

**MOLEKULARE UND
BIOCHEMISCHE ASPEKTE
DER FURANOCUMARINBIOSYNTHESE
IN *AMMI MAJUS* L.**



Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Sandra Kellner

aus München

Marburg/Lahn 2008

Vom Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg
als Dissertation

angenommen am:	12.09.2008
Erstgutachter:	Prof. Dr. Ulrich Matern
Zweitgutachter:	Prof. Dr. Maike Petersen
Tag der mündlichen Prüfung:	12.09.2008

*„Das Gleiche lässt uns in Ruhe,
aber der Widerspruch ist es, der uns produktiv macht.“*

(Johann Wolfgang von Goethe)

Für
meine Eltern, meinen Bruder Stefan und Tristan,
ohne die alles ganz anders gekommen wäre.

Auszüge der vorliegenden Arbeit sind in folgende Veröffentlichungen eingegangen:

Zeitschriftenartikel:

LARBAT, R. *, KELLNER, S. *, SPECKER, S., HEHN, A., GONTIER, E., HANS, J., BOURGAUD, F. & MATERN, U. (2007). Molecular cloning and functional characterization of Psoralen synthase, the first committed Monooxygenase of furanocoumarin biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 282, S. 542-554.

*Gemeinsame Erstautorenschaft

Poster:

KELLNER, S., LARBAT, R., SPECKER, S., HANS, J., MATERN, U. (2006). Isolation and characterization of psoralen synthase - the first P450 involved in furanocoumarin biosynthesis. 8th International Symposium on Cytochrome P450 Biodiversity and Biotechnology, 23.-27. Juli, Swansea (UK)

Vorträge:

HANS, J., KELLNER, S., MATERN, U. (2006). Furanocoumarinbiosynthese in *Ammi majus* – Klonierung und Charakterisierung der Psoralensynthase als erstes spezifisches Cyt P450. Sektionstreffen pflanzliche Naturstoffe, 1.-3. Oktober, Kaub

HANS, J., KELLNER, S., MATERN, U. (2007). Furanocoumarinbiosynthese in *Ammi majus* – Cloning and characterization of psoralen synthase, the first pathway-specific cytochrome P450. Botanikertagung, 3.-7. September, Hamburg

Inhaltsverzeichnis

Tabellen und Abbildungen.....	VIII
Abkürzungen.....	XI
A Einleitung.....	1
A.1 <i>Ammi majus</i> L.....	1
A.1.1 Botanik und Herkunft	1
A.1.2 Pharmazeutische Bedeutung	2
A.2 Furanocumarine.....	3
A.2.1 Biosynthese	3
A.2.2 Vorkommen	10
A.2.3 Ökologische Interaktionen und therapeutische Bedeutung	11
A.2.4 Furanocumarine aus <i>Ammi majus</i>	13
A.2.5 Induktion der Furanocumarinbiosynthese	15
A.3 Cytochrom P450-abhängige Monooxygenasen (Cyt P450)	16
A.3.1 Bedeutung und Klassifizierung	16
A.3.2 Aufbau und Reaktionsmechanismus von P450-Komplexen	18
A.4 Zielsetzung der Arbeit.....	21
B Material und Methoden	23
B.1 Material	23
B.1.1 <i>Ammi majus</i>	23
B.1.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	25
B.1.3 Radiochemikalien.....	25

B.1.4	Referenzsubstanzen, Substrate und Cosubstrate.....	25
B.1.5	Enzyme	26
B.1.6	Reaktionssysteme (Kits)	26
B.1.7	Bakterien- und Hefestämme	27
B.1.8	Vektoren	27
B.1.9	Nährlösungen	28
B.1.10	Puffer und Lösungen	29
B.1.11	Geräte.....	32
B.2	Induktion der Furanocumarinbiosynthese	33
B.3	Molekularbiologische Methoden	34
B.3.1	Gelelektrophorese.....	34
B.3.2	Nukleinsäureisolierung und –reinigung.....	34
B.3.2.1	Gesamt-RNA.....	34
B.3.2.2	gDNA.....	35
B.3.2.3	Plasmid-DNA aus Bakterien und Hefe.....	35
B.3.2.4	Nukleinsäurereinigung.....	36
B.3.3	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	37
B.3.3.1	Standard-PCR und Primer-Design	37
B.3.3.2	Cyt P450-spezifische differentielle ACP-PCR	38
B.3.3.3	5'-RACE	40
B.3.3.4	GeneRACE	41
B.3.3.5	Semiquantitative RT-PCR	42
B.3.4	Mutagenesen	43
B.3.4.1	Austausch der N-Termini	43
B.3.4.2	Punktmutationen	44
B.3.5	DNA-Klonierung in Bakterien.....	45
B.3.6	Sonstige enzymkatalysierte Reaktionen	47
B.3.6.1	Restriktionsverdau.....	47
B.3.6.2	Reverse Transkription	47

B.3.7	Northern und Southern Blot.....	47
B.3.8	Heterologe Genexpression und Proteinsolubilisierung	49
B.3.8.1	Herstellung kompetenter Hefezellen und Transformation	49
B.3.8.2	Anzucht und Induktion transformierter Hefezellen	50
B.3.8.3	Isolierung und Solubilisierung mikrosomal gebundener Proteine	50
B.4	Extraktion und Chromatographie.....	51
B.4.1	Furanocumarin-Extraktion.....	51
B.4.2	Chromatographische Methoden	51
B.4.2.1	Dünnschichtchromatographie	51
B.4.2.2	HPLC.....	52
B.4.2.3	Immobilisierte Metall-Affinitätschromatographie (IMAC).....	52
B.5	Enzymologische Methoden	53
B.5.1	Bestimmung des Gesamtproteingehaltes.....	53
B.5.2	Nachweis der CPR-Aktivität in Hefemikrosomen.....	53
B.5.3	Messung des NADPH-Verbrauchs in Hefemikrosomen.....	53
B.5.4	Kohlenmonoxid-Differenzspektrum	54
B.5.5	Nachweis des Substratumsatzes in Hefemikrosomen	54
B.5.5.1	Standard-Enzymtest.....	54
B.5.5.2	Modifizierte Enzymtests	55
B.5.5.3	Biotransformation.....	55
B.6	Bioinformatik-Programme	56
C	Ergebnisse	57
C.1	Induktionsmuster der Furanocumarinbiosynthese in <i>Ammi majus</i>	
Suspensionskulturen	57	
C.1.1	Einfluss verschiedener Elicitoren.....	57
C.1.2	Zeitliches Induktionsprofil.....	60

C.2	Induktionsmuster und funktionelle Charakterisierung von CYP71AJ1	62
C.3	Differentielle Isolierung potentiell Furanocumarin-spezifischer Cyt P450-Transkripte	65
C.3.1	Isolierungsstrategie.....	65
C.3.2	CYP71AZ1	68
C.3.3	CYP71D97.....	69
C.3.4	CYP71D98.....	70
C.4	Untersuchungen zur Korrelation von Cyt P450s aus <i>Ammi majus</i> mit der Furanocumarin-Biosynthese.....	70
C.4.1	Phylogenetische Analyse	70
C.4.2	Vergleichende Analyse von Substraterkennungsregionen	72
C.4.3	Genstruktur	73
C.4.3.1	CYP71AJ1	73
C.4.3.2	CYP71AZ1	76
C.4.3.3	CYP71D97 und CYP71D98	76
C.4.4	Transkript-Muster von CYP71AZ1, CYP71D97 und CYP71D98	77
C.4.4.1	Induktions-Muster in <i>Ammi majus</i> Zellkulturen	77
C.4.4.2	Entwicklungs- und gewebespezifische Transkript-Muster.....	80
C.4.5	Expressionsstudien	81
C.4.5.1	Versuche zur funktionelle Analyse	81
C.4.5.2	Optimierung der heterologen Expression	85
C.5	Furanocumarinbiosynthese in <i>Ammi majus</i> Pflanzen	88
D	Diskussion und Ausblick.....	92
E	Zusammenfassung	107

F	Literaturverzeichnis.....	108
G	Anhang.....	124
G.1	Beschreibungen und Referenzen der Sequenzen	124
G.2	Nukleinsäure- und Aminosäure-Sequenzen.....	127
G.2.1	CYP71AZ1	127
G.2.2	CYP71D97.....	129
G.2.3	CYP71D98.....	131
G.2.4	CYP71AJ1	132
G.3	Übersicht der verwendeten Primer	133
G.4	Vektorkarten	136

Tabellen

Tab. 1: Nomenklatur von Cyt P450s.....	17
Tab. 2: Elektronen-Transfer-Systeme von Cyt P450-Komplexen	18
Tab. 3: Verwendete Entwicklungsstadien und Organe von <i>Ammi majus</i>	23
Tab. 4: Bakterien und Hefen für Klonierung und Expression	27
Tab. 5: Klonierungs- und Expressionsvektoren.....	28
Tab. 6: Elicitoren für die Induktion der Furanocumarinbiosynthese in <i>Ammi majus</i>	33
Tab. 7: Standard-PCR-Bedingungen	37
Tab. 8: Primerkombinationen für die RT-PCR.....	42
Tab. 9: Elicitiertes Zellkultur- und Pflanzenmaterial für Transkriptanalysen	43
Tab. 10: Restriktionsschnittstellen-modifizierte Primer für Insert/Vektor-Ligation	46
Tab. 11: Minimalmedien für transformierte Hefestämme.....	49
Tab. 12: HPLC-Gradientenprofil.....	52
Tab. 13: Reaktionsansatz für den Standard-Enzymtest.....	54
Tab. 14: Modifikationen für Enzymtests.....	55
Tab. 15: Substrate für Enzymtests	55
Tab. 16: Optimierte RT-PCR-Parameter für C4H, BOMT und 18S rRNA	57
Tab. 17: Ableitung der ACPs von der PERF-Region	66
Tab. 18: SRS1 und SRS5	72
Tab. 19: Erwartete Anzahl der hybridisierenden gDNA-Fragmente im POS Southernblot.....	75
Tab. 20: Detektierte Signale im POS Southernblot	76
Tab. 21: Optimierte RT-PCR-Parameter für CYP71AZ1, CYP71D97 und CYP71D98.....	77
Tab. 22: Relative Umbelliferon-Mengen in der Pflanze	88
Tab. 23: Relative Psoralen-Mengen in der Pflanze	90
Tab. 24: Relative Bergapten/Isopimpinellin-Mengen in der Pflanze.....	91
Tab. 25: Beschreibung der isolierten und in Laborversuchen eingesetzten Sequenzen	124
Tab. 26: Alignment-Sequenzen für das ACP-Design	125
Tab. 27: Sequenzen und Referenzen der verwendeten Primer	133

Abbildungen

Abb. 1: Habitus, Infloreszenz und Früchte von <i>Ammi majus</i>	1
Abb. 2: Historische Beschreibung der Arzneipflanze <i>Ammi majus</i>	3
Abb. 3: Biosynthese sekundärer Inhaltstoffe aus Zimtsäure	4
Abb. 4: Biosynthese des Umbelliferons/Scopoletins	6
Abb. 5: Strukturschema von Umbelliferon-Ethern, linearen und angulären Furanocumarinen	7
Abb. 6: Katalytischer Mechanismus der Psoralensynthese	8
Abb. 7: Schema zur Biosynthese der linearen Furanocumarine	9
Abb. 8: Phototoxizität von linearen und angulären Furanocumarinen.....	12
Abb. 9: Cumarin-Derivate aus <i>Ammi majus</i>	14
Abb. 10: P450-Systeme der Klasse II in der Membran.....	18
Abb. 11: Domänenstruktur und konservierte Bereiche von Cyt P450s	19

