Verhältnis von 25 : 24 : 1 (v/v/v). Die Phasen wurde dazu eine Minute gemischt (Vortex) und durch 5 Minuten Zentrifugation mit 16000 g bei 4 °C wieder getrennt, die wässrige Phase wie beschrieben mit Chloroform reextrahiert und dann die DNA daraus mit Ethanol gefällt. Zur Volumensreduktion wurden wässrige Lösungen von DNA so oft wie notwendig auf die gleiche Weise mit demselben Volumen an 2-Butanol extrahiert. Weiterhin wurde verfahren wie in den Vorschriften von Sambrook *et al.* (1989) angegeben.

##### 3.3.1.3 Agarosegel-Elektrophorese

Gele enthielten 8 g L<sup>-1</sup> (0,8 % [w/v]) Agarose und 0,5 mg L<sup>-1</sup> Ethidiumbromid in TAE-Puffer. In dem gleichen Puffer, der aus 40 mmol L<sup>-1</sup> Tris-Acetat (pH 8,0) und 1 mmol L<sup>-1</sup> EDTA (pH 8,0) bestand, wurden bei konstant 80 V die Elektrophoresen durchgeführt. Der 6fach konzentrierte Auftragspuffer setzte sich aus 30 % (v/v) Glycerin, 6 mmol L<sup>-1</sup> EDTA (pH 8,0) und 2,5 g L<sup>-1</sup> (0,25 % [w/v]) Bromphenolblau (BPB) zusammen. Als Standards wurden die 1 kb-DNA-Leiter mit Größen der Fragmente von 0,25 kb bis 10 kb oder ein vergleichbares System verwendet. Eine Menge von 0,5 µg DNA der Leiter

wurde auf das Gel geladen. Darüber hinaus wurde die Agarosegel-Elektrophorese nach der Vorschrift von Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt.

#### 3.3.1.4 Gelextraktion von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente wurden mit dem Quiaex II Gel Extraction Kit nach dem Handbuch des Herstellers in der Ausgabe von 1995 aus den Agarosegelen (s. Abschn. 3.3.1.3) extrahiert. Die aktuelle Version des Handbuchs ist im Internet unter der Adresse <http://www.quiagen.com> zu finden. Gelstücke enthaltend die DNA wurden mit dem 3fachen Volumen pro Gewicht an Puffer QX1 und 10 µl der Quiaex II-Suspension versetzt. Zur Auflösung des Gels und Bindung der DNA an die Quiaex II-Partikel wurde der Ansatz 10 Minuten bei 50 °C inkubiert. Die Partikel wurden dann in 30 Sekunden mit 16000 g bei 4 °C abzentrifugiert, mit 500 µl des Puffers QX1 und PE gewaschen sowie bei Raumtemperatur getrocknet. Die Elution der DNA erfolgte in 20 µl eines Puffers mit 10 mmol L<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH 8,5) durch erneute Inkubation für 5 Minuten bei 50 °C. Die Ausbeute wurde in der Agarosegel-Elektrophorese (s. Abschn. 3.3.1.3) mit einem Aliquot von 2 µl des Eluats überprüft. Die Partikel bestanden aus einem Kieselgel, der Puffer QX1 enthielt in hoher Konzentration ein chaotropes Salz, der PE-Puffer eine niedrige Salzkonzentration und Ethanol. Exakte Herstellerangaben über die Zusammensetzung der in dem Kit enthaltenen Materialien lagen nicht vor. Diese entsprechen möglicherweise dem, was in Moore *et al.* (1994) oder der Originalvorschrift von Vogelstein und Gillespie (1979) beschrieben wurde.

#### 3.3.1.5 Polymerase-Kettenreaktion

Die PCR wurde mit Modifikationen nach Innis *et al.* (1990) und den Herstellerangaben (z.B. Promega) für die *Taq* und *Pfu* DNA-Polymerase durchgeführt. Der Ansatz enthielt in einem Volumen von 50 µl 0,25 µmol L<sup>-1</sup> der Primer, jeweils 0,2 mmol L<sup>-1</sup> Desoxynukleotide (pH 7,5), 1 U des Enzyms und die DNA-Matrize, z.B. 10 ng eines zirkulären Plasmids. Der Reaktionspuffer für die *Taq* DNA-Polymerase enthielt 10 mmol L<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH 9,0 [25 °C]), 50 mmol L<sup>-1</sup> Kaliumchlorid, 1,5 mmol L<sup>-1</sup> Magnesiumchlorid und 0,1 % (v/v) Triton X-100, derjenige für die *Pfu* DNA-Polymerase 20 mmol L<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH 8,8 [25 °C]), 10 mmol L<sup>-1</sup> Kaliumchlorid, 10 mmol L<sup>-1</sup> Ammoniumsulfat, 2 mmol L<sup>-1</sup> Magnesiumsulfat, 0,1 % (v/v) Triton X-100 und 100 mg L<sup>-1</sup> Rinderserumalbumin (BSA). Der Ansatz wurde mit demselben Volumen an Mineralöl überschichtet. Die PCR erfolgte in 30 Zyklen mit der Denaturierung bei 94 °C und der Elongation bei 72 °C oder 75 °C für die *Taq* oder *Pfu* DNA-Polymerase. Die Primer wurden normalerweise bei 54 °C hybridisiert. Die Dauer von Denaturierung und Hybridisierung betrug eine Minute, diejenige der Elongation normalerweise zumindest eine Minute, ansonsten für jeweils 1 kb zu amplifizierender DNA eine Minute bei der *Taq* und 2 Minuten bei der *Pfu* DNA-Polymerase. Vor dem Start der PCR wurde der Ansatz für 2 Minuten auf 94 °C erhitzt und in dieser Phase das Enzym zugesetzt (sog. *Hot Start*). Die PCR wurde mit einer Elongation für 10 Minuten beendet, ein Aliquot von 5 µl des Ansatzes in einer Agarosegel-Elektrophorese (s. Abschn. 3.3.1.3) analysiert. Das Expand High Fidelity PCR Kit kam mit 2,5 U der Enzymmischung aus der *Taq* und *Pyrococcus woesei* (*Pwo*) DNA-Polymerase auf die gleiche Weise zum Einsatz wie die *Taq* DNA-Polymerase, das Kit beruhte auf der Methode von Barnes (1994), über den Reaktionspuffer lagen keine Herstellerangaben vor.

#### 3.3.1.6 Klonierung von PCR-Fragmenten

Zur Klonierung von Fragmenten aus der PCR (s. Abschn. 3.3.1.5) wurden das Original TA Cloning Kit mit dem Vektor pCRII in der Version 1.0 nach der Anleitung des Herstellers von 1996 oder der Vektor pT7Blue(R) verwendet. Die aktuelle Version derselben ist unter der Adresse <http://www.invitrogen.com> im Internet zu finden. In eine Ligationsreaktion (s. Abschn. 3.3.1.1) wurden 50 ng der Vektor-DNA und

die 2fache molare Menge des PCR-Fragments eingesetzt. Der Vektor pT7Blue(R) wurde nach Hadjeb und Berkowitz (1996) durch die *Taq* DNA-Polymerase mit überhängenden 3'-Enden aus Desoxythymidin versehen und in gleicher Weise wie das Kit zur Klonierung von PCR-Fragmenten verwendet.

### 3.3.1.7 Radioaktive Markierung

Sonden wurden mit [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-Desoxyadenosin-5'-triphosphat und dem DECAprime II DNA Labeling Kit nach der Anleitung des Herstellers in der Ausgabe von 1997 hergestellt. Das Radionukleotid hatte eine spezifische Aktivität von 3000 Ci mmol $^{-1}$ , die Konzentration betrug 10 Ci L $^{-1}$ . Die zu markierenden DNA-Fragmente wurden durch Verdau mit Restriktionsenzymen (s. Abschn. 3.3.1.1), eine Agarosegel-Elektrophorese (s. Abschn. 3.3.1.3) und Gelextraktion (s. Abschn. 3.3.1.4) aus Plasmiden präpariert. In einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß wurden ca. 25 ng der DNA mit Wasser zu einem Volumen von 11,5  $\mu$ l aufgefüllt und mit 2,5  $\mu$ l der 10fach konzentrierten Dekanukleotid-Primerlösung versetzt. Der Ansatz wurde 5 Minuten auf 100 °C erhitzt, eine Minute im Eis abgekühlt und kurz mit 16000 g bei 4 °C zentrifugiert. Dem folgte der Zusatz von 5  $\mu$ l der 5fach konzentrierten Reaktionsmischung, 5  $\mu$ l des Radionukleotids und 1  $\mu$ l der Lösung des Klenow-Fragments der DNA-Polymerase I von *E. coli*, was 5 U des Enzyms entsprach. Nach 10 Minuten Inkubation bei 37 °C wurde die Reaktion mit 1  $\mu$ l einer Lösung, die 0,5 mol L $^{-1}$  EDTA (pH 8,0) enthielt, abgestoppt und nicht eingebautes Radionukleotid abgetrennt (s. Abschn. 3.3.1.8). Die Reaktionsmischung enthielt die Desoxynukleoside der Basen Cytosin, Guanin und Thymin sowie Puffer und Salze. Über die exakte Zusammensetzung der Lösung wie diejenige der Primer lagen keine Herstellerangaben vor. Diese entsprechen möglicherweise dem, was beschrieben wurde in der Originalvorschrift von Feinberg und Vogelstein (1983).

### 3.3.1.8 Reinigung radioaktiver Sonden

Nicht eingebautes Radionukleotid nach der Herstellung von radioaktiven Sonden (s. Abschn. 3.3.1.7) wurde durch Säulenchromatographie abgetrennt. Der Kolben einer 3 ml-Einwegspritze wurde dazu mit 2,5 ml Sephadex G-50, das mit 40 g L $^{-1}$  in TE-Puffer (pH 8,0) äquilibriert worden war, gefüllt. Der Ausfluss der Spritze wurde dafür mit einer Scheibe Miracloth abgedeckt. Die Markierungsreaktion wurde mit dem 0,1fachen Volumen an Auftragspuffer versetzt und auf die Säule geladen. Der Puffer setzte sich aus 400 g L $^{-1}$  (40 % [w/v]) Saccharose und 0,25 g L $^{-1}$  (0,025 % [w/v]) Bromphenolblau (BPB) zusammen. Die nicht eingebaute Aktivität wurde mit 650  $\mu$ l TE-Puffer (pH 8,0) von der Säule gewaschen, die Sonde danach mit dem gleichen Volumen an Puffer eluiert. Die Qualität der Sonde wurde mit dem Handmonitor Survey Meter Model 3 mit Pancake-Detector Model 44-9 abgeschätzt. Eine Zählrate von mehr als 3000 Treffern pro Minute im Abstand von 30 cm reichte aus für eine Hybridisierung (s. Abschn. 3.3.2.2 u. 3.3.3.2). Die Sonde wurde dazu 5 Minuten auf 100 °C erhitzt und dann umgehend in das Experiment eingesetzt.

### 3.3.1.9 Automatische Sequenzierung

Die automatische Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde nach dem Kettenabbruch-Verfahren (Sanger *et al.* 1977) mit der Methode des *Cycle Sequencing* durch das Center for DNA Sequencing der Purdue University, West Lafayette, Indiana, USA durchgeführt. Dabei wurden das ALFexpress DNA Analysis System von Pharmacia (Uppsala, Schweden) und mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte Standardprimer wie T3 und T7 verwendet. Die Plasmid-DNA wurde mit dem Wizard *Plus* Minipreps DNA Purification System präpariert (s. Abschn. 3.2.3.1). Die Konzentration der DNA wurde photometrisch bestimmt nach Sambrook *et al.* (1989), durch eine Agarosegel-Elektrophorese (s. Abschn. 3.3.1.3) zudem Menge, Superzirkularität und Reinheit überprüft. Dazu wurde Plasmid-DNA mit und ohne Verdau durch ein

Restriktionsenzym (s. Abschn. 3.3.1.1) auftragen. In eine Reaktion wurden ca. 2,5 µg der DNA in bis zu 20 µl Wasser eingesetzt.

### 3.3.1.10 Manuelle Sequenzierung

DNA wurde manuell mit dem USB Sequenase DNA Sequencing Kit in der Version 2.0 nach Anleitung des Herstellers in der 9. Ausgabe von 1994 nach den Standardprotokollen sequenziert. Dithiothreitol (DTT), Labeling Mix und [ $\alpha$ - $^{35}\text{S}$ ]-Desoxyadenosin-5'-triphosphat in der Markierungsreaktion wurden durch  $^{35}\text{SequeTide}$  Nucleotide Premix ersetzt. Dieses enthielt 10 mmol L $^{-1}$  Tricin-NaOH (pH 7,6), 2 Ci L $^{-1}$  des [ $\alpha$ - $^{35}\text{S}$ ]-Desoxyadenosin-5'-triphosphats, 1,5 µmol L $^{-1}$  der Nukleotide des Guanins, Cytosins und Thymins sowie 1 mmol L $^{-1}$  Dithiothreitol (DTT), die spezifische Aktivität des Radionukleotids betrug 1250 Ci mmol L $^{-1}$ . Als Matrize wurde Plasmid-DNA eingesetzt, die in einer Minipräparation (s. Abschn. 3.2.3.1.) hergestellt worden war, die Konzentration derselben wurde photometrisch bestimmt nach Sambrook *et al.* (1989), in einer Agarosegel-Elektrophorese (s. Abschn. 3.3.1.3) wurden zudem Menge, Reinheit und Superzirkularität überprüft. In eine Reaktion wurden 1 pmol entsprechend 2-3,5 µg der DNA und eine äquimolare Menge des Primers eingesetzt. Zur Denaturierung wurde die Plasmid-DNA mit dem 0,1fachen Volumen an 2 mol L $^{-1}$  Natriumhydroxid und 2 mmol L $^{-1}$  EDTA (pH 8,0) versetzt, der Ansatz 30 Minuten bei 37 °C inkubiert und die DNA mit Ethanol gefällt (s. Abschn. 3.3.1.2). Die getrocknete DNA wurde anschließend in 7 µl Wasser, 1 µl einer Lösung mit 1 µmol L $^{-1}$  des Primers und 2 µl an 5fach konzentriertem Sequenase-Puffer gelöst. Der Puffer enthielt 0,2 mol L $^{-1}$  Tris-HCl (pH 7,5), 0,1 mol L $^{-1}$  Magnesiumchlorid und 0,25 mol L $^{-1}$  Natriumchlorid. Zur Hybridisierung des Primers wurde der Ansatz 2 Minuten bei 65 °C inkubiert und langsam (Wasserbad) auf Raumtemperatur abgekühlt. Nach dem Zusatz von 4 µl  $^{35}\text{SequeTide}$  und 2 µl der Sequenase erfolgte die Markierungsreaktion für 3 Minuten. Das Enzym wurde dazu mit 1,6 U µl $^{-1}$  in einem Puffer verdünnt, der 10 mmol L $^{-1}$  Tris-HCl (pH 7,5), 5 mmol L $^{-1}$  Dithiothreitol (DTT) und 0,5 g L $^{-1}$  Rinderserumalbumin (BSA) enthielt. Jeweils 2,5 µl der Kettenabbruch-Mischungen wurden danach mit 3,5 µl des Markierungsansatzes versetzt, die Reaktionen 5 Minuten bei 37 °C inkubiert und mit 4 µl Stopplösung beendet. Die Mischungen enthielten 8 µmol L $^{-1}$  des Didesoxynukleotids, 80 µmol L $^{-1}$  der Desoxynukleotide und 50 mmol L $^{-1}$  Natriumchlorid, die Stopplösung setzte sich zusammen aus 95 % (v/v) Formamid, 20 mmol L $^{-1}$  EDTA (pH 8,0) und 0,5 g L $^{-1}$  [0,05 % (w/v)] Bromphenolblau (BPB) wie Xylen Cyanol FF (XC). Zur Auftrennung wurde das Sequenziergel-Elektrophoresesystem 2 verwendet, das Gel hatte eine Länge von 38,5 cm und Dicke von 0,4 mm. Die Glasplatten wurden anstelle von Dichlormethylsilan mit Gel Slick präpariert, das Gel enthielt in 0,6fach konzentriertem TBE-Puffer 5 % (v/v) des Long Rangers (entsprechend 5 % [w/v] Polyacrylamid) und 7 mol L $^{-1}$  (42 % [w/v]) Harnstoff, die Polymerisation wurde gestartet mit 0,5 g L $^{-1}$  (0,05 % [w/v]) Ammoniumperoxidisulfat (APS) und 0,05 % (v/v) N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED). Der TBE-Puffer enthielt 89 mmol L $^{-1}$  Tris-HCl (pH 8,3) und 2 mmol L $^{-1}$  EDTA (pH 8,0). Ein Aliquot von 2,5 µl der Reaktionen wurde auf das Gel geladen, die Elektrophorese erfolgte mit einer konstanten Leistung von 60 W, sie wurde beendet, sobald der Marker Bromphenolblau (BPB) das Gel durchlaufen hatte. Das Gel wurde danach ohne Fixierung in einem Geltrockner bei 80 °C unter Vakuum getrocknet, dem folgte die Autoradiographie für 12-24 Stunden auf dem Film X-Omat AR ohne einen Intensifying Screen bei Raumtemperatur. Darüber hinaus wurde die Sequenzierung durchgeführt nach den Vorschriften von Sambrook *et al.* (1989).

### 3.3.2 Southern-Analyse

#### 3.3.2.1 Southern-Transfer

Pro Spur eines Southern Blots wurden ca. 2,5 µg genomische DNA verwendet, die für 6-12 Stunden mit 20 U des Restriktionsenzym in einem Volumen von 20 µl bei geeigneter Temperatur verdaut wurden. Der Ansatz enthielt außerdem 100 mg L<sup>-1</sup> Rinderserumalbumin (BSA). Die DNA wurde anschließend im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (s. Abschn. 3.3.1.3). Dabei wurde neben der 1 kb-DNA-Leiter als Standard 0,5 µg DNA des Bakteriophagen Lambda eingesetzt, die mit dem Restriktionsenzym *Hind*III verdaut worden war. Zur Kontrolle der Hybridisierung wurde zudem eine geringe Menge des DNA-Fragments aufgetragen, das als Probe vorgesehen war. Die Vorbereitung des Gels für den kapillaren Transfer auf die Membran Hybond N<sup>+</sup> und der Transfer wurden durchgeführt nach der Anleitung des Herstellers in der Version 2.0 von 1992. Die dabei eingesetzten Protokolle entsprachen denen von Sambrook *et al.* (1989). Die DNA wurde 10 Minuten mit 0,25 mol L<sup>-1</sup> HCl im Gel depuriniert, 30 Minuten in einer Lösung mit 0,5 mol L<sup>-1</sup> Natriumhydroxid und 1,5 mol L<sup>-1</sup> Natriumchlorid denaturiert sowie 30 Minuten in einem Puffer neutralisiert, der aus 1 mol L<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH 8,0) und 1,5 mol L<sup>-1</sup> Natriumchlorid bestand. Für den Transfer wurde 10fach konzentrierter SSC-Puffer verwendet, der aus 15 mmol L<sup>-1</sup> Natriumcitrat und 150 mmol L<sup>-1</sup> Natriumchlorid zusammengesetzt war. Ein pH-Wert von 7,0 wurde mit 1 mol L<sup>-1</sup> Natriumhydroxid eingestellt. Die Membran wurde nach dem Transfer mit 5fach konzentriertem SSC-Puffer kurz gewaschen und auf saugfähigem Papier vollständig getrocknet. Die Fixierung der DNA auf der Membran erfolgte durch 0,06 J cm<sup>-2</sup> UV-Licht mit einer Wellenlänge von 254 nm im Stratalinker UV-Crosslinker.

#### 3.3.2.2 Southern-Hybridisierung

Die Hybridisierung erfolgte für zumindest 12 Stunden bei 65 °C in 20 ml einer dazu frisch angesetzten Lösung, die aus 5fach konzentriertem SSPE-Puffer, 5 g L<sup>-1</sup> (0,5 % [w/v]) SDS, 50 g L<sup>-1</sup> (5 % [w/v]) Dextransulfat und 5 g L<sup>-1</sup> (0,5 % [w/v]) Trockenmilchpulver bestand. Der SSPE-Puffer setzte sich aus 10 mmol L<sup>-1</sup> Natriumphosphat (pH 7,4), 150 mmol L<sup>-1</sup> Natriumchlorid und 1 mmol L<sup>-1</sup> EDTA (pH 8,0) zusammen. Die Blots wurden eine Stunde in der Lösung prähybridisiert und in frischer Lösung mit der Sonde hybridisiert. Anschließend wurde jeweils 2-mal 10 Minuten bei Raumtemperatur und bei 65 °C in 100 ml einer Lösung gewaschen, die aus 2fach konzentriertem SSPE-Puffer und 1 g L<sup>-1</sup> (0,1 % [w/v]) SDS bestand. Bei einem hohen Hintergrundsignal wurde so oft wie notwendig für 10 Minuten bei 65 °C in 100 ml einer Lösung gewaschen, die 0,2fach konzentrierten SSPE-Puffer und 1 g L<sup>-1</sup> (0,1 % [w/v]) SDS enthält. Die Autoradiographie erfolgte in Abhängigkeit von der Signalstärke für 5-72 Stunden bei -80 °C, wozu der Medical X-Ray Film RX und ein Intensifying Screen verwendet wurden. Für eine erneute Hybridisierung wurde die Sonde nach einem Protokoll aus der Anleitung des Herstellers von der Membran abgewaschen. Die Blots wurden dabei 30 Minuten bei 45 °C in 0,4 mol L<sup>-1</sup> Natriumhydroxid inkubiert und 2-mal 15 Minuten bei Raumtemperatur in einer Lösung aus 0,2 mol L<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH 7,5), 0,1fachem SSC-Puffer und 1 g L<sup>-1</sup> [0,1 % [w/v]) SDS neutralisiert.

### 3.3.3 Northern-Analyse

#### 3.3.3.1 Northern-Transfer

Für einen Northern Blot wurden pro Spur 5 µg RNA verwendet. Die RNA wurde mit dem 3fachen Volumen an Auftragsmischung versetzt, der Ansatz 10 Minuten bei 65 °C inkubiert, eine Minute im Eis abgekühlt, mit Auftragspuffer (s. Abschn. 3.3.1.3) versetzt und auf das Gel geladen. Die Auftragsmi-

schung bestand aus 100  $\mu\text{l}$  an 10fach konzentriertem MOPS-Puffer, 170  $\mu\text{l}$  37 % (v/v) Formaldehyd, 500  $\mu\text{l}$  Formamid und 10  $\mu\text{l}$  einer Lösung mit 10  $\text{g L}^{-1}$  Ethidiumbromid. Das Gel enthielt 10  $\text{g L}^{-1}$  (1 % [w/v]) Agarose und 2,2  $\text{mol L}^{-1}$  Formaldehyd in MOPS-Puffer. Die Elektrophorese (s. Abschn. 3.3.1.3) erfolgte ebenfalls in diesem Puffer, der aus 20  $\text{mmol L}^{-1}$  3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS) (pH 7,0), 8  $\text{mmol L}^{-1}$  Natriumacetat und 1  $\text{mmol L}^{-1}$  EDTA (pH 8,0) bestand. Als Standard wurde eine Menge von 7,5  $\mu\text{g}$  der 0,24-9,5 kb-RNA-Leiter aufgetragen. Der kapillare Transfer auf die Membran Hybond N<sup>+</sup> wurde nach der Anleitung des Herstellers in der Version 2.0 von 1992 durchgeführt. Die dabei eingesetzten Protokolle entsprachen denen von Sambrook *et al.* (1989). Für den Transfer wurde 10fach konzentrierter SSC-Puffer (s. Abschn. 3.3.2.1) verwendet. Zur Entfernung des Formaldehyds wurde das Gel vor dem Transfer für jeweils 20 Minuten 2-mal in Wasser und 1-mal im Transferpuffer inkubiert. Nach dem Transfer wurde die Membran mit 5fach konzentriertem SSC-Puffer gewaschen und vollständig auf saugfähigem Papier getrocknet. Die Fixierung der RNA auf der Membran erfolgte dann im Stratalinker UV-Crosslinker mit der Autocrosslink-Einstellung im UV-Licht bei einer Wellenlänge von 254 nm.

### 3.3.3.2 Northern-Hybridisierung

Die Hybridisierung erfolgte für mindestens 12 Stunden bei 65 °C in 20 ml einer Lösung, die aus 0,5  $\text{mol L}^{-1}$  Natriumphosphat-Puffer (pH 7,2), 70  $\text{g L}^{-1}$  (7 % [w/v]) SDS und 1  $\text{mmol L}^{-1}$  EDTA (pH 8,0) bestand. Danach wurde 2-mal 20 Minuten bei 65 °C in 100 ml einer Lösung gewaschen, die 40  $\text{mmol L}^{-1}$  Natriumphosphat-Puffer (pH 7,2), 50  $\text{g L}^{-1}$  (5 % [w/v]) SDS und 1  $\text{mmol L}^{-1}$  EDTA (pH 8,0) enthielt. Bei einem hohen Hintergrundsignal wurde so oft wie notwendig jeweils 10 Minuten bei 65 °C in 100 ml einer Lösung gewaschen, die sich zusammensetzte aus 40  $\text{mmol L}^{-1}$  Natriumphosphat-Puffer (pH 7,2), 10  $\text{g L}^{-1}$  (1 % [w/v]) SDS und 1  $\text{mmol L}^{-1}$  EDTA (pH 8,0). Die Autoradiographie wurde wie für die Southern-Analyse beschrieben (s. Abschn. 3.3.2.2) durchgeführt.

### 3.3.4 Klonierungsmethoden

#### 3.3.4.1 Plasmid-Rescue

Das Plasmid-Rescue wurde mit Modifikationen durchgeführt nach Behringer und Medford (1992). Die dafür benötigte genomische DNA wurde nach Doyle und Doyle (1990) präpariert (s. Abschn. 3.1.3.1). Die Pflanzen wurden dazu in Flüssigkultur (s. Abschn. 3.1.1.2) angezogen. Ein Aliquot von 5  $\mu\text{g}$  der DNA wurde 2,5 Stunden in einem Volumen von 100  $\mu\text{l}$  verdaut mit 50 U des Restriktionsenzym *EcoRI* oder *SalI*. Die DNA wurde danach mit Phenol-Chloroform extrahiert (s. Abschn. 3.3.1.2), mit Ethanol gefällt (s. Abschn. 3.3.1.2) und in 40  $\mu\text{l}$  Wasser aufgenommen. Die Vollständigkeit des Verdau und Ausbeute bis zu diesem Schritt wurden mit einem Aliquot von 2  $\mu\text{l}$  in der Agarosegel-Elektrophorese (s. Abschn. 3.3.1.3) überprüft. Die DNA wurde anschließend in einem Volumen von 1 ml für mindestens 12 Stunden bei 14 °C mit 50 U (Weiss) der T4 DNA-Ligase religiert. Durch das große Volumen wurde dabei die Bildung von zirkulärer DNA begünstigt (Collins und Weissman 1984). Das Volumen des Ansatzes wurde danach durch Extraktionen mit 2-Butanol auf weniger als 400  $\mu\text{l}$  reduziert, die DNA aufgearbeitet und überprüft wie für den Verdau mit den Restriktionsenzymen beschrieben und gelöst in 40  $\mu\text{l}$  Wasser. Ein Aliquot von 2  $\mu\text{l}$  mit 100-250 ng der DNA wurde dann durch Elektroporation in den Stamm DH5 $\alpha$  von *E. coli* transformiert (s. Abschn. 3.2.2.3). Die Ansätze wurden zur Selektion auf die zu isolierenden Plasmide in 4 Petrischalen mit einem Durchmesser von 9 cm auf einem LB-Agar mit 100  $\text{mg L}^{-1}$  Ampicillin ausplattiert.

### 3.3.4.2 Inverse PCR

Die inverse PCR wurde mit Modifikationen nach Gasch *et al.* (1992) durchgeführt. Die dafür benötigte genomische DNA wurde nach Doyle und Doyle (1990) präpariert (s. Abschn. 3.1.3.1). Die Pflanzen wurden dazu in Flüssigkultur (s. Abschn. 3.1.1.2) angezogen. Ein Aliquot von 1 µg der DNA wurde mit 10 U des gewählten Restriktionsenzym in einem Volumen von 100 µl bei geeigneter Temperatur für 2,5 Stunden verdaut. Das Enzym wurde anschließend in 10 Minuten bei 65 °C hitzeinaktiviert, die verdaut DNA durch Extraktion mit Phenol-Chloroform gereinigt (s. Abschn. 3.3.1.2), mit Ethanol gefällt (s. Abschn. 3.3.1.2) und in 40 µl Wasser aufgenommen. Vollständigkeit des Verdau und Ausbeute bis zu diesem Schritt wurden mit einem Aliquot von 2 µl in der Agarosegel-Elektrophorese (s. Abschn. 3.3.1.3) überprüft. Die DNA wurde danach in einem Volumen von 200 µl für mindestens 12 Stunden bei 14 °C mit 10 U (Weiss) der T4 DNA-Ligase religiert, aufgearbeitet und überprüft wie für den Verdau mit dem Restriktionsenzym beschrieben und schließlich in 50 µl Wasser resuspendiert. Durch das große Volumen des Ligationsansatzes wurde dabei die Zirkularisation der DNA begünstigt (Collins und Weissman 1984). In die inverse PCR (s. Abschn. 3.3.1.5) wurden dann Aliquots von 5 µl mit 50-100 ng der DNA eingesetzt.

### 3.3.5 Bibliotheks-Analysen

#### 3.3.5.1 Genomische Bibliothek

Die genomische Bibliothek *abi1* lag vor im Wirtstamm NM554 von *E. coli* und wurde in Aliquots von 50 µl bei -80 °C aufbewahrt. Von einem Aliquot wurde vor der Ausplattieren für die Analyse der Titer bestimmt. Zur Herstellung einer Verdünnungsreihe in LB-Medium wurde dieses Aliquot für kurze Zeit im Eis aufgetaut. Aliquots der Verdünnungen wurden in 200 µl des gleichen Mediums suspendiert und in Petrischalen mit einem Durchmesser von 9 cm wie für das erste Screening beschrieben ausplattiert. Die zuvor reamplifizierte Bibliothek hatte einen Titer von  $5 \times 10^5$  cfu/µl. Für die Analyse derselben wurde ein neues Aliquot verwendet, von dem jeweils  $2,5 \times 10^4$  cfu in Nunc Bio-Assay Kulturschalen mit einer Länge und Breite von 24,5 cm ausplattiert wurden. Das entsprechende Aliquot an Bakterien wurde dazu in 1 ml LB-Medium suspendiert und durch Glasperlen mit einem Durchmesser von 5 mm gleichmäßig auf der Oberfläche des Agars verteilt. Kolonien wurden wie Plaques des Bakteriophagen Lambda (s. Abschn. 3.3.5.2) auf Membrane übertragen, die Hybridisierung mit Sonden erfolgte wie für die Southern-Analyse beschrieben (s. Abschn. 3.3.2.2). Pro Schale wurden 2 Membrane mit einer Länge von 20 cm und Breite von 10 cm verwendet. Platten, die bei 4 °C aufbewahrt worden waren, wurden dazu auf Raumtemperatur erwärmt, die Kolonien nachher für einige Stunden rekultiviert. Kolonien, die mit der Sonde reagierten, wurden wie Plaques aus dem Agar isoliert. Die Agarstücke wurden danach in 1 ml LB-Medium suspendiert, die Bakterien eine Stunde rekultiviert und durch Schütteln vom Agar abgelöst. Die Isolate wurden bis zum Abschluss der Analyse bei 4 °C aufbewahrt. Isolate, die für das zweite und dritte Screening bestimmt waren, wurden titriert wie beschrieben. Jeweils 100-200 Kolonien wurden danach in Petrischalen mit einem Durchmesser von 9 cm ausplattiert. Für den Transfer wurden Membrane mit einer Länge und Breite von 6,3 cm eingesetzt, des weiteren wurde verfahren wie für das erste Screening beschrieben.

#### 3.3.5.2 cDNA-Bibliothek

Die Analyse der cDNA-Bibliothek wurde weitgehend nach den Vorschriften von Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt. Das umfasste die Präparation des Wirtstammes C600*hflA*<sup>+</sup> von *E. coli*, die Titration und Ausplattierung der Bibliothek, das erste Screening, die Isolation und Aufbewahrung von Plaques,

die Amplifikation von Phagenklonen und die Präparation von DNA des Bakteriophagen Lambda. Das zweite und dritte Screening erfolgten wie für die genomische Bibliothek (s. Abschn. 3.3.5.1) beschrieben, der Transfer von Plaques auf die Membran Hybond N<sup>+</sup> nach der Anleitung des Herstellers in der Version 2.0 von 1992. Die dabei eingesetzten Protokolle entsprachen ebenfalls denjenigen von Sambrook *et al.* (1989). Die Membran wurde für den Transfer eine Minute auf den Agar gelegt, die DNA dann durch 7 Minuten Inkubation in einer Lösung denaturiert, die aus 0,5 mol L<sup>-1</sup> Natriumhydroxid und 1,5 mol L<sup>-1</sup> Natriumchlorid bestand. Dem folgte 2-mal die Neutralisation für 3 Minuten in einem Puffer, der 0,5 mol L<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH 7,2), 1,5 mol L<sup>-1</sup> Natriumchlorid und 1 mmol L<sup>-1</sup> EDTA (pH 8,0) enthielt. Wie für die Southern-Analyse beschrieben (s. Abschn. 3.3.2.1 u. 2) wurde die Membran gewaschen und getrocknet, die DNA auf dieser fixiert und mit Sonden hybridisiert. Plaques wurden aus dem Agar mit einer 150 mm-Pasteurpipette und Saughilfe isoliert. Im ersten Screening wurde dazu die weite Öffnung der Pipette verwendet, nachdem die Spitze mit einem Glasschneider entfernt worden war, ansonsten die schmale Öffnung. Die Präparation von Phagen-DNA erfolgte nach der Standardvorschrift ohne eine Reinigung im Cäsiumchlorid-Gradienten. Eine Kultur des Wirtsstammes in einem Volumen von 50 ml wurde dazu mit 10<sup>9</sup> pfu des zu präparierenden Phagenklones infiziert und aufgearbeitet nach Lyse der Bakterien. Das LB-Medium enthielt dabei 10 mmol L<sup>-1</sup> Magnesiumchlorid und 2 g L<sup>-1</sup> (0,2 % [w/v]) Maltose. Das Isolat des Phagenklones wurde zuvor in einer Agarkultur amplifiziert. Die auf diese Weise isolierte Lambda-DNA wurde in 200 µl Wasser gelöst, ein Aliquot von 2 µl auf Ausbeute und Reinheit in der Agarosegel-Elektrophorese (s. Abschn. 3.3.1.3) überprüft.

## **3.4 Expression in *E. coli***

### **3.4.1 Induktion der Expression**

Hinsichtlich einer Expression zu analysierende Klone wurden frisch in den dazu geeigneten Stamm von *E. coli* transformiert (s. Abschn. 3.2.2.2 u. 3). Minikulturen mit einem Volumen von 5 ml wurden mit einer Kolonie angeimpft und 12 Stunden kultiviert. Mit einem Aliquot der Minikultur wurde eine Kultur mit einem Volumen von 20 ml angeimpft und von einer Absorption kleiner als 0,05 bei einer Wellenlänge von 600 nm in einigen Stunden bei 37 °C oder Raumtemperatur (20 °C) bis zu einem Wert von 0,5-1,0 kultiviert. Ein Aliquot von 750 µl der Kultur wurde als Probe ohne Induktion abgenommen. Die Zellen wurden in 5 Minuten mit 16000 g bei 4 °C aus der Probe abzentrifugiert und bis zur Analyse der Induktion (s. Abschn. 3.4.2) bei -20°C eingefroren. Die Expression wurde mit 1 mmol L<sup>-1</sup> Isopropylthiogalactosid (IPTG) induziert. Nach weiteren 3 Stunden Kultivierung bei 37 °C oder 15 Stunden bei Raumtemperatur wurde ein Aliquot von 150 µl der Kultur als Probe mit Induktion abgenommen und aufgearbeitet wie beschrieben. Die übrigen Zellen der induzierten Kultur mit einem Frischgewicht von ca. 100 mg wurden in 10 Minuten mit 2500 g bei 4 °C abzentrifugiert und bis zur Analyse auf eine potenzielle SMT-Aktivität (s. Abschn. 3.4.4 u. 3.4.5) oder der subzellulären Lokalisation des induzierten Proteins (s. Abschn. 3.4.3) bei -20 °C aufbewahrt.