Abb. 12: Katalytischer Zyklus einer Cyt P450-Reaktion.....	21
Abb. 13: Verwendete Entwicklungsstadien und Organe von <i>Ammi majus</i>	24
Abb. 14: ACP TM -Technologie (Seegene, Seoul, Korea)	38
Abb. 15: Kombinationen zur differentiellen ACP-PCR.....	40
Abb. 16: Elicitoren-Einfluss auf die Induktion der Furanocumarinbiosynthese in <i>Ammi majus</i>	57
Abb. 17: Elicitor- und Induktionszeit-spezifische Furanocumarin-Muster in <i>Ammi majus</i>	58
Abb. 18: Einfluss verschiedener Elicitoren auf die C4H- und BOMT-Transkription	59
Abb. 19: Extinktion und quantitative Bestimmung von Umbelliferon, Psoralen und Bergapten.....	60
Abb. 20: Induktion der relativen C4H-Transkript- und Umbelliferon-Menge	61
Abb. 21: Induktion der relativen BOMT-Transkript- und Produktmenge	62
Abb. 22: Northern Dot Blot-Analyse der zeitabhängigen CYP71AJ1-Transkription.....	62
Abb. 23: RT-PCR-Analyse der Elicitor-abhängigen CYP71AJ1-Transkription	63
Abb. 24: Einfluss verschiedener Elicitoren auf die CYP71AJ1-Transkription	64
Abb. 25: Induktion der relativen POS-Transkript- und Produktmenge	64
Abb. 26: ACP-Struktur	66
Abb. 27: Induktionskontrolle durch POS RT-PCR.....	67
Abb. 28: Differentielle ACP-PCR	68
Abb. 29: Phylogenetische Analyse	71
Abb. 30: Genomische CYP71AJ1-Struktur	73
Abb. 31: Schema zum POS Southern Blotting	74
Abb. 32: Hybridisierungsmuster im POS Southernblot	75
Abb. 33: genomische CYP71AZ1-Struktur	76
Abb. 34: genomische CYP71D97 und CYP71D98-Struktur	77
Abb. 35: Einfluss verschiedener Elicitoren auf die CYP71AZ1-, D97- und D98-Transkription	78
Abb. 36: Induktion der relativen CYP71AZ1-, D97- und D98-Transkriptmenge.....	79
Abb. 37: Relative CYP71AZ1-, D97- und D98-Transkriptmengen in der Pflanze	80
Abb. 38: Expression des rekombinanten Proteins von CYP71AZ1	82
Abb. 39: CO-Differenzspektrum von CYP71AZ1-transformierten Hefemikrosomen	82
Abb. 40: CPR-Aktivität des INVSc1-Transformanten	83
Abb. 41: Austausch der N-Termini von POS, CYP71AZ1, D97 und D98 mit CYP73A1	84
Abb. 42: CPR-Aktivität verschiedener Hefe-Transformanten	86
Abb. 43: CYP73A41-Aktivität in Abhängigkeit von verschiedenen CPRs	87
Abb. 44: RT-PCR-Analyse der CYP73A41-Transkription in der Pflanze.....	89
Abb. 45: Relative C4H-Transkriptmengen in der Pflanze	89
Abb. 46: Relative POS-Transkriptmengen in der Pflanze.....	90
Abb. 47: Relative BOMT-Transkriptmengen in der Pflanze	91
Abb. 48: Phylogenetische Analyse der pflanzlichen Cyt P450 Sequenzen	97
Abb. 49: hypothetisches dreidimensionales POS-Modell.....	98
Abb. 50: Hefeexpressionsvektoren	136
Abb. 51: Klonierungsvektoren	137

Abkürzungen

2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
AAP	Abridged Anchor Primer
Abb.	Abbildung
ACP	Annealing Control Primer
AP	Anchor Primer
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
bp	Basenpaar
BOMT	Bergaptol <i>O</i> -Methyltransferase
BSA	Bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
C4H	Zimtsäure 4-Hydroxylase (CYP73A-Familie)
cDNA	Coding DNA (kodierende DNA)
CoA	Coenzym A
cpm	Counts per minute (Zählungen pro Minute)
CPR	NADPH: Cytochrom P450 Reduktase
Cyt P450	Cytochrom P450-abhängige Monooxygenase
CYP	Cytochrom P450-abhängige Monooxygenase
dest.	destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dsDNA	Double-strand DNA (doppelsträngige DNA)
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOAc	Ethylacetat
Fe	Chemisches Element Eisen
gDNA	Genomic DNA (genomische DNA)
HPLC	High pressure liquid chromatography (Hochdruckflüssigchromatographie)
IMAC	Immobilized metal ion affinity chromatography
kbp	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
MeJa	Methyljasmonat
NAD(P)H	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid(-Phosphat)
NS	Nukleinsäure
ORF	Open reading frame (offener Leserahmen)
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Ketten-Reaktion)
<i>Pmg</i>	<i>Phytophthora megasperma</i> sp. <i>glycinea</i>
POS	Psoralensynthase (CYP71AJ1)
PVP	Polyvinylpyrrolidon

RACE	Rapid amplification of cDNA ends (schnelle Amplifikation von cDNA-Enden)
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SDS-Page	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese)
sp.	lat. Spezies (Art)
ssDNA	Single-strand DNA (einzelsträngige DNA)
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
U	Unit
UTR	Untranslated region
UV	Ultraviolett

Aminosäuren

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

Nukleotide

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin

A Einleitung

A.1 *Ammi majus* L.

A.1.1 Botanik und Herkunft

Ammi majus L. (Abb. 1), nachfolgend als *Ammi majus* bezeichnet, gehört zur Familie der Apiaceae (Doldengewächse) und ist in Deutschland unter der Bezeichnung Große Knorpelmöhre oder Bischofskraut bekannt. Dieses Kraut ist im Nahen Osten beheimatet (Schiller & Hiller, 1999) und hat sich bis heute bis nach Mitteleuropa, Argentinien, Australien und den USA ausgebreitet, was von hoher Toleranz und Resistenz gegen vielfältige negative biotische und abiotische Einflüsse zeugt (Giftpflanzen, 2007).



Abb. 1: Habitus, Infloreszenz und Früchte von *Ammi majus* L.

Standort: Alter Botanischer Garten, Marburg, 2007.

Es handelt sich um eine einjährige Pflanze, die eine Größe bis zu 100 cm erreichen kann. Für Doldengewächse typisch sind ihre wechselständig angeordneten, ein- bis zweifach gefiederten Blätter und ihre weißen, strahlig von einem Punkt ausgehenden gestielten Blüten aus Döldchen und Dolden. Die Döldchen sind von langen, fiederteiligen und die Dolden von lanzettförmigen Hüllblättern umgeben. Die Spaltfrüchte (Doppelachänen) sind von Ölgängen durchzogen und akkumulieren pharmazeutisch bedeutsame Inhaltsstoffe, wobei hier vor allem die Furanocumarine zu nennen sind (Schiller & Hiller, 1999)

A.1.2 Pharmazeutische Bedeutung

Bereits im Altertum wurden die Früchte von *Ammi majus* (*Ammi fructus*), als Teeaufguss zubereitet, bei Bronchialasthma eingesetzt und auch heute noch findet diese Droge in der Volksheilkunde als Karminativum, Stomachikum, zur Regulierung der Menstruation, als antibakterielle Mundspülung (Marokko) und als „Pille danach“ (Indien) ihre Anwendung (Schiller & Hiller, 1999). In Ägypten, wo das Bischofskraut zu den wichtigsten Arzneipflanzen zählt, wird es seit der Antike als wirksamstes Heilmittel zur Behandlung von Vitiligo eingesetzt (Hani *et al.*, 1993). Der Einsatz gegen Dermatosen, zum Beispiel in der PUVA-Therapie (Psoralen + UVA-Strahlung), hat sich auch in der westlichen Medizin etabliert. Die erste detaillierte botanische und pharmakologische Beschreibung von *Ammi majus* findet sich in einem Kräuterbuch aus dem 16. Jh. (Abb. 2).

Die Früchte weisen im Vergleich zu den anderen Organen die größten Mengen pharmazeutisch bedeutsamer Inhaltsstoffe auf, zu welchen vor allem die Cumarine (Elgamal *et al.*, 1993; Hani *et al.*, 1993), die linearen Furanocumarine (Murray *et al.*, 1982), Umbelliferon-Ether sowie acylierte und nicht acylierte Flavonol-Glykoside (Nasser & Singab, 1998) gehören. *Ammi majus* gilt als reiche natürliche Quelle von Furanocumarinen (Purohit *et al.*, 1995). Zu den Medikamenten, welche auf den in *Ammi fructus* vorkommenden linearen Furanocumarinen wie Xanthotoxin und Psoralen basieren, gehören z.B. Meladinine® (Promedica, Frankreich), Psoraderm®-5 (Expanscience Laboratories, Frankreich) und Oxsoralen® (Gerot Pharmazeutica, Österreich).

Von Ammey.

Cap. XXI.

Namen.

Das kraut so wir von seinem Griechischen vnd Lateinischen namen her Ammi/haben auff Teütsch genent Ammey / würt in den Apotecten Almeos geheissen.

Gestalt.

Ammey hat einen runden vnd grünen stengel/ mit vil kleinen zweigen vnd schossen. Seine bletter seind lang / vnd ringsvmbher zerkerfft/ am gipffel bringt es kleine gestirnete weisse blümlin/ welche zusammen sich einem schatthüt vergleichen/darauf würdt ein kleines sämlin / das ist am geschmack zum theil scharpff/ vnd zum theil auch bitter. Die wurzel ist weiß / vnd hat vil kleine zäferlin.

Statt seiner wachstung.

Das Ammey wechset vornn ihm selbs nit im Teütschen land. Aber so mans pflantz vnd säht in gärten/ kompt es gern/ vnd zeühet sich alle jar selbs durch den abgefallen samen widerumb.

Zeit.

Blüet im Augustmonat am meysten/ vnd bringt darnach seinen samen/ der in der arzney gebraucht würdt.

Die natur vnd complexion.

Der sam dises krauts ist warm vnd trucken/volkomenlich im dritten grad.

Die krafft vnd würckung.

Der sam vertreibt die bläst vnd grimmen im leib. Treibt den harn / vnd bringt den frauen ihre blödigeit / ist nützlich denen so vñ einem giftigen thier gebissen seind / wañ man denselbigen mit wein seüdt vnd darnach trinckt. Dieser sam ist nützlich das man ihn mit den kleinen goldwürmlin/ welche Cantharides genent werden / vermische / dann er wendet ihren schaden / den sie sonst wo mans allein nimpt/ mit sich bringen. Wañ man disen samen mit hönig vermischt überstreicht / so verzert er das vndergerunnen blüt. Mit harz vermengt vnd angezündt / oder auff ein glüt gelegt / vnd von vnden auff den dampff zñ sich genomen / reyniget er die müter. Man sagt auch wañ die weiber / so sie mit den mann zñschaffen haben / daran schmecken / das sie defleichter empfangen.

f Von

Abb. 2: Historische Beschreibung der Arzneipflanze *Ammi majus*

Fuchs (2001), „The new herbal of 1543“.

A.2 Furanocumarine

A.2.1 Biosynthese

Pflanzen besitzen zahlreiche Schutz- und Abwehrmechanismen gegen abiotische und biotische Stressoren, die zur Akkumulation unterschiedlicher Sekundärmetabolite führen. Zu diesen gehören unter anderem Flavonoide, Lignine, Cumarine und Furanocumarine. Ihre gemeinsame Vorstufe ist die Zimtsäure, welche aus Phenylalanin gebildet wird. Drei

Reaktionen (*ortho*-, *para*-Hydroxylierung, β -Oxidation) überführen die Zimtsäure in Biosynthesewege zu diversen sekundären Inhaltstoffklassen (Abb. 3).

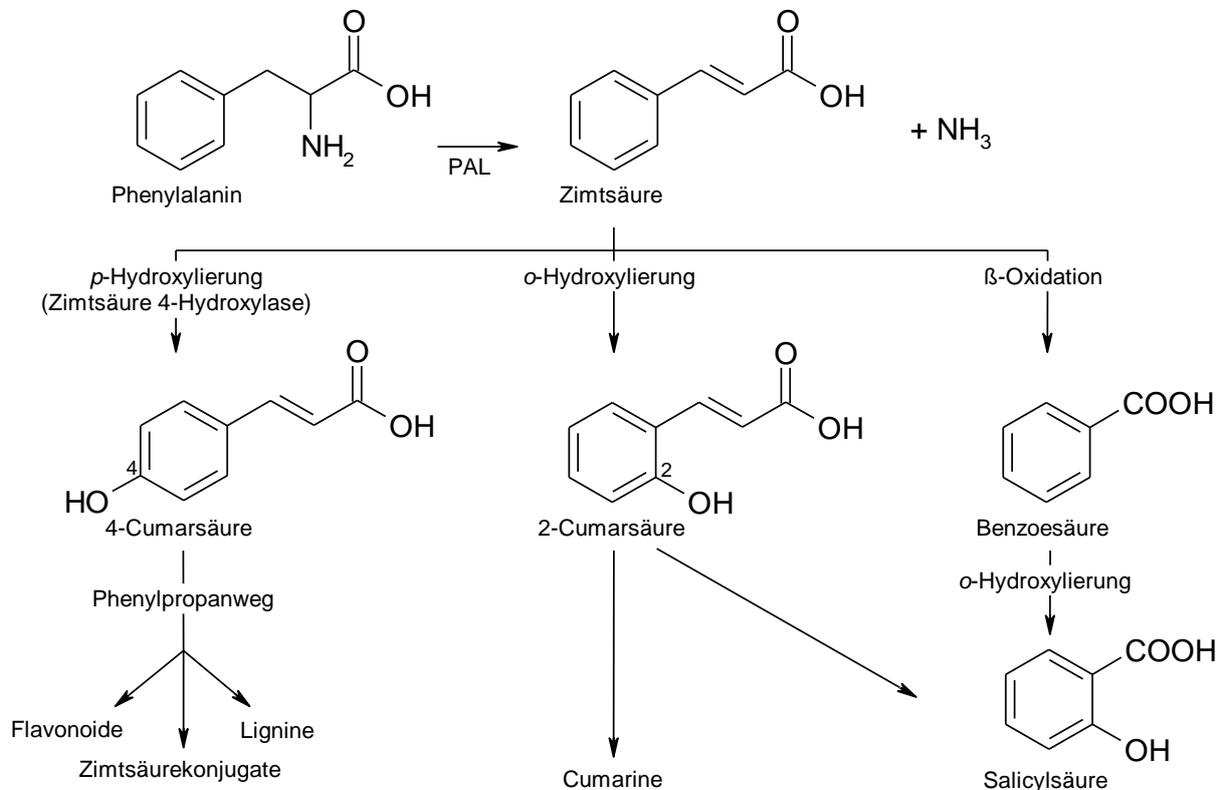


Abb. 3: Biosynthese sekundärer Inhaltstoffe aus Zimtsäure

Die Synthese der Zimtsäure aus L-Phenylalanin wird durch die Phenylalanin-Ammoniak Lyase (PAL) katalysiert. Die Hydroxylierung der Zimtsäure am C(2) oder C(4) und die β -Oxidation führen zur Synthese verschiedener sekundärer Inhaltstoffklassen. Die Bildung von Furanocumarinen läuft vermutlich über die *para*-Hydroxylierung durch die Zimtsäure 4-Hydroxylase zur *p*-Cumarsäure mit anschließender *ortho*-Hydroxylierung. Die Vorstufe von Cumarin hingegen bildet wahrscheinlich die *ortho*-hydroxylierte Zimtsäure. Modifiziert nach Ward *et al.* (1991).

Zimtsäure 4-Hydroxylasen (C4H, *para*-Hydroxylierung) gehören zur Cyt P450-Superfamilie und wurden intensiv biochemisch und genetisch untersucht. Die erste C4H wurde in den 90er Jahren aus *Helianthus tuberosus* isoliert (Teutsch *et al.*, 1993) und zu Beginn dieser Dissertation waren 40 weitere in Datenbanken registriert.

Aus Fütterungsexperimenten ist bekannt, dass 4-Cumarsäure die Vorstufe von Psoralen ist, so dass sich die *ortho*-Hydroxylierung zur 2,4-Dihydroxyzimtsäure bzw. zum Umbelliferon anschließen muss (Abb. 4, Referenzen in Bourgaud *et al.*, 2006). Es ist auch nicht auszuschließen, dass der CoA-Ester oder ein anderes Derivat der 4-Cumarsäure das Substrat der *ortho*-Hydroxylierung ist. Im Gegensatz zur *para*-Hydroxylierung war die *ortho*-

Hydroxylierung bis vor kurzem kaum untersucht. Studien aus den 70er und 80er Jahren beschreiben äquivalent zur Synthese von 2-Cumarsäure aus Zimtsäure in *Melilotus alba* (Conn, 1984) die NADPH-abhängige Reaktion von 4-Cumarsäure zur 2,4-Dihydroxymitsäure in *Petunia* und *Hydrangea macrophylla* und lokalisieren das entsprechende Enzym in den Chloroplasten (Kindl, 1971; Referenzen in Matern *et al.*, 1999 und Bourgaud *et al.*, 2006). Allerdings konnten diese Ergebnisse in späteren Untersuchungen nicht bestätigt werden und vermutlich existieren in Abhängigkeit vom Substrat verschiedene *ortho*-Hydroxylasen (Referenzen in Bourgaud *et al.*, 2006). Nach Abschluss dieser Arbeit identifizierten Kai *et al.* (2008) eine lösliche Dioxygenase in der Scopoletin-Biosynthese von *Arabidopsis thaliana*, welche die *ortho*-Hydroxylierung von Feruloyl-CoA zu 6'-Hydroxyferuloyl-CoA katalysiert (Abb. 4). *Trans*-4-Cumarsäure wurde nicht und 4-Cumaryl-CoA nur sehr schwach als Substrat akzeptiert. Endler *et al.* (2008) konnten in elicitierten *Ruta graveolens* Zellen und Milesi *et al.* (2001) in Blüten und Wurzeln eine Korrelation zwischen dem Expressionsanstieg einer bestimmten 4-Cumarsäure:CoA-Ligase und der Cumarin-Akkumulation feststellen, was auf 4-Cumaryl-CoA als Intermediat der Cumarin-Biosynthese hindeutet. Aufgrund der Sequenzeigenschaften der CoA-Ligase wird eine plastidäre Lokalisierung der *ortho*-Hydroxylierung vermutet, was mit den Studien von Kindl (1971) und Conn (1984) in Übereinstimmung steht. Somit ist ziemlich wahrscheinlich, dass die Biosynthese zumindest bis zum Umbelliferon/Scopoletin in Plastiden abläuft.

Umbelliferon kann durch separate Prenyltransferasen unterschiedlich prenyliert werden. Abhängig vom Prenylierungsmuster verlaufen die weiteren Biosyntheseschritte zu *O*-Prenylumbelliferonen, den angulären oder linearen Furanocumarinen (Abb. 5). Direkte Vorstufe der linearen Furanocumarine (Psoralene) ist das kurzlebige Intermediat Demethylsuberosin (Brown & Steck, 1973; Hamerski & Matern, 1988), welches durch die Umbelliferon C(6)-Prenyltransferase gebildet wird. Diese Reaktion konnte erstmalig in Chloroplasten von *Ruta graveolens* nachgewiesen werden (Dhillon & Brown, 1976). In dunkel kultivierten *Ammi majus* Zellkulturen wurden diese Ergebnisse zwar einige Jahre später bestätigt, jedoch, wie auch in *Petroselinum crispum* (Tietjen & Matern, 1983) als Syntheseort die Mikrosomen lokalisiert (Hamerski & Matern, 1988).

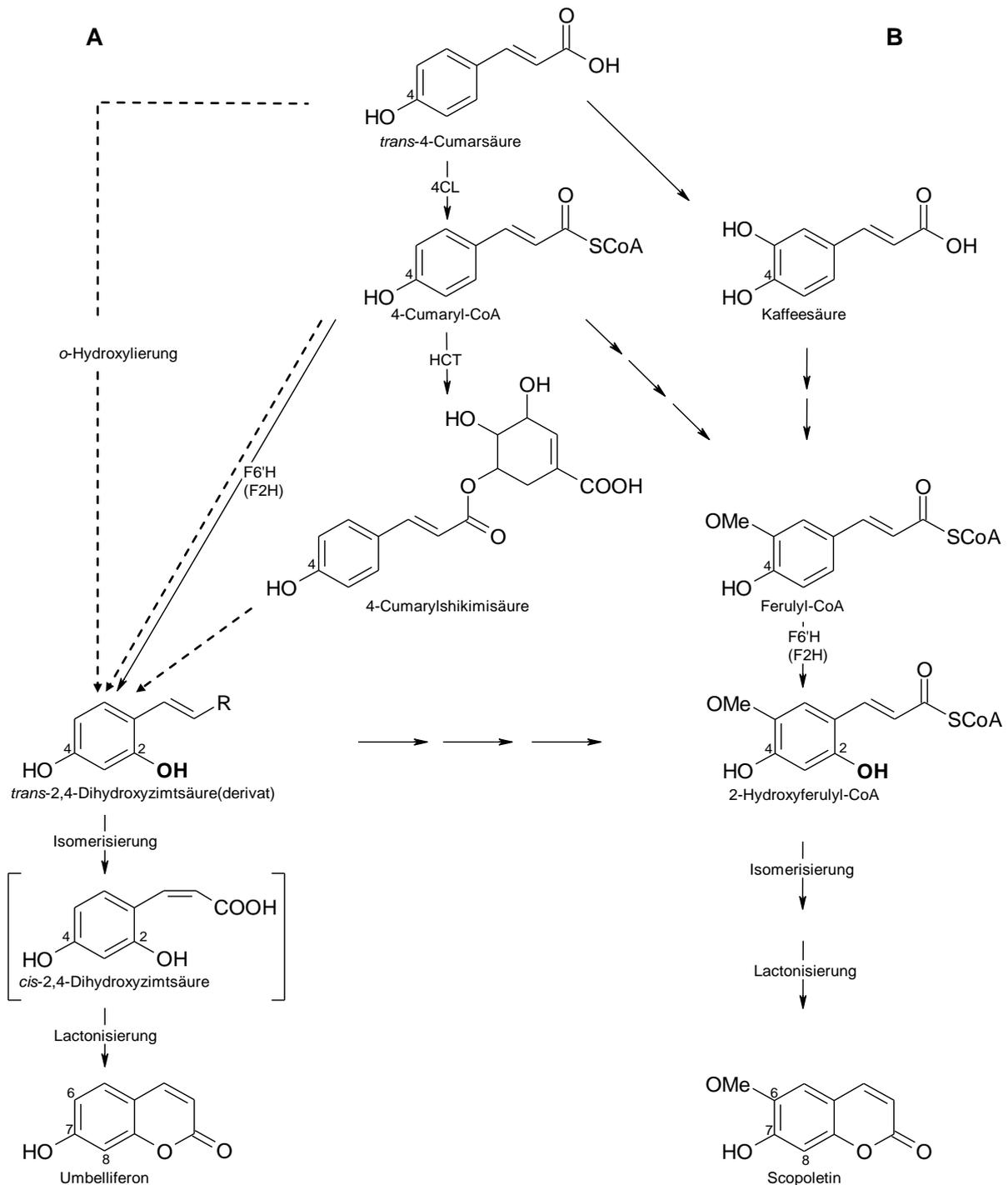


Abb. 4: Biosynthese des Umbelliferons/Scopoletins

A) Postulierte Biosynthese des Umbelliferons: *trans*-4-Cumarsäure oder verschiedene Konjugate dienen als Substrat für die *ortho*-Hydroxylierung zur 2,4-Dihydroxyzimtsäure. Es wird angenommen, dass diese Reaktion von einem Cyt P450 (gestrichelte Linie) katalysiert wird. Das Intermediat wird unter Licht oder enzymkatalysiert zur *cis*-2,4-Dihydroxyzimtsäure isomerisiert, welche im sauren Milieu zum Umbelliferon lactonisiert. Eine weitere Möglichkeit der Umbelliferon-Biosynthese besteht in der aus der *p*-Cumarsäure bestehende in der intermediären Bildung einer Chinol bzw. einer Spiro-Verbindung (Matern, 1991).

B) Biosynthese des Scopoletins (Kai *et al.*, 2008): Als Substrat für die *ortho*-Hydroxylierung dient Ferulyl-CoA und in sehr geringem Maße auch 4-Cumaryl-CoA. Die Reaktion wird von einer Fe(II)- und Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenase katalysiert (F2H, in der Originalliteratur als F6'H bezeichnet). Isomerisierung und Lactonisierung verlaufen vermutlich spontan.

4CL: 4-Cumaryl:CoA Ligase, HCT: Hydroxycinnamoyltransferase, F6'H: Ferulyl-CoA 6'-Hydroxylase, F2H: Ferulyl-CoA 2-Hydroxylase

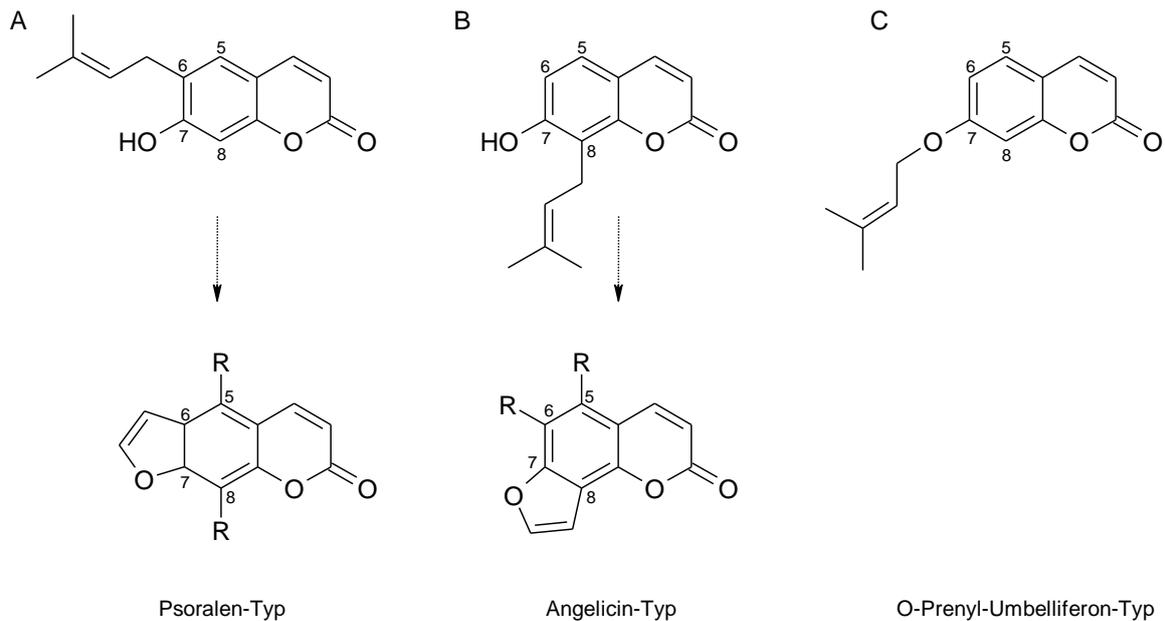


Abb. 5: Strukturschema von Umbelliferon-Ethern, linearen und angulären Furanocumarinen

Psoralene und Angelicine besitzen eine trizyklische planare Grundstruktur aus einem Cumarin-Grundgerüst (2H-1-Benzopyran-2-on) und einem Furanring, welcher über C(6) und C(7) bzw. C(7) und C(8) mit dem Cumarin verknüpft ist. A) Eine C(6)-Prenylierung des Umbelliferons zu Demethylsuberosin führt zu den linearen Furanocumarinen (Psoralen-Typ), B) eine C(8)-Prenylierung zu den angulären Furanocumarinen (Angelicin-Typ) und C) eine 7-O-Prenylierung zu den Umbelliferon-Ethern (O-Prenylumbelliferon-Typ).