### **3.4.2 Analyse der Induktion**

#### **3.4.2.1 SDS-PAGE**

Die Analyse der Induktion (s. Abschn. 3.4.1) erfolgte mittels SDS-PAGE, die Zellpellets der Proben wurden dazu in Auftragspuffer aufgenommen und die Ansätze 10 Minuten bei 100 °C inkubiert. Die Berechnung des geeigneten Puffervolumens erfolgte nach folgender Formel: Absorption der Kultur bei einer Wellenlänge von 600 nm zum Zeitpunkt der Probennahme × Faktor = Volumen an Auftragspuffer

in Mikrolitern. Für ein Probenvolumen von 750  $\mu\text{l}$  betrug der Faktor 285, für andere Volumina wurde entsprechend umgerechnet. Der 4fach konzentrierte Auftragspuffer setzte sich aus 0,5 mol  $\text{L}^{-1}$  Tris-HCl (pH 6,8), 20 % (v/v) Glycerin, 10 % (v/v) 2-Mercaptoethanol, 40 g  $\text{L}^{-1}$  (4 % [w/v]) SDS und 0,2 g  $\text{L}^{-1}$  (0,2 % [w/v]) Bromphenolblau (BPB) zusammen. Zur Elektrophorese wurde das Minigel System SE 260 Mighty Small II Dual und ein Gel mit einer Länge von 9 cm, Breite von 8 cm und einer Dicke von 0,75 mm verwendet. Das Trenngel enthielt 100 g  $\text{L}^{-1}$  (10 % [w/v]) Polyacrylamid (Acryl : Bis in einem Verhältnis von 37,5 : 1), das Sammelgel 50 g  $\text{L}^{-1}$  (5 % [w/v]). Aliquots der Proben von 10-15  $\mu\text{l}$  wurden auf das Gel geladen, vom Mid Range Protein Molecular Weight Marker ein Aliquot von 2  $\mu\text{l}$  mit 1  $\mu\text{g}$  Protein. Der Standard bestand aus Proteinen im Bereich von 14,4 kDa bis 97,4 kDa. Die Elektrophorese durch das Sammelgel erfolgte mit konstant 75 V, durch das Trenngel entsprechend mit 150 V. Darüber hinaus wurde die SDS-PAGE nach der Vorschrift von Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt.

### 3.4.2.2 Proteinfärbung

Proteine wurden nach der SDS-PAGE (s. Abschn. 3.4.2.1) angefärbt mit einer Lösung aus 50 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure und 2 g  $\text{L}^{-1}$  (2 % [w/v]) Coomassie Brilliant Blue (CBB) R-250. Das Gel wurde mit ca. 50 ml dieser Lösung bedeckt und das Ganze zur Färbung in der Mikrowelle 2-mal kurz aufgekocht. Mit einem Volumen von ca. 50 ml an 7,5 % (v/v) Essigsäure wurde das Gel danach wieder entfärbt. Der Ansatz wurde dazu erneut mehrmals kurz in der Mikrowelle aufgekocht. Die Gele wurden zur Dokumentation in einem Rahmen zwischen Plastikfolien getrocknet, wozu ein System von Promega verwendet wurde. Die Prozedur erfolgte nach der Anleitung des Herstellers von 1991 (Technisches Bulletin Nr. 091). Diese ist unter der Adresse <http://www.promega.com> im Internet zu finden. Die Gele wurden dafür zuvor 10 Minuten in 5 % (v/v) Glycerin inkubiert.

### 3.4.3 Analyse der subzellulären Lokalisation

#### 3.4.3.1 Extraktion der Proteine des Periplasmas

Aus den Zellen induzierter Kulturen (s. Abschn. 3.4.1) wurden eine Fraktionen des Periplasmas, eine Fraktion der löslichen und eine der unlöslichen Proteine des Zytoplasmas präpariert, deren Analyse durch eine SDS-PAGE (s. Abschn. 3.4.2) erfolgte. Die Periplasma-Fraktion wurde nach dem Protokoll des pET System Manuals (Technisches Bulletin Nr. TB055) von Novagen, Inc. (Madison, Wisconsin, USA) in der 6. Auflage von 1995 präpariert. Die aktuelle Version des Manuals ist im Internet unter der Adresse <http://www.novagen.com/> zu finden. Die auf einer Lyse durch osmotischen Shock beruhende Prozedur wurde in ähnlicher Form auch durch McCoy und LaVallie (1994) beschrieben. Die Zellen wurden aus der Kultur in 10 Minuten mit 2500 g bei 4 °C abzentrifugiert und in dem 0,4fachen Volumen eines Puffers resuspendiert, der aus 30 mmol  $\text{L}^{-1}$  Tris-HCl (pH 8,0), 1 mmol  $\text{L}^{-1}$  EDTA (pH 8,0) und 200 g  $\text{L}^{-1}$  Saccharose bestand. Nach 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen abzentrifugiert wie zuvor, in demselben Volumen an eiskaltem 5 mmol  $\text{L}^{-1}$  Magnesiumsulfat suspendiert und erneut für 10 Minuten im Eis inkubiert. Der Überstand nach einer Zentrifugation wie beschrieben stellte die periplasmatische Fraktion dar.

#### 3.4.3.2 Extraktion der löslichen und unlöslichen Proteine des Zytoplasmas durch Aufschluss in der FRENCH-Druckzelle

Das Zellpellet nach Herstellung der periplasmatischen Fraktion (s. Abschn. 3.4.3.1) wurde in 10 ml eines eiskalten Puffers aufgenommen, der 50 mmol  $\text{L}^{-1}$  Tris-HCl (pH 7,5), 1 mmol  $\text{L}^{-1}$  Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) und 1 mmol  $\text{L}^{-1}$  EDTA (pH 8,0) enthielt. Danach wurden Zellen bei 4 °C mit der FRENCH-Laborpresse FA-078 in der FRENCH-Druckzelle FA-303 aufgeschlossen. Dabei wurde ein

hydraulischer Druck von 1000 Pounds pro Square Inch (psi) angewendet. Unlösliche Anteile wurden dann in 10 Minuten mit 10 000 g bei 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand stellte die Fraktion der löslichen Proteine dar. Das Pellet mit den unlöslichen Proteinen wurde in 4 ml des Auftragspuffers für die SDS-PAGE (s. Abschn. 3.4.2.1) resuspendiert. Vor der Analyse durch SDS-PAGE (s. Abschn. 3.4.3.3) wurde dieser Ansatz 10 Minuten bei 100 °C inkubiert.

### **3.4.3.3 SDS-PAGE der Proteinfractionen**

Von den Fraktionen (s. Abschn. 3.4.3.1 u. 3.4.3.2) wurden hinsichtlich der Proteinmenge äquivalente Aliquots als Proben abgenommen. Diese wurden mit dem 4fach konzentriertem Auftragspuffer für die SDS-PAGE (s. Abschn. 3.4.2.1) und Wasser auf das Volumen der Probe von der induzierten Kultur (s. Abschn. 3.4.1) aufgefüllt. Die SDS-PAGE wurde weiterhin durchgeführt wie beschrieben im Abschn. 3.4.2.

## **3.4.4 Extraktion und Konzentration der löslichen Proteine**

### **3.4.4.1 Extraktion der löslichen Proteine durch Aufschluss mit Ultraschall**

Das lösliche Protein aus den Zellen induzierter Kulturen (s. Abschn. 3.4.1) wurde zur Analyse auf eine SMT-Aktivität durch Ultraschall freigesetzt. Die Zellen einer Kultur wurden resuspendiert in 1 ml an eiskaltem 0,1 mol L<sup>-1</sup> Kaliumphosphat-Puffer (pH 6,0), der Ansatz mit 1 g L<sup>-1</sup> Lysozym versetzt und 30 Minuten im Eis inkubiert. Das Lysozym wurde dazu mit 50 g L<sup>-1</sup> in einem Puffer gelöst, der sich zusammensetzte aus 50 mmol L<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH 7,5), 150 mmol L<sup>-1</sup> Natriumchlorid und 1 mmol L<sup>-1</sup> EDTA (pH 8,0). Die Zellen wurden danach 6-mal für 10 Sekunden mit 20 % maximaler Leistung im Sonoplus Ultraschall-Homogenisator HD 2070 mit der Mikrospitze MS 73 beschallt. Intervalle waren von gleicher Dauer. Der Aufschluss erfolgte in einem 10 ml-Probengefäß aus Plastik, das auf die halbe Länge abgeschnitten und in einem Stativ fest eingespannt worden war. Während der gesamten Prozedur wurde der Ansatz im Eis gekühlt. Nicht lösliche Anteile wurden anschließend in einer Stunde mit 16 000 g bei 4 °C abzentrifugiert.

### **3.4.4.2 Konzentration der Proteinextrakte durch Ultrafiltration**

Durch eine Ultrafiltration wurden Aliquots von 500 µl der Proteinextrakte (s. Abschn. 3.4.4.1) weiter angereichert. Dazu wurden Konzentratoren des Typs Microcon YM-10 nach der Anleitung des Herstellers von 1998 verwendet. Die aktuelle Version der Anleitung ist im Internet unter der Adresse <http://www.millipore.com> zu finden. Durch eine Zentrifugation für eine Stunde mit 16 000 g bei 4 °C wurden die Extrakte auf ein Volumen von 50 µl reduziert. Die Konzentratoren wurden dazu auf ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß gesetzt. Die angereicherten Extrakte wurden durch eine Zentrifugation für 5 Minuten mit 1000 g bei 4 °C in umgekehrter Position aus den Konzentratoren zurückgewonnen.

### **3.4.4.3 Bestimmung des Proteingehaltes der Extrakte**

Der Proteingehalt der Proteinextrakte (s. Abschn. 3.4.4.1 u. 2) wurde nach Bradford (1976) bestimmt. Aliquots von 5-25 µl der Extrakte mit 5-15 µg Protein wurden mit 1 ml des Bradford-Reagenz versetzt. Dieses bestand aus 65 mg L<sup>-1</sup> (0,0065 % [w/v]) Coomassie Brilliant Blue (CBB) G-250, 5 % (v/v) Methanol und 8,5 % (w/v) Phosphorsäure. Die Messung der Absorption erfolgte bei einer Wellenlänge von 595 nm gegen einen Nullwert, der anstatt der Probe das gleiche Volumen an Probenpuffer enthielt. Die Ansätze wurden zuvor 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Eine Eichkurve wurde aufgenommen mit Rinderserumalbumin (BSA). Einer Absorption von 1 im UV/Vis-Spektrophotometer DU 640 entsprachen 25 mg L<sup>-1</sup> Protein.

### 3.4.5 Analyse der SMT-Aktivität

#### 3.4.5.1 SMT-Enzymtest

Enzymtests zur Bestimmung der SMT-Aktivität erfolgten nach Lorenzen *et al.* (1996). Der Testansatz setzte sich zusammen aus 25  $\mu\text{l}$  2  $\text{mmol L}^{-1}$  1-*O*-Sinapoyl- $\beta$ -D-glucose in Wasser, 15  $\mu\text{l}$  0,1  $\text{mol L}^{-1}$  Kaliumphosphat-Puffer (pH 6,0), 5  $\mu\text{l}$  1  $\text{mol L}^{-1}$  L-Malat in Kaliumphosphat-Puffer und 5  $\mu\text{l}$  des Proteinextrakts (s. Abschn. 3.4.4.1 u. 3.4.4.2). Die Enzymtests wurden 12 Stunden bei 30 °C inkubiert, mit 50  $\mu\text{l}$  Methanol abgestoppt und bei -20 °C aufbewahrt. Vor der Analyse wurden die Ansätze 5 Minuten mit 16 000 g bei 4 °C zentrifugiert. Aliquots von 10  $\mu\text{l}$  wurden mittels DC (s. Abschn. 3.4.5.2) analysiert, Aliquots von 20  $\mu\text{l}$  mittels HPLC (s. Abschn. 3.4.5.3). Als Positivkontrolle wurde ein Ansatz mit einem Extrakt aus Blättern des Wildtyps von *Arabidopsis* mitgeführt (s. Abschn. 3.1.3.3).

#### 3.4.5.2 Dünnschichtchromatographie

Die DC-Analyse wurde nach Lorenzen *et al.* (1996) durchgeführt. Als stationäre Phase wurden Platten aus K6-Kieselgel (Teilchendurchmesser: 60 Angström) verwendet. Die mobile Phase bestand aus n-Butanol : Wasser : Ethanol in einem Verhältnis von 4 : 1 : 1 (v/v/v). Die Auftrennung erfolgte über eine Laufstrecke von 10 cm, Proben wurden mit einer Glaskapillare aufgetragen. Sinapinsäureester wurden mit einem zur Dokumentation von DNA in Agarosegelen gebräuchlichen UV-Transilluminator ohne den dabei normalerweise verwendeten roten Interferenzfilter bei einer Wellenlänge von 312 nm detektiert. Als Standards kamen Extrakte aus Blättern des Wildtyps und der Mutante *sng1-1* von *Arabidopsis* zum Einsatz (s. Abschn. 3.1.3.3).

#### 3.4.5.3 Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie

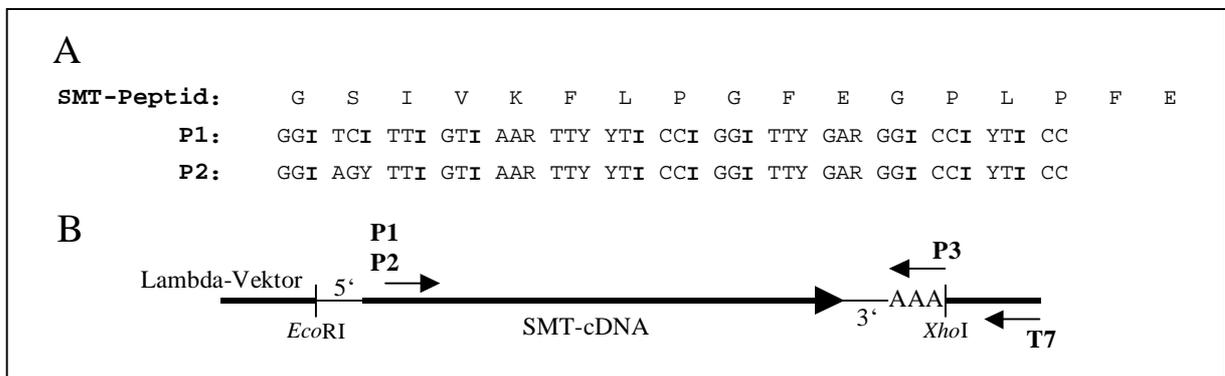
Die HPLC-Analyse erfolgte in einem System von Waters mit einer Nucleosil 120-5 Reversed Phase- $\text{C}_{18}$ -Trennsäule (Länge: 25 cm, Durchmesser: 4 mm). Der Teilchendurchmesser des Trennmaterials betrug 5  $\mu\text{m}$ . Das Elutionsmittel A bestand aus 1,5 % (v/v) Phosphorsäure in Wasser, das Elutionsmittel B war reines Methanol. Zur Trennung wurde ein linearer Gradient mit 40 Minuten von 0 bis 30 % (v/v) B in A und 10 Minuten von 30 bis 90 % (v/v) B in A verwendet. Die Flussrate betrug 1 ml pro Minute. Die Sinapinsäureester wurden bei einer Wellenlänge von 330 nm detektiert. Als Standards wurden die authentischen Ester 1-*O*-Sinapoyl- $\beta$ -D-glucose und 2-*O*-Sinapoyl-L-malat verwendet, die nach Chapple *et al.* (1992) und Lorenzen *et al.* (1996) aus *Arabidopsis* isoliert worden waren.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Versuche zur Klonierung des *SMT*-Gens aus *Brassica rapa*

In einem ersten Ansatz wurde versucht, mit Hilfe der PCR ein Fragment des *SMT*-Gens aus einer cDNA-Bibliothek zu klonieren, die aus Keimlingen von *B. rapa* im Vektor  $\lambda$  ZAP Express hergestellt worden war (s. Abschn. 1.2.1). Von dem bekannten N-terminalen Peptid der *SMT* aus *B. rapa* (s. Abschn. 8.2) wurden dazu die Primer P1 und P2 abgeleitet (s. Abb. 3). Als entgegengerichteter, zweiter Primer wurde zuerst T7 verwendet, dessen Bindungsstelle sich im Lambda-Vektor befindet. In einer Reihe von Experimenten konnte aus einem Aliquot der Bibliothek von 5  $\mu$ l bei einer Temperatur im Bereich von 35-65 °C für die Hybridisierung der Primer und mit einer Elongationszeit von einer bis drei Minuten kein Fragment amplifiziert werden. In einem zweiten Ansatz wurde die PCR mit der cDNA aus *B. rapa* als Matrize versucht. Dazu wurde der Primer P3 synthetisiert (s. Abb. 3), der am Poly(A)-Ende der cDNAs hybridisiert und anstelle von T7 eingesetzt wurde. Unter den gleichen Bedingungen wie zuvor wurde aus einem Aliquot der cDNA von 50 ng ebenfalls kein Fragment erhalten. Mit dem Primer P3 wurde in einem dritten Ansatz versucht, ein Fragment aus der cDNA-Bibliothek selbst zu amplifizieren. Bei einer Temperatur von 40 °C für die Primer-Hybridisierung wurden mit den Primern P1 und P2 in diesem Fall reproduzierbar ein 1,3 kb- und ein 0,8 kb-Fragment erzeugt.

Die mit den Primern P1 und P3 gewonnenen Fragmente wurden nach Elektrophorese aus dem Agarosegel extrahiert, radioaktiv markiert und mit einem Aliquot von 0,3  $\mu$ g der cDNA aus *Brassica rapa* hybridisiert, das nach Agarosegel-Elektrophorese auf eine Membran übertragen worden war. Beide Sonden reagierten im Blot mit cDNA-Fragmenten ähnlicher Größe. Die Fragmente wurden mit dem Original TA Cloning Kit in den Vektor pCRII ligiert, die Produkte der Ligation danach durch Hitzeschock in den Stamm DH5 $\alpha$  von *E. coli* transformiert. Aus einer Reihe von Kolonien wurde anschließend in Minipräparationen Plasmid-DNA isoliert.



**Abb. 3.** Klonierung des *SMT*-Gens mit Hilfe der PCR aus einer cDNA-Bibliothek von *Brassica rapa*. – **A** bekanntes N-terminales Peptid der *SMT* aus *B. rapa* und davon abgeleitete Primer P1 und P2, I: Base Inosin; **B** PCR mit den Primern P1 oder P2 in Kombination mit T7 oder P3 zur Amplifikation der *SMT*-cDNA aus dem Vektor  $\lambda$  ZAP Express; *EcoRI* und *XhoI*: Schnittstellen der Restriktionsenzyme, mit denen die cDNA in den Bakteriophage Lambda-Vektor kloniert wurde.

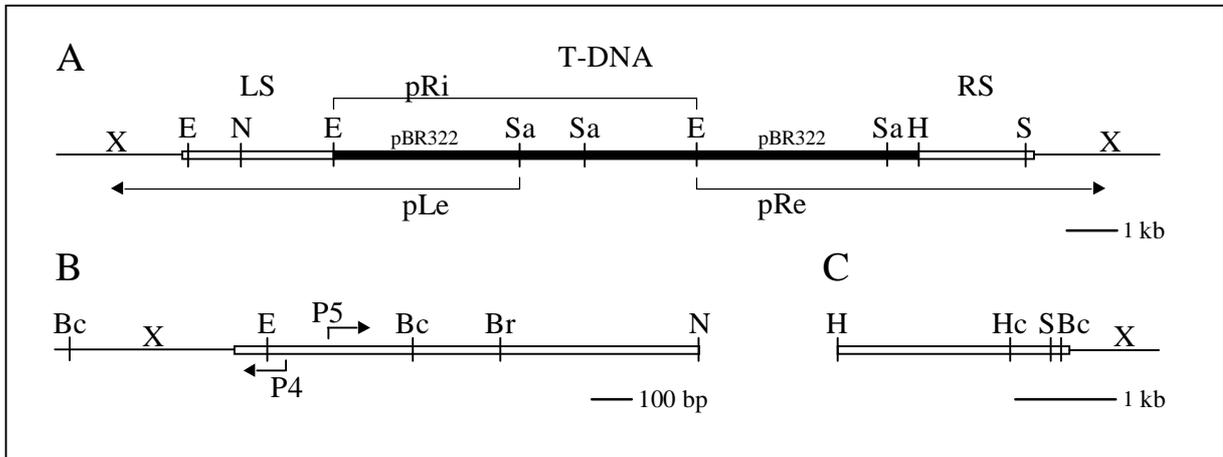
Klone des Vektors, die das PCR-Fragment enthielten, wurden nach Verdau mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* in der Agarosegel-Elektrophorese identifiziert. Jeweils ein Klon der beiden Fragmente wurde mit den Primern T7 und M13 Reverse in beiden Richtungen manuell ansequenziert. Die erhaltenen Sequenzen wurden durch den BLASTX-Algorithmus (Altschul *et al.* 1990, 1997) mit GenBank verglichen. Das 1,3 kb-Fragment wies signifikante Ähnlichkeit zu Phosphat-/Triosephosphat-Translokatoren aus verschiedenen Pflanzen auf, entsprechend das 0,8 kb-Fragment zu einer Reihe von Fettsäure-Desaturasen.

## 4.2 Isolation von genomischer DNA aus dem *SNG1*-Gen von *Arabidopsis*

### 4.2.1 Plasmid-Rescue aus der Mutante *sng1-4*

Zur Klonierung von genomischer DNA, die von einer Seite der T-DNA im *SNG1*-Gen der Mutante *sng1-4* von *Arabidopsis* stammte, wurde zuerst die Methode des Plasmid-Rescues eingesetzt (Behringer und Medford 1992; Feldmann 1992; Feldmann und Dilkes 1998). Genomische DNA der Mutante wurde dazu mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* für die rechte und *SalI* für die linke Seite verdaut, durch Extraktion mit Phenol-Chloroform gereinigt, durch Fällung mit Ethanol konzentriert und mittels T4 DNA-Ligase in einem Volumen religiert, das eine Zirkularisierung der DNA-Fragmente begünstigt. Aliquots der Präparationen wurden nach der erneuten Reinigung und Konzentration durch Elektroporation in den Stamm DH5 $\alpha$  von *E. coli* transformiert. Die Isolation von zirkularisierter DNA wird in diesem Fall dadurch ermöglicht, dass zwei Abschnitte der T-DNA aus dem Plasmid pBR322 bestehen. Dieses ist in der Folge auch in den Fragmenten enthalten, die mit den eingesetzten Enzymen aus den beiden Seiten der T-DNA und der jeweils benachbarten genomischen DNA freigesetzt werden (s. Abb. 4). Bei den zirkularisierten Fragmenten handelt es sich damit um Plasmide, die einen Ursprungspunkt der DNA-Replikation und mit dem  $\beta$ -Lactamase-Gen eine Resistenz gegen Ampicillin besitzen, die gemeinsam eine Amplifikation in *E. coli* ermöglichen.

Zur Identifikation von solchen Plasmiden wurden die Kolonien mit Fragmenten der Seiten als Sonden gescreent. Ein 2,1 kb-Fragment der rechten Seite der T-DNA wurde durch einen Verdau mit den Enzymen *HindIII* und *SacII* aus dem Plasmid pCC1 präpariert, entsprechend ein 2,9 kb-Fragment der linken Seite durch Verdau mit dem Enzym *EcoRI* aus dem Plasmid pL3 (s. Abb. 4). Das Plasmid pCC1 war durch ein Plasmid-Rescue von der rechten Seite der T-DNA aus einer *fah1*-Mutante von *Arabidopsis* isoliert worden (Meyer *et al.* 1996), das Plasmid pL3 entsprechend von der linken Seite aus einer *transport inhibitor response 1*-Mutante (Ruegger *et al.* 1998). Die Fragmente wurden nach der Elektrophorese aus dem Agarosegel extrahiert, radioaktiv markiert und mit den Kolonien nach dem Transfer auf eine Membran hybridisiert. Für beide Seiten wurden in keinem der Rescues Kolonien erhalten, die mit der Sonde reagierten. Aus einer Reihe von Kolonien wurde darüber hinaus in Minipräparationen Plasmid-DNA isoliert, die mit dem Enzym *EcoRI* für die rechte und *SalI* für die linke Seite verdaut



**Abb. 4.** Karte der T-DNA des Ti-Plasmids pGV3850:pAK1003. – **A** Gesamte T-DNA, LS: linke Seite, RS: rechte Seite, pLe: Plasmid im Rescue von LS mit Sa, pRe: Plasmid im Rescue von LR mit E, pRi: sog. internes Plasmid im Rescue von RS, pBR322: ungefähr zwischen E und Sa; X: flankierende genomische DNA; **B** Abschnitt von LS, P4 und P5: Primer für inverse PCR; **C** Abschnitt von RS; Schnittstellen der Restriktionsenzyme, E: *EcoRI*, Sa: *SallI*, H: *HindIII*, S: *SacII*, Hc: *HincII*, Br: *BsrBI*, Bc: *BcII* und N: *NruI*, alle in der T-DNA vorhandenen für E und Sa, ausgewählte Stellen für die anderen.

wurde. Die linearisierten Plasmide wiesen in der Agarosegel-Elektrophorese Größen von 2 kb oder 3 kb auf. Das entspricht nicht den Größen, die in diesem Fall einerseits für Plasmide von den beiden Seiten der T-DNA und andererseits für sog. interne Plasmide aus dem Inneren der T-DNA zu erwarten sind (s. Abb. 4; Behringer und Medford 1992).

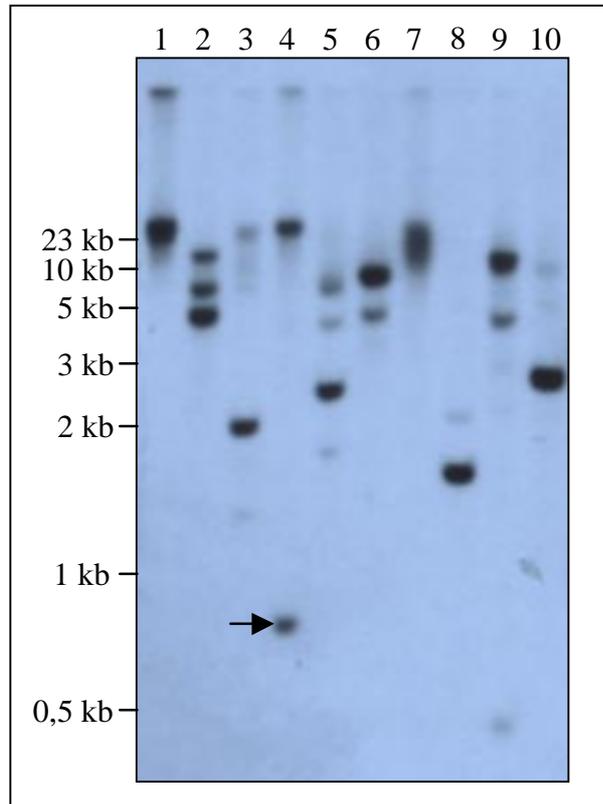
#### 4.2.2 Southern-Analyse der T-DNA-Insertion in der Mutante *sng1-4*

In einem zweiten Ansatz zur Isolation von genomischer DNA aus dem *SNG1*-Gen wurde die Methode der inversen PCR angewendet (Ochmann *et al.* 1990; Gasch *et al.* 1992; Lindsay und Topping 1996; Topping und Lindsay 1997). Um solche Fragmente zu finden, die dafür geeignet waren, d.h. von einer der T-DNA-Seiten stammten und flankierende genomische DNA enthielten, war eine Southern-Analyse der T-DNA-Insertion in der Mutante *sng1-4* von *Arabidopsis* erforderlich. Genomische DNA der Mutante wurde dazu für jede Seite mit einer Reihe von Restriktionsenzymen (s. Abb. 5 u. 6) verdaut und auf eine Membran übertragen. Die Auswahl der Enzyme erfolgte unter Beachtung eine Reihe von Kriterien. Es musste für das jeweilige Enzym in zumindest einer der T-DNA-Seiten eine Schnittstelle vorhanden sein. Um eine möglichst geringe Anzahl von Fragmenten aus der T-DNA freizusetzen, die mit den Sonden reagieren konnten, waren singuläre Schnittstellen am besten geeignet. Eine Schnittstelle sollte weiterhin einen Abstand von mehr als ca. 0,5 kb zum jeweiligen Seitenende haben, andererseits aber auch nicht mehr als ca. 3 kb Distanz dazu besitzen. Ansonsten würde entweder der Bereich für die Auswahl der Primer zu klein sein oder eventuell insgesamt ein zu großes Fragment entstehen (s.u.). Das linke Seitenende wird zudem häufig nicht vollständig in das Genom integriert, so dass darin gelegene Schnittstellen in der T-DNA eventuell nicht vorhanden sind. Informationen zur Sequenz der T-DNA, die der Auswahl von Enzymen zugrunde lag,

sind z.B. in Feldmann (1992) zu finden. Es wurden darüber hinaus solche Enzyme bevorzugt eingesetzt, für die in der genomischen DNA von *Arabidopsis* viele Schnittstellen vorhanden sind und die keine glatten, sondern überhängende Enden erzeugen. Diese können in einer inversen PCR effizienter ligiert werden.

Für jede Seite der T-DNA wurde ein Southern Blot mit den ausgewählten Enzymen angefertigt (s. Abb. 5 u. 6). Darüber hinaus wurden Verdau mit den Enzymen *EcoRI* und *SalI* mitgeführt, die für das Plasmid-Rescue verwendet wurden (s. Abschn. 4.2.1). Um eine große Auflösung zu erzielen, wurde zur Auftrennung der Fragmente genomischer DNA eine Kammer mit großer Laufstrecke (14 cm) verwendet. Zur Analyse der T-DNA-Insertion wurden die Blots nacheinander mit verschiedenen Fragmenten der T-DNA als Sonden hybridisiert. Es wurden dabei die gleichen Fragmente der gesamten T-DNA-Seiten verwendet wie für das Plasmid-Rescue (s. Abschn. 4.2.1), weiterhin das sog. interne Plasmid pRi (Behringer und Medford 1992), das den Abschnitt der T-DNA repräsentiert, der nicht zu diesen Seiten gehört (s. Abb. 4). Dieses Plasmid wurde für eine effektive radioaktive Markierung zusätzlich durch Verdau mit dem Enzym *EcoRI* linearisiert. Außerdem wurden Sonden eingesetzt, die nach Möglichkeit nur mit den Fragmenten reagieren sollten, die von den Seiten der T-DNA stammten und flankierende genomische DNA enthielten, nicht aber mit Fragmenten aus der T-DNA. Bei diesen Sonden handelte es sich um die äußersten Abschnitte der T-DNA-Seiten. Ein 0,6 kb-Fragment der rechten Seite wurde aus dem Plasmid pCC1 durch Verdau mit den Enzymen *HincII* und *BclII* freigesetzt, ein 0,6 kb-Fragment der linken Seite aus dem Plasmid pCS610 durch Verdau mit den Enzymen *BsrBI* und *EcoRI* (s. Abb. 4). Für den Verdau mit dem Enzym *BclII*, das hinsichtlich einer *dam*-Methylierung in *E. coli* empfindlich ist, wurde das Plasmid pCC1 durch Elektroporation in den *E. coli*-Stamm DM1 transformiert. Die genannten Sondenfragmente wurden nach Verdau und Elektrophorese aus dem Agarosegel extrahiert, radioaktiv markiert und mit den Blots hybridisiert.

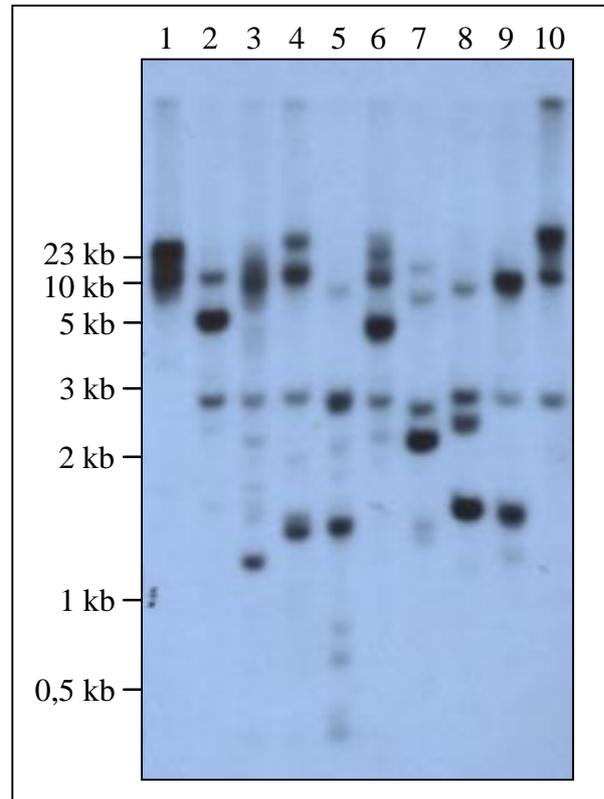
Für beide Seiten der T-DNA wurde ein Spektrum von Fragmenten unterschiedlicher Größe und Signalstärke erhalten. Als Beispiele seien die Southern Blots für die linke und rechte Seite der T-DNA gezeigt (s. Abb. 5 und 6), die mit den Fragmenten der ganzen T-DNA-Seiten analysiert wurden. Im Verdau mit dem Enzym *SalI* wurde dabei auf der linken Seite (s. Abb. 5, Verdau Nr. 1) ein Fragment mit einer Größe von 25 kb identifiziert, auf der rechten Seite mit dem Enzym *EcoRI* zwei Fragmente mit Größen von 11 kb und 25 kb (s. Abb. 6, Verdau Nr. 1). Dabei handelte es sich um die durch das Plasmid-Rescue zu isolierenden Fragmente der vorliegenden T-DNA-Insertion (s. Abschn. 4.2.1). In den einzelnen Verdau wurden danach geeignete Fragmente für die inverse PCR ausgesucht, wobei erneut verschiedene Kriterien beachtet wurden. Das gewählte Fragment durfte nicht mit den Sonden von der anderen Seite reagieren. Ein solches Verhalten wurde als Hinweis darauf gewertet, dass das Fragment aus einem Bereich stammte, in dem zwei T-DNAs sehr dicht beieinander liegen. Ein derartiges Fragment enthielt wahrscheinlich wenig oder keine flankierende genomische DNA. Aus diesem Grund durfte das Fragment auch nicht mit dem internen Plasmid hybridisieren. Diese Reaktion



**Abb. 5.** Southern Blot von der *Arabidopsis*-Mutante *sng1-4* hybridisiert mit dem Fragment der linken Seite der T-DNA. – Restriktionsenzyme, 1: *SalI*, 2: *HindIII*, 3: *ClaI*, 4: *BclI*, 5: *ScaI*, 6: *HincII*, 7: *EcoRV*, 8: *DraI*, 9: *PstI* und 10: *NsiI*; Pfeil: 0,8 kb-Fragment für die inverse PCR (s. Abschn. 4.2.3).

hätte hingewiesen auf Prozesse wie eine Rekombination oder die unvollständige Insertion von T-DNAs, die zu veränderten und nicht vorhersehbaren T-DNA-Strukturen führen (s. Abschn. 5.1). Das gesamte Fragment sollte eine Größe von ca. 10 kb, der zu amplifizierende Abschnitt genomischer DNA eine solche von ca. 3 kb nicht überschreiten. Dadurch würde vermutlich die Effizienz der Zirkularisierung des Fragments oder diejenige der Amplifikation des genomischen Teils mittels inverser PCR erheblich reduziert. Um eine geeignete Sonde für das *SNG1*-Gen zu erhalten, sollte der zu amplifizierende Abschnitt dagegen eine Größe von mindestens ca. 0,5 kb aufweisen. Es wurden weiterhin Fragmente nicht berücksichtigt, die in ihrer Größe den Teilen der T-DNA entsprachen, die durch den jeweiligen Verdau hätten freigesetzt werden müssen. Dazu gehörten auch solche Fragmente, die entstehen würden, wenn die Insertion aus mehreren T-DNAs in konkatermerer Anordnung bestand (s. Abschn. 5.1). Dabei wurde die Aneinanderlagerung von gleichen und verschiedenen Seiten der T-DNAs berücksichtigt. Die Größen der Fragmente und Abschnitte wurden anhand der bekannten Sequenz des T-DNA-Vektors (s.o.) abgeschätzt.

Bei der Interpretation der Blots musste aber berücksichtigt werden, dass ein Abschnitt von 1,5 kb aus der linken Seite der T-DNA nicht sequenziert worden war. Darin befanden sich eventuell weitere Schnittstellen der eingesetzten Enzyme, so dass in den Verdau noch andere Fragmente als erwartet auftreten konnten. Soweit die Southern-Analyse einen Einblick in die

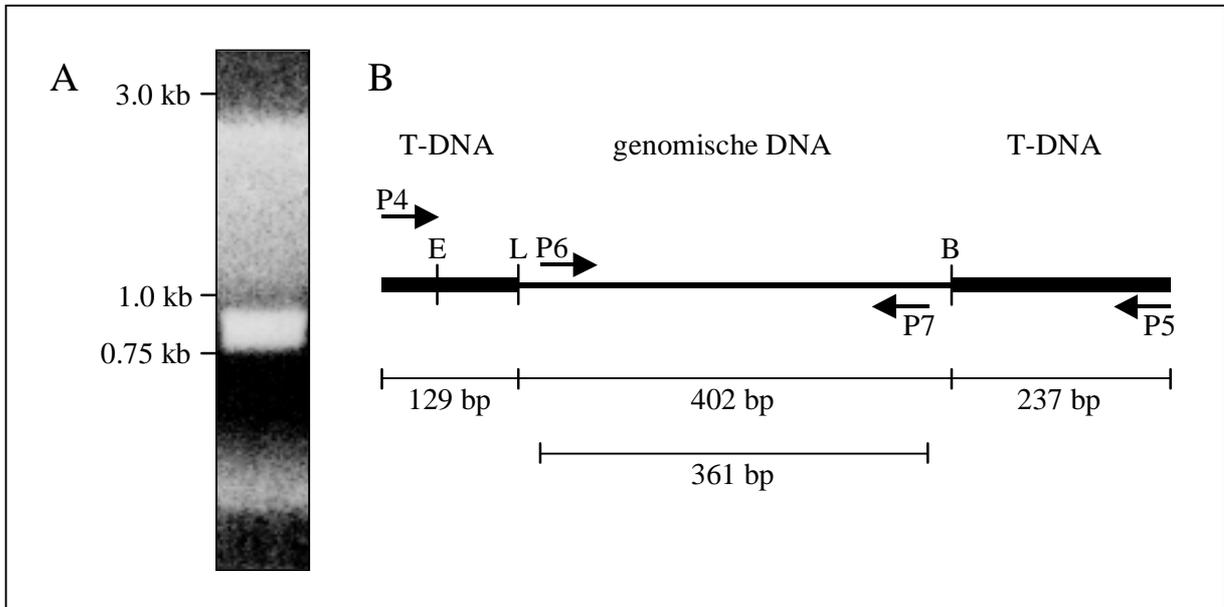


**Abb. 6.** Southern Blot von der *Arabidopsis*-Mutante *sng1-4* hybridisiert mit dem Fragment der rechten Seite der T-DNA. – Restriktionsenzyme, 1: *EcoRI*, 2: *HindIII*, 3: *Csp45I*, 4: *ClaI*, 5: *SphI*, 6: *StuI*, 7: *HincII*, 8: *BamHI*, 9: *NcoI* und 10: *SacII*.

Struktur der T-DNA-Insertion gewähren konnte, sollten bevorzugt Fragmente von der Seite für die inverse PCR ausgewählt werden, deren Analyse sich insgesamt als schlüssiger und einfacher erwies. Bei der Interpretation der Blots musste zudem in Rechnung gestellt werden, dass ein Signal mehr als ein Fragment repräsentieren konnte und dass kleinere Fragmente unter Umständen kein erkennbares Signal ergeben würden. In dem vorliegenden Fall erwies sich die linke Seite der T-DNA-Insertion als weniger komplex, so dass auf dieser Seite für die inverse PCR Fragmente in den Verdauungen der Restriktionsenzyme *DraI*, *ScaI*, *PstI* und *BclI* ausgewählt wurden, welche die genannten Kriterien weitgehend erfüllten. Es handelte sich dabei um die Fragmente mit einer Größe von 1,6 kb (*DraI*), 1,8 kb und 4,8 kb (*ScaI*), 4,8 kb (*PstI*) und 0,85 kb (*BclI*) (s. Abb. 5).

#### 4.2.3 Inverse PCR mit der Mutante *sng1-4*

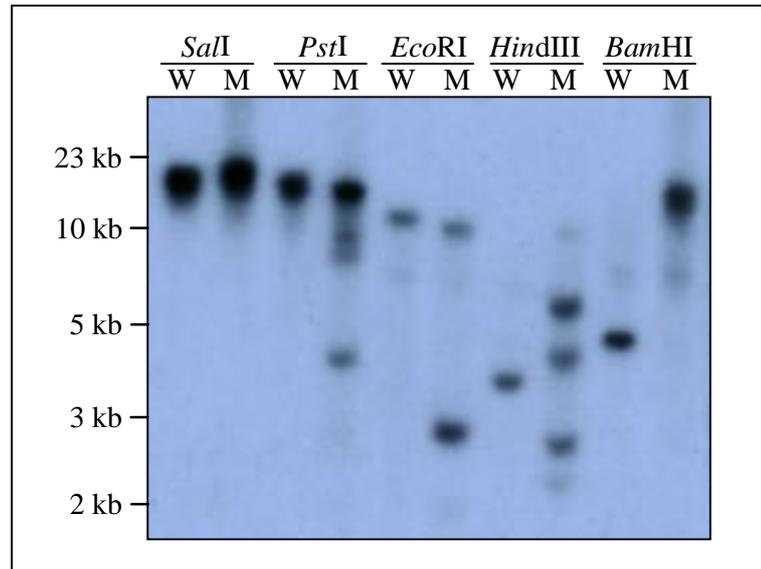
Für die inverse PCR wurde genomische DNA der Mutante *sng1-4* von *Arabidopsis* mit den in der Southern-Analyse ausgewählten vier Restriktionsenzymen verdaut. Die DNA wurde durch Extraktion mit Phenol-Chloroform gereinigt, durch Fällung mit Ethanol konzentriert und mittels T4 DNA-Ligase in einem Volumen religiert, das die Zirkularisierung begünstigt. Die DNA wurde danach erneut wie beschrieben gereinigt und konzentriert. Aliquots der Präparationen wurden in eine inverse PCR mit einer Elongationszeit von einer sowie fünf Minuten eingesetzt.



**Abb. 7.** Analyse des 0,8 kb-Fragments aus der inversen PCR mit der Mutante *sng1-4* von *Arabidopsis* nach Verdau der DNA mit dem Restriktionsenzym *BclI*. – **A** Agarosegel-Elektrophorese; **B** Struktur des 0,8 kb-Fragments nach Sequenzanalyse; L: Linke Seite der T-DNA; Pfeile: Primer P4, P5, P6 und P7; Schnittstellen der Enzyme, B: *BclI* und E: *EcoRI*.

Von der linken Seite der T-DNA wurden dazu die Sequenzen der Primer P4 und P5 abgeleitet (s. Abb. 4 u. 7). Zur Kontrolle wurde mit den Primern zuerst eine PCR durchgeführt, in der als Matrize das Plasmid pCS610 vorgelegt worden war. Das Plasmid enthält im Vektor pSP64 ein 1,1 kb-Fragment aus der linken Seite der T-DNA. Es handelt sich um den Abschnitt zwischen den Schnittstellen der Enzyme *EcoRI* und *NruI* (s. Abb. 4), in dem sich auch die Bindungsstellen der Primer P4 und P5 befinden. In der PCR wurde aus diesem Plasmid wie erwartet ein 4 kb-Fragment amplifiziert, was die Funktionsfähigkeit der Primer zeigte. In den mit den Präparationen danach durchgeführten inversen PCRs wurden für die Enzyme *PstI* und *ScaI* keine Fragmente erhalten, für das Enzym *DraI* dagegen zwei Fragmente, die aber kleiner waren als nach der Southern-Analyse erwartet. Für das Enzym *BclI* wurde dagegen reproduzierbar ein 0,75 kb-Fragment erhalten (s. Abb. 7), dessen Größe dem 0,85 kb-Fragment im Blot entsprach (s. Abschn. 4.2.2 u. Abb. 5).

Das Fragment wurde nach Elektrophorese aus dem Agarosegel extrahiert und mittels T4 DNA-Ligase in den Vektor pT7blue(R) ligiert. Der Vektor war zu diesem Zweck mit überhängenden 3'-Enden aus Desoxythymidin versehen worden. Die Produkte der Ligation wurden mittels Hitzeschock in den Stamm DH5 $\alpha$  von *E. coli* transformiert. Aus einer Reihe von Klonen wurde anschließend in Minipräparationen Plasmid-DNA isoliert. Klone des Vektors, die das 0,75 kb-Fragment aus der inversen PCR enthielten, wurden nach dem Verdau mit den Enzymen *HindIII* und *SmaI* in der Agarosegel-Elektrophorese identifiziert. Diese Enzyme sind im Polylinker des Vektors pT7Blue(R) vorhanden. Die Orientierung der Fragmente wurde durch einen Verdau mit dem Enzym *EcoRI* überprüft, für das im Polylinker und in der linken



**Abb. 8.** Southern Blot mit dem Wildtyp (W), Ökotyp Wassilewskija, und der Mutante *sng1-4* (M) von *Arabidopsis* hybridisiert mit dem 0,4 kb-Fragment genomischer DNA aus der inversen PCR.

Seite der T-DNA jeweils eine Schnittstelle vorhanden ist (s. Abb. 7). Zwei Klone, die das Fragment aus der inversen PCR in der entgegengesetzten Orientierung enthielten, wurden mit dem Primer T7 automatisch sequenziert. Die Analyse mit der Lasergene Biocomputing Software zeigte, dass es die Struktur eines Fragments besaß, das in einer inversen PCR mit den Primern P4 und P5 erzeugt worden war und das von der linken Seite der T-DNA stammte. Es enthielt einen zentralen Abschnitt mit einer Größe von 402 bp, der kein Teil der T-DNA ist. Das zeigte ein Vergleich mit der T-DNA-Sequenz mit Hilfe der Biocomputing Software. Der Abschnitt wies 1997 in einem Vergleich mit GenBank, der mit dem BLASTN-Algorithmus durchgeführt wurde (Altschul *et al.* 1990, 1997), keine signifikante Ähnlichkeit zu in dieser deponierten Sequenzen auf. Ein Teil dieses Abschnitts mit einer Größe von 0,36 kb wurde mit den Primern P6 und P7 amplifiziert (s. Abb. 7). Das erzeugte PCR-Fragment wurde nach der Elektrophorese aus dem Agarosegel extrahiert, radioaktiv markiert und mit genomischer DNA des Wildtyps (Ökotyp Wassilewskija) und der Mutante *sng1-4* von *Arabidopsis* hybridisiert, die auf eine Membran transferiert worden waren. Die Sonde ergab im Southern Blot in den Verdauungen von mehreren Restriktionsenzymen einen RFLP (s. Abb. 8).

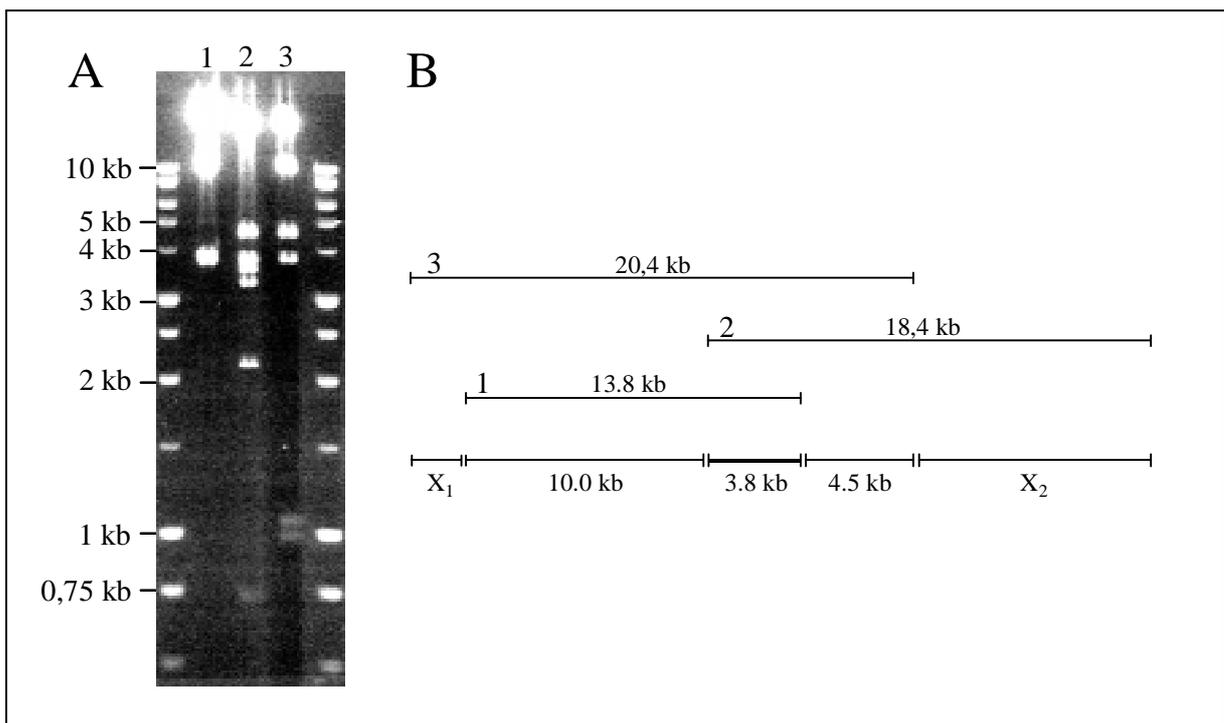
## 4.3 Isolation eines genomischen Klons des *SNG1*-Gens von *Arabidopsis*

### 4.3.1 Analyse der *abi1*-Bibliothek

Zur Identifikation eines genomischen Klons des *SNG1*-Gens wurde die *abi1*-Bibliothek von *Arabidopsis* (Meyer 1994; Meyer *et al.* 1994) analysiert. Diese war hergestellt worden aus dem Ökotyp Landsberg *erecta* im Vektor pBIC20, zur Klonierung wurde die Schnittstelle des Restriktionsenzym *HindIII* verwendet. Als Sonde wurde das 0,36 kb-Fragment genomischer

DNA aus der inversen PCR eingesetzt. Im ersten Screening der Bibliothek wurden  $1 \times 10^5$  cfu nach Membrantransfer mit der Sonde hybridisiert. Es wurden 30 Kolonien erhalten, die mit der Sonde reagierten, von denen zwei ein starkes Signal erzeugten. Diese und eine Auswahl von 13 anderen Kolonien, die ein Spektrum schwächerer Signale erzeugten, wurden in einem zweiten Screening erneut mit der Sonde hybridisiert. Von den 13 Kolonien reagierten fünf nicht mehr mit der Sonde.

Von positiven Klonen und einzelnen Kolonien anderer Klone wurde in Minipräparationen Cosmid-DNA isoliert. Die Cosmide wurden mit dem Enzym *Hind*III verdaut, die erzeugten Fragmente im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Im Verdau der zwei Cosmide mit starkem Signal wurde in gleicher Weise ein 3,8 kb-Fragment genomischer DNA freigesetzt, darüber hinaus ergab sich ein Spektrum von Fragmenten unterschiedlicher Größe. Die verdaute Cosmid-DNA wurde auf eine Membran übertragen und mit der Sonde, die für das Screening verwendet wurde, hybridisiert. Nur das 3,8 kb-Fragment der beiden genannten Cosmide reagierte erneut mit der Sonde. Diese Cosmide wurden als Nummer 1 und 2 bezeichnet. Aus dem Cosmid 1 wurden durch den Verdau zwei Fragmente genomischer DNA mit einer Größe von 3,8 kb und 10 kb freigesetzt, aus dem Cosmid 2 sieben Fragmente mit Größen von 0,25 kb, 0,75 kb, 2,2 kb, 3,3 kb, 3,6 kb, 3,8 kb und 4,5 kb (s. Abb. 9). Aus diesem Verdau ging darüber hinaus hervor, dass das 3,8 kb-Fragment auf der genomischen Ebene von dem 10 kb-Fragment des Cosmids 1 einerseits und von einem der Fragmente des Cosmids 2 andererseits flankiert wird.



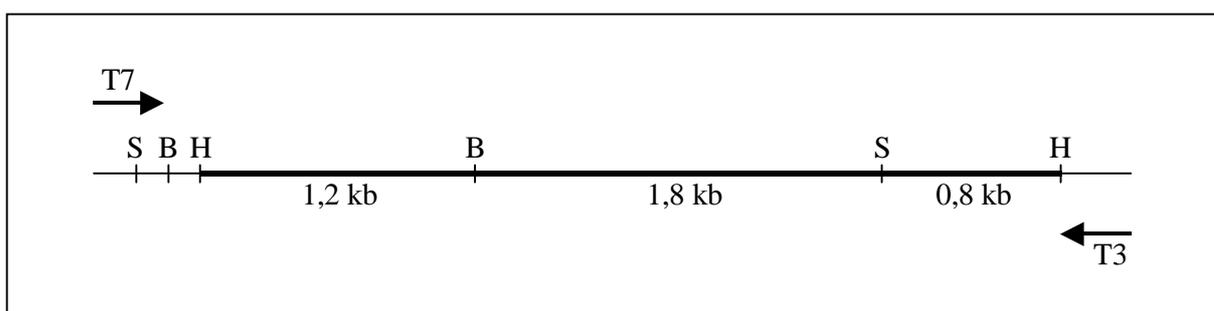
**Abb. 9.** Analyse der Cosmide 1-3 nach Verdau mit dem Restriktionsenzym *Hind*III. – **A** Agarosegel-Elektrophorese des Verdaus; **B** Anordnung der in **A** freigesetzten Fragmente genomischer DNA und der gesamten Cosmid-Inserts, X: Anordnung unbekannt, X<sub>1</sub>: 1,0 kb- und 1,1 kb-Fragment des Cosmids 3, X<sub>2</sub>: 0,25 kb-, 0,75 kb-, 2,2 kb-, 3,3 kb- und 3,6 kb-Fragment des Cosmids 2 (das 0,25 kb-Fragment ist auf dem Photo nicht sichtbar).

Um ein Cosmid zu isolieren, in dem das 3,8 kb-Fragment beidseitig von Fragmenten genomischer DNA flankiert wird, wurde die Bibliothek erneut wie beschrieben mit der Sonde analysiert. Es wurden 35 mit der Sonde reagierende Kolonien erhalten, von denen vier im ersten und zweiten Screening ein starkes Signal erzeugten. In einer Minipräparation wurde aus diesen Kolonien Cosmid-DNA isoliert, die ebenfalls durch einen Verdau analysiert wurde. Ein Cosmide enthielt fünf Fragmente genomischer DNA mit einer Größe von 10 kb, 4,5 kb, 3,8 kb, 1,1 kb und 1,0 kb (s. Abb. 9), die anderen Klone waren mit den Cosmiden 1 oder 2 identisch. Das Cosmid wurde als Nummer 3 bezeichnet. Auf genomischer Ebene wird demzufolge das 3,8 kb-Fragment von einem 10 kb- und 4,5 kb-Fragment flankiert.

### 4.3.2 Klonierung der Cosmidfragmente

Die aus den Cosmiden 1-3 durch Verdau mit dem Restriktionsenzym *HindIII* freigesetzten Fragmente wurden zur weiteren Analyse in den Vektor pBluescript II KS(-) subkloniert. Von der Cosmid-DNA wurden dazu Midipräparationen angefertigt, Aliquots davon nach dem Verdau durch Extraktion mit Phenol-Chloroform gereinigt, mit Hilfe einer Ethanol-Fällung konzentriert und in einer Agarosegel-Elektrophorese überprüft. Ein Aliquot dieser DNA und der Präparation des Vektors wurden in eine Ligation eingesetzt. Die Katalyse erfolgte dabei durch die T4 DNA-Ligase. Plasmid-DNA des Vektor aus einer Minipräparation wurde dafür mit dem Enzym *HindIII* verdaut, mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert und nach Elektrophorese aus dem Agarosegel extrahiert. Die Ligationsprodukte wurden durch Hitzeschock in den Stamm DH5 $\alpha$  von *E. coli* transformiert. Aus einer Reihe von Kolonien wurde danach in Minipräparationen die Plasmid-DNA isoliert. Klone des Vektors, welche die Cosmidfragmente enthielten, ließen sich nach Verdau mit dem Enzym *HindIII* in der Agarosegel-Elektrophorese identifizieren.

Zur Sequenzierung wurden weiter Abschnitte des 3,8 kb-Fragments von Cosmid 2 aus einem pBluescript-Klon subkloniert. Der Verdau mit einer Reihe von Enzymen aus dem Polylinker des Vektors zeigte, dass in dem Fragment einzelne Schnittstellen für die Enzyme *BamHI* und *SmaI* vorhanden sind (s. Abb. 10). Im Verdau mit dem Enzym *BamHI* wurde deshalb ein 1,2 kb-Fragment, in einem Verdau mit den Enzymen *BamHI* und *SmaI* analog ein 1,8 kb-Fragment aus dem pBluescript-Klon freigesetzt und wie beschrieben subkloniert. Durch Verdau mit



**Abb. 10.** Karte des 3,8 kb-Fragments der Cosmide 1-3 im Vektor pBluescript II KS(-). – Pfeile: Primer T3 und T7; Schnittstellen der Restriktionsenzyme, B: *BamHI*, H: *HindIII* und S: *SmaI*.

dem Enzym *Sma*I wurde weiterhin aus dem 3,8 kb-Fragment ein solches mit einer Größe von 3,0 kb genomischer DNA entfernt. Das Vektorfragment wurde nach der Elektrophorese aus dem Agarosegel extrahiert, religiert und wie beschrieben in *E. coli* kloniert. Danach verblieb im pBluescript-Vektor ein 0,8 kb-Abschnitt genomischer DNA.

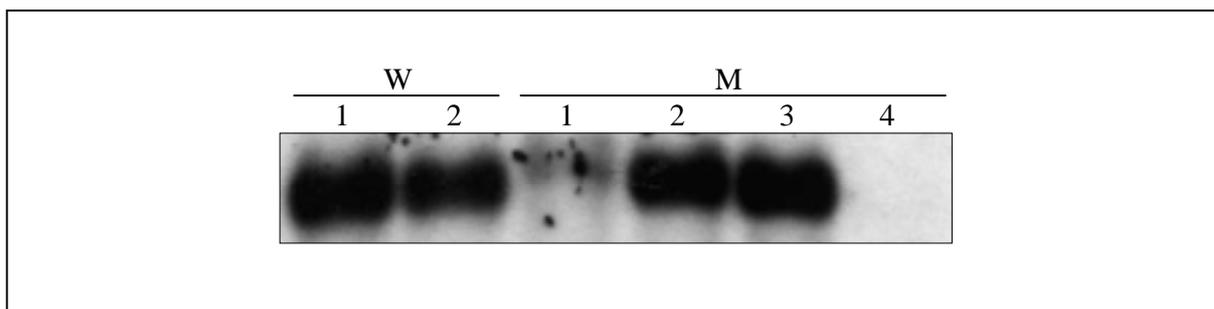
### 4.3.3 Sequenzanalyse der Cosmidfragmente

Klone mit dem 10 kb-Fragment von Cosmid 1 sowie dem 3,8 kb- und 4,5 kb-Fragment von Cosmid 2 im Vektor pBluescript II KS(-) wurden mit den Primern T3 und T7 von beiden Seiten ansequenziert, ebenso Klone mit dem 1,2 kb-, dem 1,8 kb- und dem 0,8 kb-Fragment des 3,8 kb-Fragments. Vektorsequenzen und nicht mit Eindeutigkeit lesbare Abschnitte vom Ende des Sequenzierlaufs wurden mit der Lasergene Biocomputing Software entfernt. Die gesäuberten Sequenzen wurden im Jahr 1997 durch den BLASTX-Algorithmus (Altschul *et al.* 1990, 1997) mit GenBank verglichen. Auf dem 3,8 kb-Fragment wurde ein Gen mit signifikanter Ähnlichkeit zu Serincarboxypeptidasen (EC 3.4.16) gefunden. Dabei ist das 5'-Ende des Gens auf dem 10 kb-Fragment lokalisiert (s. Abb. 13). An dem anderen Ende des 10 kb-Fragments befindet sich das 3'-Ende eines weiteren Gens, das ebenfalls eine signifikante Ähnlichkeit zu Serincarboxypeptidasen aufweist. Die Richtung der ORFs wurde durch einen auf Proteinebene durchgeführten Vergleich mit den aus der Datenbank erhaltenen Sequenzen abgeleitet. Die Analyse mit der Biocomputing Software zeigte weiterhin, dass sich die Sequenz des 0,4 kb-Fragments genomischer DNA aus der inversen PCR auf dem 3,8 kb-Fragment befindet. Mit den Sequenzen des 4,5 kb-Fragments wurden im Gegensatz dazu aus der Datenbank keine Treffer erhalten. In einer zum gleichen Zeitpunkt erfolgten BLASTN-Analyse der *Arabidopsis thaliana*-Datenbank wurde außerdem die Endsequenz eines BAC-Klons erhalten. Der Eintrag in der Datenbank zeigte, dass sich der Klon im Rahmen des *Arabidopsis*-Genomprojekts in der Vorbereitung zur Sequenzierung durch das Institute for Genomic Research (TIGR, Rockville, Madison, USA) befand. Eine Rückfrage ergab Ende 1997, dass die betreffende Region auf dem Chromosom 2 von *Arabidopsis* in den folgenden Monaten sequenziert werden sollte (Steve Rounsley, pers. Mitt.).

### 4.3.4 Northern-Analyse der Cosmidfragmente

Das 10 kb-Fragment des Cosmids 1 und das 3,8 kb- sowie das 4,5 kb-Fragment des Cosmids 2 wurde als Sonde in jeweils ein Northern-Experiment mit dem Wildtyp sowie den Mutanten *sng1-1*, *sng1-2*, *sng1-3* und *sng1-4* von *Arabidopsis* eingesetzt. Keimlinge wurden dazu in acht Tagen auf Agar angezogen, daraus RNA isoliert und nach Agarosegel-Elektrophorese auf eine Membran transferiert. Die Sonden-Fragmente wurden aus pBluescript-Klonen durch Verdau mit dem Restriktionsenzym *Hind*III freigesetzt, nach der Elektrophorese aus dem Agarosegel extrahiert, radioaktiv markiert und mit den Blots hybridisiert. Das 3,8 kb-Fragment reagierte mit den Ökotypen des Wildtyp, mit den Mutanten *sng1-1* und *sng1-3*, schwach mit der Mutante *sng1-2*, nicht aber mit der Mutante *sng1-4* (s. Abb. 11). Das 10 kb-Fragment reagierte sehr

schwach auf gleiche Weise. Das 4,5 kb-Fragment identifizierte in allen Typen von RNA ein Transkript anderer Größe.



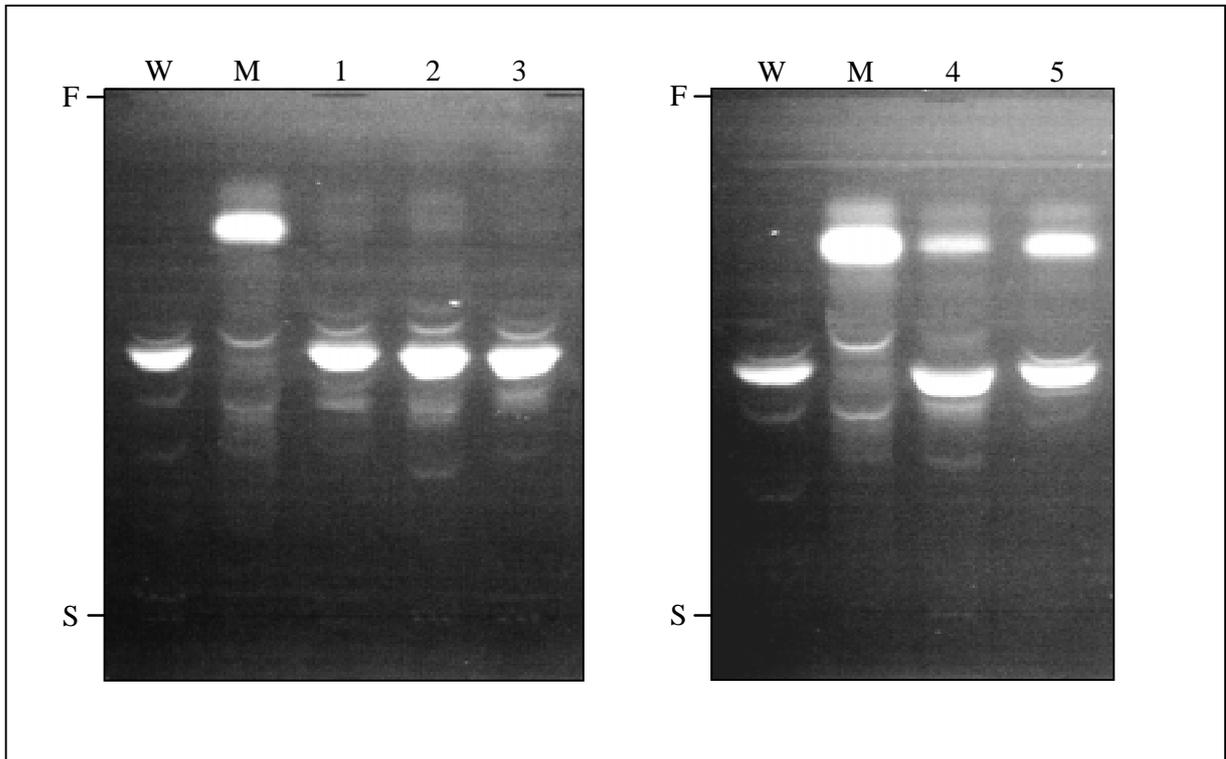
**Abb. 11.** Northern Blot mit RNA aus acht Tage alten Keimlingen von *Arabidopsis* hybridisiert mit dem 3,8 kb-Fragment genomischer DNA der Cosmide 1-3. – W: Ökotypen des Wildtyps, 1: Columbia und 2: Wassilewskija; M: *sng1*-Mutanten, 1: *sng1-1*, 2: *sng1-2*, 3: *sng1-3* und 4: *sng1-4*; für Kontrolle des Auftrags gleicher RNA-Mengen s. Abb. 3 A in Lehfeldt *et al.* (2000).

#### 4.3.5 Komplementation der Mutante *sng1-1* mit dem Cosmid 1

Die Cosmiden 1-3 wurden in die Komplementation der Mutante *sng1-1* von *Arabidopsis* eingesetzt. Die Cosmide wurden dazu mittels Elektroporation in *A. tumefaciens* transformiert, das anschließend durch Vakuuminfiltration in die Pflanzen eingebracht wurde. Aus den Samen infiltrierter Pflanzen wurden Keimlinge mit Resistenz gegen Kanamycin auf Agar angezogen und mittels DC von methanolischen Blattextrakten auf die Akkumulation der Sinapinsäureester getestet. Die Resistenz wird dabei durch das in der T-DNA des Cosmids pBIC20 lokalisierte *NPT II*-Gen vermittelt. In einem ersten Versuch wurden mit jedem Cosmid acht Töpfe infiltriert. Ungefähr 5000 Samen pro Topf, d.h. insgesamt ca. 40 000 Samen pro Cosmid, wurden auf resistente Keimlinge getestet. Für das Cosmid 1 wurden aus sieben Töpfen 15 resistente Keimlinge erhalten, was mehr als sieben unabhängigen Transformationen entsprach. Wie der Wildtyp akkumulierten alle transgenen Keimlinge nur 2-*O*-Sinapoyl-L-malat (s. Abb. 12). Für die Cosmide 2 und 3 wurden dagegen keine resistenten Keimlinge erhalten.

Von jeweils drei Kolonien des mit den Cosmiden 1-3 transformierten *A. tumefaciens* wurde in einer Minipräparation Cosmid-DNA isoliert, die mit dem Restriktionsenzym *Hind*III verdaut wurde. In der anschließend durchgeführten Agarosegel-Elektrophorese waren keine einzelnen Fragmente zu erkennen. Die DNA wurde deshalb auf eine Membran übertragen und mit einer Mischung aus dem 3,8 kb-Fragment, dem 4,5 kb-Fragment und dem 10 kb-Fragment als Sonde hybridisiert. Die Sonden wurden präpariert wie für die Northern-Analyse beschrieben (s. Abschn. 4.3.4). Nur für das Cosmid 1 konnten in der Southern-Analyse die erwarteten Fragmente identifiziert werden.

In einem zweiten Versuch wurden erneut zehn Töpfe mit Pflanzen von *Arabidopsis* mit dem Cosmid 1 infiltriert. Ungefähr 2500 Samen pro Topf, und damit insgesamt ca. 25 000 Samen, wurden anschließend wie beschrieben getestet. Aus acht Töpfen wurden 19 Keimlinge mit Resistenz gegen Kanamycin erhalten, was mindestens acht unabhängigen Transformationen

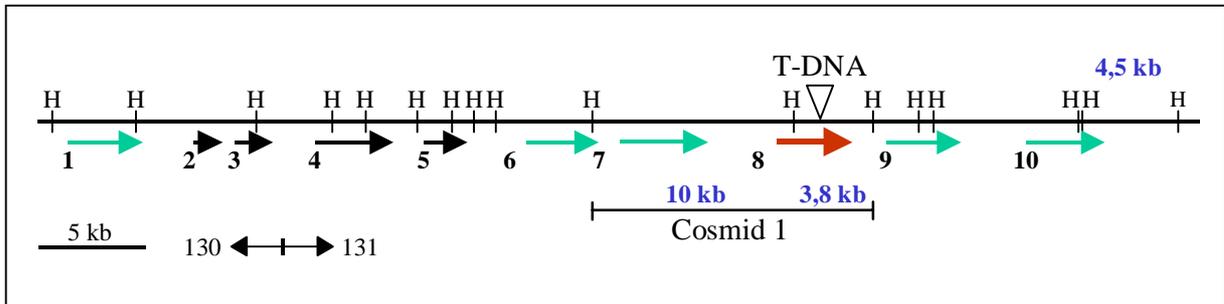


**Abb. 12.** DC-Analyse methanolischer Blattextrakte aus Keimlingen von *Arabidopsis* nach Transformation mit Cosmid 1. – W: Keimling des Wildtyp, Ökotyp Columbia; M: Keimling der Mutante *sng1-1*; Nr. 1-5: Keimlinge der Mutante *sng1-1* mit Kanamycin-Resistenz in der folgenden Generation (T1) nach *A. tumefaciens*-Vakuuminfiltration; Photographie der DCs im UV-Licht bei einer Wellenlänge von 312 nm (s. Abschn. 3.4.5.2), S: Start, F: Front.

entsprach. Wie der Wildtyp von *Arabidopsis* akkumulierten alle Keimlinge 2-*O*-Sinapoyl-L-malat, fünf Keimlinge zusätzlich 1-*O*-Sinapoyl- $\beta$ -D-glucose (s. Abb. 12). In beiden Versuchen wurden ca. 5000 Samen der Mutante *sng1-1* ohne Vakuuminfiltration als Negativkontrolle auf Selektionsagar ausgesät. In keinem Fall wurden Keimlinge mit Resistenz gegen Kanamycin erhalten. In einer Publikation, in welche Ergebnisse aus dieser Arbeit zum Teil eingegangen sind, wurde das Cosmid 1 auch als pBIC20-*SNG1* bezeichnet (Lehfeldt *et al.* 2000).

#### 4.3.6 Analyse des *SNG1*-Gens von *Arabidopsis*

Im Rahmen des *Arabidopsis*-Genomprojekts wurde durch das Institut for Genomic Research (TIGR, Rockville, Madison, USA) 1998 die Sequenz des BAC-Klons F21P24 mit einer Größe von 94 kb veröffentlicht und in GenBank deponiert. Mit Hilfe von Computerprogrammen und durch Vergleiche mit Datenbanken wurden in der Sequenz außerdem die potenziellen Gene identifiziert. Die Sequenz des 0,4 kb-Fragments aus der inversen PCR (s. Abschn. 4.2.3), die sequenzierten Abschnitte des 3,8 kb-Fragment der Cosmide (s. Abschn. 4.3.3) und die Sequenz der *SNG1*-cDNA 2 (s. Abschn. 4.4.3) konnten mit Hilfe des BLASTN-Algorithmus (Altschul *et al.* 1990, 1997) in einem Gen (F21P24.5) auf diesem BAC-Klon lokalisiert werden, das eine signifikante Ähnlichkeit zu Serincarboxypeptidasen (EC 3.4.16) aufweist.



**Abb. 13.** Karte des Bereichs mit dem *SNG1*-Gen in den Abschnitten 130 und 131 des Chromosoms 2 von *Arabidopsis*. – Pfeile: potenzielle Gene; grüne Pfeile, Gen Nr. 1, 6, 7, 8, 9 und 10: Serincarboxypeptidasen; schwarze Pfeile, Gen Nr. 2: Flavonol-3-*O*-Glucosyltransferase, Gen Nr. 3: sog. hypothetisches Protein (keine Ähnlichkeit mit Sequenzen in Datenbanken), Gen Nr. 4: Ca<sup>2+</sup>-ATPase und Gen Nr. 5: Pseudogen; roter Pfeil, Gen Nr. 8: potenziell das *SNG1*-Gen; H: Schnittstelle des Restriktionsenzym *HindIII*; weißes Dreieck: T-DNA-Insertion in der Mutante *sng1-4*; blaue Zahlen: 10 kb-, 3,8 kb- und 4,5 kb-Fragment der Cosmide 1-3 (s. Abb. 9).