Die Biosynthese der Psoralene (Abb. 6 und 7) aus Demethylsuberosin verläuft über (+)-Marmesin. Die enzymatische Zyklisierung zu (+)-Marmesin wurde von Hamerski und Matern (1988) nachgewiesen und dem Cyt P450 Marmesinsynthase zugeschrieben. Die Umsetzung von Marmesin zum Psoralen durch die als Cyt P450 charakterisierte Psoralensynthase (POS) wurde ebenfalls erstmals in den 80er Jahren mit Membranfraktionen aus Elicitor-induzierten Zellkulturen von *Petroselinum crispum* (Wendorff & Matern, 1986) und *Ammi majus* (Hamerski, 1989) nachgewiesen. Durch differentielle Klonierung gelang es aus *Ammi majus* später fünf Elicitor-induzierte Cyt P450-cDNAs zu amplifizieren. Die funktionelle Expression einer dieser cDNAs (POS) erfolgte an der ENSAIA (Nancy, Frankreich) und ihre molekulare Charakterisierung ist Teil der vorliegenden Arbeit (Specker, 2003; Larbat *et al.*, 2007). Die POS katalysiert eine außergewöhnliche Reaktion (Abb.6), da aus (+)-Marmesin unter *syn*-Eliminierung eines Isopropoxyradikals und eines Wasserstoffatoms Psoralen und Aceton entstehen (Stanjek *et al.*, 1999). Die Freisetzung von Aceton ist bisher einzigartig in der Biochemie.

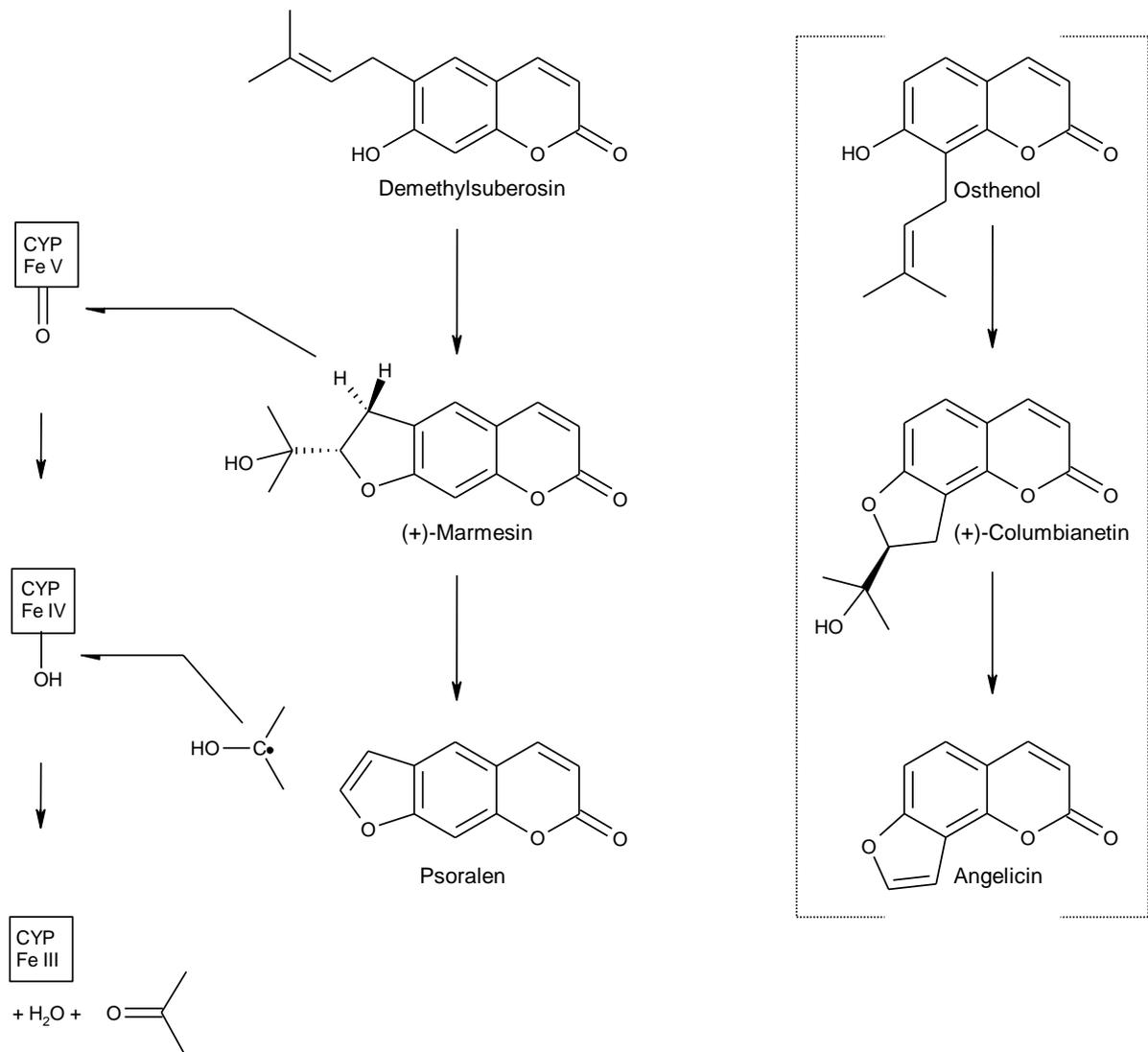


Abb. 6: Katalytischer Mechanismus der Psoralensynthese

Psoralen wird aus (+)-Marmesin durch syn-Eliminierung der Isopropoxyradikal und eines Wasserstoffatoms gebildet. Im Vergleich sind die entsprechenden, putativen Schritte der Synthese des angulären Furanocumarins Angelicin aus (+)-Columbianetin aufgezeigt

Vom Psoralen leiten sich verschiedene hydroxylierte und methoxylierte Derivate wie Bergaptol (5-Hydroxypsoralen), Xanthotoxol (8-Hydroxypsoralen), Bergapten (5-Methoxypsoralen) und Xanthotoxin (8-Methoxypsoralen) ab (Abb. 7). Die Psoralen-5-Monooxygenase konnte in Mikrosomen von *Ammi majus* nachgewiesen, jedoch noch nicht genetisch charakterisiert werden (Hamerski & Matern, 1988), Bergapten wird durch die S-Adenosyl-L-Methionin:Bergaptol O-Methyltransferase gebildet, deren cDNA von *Ammi majus* isoliert und charakterisiert werden konnte (Hehmann *et al.*, 2004).

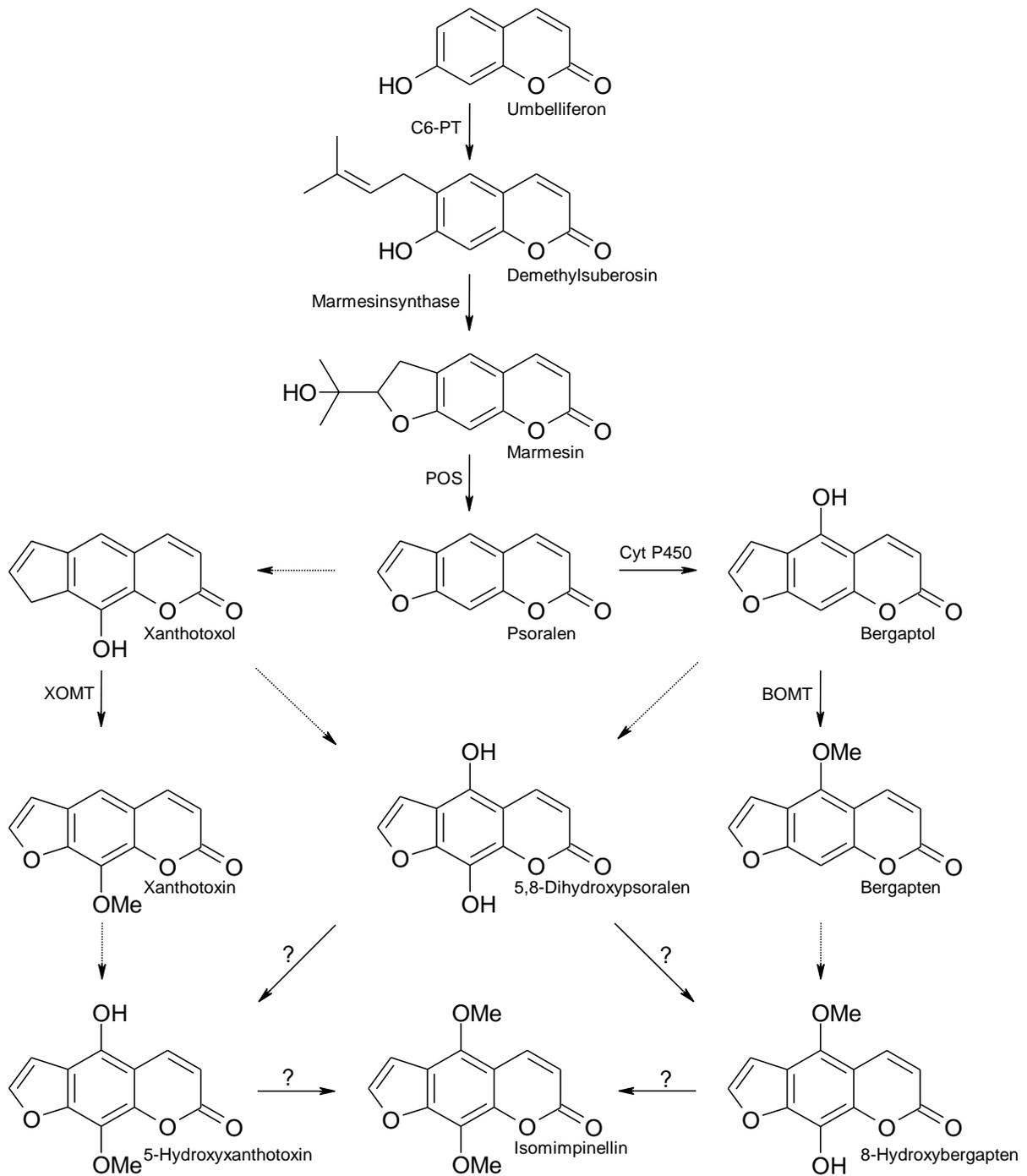


Abb. 7: Schema zur Biosynthese der linearen Furanocumarine

Alle linearen Furanocumarine leiten sich vom Psoralen ab. Die hydroxylierten und methoxylierten Psoralen-Derivate erfordern die Beteiligung von verschiedenen Cyt P450s und haben pharmazeutische Bedeutung.
 -----: putative Cyt P450; C6-PT: C(6)-Prenyltransferase

A.2.2 Vorkommen

Verbreitung in der Pflanzenwelt

Psoralene sind in großer Vielfalt in den Familien Apiaceae, Rutaceae, Moraceae und in den Gattungen *Psoralea* und *Coronilla* innerhalb der Fabaceae zu finden, wobei bis zu den 90er Jahren schon 200 verschiedene Furanocumarine beschrieben wurden (Berenbaum, 1981; Matern *et al.*, 1988; Herde, 2005). Apiaceae und Rutaceae gelten als die cumarin- bzw. furanocumarinreichsten Familien im Pflanzenreich, allerdings ist das Furanocumarin-Vorkommen innerhalb der Apiaceae kein durchgehendes Merkmal (Herde, 2005). Die häufigsten linearen Furanocumarine sind Psoralen, Xanthotoxin, Bergapten und Isopimpinellin. Anguläre Formen, insbesondere Angelicin, Sphondin und Pimpinellin, beschränken sich auf Apiaceae und Fabaceae (Bourgaud *et al.*, 1989). Einige Furanocumarine sind nur aus einer Art beschrieben wie z.B. Bergamottin (5-Geranoylpsoralen) aus *Citrus paradisi* (Stanley & Vannier, 1967). Bemerkenswert ist die Tatsache, dass Pflanzen entweder nur lineare Furanocumarine, wie *Ammi majus* (Elgamal *et al.*, 1993) und *Petroselinum crispum* (Tietjen & Matern, 1983), oder lineare und anguläre Furanocumarine, wie *Angelica sp.*, produzieren; das alleinige Vorkommen von angulären Furanocumarinen wurde hingegen noch nicht beobachtet (Murray *et al.*, 1982). Dies birgt einen interessanten evolutionären Aspekt im Hinblick auf Pflanze-Insekt-Interaktionen, in welcher Pflanze und Herbivor aufeinander aufbauende Angriffs- und Verteidigungsmechanismen entwickelt haben mit angulären Furanocumarinen als jüngste Entwicklung.