Die Fragmente von genomischer DNA, die sich aus der Analyse der Cosmide mit dem Restriktionsenzym *HindIII* ergeben hatten (s. Abschn. 4.3.1 u. Abb. 9), konnten ebenso in der Sequenz des BAC-Klons gefunden werden (s. Abb. 13). Die 4,5 kb-Fragmente der Cosmide 2 und 3 sind aber nicht identisch, wie aufgrund der Agarosegel-Elektrophorese zuerst angenommen wurde (s. Abschn. 4.3.1 u. Abb. 9). Das den Cosmiden gemeinsame 3,8 kb-Fragment wird auf einer der Seiten nicht von einem 4,5 kb-Fragment, sondern von dem 2,0 kb-Fragment des Cosmids 2 flankiert. Des weiteren fehlt eine Schnittstelle des Enzyms *HindIII*, die zur Entstehung des 3,3 kb- und 3,5 kb-Fragments von Cosmid 2 führte. Hierbei handelt es sich sehr wahrscheinlich um einen Polymorphismus zwischen zwei Ökotypen von *Arabidopsis*. Denn zur genomischen Sequenzierung wurde der Ökotyp Columbia verwendet, zur Konstruktion der *abil*-Bibliothek, aus der die Cosmide 1-3 isoliert wurden, hingegen der Ökotyp Landsberg *erecta*.

Die Analyse des BAC-Klons durch das *Arabidopsis*-Genomprojekt demonstrierte, dass das potenzielle *SNG1*-Gen zu einer Gruppe von fünf Genen gehört, die sich in einem Abschnitt mit einer Größe von 25 kb befinden (s. Abb. 13). Diese Gene weisen alle die gleiche signifikante Ähnlichkeit zu Serincarboxypeptidasen auf. Die Aminosäuresequenzen sind nach einer Analyse mit dem Clustal-Algorithmus aus der Lasergene Biocomputing Software zu 69-87 % identisch. Die Gene kodieren weiterhin alle das bekannte N-terminale Peptid der SMT aus *Brassica rapa* oder eine geringfügig davon abweichende Sequenz. Die BLASTN-Analyse (s.o.) von GenBank zeigte aber, dass die Sequenzen des 0,4 kb-Fragments aus der inversen PCR und der *SNG1*-cDNA 2 vollständig nur mit der Sequenz des Gens Nr. 8 übereinstimmen (s. Abb. 13). Dieses Gen wurde aufgrund der bis zu diesem Zeitpunkt erzielten Ergebnisse als das *SNG1*-Gen von *Arabidopsis* identifiziert (GenBank Nrn. AAC17816 u. AC004401).

Die Analyse zeigte weiterhin, dass das Cosmid 1 ein weiteres Gen (Gen Nr. 7; s. Abb. 13) aus der genannten Gruppe von Genen einschließt, das durch die Ansequenzierung der Cosmid-

fragmente nicht entdeckt worden war. Zu einem späteren Zeitpunkt wurde die vollständige Sequenz des Chromosoms 2 von *Arabidopsis* veröffentlicht (Lin *et al.* 1999). Für die Analyse des *SNG1*-Gens sind die Abschnitte 130 (GenBank Nr. AC004786) mit einer Größe von 61 kb und 131 (GenBank Nr. AC004401) mit einer solchen von 77 kb relevant. In einem Bereich mit einer Größe von 45 kb sind danach insgesamt sechs Gene und ein Pseudogen mit signifikanter Ähnlichkeit zu Serincarboxypeptidasen vorhanden (s. Abb. 13). Aus dem BAC-Klon F21P24 ging nach der Entfernung von Sequenzen, die mit benachbarten BAC-Klonen identisch waren, der Abschnitt 131 hervor.

Eine BLASTP-Analyse (s.o.) von GenBank mit dem bekannten N-terminalen SMT-Peptid aus *Brassica rapa* ergab am 20.02.2000, dass bis zu diesem Zeitpunkt insgesamt 15 Gene, die dieses oder ein ähnliches Peptid enthielten, aus dem Genomprojekt für *Arabidopsis* in der Datenbank deponiert wurden. Dazu gehört eine weitere Gruppe von fünf Genen, die alle eine signifikante Ähnlichkeit zu Serincarboxypeptidasen besitzen, die sich auf Chromosom 1 von *Arabidopsis* befindet (BAC-Klon T18K17, GenBank Nr. ATAC010556). Ein Vergleich von Sequenzen mit der Biocomputing Software (s.o.) zeigte, dass die Gruppen von Genen auf den BAC-Klonen F21P24 und T18K17 nicht identisch sind. Es liegt deshalb keine erst vor kurzem erfolgte Duplikation eines größeren chromosomalen Abschnitts vor.

#### **4.4 Isolation eines cDNA-Klons für das *SNG1*-Gen von *Arabidopsis***

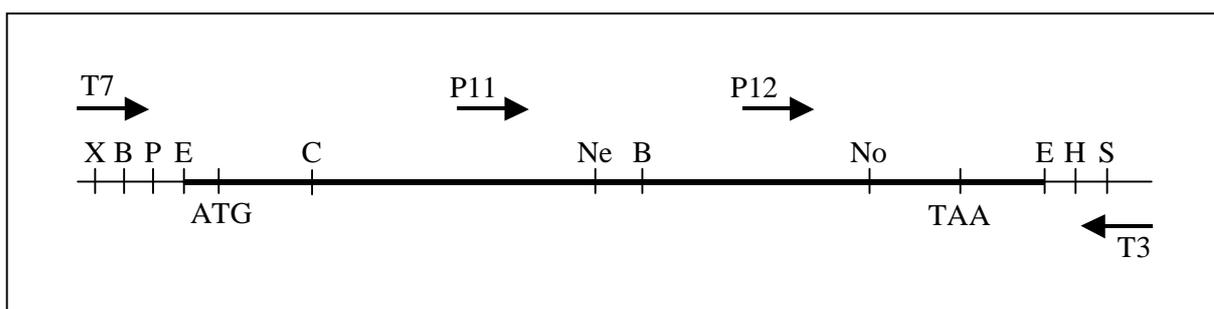
##### **4.4.1 Analyse einer cDNA-Bibliothek**

Zur Isolation eines cDNA-Klons des *SNG1*-Gens wurde als Sonde das 3,8 kb-Fragment genomischer DNA der Cosmide 1-3 verwendet. Das Fragment wurde zu diesem Zweck aus dem pBluescript-Klon des Cosmids 2 durch Verdau mit dem Restriktionsenzym *HindIII* freigesetzt. Das Fragment wurde nach Elektrophorese aus dem Agarosegel extrahiert und radioaktiv markiert. Die Sonde wurde in einem ersten Screening mit  $5 \times 10^5$  pfu einer cDNA-Bibliothek nach Membrantransfer hybridisiert, die aus 10-14 Tage alten Keimlingen des Ökotyps Landsberg *erecta* von *Arabidopsis* hergestellt worden war (Meyer *et al.* 1994; Leube 1996). Zur Konstruktion der Bibliothek wurde der Vektor  $\lambda$ gt10 verwendet, die cDNAs wurden in die Schnittstelle des Enzyms *EcoRI* kloniert. Von 35 Plaques, die mit der Sonde reagierten, wurden zehn Plaques, die ein starkes Signal erzeugten, ausgewählt und in einem zweiten Screening erneut mit der Sonde analysiert. Von den sechs Plaques, die abermals eine positive Reaktion zeigten, wurden anschließend in einem dritten Screening einzelne Plaques isoliert.

Aliquots der Phagenisolate wurden in eine PCR mit den Primern P8 und P9 eingesetzt. Die Primer flankieren die Schnittstelle des Enzyms *EcoRI* im Vektor  $\lambda$ gt10. Die amplifizierten Fragmente wiesen in der Agarosegel-Elektrophorese eine Größe von 1,0-1,5 kb auf. Das größte Fragment wurde subkloniert und sequenziert (s. Abschn. 4.4.2). Dieser Klon wurde als *SNG1*-cDNA 1 bezeichnet. Die Sequenzanalyse zeigte, dass in dem aus der cDNA abgeleiteten

ORF an der Position 1 kein Startcodon oder Methioninrest vorhanden ist. Deshalb wurden mit einem 0,75 kb-Fragment des 5'-Endes der *SNG1*-cDNA 1 in einem weiteren Screening  $5 \times 10^5$  pfu der Bibliothek wie beschrieben analysiert. Die Sonde wurde durch Verdau mit dem Enzym *Bam*HI aus dem pBluescript-Klon freigesetzt (s. Abschn. 4.4.2 u. Abb. 14). Dabei wurden 38 Plaques erhalten, die mit der Sonde reagierten.

Diese Plaques wurden mit den nicht analysierten 25 Plaques aus dem Screening mit dem 3,8 kb-Fragment in eine PCR-Analyse des 5'-Endes der cDNAs eingesetzt. Aus den sequenzierten Abschnitten der *SNG1*-cDNA 1 (s. Abschn. 4.4.2) wurde zu diesem Zweck der Primer P10 abgeleitet (s. Abb. 14), der mit dem Primer P8 oder P9 die Amplifikation des 5'-Endes der cDNA ermöglicht. Es wurde ein Plaque gefunden, dessen 5'-Ende um 0,1 kb größer war als das der *SNG1*-cDNA 1, wie die Agarosegel-Elektrophorese zeigte. Für 17 der insgesamt 63 Plaques wurde dagegen im Vergleich zur *SNG1*-cDNA 1 ein ungefähr gleich großes oder aber kleineres Fragment erhalten, die restlichen Plaques ergaben kein Produkt. Mit dem auf diese Weise isolierten cDNA-Klon wurde wie beschrieben ein zweites und drittes Screening mit der *SNG1*-cDNA 1 als Sonde durchgeführt. Die Sonde wurde dazu durch Verdau mit dem Enzym *Eco*RI aus dem pBluescript-Klon freigesetzt (s. Abb. 14). Im dritten Screening wurde dann ein Plaque dieses Klons isoliert. Der Klon wurde als *SNG1*-cDNA 2 bezeichnet, die cDNA desselben mit einer Größe von 1,6 kb wurde subkloniert und sequenziert (s. Abschn. 4.4.2). Die Analyse der Sequenz zeigte, dass in dem aus der cDNA abgeleitete ORF an der Position 1 ein Startcodon oder Methioninrest vorhanden ist (s. Abschn. 8.3).



**Abb. 14.** Karte des Klons 2.2 der *SNG1*-cDNA 2 im Vektor pBluescript II KS(-). – Pfeile: Primer T3 und T7; Schnittstellen der Restriktionsenzyme, B: *Bam*HI, C: *Csp*45I, E: *Eco*RI, H: *Hind*III, Ne: *Nde*I, No: *Nco*I, P: *Pst*I, S: *Sal*I und X: *Xba*I.

#### 4.4.2 Klonierung der cDNA des *SNG1*-Gens

Die *SNG1*-cDNAs 1 und 2 sowie Teilfragmente derselben wurden zur Sequenzierung in den Vektor pBluescript II KS(-) subkloniert. Das Fragment der *SNG1*-cDNA 1 wurde mittels PCR aus zwei Phagenisolaten des dritten Screenings amplifiziert. Zu diesem Zweck wurde die *Pfu* DNA-Polymerase mit den Primer P8 und P9 verwendet. Die Fragmente wurde durch eine Extraktion mit Phenol-Chloroform gereinigt, durch eine Ethanol-fällung konzentriert, mit dem Restriktionsenzym *Eco*RI verdaut, nach Elektrophorese aus dem Agarosegel extrahiert und mit dem Fragment des Vektors durch T4 DNA-Ligase verknüpft. Der Vektor wurde dazu mit dem

Enzym *EcoRI* verdaut, die erzeugten 5'-Enden anschließend mit der alkalischen Phosphatase dephosphoryliert, das Fragment nach der Elektrophorese aus dem Agarosegel extrahiert. Die Produkte dieser Ligation wurden durch Hitzeschock in den Stamm DH5 $\alpha$  von *E. coli* transformiert. Aus einer Reihe von Kolonien wurde in Minipräparationen Plasmid-DNA isoliert. Klone des Vektors, die das Fragment der cDNA enthielten, wurden nach Verdau mit dem Enzym *EcoRI* in der Agarosegel-Elektrophorese identifiziert. Für jedes der Phagenisolate wurde ein Klon zur Sequenzierung ausgewählt. Diese wurden bezeichnet als die Klone 1.1 und 1.2 der *SNG1*-cDNA 1.

Ein Verdau des Klons 1.1 mit einer Reihe von Restriktionsenzymen aus dem Polylinker des Vektors zeigte, dass in der cDNA eine Schnittstelle für das Enzym *BamHI* vorhanden ist (s. Abb. 14). Ein 0,75 kb-Fragment der cDNA wurde aus den Klonen 1.1 und 1.2 durch Verdau mit diesem Enzym freigesetzt und wie beschrieben subkloniert. Die Orientierung der subklonierten cDNA-Fragmente wurde durch Verdau mit dem Enzym *EcoRI*, für das aus dem Polylinker des Vektors eine Schnittstelle in das neue Konstrukt übertragen wurde, in der Agarosegel-Elektrophorese überprüft (s. Abb. 14). Zwei Klone, in denen die Fragmente die gleiche Orientierung wie in den Klonen 1.1 und 1.2 hatten, wurden ausgewählt und als 1.1a und 1.2a bezeichnet. Das im Vektor verbleibende cDNA-Fragment wurde analog durch Religation der Vektorfragmente subkloniert. Die daraus hervorgehenden Klone wurden bezeichnet als 1.1b und 1.2b.

Zur Klonierung der *SNG1*-cDNA 2 wurde aus dem Phagenisolat dieses Klons nach dem dritten Screening DNA des Bakteriophagen Lambda präpariert und mit dem Enzym *EcoRI* verdaut. Das freigesetzte Fragment der *SNG1*-cDNA 2 wurde wie für die *SNG1*-cDNA 1 beschrieben subkloniert. Die Sequenzierung der Klone 1.1 und 1.2 hatte gezeigt, dass in der cDNA am 3'-Ende eine Schnittstelle des Enzyms *NcoI* vorhanden ist (s. Abb. 14). Die Orientierung der cDNA-Fragmente wurde deshalb durch Verdau mit den Enzymen *PstI* und *NcoI* überprüft. Zwei Klone mit entgegengesetzter Orientierung der cDNA-Fragmente wurden zur Sequenzierung ausgewählt und als die Klone 2.1 und 2.2 bezeichnet. Dabei war die Orientierung in den Klonen 1.1, 1.2 und 2.2 identisch (s. Abb. 14). Aus dem Klon 2.2 wurde darüber hinaus das Fragment mit dem 3'-Ende der cDNA wie beschrieben für die Klone 1.1b und 1.2b subkloniert, woraus der Klon 2.2b hervorging.

#### 4.4.3 Sequenzanalyse der cDNA des *SNG1*-Gens

Die Klone 1.1, 1.2, 2.1 und 2.2 der *SNG1*-cDNA 1 und 2 wurden mit den Primern T7 und T3 von beiden Seiten sequenziert, die Klone 1.1a und 1.2a mit dem Primer T3 und die Klone 1.1b, 1.2b und 2.2b mit dem Primer T7. Die Klone 1.1 und 1.2 wurden zusätzlich mit den Primern P11 und P12 sequenziert (s. Abb. 14). Diese Primer wurden aus den Bereichen der cDNA abgeleitet, die mit den Primern T3 und T7 analysiert worden waren. Aus allen sequenzierten Abschnitten wurde mit Hilfe der Lasergene Biocomputing Software die gesamte Sequenz der

*SNG1*-cDNA 2 (s. Abschn. 8.3) zusammengesetzt. Sequenzen des Vektors und nicht eindeutig lesbare Abschnitte vom Ende des Sequenzierlaufs wurden zuvor entfernt.

Für die *SNG1*-cDNA 2 ergab sich eine Sequenz aus 1518 Basenpaaren, die mit Hilfe des Programms ORF Finder (Wheeler *et al.* 2000) auf mögliche kodierende Abschnitte analysiert wurde. Dabei wurde ein signifikanter ORF mit einer Größe von 1302 bp erhalten, der sich fast über die gesamte Länge der cDNA erstreckte. Dieser ORF bestand aus 433 Aminosäuren, aus der sich mit der Biocomputing Software (s.o.) für das SNG1-Protein eine molare Masse von 49,4 kDa und ein isoelektrischer Punkt (pI) von 6,2 errechneten. In diesem Leseraster wurde weiterhin eine Sequenz gefunden (Position 20-36, s. Abschn. 8.3 u. Abb. 15), die bis auf den konservativen Austausch von einer Aminosäure (Position 20, Alanin anstelle von Glycin) mit dem bekannten N-terminalen Peptid der SMT aus *Brassica rapa* identisch ist (s. Abschn. 1.2.1). Ein Vergleich mit den vier Peptiden, die von der SCT aus *B. napus* erhalten worden waren (Vogt *et al.* 1993; s. Abschn. 1.1), ergab eine begrenzte, eventuell aber nicht zufällige Übereinstimmung.

Die Sequenz der *SNG1*-cDNA 2 wurde im nächsten Schritt durch die Biocomputing Software (s.o.) mit der des *SNG1*-Gens verglichen (s. Abschn. 4.3.6). Das *SNG1*-Gen besteht demnach aus 14 Exons und 13 Introns. Durch das *Arabidopsis*-Genomprojekt wurden die gleichen Exons und eine identische Aminosäuresequenz mit Hilfe von Computerprogrammen aus der genomischen DNA abgeleitet (GenBank Nrn. ACC17816 u. AC004401). Zwischen der cDNA und der genomischen Sequenz besteht dabei an zwei Positionen eine Differenz (Basenpaare 1160 und 1534, s. Abschn. 8.3, an beiden Positionen Thymin in der cDNA), woraus aber kein Unterschied in der Aminosäuresequenz resultiert. Es handelt sich dabei sehr wahrscheinlich nicht um Sequenzierartefakte, sondern erneut um einen Polymorphismus zwischen zwei Ökotypen von *Arabidopsis* (s. Abschn. 4.3.6). Die cDNA wurde aus einer Bibliothek des Ökotyps Landsberg *erecta* isoliert, für die genomische Sequenzierung wurde dagegen der Ökotyp Columbia verwendet.

Der ORF des SNG1-Proteins, der sich aus der *SNG1*-cDNA 2 ergeben hatte, wurde später mit GenBank verglichen. Die Analyse wurde mit dem BLASTP-Algorithmus (Altschul *et al.* 1990, 1997) in der Version 2.0.11 durchgeführt. Am 20.02.2000 wurden dabei über das Internet 100 signifikante Treffer mit einem Erwartungswert (E) zwischen 0,002 und 0 erhalten. Die Datenbank vom Typ ‚nicht redundant‘ (nr) in der Ausgabe vom 15.02.2000 enthielt zu diesem Zeitpunkt 457 798 Einträge. Die Abschnitte mit signifikanter Ähnlichkeit erstreckten sich über die gesamten miteinander verglichenen Sequenzen. Bis auf wenige Ausnahmen (s.u.) wurden als Treffer Sequenzen von Serincarboxypeptidasen erhalten (EC 3.4.16; Peptidasen-Familie S10, Rawlings und Barrett 1994). Eine Analyse mit dem Clustal-Algorithmus der Lasergene Biocomputing Software ergab, dass die Identität zwischen dem SNG1-Protein und diesen Sequenzen 13,9-76,7 % beträgt. Mit der cDNA wurde am 22.02.2000 weiterhin die Datenbank ‚dbest‘ analysiert. Dieser Teil von GenBank in der Ausgabe vom selben Tag enthielt 3 642 750 nicht-redundante Einträge. Mit dem BLASTN-Algorithmus in der Version 2.0.11 wurde als

signifikanter Treffer ein *Expressed Sequence Tag* (EST) mit einer Größe von 624 bp erhalten (GenBank Nr. AI997845), der mit dem 3'-Ende der cDNA über 503 bp zu 99 % identisch war. Dieser potenzielle *Tag* des *SNG1*-Gens wurde aus Blättern von vier bis sieben Wochen alten *Arabidopsis*-Pflanzen isoliert.

Aus der Datenbank ‚nr‘ (s.o.) ergaben sich Sequenzen von Serincarboxypeptidasen, die aus den Organismen Einzeller, Hefe, Pilz, Pflanze, Wurm, Insekt, Säugetier und Mensch isoliert worden waren. Darunter befanden sich alle bislang bekannten Vertreter dieser Enzymfamilie (Rawlings und Barrett 1994) und 45 Gene mit signifikanter Ähnlichkeit zu diesen Proteinen, die größtenteils in den zur Zeit laufenden Genomprojekten identifiziert wurden. Alleine 31 von diesen Gene stammten aus *Arabidopsis*. Unter den Treffern waren weiterhin eine Hydroxynitril-Lyase (EC 4.1.2) aus *Shorgum bicolor* (Mohrenhirse; GenBank Nr. P52708) und das Gen eines solchen Enzyms aus *Arabidopsis* (GenBank Nr. CAB10289), weiterhin drei cDNAs von Glucose-Acyltransferasen (EC 2.3.1) aus *Solanum berthaultii* (GenBank Nrn. AF006078, AF006079 u. AF006080) und ein analoges Gen aus *Arabidopsis* (GenBank Nr. AAF04179). Die Einträge wurden offenbar durch ihre Ähnlichkeit zu Serincarboxypeptidasen aus der Datenbank aufgerufen. Eine Analyse mit dem Clustal-Algorithmus (s.o.) zeigte, dass zwischen den drei cDNAs und dem *SNG1*-Protein eine Identität von ca. 42 % besteht, zu der potenziellen Acyltransferase aus *Arabidopsis* eine von 66,4 %. Höhere Werte ergaben sich nur für die Gene aus der Gruppe, zu der das *SNG1*-Gen gehört, und für die Gene der anderen Gruppe, die bislang noch im *Arabidopsis*-Genom gefunden wurde (s. Abschn. 4.3.6).

Die in der GenBank-Analyse (s.o.) erhaltenen Sequenzen pflanzlicher Enzyme stammten ansonsten zu einem großen Teil aus den Arten *Hordeum vulgare* (Gerste), *Triticum aestivum* (Weizen) und *Oryza sativa* (Reis). Diese Pflanzen wurden bisher auch am genauesten hinsichtlich dieser Peptidasen untersucht (Lehfeldt *et al.* 2000, darin zitierte Literatur). Bleiben die im vorangehenden Abschnitt erwähnten Gene aus *Solanum berthaultii* und *Arabidopsis* unberücksichtigt, bestand für das *SNG1*-Protein die größte Ähnlichkeit zur Serincarboxypeptidase I aus *H. vulgare* (GenBank Nr. P07520, nicht prozessierte Form), die zum Carboxypeptidase Typ C gehört. Mit dem Clustal-Algorithmus (s.o.) errechnete sich eine Identität von 35,7 % zwischen den Sequenzen der beiden Proteine, in der BLASTP-Analyse von GenBank (s.o.) ergab sich darüber hinaus ein Erwartungswert (E) von  $8 e^{-91}$ .

Bislang wurden für zwei Enzyme aus dieser Familie, die Carboxypeptidase II (CPD-W II) aus *Triticum aestivum* (EC 3.4.16.6; SWISS-PROT Nr. P08819) und die Carboxypeptidase Y (CPD-Y) aus *Saccharomyces cerevisiae* (Hefe; EC 3.4.16.5; SWISS-PROT Nr. P00729) die katalytisch aktiven Aminosäuren bestimmt (Remington 1993, 1998; Breddam und Remington 1994; Breddam *et al.* 1998; Lehfeldt *et al.* 2000, darin zitierte Literatur). In einem Vergleich des *SNG1*-Proteins mit den Sequenzen dieser Enzyme mit Hilfe des CLUSTALW-Algorithmus (Thompson *et al.* 1994) zeigte sich, dass im *SNG1*-Proteins an äquivalenten Positionen die identischen, damit potentiell katalytisch aktive Reste vorhanden sind (s. Abb. 15). Es handelt sich hierbei um die Aminosäuren Serin (Position 173), Asparaginsäure (Position 358) und

SNG1	MSLKIKFLLLLLVLYHHVDSASIVKFLPGFEG--PLPFELETGYIGIGEDENVQFFYYFIK	58
CPD-Y	-----KIKDKPKILG-IDPNVTQYTGYLDDVED-EDKHFFFWTFE	36
CPD-W2	-----VEPSGHAADRIARLPQPAVDFDMYSGYITVDEGAGRSFLYLLQE	45
	. : * . : ** : : . : * : :	
SNG1	SENNPKEDPLLIWLNGGPGCSCLG-GIIFENGVPGLKFEVFNGSAPSLFSTTYSWTKMAN	117
CPD-Y	SRNDPAKDPVILWLNGGPGCSSLT-GLFFALGPSSIIGP-----DLKPIGNPYSWNSNAT	89
CPD-W2	APEDAQPAPLVLWLNGGPGCSSVAYGASEELGAFRVKPR----GAGLVLNNEYRWNKVAN	100
	: : . . * : : * * * * * * * : * * . : . . * * . . *	
SNG1	IIFLDQPVGSGFYSYKTPID--KTGDISEVKRTHEFLQKWLRSRHPQYFSN--PLYVVGDS	173
CPD-Y	VIFLDQPVNVGFSYSGSSG--VSNTVAAGKDVYNFLELFFDQFPEYVKNKGQDFHIAGAS	146
CPD-W2	VLFLDSPAGVGFYSYNTSSDIYTSGDNRHTAHSYAF LAKWFERFPHYKYR--DFYIAGES	158
	: * * * * . . * * * : : . : : : * : : : * * . . : : : * *	
SNG1	YSGMIVPALVQEISQGNVICPEPPINLQGYMLGNPVTYMDFEQNFRIPYAYGMG---LIS	230
CPD-Y	YAGHYIPVFASEILSHK---DRNFNLTSVLIIGNGLTDPLTQYNYEPMACGEGGEPVSL	202
CPD-W2	YAGHYVPELSQLVHRSK---NPVINLKGFMVGNGLIDDYHDYVGTTFEFWWNHG---IVS	211
	* : * : * : : : : : : * * . : * * : : : : . * : :	
SNG1	DEIYEPMKRICNGNYNVDPSTNTQCLKLT E EYHKCTAKINIHHLTPDCDVTNVTSPDCY	290
CPD-Y	PSEECSAMEDSLERCLGLIES--CYDSQSVWSCVPATIIYCENNAQLAPYQRTGRNVY-DIR	259
CPD-W2	DDTYRRLKEACLHDSFIHPSP--ACDAATDVATAEQGNIDMYSLYTPVCNITSSSTG-SYD	268
	. . . . . : : : * : . . : * . * : .	
SNG1	YYPYHLIECWANDES VREALHIE-----KSGK GKWARCNRTIPYNHDI VSSIPYHMNN-	343
CPD-Y	KDCEGGNLCYPTLQDIDDYLNQDYVKEAVGAEVDHYESCNF DINRNFLFAGDWMKPYHTA	319
CPD-W2	PCTERYSTAYYNR RDVQMALHAN---VTGAMNYTWATCSDTINTHWH DAPRSM LPIYR-	323
	: . . . : * : : . : * . * : .	
SNG1	----SISGYRSLIYSGDHDIAVPFLATQAWIRSLNYSPIHNWRP WMIN-----NQIAG	392
CPD-Y	VTDLLNQDLPILVYAGDKDFICNWLGNKAWTDVLPWKYDEEFASQKVRNWTASITDEVAG	379
CPD-W2	--ELIAAGLR IWVFSGDTDAVVPLTATRYSIGALGLPTTTSWYPWYDD-----QEVGG	374
	. : : * * * . . : * . : : . : : * :	
SNG1	YTRAYSNKMTFATIKGGGHTAEYR-PNETFIMFQRWISGQPL-----	433
CPD-Y	EVKSYK-HFTYLRVFNNGGHMVPFDV PENALSMVNEWIHGGFSL-----	421
CPD-W2	WSQVYK-GLTLVSVRGAGHEVPLHRPRQALVLFQYFLQGKPM PGQTKNAT	423
	: * . : * : . * * . * : : : : : : *	

**Abb. 15.** Vergleich der Aminosäuresequenzen des SNG1-Proteins, der Carboxypeptidase Y von *Saccharomyces cerevisiae* (CPD-Y; prozessierte Form) und der Carboxypeptidase II aus *Triticum aestivum* (CPD-W2) durch den CLUSTALW-Algorithmus. – Rotes Dreieck: Aminosäuren der katalytischen Triade, schwarzes Dreieck: potenzielle Spaltstelle der Signalpeptidase des Endoplasmatischen Retikulums im SNG1-Protein, blau markierte Sequenz: bekanntes N-terminales Peptid der SMT aus *Brassica rapa*, Pluszeichen: konservierte Glycinreste in Serincarboxypeptidasen, weißes Dreieck: potenzielle N-Glykosylierungsstellen, schwarzes Sternchen: identische Aminosäuren, Doppelpunkt: sehr ähnliche Aminosäuren (*strongly similar*), Punkte: geringfügig ähnliche Aminosäuren (*weakly similar*).

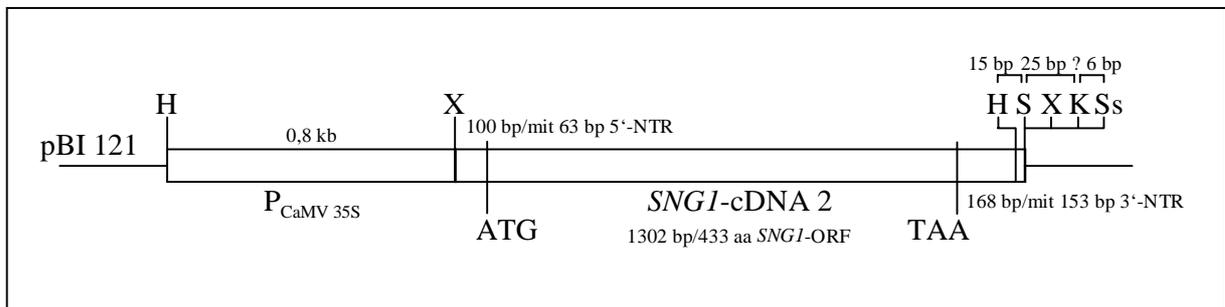
Histidin (Position 411; s. Abb. 15 u. Abschn. 8.3). In der Nähe des katalytisch aktiven Serins und der Asparaginsäure befinden sich außerdem bestimmte Glycinreste (s. Abb. 15), deren Vorkommen an diesen Positionen für die Familie der Serincarboxypeptidasen typisch ist (Rawlings und Barrett 1994). Dabei beträgt nach der Analyse mit dem Clustal-Algorithmus (s.o.) die Identität zwischen den Sequenzen des SNG1-Protein und der Carboxypeptidase Y 18,1 %, die mit der Serincarboxypeptidase II hat einen Wert von 22,7 %.

Die Aminosäuresequenz des SNG1-Proteins wurde darüber hinaus auf das Vorkommen von Erkennungssequenzen hin untersucht. Mit dem Programm SignalP, das auf der Methode

von Nielsen *et al.* (1997) beruht, wurde ein N-terminales Signalpeptid für das Endoplasmatische Retikulum gefunden. Die Spaltstelle für die Signalpeptidase befindet sich danach zwischen den Positionen 19 und 20 der Sequenz, d.h. unmittelbar vor dem bekannten N-terminalen Peptid der SMT aus *Brassica rapa* (s. Abb. 15 u. Abschn. 8.3). Mit Hilfe des Programms Scanprosite (Hofmann *et al.* 1999) wurden unter Verwendung der Datenbank Prosite weiterhin fünf potenzielle N-Glykosylierungsstellen gefunden (s. Abb.15 u. Abschn. 8.3, Asparagin an den Positionen 99, 283, 324, 342 und 418). Ein Signalpeptid für den Transport in die Vakuole wurde in einer Analyse mit dem Programm PSORT (Nakai und Kanehisa 1992) allerdings nicht identifiziert, obwohl es sich demzufolge wahrscheinlich dennoch um ein Protein handelt, das in der Vakuole lokalisiert ist. Ein Vergleich mit vakuolären Signalsequenzen, die aus höheren Pflanzen bekannt sind (Vitale und Raikhel 1999), ergab unter Verwendung der Biocomputing Software (s.o.) keine signifikante Übereinstimmung. Die Sequenz der cDNA des *SNG1*-Gens und die daraus abgeleitete Sequenz des SNG1-Proteins wurden unter der Nummer AF275313 in GenBank deponiert.

#### 4.4.4 Klonierung der cDNA des *SNG1*-Gens in den Vektor pBI121

Mit Hilfe der *SNG1*-cDNA 2 wurde versucht, erneut die Mutante *sngl-1* von *Arabidopsis* zu komplementieren. Die cDNA wurde dazu in den Vektor pBI121 (Jefferson *et al.* 1987) kloniert. Die cDNA befand sich dabei unter der Kontrolle des konstitutiven und sehr effizienten 35S-Promotors des Cauliflower Mosaik Virus (CaMV). Das Fragment des  $\beta$ -Glucuronidase ( $\beta$ -GUS)-Gens war zuvor durch einen Verdau mit den Restriktionsenzymen *Xba*I und *Kpn*I aus dem Vektor entfernt worden. Es wurde ersetzt durch das 0,4 kb-Fragment eines fremden Gens, das am 3'-Ende unter anderem eine Schnittstelle des Enzyms *Sal*I in den Vektor einführt (Dr. M.M. Champbell, pers. Mitt.; s. Abb. 16). Das 0,4 kb-Fragment wurde aus dem Konstrukt, das als pBI121-126N bezeichnet worden war, durch Verdau mit den Enzymen *Xba*I und *Sal*I wieder entfernt und durch ein Fragment der *SNG1*-cDNA 2 ersetzt. Das cDNA-Fragment wurde dazu mit denselben Enzymen aus dem pBluescript-Klon 2.2 freigesetzt (s. Abb. 14). Die Frag-



**Abb. 16.** Karte des Konstrukt pBI-*SNG1* mit der *SNG1*-cDNA 2 im Vektor pBI121 zur Komplementation der Mutante *sngl-1* von *Arabidopsis*. – P<sub>CaMV 35S</sub>: Cauliflower Mosaik Virus (CaMV) 35S-Promotor; Schnittstellen der Restriktionsenzyme, H: *Hind*III, X: *Xba*I, S: *Sal*I, X: *Xho*I, K: *Kpn*I und Ss: *Sst*I; Abschnitt S bis K: aus Konstrukt pBI121-125N, vermutlich 25 bp-Fragment aus einem Polylinker wie z.B. im Vektor pBluescript II KS(-).

mente des Vektors und der cDNA wurden nach Elektrophorese aus dem Agarosegel extrahiert und durch T4 DNA-Ligase miteinander verknüpft, die Produkte der Ligation durch Hitzeschock in den Stamm DH5 $\alpha$  von *E. coli* transformiert. Aus einer Reihe von Kolonien wurde danach in Minipräparationen Plasmid-DNA isoliert und mit den zur Klonierung verwendeten Enzymen verdaut. Die Identifikation von Klonen, die das Fragment der *SNG1*-cDNA 2 im Vektor pBI121 enthielten, erfolgte anschließend in der Agarosegel-Elektrophorese. Das so hergestellte Konstrukt wurde als pBI-*SNG1* bezeichnet (s. Abb. 16).

#### 4.4.5 Komplementation der Mutante *sng1-1* mit der cDNA des *SNG1*-Gens

Plasmid-DNA eines Klons des Konstrukts pBI-*SNG1* wurde zur Vakuuminfiltration mittels Elektroporation in *A. tumefaciens* transformiert. Aus drei Kolonien des transformierten Bakteriums wurde in einer Minipräparation Plasmid-DNA isoliert, die verdaut wurde mit den zur Klonierung verwendeten Restriktionsenzymen *XbaI* und *SalI*. Einzelne Fragmente waren in der Agarosegel-Elektrophorese nicht zu erkennen. Die DNA wurde daher auf eine Membran transferiert und mit der *SNG1*-cDNA 2 als Sonde hybridisiert. Das Fragment der cDNA wurde aus dem pBluescript-Klon 2.2 präpariert wie bereits beschrieben für die Herstellung des Konstrukts pBI-*SNG1* und radioaktiv markiert. Mit der Sonde wurde in der aus dem Bakterium isolierten DNA das aus dem Konstrukt freigesetzte Fragment der cDNA identifiziert. Fünfzehn Töpfe mit Pflanzen der Mutante *sng1-1* von *Arabidopsis* wurden anschließend mit *A. tumefaciens* infiziert. Pro Topf infizierter Pflanzen wurden in der Folge 2500 Samen auf Selektionsagar ausgesät. Dabei wurde insgesamt 192 Keimlinge mit Resistenz gegen Kanamycin erhalten. Die Resistenz wird durch das *NPT II*-Gen vermittelt, das vorhanden ist in der T-DNA des Vektors pBI121. Aus zwei resistenten Keimlingen pro Topf wurden methanolische Blattextrakte hergestellt und mittels DC analysiert. Alle analysierten Keimlinge akkumulierten wie die Mutante *sng1-1* von *Arabidopsis* 1-*O*-Sinapoyl- $\beta$ -D-glucose und nicht 1-*O*-Sinapoyl-L-malat wie der Wildtyp.

Von einer Pflanze, die aus einem der analysierten Keimlinge pro Topf hervorging, wurde im Alter von drei Wochen aus Blättern eine Minipräparation genomischer DNA angefertigt. Ein Aliquot davon wurde mit dem Enzym *HindIII* verdaut, nach Agarosegel-Elektrophorese auf eine Membran transferiert und mit der *SNG1*-cDNA 2 als Sonde hybridisiert. Die Sonde wurde wie zuvor beschrieben präpariert (s.o.). Die Sonde hybridisierte mit einem Fragment, das eine Größe von 2,4 kb besaß. Das entspricht der Größe des Fragments, das mit dem Enzym *HindIII* aus dem Konstrukt pBI-*SNG1* freigesetzt wird (s. Abb. 16). In den Negativkontrollen, d.h. mit genomischer DNA des Wildtyps oder der Mutante *sng1-1*, wurde dagegen kein Signal erzeugt. Ein Aliquot der Präparationen wurde zudem in eine PCR mit den Primern P13 und P14 eingesetzt. Die Agarosegel-Elektrophorese zeigte, dass aus der DNA transformierter Pflanzen das erwartete cDNA-Fragment amplifiziert werden konnte, nicht aber aus den erwähnten Kontrollen. Aus Blättern transformierter Pflanzen wurden darüber hinaus Proteinextrakte hergestellt. Aliquots dieser Extrakte wurden in SMT-Enzymtests eingesetzt, die danach

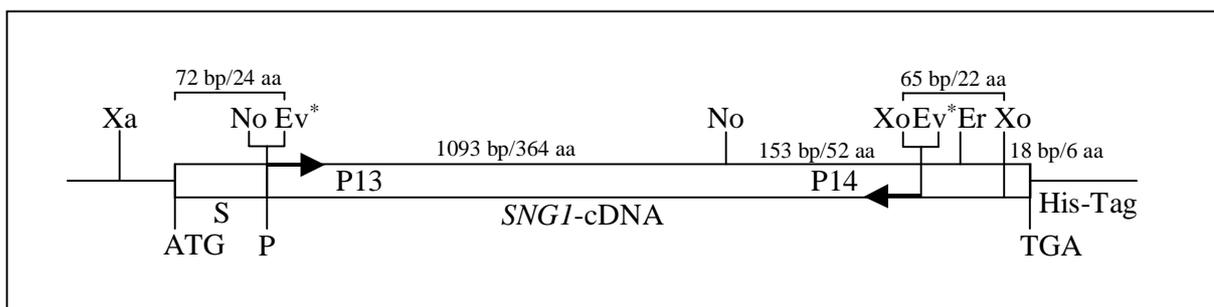
mittels DC analysiert wurden. In keinem Fall wurde die Akkumulation von 2-O-Sinapoyl-L-malrat oder eine SMT-Aktivität beobachtet. Aus den Samen von drei transformierten Pflanzen wurden weiterhin Keimlinge in acht Tagen auf Agar angezogen. Aus diesen wurde RNA isoliert, auf eine Membran übertragen und mit dem Fragment der *SNG1*-cDNA 2 als Sonde hybridisiert. Die Sonde wurde wie zuvor beschrieben präpariert (s.o.). Die Northern-Analyse zeigte, dass in den Blättern von transformierten Pflanzen wie auch in der Mutante *sng1-1* kein *SNG1*-Transkript akkumuliert. Im Wildtyp von *Arabidopsis* war dagegen dieses Transkript, das eine Größe von 1,5 kb besaß, vorhanden.

## 4.5 Versuche zur Expression des SNG1-Proteins in *E. coli*

### 4.5.1 Klonierung des *SNG1*-Gens in den Vektor pET-20b(+)

Zum Nachweis von SMT-Aktivität wurde versucht, das SNG1-Protein im Vektor pET-20b(+) (Studier *et al.* 1992) in *E. coli* zu exprimieren. Ein Fragment der *SNG1*-cDNA 2 wurde dazu mittels PCR aus dem pBluescript-Klon 2.2 (s. Abb. 14) amplifiziert, wozu die Primer P13 und P14 sowie die *Pfu* DNA-Polymerase verwendet wurden. Das PCR-Fragment wurde nach der Elektrophorese aus dem Agarosegel extrahiert, mit T4 Polynukleotidkinase phosphoryliert, durch Extraktion mit Phenol-Chloroform gereinigt und durch Fällung mit Ethanol konzentriert. Das erzeugte 1,3 kb-Fragment der *SNG1*-cDNA 2 enthält durch den Primer P13 die kodierende Sequenz des *SNG1*-Gens ab dem bekannten N-terminalen Peptid der SMT aus *Brassica rapa*. Das originäre Stoppcodon wurde durch den Primer P14 entfernt und ersetzt durch eine Schnittstelle des Restriktionsenzym *XhoI*. Das Leseraster wird dadurch bis zum Stoppcodon im Polylinker des Vektors verlängert (s. Abb. 17).

Der Vektor wurde zur Klonierung mit dem Enzym *EcoRV* verdaut, die damit erzeugten 5'-Enden mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Das Vektorfragment wurde nach der Elektrophorese aus dem Agarosegel extrahiert und durch T4 DNA-Ligase mit dem cDNA-Fragment verknüpft. Die Produkte der Ligation wurden mittels Hitzeschock in den Stamm DH5 $\alpha$  von *E. coli* transformiert. Aus einer Reihe von Kolonien wurde in Minipräparationen Plasmid-DNA isoliert. Klone des Vektors, die das cDNA-Fragment enthielten, wurden nach



**Abb. 17.** Karte des Konstrukt pET-SNG1-1 zur Expression der *SNG1*-cDNA im Vektor pET-20b(+) in *E. coli*. – P: Schnittstelle der Signalpeptidase des Periplasmas, S: Signalsequenz des *pelB*-Genprodukts für das Periplasma; Schnittstellen der Restriktionsenzyme, Ev: *EcoRV*, Er: *EcoRI*, No: *NcoI*, Xa: *XbaI* und Xo: *XhoI*; aa: Aminosäuren.

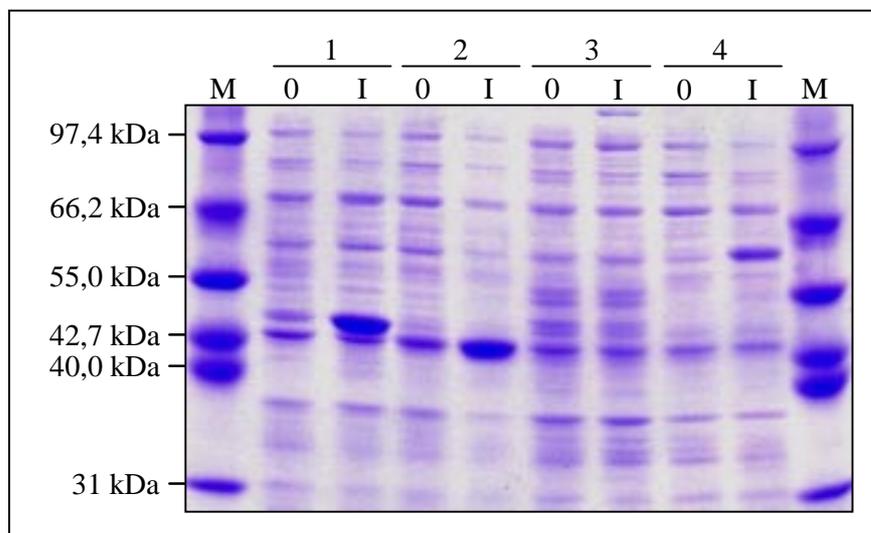
Verdau mit den Enzymen *Xba*I und *Eco*RI in der Agarosegel-Elektrophorese identifiziert (s. Abb. 17). Die Orientierung des cDNA-Fragments wurde analog durch Verdau mit dem Enzym *Nco*I überprüft. Das erzeugte Konstrukt wurde als pET-SNG1-1 bezeichnet. Aus drei Klonen des Konstrukts wurde darüber hinaus durch Verdau mit dem Enzym *Xho*I ein Fragment des Polylinkers mit einer Größe von 60 bp entsprechend 20 Aminosäuren C-terminal aus der kodierenden Sequenz entfernt (s. Abb. 17). Das Vektorfragment wurde nach Elektrophorese aus dem Agarosegel extrahiert, in einer Ligrationsreaktion rezirkularisiert und in *E. coli* kloniert wie für das Konstrukt pET-SNG1-1 beschrieben. Dieses neue Konstrukt wurde als pET-SNG1-2 bezeichnet.

Die *SNG1*-cDNA befindet sich im Vektor pET-20b(+) unter transkriptioneller Kontrolle des effizienten T7-Promotors. Das vom Konstrukt pET-SNG1-1 exprimierte Protein umfasst 468 Aminosäuren mit einer molaren Masse von 52,7 kDa. Das Konstrukt pET-SNG1-2 besteht aus 446 Aminosäuren, woraus sich eine molare Masse von 50,7 kDa ergibt. Die von beiden Konstrukten exprimierten Proteine enthalten in einer N-terminalen Sequenz von 24 Aminosäuren das Signalpeptid des *pelB*-Genprodukts von *E. coli* für den Eintransport in das Periplasma (s. Abb. 17). Am C-Terminus befindet sich eine Sequenz von sechs Histidinresten, die zur Aufreinigung verwendet werden kann (*His-Tag*). Die C-terminale Sequenz besteht im Konstrukt pET-SNG1 aus 28, im Konstrukt pET-SNG2 (einschließlich der Schnittstelle des Enzyms *Xho*I) aus acht Aminosäuren. Insgesamt 52 Aminosäuren im Konstrukt pET-SNG1-1 und 32 im Konstrukt pET-SNG1-2 gehören nicht zur Sequenz des SNG1-Proteins, die aus 416 Resten besteht. Das Signalpeptid mit einer Größe von 22 Aminosäuren und einer molaren Masse von 2,2 kDa wird normalerweise nach dem Transport des Proteins in das Periplasma durch eine Peptidase abgespalten.

#### 4.5.2 Expression des SNG1-Proteins im Vektor pET-20b(+)

Plasmid-DNA der genannten drei Klone der Konstrukte pET-SNG1-1 und -2 wurden mittels Elektroporation in den Stamm BL21( $\lambda$ DE3) von *E. coli* transformiert. Anschließend wurden zwei Versuche zur Expression des SNG1-Proteins und zum Nachweis von SMT-Aktivität durchgeführt. Für zwei der Klone beider Konstrukte wurde mittels SDS-PAGE die Induktion einer Proteinbande beobachtet (s. Abb. 18). Als Negativkontrolle wurde der pET-20b(+)-Vektor verwendet, als Positivkontrolle ein im pET-System erwiesenermaßen induzierbares Konstrukt. Die Induktion erfolgte sowohl bei 37 °C als auch bei Raumtemperatur (20 °C). Über einen Zeitraum von drei Stunden hinaus wurde in bis zu 48 Stunden keine weitere Steigerung der Akkumulation des induzierten Proteins beobachtet. Die molaren Massen induzierter Proteine stimmten ungefähr mit den berechneten überein.

Zum Nachweis von SMT-Aktivität wurde von den Zellen einer induzierten Kultur zunächst eine Fraktion des Periplasmas angefertigt und ein Teil davon durch Ultrafiltration weiter angereichert. Aliquots dieser Extrakte wurden in SMT-Enzymtests eingesetzt. Die Zellen wurden danach durch Ultraschall vollständig aufgeschlossen, Teile davon wie beschrieben angereichert

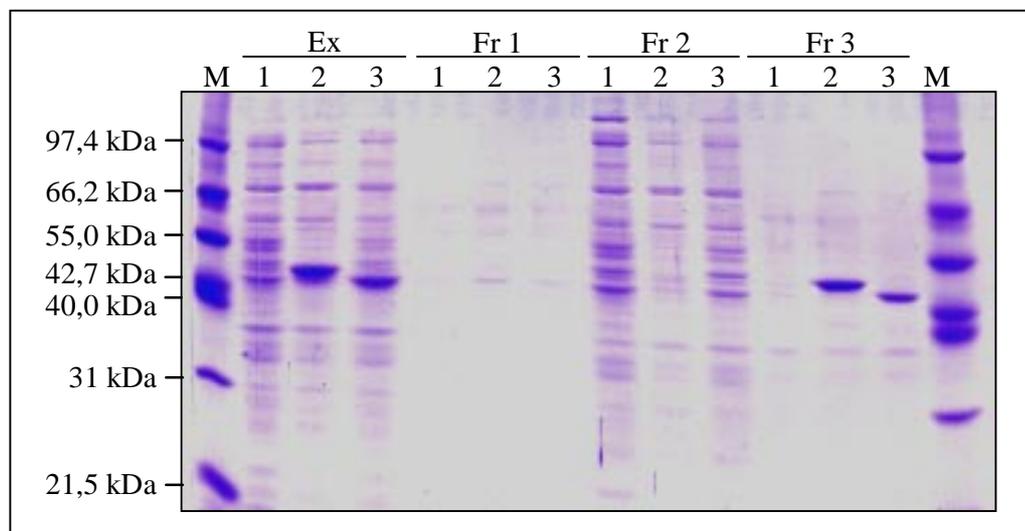


**Abb. 18.** SDS-PAGE eines Experiments zur Expression des SNG1-Proteins in *E. coli* im Vektor pET-20b(+). – 1: Klon 1 des Konstrukts pET-SNG1-1, 2: Klon 1 des Konstrukts pET-SNG1-2, 3: Negativkontrolle, Vektor pET-20b(+), 4: Positivkontrolle, induzierbares Konstrukt in einem pET-Vektor, M: Standard für molare Masse, 0 und I: Proben ohne und mit Induktion.

und Aliquots der Extrakte in Tests eingesetzt. Alle Tests wurden mittels DC und HPLC analysiert. Eine Kultur mit einem Volumen von 20 ml ergab Zellen mit einem Frischgewicht von ca. 100 mg. Aus diesen konnten ca. 10 mg Protein extrahiert werden. Vorversuche hatten gezeigt, dass es sich um die mit der Methode maximal zu extrahierende Menge handelt. Aliquots der Extrakte mit 50 µg Protein wurden direkt in die Tests eingesetzt. Durch Ultrafiltration wurden die Extrakte 10fach weiter angereichert. Von den konzentrierten Extrakten wurden Aliquots mit 250 µg Protein in die Tests eingesetzt. In beiden Versuchen zur Expression wurde in den Tests keine Bildung von 2-*O*-Sinapoyl-L-malat oder eine SMT-Aktivität beobachtet. Zur Kontrolle wurde zusätzlich das Medium induzierter Kulturen analysiert. Auch in diesem Fall konnte mit und ohne Anreicherung in den Tests keine Aktivität nachgewiesen werden.

In einer Reihe von Expressionsversuchen zeigte sich, dass die Induktion der Proteinbande nicht selten ausbleibt. Dabei war diese Bande beim Konstrukt pET-SNG1-2 und bei Raumtemperatur schwieriger zu induzieren. Am sichersten gelang die Induktion unmittelbar nach der Transformation in den Expressionsstamm. Auch in einer Kultur ohne die sichtbare Induktion einer Bande konnte für keinen der Klone beider Konstrukte eine SMT-Aktivität festgestellt werden. Weiterhin wurden von Kulturen mit Induktion der Bande Aliquots auf Agar mit und ohne Selektion durch Ampicillin ausplattiert. Auf dem Selektionsagar wurde im Vergleich zur Kontrolle eine um ca. 50 % reduzierte Anzahl von Kolonien erhalten. Von drei Kolonien eines jeden Klons der beiden Konstrukte wurde in Minipräparationen Plasmid-DNA isoliert, die mit den Restriktionsenzymen *Xba*I und *Eco*RI verdaut wurde. Wie die Agarosegel-Elektrophorese ergab, wurde das erwartete cDNA-Fragment freigesetzt (s. Abb. 17).

In zwei Experimenten wurde für jeweils einen Klon der beiden Konstrukte die subzelluläre Lokalisation des exprimierten Proteins untersucht (s. Abb. 19). Zunächst wurde dazu aus den

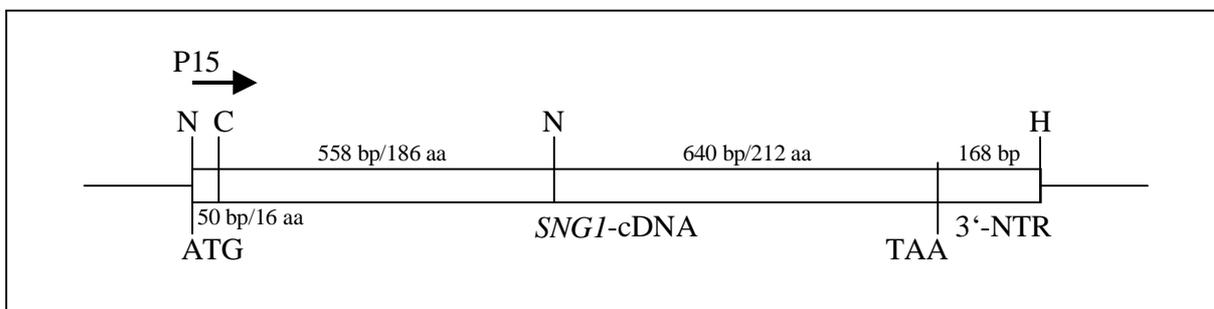


**Abb. 19.** SDS-PAGE eines Experiments zur Analyse der subzellulären Lokalisation des SNG1-Proteins nach Expression in *E. coli* im Vektor pET-20b(+). – 1: Negativkontrolle, Vektor pET-20b(+); 2: Klon 1 von Konstrukt pET-SNG1-1, 3: Klon 1 von Konstrukt pET-SNG1-2; Fraktionen, Z: Zellen, Fr1: periplasmatische Proteine, Fr2: lösliche Proteine, Fr3: unlösliche Proteine; M: Standard für molare Masse.

Zellen der induzierten Kulturen eine Fraktion des Periplasmas hergestellt. Der vollständige Aufschluss der Zellen erfolgte danach in einer FRENCH-Druckzelle. Aliquots der gesamten Zellen, der löslichen, der unlöslichen und der periplasmatischen Fraktion wurden mit Hilfe der SDS-PAGE analysiert. Der allergrößte Teil des exprimierten Proteins der beiden Konstrukte akkumulierte in einem Experiment bei 37 °C und einem weiteren bei Raumtemperatur (20 °C) in der Fraktion unlöslicher Bestandteile, eine sehr geringe Menge wurde möglicherweise in das Periplasma transportiert (s. Abb. 19).

#### 4.5.3 Klonierung des *SNG1*-Gens in den Vektor pCW Ori+

Um SMT-Aktivität nachzuweisen, wurde die Expression des SNG1-Proteins in *E. coli* mit einem anderen System erneut versucht. In diesem Fall wurde der Vektor pCW Ori+ (Barnes 1996) verwendet. Die Klonierung eines Fragments der *SNG1*-cDNA 2 in den Vektor erfolgte in 2 Schritten. In einem ersten Schritt wurde mittels PCR ein 1,5 kb-Fragment der cDNA mit den Primern P15 und T3 amplifiziert. Als Matrize diente der pBluescript-Klon 2.2 der cDNA (s. Abb. 14). Die Amplifikation erfolgte mit dem Expand High Fidelity PCR Kit, da mit der *Pfu* DNA-Polymerase kein Produkt erhalten wurde. Die Polymerasen dieses Systems weisen im Vergleich zur *Taq* DNA-Polymerase wie die *Pfu* DNA-Polymerase eine geringere Fehlerrate auf. Das amplifizierte Fragment enthält durch den Primer P15 den kodierenden Bereich des *SNG1*-Gens ab dem bekannten N-terminalen Peptid der SMT aus *Brassica rapa*. Durch diesen Primer wurde am 5'-Ende der cDNA außerdem eine Schnittstelle des Restriktionsenzym *NdeI* eingeführt. Die PCR wurde zur Klonierung mit Phenol-Chloroform extrahiert, das amplifizierte Fragment durch Fällung mit Ethanol konzentriert und danach mit dem Enzym *NdeI* verdaut. Da sich in der cDNA eine weitere Schnittstelle des Enzyms *NdeI* befindet (s. Abb. 14 u. 20),



**Abb. 20.** Karte des Konstrukts pCW-SNG1 mit der *SNG1*-cDNA 2 im Vektor pCW Ori+ zur Expression in *E. coli*. – NTR: nicht translatierte Sequenz; Schnittstellen der Restriktionsenzyme, C: *Csp45I*, H: *HindIII* und N: *NdeI*; aa: Aminosäuren.

werden dadurch ein 0,6 kb-Fragment des 5'-Endes und ein 0,9 kb-Fragment des 3'-Endes der cDNA erzeugt. Eine Kontrolle mittels Agarosegel-Elektrophorese zeigte die Unvollständigkeit des Verdau. Die Fragmente wurden wie beschrieben gereinigt und konzentriert.

Der Vektor wurde zur Klonierung ebenfalls mit dem Enzym *NdeI* verdaut, die erzeugten 5'-Enden mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Das Fragment des Vektors wurde nach Elektrophorese aus dem Agarosegel extrahiert und in die Ligation mit den Fragmenten der cDNA eingesetzt. Dabei sollte nur das 0,6 kb-Fragment, das an beiden Enden eine *NdeI*-Schnittstelle aufweist, mit dem Vektor durch die T4 DNA-Ligase verknüpft werden können. Die Ligationsprodukte wurden durch Hitzeschock in den Stamm DH5 $\alpha$  von *E. coli* transformiert. Aus einer Reihe von Kolonien wurde danach in Minipräparationen Plasmid-DNA isoliert. Klone des Vektors pCW Ori+, die das 0,6 kb-Fragment der cDNA enthielten, wurden nach Verdau mit dem Enzym *NdeI* in der Agarosegel-Elektrophorese identifiziert. Die Orientierung des cDNA-Fragments wurde durch Verdau mit den Enzymen *Csp45I* und *HindIII* überprüft. In richtiger Orientierung wird dabei ein 1,1 kb-Fragment freigesetzt, dass aus dem größten Teil des 0,6 kb-Fragments (s. Abb. 14 u. 20) und dem 0,5 kb-Fragment des Stuffers von pCW Ori+ besteht.

Für den zweiten Schritt der Klonierung wurden drei Klone ausgewählt. Plasmid-DNA dieser Klone wurde mit den Enzymen *Csp45I* und *HindIII* verdaut, in gleicher Weise Plasmid-DNA des erwähnten pBluescript-Klones 2.2 der cDNA. Die Vektorfragmente der drei Klone und das aus dem Klon 2.2 freigesetzte 1,4 kb-Fragment der cDNA wurden nach Elektrophorese aus dem Agarosegel extrahiert und durch T4 DNA-Ligase miteinander verknüpft. Die Produkte der Ligation wurden wie zuvor beschrieben in *E. coli* kloniert. Durch Verdau mit den zur Klonierung verwendeten Enzymen wurden Klone identifiziert, die das 1,4 kb-Fragment der cDNA enthielten. Damit wurden drei Klone eines Konstrukts, das als pCW+SNG1 bezeichnet wurde, hergestellt (s. Abb. 20). Durch den zweiten Schritt der Klonierung wird der überwiegende Teil des mittels PCR erzeugten 0,6 kb-Fragments durch ein Fragment der cDNA ersetzt, das aus Plasmid-DNA isoliert wurde. Der verbleibende Abschnitt weist eine Größe von 50 bp auf. Das Konstrukt enthält weiterhin einen nicht translatierten Bereich vom 3'-Ende der cDNA

mit einer Größe von 153 bp. Das Fragment der *SNG1*-cDNA 2 befindet sich in dem Konstrukt unter der transkriptionellen Kontrolle einer Kombination von Promotoren (*lacUV5* und *tac*), deren Effizienz insgesamt deutlich geringer ist als die des T7-Promotors im pET-Konstrukt (s. Abschn. 4.5.1). Das in *E. coli* exprimierte Protein besteht aus 414 Aminosäuren, woraus eine molare Masse von 47,2 kDa resultiert. Es enthält keinerlei Sequenzen, die durch den Vektor kodiert werden, wie z.B. einen His-Tag.

#### 4.5.4 Expression des SNG1-Proteins im Vektor pCW Ori+

Plasmid-DNA der genannten drei Klone des Konstrukts pCW-SNG1 wurde zur Expression durch Hitzeschock in den Stamm DH5 $\alpha$  von *E. coli* transformiert. Danach wurden zwei Versuche zur Induktion der Expression des SNG1-Proteins und zum Nachweis von SMT-Aktivität durchgeführt. In beiden Fällen wurde für keinen der Klone mittels SDS-PAGE die Induktion einer Proteinbande beobachtet. Als Negativkontrolle wurde der Vektor pCW Ori+ mitgeführt. Die Induktion erfolgte bei 37 °C, in dem einen Experiment über einen Zeitraum von drei, in dem anderen über 15 Stunden. Die Zellen der induzierten Kulturen wurden mittels Ultraschall aufgeschlossen, Teile der Proteinextrakte durch Ultrafiltration weiter angereichert. Aliquots dieser Extrakte wurden in SMT-Enzymtests eingesetzt. Es wurden die gleichen Proteinmengen in die Tests eingesetzt wie für die Konstrukte im Vektor pET-20b(+) (s. Abschn. 4.5.2). Die Enzymtests wurden mittels DC und HPLC analysiert. Für keinen der Klone des Konstrukts pCW-SNG1 wurde in beiden Versuchen zur Expression die Bildung von 2-*O*-Sinapoyl-L-malat oder eine SMT-Aktivität beobachtet.

Aliquots der induzierten Kulturen wurden außerdem auf Agar mit und ohne Selektion durch Ampicillin ausplattiert. In beiden Fällen wurde die gleiche Anzahl von Kolonien erhalten. Für jeden Klon wurde anschließend aus drei Kolonien in Minipräparationen Plasmid-DNA isoliert, die mit den Restriktionsenzymen *Csp45I* und *HindIII* verdaut wurde. Die Agarosegel-Elektrophorese zeigte, dass das erwartete Fragment der cDNA freigesetzt worden war (s. Abb. 20). In zwei weiteren Experimenten wurde außerdem untersucht, ob in dem Proteinextrakt aus *E. coli* Faktoren vorhanden sind, welche die SMT-Aktivität hemmen. Von einer Kultur der Stämme BL21( $\lambda$ DE3) und DH5 $\alpha$  wurde dazu ein Proteinextrakt wie beschrieben hergestellt und angereichert. Aliquots der Extrakte wurden mit einem Proteinextrakt aus Blättern von *Arabidopsis* im Verhältnis 1 : 1 gemischt und fünf Stunden im Eis inkubiert. Ein Aliquot der Mischungen wurde anschließend in einen SMT-Enzymtest eingesetzt. Als Kontrolle wurde ein Ansatz mit dem Testpuffer und ohne den Extrakt aus *E. coli* mitgeführt. Die Tests wurden nachfolgend mittels DC und HPLC analysiert. In beiden Experimenten wurde im Vergleich mit der Kontrolle keine Reduktion der Bildung von 2-*O*-Sinapoyl-L-malat oder der SMT-Aktivität festgestellt.

## 5 Diskussion

### 5.1 Die Klonierung des *SMT*-Gens

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Klonierung und Charakterisierung des *SMT*-Gens aus *Arabidopsis*. Zu Beginn dieser Arbeit war von diesem Enzym ein N-terminales Peptid bekannt, das durch Aufreinigung aus *Brassica rapa* erhalten worden war. Diese Information war jedoch nicht ausreichend, um das *SMT*-Gen aus *B. rapa* zu klonieren (s. Abschn. 1.2.1 u. 4.1). Um weitere Sequenzen zu erhalten, wäre die erneute Aufreinigung des Proteins nötig gewesen, die sich wiederholt als schwierig erwiesen hatte. Zur Klonierung des *SMT*-Gens wurde daher ein anderer Weg eingeschlagen, der durch die Isolation der *sng1*-Mutante von *Arabidopsis* ermöglicht wurde (s. Abschn. 1.2.2). Der *sng1*-Phänotyp legte die Vermutung nahe, dass durch das *SNG1*-Gen die *SMT* kodiert wird. Zudem ermöglichte er die Isolation der T-DNA-Mutante *sng1-4*, die der Ausgangspunkt war für diese Klonierung des *SMT*-Gens.

Im ersten Schritt sollte ausgehend von der T-DNA-Insertion ein Fragment genomischer DNA aus dem *SNG1*-Gen isoliert werden. Mit der Methode des Plasmid-Rescues kann dieses auf einem recht einfachen Weg in verhältnismäßig kurzer Zeit erreicht werden (Behringer und Medford 1992; Feldmann 1992; Feldmann und Dilkes 1998). In diesem Fall führte die Anwendung der Methode aber nicht zur Isolation von Plasmiden, die von einer Seite der T-DNA stammten und damit flankierende genomische DNA enthielten (s. Abschn. 4.2.1). Durch eine Southern-Analyse der T-DNA-Insertion wurde aufgedeckt, was vermutlich die Ursache für dieses Ergebnis war (s. Abschn. 4.2.2). Die von beiden Seiten der T-DNA zu isolierenden Fragmente weisen eine Größe von 25 kb auf (s. Abb. 5, Verdau Nr. 1, Restriktionsenzym *SalI*; s. Abb. 6, Verdau Nr. 1, Enzym *EcoRI*). Diese großen Fragmente konnten im Plasmid-Rescue sehr wahrscheinlich nicht mehr effizient zirkularisiert werden. Das galt allerdings nicht für das 11 kb-Fragment, das zusätzlich auf der rechten Seite der T-DNA vorhanden war. Es ist nicht klar, warum dieses Plasmid nicht isoliert werden konnte. Bei der Analyse von Insertionen dieser Art sind aber auch Prozesse wie die Rekombination und unvollständige Integration von T-DNAs zu berücksichtigen (s.u.). Diese Prozesse könnten die Funktionslosigkeit des Plasmids verursacht haben.

Das Ergebnis machte den Einsatz einer anderen Methode erforderlich, um genomische DNA aus dem *SNG1*-Gen zu isolieren. Mit Hilfe der inversen PCR waren bereits erfolgreich Gene aus T-DNA-Mutanten von *Arabidopsis* kloniert worden (Feldmann und Dilkes 1998). Es handelt sich dabei um die in den Mutanten *constitutively photomorphogenic 1* (Deng *et al.* 1992) und *forever young* (Callos *et al.* 1994) betroffenen Gene. Um aber für den Einsatz der inversen PCR geeignete Fragmente von den Seiten der T-DNA zu finden, musste zuvor eine Southern-Analyse der T-DNA-Insertion in der Mutante *sng1-4* durchgeführt werden (s. Abschn. 4.2.2). Eine solche Analyse war darüber hinaus aus anderen Gründen geboten. Um den voraussichtlichen Erfolg von weiteren Versuche zur Klonierung des *SNG1*-Gens abschätzen zu

können, war es sinnvoll, einen Einblick in die Struktur der T-DNA-Insertion zu erhalten. Es war wiederholt beobachtet worden, dass T-DNA-Insertionen von einer komplexen Natur sein können (s.u.), die eine Isolation von genomischer DNA unter Umständen erheblich erschwert. Auf das Vorliegen von derartigen Verhältnissen deutete das Ergebnis der Plasmid-Rescues hin, bei denen von beiden Seiten der T-DNA nur Plasmide mit abnormen Größen erhalten worden waren (s. Abschn. 4.2.1). Das deckte sich nicht mit den in der T-DNA vorhandenen Schnittstellen der Restriktionsenzyme, mit denen das Plasmid-Rescue durchgeführt worden war. Es war deshalb angebracht, auch etwas über die Fragmente in Erfahrung zu bringen, die mit der Methode in diesem Fall isoliert werden konnten.

Grundlage der Southern-Analyse war die Beobachtung, dass T-DNA-Insertionen zumeist aus einer wechselnden Anzahl von T-DNAs in einer variablen, konkatemeren Anordnung bestehen (Feldmann und Marks 1987; Feldmann 1992; Tinland 1996). Weiterhin mussten die bereits erwähnten Prozesse (s.o.) der Rekombination und nicht vollständigen Integration von T-DNAs berücksichtigt werden. Ausgehend von der Southern-Analyse konnten schließlich einige für die inverse PCR geeignete Fragmente ausgewählt werden (s. Abschn. 4.2.2). Ein Einblick in die Struktur der vorliegenden T-DNA-Insertion war hingegen nur sehr begrenzt möglich. Aus Anzahl und Größe der Fragmente in den Southern Blots ließ sich kein schlüssiges Modell für diese Insertion ableiten. Die Anzahl der wahrscheinlich dicht beieinander liegenden T-DNAs wurde auf zwei bis drei geschätzt. In der inversen PCR konnte mit einem der ausgewählten Enzyme ein Fragment amplifiziert werden, welches flankierende genomische DNA von der linken Seite der T-DNA enthielt (s. Abschn. 4.2.3 u. Abb. 7). Das wurde zum einen angezeigt durch die Struktur des Fragments, das an beiden Enden exakt diejenigen Abschnitte aus der linken Seite enthielt, die sich mit den eingesetzten Primern theoretisch ergeben mussten. Demonstriert wurde es zum anderen durch den RFLP, der von der genomischen DNA aus der inversen PCR zwischen dem Wildtyp und der Mutante *sng1-4* von *Arabidopsis* erkannt wurde (s. Abb. 8). Dieser RFLP wird von der T-DNA-Insertion in der Mutante hervorgerufen, die sich nach der genetischen Analyse im *SNG1*-Gen oder in dessen Umgebung befindet (s. Abschn. 1.2.2). Das klonierte Fragment hätte nur dann von einer anderen genomischen Position stammen können, wenn in der Mutante eine weitere T-DNA-Insertion vorhanden gewesen wäre, in der z.B. durch eine Rekombination das *NPT II*-Gen nicht mehr funktionsfähig ist. Das Vorkommen einer solchen T-DNA-Insertion ist zwar nicht sehr wahrscheinlich, sie hätte aber durch die genetischen Analyse nicht erkannt werden können.

Das Fragment konnte deshalb zur Analyse einer genomischen Bibliothek von *Arabidopsis* verwendet werden (s. Abschn. 4.3.1). Dabei wurden drei Cosmide isoliert, deren genomische DNA anhand eines Verdaus mit dem Restriktionsenzym *HindIII* in einem Contig mit einer Größe von 34 kb angeordnet werden konnte, der das potenzielle *SNG1*-Gen einschloss (s. Abb. 9). Ein 3,8 kb-Fragment, das in allen drei Cosmiden vorhanden war, reagierte in einer Southern-Analyse mit der Sonde genomischer DNA aus der inversen PCR. Das war ein erster Hinweis auf die mögliche Position des *SNG1*-Gens. Das Fragment und die beiden benachbarten

Fragmente wurden anschließend subkloniert (s. Abschn. 4.3.2) und partiell sequenziert (s. Abschn. 4.3.3). Die Analyse ergab, dass auf dem 3,8 kb-Fragment ein Gen mit signifikanter Ähnlichkeit zu Serincarboxypeptidasen vorhanden ist. Das 5'-Ende dieses Gens befindet sich auf dem angrenzenden 10 kb-Fragment (s. Abb. 13). Innerhalb dieses Gen wurde die Sequenz genomischer DNA aus der inversen PCR gefunden. Dadurch wurde zugleich die Position der T-DNA-Insertion in der Mutante *sng1-4* angezeigt. Das führte zu dem Schluss, dass es sich hierbei sehr wahrscheinlich um das gesuchte *SNG1*-Gen handelt.