Lokalisation in Pflanzen

Furanocumarine sind in beträchtlicher Menge auf der Pflanzenoberfläche (Tietjen & Matern, 1983), aber auch in Früchten (Lohman & McCaunnaughay, 1998) zu finden. Dies steht im Einklang mit der Beobachtung, dass auch Zellsuspensionskulturen Furanocumarine überwiegend in die Kulturflüssigkeit sekretieren (Tietjen, *et al.*, 1983; Hamerski & Matern, 1988; Matern *et al.*, 1988). Auf der Blattoberfläche dienen sie wahrscheinlich dem Schutz vor Herbivoren, in Samen von z.B. *Psoralea subacaulis* (Baskin *et al.*, 1967) oder *Ammi majus* (Garcia *et al.*, 2002) wirken sie bei der Keimung allelopathisch als Inhibitoren für andere Pflanzensamen. Die subzelluläre Lokalisation ist noch ungeklärt. Es wurden glykosilierte Furanocumarine gefunden, die vermutlich neben der Sekretion auch der vakuolären Speicherung dienen (Nguyen *et al.*, 1997; Zobel *et al.*, 1998). Von der juvenilen bis zur adulten Pflanze steigt die Furanocumarin-Konzentration, was sich mit dem anfänglichen Energiebedarf für das Wachstum erklären lässt (Lohman & McCaunnaughay, 1998).

A.2.3 Ökologische Interaktionen und therapeutische Bedeutung

Furanocumarine verschaffen der Pflanze als Phytoalexine (Beier & Oertli, 1983), Allelopathika und Fraß-Inhibitoren (McKey, 1979; Jiwajinda *et al.*, 2000) einen Selektionsvorteil. Einige besitzen lichtunabhängig antimikrobielle Eigenschaften oder hemmen intestinale Cyt P450s (Liang-qing & Yasushi, 2004). Ihre antiproliferativen und photosensibilisierenden Effekte können einen weiteren ökotoxikologischen Beitrag leisten (Berkley *et al.*, 1986; Beier & Nigg, 1992; Chimichi *et al.*, 2002).

„Mechanism-based inhibition“ von Cyt P450s

Die Inaktivierung von Cyt P450s, insbesondere durch lineare Furanocumarine, beruht auf der „mechanism-based inhibition“. Das Furanocumarin wird von dem Cyt P450 als Pseudosubstrat akzeptiert, dabei irreversibel kovalent gebunden und blockiert die Enzymaktivität. Dieser Mechanismus, auch als ‚Suizid Inhibition‘ bekannt, konnte bei Cyt P450s von Wirbeltieren (Koenigs & Trager, 1998), Insekten (Zumwalt & Neal, 1993) und Pflanzen (Gravot *et al.*, 2004) beobachtet werden. In der Humantherapie besitzt dieser Effekt besondere Bedeutung beim Genuss von Grapefruit, was die intestinale CYP3A4 als wichtiges Enzym im Xenobiotika-Metabolismus inhibiert (Wen *et al.*, 2002; Pain *et al.*, 2005). Bergamottin wird diesbezüglich als Inhibitor postuliert (Goosen *et al.*, 2004). Xanthotoxin hingegen hemmt z.B. die humane CYP2A6, welche in der Metabolisierung von toxischen Komponenten wie Aflatoxinen oder Nitrosaminen im Zigarettenrauch involviert ist (Koenigs & Trager, 1998). Man kann davon ausgehen, dass Extrakte vieler Citrusfrüchte oder von Apiaceae auf diese Weise den menschlichen Stoffwechsel beeinflussen (Guo *et al.*, 2001; Liang-qing & Yasushi, 2004).

Die Toxizität von Furanocumarinen hat ökologische Konsequenzen (Schuler & Berenbaum, 2003). So haben einige Schmetterlinge CYP6B entwickelt mit verminderter Sensitivität gegen lineare Furanocumarine, vor allem methoxylierte Formen wie Xanthotoxin (Ma *et al.*, 1994; Li *et al.*, 2003). Die Larven dieser Tiere, vor allem die Gattung *Papilio*, welche sich mit etwa 75% ihrer Arten auf Apiaceae und Rutaceae spezialisiert hat (Berenbaum, 1981; Li *et al.*, 2003), nutzen furanocumarinhaltige Pflanzen als ökologische Nische (Berenbaum, 2002). Zumwalt & Neal (1993) vermuten, dass dies das Resultat einer Koevolution von detoxifizierenden Enzymen in Insekten mit dem pflanzlichen Abwehrmechanismus ist, was durch die Tatsache gestützt wird, dass z.B. *Papilio glaucus* Psoralen-detoxifizierende Cyt P450s besitzt, obwohl dessen Wirtspflanzen keine Furanocumarine enthalten. Anguläre Furanocumarine sind weniger toxisch für Insekten als die linearen Formen (Murray *et al.*,

1982; Wamer *et al.*, 1995), aber sie können synergistisch mit Psoralen und Xanthotoxin wirken (Berenbaum & Zangerl, 1993). Dieser Effekt beruht auf der Hemmung der insekteneigenen CYP6Bs durch das anguläre Furanocumarin Angelicin, was die Detoxifizierung linearer Furanocumarine erschwert. Zusammen mit der Tatsache, dass das Vorkommen angulärer Furanocumarine nur auf wenige Pflanzenarten beschränkt ist und sie nur in Kombination mit linearen Furanocumarinen vorkommen, liegt die Vermutung nahe, dass sich im Zuge der Koevolution die anguläre Furanocumarinbiosynthese als Antwort auf die Insekten-Abwehrreaktion aus der linearen Furanocumarinbiosynthese entwickelt hat (Berenbaum & Zangerl, 1998; Berenbaum, 1981 und 2002).

Phototoxische und antimikrobielle Qualität

Furanocumarinhaltige Pflanzen werden seit 2000 v. Chr. zur Hautpigment-Stimulierung unter Sonnenlicht eingesetzt (Pathak & Fitzpatrick, 1992). Die photosensibilisierenden Eigenschaften der Psoralene sind seit Ende 1940 bekannt (Fahmy *et al.*, 1947, Fahmy & Abushady, 1948) und *Ammi majus* wurde als Auslöser entsprechender Effekte in Tieren identifiziert (Ivie, 1978). In den 80er Jahren konnte bewiesen werden, dass Bergapten, Xanthotoxin und Psoralen in Sellerie für eine häufig auftretende Dermatitis bei Agrararbeitern verantwortlich sind (Berkley *et al.*, 1986). Die Phototoxizität der Furanocumarine beruht auf der Interkalation in dsDNA unter einer UV-Strahlung von 250 bis 350 nm (Abb. 8). Anguläre Furanocumarine bilden Monoaddukte, welche durch zelleigene Reparaturmechanismen wieder geöffnet werden können, die Interkalation von linearen Furanocumarine kann hingegen zu einem irreversiblen Crosslink führen (Dall'Acqua *et al.*, 1978; Nigg *et al.*, 1997).

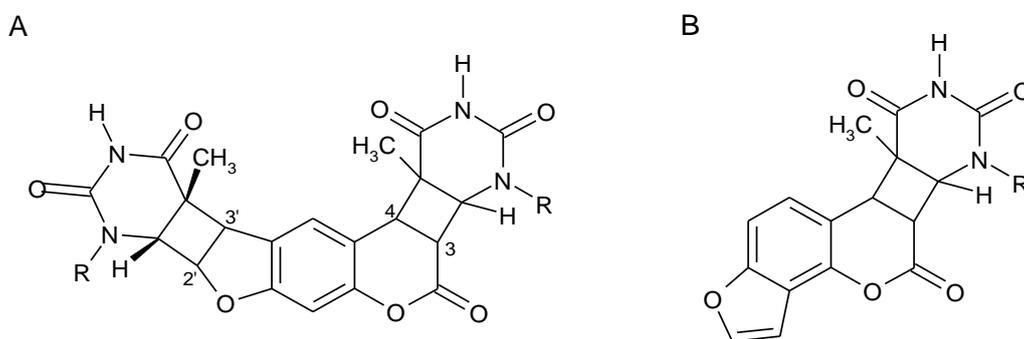


Abb. 8: Phototoxizität von linearen und angulären Furanocumarinen

- (A) Lineare Furanocumarine (hier Psoralen) werden durch Strahlung von 250 – 350 nm aktiviert und bilden eine kovalente Bindung zwischen der C(3,4)- oder C(2',3')-Doppelbindung und der C(5,6)-Doppelbindung einer Pyrimidinbase (hier Thymin) der dsDNA. Das reversible Monoaddukt kann unter Bindung einer Pyrimidinbase des Gegenstranges zu einem irreversiblen Diaddukt reagieren.
- (B) Anguläre Furanocumarine (hier Angelicin) können aufgrund ihrer Struktur, bzw. Lage ihrer Doppelbindung am Furanring nur ein Monoaddukt bilden.

In der Humantherapie wird die Photosensibilisierung z.B. gegen Leukoderma (Behl, 1955) und die in Zelltod resultierende Phototoxizität für die Behandlung von Hauterkrankungen mit pathologisch erhöhter Zellteilungsrate wie Vitiligo, Psoriasis und Neurodermitis genutzt (Makki *et al.*, 1996). Die hierfür verwendete PUVA-Therapie (Psoralene, vor allem Xanthotoxin und Bergapten, + UVA-Strahlung) kann allerdings kanzerogene Nebenwirkungen zur Folge haben (Cassier *et al.*, 1984). Neben der therapeutischen Bedeutung wurde die Phototoxizität der Psoralene auch genutzt, um Struktur und Funktion von DNAs und RNAs zu untersuchen (Cimino *et al.*, 1985).

Furanocumarine besitzen auch antimikrobielle Eigenschaften (Murray *et al.*, 1982), z.B. gegen *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* (Tada *et al.*, 2002) oder *Liriomyza trifolii* (Trumble *et al.*, 1990) und sollen sogar antiviral wirken (Zhou *et al.*, 2000). Diese Wirkung ist unabhängig von der Phototoxizität, da eine Studie an *Petroselinum crispum* (Afek *et al.*, 2002) (+)-Marmesin als stärker fungizid als die stark phototoxische Komponente Psoralen erwiesen hat. Die Akkumulation von Marmesin ist allerdings ungewöhnlich. Es wird angenommen, dass bei Lagerung von *Petroselinum crispum* Gibberelinsäure entsteht, welche die Psoralensynthese unter Anreicherung der Psoralen-Vorstufe Marmesin hemmt.

A.2.4 Furanocumarine aus *Ammi majus*

Das erste Furanocumarin, welches aus *Ammi majus* isoliert werden konnte, war Xanthotoxin (Fahmy *et al.*, 1947), das an der therapeutischen Wirkung von *Ammi majus* Früchten gegen diverse Dermatosen beteiligt ist (Schöberg & Sina, 1948) und noch bis heute das wahrscheinlich pharmakologisch bedeutsamste Psoralen darstellt (Bethea *et al.*, 1999). Das pharmazeutische Potential der Früchte führte dazu, dass Ende der 70er Jahre schon eine Vielzahl weiterer Psoralene aus *Ammi fructus* mit ihren biochemischen und physikalischen Daten sowie hinsichtlich ihrer biologischen Aktivität dokumentiert worden waren (Ivie, 1978). Hierzu gehören u.a. Bergapten (Fahmy & Abushady, 1948), Marmesin (Abu-Mustafa & Fayez, 1961), Isopimpinellin (Abdel-Hay *et al.*, 1966), Isoimperatorin (Abu-Mustafa *et al.*, 1968) und weitere Derivate (siehe Referenzen bei Ivie, 1978). In den 70er Jahren erschienen summarische Berichte, wobei jedoch nicht zwischen den Varietäten geographischer Rassen unterschieden wurde (Hegnauer, 1973; Hoppe, 1978). Von Abu-Mustafa existieren einige wenige Studien über das Vorkommen angulärer Furanocumarine, z.B. Majurin (1971b), in *Ammi majus* ägyptischer Herkunft. Allerdings fehlt hierfür bis heute eine Bestätigung ebenso

wie für anguläre Furanocumarine in der polnischen (europäischen) Herkunft. *Ammi majus* besitzt die Fähigkeit zur 7-*O*-Prenylierung von Umbelliferon und diese Prenyltransferase-Aktivität wurde neben der C(6)-Prenyltransferase *in vitro* nachgewiesen (Brown & Steck, 1973; Hamerski *et al.*, 1990b). Die ersten *O*-Prenyl-Umbelliferone waren das in der ägyptischen Varietät entdeckte Umbelliprenin (Abu-Mustafa *et al.*, 1971a) und Alloimperatorin (Abu-Mustafa *et al.*, 1975). Durch Induktion der Furanocumarinbiosynthese in Suspensionskulturen von *Ammi majus* polnischer Herkunft konnte das Vorkommen von zwei weiteren Umbelliferon-Ether, Cumarin A und Cumarin B, wie auch das Vorkommen weiterer Psoralene und Cumarin-Derivate gezeigt werden (Hamerski *et al.*, 1990a). Die dort bezüglich ihrer biologischen Aktivität wichtigen (Fahmy & Abushady, 1948; Abdel-Hay *et al.*, 1966) bzw. in den größten Mengen vorkommenden Furanocumarine und Umbelliferon-Ether sind in Abb. 9 zusammengefasst.