Das Ergebnis wurde durch eine Northern-Analyse der isolierten *sng1*-Mutanten mit dem 3,8 kb- und 10 kb-Fragment bestätigt (s. Abschn. 4.3.4). Dieses Experiment beruhte auf einer Beobachtung, die unter anderem im Zuge der Klonierung und Analyse des *F5H*-Gens gemacht worden war (Meyer *et al.* 1996). Dabei war festgestellt worden, dass eine Mutagenese mit EMS in einem Teil der erzeugten *fah1*-Allele zu einer in variablem Umfang herabgesetzten Akkumulation des *F5H*-Transkripts führte. Dieser Effekt ist auch von anderen Mutanten dieser Art bekannt (Feldman *et al.* 1994). Ist ein Gen von der Insertion einer T-DNA mit einer Größe von 17 kb betroffen, führt das mit großer Sicherheit dazu, dass kein Transkript dieses Gens akkumuliert. Für das *SNG1*-Gen standen die EMS-Mutanten *sng1-1* und *sng1-2* als auch die T-DNA-Mutanten *sng1-3* und *sng1-4* zur Verfügung (s. Abschn. 1.2.2). Es war anzunehmen, dass diese Mutanten in bezug auf das *SNG1*-Transkript ebensolche Unterschiede aufweisen würden. In einer Northern-Analyse sollten diese durch eine Sonde des *SNG1*-Gens erkannt werden. Dies gelang für das 3,8 kb-Fragment (s. Abb. 11), mit einem sehr schwachen Signal auch für das 10 kb-Fragment. Das Ergebnis stützte die Hypothese, dass sich das *SNG1*-Gen größtenteils auf dem 3,8 kb-Fragment und zu einem geringeren Teil auf dem 10 kb-Fragment befindet (s.o.). Der Befund, dass in der Mutante *sng1-3* eine mit dem Wildtyp von *Arabidopsis* vergleichbare Akkumulation des *SNG1*-Transkripts erfolgt, bestätigte zudem die genetische Analyse, wonach beide T-DNAs sich in diesem Fall nicht im *SNG1*-Gen befinden (s. Abschn. 1.2.2).

Die bis zu diesem Punkt durchgeführten Experimente ermöglichten die Identifikation des potenziellen *SNG1*-Gens. Um die Klonierung des *SNG1*-Gens eindeutig zu zeigen, wurde das Cosmid 1 in die Komplementation der Mutante *sng1-1* von *Arabidopsis* eingesetzt (s. Abschn. 4.3.5). Das Cosmid bestand aus dem 3,8 kb- und 10 kb-Fragment (s.o.), und wenn die Annahme hinsichtlich des *SNG1*-Gens richtig war, musste es daher eine Komplementation bewirken. Der größte Teil der transgenen Keimlinge, die mit diesem Cosmid erzeugt worden waren, akkumulierte ausschließlich 2-*O*-Sinapoyl-L-malat, einige darüber hinaus 1-*O*-Sinapoyl- $\beta$ -D-glucose (s. Abb. 12). Für diese partielle Komplementation ist wahrscheinlich ein Positioneffekt verantwortlich. Die durch das Cosmid 1 bewirkte Komplementation zeigte eindeutig, dass sich das *SNG1*-Gen in dessen genomischer DNA befinden musste. Mit den beiden anderen Cosmiden konnte die *sng1*-Mutante nicht transformiert werden, da die darin enthaltene genomische DNA aus *Arabidopsis* sich in *Argobacterium tumefaciens* als nicht stabil in den Vektor pBIC-20 integriert erwies. Dieses Phänomen wurde bei der Konstruktion von Cosmid-Bibliotheken

wiederholt beobachtet, für die in diesem Fall verwendete *abi1*-Bibliothek bislang aber noch nicht (Meyer 1994; K. Meyer, pers. Mitt.).

Die Sequenz des 3,8 kb-Fragments, auf dem sich das potenzielle *SNG1*-Gen größtenteils befindet, wurde im Verlauf der Klonierung sehr weitgehend bestimmt (s. Abschn. 4.3.3), das 10 kb-Fragment hingegen von beiden Seiten lediglich ansequenziert. An einer Seite wurde dabei das 5'-Ende des potenziellen *SNG1*-Gens gefunden (s.o.), an der anderen das 3'-Ende eines weiteren Gens mit großer Ähnlichkeit zu Serincarboxypeptidasen. Das war ein erster Hinweis darauf, dass sich in der Umgebung des potenziellen *SNG1*-Gens noch weitere, gleichartige Gene befinden. Es konnte zudem nicht ausgeschlossen werden, dass auch innerhalb des 10 kb-Fragments ein solches Gen vorhanden war. Das bestätigte sich, als durch das *Arabidopsis*-Genomprojekt die Sequenz dieser Region auf dem Chromosom 2 verfügbar wurde (s. Abschn. 4.3.6). Aufgrund der bis zu diesem Zeitpunkt erzielten Ergebnisse war es insgesamt nicht sehr wahrscheinlich, dass sich das *SNG1*-Gen auf dem 10 kb-Fragment von Cosmid 1 befand. Dennoch war das *SNG1*-Gen unter diesen Umständen noch nicht eindeutig identifiziert. Das machte es erforderlich, die Mutante *sng1-1* von *Arabidopsis* erneut zu komplementieren, und zwar ausschließlich mit dem potenziellen *SNG1*-Gen. In einem ersten Ansatz wurde zu diesem Zweck die cDNA dieses Gens verwendet.

Zur Isolation der cDNA wurde mit dem 3,8 kb-Fragment als Sonde eine Bibliothek aus zehn bis 14 Tage alten Keimlingen von *Arabidopsis* analysiert (s. Abschn. 4.4.1). In diesen Zeitraum fällt das Maximum der SMT-Aktivität in der frühen Entwicklung dieser Pflanze (s. Abschn. 1.1). Aus der Sequenzanalyse der isolierten cDNA ergab sich für das *SNG1*-Protein ein ORF mit einem N-terminalen Methioninrest (s. Abschn. 4.4.3). Damit lag wahrscheinlich eine vollständige cDNA des potenziellen *SNG1*-Gens vor. In diesem ORF wurde weiterhin das bekannte Peptid der SMT aus *Brassica rapa* gefunden (s. Abschn. 1.2.1 u. 8.2). Durch das *Arabidopsis*-Genomprojekt stellte sich allerdings später heraus, dass eine Reihe sehr ähnlicher Gene in der Umgebung des potenziellen *SNG1*-Gens auf Chromosom 2 das gleiche oder ein sehr ähnliches Peptid kodieren (s. Abschn. 4.3.6), darunter auch das Gen auf dem 10 kb-Fragment von Cosmid 1 (s.o.). Die Vorhandensein dieses Peptids im potenziellen *SNG1*-Protein konnte daher nur ein zusätzlicher Hinweis darauf sein, dass die SMT von diesem Gen kodiert wird.

Mit der cDNA dieses Gens gelang es insgesamt nicht, die Mutante *sng1-1* von *Arabidopsis* zu komplementieren (s. Abschn. 4.4.5). Es konnte zwar nachgewiesen werden, dass transgene Pflanzen hergestellt worden waren, diese enthielten aber alle keinerlei SMT-Aktivität und akkumulierten ausschließlich 1-*O*-Sinapoyl- $\beta$ -D-glucose. Die cDNA befand sich in diesem Fall unter der Kontrolle des sehr effizienten und konstitutiven Cauliflower Mosaik Virus (CaMV)-35S-Promotors (s. Abb. 16). Die Northern-Analyse von einigen transgenen Pflanzen demonstrierte, dass in diesen kein *SNG1*-Transkript akkumuliert. Für das Ausbleiben der Komplementation ist damit wahrscheinlich eine Instabilität des *SNG1*-Transkripts verantwortlich. Eine naheliegende oder plausible Erklärung konnte für dieses Ergebnis nicht gefunden werden. Es

ergab sich daraus aber die Konsequenz, dass der eindeutige Beleg für die Klonierung des *SNG1*-Gens durch die Komplementation mit einem genomischen Klon erbracht werden musste, der nur dieses Gen umfasste (s.u.).

Der Nachweis der erfolgreichen Klonierung eines Gens ist neben der Komplementation von entsprechenden Mutanten auch über die Expression und den Nachweis von Enzymaktivität möglich. Deshalb wurde auch versucht, das *SNG1*-Gen in *E. coli* zu exprimieren, um für das *SNG1*-Protein die SMT-Aktivität zu zeigen. In einem ersten Ansatz wurde dazu der Vektor pET-20b(+) verwendet (s. Abschn. 4.5.1). Der Expressionsstrategie lag die Annahme zugrunde, dass das *SNG1*-Protein ab dem bekannten N-terminalen Peptid der SMT aus *Brassica rapa* die aktive, *in vivo* existente Form des Enzyms darstellt. Diese Annahme war einerseits berechtigt, weil die SMT in dieser Form aus *B. rapa* aufgereinigt worden war (s. Abschn. 1.2.1). Durch eine Computeranalyse war andererseits die oberhalb des SMT-Peptids befindliche N-terminale Sequenz von 19 Aminosäuren als ein Signalpeptid für das Endoplasmatische Retikulum (ER) identifiziert worden (s. Abschn. 4.4.3). Diese Sequenz wird damit voraussichtlich nach Einschleusung des Proteins in das ER abgespalten.

Da keine geeigneten Restriktionsenzym-Schnittstellen vorhanden waren, wurde der zur Expression bestimmte Abschnitt des *SNG1*-Proteins in einer PCR amplifiziert, wobei die *SNG1*-cDNA als Matrize diente (s. Abschn. 4.5.1). Um Artefakte in der Sequenz zu vermeiden, wurde zum einen die *Pfu* DNA-Polymerase verwendet, die eine sehr geringe Fehlerrate aufweist. Zum anderen wurden in den Versuchen zu Expression mehrere Klone gleichzeitig analysiert. In den Experimenten konnte zwar eine Expression des *SNG1*-Proteins festgestellt werden (s. Abschn. 4.5.2 u. Abb. 18), dieses akkumulierte aber vollständig in zytoplasmatischen Einschlusskörpern (s. Abb. 19). Die molare Masse des exprimierten Proteins war in der SDS-PAGE etwas geringer als aus der Aminosäuresequenz berechnet worden war (s. Abschn. 4.5.1). Um mindestens einen Teil des Proteins in aktiver Form in Lösung zu bringen, wurde die Expression zudem bei Raumtemperatur (20 °C) versucht, die aber zu dem gleichen Ergebnis führte. Ein Transport des Proteins in das Periplasma, der durch das N-terminale Signalpeptid des Vektors (s. Abschn. 4.5.1 u. Abb. 17) hätte bewirkt werden sollen, fand gar nicht oder eventuell nur in einem sehr geringem Umfang statt (s. Abb. 19).

Eine SMT-Aktivität konnte in keinem der Experimente nachgewiesen werden. Dieses negative Ergebnis kann sicherlich verschiedene Ursachen haben. Offensichtlich weist aber das rekombinante Protein eine starke Tendenz zur Akkumulation in Einschlusskörpern auf. Das ist wahrscheinlich in erster Linie auf die Sequenz des *SNG1*-Proteins selbst zurückzuführen. Wurde das Protein unter vergleichbaren Bedingungen ohne das N-terminale Signalpeptid (s.o.) und ohne die am C-Terminus befindliche Sequenz (s. Abschn. 4.5.1) exprimiert, so akkumulierte es größtenteils ebenfalls in Einschlusskörpern (s.u.). Diese Tendenz wird wahrscheinlich noch durch die starke Überexpression des *SNG1*-Proteins begünstigt, die vermutlich durch den sehr effizienten T7-Promotor verursacht wird (s. Abschn. 4.5.1 u. Abb. 17). Zudem übten die nicht zum *SNG1*-Protein gehörenden Abschnitte möglicherweise dadurch einen negativen Einfluss

aus, dass sie die Faltung zu einem aktiven Enzym behinderten. Ein störender Effekt auf den Transport in das Periplasma ging darüber hinaus eventuell von der am C-Terminus befindlichen Sequenz (s.o.) aus. Deshalb war in einem Teil der analysierten Klone dieser Abschnitt bis auf den His-Tag entfernt worden (s. Abschn. 4.5.1 u. Abb. 17). Aber auch in diesem Fall akkumulierte das Protein ohne Aktivität in Einschlusskörpern, und es fand kein oder eventuell nur ein sehr begrenzter Transport in das Periplasma statt.

Die Sequenzanalyse hatte gezeigt, dass das potenzielle *SNG1*-Gen signifikante Ähnlichkeit zu Serincarboxypeptidasen aufweist (s. Abschn. 4.4.3). Die SMT ist dagegen eine Acyltransferase mit einer anderen biologische Funktion, als sie diesen Enzymen normalerweise zukommt (s. Abschn. 1.1 u. 5.2). Es war deshalb sehr wichtig, zu demonstrieren, dass dieses Gen die SMT kodiert. Das würde beweisen, dass die SMT tatsächlich aus einer Serincarboxypeptidase entstanden ist. Deshalb wurde erneut die Expression des *SNG1*-Proteins in *E. coli* im Vektor pCW Ori+ versucht (s. Abschn. 4.5.3). Dieser besitzt im Vergleich zu dem zuvor eingesetzten Vektor pET-20b(+) (s.o.) einen deutlich schwächeren Promotor. Durch eine verminderte Expression des *SNG1*-Proteins sollte bewirkt werden, dass zumindest zum Teil die lösliche und aktive Form gebildet wird. Die zu exprimierende Sequenz bestand nur aus dem *SNG1*-Protein ab dem bekannten SMT-Peptid (s. Abb. 20). Damit waren im Gegensatz zum zuvor getesteten Konstrukt (s.o.) keine Sequenzen vorhanden, die möglicherweise die Faltung zu einem aktiven Enzym hätten stören können.

Zur Herstellung des neuen Konstrukts wurde zuerst ein Fragment der cDNA mit Hilfe der PCR amplifiziert, das aus dem 5'-Ende der zu exprimierenden Sequenz des *SNG1*-Proteins bestand (s. Abschn. 4.5.3). Um Artefakte zu vermeiden, kam wiederum eine Polymerase mit geringer Fehlerrate zum Einsatz. Aus diesem Grund erfolgte in den Versuchen zur Expression auch die Analyse von mehreren Klonen zugleich. Das in den Vektor pCW Ori+ klonierte PCR-Fragment wurde außerdem fast vollständig durch ein Fragment der cDNA ersetzt, das nicht mittels PCR erzeugt worden war. Das geschah mit Restriktionsenzymen auf konventionellem Wege. Eine Expression des *SNG1*-Proteins oder eine SMT-Aktivität konnte aber in keinem der Versuche festgestellt werden (s. Abschn. 4.5.4). Die Ursache dafür ist nicht klar, ist aber womöglich auf der Ebene der Transkription zu suchen. Ein wesentlicher Unterschied zu dem vorangehend getesteten Konstrukt war der Einsatz eines viel schwächeren Promotors (s.o.), der von der bakteriellen RNA-Polymerase und nicht von dem Enzym des Bakteriophagen T7 abgelesen wird. Das führte eventuell zu einer geringen Kopienzahl des Transkripts und mit anderen, unbekanntem Faktoren dazu, dass kein aktives Protein exprimiert wurde. Die mit den beiden Konstrukten (s.o.) erzielten Ergebnisse zeigten insgesamt, dass die Expression des *SNG1*-Proteins in *E. coli* und der Nachweis von SMT-Aktivität auf große Schwierigkeiten stößt.

Das machte es erforderlich, in erster Linie die Identität des potenziellen *SNG1*-Gens zu beweisen. Als einzige Möglichkeit dazu verblieb die Komplementation der Mutante *sng1-1* von *Arabidopsis* mit einem genomischen Klon des *SNG1*-Gens (s.o.). Im Cosmid 1 waren keine

Schnittstellen für ein Restriktionsenzym vorhanden, mit denen das auf dem 10 kb-Fragment befindliche, zusätzliche Gen des Cosmids 1 hätte entfernt werden können. Das verbleibende Fragment des Cosmids hätte ansonsten rezirkularisiert und in die Komplementation eingesetzt werden können. Um ein Fragment zu erzeugen, das nur aus dem potenziellen *SNG1*-Gen mit den regulatorischen Sequenzen des 5'- und 3'-Endes bestand, waren ebenfalls keine geeignete Schnittstellen mit überhängenden Enden vorhanden. Ein derartiges Fragment wäre zur Komplementation in die T-DNA-Region des Vektors pGA482 (An 1987) kloniert worden. Die Amplifikation dieses Bereichs auf dem Cosmid 1 mit einer Größe von 7 kb mit Hilfe der PCR erwies sich ebenfalls als nicht möglich, auch nicht mit einem speziell dafür nach Barnes (1994) optimierten Kit (Expand Long Template PCR Kit, Boehringer Mannheim GmbH, Deutschland). Das Fragment hätte über die Schnittstellen geeigneter Restriktionsenzyme, die durch die Primer eingeführt worden wären, ebenso zur Komplementation in den Vektor pGA482 kloniert werden können.

Die bis zu diesem Stand der Ergebnisse diskutierte Klonierung des *SMT*-Gens wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. C. Chapple an der Purdue University (West Lafayette, Indiana, USA) zu Ende geführt (Lehfeldt *et al.* 2000). Die Arbeiten sollen an dieser Stelle zusammengefasst und diskutiert werden. Zur Herstellung des genomischen Klons des potenziellen *SNG1*-Gen (s.o.) wurde aus dem Cosmid 1 in einer PCR ein Fragment mit einer Größe von 2,2 kb amplifiziert und zur Sequenzierung in den Vektor pGEM-T Easy (Promega Corp., Madison, Wisconsin, USA) kloniert. Dieses Fragment bestand aus dem 5'-Ende des *SNG1*-Gens, das sich auf dem 10 kb-Fragment des Cosmids 1 befindet, und einem Abschnitt mit einer Größe von 1,1 kb oberhalb davon, der den *SNG1*-Promotor einschließen sollte. Durch den Primer an diesem Ende wurde eine Schnittstelle des Restriktionsenzym *KpnI* in das Fragment eingeführt, die Position des entgegengerichteten Primers befand sich auf dem 3,8 kb-Fragment unterhalb der Schnittstelle des Enzyms *HindIII* (s. Abb. 13). Dieses Fragment wurde mit den genannten Enzymen aus dem Vektor pGEM-T Easy nach der Sequenzierung wieder freigesetzt und in den Vektor pGA482 kloniert (s.o.). Danach wurde in die Schnittstelle des Enzyms *HindIII* das 3,8 kb-Fragment von Cosmid 1 kloniert. Dadurch wurde der andere Teil des potenziellen *SNG1*-Gens in den Vektor eingeführt, außerdem ein unterhalb des Stoppkodons befindlicher Abschnitt mit einer Größe von 1,1 kb. Darin sollten sich die regulatorischen Sequenzen des 3'-Endes dieses Gens befinden. Die richtige Orientierung des 3,8 kb-Fragments wurde danach in einer PCR mit den erwähnten Primern überprüft. Das Konstrukt komplementierte die Mutante *sng1-1* in gleicher Weise wie zuvor das Cosmid 1 (s. Abschn. 3.4.5), womit das *SNG1*-Gen von *Arabidopsis* eindeutig identifiziert worden war (Lehfeldt *et al.* 2000).

Um doch noch den Beweis dafür zu erhalten, dass dieses Gen die *SMT* kodiert, wurde erneut der Versuch unternommen, das *SNG1*-Protein in *E. coli* zu exprimieren. Zuvor konnte eine Expression des *SNG1*-Proteins nur unter der Kontrolle des T7-Promotors beobachtet werden (s.o.). Aus diesem Grund wurde der Vektor pET-28a(+) (Studier *et al.* 1992; Novagen, Inc., Madison, Wisconsin, USA) verwendet, der ebenfalls den T7-Promotor, aber kein

Signalpeptid für den periplasmatischen Raum enthielt (s.o.). Die zu exprimierende Sequenz bestand nur aus dem SNG1-Protein ab dem bekannten SMT-Peptid (s.o.). Das sollte wiederum verhindern, dass Abschnitte vorhanden sind, die einen störenden Einfluss auf die Erzeugung eines aktiven Enzyms ausüben können (s.o.). Herstellung und Analyse des Konstrukts erfolgten in einer Kooperation zwischen Prof. C. Chapple (s.o.) und Dr. K. Meyer (Central Research and Development, Biochemical Sciences and Engineering, E.I. du Pont de Nemours & Co., (Inc.), Wilmington, Delaware, USA).

Der zur Expression bestimmte Teil des SNG1-Proteins wurde in einer PCR mit der cDNA als Matrize amplifiziert und zur Sequenzierung in den Vektor pGEM-T Easy (s.o.) kloniert. Durch die Primer wurde dabei N-terminal eine Schnittstelle des Restriktionsenzym *PgaI* in das Fragment eingeführt, C-terminal eine solche des Enzyms *SalI*. Die Enzyme *PgaI* und *NcoI* erzeugen die gleichen überhängenden Enden. Das Fragment konnte nach der Sequenzierung deshalb mit den zuvor eingesetzten Enzymen wieder freigesetzt und in die Schnittstellen der Enzyme *NcoI* und *SalI* im Vektor pET-28a(+) (s.o.) kloniert werden. Durch die Erkennungssequenz des Enzyms *PagI* (TCATGA) wird dabei die Aminosäure Alanin (GCC) an der Position 2 des SNG1-Proteins durch einen Threoninrest (ACC) ersetzt. Es wurde angenommen, dass diese Veränderung keinen Einfluss auf die Bildung eines aktiven Enzyms hat. Wie schon zuvor, so akkumulierte auch in diesem Fall das SNG1-Protein nach Induktion wahrscheinlich vollständig und in inaktiver Form in Einschlusskörpern. Bei einer sehr niedrigen Temperatur (14 °C) für die Kultivierung und ohne eine Induktion ließ sich nach einem längeren Zeitraum (48 Stunden) im Extrakt löslicher Proteine aber die SMT-Aktivität nachweisen (Lehfeldt *et al.* 2000). Unter diesen Bedingungen, die eine nur geringe Expression bewirkten, wurde offenbar zumindest ein Teil des Enzyms in die aktive und lösliche Form gefaltet. Dieser Prozess wurde möglicherweise auch durch die lange Zeit der Inkubation begünstigt. Das Ergebnis zeigte eindeutig, dass das *SNG1*-Gen von *Arabidopsis* tatsächlich die SMT kodiert.

Es seien an dieser Stelle zwei weitere experimentelle Befunde erwähnt, die mit diesem Ergebnis in Übereinstimmung sind. So wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. C. Chapple (s.o.) ca. 42 000 Keimlinge von Mutanten, die durch eine Bestrahlung mit schnellen Neutronen erzeugt worden waren, in der M2-Generation auf den *sng1*-Phänotyp hin analysiert wie im Abschn. 1.2.2 beschrieben. Diese Analyse wurde in erster Linie durchgeführt, um Aufschluss über die Funktion der sehr ähnlichen Gene in direkter Nachbarschaft zum *SMT*-Gen zu erhalten (s. Abschn. 5.2). Es wurden vier neue *Arabidopsis*-Mutanten mit einem *sng1*-Phänotyp gefunden, die von verschiedenen Pflanzen in der M1-Generation abstammten. In keinem Fall wurde nach Kreuzung mit der Mutante *sng1-1* der *sng1*-Phänotyp komplementiert. Damit handelte es sich um neue Allele des *SNG1*-Gens, die als *sng1-5*, *sng1-6*, *sng1-7* und *sng1-8* bezeichnet wurden. Eine Mutagenese mit schnellen Neutronen führt meistens zu einer Deletion größerer Abschnitte genomischer DNA (Feldmann *et al.* 1994). Eine Southern-Analyse der Mutanten zeigte, dass in einem variablen Ausmaß solche Deletionen im Bereich des *SNG1*-Gens vorhanden sind (Lehfeldt *et al.* 2000). In den Mutanten *sng1-5*, *sng1-6* und *sng1-8* war davon immer

auch das 3,8 kb-Fragment betroffen, was mit den zuvor erzielten Ergebnissen übereinstimmt, wonach sich auf diesem zu einem großen Teil das *SNGI*-Gen befindet (s.o.). In der Mutante *sngl-7* wurde wahrscheinlich eine weniger drastische Veränderung bewirkt, die durch diese Southern-Analyse nicht aufgedeckt werden konnte.

In der frühen Entwicklung des *Arabidopsis*-Keimlinge wurde außerdem mit der cDNA als Sonde die Expression des *SNGI*-Transkripts in Abhängigkeit vom Licht untersucht. Bei einer Kultur im Licht akkumulierte die RNA in den ersten 14 Tagen der Entwicklung zu einem deutlich höheren Stand als bei der Anzucht in Dunkelheit (Prof. C. Chapple, pers. Mitt.). Es scheint damit eine begrenzte konstitutive Expression des *SNGI*-Transkripts vorzuliegen, die unter dem Einfluss von Licht erheblich gesteigert werden kann. Das Transkript war dabei vorhanden ab dem dritten Tag der Entwicklung, danach wurde bis zum 14. Tag ein stetiger Anstieg der Expression auf einen maximalen Stand beobachtet. Eine Abhängigkeit vom Licht wurde auch für die Akkumulation von 2-*O*-Sinapoyl-L-malat und für die Entwicklung der SMT-Aktivität in *Arabidopsis* und *Raphanus sativus* festgestellt (s. Abschn. 1.1). Das stimmt überein mit dem Ergebnis der Klonierung, wonach es sich bei dem *SNGI*-Gen von *Arabidopsis* um die SMT handelt. Die Größe des *SNGI*-Transkripts im Gel weicht mit 1,5 kb (s. Abschn. 4.4.5) nicht ab von derjenigen, die sich für die cDNA des *SNGI*-Gens ergeben hatte (s. Abschn. 4.4.3). Das ist ein zusätzlicher Hinweis darauf, dass die vollständige cDNA dieses Gens isoliert worden war. Weiterhin entsprechen sich die SMT und das SNG1-Protein in wichtigen Eigenschaften. So wurde aus der cDNA für das *SNGI*-Protein eine molare Masse von 50 kDa und ein isoelektrischer Punkt (pI) von 6,2 abgeleitet (s. Abschn. 4.4.3). Solche Werte ergeben sich auch für die aus *R. sativus* (Gräwe *et al.* 1992) und *Brassica rapa* aufgereinigte SMT (s. Abschn. 1.1). Das SNG1-Protein enthält darüber hinaus ein N-terminales Signalpeptid für das Endoplasmatische Retikulum (ER) (s. Abschn. 4.4.3), was typisch ist für ein in der Vakuole lokalisiertes Protein wie die SMT, dessen Transport über das ER erfolgt. Eine Signalsequenz für den Transport in die Vakuole konnte dagegen nicht identifiziert werden. Das ist aber vermutlich bedingt durch den noch unzureichenden Kenntnisstand über diese Sequenzen in höheren Pflanzen (Vitale und Raikhel 1999).

Es sei schließlich erwähnt, dass es auch möglich gewesen wäre, das *SNGI*-Gen positionell, und nicht mit Hilfe einer T-DNA-Mutante, zu klonieren. Die genetische Analyse der Mutante *sngl-1* hatte gezeigt, dass sich das *SNGI*-Gen in der Nähe des *ERECTA*-Lokus auf dem Chromosom 2 von *Arabidopsis* befindet (Prof. C. Chapple, pers. Mitt.). So wurde nach Kreuzung der Mutante *sngl-1* mit dem Ökotyp *Landsberg erecta* in der F<sub>2</sub>-Generation nur eine von 100 Pflanzen gefunden, die den Phänotyp der *sngl*- und *erecta*-Mutation zugleich besaß. Ausgangspunkt für die Erzeugung der Mutante *sngl-1* war der Ökotyp Columbia von *Arabidopsis*. Für eine positionelle Klonierung hätte die Position der *sngl*-Mutation aber noch genauer bestimmt werden müssen. Das Cosmid 1 wurde im Zuge der Klonierung des *SNGI*-Gens ebenfalls mit Hilfe von 100 rekombinanten Inzuchtlinien kartiert (Lister und Dean 1993), die das ABRC (s. Abschn. 2.1, Nr. CS1899) zur Verfügung stellte. Dabei ergab sich eine Position bei

38,1 Centimorgan (cM) zwischen den Markern m216 (33,1 cM) und m265 (39,3 cM) auf dem langen Arm des Chromosoms 2 von *Arabidopsis* (Prof. C. Chapple, pers. Mitt.). Das stimmt in etwa überein mit der Position des *ERECTA*-Lokus, der sich bei 50,1 cM befindet. Das Cosmid 1 wurde als der Klon pCC300 auf der Karte nach Lister und Dean eingetragen (s. *Arabidopsis thaliana*-Database, Abschn. 2.11). Für den BAC Klon F21P24, auf dem sich das Cosmid 1 mit dem *SNG1*-Gen befindet (s. Abschn. 4.3.6), wurde durch das *Arabidopsis*-Genomprojekt als nächstliegender Marker mi238 bei 39,9 cM auf Chromosom 2 bestimmt. Die Übereinstimmung dieser Kartierungen im Zuge der Klonierung des *SNG1*-Gens war ein zusätzlicher, wichtiger Hinweis darauf, dass die richtige genomische DNA isoliert worden war. Da die positionelle Klonierung ein aufwendiger Weg zur Isolation eines Gens ist (s. z.B. Meyer 1994 u. Meyer *et al.* 1994), hätte auch die Möglichkeit bestanden, bei einem Fehlschlagen der inversen PCR von der T-DNA-Mutante *sng1-4* eine genomische Bibliothek herzustellen. Mit den Fragmenten der T-DNA-Seiten als Sonden hätte daraus in gleicher Weise ein Fragment genomischer DNA aus dem *SNG1*-Gen oder dessen Umgebung isoliert werden können. Eine weitere Methode zu diesem Zweck wäre außerdem die Thermal Assymmetric Interlaced (TAIL)-PCR gewesen (Feldmann und Dilkes 1998). Auf einem dieser Wege wäre es wahrscheinlich möglich gewesen, das *SNG1*-Gen von *Arabidopsis* dennoch zu klonieren.

## 5.2 Die Analyse des *SMT*-Gens

Nachdem im vorangehenden Abschnitt die Klonierung des *SMT*-Gens diskutiert worden war, sollen im Folgenden die Eigenschaften dieses Gens erörtert werden. Die Sequenzanalyse der cDNA hatte ergeben, dass die *SMT* eine signifikante Ähnlichkeit zu Serincarboxypeptidasen aufweist (s. Abschn. 4.4.3). Das zeigte in erster Linie die Genbank-Analyse, wobei eventuell alle zu diesem Zeitpunkt darin enthaltenen Sequenzen derartiger Peptidasen als Treffer erhalten wurden. Zwischen den Sequenzen der Peptidasen und der *SMT* bestand überdies zumindest teilweise eine sehr hohe prozentuale Identität. Für zwei dieser Enzyme wurden bislang die katalytisch aktiven Aminosäuren eindeutig bestimmt (s. Abschn. 4.4.3). Dabei handelt es sich um die aus den Aminosäuren Serin, Histidin und Asparaginsäure bestehende sog. katalytische Triade. Neben diesen sind allerdings noch weitere Reste an der Katalyse beteiligt, z.B. bei der Stabilisierung des Übergangszustandes (s.u.). Ein Vergleich der *SMT* mit den Sequenzen der beiden Enzyme ergab, dass in der *SMT* an äquivalenten Positionen identische Reste vorhanden sind (s. Abschn. 4.4.3 u. Abb. 15; Lehfeldt *et al.* 2000). Die Anordnung der Reste in der Sequenz ist dabei typisch für Serincarboxypeptidasen (Rawlings und Barrett 1994). Darunter sind in diesem Fall die Reihenfolge und genaue Position der Reste zu verstehen. In der Umgebung des katalytisch aktiven Serins und der Asparaginsäure befinden sich zudem bestimmte Glycinreste (s. Abschn. 4.4.3), deren Existenz nach Rawlings und Barrett (1994) in gleicher Weise für diese Familie von Enzymen kennzeichnend ist. Diese Ergebnisse zeigen insgesamt klar, dass sich die Acyltransferase *SMT* aus einer Serincarboxypeptidase entwickelt hat.

Die biologische Funktion von Serincarboxypeptidasen besteht in der Prozessierung und im Abbau von Proteinen und Peptiden. Sie katalysieren in diesen Substraten die hydrolytische Spaltung der C-terminalen Peptidbindung, wodurch die endständige Aminosäure freigesetzt wird. Der in Serinpeptidasen wirkende katalytische Mechanismus wurde eingehend analysiert, vor allem in Enzymen, die zu der Familie animalischer Endopeptidasen gehören, wie z.B. Chymotrypsin (Ferry *et al.* 1994; Dodson und Wlodawer 1998; Voet und Voet 1998), aber auch in Enzymen aus der Familie der Serincarboxypeptidasen, wie z.B. der Carboxypeptidase Y aus *Saccharomyces cerevisiae* (Breddam 1986; Remington 1993; Breddam und Remington 1994; Breddam *et al.* 1998). Der katalytische Mechanismus dieser Enzyme kann kurzgefasst wie folgt beschrieben werden. Nach Bildung des Enzym-Peptid-Komplexes wird im ersten Schritt der Katalyse die  $\alpha$ -Carbonylgruppe der vorletzten Aminosäure des Peptids durch ein freies Elektronenpaar nukleophil angegriffen. Dieses stammt aus der Hydroxylgruppe des Serins, das sich im aktiven Zentrum befindet. In der Folge wird die Peptidbindung zur C-terminalen Aminosäure gelöst und diese freigesetzt. Es entsteht ein Zwischenprodukt, in dem das restliche Peptid kovalent an das Enzym gebunden ist, der Acyl-Enzym-Komplex. Zugleich wird das Proton der Serin-Hydroxylgruppe auf die  $\alpha$ -Aminogruppe der abgespaltenen Aminosäure übertragen, woran wesentlich das Histidin und die Asparaginsäure der katalytischen Triade beteiligt sind. Die Deprotonierung aktiviert dabei den Hydroxyl-Sauerstoff für den nukleophilen Angriff. Im Verlauf des gesamten Prozesses wird am C-Atom der  $\alpha$ -Carbonylgruppe ein Übergangszustand mit tetraedischer Konfiguration durchlaufen, dessen Stabilisation durch Effekte unterschiedlicher Art ein weiterer, sehr wichtiger Beitrag zur Katalyse ist. Im zweiten Schritt der Katalyse wird der Acyl-Enzym-Komplex hydrolytisch gespalten und das um eine Aminosäure verkürzte Peptid wieder freigesetzt. Dabei wird das erwähnte C-Atom durch ein freies Elektronenpaar aus einem Wassermolekül, welches in das aktive Zentrum eintritt, nukleophil attackiert. In Umkehrung des ersten Schrittes wird ein Proton des Wassers auf ein N-Atom des Imidazolsystems im katalytisch aktiven Histidin und von dort auf das aus der Bindung mit dem Peptid austretende Sauerstoffatom des Serins übertragen, wodurch die Hydroxylgruppe des Serinrests zurückgebildet wird.

Die große Ähnlichkeit der Aminosäuresequenzen von Serincarboxypeptidasen und SMT legt die Vermutung nahe, dass die Katalyse durch die SMT unter Beteiligung identischer Reste auf dem gleichen Mechanismus beruht, der für Serinpeptidasen ermittelt wurde. Diese wird dadurch gestützt, dass die SMT-Aktivität in Proteinextrakten aus *Arabidopsis* durch Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) signifikant gehemmt wird (Lehfeldt *et al.* 2000). PMSF ist ein klassischer Inhibitor der Aktivität zahlreicher Serinpeptidasen und reagiert spezifisch mit dem Serinrest im aktiven Zentrum dieser Enzyme (Barrett 1994). Ein Serinrest ist daher sehr wahrscheinlich auch in der SMT an der Katalyse beteiligt, und damit auch die andere Aminosäuren, die zur katalytischen Triade gehören. Weiterhin sind zwischen der Peptidhydrolyse und einer Transacylierung gewisse Ähnlichkeiten vorhanden, die es erlauben, in erster Annäherung den folgenden katalytischen Mechanismus für die SMT zu formulieren. Anstatt einer Peptidbindung

wird durch die SMT die energiereiche Esterbindung in der 1-*O*-Sinapoyl- $\beta$ -D-glucose gespalten. Das Proton der Serin-Hydroxylgruppe wird dabei auf die aus der Esterbindung austretende Glucose übertragen, der Sinapoylrest zugleich durch den Serin-Sauerstoff kovalent an das Enzym gebunden. Dieses Zwischenprodukt unterliegt aber offenbar nicht, wie in den Peptidasen, einer Hydrolyse. Vielmehr wird die Carbonylfunktion der Sinapinsäure durch ein Elektronenpaar aus der Hydroxylgruppe von L-Malat nukleophil attackiert, das unter Ausbildung eines zweiten Enzym-Substrat-Komplexes in das aktive Zentrum eintritt. Dadurch wird die Bindung im Komplex gelöst und der Ester 2-*O*-Sinapoyl-L-malat gebildet. Dieses Modell bietet einen ersten Anhaltspunkt, um zu verstehen, wie aus einer Serincarboxypeptidase im Verlauf der Evolution ein Enzym wie die SMT entstanden sein könnte, das eine Transacylierung anstatt einer Peptidhydrolyse katalysiert. Dabei dürfte von großer Bedeutung sein, dass in diesem Fall hauptsächlich L-Malat und nicht Wasser mit dem Acyl-Enzym-Komplex reagieren kann, was im Vergleich zu Serincarboxypeptidasen auf strukturelle Veränderungen im aktiven Zentrum der SMT hinweist. Für die aus *Raphanus sativus* (Gräwe *et al.* 1992) und *Brassica rapa* (M. Lorenzen, pers. Mitt.) aufgereinigten Formen der SMT wurde für 1-*O*-Sinapoyl- $\beta$ -D-glucose jedenfalls in Enzymtests keine hydrolytische Aktivität festgestellt. Zumindest bei der SMT aus *B. rapa* dürfte es sich, ausgehend von dem bekannten N-terminalen Peptid (s. Abschn. 1.2.1 u. 8.2), ebenfalls um ein Protein handeln, das aus einer Serincarboxypeptidase hervorgegangen ist. Strukturelle Veränderungen betreffen darüber hinaus womöglich die Bindungsstellen der Substrate 1-*O*-Sinapoyl- $\beta$ -D-glucose und L-Malat. Zwischen diesen Verbindungen und einem Peptidsubstrat besteht jedenfalls eine gewisse strukturelle Differenz.

Auf ähnliche Weise wie für die SMT lässt sich auch ein Vergleich der Enzyme SCT und SCE aus dem Stoffwechsel der Sinapinsäureester (s. Abschn. 1.1) mit derartigen Peptidasen durchführen. Wie bei der SMT wird durch die SCT ein Sinapoylrest übertragen, im Falle der SCT allerdings auf die Hydroxylgruppe von Cholin und nicht auf diejenige von L-Malat. Die zur Bildung des Acyl-Enzym-Komplexes erforderliche Aktivierung des Acylrestes erfolgt jedes Mal in Form des energiereichen Esters 1-*O*-Sinapoyl- $\beta$ -D-glucose. In der durch die Esterase SCE katalysierten Reaktion wird der Acylrest hingegen auf Wasser übertragen, das umgesetzte Substrat ist *O*-Sinapoylcholin. Gemeinsam ist aber den Reaktionen, dass ausgehend von einem Sinapinsäureester als Donor ein Sinapoylrest auf die Hydroxylgruppe eines anderen Moleküls als Akzeptor übertragen wird. Mit Bezug auf die SCE ist zudem schon länger bekannt, dass Serincarboxypeptidasen *in vitro* zu einer effizienten Esterhydrolyse in der Lage sind (Breddam 1986; Remington 1993, 1998; Remington und Breddam 1994; Breddam *et al.* 1998). Darüber hinaus sind Esterasen isoliert worden, an deren Katalyse eine aus den gleichen Aminosäuren wie in der SMT bestehende katalytische Triade beteiligt ist (Dodson und Wlodawer 1998). Diese Beobachtungen führten deshalb zu der Frage, ob sich nicht nur die SMT, sondern auch die Acyltransferase SCT und die Esterase SCE evolutionär aus Serincarboxypeptidasen entwickelt haben. Die Gene dieser Enzyme könnten dann zu der Gruppe gehören, in welcher das SMT-Gen gefunden wurde (s. Abschn. 4.3.6). In diesem Fall haben womöglich mehrere Gen-

duplikationen das genetische Material geliefert, das dem Stoffwechsel der Sinapinsäureester in der Familie der *Brassicaceen* zugrunde liegt.

Die Analyse der *sng1*-Mutanten, die durch Bestrahlung mit schnellen Neutronen erzeugt worden waren (s. Abschn. 5.1), bestätigte diese Annahme allerdings nicht. So fehlen in der Mutante *sng1-6* das 10 kb- und 3,8 kb- Fragment von Cosmid 1 sowie das 4,5 kb-Fragment von Cosmid 2 (Lehfeldt *et al.* 2000). Die Deletion hat damit in dieser Mutante eine Größe von 25 kb, von der das *SMT*-Gen als auch die umliegenden vier Gene mit großer Ähnlichkeit zu Serincarboxypeptidasen betroffen sind (s. Abb. 13, Gen Nr. 6-10). Daraus ergaben sich über den *sng1*-Phänotyp hinaus aber keine Veränderungen im Stoffwechsel der Sinapinsäureester (Lehfeldt *et al.* 2000). Ein Defekt im *SCT*-Gen hätte dazu geführt, dass freies Cholin anstelle von *O*-Sinapoylcholin in den Samen akkumuliert. Ein Defekt im *SCE*-Gen hätte sich dadurch gezeigt, dass das gespeicherte *O*-Sinapoylcholin in der frühen Entwicklung des Keimlings nicht abgebaut wird. Es ist damit sehr unwahrscheinlich, dass die Enzyme SCT oder SCE von einem der Gene in direkter Nachbarschaft zum *SMT*-Gen kodiert werden. Dieses Ergebnis wird auch durch eine Northern-Analyse unterstützt, die mit Fragmenten der betroffenen fünf Gene durchgeführt wurde (s.o.). Danach wird offensichtlich nur das *SMT*-Gen in der frühen Entwicklung des *Arabidopsis*-Keimlings exprimiert (Prof. C. Chapple, pers. Mitt.). Diese Phase der Entwicklung betrifft zwar nicht die SCT, das Ergebnis spricht aber zumindest nicht dafür, dass eines dieser Gene die SCE kodiert. Es ist allerdings möglich, dass es sich bei der SCT oder SCE um redundante Gene handelt. In diesem Fall wären Gene mit gleicher Funktion an anderer Stelle im Genom vorhanden, was zu einer Kompensation eines Deletionseffekts geführt hätte. Es wurde aber mittlerweile eine durch EMS erzeugte Mutante von *Arabidopsis* isoliert, in der sehr wahrscheinlich ein Defekt im *SCT*-Gen vorhanden ist (Prof. C. Chapple, pers. Mitt.). Anstatt von *O*-Sinapoylcholin wie im Wildtyp werden in den Samen der Mutante freies Cholin und 1-*O*-Sinapoyl- $\beta$ -D-glucose akkumuliert, die Edukte der Reaktion, die durch die SCT katalysiert wird (s. Abschn. 1.1 u. Abb. 1). Diese Mutante wurde deshalb als *sinapoylglucose accumulator 2* (*sng2*) bezeichnet (s. Abschn. 1.2.2). Aus der genetischen Analyse der Mutante ging zudem hervor, dass das betroffene Gen nicht, wie das *SNG1*-Gen, auf Chromosom 2 von *Arabidopsis* lokalisiert ist. Wenn es sich dabei tatsächlich um das *SCT*-Gen handelt (s. Abschn. 5.3), bestätigt das Ergebnis die Analyse der Mutante *sng1-6* (s.o.).

Die Analyse dieser Mutante hatte zwar gezeigt, dass die Gene in der Nachbarschaft zum *SMT*-Gen keine weiteren Enzyme aus dem Stoffwechsel der Sinapinsäureester kodieren. Das lässt aber die Frage offen, ob sich unter diesen nicht möglicherweise redundante *SMT*-Gene befinden. Das würde allerdings bedeuten, dass in allen acht isolierten *sng1*-Mutanten (s.o.), die durch verschiedene Methoden hergestellt worden waren, in mehr als einem der Gene aus dieser Gruppe gleichzeitig Defekte vorhanden sind, die zu einem vollständigen Ausfall der Funktion führen, was sehr unwahrscheinlich ist. Für das Gen, das sich auf dem 10 kb-Fragment des Cosmids 1 befindet (s.o.), zeigte außerdem eine Northern-Analyse, dass es in Keimlingen von *Arabidopsis* nicht exprimiert wird (s. Abschn. 4.3.4). Das müsste aber für ein *SMT*-Gen der

Fall sein, da das Enzym an Umwandlungen der Sinapinsäureester beteiligt ist, die zu diesem Zeitpunkt ablaufen (s. Abschn. 1.1). In den Mutanten *sng1-5*, *sng1-7* und *sng1-8*, die mit schnellen Neutronen hergestellt worden waren (s.o.), ist zudem das 10 kb-Fragment von einer Deletion betroffen (Lehfeldt *et al.* 2000). Würde das Gen, das auf diesem Fragment lokalisiert ist, ein zusätzliches *SMT*-Gen sein, sollten diese Mutanten nicht den *sng1*-Phänotyp aufweisen. Durch das *Arabidopsis*-Genomprojekt wurden aus den Genen der Gruppe, zu der auch das *SMT*-Gen gehört, die Aminosäuresequenzen der potenziell kodierten Proteine abgeleitet (s. Abschn. 4.3.6). Diese sind soweit voneinander verschieden, dass sich daraus unterschiedliche isoelektrische Punkte (pI) ergeben sollten. Mit der Lasergene Biocomputing Software ließen sich Werte errechnen, die um 0,1-0,8 pH-Einheiten voneinander abwichen. Es müsste deshalb möglich sein, potenzielle Isoenzyme der SMT (s. Abschn. 1.1; Gräwe *et al.* 1992), die durch diese Gene kodiert werden, mittels isoelektrischer Fokussierung aufzutrennen. Zu verschiedenen Zeitpunkten in der Entwicklung von *Arabidopsis* wurde aber nur eine Form der SMT gefunden (s. Abschn. 1.2.2). Es ist daher unwahrscheinlich, dass die sehr ähnlichen Gene in direkter Nachbarschaft zum *SMT*-Gen ebenfalls dieses Enzym kodieren. Dass an anderer Stelle im Genom von *Arabidopsis* keine redundanten *SMT*-Gene vorhanden sind, war eine essentielle Voraussetzung für die Klonierung dieses Gens aus einer T-DNA-Mutante. Das ergab sich in erster Linie aus der Existenz und der genetischen Analyse der verschiedenen *sng1*-Mutanten (s. Abschn. 1.2.2). Dass keine Kopien des *SMT*-Gens im *Arabidopsis*-Genom vorhanden sind, zeigte auch eine mit der cDNA als Sonde durchgeführte Southern-Analyse (Prof. C. Chapple, pers. Mitt.). Die Sonde reagierte nur mit Fragmenten, die mit den verwendeten Restriktionsenzymen aus dem Bereich des *SMT*-Gens freigesetzt werden sollten. Welche Funktion (wenn überhaupt eine) den erwähnten Genen in der Nähe des *SMT*-Gens zukommt (s.o.), lässt sich damit bisher nicht beantworten.

Das Analyse des *SMT*-Gens hat ergeben, dass die Acyltransferase SMT sich evolutionär aus einer Serincarboxypeptidase entwickelt hat. Aus dem Mechanismus, der für die Peptidhydrolyse durch diese Enzyme formuliert wurde, konnte für die Katalyse durch die SMT ein möglicher Mechanismus abgeleitet werden. Proteine und Gene, die zu dieser Familie von Peptidasen gehören, wurden bereits aus verschiedenen pflanzlichen und anderen Organismen isoliert und zum Teil sehr genau charakterisiert (Zuber und Matile 1968; Breddam 1986; Remington 1993, 1998; Breddam und Remington 1994; Rawlings und Barrett 1994; Breddam *et al.* 1998; Lehfeldt *et al.* 2000, und darin zitierte Literatur). Das zeigt z.B. auch die große Anzahl von Sequenzen aus diversen Spezies, die in GenBank deponiert worden sind (s. Abschn. 4.4.3). Viele dieser Enzyme sind in Pflanzen offenbar in den Vakuolen lokalisiert. Es ist daher die Annahme naheliegend, dass sich die SMT aus einer solchen vakuolären Serincarboxypeptidase entwickelt hat. Für die SMT wurde auf biochemischem Wege ja bereits die Lokalisation in der Vakuole festgestellt (s. Abschn. 1.1; Sharma und Strack 1985; Strack und Sharma 1985). Das pH-Optimum dieser Enzyme befindet sich außerdem bei einem Wert von ungefähr sechs (Breddam und Remington 1994; Rawlings und Barrett 1994), was sehr gut übereinstimmt mit dem

der SMT (s. Abschn. 1.1). Die Enzymaktivität von Peptidasen wird normalerweise mit Hilfe von synthetischen Peptidsubstraten bestimmt (Breddam 1986; Breddam und Remington 1994). Daher sind trotz vielfältiger biochemischer Erkenntnisse die Substrate *in vivo* häufig nicht genau bekannt. Es wird deshalb zumeist allgemein eine Funktion im Abbau und in der Prozessierung von Proteinen und Peptiden angenommen. Aus der Klonierung des *SMT*-Gens ergibt sich aber die Frage, ob sich unter diesen Enzymen nicht auch solche befinden, die in Analogie zur *SMT* andere Reaktionen katalysieren.

In den zur Zeit laufenden Genomprojekten wurden außerdem bereits viele Gene gefunden, die eine signifikante Ähnlichkeit zu Serincarboxypeptidasen besitzen. In *Arabidopsis* handelt es sich dabei um mehr als 30 derartige Gene (s. Abschn. 4.4.3). Bei Pflanzen stehen momentan die besten Daten über das Genom von *Arabidopsis* zur Verfügung, das zum großen Teil bereits sequenziert wurde. Es ist aber nicht ausgeschlossen, dass eine größere Anzahl von derartigen Genen auch in anderen Pflanzen vorhanden ist, eventuell darüber hinaus sogar in anderen Organismen. In den Projekten zur Sequenzierung von cDNAs wurden außerdem zahlreiche *Expressed Sequence Tags* (ESTs) von Serincarboxypeptidasen gefunden. So enthält der *Arabidopsis* Gene Index des Instituts for Genomic Research (TIGR; Rockville, Madison, USA) die *Tags* aus dieser Pflanze nach der Korrektur um die Redundanz, die sich durch die zufällige Auswahl der sequenzierten Klone ergibt. In einer am 20.09.2000 durchgeführten Analyse mit der cDNA des *SMT*-Gens (s. Abschn. 4.4.3) wurden aus diesem Index 28 nicht-redundante *Tags* von Serincarboxypeptidasen erhalten. Da jeder dieser *Tags* wahrscheinlich einem exprimierten Gen entspricht, sind in *Arabidopsis* danach mindestens 28 Proteine vorhanden, die eine signifikante Ähnlichkeit zu Serincarboxypeptidasen besitzen. Diese Zahl kann sich noch weiter erhöhen, da die Projekte zur Sequenzierung von *Arabidopsis*-cDNAs noch nicht abgeschlossen sind. Am 20.09.2000 wurde außerdem mit der cDNA des *SMT*-Gens die im Abschnitt 4.4.3 dargestellte Analyse von GenBank wiederholt. In der zu diesem Zeitpunkt gültigen Ausgabe der Datenbank wurden 72 *Arabidopsis*-Gene gefunden, die als potenziell Serincarboxypeptidasen kodierend klassifiziert wurden, wobei bislang mehr als 90 % der genomischen Sequenz dieser Pflanze in GenBank deponiert worden ist. Auch wenn ein Teil dieser Gene womöglich keine Funktion besitzt, wie zum Teil vielleicht diejenigen in der Umgebung des *SMT*-Gens (s.o.), ist auch hier erneut die Frage berechtigt, ob es sich bei diesen Genen und Proteinen nur um Peptidasen handelt. Das Beispiel der *SMT* macht deutlich, dass die in Genomprojekten durchgeführte Einordnung dieser Gene durch Sequenzvergleiche keinen sicheren Schluss auf die *in vivo* tatsächlich ausgeübte Funktion der kodierten Proteine zulässt.

Vergleichbare Reaktionen wie die Transacylierung, die von der *SMT* im Stoffwechsel der Sinapinsäureester einiger *Brassicaceen* katalysiert wird, sind auch aus anderen Bereichen des phenolischen Stoffwechsels bekannt. Wie bei der *SMT* stellt auch in diesen Fällen ein 1-*O*-Glucoseester die aktivierte Form des zu übertragenden Acylrestes dar. So kann die Biosynthese der Chlorogensäure, einer weit verbreiteten phenolischen Verbindung, über den Thioester der Kaffeesäure mit Coenzym A, aber auch über 1-*O*-Kaffeoyl- $\beta$ -D-glucose erfolgen. Ein Transfer,

der vom 1-*O*-Glucoseester ausgeht, wurde z.B. für eine Transferase in *Ipomoea batatas* (Süßkartoffel) gefunden (Villegas und Kojima 1986). Entsprechend wird in der Biosynthese von Gallotanninen die Gallussäure in der Form des 1-*O*-Glucoseesters ( $\beta$ -Glucogallin) aktiviert (Gross 1983). An dieser Biosynthese sind mehrere regiospezifische Acyltransferasen beteiligt. Neben der SMT und SCT wurde im Stoffwechsel der Sinapinsäureester von *Raphanus sativus* eine weitere Acyltransferase gefunden. Dieses Enzym katalysiert die Bildung von 1,2-*O*-di-Sinapoyl- $\beta$ -D-glucose unter Disproportionierung der 1-*O*-Sinapoyl- $\beta$ -D-glucose (Strack *et al.* 1984; Dahlbender und Strack 1986). Eines der beiden Moleküle wirkt dabei als die aktivierte Form des zu übertragenden Sinapoylrestes. Wie von Strack und Mock (1993), Lehfeldt *et al.* (2000) und Steffens (2000) ausgeführt, sind zudem diverse weitere Transacylierungen von Hydroxyzimtsäuren mit einem 1-*O*-Glucoseester als Substrat aus dem phenolischen und anderen Bereichen des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels bekannt. Eine analoge Reaktion wurde auch im Stoffwechsel des Hormons Indol-3-yl-essigsäure (IES) in *Zea mays* (Mais) gefunden. Die Bildung des Konjugats IES-*myo*-Inositol erfolgt dabei durch eine Transferase, die als Substrat IES- $\beta$ -D-glucose verwendet (Michalczuk und Bandurski 1982). Es ist daher nicht auszuschließen, dass sich auch unter diesen Acyltransferasen solche befinden, die in Analogie zur SMT aus Serincarboxypeptidasen entstanden sind. Die für diese Reaktionen erforderlichen 1-*O*-Glucoseester der Acylreste werden dabei vermutlich durch spezifische Glucosyltransferasen wie z.B. der SGT synthetisiert (s. Abschn. 1.1), die von Uridin-5'-diphosphat (UDP)-Glucose abhängig sind.

Enzyme, die sich wie die SMT im Stoffwechsel der Sinapinsäureester aus dem Gen einer Serincarboxypeptidase entwickelt haben, aber eine andere Reaktion als die Peptidhydrolyse katalysieren, sind bislang noch aus zwei weiteren Bereichen des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels isoliert worden. In einem Fall handelt es sich um eine Reihe von Acyltransferasen, die in den Trichomen verschiedener Arten an der Biosynthese von 2,3,4-tri-*O*-Acylglucoseestern beteiligt sind (Ghangas und Steffens 1993). Eines dieser Enzyme wurde aus *Lycopersicon pennellii* (Wildtomate) bis zur Homogenität aufgereinigt (Li *et al.* 1999), was die Klonierung der cDNA ermöglichte (GenBank Nr. AAF64227). Davon ausgehend wurden drei ähnliche cDNAs aus *Solanum berthaultii* isoliert (GenBank Nrn. AF006078, AF006079 u. AF006080). Bei den zu übertragenden Acylgruppen handelt es sich in diesem Fall um verschiedene Fettsäuren, und nicht um eine Hydroxyzimtsäure wie bei der SMT. Diese Ergebnisse zeigen, dass Serincarboxypeptidasen sich offenbar zu Acyltransferasen mit ganz unterschiedlicher Substratspezifität weiterentwickeln konnten. Die gebildeten Polyester werden sekretiert und sind an der Abwehr gegen diverse Pathogene beteiligt. Die cDNA der Acyltransferase aus *L. pennellii* wurde mittlerweile in aktiver Form in *Saccharomyces cerevisiae* exprimiert (Li und Steffens 2000). Die heterolog exprimierte cDNA und das aus der Pflanze aufgereinigte Enzym katalysieren beide die Disproportionierung eines 1-*O*- $\beta$ -Acylglucoseesters, wobei in regiospezifischer Weise der 1,2-di-*O*-Acylglucoseester gebildet wird. Es ist interessant, dass im Stoffwechsel der Sinapinsäureester ein Enzym existiert, das eine vergleichbare Reaktion katalysiert (s.o.), dessen Gen

aber bisher nicht bekannt ist. Die aus *L. pennellii* aufgereinigte Acyltransferase wird weiterhin durch Diisopropylfluorophosphat (DFP) vollständig inhibiert, hat aber anscheinend die Aktivität als Peptidase verloren. Das zeigten Enzymtests mit gängigen, synthetischen Peptidsubstraten (Li und Steffens 2000). DFP ist wie Phenylmethanolsulfonylfluorid (PMSF) (s.o.) ein potenter Inhibitor der Aktivität von zahlreichen Serinpeptidasen und reagiert in gleicher Weise nur mit dem Serin im aktiven Zentrum des Enzyms (Barrett 1994). Die Inhibition der Acyltransferase aus *L. pennellii* durch DFP zeigt damit, dass wie im Falle der SMT (s.o.) offenbar ein Serinrest an der Katalyse beteiligt ist. Damit ging sehr wahrscheinlich auch bei dieser Acyltransferase der katalytische Mechanismus aus dem der Serincarboxypeptidasen hervor. In den Enzymtests für diese Acyltransferase wurde als Substrat 1-*O*-Isobutyl- $\beta$ -D-glucose verwendet. Versuche von Li und Steffens (2000) haben gezeigt, dass diese Verbindung von der Carboxypeptidase Y aus *S. cerevisiae* und der Serincarboxypeptidase II aus *Triticum aestivum* nicht umgesetzt wird, so dass diese Enzyme, wie es scheint, keine Aktivität als Acyltransferase besitzen. Die Acyltransferase aus *L. pennellii* hat damit vermutlich unter Verlust der ursprünglichen katalytischen Funktion eine neue ausgebildet, die in dem evolutionären Vorläufer noch nicht angelegt war (Steffens 2000).

In dem anderen Fall (s.o.) handelt es sich um eine Hydroxynitril-Lyase (EC 4.1.2) aus *Sorghum bicolor* (Wajant *et al.* 1994; GenBank Nr. P52708). Das Enzym ist am Abbau des von dieser Pflanze produzierten, cyanogenen Glukosids (Dhurrin) beteiligt. Durch die Lyase-Reaktion wird Blausäure (HCN) freigesetzt, welches eine wichtige Rolle spielt in der Abwehr von Pathogenen. Diese Reaktion besitzt eine geringere Ähnlichkeit zu der Peptidhydrolyse als ein Acyltransfer, dennoch sind in der Sequenz des Enzyms an äquivalenten Positionen dieselben, potenziell katalytisch aktiven Aminosäuren vorhanden wie in der SMT (Lehfeldt *et al.* 2000). Die Lyase wird zudem, wie die Acyltransferase aus *Lycopersicon pennellii* (s.o.), durch Diisopropylfluorophosphat (DFP) inhibiert. Ein Mechanismus für die von diesem Enzym katalysierte Reaktion mit Beteiligung eines Serinrestes wurde von Wajant und Pfizenmaier (1996) vorgeschlagen. Die deprotonierte Hydroxylgruppe des Serins wirkt demnach in dieser Katalyse als Base, welche die Hydroxylgruppe des  $\alpha$ -Hydroxynitrils angreift, womit unter Abspaltung von HCN die Ausbildung der Carbonylgruppe begünstigt wird. Das Beispiel dieser Lyase zeigt, dass ausgehend von Serincarboxypeptidasen im Verlauf der Evolution sogar verschiedene neue katalytische Fähigkeiten entwickelt worden sind. Fast alle bisher analysierten Lyasen dieser Art werden zudem durch Substanzen gehemmt, die als spezifische Inhibitoren des aktiven Serins oder Histidins der katalytischen Triade bekannt sind (Wajant und Pfizenmaier 1996). Nicht alle diese Enzyme wurden bereits kloniert, so dass noch weitere Lyasen, die eine Gruppe von Enzymen mit sehr heterogener Abstammung darstellen, aus Serincarboxypeptidasen entstanden sein könnten. Die Existenz der beiden Enzyme aus *L. pennellii* und *S. bicolor* macht insgesamt deutlich, dass es sich bei der SMT offenbar nicht um einen Einzelfall im pflanzlichen Sekundärstoffwechsel handelt. Vielmehr wurden Enzyme, die aus diesen Peptidasen entstanden sind, in

andere Bereiche dieses Stoffwechsels integriert, deren Produkte unterschiedliche biologische Funktionen erfüllen.

Die Klonierung und Analyse des Gens der SMT hatte gezeigt, dass diese Acyltransferase aus dem Stoffwechsel der Sinapinsäureester in *Arabidopsis* aus einer Serincarboxypeptidase entstanden ist. Dabei handelt es sich um eine sehr konservierte Familie von Enzymen, deren Vertreter vermutlich in allen Eukaryonten zu finden sind und die im primären Stoffwechsel essentielle biologische Funktionen erfüllen. Das Beispiel der SMT macht deutlich, dass diese Enzyme im Verlauf der Evolution die Fähigkeit zur Katalyse von Transacylierungen erworben haben. Damit verbunden war die Integration in den pflanzlichen Sekundärstoffwechsel, woraus sich auch eine neue biologische Funktion ergeben hat. Wie das Beispiel einer Lyase zeigt, ist das katalytische Spektrum dabei nicht nur in Richtung eines Acyltransfers erweitert worden. Verschiedene Beobachtungen und Überlegungen führen zu dem Schluss, dass insbesondere im Sekundärstoffwechsel noch weitere Enzyme wie die SMT vorhanden sein können. Aufgrund der großen Anzahl unterschiedlicher Reaktionen muss besonders beim Sekundärstoffwechsel der Bedarf an Genen im Verlauf der Evolution groß gewesen sein, um das jetzt vorhandene katalytische Potential zu erzeugen. Es ist deshalb vermutlich nicht erstaunlich, dass sich gerade in diesem Bereich aktuelle Beispiele finden, in denen ausgehend von Serincarboxypeptidasen Enzyme mit neuen katalytischen Eigenschaften entstanden sind. Diese gewähren damit einen Einblick in den Ablauf der Evolution von Stoffwechselwegen und Enzymen. Eine solche Veränderung des katalytischen Spektrums könnte auch derartige Enzyme in nichtpflanzlichen Organismen, anderen Serinpeptidasen-Familien und die gesamte heterogene Gruppe von häufig hydrolytischen Enzymen betreffen, in denen ein analoges katalytisches System wie in Serinpeptidasen wirksam ist (Dodson und Wlodawer 1998). Die Klonierung des Gens der SMT, einem Enzym, das bisher nur in vier Arten aus der Familie der *Brassicaceen* nachgewiesen wurde, hat zu diesen Erkenntnissen von allgemeiner Bedeutung einen wichtigen Beitrag geleistet.

### 5.3 Zukünftige Arbeiten

Die Klonierung des *SMT*-Gens legt es nahe, die Gene anderer Enzyme aus dem Stoffwechsel der Sinapinsäureester in gleicher Weise aus einer Mutante von *Arabidopsis* zu isolieren. Mittlerweile wurde aus der Mutante *sng2* (s. Abschn. 5.2 u. Abb. 1) auf dem positionellen Weg das in diesem Fall betroffene Gen kloniert (Shirley *et al.* 2000). Dieses Gen, das wahrscheinlich die SCT kodiert, weist wie das *SMT*-Gen eine signifikante Ähnlichkeit zu Serincarboxypeptidasen auf. Sollte sich bestätigen, dass es sich hierbei um die SCT handelt, wäre das ein weiterer wichtiger Beleg für die Schlussfolgerungen, die aus der Klonierung des *SMT*-Gens gezogen worden sind (s. Abschn. 5.2). Der Ausfall des *SMT*-Gens und (potenziell) des Gens der SCT hat die Lebensfähigkeit der dazugehörigen Mutanten zumindest bei Anzucht unter den künstlichen Bedingungen im Labor nicht beeinträchtigt. Es ist daher die Annahme berechtigt, dass Mutanten dieser Art auch für die Enzyme SCE und SGT isoliert werden können, sofern es sich nicht um redundante Gene handelt. Das sollte auf einem ähnlichen Weg möglich sein wie bei der SMT

(s. Abschn. 1.2.2) oder SCT. Davon ausgehend könnten auch diese Gene kloniert werden, eventuell in gleicher Weise aus einer T-DNA-Mutante. Das hängt allerdings davon ab, ob wie bei der *sng1*-Mutante ein Phänotyp vorhanden ist, durch den eine solche Mutante identifiziert werden kann (s. Abschn. 1.2.2). Sollte das nicht der Fall sein, könnten diese Gene positionell kloniert werden, wie das in der *sng2*-Mutante betroffene Gen.

Ausgehend von den vorliegenden Kenntnissen über Serincarboxypeptidasen ließ sich eine erste Vorstellung entwickeln, wie durch die SMT anstatt der Hydrolyse einer Peptidbindung ein Acyltransfer katalysiert werden könnte. Der genaue Mechanismus dieser Katalyse müsste aber durch weitere Analysen erst noch aufgeklärt werden. Dazu sind die gleichen Methoden geeignet, mit denen der Mechanismus bei Serincarboxypeptidasen untersucht worden ist (Bredam 1986; Remington 1993, 1998; Breddam und Remington 1994; Ferry *et al.* 1994; Breddam *et al.* 1998; Voet und Voet 1998). Das beinhaltet unter anderem die kinetische Analyse der SMT mit dem Einsatz von geeigneten Substraten und Inhibitoren, die spezifische Mutagenese sowie die Kristallisation und Bestimmung der räumlichen Struktur. Dafür ist es von Vorteil, dass die SMT bereits in einer geringen Menge in aktiver und löslicher Form in *E. coli* exprimiert werden konnte (s. Abschn. 5.2). Diese Expression lässt sich eventuell noch in der Weise optimieren, dass die rekombinante SMT mit einem His-Tag versehen und in einer größeren Menge durch Affinitätschromatographie zur Homogenität aufgereinigt werden kann. Damit könnten die erwähnten Experimente durchgeführt werden, und es ließe sich z.B. untersuchen, ob die SMT noch eine Peptidase-Aktivität besitzt.

Das in *E. coli* in großer Menge unlöslich und inaktiv in Einschlusskörpern akkumulierende, rekombinante Protein (s. Abschn. 4.5.2) könnte außerdem zur Herstellung eines polyklonalen Antikörpers verwendet werden. Ein SMT-spezifischer Antikörper würde es ermöglichen, die subzelluläre Lokalisation der SMT immunhistochemisch zu ermitteln. Dadurch könnte, an die biochemischen Analysen anschließend (s. Abschn. 1.1; Sharma und Strack 1985; Strack und Sharma 1985), der eindeutige Beweis erbracht werden, dass es sich um ein vakuoläres Enzym handelt. Mit Hilfe des Antikörpers könnte anschließend auch der Mechanismus des vakuolären *Targeting* der SMT untersucht werden. Das betrifft insbesondere die bisher nicht bekannten Abschnitte in der Sequenz, die den Transport des Enzyms in die Vakuole bewirken. Diese Prozesse sind in Pflanzen noch nicht hinreichend aufgeklärt und stellen einen Gegenstand der aktuellen Forschung dar (Vitale und Raikhel 1999).

## 6 Zusammenfassung

Ester der Sinapinsäure sind eines der löslichen Produkte des phenolischen Stoffwechsels in Pflanzen. Ihr Vorkommen ist typisch für viele Arten aus der Familie der *Brassicaceen* (Kreuzblütler). Sie spielen eine wichtige Rolle als Schutzfilter gegen schädigende UV-Strahlung in *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. (Ackerschmalwand). Im Wildtyp dieser Pflanze ist 1-*O*-Sinapoyl- $\beta$ -D-glucose die Vorstufe von 2-*O*-Sinapoyl-L-malat, das hauptsächlich in der oberen Epidermis der Blätter akkumuliert. Die Umwandlung dieser Ester wird katalysiert von der 1-*O*-Sinapoyl- $\beta$ -D-glucose:L-Malat-Sinapoyltransferase (SMT, EC 2.3.1.92). Weiterhin wurde die SMT in *Raphanus sativus* (Radieschen), *Brassica rapa* (Rübsen) und *Brassica napus* (Raps) nachgewiesen. Die *Arabidopsis*-Mutante *sinapoylglucose accumulator1 (sng1)* akkumuliert Sinapoylglucose anstelle von Sinapoylmalat, was zu der Annahme führte, dass durch das *SNG1*-Gen die SMT kodiert wird. Um dieses Gen zu klonieren, wurde in der Sammlung des *Arabidopsis* Biological Resource Centers (ABRC) an der Ohio State University (Columbus, Ohio, USA) eine T-DNA-Mutante mit *sng1*-Phänotyp identifiziert. Durch inverse PCR konnte daraus ein Fragment genomischer DNA isoliert werden, das von der T-DNA-Insertion stammte. Mit dieser DNA wurde aus einer genomischen Bibliothek von *Arabidopsis* ein Cosmid erhalten, das die *sng1*-Mutante nach Transformation (Vakuuminfiltration mit *Agrobacterium tumefaciens*) komplementierte. Die 13 kb genomischer DNA des Cosmids befinden sich im Abschnitt 131 (GenBank Nr. AC004401) des Chromosoms 2 von *Arabidopsis*, was einer Position bei 38,1 cM (Marker pCC300) auf der Karte Rekombinanter Inzuchtlinien von Lister und Dean entspricht. In einem Gen, das von der DNA kodiert wird, wurde die T-DNA-Insertion in der *sng1*-Mutante gefunden. Ein Fragment genomischer DNA, das nur dieses Gen kodiert, komplementierte die *sng1*-Mutante wie zuvor das Cosmid, auf dem sich noch ein weiteres Gen befand. Das *SNG1*-Gen (GenBank Nr. AAC17816) gehört zu einer Gruppe von fünf sehr ähnlichen, dicht beieinander liegenden Genen. Ein Fragment des *SNG1*-Gens wurde eingesetzt, um in einer Bibliothek aus *Arabidopsis*-Keimlingen eine vollständige cDNA zu isolieren (GenBank Nr. AF275313). Die *SNG1*-cDNA weist eine Größe von 1,5 kb auf, das daraus abgeleitete SNG1-Protein enthält ein N-terminales Peptid von 17 Aminosäuren (ASIVKFLPGFEGPLPFE), das zuvor auch durch Aufreinigung der SMT aus *Brassica rapa* erhalten worden war. Die vor diesem Peptid befindlichen, N-terminalen 19 Aminosäuren wurden als Signalpeptid für das Endoplasmatische Retikulum identifiziert. Das SNG1-Protein besteht aus 433 Aminosäuren, woraus sich eine molare Masse von 49,4 kDa ergibt. Die Expression der *SNG1*-cDNA in *Escherichia coli* zeigte, dass das SNG1-Protein SMT-Aktivität besitzt. Die SNG1-Sequenz weist eine signifikante Ähnlichkeit zu Serincarboxypeptidasen aus diversen Organismen auf (EC 3.4.16, Peptidasen-Familie S10). Die katalytisch aktiven Reste dieser Enzyme sind auch in der Sequenz des SNG1-Proteins vorhanden (Serin 173, Asparaginsäure 358 und Histidin 411, sog. katalytische Triade). Die Aktivität der SMT aus *Arabidopsis* wird durch Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) gehemmt, was die Beteiligung eines Serinrests an der Katalyse zeigt. Die

---

Ergebnisse führten zu dem Schluss, dass die Acyltransferase SMT aus einer Serincarboxypeptidase entstanden ist. Der Mechanismus der Peptidhydrolyse durch diese Enzyme liegt deshalb wahrscheinlich auch der Katalyse durch die SMT zugrunde. Zahlreiche Transacylierungen, in denen analog zur SMT die Aktivierung durch einen 1-*O*- $\beta$ -Acylglucoseester erfolgt, sind insbesondere aus dem phenolischen Stoffwechsel der Pflanzen bekannt. Zwei Enzyme, die ebenfalls aus derartigen Peptidasen entstanden sind, wurden bislang noch an anderer Stelle im pflanzlichen Sekundärstoffwechsel gefunden, eine weitere Acyltransferase in *Lycopersicon pennellii* (Wildtomate) und eine Hydroxynitril-Lyase in *Sorghum bicolor* (Mohrenhirse). Durch das *Arabidopsis*-Genomprojekt konnte außerdem eine große Anzahl von Genen und Proteinen mit Ähnlichkeit zu dieser in Eukaryonten ubiquitären Familie von Peptidasen identifiziert werden. Es ist daher anzunehmen, dass in Pflanzen und eventuell auch darüber hinaus weitere Enzyme wie die SMT vorhanden sind, die aus diesen Peptidasen hervorgegangen sind, aber eine von der Peptidhydrolyse abweichende Reaktion katalysieren und in anderen Stoffwechselwegen divergente biologische Funktionen erfüllen. Die SMT ist damit eines der aktuellen Beispiele, die ein neues Licht werfen auf das katalytische Potential dieser Familie von Enzymen und die einen Einblick bieten in diejenigen Prozesse, die der Evolution von Proteinen und Stoffwechselwegen zugrunde liegen.