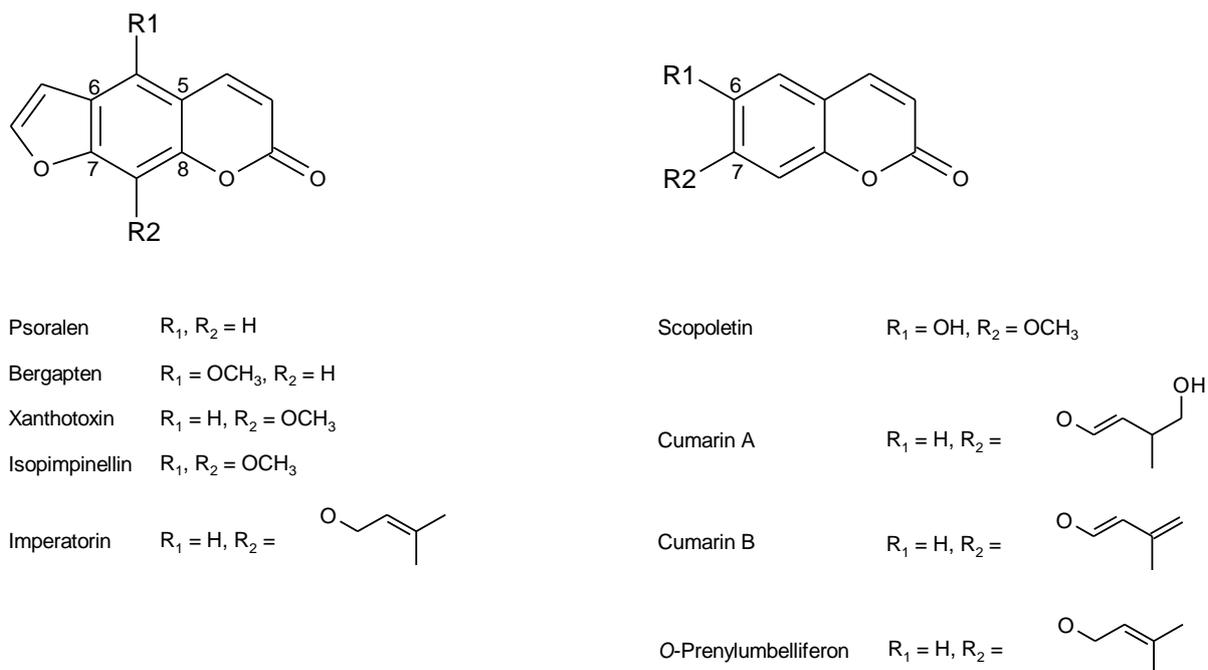


Abb. 9: Cumarin-Derivate aus *Ammi majus*

Psoralen, Bergapten, Xanthotoxin, Isopimpinellin und Imperatorin entstehen aus C(6)-prenyliertem Umbelliferon, Cumarin A und B aus 7-*O*-prenyliertem Umbelliferon-Ether.

Obwohl große Unterschiede bezüglich der dokumentierten Mengen einzelner Psoralene in *Ammi fructus* existieren, stimmen die Berichte qualitativ überein (Ekiert & Gomolka, 2000a; Ivie, 1978; Krolicka *et al.*, 2001b). Die Früchte sind der ergiebigste Pflanzenteil, aber auch die anderen Organe enthalten Psoralene, z.B. Wurzeln enthalten Bergapten und Xanthotoxin

sowie die Blätter Imperatorin und Xanthotoxin (Ekiert und Gomolka, 2000a). Im Laufe der Vegetationsperiode ändert sich der Cumaringehalt nur geringfügig (Blazek und Starý, 1965). Untersuchungen des Xanthotoxin-Gehaltes in der kultivierten Pflanze unter sterilen Bedingungen konnten diese Ergebnisse bestätigen (Pande *et al.*, 2002).

A.2.5 Induktion der Furanocumarinbiosynthese

Furanocumarine sind in Pflanzen konstitutiv vorhanden, ihre Biosynthese wird jedoch durch spezifische biotische und abiotische Stressoren stark stimuliert, wie z.B. die Behandlung von Sellerieblättern mit Methyljasmonat erwiesen hat (Miksch & Boland, 1996). Als Abwehrsubstanzen sekretieren sie auf die Blattoberfläche und in Zellkulturen entsprechend in die Nährflüssigkeit, was eine einfache Extraktion und Untersuchung ermöglicht. So wurde in *Petroselinum crispum* Suspensionskulturen, zehn Stunden nach Induktion, ein im Vergleich zu den Zellen vierfacher Furanocumarin-Gehalt im Medium nachgewiesen (Kombrink & Hahlbrock, 1986).

Unter Verwendung von Zellkulturen bietet die Induzierbarkeit die Möglichkeit, Verfahren für eine effiziente Furanocumarin-Produktion zu entwickeln. In *Ammi majus* Zellkulturen wurden bereits diverse abiotische Elicitoren wie Herbizide, Salze, Phytohormone und elektromagnetische Strahlung erfolgreich erprobt (Koul & Koul, 1993; Ekiert & Gomolka, 2000a; Staniszewka *et al.*, 2003; Króllicka *et al.*, 2006). Die biotische Elicitierung mit *Erwinia chrysanthemi* bzw. Skleroglucan erhöhte gezielt die Marmesin-Produktion (Króllicka *et al.* 2006). Unter Verwendung von Kulturen, welche sich wie die *Ammi majus* „hairy roots“-Kultur (Króllicka *et al.*, 2001a und 2001b) durch schnelles Wachstum, genetische Stabilität und hohen Furanocumarin Gehalt auszeichnen, könnten Verfahren zur größtmöglichen Furanocumarin-Produktion innerhalb natürlicher Ressourcen entwickelt werden.

Eine Induktion in Zellkulturen bietet weiterhin die Gelegenheit zur detaillierten Untersuchung der Furanocumarinbiosynthese. Voraussetzung ist eine kontrollierte Produktion von Furanocumarinen. *Ruta graveolens* ist z.B. als Versuchspflanze ungeeignet, da ihre Zellkultur konstitutive Furanocumarine aufweist (Eilert, 1989; Bohlmann *et al.*, 1995), wohingegen sie häufig für *in vivo* Untersuchungen (Milesi *et al.*, 2001) herangezogen wird. Apiaceae-Zellkulturen wie von *Ammi majus* oder *Petroselinum crispum* werden hingegen häufig als Modellsysteme für *in vitro* Induktionsstudien verwendet (z.B. Hamerski, 1989; Hagemeyer *et al.*, 1999). In ihren dunkel kultivierten Suspensionskulturen sind keine Furanocumarine nachweisbar und die Biosynthese ist gezielt mit spezifischen Elicitoren wie von *Alternaria*

carthami oder *Phytophthora sojae* (Pmg) induzierbar (Tietjen *et al.*, 1983; Hamerski & Matern, 1988; Matern *et al.*, 1988).

A.3 Cytochrom P450-abhängige Monooxygenasen (Cyt P450)

A.3.1 Bedeutung und Klassifizierung

Cyt P450s wurden 1958 unabhängig von Garfinkel und Klingenberg als Kohlenmonoxid-bindende Pigmente durch ihr ungewöhnliches Kohlenmonoxid-Differenzspektrum mit einer Absorption bei 450 nm in Säuger-Mikrosomen entdeckt (z.B. Garfinkel, 1958), was ihnen die Bezeichnung ‚P450‘ einbrachte. Einige Jahre später zeigte sich, dass es sich um Sauerstoff- und NAD(P)H-abhängige Häm-Enzyme handelt, welche membrangebunden oder löslich vorliegen und eine eigene Enzymklasse darstellen (Chapple, 1998). In den späten 60er Jahren konnten die ersten Cyt P450s isoliert werden, in den frühen 80er Jahren folgte die DNA-Sequenzierung und einige Jahre später wurde die Struktur aus dem Kristall abgeleitet (Nelson, 1999).

Nach ihrer Entdeckung begannen in den 60er Jahren intensive Studien über die Rolle von Cyt P450s im pflanzlichen Sekundärstoffwechsel (Frear *et al.*, 1969; Murphy & West, 1969). Die größte Anzahl Cyt P450s wurde aus Pflanzen beschrieben, was durch ihre im Vergleich zu tierischen Cyt P450s größere funktionelle Vielfalt und engere Substratspezifität zu erklären ist. Tierische Cyt P450s spielen eine wichtige Rolle im Metabolismus, im Steroid- oder Fettstoffwechsel, aber auch bei der Elimination von Arzneimitteln, Xenobiotika einschließlich Toxinen. In Pflanzen sind diese Enzyme in der Biosynthese von verschiedensten Sekundärmetaboliten wie Flavonoiden, Cumarinen, Furanocumarinen, Ligninen, Sterolen, Alkaloiden oder Phytohormonen involviert (Chapple, 1998; Werck-Reichhart & Feyereisen, 2000). Ein gut dokumentiertes Beispiel bietet die *p*-Hydroxylierung der Zimtsäure zur 4-Cumarsäure durch Zimtsäure 4-Hydroxylase (C4H). Funktionell sind sie an der Pathogenabwehr und weiteren lebenswichtigen oder vorteilhaften Prozessen wie UV-Schutz, Membranbildung, Detoxifizierung von Xenobiotika oder Pigmentierung zur Anlockung von Bestäuberinsekten bzw. zur Vermehrung beteiligt (Donaldson & Luster, 1991; Siminszky *et al.*, 1999).

Viele Cyt P450s lassen sich durch Stressoren wie UV-Strahlung, Verwundung oder Elicitoren *de novo* induzieren. Dabei können neben dem Entwicklungsstadium auch der Gewebetyp oder die Jahres- oder Tageszeit, sowie Schädlingsbefall und weitere Stresssituationen eine Rolle spielen (siehe Referenzen in Donaldson & Luster, 1991 und in Werck-Reichhart & Feyereisen, 2000).

Cyt P450s sind Mitglieder einer der größten und ältesten, stark divergenten Gen-Superfamilie (Ueyama *et al.* 2002). Ihre Sequenzen bergen eine große Variabilität, in manchen Fällen sind ihre Aminosäure-Sequenzen sogar zu weniger als 16% identisch. Anzahl und Diversität sind gekennzeichnet durch multiplen Verlust bzw. Zunahme an Introns, Genverdoppelung und vermutlich, aber wenig dokumentiert, durch Konversionen und lateralen Gentransfer (Werck-Reichhart & Feyereisen, 2000; Paquette *et al.*, 2000). Dennoch blieb ihre primäre Struktur durch die Evolution weitgehend unverändert. Jährlich wächst die Anzahl der bekannten Cyt P450-Sequenzen um einige Hundert an, beispielsweise von 3700 im Jahr 2004 auf 6766 Sequenzen (in 711 Familien) im April 2007, davon knapp ein Drittel aus Pflanzen (in 97 Familien) (Nelson, 2007). Aus *Arabidopsis thaliana* wurde eine vollständige Liste der Cyt P450s erstellt mit insgesamt 272 Sequenzen, von denen allerdings nur 15% funktionell charakterisiert werden konnten. Die große Anzahl, ihre Diversität, die Mannigfaltigkeit der katalytischen Funktionen und der Verteilung hat eine definierte Einteilung nach phylogenetischen Kriterien notwendig gemacht: Die Einteilungskriterien und die standardisierte Nomenklatur sind in Tab. 1 am Beispiel von CYP73A41 dargestellt:

Tab. 1: Nomenklatur von Cyt P450s

Bezeichnung	Klassifizierung	Einteilungs-Kriterium
CYP	Cytochrom P450	Vertreter der Cyt P450-Enzyme
Arabische Ziffer 73	Familie 73	AS-Sequenzen untereinander zu mindestens 40% identisch
Buchstabe A	Subfamilie A	AS-Sequenzen untereinander zu mindestens 55% identisch
Arabische Ziffer 41	41. Mitglied der Subfamilie	Numerische Reihenfolge

Die Exon-Intron-Organisation der Cyt P450 Gene enthüllt eine bemerkenswerte Diversität, wobei nur einige Intron-Positionen in verschiedenen P450 Familien konserviert sind. Die „Exon-Intron-Gen-Struktur“ kann somit als ein zusätzliches Kriterium für die Klassifizierung hinzugezogen werden (Chapple, 1998).

A.3.2 Aufbau und Reaktionsmechanismus von P450-Komplexen

Cyt P450s weisen eine Molmasse von 45 bis 62 kDa auf und bilden eine Komponente in den P450-Systemen, wobei hinsichtlich ihrer subzellulären Lokalisierung zwischen dem löslichen und membrangebundenen Typus unterschieden wird (Werck-Reichhart & Feyereisen, 2000). Pflanzliche Cyt P450-Systeme sind vor allem an der Membran des endoplasmatischen Retikulums lokalisiert, können aber auch in der plastidären Membran verankert sein (Degtyarenko, 1995). P450-Komplexe besitzen allgemein eine funktionelle 3-Domänen-Architektur (NADPH/Elektronentransport/Cyt P450), welche in Abhängigkeit vom Elektronentransfer vom NADPH auf das Cyt P450 aus unterschiedlichen Proteinkomponenten und Domänen aufgebaut ist (Fabian und Degtyarenko, 1996). Darauf basierend erfolgt die Einteilung in verschiedene Klassen (Tab. 2). In Pflanzen sind Cyt P450-Systeme der Klasse II vorzufinden, deren Komponenten Cyt P450 und Cyt P450 Reduktase sich in der Membran zu Komplexen anordnen (Abb. 10).

Tab. 2: Elektronen-Transfer-Systeme von Cyt P450-Komplexen

		Klasse I	Klasse II	Klasse III	Klasse IV
NADPH (Elektronen-Donor)		+	+	-	+
Elektronen-Transfer zum Cyt P450 über	FAD	FAD-enhaltende Reduktase	FAD/FMN-enhaltende Reduktase (CPR)	-	Direkter Transfer der Elektronen vom NADPH zum Cyt P450
	FMN	-		-	
	Eisen-Schwefel Redoxin	+		-	

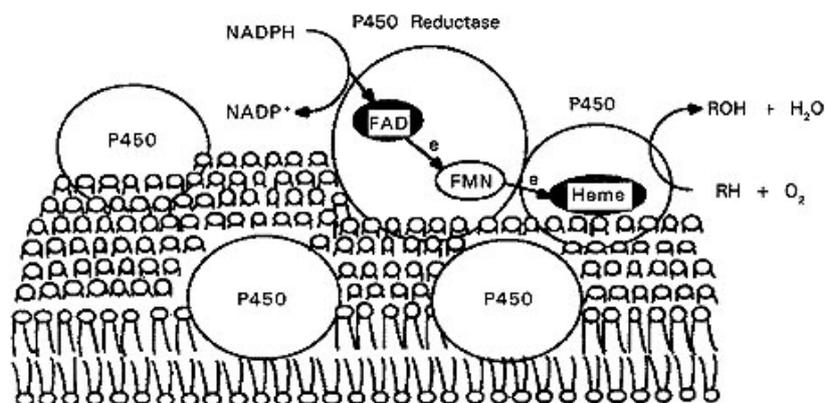


Abb. 10: P450-Systeme der Klasse II in der Membran

Die Elektronen werden vom NADPH über die P450 Reduktase, ein Flavoprotein bestehend aus FAD- und FMN-Domäne, auf die Häm-Domäne des Cyt P450 Enzyms übertragen. Zusätzlich kann noch ein Cytochrom b₅ zwischengeschaltet sein (Ohkawa *et al.*, 1998).

Das Cyt P450 besteht aus einem b-Typ Häm-Chromophor (Eisen-Protoporphyrin IX), das über ein hochkonserviertes Cystein an das Apoprotein mit Domänenstruktur und konservierten Regionen (Abb. 11) gebunden ist.

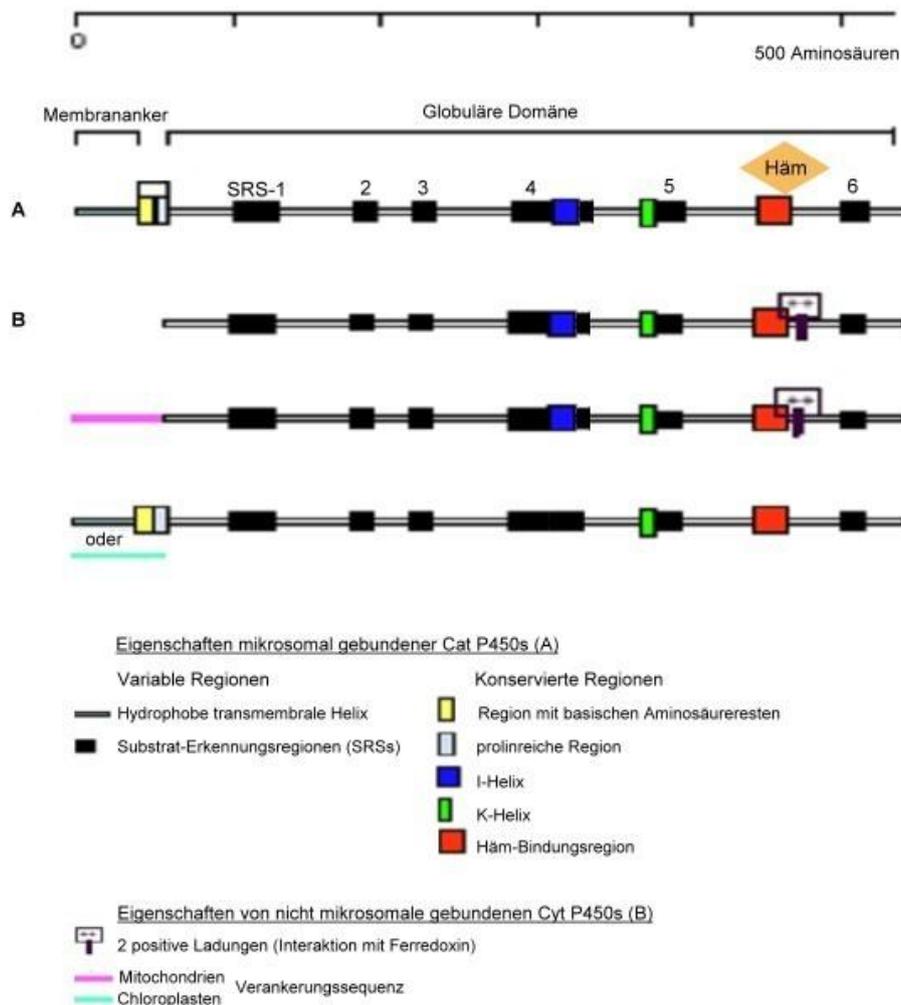


Abb. 11: Domänenstruktur und konservierte Bereiche von Cyt P450s

Der mikrosomale Typ (A) unterscheidet sich signifikant vom löslichen bzw. mitochondrialen oder plastidären Typ (B) (modifiziert nach Werck-Reichhart & Feyereisen, 2000).

Am N-Terminus der mikrosomal gebundenen Cyt P450s findet sich eine für die Membran-Verankerung verantwortliche hydrophobe Helix, wobei der größte Teil des Proteins auf der cytosolischen Seite der Membran verbleibt. Dieser Region folgen mehrere basische Aminosäurereste, welche mit den negativ geladenen Köpfen der ER-Membran-Lipide interagieren (Chapple, 1998). Die meisten eukaryotischen mikrosomalen Cyt P450s besitzen unmittelbar danach eine prolinreiche Region mit der Konsensussequenz [(P/I)PGPX(G/P)XP]

(Werck-Reichhart & Feyereisen, 2000). Die Aminosäuren Prolin und Glycin destabilisieren α -Helices, wodurch diese Region für die optimale Orientierung des Enzyms zu der Membran als eine Art Scharnier zwischen dem hydrophoben Membran-Anker und dem globulären Teil des Proteins fungiert (Yamazaki *et al.*, 1993). Die I-Helix auf der distalen Seite der Häm-Region weist in ihrem Zentrum eine Threonin enthaltende „Tasche“ für das Sauerstoffmolekül mit der Konsensussequenz [(A/G)GX(D/E)T(T/S)] auf (Ausnahme CYP74, Durst & Nelson, 1995; Nelson, 1999). Diese Konsensussequenz ist in der Sauerstoffaktivierung und dem Transfer von Protonen involviert (Chapple, 1998). Die K-Helix auf der proximalen Seite der Häm-Region beinhaltet die konservierte Sequenz [EXXR], welche vermutlich für die Stabilität der Protein-Kernstruktur verantwortlich ist (Ausnahme CYP157, Rupasinge *et al.*, 2006). Der am höchsten konservierte Bereich ist die Häm-Bindungsregion im zentralen und globulären Teil des Proteins (Kalb *et al.*, 1988). Sie liegt etwa 50 AS vom C-Terminus entfernt und beinhaltet die als weitere Cyt P450-Fingerprint angesehene Sequenz [PFGXGRRXCXG], wobei das absolut konservierte zentrale Cystein als 5. Ligand zum Häm-Eisen dient. Das Häm ist essentiell für die katalytische Funktion und verleiht dem Enzym die Fähigkeit, Kohlenmonoxid zu binden (Akashi *et al.*, 1997). Die Aminosäuren Glutamin und Arginin in der K-Helix und Cystein in der Häm-Domäne werden als die einzig komplett konservierten AS in allen Cyt P450s angesehen (Nelson, 2007). Am variabelsten sind die Regionen, welche mit der Membran-Verankerung oder mit der Substratbindung bzw. -erkennung in Verbindung gebracht werden (Werck-Reichhart & Feyereisen, 2000).

Reaktionsmechanismus

Pflanzliche Cyt P450s sind NAD(P)H- und O₂-abhängigen Monooxygenasen und können mannigfaltige Reaktionen katalysieren. Die am häufigsten katalysierte Reaktion ist die Hydroxylierung (Chapple, 1998), es erfolgt aber auch Peroxidation, Desaminierung, Isomerisierung, Reduktion oder Dehydrierung (Chapple, 1998; Mansuy, 1998). Dabei kann die CPR als Koenzym Elektronen auf mehrere unterschiedliche Cyt P450s übertragen ohne Einfluss auf die Substratspezifität von NADP(H). Die Zugabe von NADH kann in einer erhöhten Cyt P450 Aktivität resultieren, was vermutlich auf eine Beteiligung von Cytochrom b₅ hindeutet, welches *in vivo* die Elektronen von der NADH:Cyt b₅ Reduktase erhält (Donaldson & Luster, 1991).

Der Reaktionsmechanismus wurde bisher am gründlichsten hinsichtlich der Sauerstoff-Aktivierung untersucht, welche alle P450-Systeme gemeinsam haben. Das für die Katalyse erforderliche Eisen-Protoporphyrin IX mit konserviertem Cystein-Rest befindet sich im

Zentrum der Häm-Region. Die Elektronen vom NAD(P)H reduzieren den Enzym-Substrat-Komplex zur Aktivierung des molekularen Sauerstoffs, was zu einem regio- und stereospezifischen oxidativen Angriff auf das Substrat führt. Hierbei wird ein Sauerstoffatom auf das Substrat und das andere auf zwei Wasserstoffatome übertragen (Abb. 12).