## 7 Literaturverzeichnis

**Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ.** 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403-10.

**Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ.** 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389-402.

**An G.** 1987. Binary Ti vectors for plant transformation and promoter analysis. In: Wu R, Grossman L, editors. Volume 153, methods in enzymology: recombinant DNA, part D. San Diego [California, USA]: Academic Press. 292-305.

**Appel RD, Bairoch A, Hochstrasser DF.** 1994. A new generation of information retrieval tools for biologists: the example of the ExPASy WWW server. *Trends Biochem Sci* 215:403-10.

**Azpiroz-Leehan R, Feldmann KA.** 1997. T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis*: going forth and back. *Trends Genet* 13:152-6.

**Bairoch A, Apweiler R.** 2000. The SWISS-PROT protein sequence database and its supplement TrEMBL in 2000. *Nucleic Acids Res* 28:45-8.

**Barnes HJ.** 1996. Maximizing expression of eukaryotic cytochrome P450s in *Escherichia coli*. In: Johnson EF, Waterman MR, editors. Volume 272, methods in enzymology: cytochrome P450, part B. San Diego [California, USA]: Academic Press. p 3-14.

**Barnes WM.** 1994. PCR amplification of up to 35 kb DNA with high fidelity and high yield from bacteriophage  $\lambda$  templates. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:2216-20.

**Barrett AJ.** 1994. Classification of peptidases. Volume 244, methods in enzymology: proteolytic enzymes: serine and cysteine peptidases. San Diego [California, USA]: Academic Press. p 1-15.

**Bechtold N, Ellis J, Pelletier G.** 1993. *In planta Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis* plants. *CR Acad Sci Paris Life Sci* 316:1194-9.

**Behringer FJ, Medford JI.** 1992. A plasmid rescue technique for the recovery of plant DNA disrupted by T-DNA insertion. *Plant Mol Biol Rep* 10:190-8.

**Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Rapp BA, Wheeler DL.** 2000. GenBank. *Nucleic Acids Res* 28:15-8.

**Bent AF, Kunkel BN, Dahlbeck D, Brown KL, Schmidt R, Giraudat J, Leung J, Staskawitz BJ.** 1994. *RPS2* of *Arabidopsis thaliana*: a leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. *Science* 265:1856-60.

**Birnboim HC, Doly J.** 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7:1513-22.

**Bouchereau A, Hamelin J, Lamour I, Renard M, Larher F.** 1991. Distribution of sinapine and related compounds in seeds of *Brassica* and allied genera. *Phytochemistry* 30:1873-81.

**Bradford MM.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-54.

- Brandl W, Herrmann K, Grothjahn L.** 1984. Hydroxycinnamoyl esters of malic acid in small radish (*Raphanus sativus* L. var. *sativus*). *Z Naturforsch* 39c:515-20.
- Breddam K.** 1986. Serine carboxypeptidases: a review. *Carlsberg Res Commun* 51:83-128.
- Breddam K, Mortensen UH, Olesen K.** 1998. Carboxypeptidase C including carboxypeptidase Y. In: Barrett AJ, Rawlings ND, Woessner JF, editors. *Handbook of proteolytic enzymes*. San Diego [California, USA]: Academic Press. p 389-93.
- Breddam K, Remington SJ.** 1994. Carboxypeptidase C and D. In: Barrett AJ, editor. Volume 244, *methods in enzymology: serine and cysteine peptidases*. San Diego [California, USA]: Academic Press. p 231-48.
- Budelier K, Schorr J.** 1998. Purification of DNA by anion-exchange chromatography. In: Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K, editors. *Current protocols in molecular biology*. New York [USA]: John Wiley & Sons. p 2.1.11-8.
- Callos JD, DiRado M, Xu B, Behringer FJ, Link BM, Medford JI.** 1994. The *forever young* gene encodes an oxidoreductase required for proper development of the *Arabidopsis* shoot apex. *Plant J* 6: 835-47.
- Chapple CCS, Shirley BW, Zook M, Hamerschmidt R, Somerville SC.** 1994. Secondary metabolism in *Arabidopsis*. In: Meyerowitz EM, Somerville CR, editors. Volume 27, *Cold Spring Harbor monograph series: Arabidopsis*. Plainview [New York, USA]: Cold Spring Harbor Laboratory Press. p 989-1030.
- Chapple CCS, Vogt T, Ellis BE, Somerville CR.** 1992. An *Arabidopsis* mutant defective in the general phenylpropanoid pathway. *Plant Cell* 4:1413-24.
- Collins FS, Weissman SM.** 1984. Directional cloning of DNA fragments at a large distance from an initial probe: a circularisation method. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:6812-6.
- Dahlbender B, Strack D.** 1984. Nitrogen nutrition and the accumulation of free and sinapoyl-bound malic acid in *Raphanus sativus* cotyledons. *Planta* 161:142-7.
- Dahlbender B, Strack D.** 1986. Purification and properties of 1-(hydroxycinnamoyl)-glucose:1-(hydroxycinnamoyl)-glucose-hydroxycinnamoyltransferase from radish *Raphanus sativus* seedlings. *Phytochemistry* 25:1043-6.
- Deng XW, Matusi M, Wei N, Wagner D, Chu AM, Feldmann KA, Quail PH.** 1992. *COP1*, an *Arabidopsis* regulatory gene, encodes a protein with both a zinc-binding motif and a G<sub>B</sub> homologous domain. *Cell* 71:791-801.
- Dodson G, Wlodawer A.** 1998. Catalytic triads and their relatives. *Trends Biochem Sci* 23:347-52.
- Douglas CJ.** 1996. Phenylpropanoid metabolism and lignin biosynthesis: from weeds to trees. *Trends Plant Sci* 1:171-8.
- Dower WJ, Miller JF, Ragsdale CW.** 1988. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* 16:6127-45.
- Doyle JJ, Doyle JL.** 1990. A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. *Focus* 12: 13-5.

- Feinberg AP, Vogelstein B.** 1983. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Analyt Biochem* 132:6-13.
- Feldmann KA.** 1991. T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis*: mutational spectrum. *Plant J* 1: 71-82.
- Feldmann KA.** 1992. T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis*: seed infection/transformation. In: Koncz C, Chua NH, Schell J, editors. *Methods in Arabidopsis Research*. Singapore [Republik of Singapore]: World Scientific Publishing. p 274-89.
- Feldmann KA, Dilkes BP.** 1998. Cloning genes from T-DNA tagged mutants. In: Martinez-Zapater JM, Salinas J, editors. Volume 82, *methods in molecular biology: Arabidopsis protocols*. Totowa [New Jersey, USA]: Humana Press. p 339-51.
- Feldmann KA, Malmberg RL, Dean C.** 1994. Mutagenesis in *Arabidopsis*. In: Meyerowitz EM, Somerville CR, editors. *Arabidopsis*. Plainview [New York, USA]: Cold Spring Harbor Laboratory Press. p 137-72.
- Feldmann KA, Marks MD.** 1987. *Agrobacterium*-mediated transformation of germinating seeds of *Arabidopsis thaliana*: a non-tissue culture approach. *Mol Gen Genet* 208:1-9.
- Ferry PA, Whitt SA, Tobin JB.** 1994. A low-barrier hydrogen bond in the catalytic triad of serine proteases. *Science* 264:1927-30.
- Flanders DJ, Weng S, Fabien XP, Cherry JM.** 1998. AtDB, the *Arabidopsis thaliana*-Database, and graphical-web-display of progress by the *Arabidopsis* Genome Initiative. *Nucleic Acids Res* 28:80-4.
- Foster GD, Twell D,** editors. 1996. *Plant gene isolation: principles and practice*. Chichester [West Sussex, UK]: John Wiley & Sons. 426 p.
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K.** 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* 50:151-8.
- Gasch A, Aoyama T, Foster R, Chua NH.** 1992. Gene isolation with the polymerase chain reaction. In: Koncz C, Chua NH, Schell J, editors. Singapore [Republik of Singapore]: World Scientific Publishing. p 342-56.
- Ghangas GS, Steffens JC.** 1993. UDP-glucose:fatty acid transglucosylation and transacylation in triacylglycerol biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:9911-5.
- Goldsbrough PB, Cullis CA.** 1981. Characterization of the genes for ribosomal RNA in flax. *Nucleic Acids Res* 9:1301-9.
- Gräwe W, Bachhuber P, Mock HP, Strack D.** 1992. Purification and characterization of sinapoyl-glucose:malate-sinapoyltransferase from *Raphanus sativus*. *Planta* 187:236-41.
- Gross GG.** 1983. Synthesis of mono-, di- and trigalloyl- $\beta$ -D-glucose by  $\beta$ -glucogallin-dependent galloyltransferases from oak leaves. *Z Naturforsch* 38c:519-23.
- Hadjeb N, Berkowitz GA.** 1996. Preparation of T-overhang vectors with high PCR product cloning efficiency. *Biotechniques* 20:20-2.

- Hahlbrock K, Scheel D.** 1989. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annu Rev Plant Physiol Mol Biol* 40:347-69.
- Heilig JS, Elbing KL, Brent R.** 1998. Large-scale preparation of plasmid DNA. In: Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K, editors. *Current protocols in molecular biology*. New York [USA]: John Wiley & Sons. p 1.7.1-16.
- Herrmann KM, Weaver LM.** 1999. The shikimate pathway. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50:473-503.
- Hofmann K, Bucher P, Falquet L, Bairoch A.** 1999. The Prosite database, its status in 1999. *Nucleic Acids Res* 27:215-9.
- Humphreys JM, Hemm MR, Chapple C.** 1999. New routes for lignin biosynthesis defined by biochemical characterisation of recombinant ferulate-5-hydroxylase, a multifunctional cytochrome P450-dependent monooxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:10045-50.
- Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ,** editors. 1990. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. San Diego [California, USA]: Academic Press. 482 p.
- Inoue H, Nojima H, Okayama H.** 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96:23-8.
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW.** 1987. GUS fusions:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* 6:3901-7.
- Jürgens G.** 1998. Modellsysteme: *Arabidopsis*. In: Seyffert W, editor. *Lehrbuch der Genetik*. Heidelberg [Germany]: Spektrum Akademischer Verlag. p 263-81.
- Koncz C, Chua NH, Schell J,** editors. 1992. *Methods in Arabidopsis research*. Singapore [Republik of Singapore]: World Scientific Publishing. 482 p.
- Landry LG, Chapple CCS, Last R.** 1995. *Arabidopsis* mutants lacking phenolic sunscreens exhibit enhanced ultraviolet-B injury and oxidative damage. *Plant Physiol* 109:1159-66.
- Lehfeldt C, Shirley AM, Meyer K, Ruegger MO, Cusumano, JC, Viitanen PV, Strack D, Chapple C.** 2000. Cloning of the *SNG1* gene of *Arabidopsis* reveals a role for a serine carboxypeptidase-like protein as an acyltransferase in secondary metabolism. *Plant Cell* 12:1295-1306.
- Leube MP.** 1996. Charakterisierung des ABI1 Genproduktes aus *Arabidopsis thaliana* und Identifizierung eines *in vivo* interagierenden potenziellen Transkriptionsfaktors [dissertation]. Zürich [Swiss]: Eidgenössische Technische Hochschule. 141 p.
- Li AX, Eannetta N, Ghangas GS, Steffens JC.** 1999. Glucose polyester biosynthesis. Purification and characterization of a glucose acyltransferase. *Plant Physiol* 121:453-60.
- Li AX, Steffens JC.** 2000. An acyltransferase catalyzing the formation of diacylglucose is a serine carboxypeptidase-like protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:6902-7.
- Lin X, Kaul S, Rounsley S, Shea TP, Benito MI, Town CD, Fujii CY, Mason T, Bowman CL, Barnstead M** and others. 1999. Sequence and analysis of chromosome 2 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 402:761-8.

- Lindsay K, Topping JF.** 1996. T-DNA-mediated insertional mutagenesis. In: Foster GD, Twell D, editors. Plant gene isolation: principles and practice. Chichester [West Sussex, UK]: John Wiley & Sons. p 275-99.
- Linscheid M, Wendisch D, Strack D.** 1980. The structures of sinapic acid esters and their metabolism in cotyledons of *Raphanus sativus*. *Z Naturforsch* 35c:907-14.
- Lister C, Dean C.** 1993. Recombinant inbred lines for mapping RFLP and phenotypic markers in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 4:745-50.
- Lorenzen M, Racicot V, Strack D, Chapple C.** 1996. Sinapic acid ester metabolism in wildtype and a sinapoylglucose-accumulating mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 112:1625-30.
- Martinez-Zapater JM, Salinas J.** 1998. Volume 82, methods in molecular biology: *Arabidopsis* protocols. Totowa [New Jersey, USA]: Humana Press. 440 p.
- McCoy J, LaVallie E.** 1994. Expression and purification of thioredoxin fusion proteins. In: Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K, editors. Current protocols in molecular biology. New York [USA]: John Wiley & Sons. p 16.8.1-14.
- Meinke DW, Cherry JM, Dean C, Rounsley SD, Koorneef M.** 1998. *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis. *Science* 282:679-82.
- Meyer K.** 1994. Positional cloning of the *ABII* locus of *Arabidopsis thaliana* using yeast artificial chromosomes [dissertation]. Zürich [Swiss]: Eidgenössische Technische Hochschule. 161 p.
- Meyer K, Cusumano JC, Somerville CR, Chapple CSC.** 1996. Ferulate-5-hydroxylase from *Arabidopsis thaliana* defines a new family of cytochrome P450-dependent-monooxygenases. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:6869-74.
- Meyer K, Leube MP, Grill E.** 1994. A protein phosphatase 2C involved in ABA signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. *Science* 264:1452-5.
- Meyer K, Shirley AM, Cusumano JC, Bell-Lelong DA, Chapple C.** 1998. Lignin monomer composition is determined by the expression of a cytochrome P450-dependent monooxygenase in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:6619-23.
- Meyerowitz EM, Somerville CR,** editors. 1994. Volume 27, Cold Spring Harbor monograph series: *Arabidopsis*. Plainview [New York, USA]: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1300 p.
- Michalczuk L, Bandurski RS.** 1982. Enzymatic synthesis of 1-*O*-indol-3-yl-acetyl- $\beta$ -D-glucose and indol-3-yl-acetyl-*myo*-inositol. *Biochem J* 207:273-81.
- Mock HP, Strack D.** 1993. Energetics of the uridine 5'-diphosphoglucose:hydroxycinnamic acid acylglucosyltransferase reaction. *Phytochemistry* 32:575-9.
- Mock HP, Vogt T, Strack D.** 1992. Sinapoylglucose:malate-sinapoyltransferase activity in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica rapa*. *Z Naturforsch* 47c:680-2.
- Moore D, Chory J, Ribando RH.** 1994. Isolation and purification of large DNA restriction fragments from agarose gels. In: Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K, editors. Current protocols in molecular biology. New York [USA]: John Wiley & Sons. p 2.6.1-12.

- Murashige T, Skoog F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15:473-97.
- Nakai K, Kanehisa M.** 1992. A knowledge base for predicting protein localization sites in eukaryotic cells. *Genomics* 14:897-911.
- Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S, von Heijne G.** 1997. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Engineering* 10:1-6.
- Nielsen, JK, Olsen O, Pedersen LH, Sørensen H.** 1984. 2-*O*-(*p*-Coumaroyl)-L-malate, 2-*O*-caffeoyl-L-malate and 2-*O*-feruloyl-L-malate in *Raphanus sativus*. *Phytochemistry* 23:1741-3.
- Nurmann G, Strack D.** 1979. Sinapine esterase. I. Characterization of sinapine esterase from cotyledons of *Raphanus sativus*. *Z Naturforsch* 34c:715-20.
- Nurmann G, Strack D.** 1981. Formation of 1-sinapoylglucose by UDP-glucose:sinapic acid-glucosyltransferase from cotyledons of *Raphanus sativus*. *Z Pflanzenphysiol* 102:11-7.
- Ochmann H, Medhora MM, Garza D, Hartl DL.** 1990. Amplification of flanking sequences by inverse PCR. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, editors. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. San Diego [California, USA]: Academic Press. p 219-27.
- Quackenbush J, Liang F, Holt I, Pertea G, Upton J.** 2000. The TIGR gene indices: reconstruction and representation of expressed gene sequences. *Nucleic Acids Res* 28:141-5.
- Rawlings ND, Barrett AJ.** 1994. Families of serine peptidases. In: Barrett AJ, editor. Volume 244, *methods in enzymology: proteolytic enzymes: serine and cysteine peptidases*. San Diego [California, USA]: Academic Press. p 19-61.
- Regenbrecht J, Strack D.** 1985. Distribution of sinapoylglucose:choline-sinapoyltransferase in the *Brassicaceae*. *Phytochemistry* 24:407-10.
- Remington SJ.** 1993. Serine carboxypeptidases: a new and versatile family of enzymes. *Curr Opin Biotechnol* 4:462-8.
- Remington SJ.** 1998. Carboxypeptidase D. In: Barrett AJ, Rawlings ND, Woessner JF, editors. *Handbook of Proteolytic Enzymes*. San Diego [California, USA]: Academic Press. p 398-401.
- Richter G.** 1998. *Stoffwechselphysiologie der Pflanzen*. 6th ed. Stuttgart [Germany]: Thieme Verlag. Chapter 8, Phenole; p 365-90.
- Ruegger M, Dewey E, Gray WM, Hobbie L, Turner J, Estelle M.** 1998. The TIR1-protein of *Arabidopsis* functions in auxin response and is related to human SKP2 and yeast Grr1p. *Genes Dev* 12: 198-207.
- Ruegger M, Meyer K, Cusumano J, Chapple C.** 1999. Regulation of ferulate-5-hydroxylase expression in *Arabidopsis* in the context of sinapate ester biosynthesis. *Plant Physiol* 119:101-10.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. Plainview [New York, USA]: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1659 p [3 Volumes].
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR.** 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:5463-7.

- Schmidt A, Grimm R, Schmidt J, Scheel D, Strack D, Rosahl S.** 1999. Cloning and expression of a potato cDNA encoding hydroxycinnamoyl-CoA:tyramine-N-(hydroxycinnamoyl)transferase. *J Biol Chem* 274:4273-80.
- Schmidt A, Scheel D, Strack D.** 1998. Elicitor-stimulated biosynthesis of hydroxycinnamoyl-tyramines in cell suspension cultures of *Solanum tuberosum*. *Planta* 205:51-5.
- Sharma V, Strack D.** 1985. Vacuolar localization of 1-sinapoylglucose:L-malate-sinapoyltransferase in protoplasts from cotyledons of *Raphanus sativus*. *Planta* 163:563-8.
- Shirley AM, McMichael CM, Chapple C.** The *SNG2* locus encodes a serine carboxypeptidase-like protein that functions in *Arabidopsis* secondary metabolism [abstract]. In: The North American *Arabidopsis* Steering Committee. 11th International Conference on *Arabidopsis* Research, program and abstracts book; 2000 Jun 24-8; University of Madison-Wisconsin, USA. Madison: [publisher unknown]. p 423. Abstract No. 423.
- Short JM, Fernandez JM, Sorge JA, Huse WD.** 1988. Lambda ZAP: a bacteriophage lambda expression vector with in vivo excision properties. *Nucleic Acids Res* 16:7583-600.
- Steffens JC.** 2000. Acyltransferases in protease's clothing. *Plant Cell* 12:1253-5.
- Strack D.** 1977. Sinapic acid ester fluctuations in cotyledons of *Raphanus sativus*. *Z Pflanzenphysiol* 84:139-45.
- Strack D.** 1980. Enzymatic synthesis of 1-sinapoylglucose from free sinapic acid and UDP-glucose by a cell-free system from *Raphanus sativus* seedlings. *Z Naturforsch* 35c:204-8.
- Strack D.** 1981. Sinapine as a supply of choline for the biosynthesis of phosphatidylcholine in *Raphanus sativus* seedlings. *Z Naturforsch* 36c:215-21.
- Strack D.** 1982. Development of 1-O-sinapoyl- $\beta$ -D-glucose:L-malate-sinapoyltransferase activity in cotyledons of red radish (*Raphanus sativus* L. var. *sativus*). *Planta* 155:31-6.
- Strack D.** 1997. Phenolic metabolism. In: Dey PM, Harborne JB, editors. *Plant Biochemistry*. San Diego [California, USA]: Academic Press. p 387-416.
- Strack D, Dahlbender B, Grotjahn L, Wray V.** 1984. 1,2-Disinapoylglucose accumulated in cotyledons of darkgrown *Raphanus sativus* seedlings. *Phytochemistry* 23:657-9.
- Strack D, Ellis BE, Gräwe W, Heilemann J.** 1990. Sinapoylglucose:malate-sinapoyltransferase activity in seeds and seedlings of rape. *Planta* 180:217-9.
- Strack D, Knogge W, Dahlbender B.** 1983. Enzymatic synthesis of sinapine from 1-O-sinapoyl- $\beta$ -D-glucose and choline by a cell-free system from developing seeds of red radish (*Raphanus sativus* L. var. *sativus*). *Z Naturforsch* 38c:21-7.
- Strack D, Mock HP.** 1993. Hydroxycinnamic acids and lignins. In: Dey PM, Harborne JB, editors. Volume 9, methods in plant biochemistry: enzymes of secondary metabolism; San Diego [California, USA]: Academic Press. p 45-97.
- Strack D, Nurmman G, Sachs G.** 1980. Sinapine esterase. II. Specificity and change of sinapine esterase activity during germination of *Raphanus sativus*. *Z Naturforsch* 35c:963-6.

- Strack D, Pieroth M, Scharf H, Sharma V.** 1985. Tissue distribution of phenylpropanoid metabolism in cotyledons of *Raphanus sativus*. *Planta* 164:507-11.
- Strack D, Reinecke J, Takeuchi S.** 1986. Evidence of a relationship between malate metabolism and activity of 1-sinapoylglucose:L-malate-sinapoyltransferase in radish (*Raphanus sativus* L.) cotyledons. *Planta* 167:212-7.
- Strack D, Sharma V.** 1985. Vacuolar localization of the enzymatic synthesis of hydroxycinnamic acid esters of malic acid in protoplasts from *Raphanus sativus* leaves. *Physiol Plant* 65:45-50.
- Strack D, Tkotz N, Klug M.** 1978. Phenylpropanoid metabolism in cotyledons of *Raphanus sativus* and the effect of competitive in vivo inhibition of L-phenylalanine ammonia-lyase (PAL) by hydroxylamine derivatives. *Z Pflanzenphysiol* 89:343-53.
- Studier FW, Rosenberg AH, Dunn JJ, Dubendorff JW.** 1990. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. In: Goeddel DV, editor. Volume 185, methods in enzymology: gene expression technology. p 60-89.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ.** 1994. CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673-80.
- Tinland B.** 1996. The integration of T-DNA into plant genomes. *Trends Plant Sci* 1:178-184.
- Tkotz N, Strack D.** 1980. Enzymatic synthesis of sinapoyl-L-malate from 1-sinapoylglucose and L-malate by a protein preparation from *Raphanus sativus* cotyledons. *Z Naturforsch* 35c:835-7.
- Topping JF, Lindsey K.** 1997. T-DNA-mediated gene tagging in *Arabidopsis*. In: Hansen E, Harper G, editors. Differentially expressed genes in plants: a bench manual. London: Taylor & Francis. p 83-103.
- Villegas RJA, Kojima M.** 1986. Purification and characterisation of hydroxycinnamoyl- $\beta$ -D-glucose: quinate-hydroxycinnamoyltransferase in the root of sweet potato *Ipomoea batatas*. *J Biol Chem* 261: 8729-33.
- Vitale A, Raikhel NV.** 1999. What do proteins need to reach different vacuoles ? *Trends Plant Sci* 4: 149-55.
- Voet D, Voet JG.** 1998. Biochemistry. 2nd ed. New York [USA]: John Wiley & Sons. Chapter 14.3, serin proteases; p 389-400.
- Vogelstein B, Gillespie D.** 1979. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci* 76:615-9.
- Vogt T, Aebershold R, Ellis BE.** 1993. Purification and characterization of sinapine synthase from seeds of *Brassica napus*. *Arch Biochem and Biophys* 300:622-8.
- Wajant H, Mundry KW, Pfizenmaier K.** 1994. Molecular cloning of hydroxynitrile-lyase from *Sorghum bicolor* (L.). Homologies to serine carboxypeptidases. *Plant Mol Biol* 26:735-46.
- Wajant H, Pfizenmaier K.** 1996. Identification of potential active-site residues in the hydroxynitrile-lyase from *Manihot esculanta* by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* 271:25830-4.

---

**Wang SX, Ellis BE.** 1998. Enzymology of UDP-glucose:sinapic acid-glucosyltransferase from *Brassica napus*. *Phytochemistry* 49:307-18.

**Weaver LM, Herrmann K.** 1997. Dynamics of the shikimate pathway in plants. *Trends Plant Sci* 2: 346-51.

**Wheeler DL, Chappey C, Lash AE, Leipe DD, Madden TL, Schuler GD, Tatusova TA, Rapp BA.** 2000. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res* 28: 10-4.

**Zambrisky P, Joos H, Gentello C, Leemans J, Van Montagu M, Schell J.** 1983. Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J* 2:2143-50.

**Zuber H, Matile PH.** 1968. Acid carboxypeptidases: their occurrence in plants, intracellular distribution and possible function. *Z Naturforsch* 23b:663-5.

## 8 Anhang

### 8.1 Primer

**P1:** GGITCITTTIGTIAARTTYYTICCCIGGITTYGARGGICCIYTICC  
**P2:** GGIAGYTTIGTIAARTTYYTICCCIGGITTYGARGGICCIYTICC  
**P3:** CTCGAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT  
**P4:** GATGCACTCGAAATCAGCCA  
**P5:** GCGCGGAGTCATTACAGTTA  
**P6:** GCACTGCCAAAATAAATATCCA  
**P7:** CTTGGCATATACCTTTTCA  
**P8:** CTTATGAGTATTTCTTCCAGGGTA  
**P9:** AGCAAGTTCAGCCTGGTTAAG  
**P10:** AGGGCCGGGACAATCATA  
**P11:** GGCCCTCGTTCAAGAAAT  
**P12:** GGAGGCCATGGATGATAA  
**P13:** GCCTCTATCGTCAAGTTT  
**P14:** CTCGAGCAGGGGTTGGCCACTGAT  
**P15:** GGAATTCCATATGGCCTCTATCGTGTTT

### 8.2 N-terminales Peptid der SMT aus *Brassica rapa*

ASIVKFLPGFEGPLPFE

8.3 DNA- und Aminosäuresequenz des *SNG1*-Gens von *Arabidopsis* \*

tattttataaagatcctatgtctatccgtaaatggactaatcttttagacacacagagaataataATGAGTTTGAAAATAAA	80
	M S L K I K 6
GTTTCTGCTTCTGCTTGTCTTGTATCATCATGTTGATTCTGCCTCTATCGTCAAGTTTCTTCTCTGGTTTTGAAGGCCCTC	160
F L L L L V L Y H H V D S A S I V K F L P G F E G P	32
TTCCTTTCGAACTTGAAACCGGGTttgtaatttttttttttttaaccaatgcatttatttgtgtatgtaacaagcatt	240
L P F E L E T G	40
cttcttaatgaaggtACATTGGTATTGGTGAGGACGAGAATGTGCAATTTTTCTACTATTTTCATCAAATCTGAAAACAAT	320
Y I G I G E D E N V Q F F Y Y F I K S E N N	62
CCAAAAGAAGATCCTCTTCTTATATGGTTAAATGGAGGACCTGGATGTTCTTGTCTTGGTGGTATTATTTTTGAGAACGG	400
P K E D P L L I W L N G G P G C S C L G G I I F E N G	89
taaactttataataataaatttttaatatataatataatctatatatgtatttatttattttttttcttcttt	480
cgctaagcactactttcaccgagttattttaaattggtaaaaaacaaaaatttaggACCGGTGGGTTTGAAGTTTGAAGT	560
	P V G L K F E V 97
GTTCAACGGAAGTGCTCCTTCTTGTCTCTACTACATATTCATGGACAAaggtagccaatagtatgttcatctgtctat	640
F N G S A P S L F S T T Y S W T	113
cacaaaccaaagatacattcttcatccttgaattttgtgtcaattaaagcaaaaataagaaagaaaaaaaaaac	720
aaatttgtgtcaatttctcAGATGGCAAAACATTATATTCTTGGATCAGCCAGTAGGATCTGGCTTCTCCTACTCAAAAAC	800
K M A N I I F L D Q P V G S G F S Y S K T	134
TCCAATTGATAAACTGGTGACATAAGTGAAGTAAAGAGGACCCATGAGTTTCTTCAAAAGgtaataagagaaacttgaa	880
P I D K T G D I S E V K R T H E F L Q K	154
aacgtgtccttaaaagcatttttctctatttgcattgaatttcttgtgaatggtggaattctcttgggtgaaagttatcat	960
cttatttaagtccaagtggtccaagcttaacacattctaatttttttatttgaaccaagcggttgagggtgttttttaaaa	1040
attctgcgtatacagattgtctcattgattataacatccacatctcgactgcattttttttgtttttttttgttagTGGCT	1120
	W L 156
AAGCAGGCATCCACAATATTCTCCAACCCTTTATATGTAGTTGGAGATTCTTATTCGGTATGATTGTCCCGGCCCTCG	1200
S R H P Q Y F S N P L Y V V G D S Y S G M I V P A L	182
TTCAGAAATCTCACAGGtatggttttatcatatcagtcaattaaagtccacttttcttccaatcatttaaccatt	1280
V Q E I S Q G	189
ttgttacttttaacaatatcgacaacggtgcaggAAATTATATATGTTGCGAACCTCTATAAATCTacaggtcattga	1360
	N Y I C C E P P I N L 200
tctttgatttacttcttgtatcacataaatttttgaacaataaataattgatagtaaaatataattttcttaccaaaaca	1440
aaaACAGGGTTATATGCTTGAAACCCCTGTAACATATATGGACTTTGAACAAAACCTCCGCATTCCATATGCTTATGGTA	1520
Q G Y M L G N P V T Y M D F E Q N F R I P Y A Y G	225
TGGGATTAATCTCCGACGAAATCTATGaggtatgaaataaggcatgcttatattgtcactagagagtttaaatatttgac	1600
M G L I S D E I Y	234
gaatcgataactacaagaaaaacattgatttcttatagcaaaaacgtcgaaaaatggttaagaaacagggtatttctac	1680
aattttcctacgaaaaatattggtagtaaattgtccataggaaataaataattggttaggaatttggttaggaatgtctcga	1760
gagtcctgtctgagtttacttatatggtagcaaatgtctcgcgagtccttctctgagttttgttatttattgtatccta	1840

```

taataacatgattgaaacttgccatttcgaagcctcaaacgaaataataactggttcgaaactttcatcaaaaataataata 1920
ataatTTTTTTTTTTTTTcaagaataataataattggtcaaaactcttttggtgcAGCCAATGAAGAGAATCTGCAA 2000
                                     E P M K R I C N 242
CGGAAATTATTACAATGTGGATCCATCTAACACACAATGTTTGAAACTTACTGAAGAATATCATAAGgtacatcacactc 2080
  G N Y Y N V D P S N T Q C L K L T E E Y H K 264
agaaatttggctgatacttttatttatttattgttcttttatatatcattactaattccgatttttgtttatccacagTG 2160
                                     C 265
CACTGCCAAAATAAATATCCATCACATATTAACACCAGATTGCGATGTAACCAATGTAACATCTCCTGATTGTTATgtaa 2240
  T A K I N I H H I L T P D C D V T N V T S P D C Y 290
gtaatatctctttcctccaaaataatTTTTTgacagattttgaaaacctatttatgtaaagtacctcagctgcaacat 2320
ctatttagttataaaaactaagaacgtactaaaatggatgaaatcaaagttaaactatgtgtggatatattttgacat 2400
ttcaaagaacatatttacaaggttgcttttgcagTATTATCCATATCATCTCATTGAATGTTGGGCTAACGACGAGAGC 2480
                                     Y Y P Y H L I E C W A N D E S 305
GTTTCGGAAGCTCTTCATATTGAAAaggtatatgccagtttaaatttaagattattgatcaaggaagtttctaattta 2560
  V R E A L H I E 313
aattaaggacgatctatgattacAGGGTAGTAAAGGAAAATGGGCGCGATGTAATCGGACTATTCCATACAATCACGACA 2640
                                     K G S K G K W A R C N R T I P Y N H D 332
TTGTAAGCAGCATACCATATCACATGAATAACAGCATCAGTGGATACCGATCTCTTATTTACAGgtttgattttaaatta 2720
  I V S S I P Y H M N N S I S G Y R S L I Y S 354
cttatcaattttaactcaaactcagctcttaggttagagttaaacctgaatcttatttttaagagctggttttatacaact 2800
acaagtaggattgggcaaaatTTTataagctgatagatcgaaagtttagtaaagtttaattttaaaatttcctgtttca 2880
aaaaagcacatacaaggaacaaatataatagtactacataaatatcaaatttattcaaactattataatttatataata 2960
ttatttttcaaacgacaaccgaaaacaagagaatTTTTTcaaactgaaccaaaccgaaatggaactacaaatggtttttt 3040
ttttttttggatagtttctgtaaaaacataaaacctaatggatcataccgaaacaaaattgtaactctgaggtttta 3120
tacaacttgtctgatttatgggtgaacagTGGTGATCAGCAGATCGCGGTCCCTTTTCTTGCAACTCAAGCCTGGATAAGA 3200
                                     G D H D I A V P F L A T Q A W I R 371
TCTCTCAATTACTCCCCATTATAACTGGAGGCCATGGATGATAACAATCAAATCGCTGGgtaatatatatctatTTT 3280
  S L N Y S P I H N W R P W M I N N Q I A G 392
Tcctgttttataatagtctctcttgtttattcatattttagtcatatcacaaacttatgaactcagtaaaaatcattt 3360
tttttttacagATACAGGAGCTTATTCCAATAAGATGACATTTGCTACTATCAAAGcaagtgttattttcagttta 3440
                                     Y T R A Y S N K M T F A T I K 407
aacattttttgtgtcactacattacaatgaaagtgtgtttattaatTTTTTTTTTTTactgtttgattatagGGAGG 3520
                                     G G 409
TGGACACACGGCAGAGTATAGACCAAACGAGACCTTTATCATGTTCCAAAGGTGGATCAGTGGCCAACCCCTGtaacaaa 3600
  G H T A E Y R P N E T F I M F Q R W I S G Q P L 433
aggcttatgaccttcacctataattatctaccaactaatatccacgtaagcgcagttggttggtgaaatggttttgt 3680
tgtttgctttgttgacattcttttgtgctttatgttacaattttatgtgttttatgtactacagttcatt 3749

```

\* Sequenz des *SNG1*-Gens von *Arabidopsis* (oben) und aus der cDNA abgeleitete Aminosäuresequenz des *SNG1*-Proteins (unten). – Buchstaben, klein: Introns und nicht translatierte Abschnitte des 5'- und 3'-Endes der cDNA, Buchstaben, groß: Exons mit den kodierten Aminosäuren, Punkte: Abschnitte der Sequenz bestehend aus zehn Basenpaaren.

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt habe und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

**Claus-Ulrich Lehfeldt**

# Lebenslauf

## Angaben zur Person

Name: Lehfeldt  
Vorname: Claus-Ulrich

Anschrift: Große Brunnenstraße 49  
06114 Halle (Saale)  
Tel.: 0345-5227433  
E-Mail: claus.lehfeldt@t-online.de

Geburtsdatum: 15. April 1962  
Geburtsort: Schleswig  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: deutsch

## Angaben zum Bildungsgang

### Schulbildung

1968 bis 1972 Grundschole in Busdorf bei Schleswig  
1972 bis 1977 Gymnasium in Schleswig  
1978 bis 1981 Gymnasium in Kronshagen bei Kiel  
1981 Abitur

### Tätigkeit vor dem Studium

1981 bis 1982 Zivildienst

### Studium

1982 bis 1985 Studium der Biochemie an der Universität Hannover  
1985 Vordiplom  
1985 bis 1990 Studium der Philosophie an der Freien Universität Berlin  
1990 bis 1994 Studium der Biochemie an der Medizinischen Hochschule Hannover  
1994 Diplom

### Weiterbildung

1995 wiss. Mitarbeiter bei der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF) in Braunschweig  
1995 bis 2000 Doktorand am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie (IPB) in Halle (Saale)  
1996 bis 1998 Forschungsaufenthalt an der Purdue University in West Lafayette, Indiana, USA.