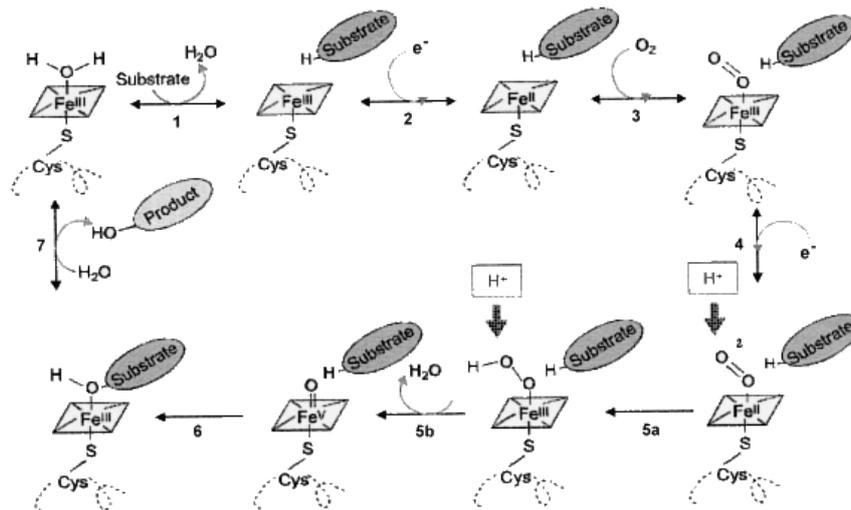


Abb. 12: Katalytischer Zyklus einer Cyt P450-Reaktion

- 1) Bindung des Substrates unter Verdrängung des 6. Häm-Liganden (H₂O).
 - 2) Ein-Elektronen-Transfer von NADPH über CPR zum Cyt P450 unter Reduktion des Fe³⁺ zum Fe²⁺.
 - 3) Bindung von O₂ unter Bildung eines Cyt P450 Superoxid (Dioxygen)-Komplex.
 - 4) Reduktions-Reaktion wie unter 2) unter Bildung einer aktivierten Sauerstoffspezies.
 - 5a) Protonierung des Komplexes.
 - 5b) Weitere Protonierung und H₂O-Abspaltung und Bildung eines Eisen-Oxo-Komplexes.
 - 6) Übertragung eines Sauerstoffatoms vom Oxo-Komplex auf das gebundene Substrat, resultierend in der Hydroxylierung.
 - 7) Entlassung des Produktes.
- (Mmodifiziert nach http://www.p450.kvl.dk/P450_reax_sm.jpg)

A.4 Zielsetzung der Arbeit

Die molekulare Aufklärung der linearen Furanocumarinbiosynthese bietet die Möglichkeit innovativer humantherapeutischer Anwendungen sowie die Datengrundlage für die Aufklärung der angulären Furanocumarinbiosynthese und evolutionärer Pflanzen-Insekt-Interaktionen.

Der Furanocumarinbiosyntheseweg führt von Umbelliferon über C-Prenylierung zu Demethylsuberosin (lineare Furanocumarine) bzw. Osthenol (anguläre Furanocumarine) und die nachfolgende oxidative Zyklisierung zu (+)-Marmesin bzw. (+)-Columbianetin, welche durch oxidative Spaltung zu Psoralen bzw. Angelicin umgesetzt werden. Jeder dieser Reaktionsschritte, ebenso wie die Hydroxylierung von Psoralen zu Bergaptol und dessen *O*-Methylierung zu Bergapten, wurde in früheren Untersuchungen *in vitro* nachgewiesen. Die Membran-Bindung in Kombination mit der Sauerstoff- und NADP(H)-Abhängigkeit der beteiligten Enzyme, mit Ausnahme der Prenyltransferase und der Bergaptol *O*-Methyltransferase, lassen auf Cyt P450s schließen. Zu Beginn dieser Arbeit war keines dieser Cyt P450s molekular charakterisiert. Da eine traditionelle Reinigung der Enzyme nicht möglich erschien, bestand das vorrangige Ziel der Arbeit darin, Furanocumarin-spezifische Cyt P450s durch cDNA-Amplifikation und funktionelle Expression zu identifizieren.

Ammi majus eignet sich, neben dem Interesse an seiner Bedeutung als Arzneipflanze, besonders für dieses Vorhaben, weil in dunkel kultivierten Zellsuspensionskulturen keine Furanocumarine und spezifische Enzymaktivitäten vorhanden sind. Nach *Pmg*-Elicitierung der Zellkultur kommt es jedoch zu einer raschen Furanocumarin-Akkumulation, wobei innerhalb dieses Zeitfensters vermutlich die spezifischen Transkripte transient induziert werden. Auf dieser Grundlage erschien für die Isolierung Furanocumarin-spezifischer Cyt P450-Transkripte eine differentielle Klonierungs-Strategie unter Einbezug neuer Technologien Erfolg versprechend. Eine funktionelle Identifizierung eines oder mehrerer dieser Transkripte als Furanocumarin-spezifisches Enzym sollte die exakte Messung der Induktion unter verschiedenen Stressoren und molekulare Vergleiche bzw. phylogenetische Studien ermöglichen und dadurch die Identifizierung weiterer Enzyme dieses Stoffwechselweges erleichtern.

Ein weiteres Ziel war die gewebespezifische Lokalisation des Furanocumarin-Stoffwechsels von der juvenilen bis zur adulten Pflanze. Die diesbezüglichen Aussagen in der Literatur sind teils widersprüchlich und konzentrieren sich meist nur auf Wurzel und Früchte. Der Nachweis Furanocumarin-spezifischer Transkripte in den verschiedenen Organen über die Entwicklung der Pflanzen würde erstmalig ein präziseres Bild liefern und im Zusammenhang mit der Produkt-Akkumulation Fragen zum Transport von Cumarinen und zur Altersabhängigkeit der Biosynthese klären.

B Material und Methoden

B.1 Material

B.1.1 *Ammi majus*

Pflanze

Die Anzucht von *Ammi majus* L. erfolgte aus Saatgut polnischer Herkunft (institutseigene Sammlung) im Gewächshaus. Nach Erreichen des 6-Blattstadiums wurden die Pflanzen im Freien weiterkultiviert. Die Definition der untersuchten Entwicklungsstadien und Pflanzenorgane ist in Tab.3 und Abb. 13 zusammengefasst.

Tab. 3: Verwendete Entwicklungsstadien und Organe von *Ammi majus*

Stadium	Beschreibung	Organe
Keimlings-Stadium	Zwei bis drei Wochen alt, die Kotyledonen voll entwickelt	Wurzel Kotyledonen
Vegetatives Stadium	Sechs bis acht Wochen alt, erste Blütenknospenansätze erkennbar	Wurzel Stängel Laubblatt
Blüten-Stadium	Ab der elften Woche, Blüten halb bis vollständig geöffnet	Wurzel Laubblatt Stängel Blüte
Samen-Stadium	Ab der zwölften Woche, Petale abgefallen, grüne Achänen erkennbar	Wurzel Stängel Laubblatt Same

Zellkultur

Für die Herstellung von Kalluskulturen wurden Samen in 70% (v/v) Ethanol gereinigt, mit 3% (w/v) Natriumhypochlorid für 15 min desinfiziert und dreimal mit steril filtriertem H_2O_{dest} gewaschen. Eine mechanisch erzeugte Wundfläche wurde in direkten Kontakt auf B5-Agar (B.1.9) gebracht, der entstandene Wundkallus vom Samen abgetrennt und anschließend monatlich auf frisches Medium übertragen. Suspensionskulturen wurden halbjährlich durch Zerkleinerung und Homogenisierung der Kalli neu hergestellt und mit wöchentlicher

Umsetzung im flüssigen B5⁺-Medium (B.1.9) bei 110 rpm kultiviert. Die Kultivierung der Zell-Kulturen erfolgte im Dunkeln bei etwa 25°C. Nach 6- bis 7-tägiger Subkultur wurden mRNA-Transkripte (B.3.2.1) aus elicierten Zellen, Furanocumarine aus dem Nährmedium (B.2) gewonnen.

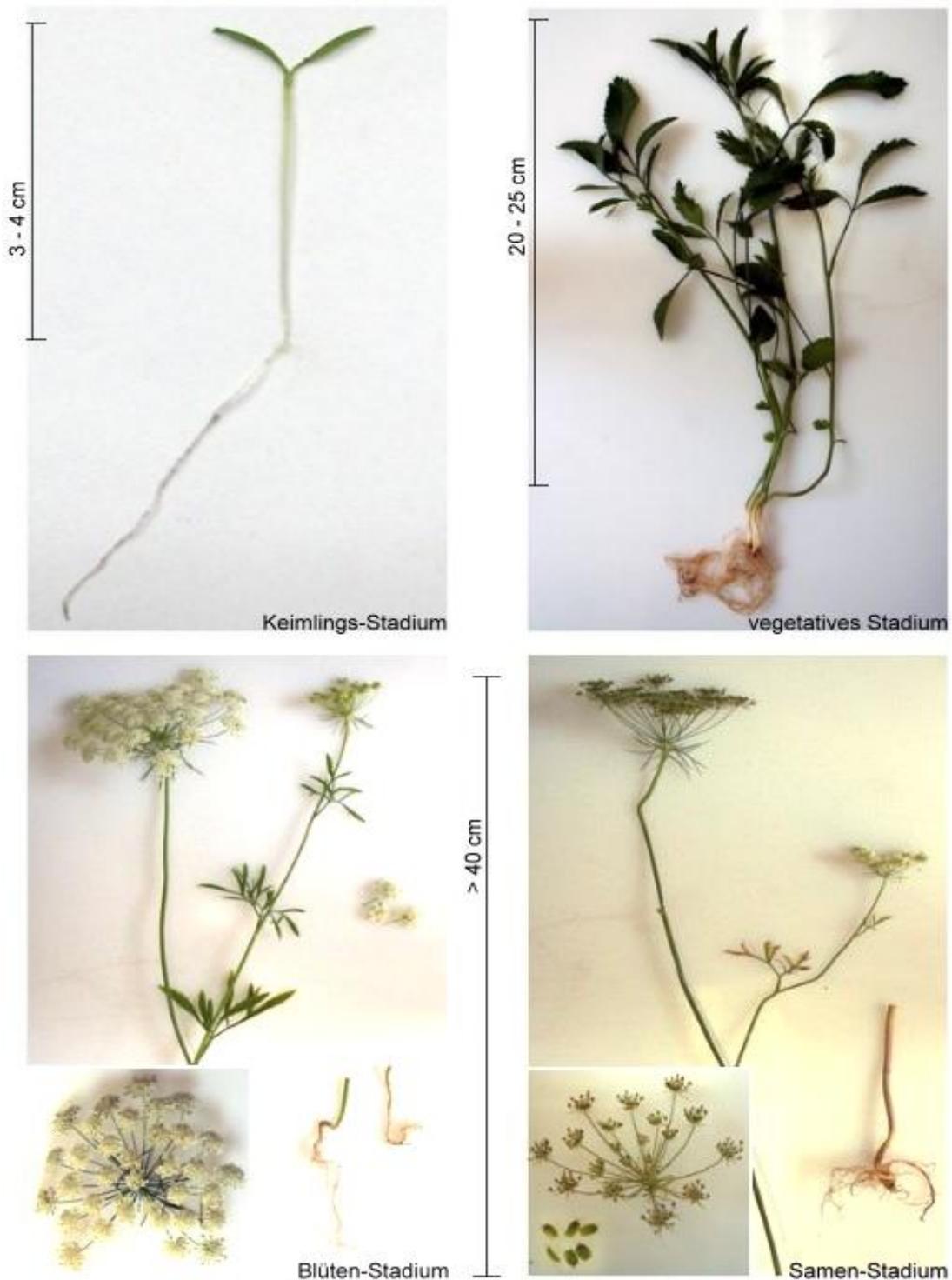


Abb. 13: Verwendete Entwicklungsstadien und Organe von *Ammi majus*

B.1.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Amersham Hybond N ⁺ Membran	GE Healthcare, München
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Desoxyribonukleotide	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
D-Galaktose	Duchefa Biochemie, Haarlem, NL
DNA-Größenstandards	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Hefeextrakt	Duchefa Biochemie, Haarlem, NL
Kieselgel 60 F ₂₅₄	Merck, Darmstadt
Micro Agar	Duchefa Biochemie, Haarlem, NL
Natrium-Dithionit	Fluka, Neu-Ulm
Pepton	Duchefa Biochemie, Haarlem, NL
<i>Pmg</i> -Elicitor	Sammlung des Institutes
Pep-13-Elicitor	freundlicherweise von Prof. Dr. Nürnberger (1994) zur Verfügung gestellt.
SeaKem [®] LE Agarose	Cambrex, Rockland, ME, USA
Whatman 3MM Chr	Whatman, Branbury, UK

Alle weiteren Chemikalien und Verbrauchsmaterialien wurden in analysenreiner Qualität von Roth (Karlsruhe) oder Sigma (Deisenhofen) bezogen.

B.1.3 Radiochemikalien

Alle Radiochemikalien werden mit ihrer spezifischen Aktivität angegeben und entstammen, soweit nicht anders angegeben, der Sammlung des Institutes.

[α - ³² P] dCTP (ICN, Meckenheim)	> 111 * 10 ³ GBq/mmol
[U- ¹⁴ C] Zimtsäure	1,702 kBq/nmol
4-[3- ¹⁴ C] Cumarsäure	7,4 Bq/ μ l
4-[3- ¹⁴ C] Cumarsäure glykosiliert	7,4 Bq/ μ l
<i>trans</i> -2,4-[3- ¹⁴ C] Dihydroxymimtsäure	13,45 Bq/ μ l
[3- ¹⁴ C] Demethylsuberosin	134,54 Bq/ μ l

B.1.4 Referenzsubstanzen, Substrate und Cosubstrate

Bergapten	Extrasynthese, Genay, France
Bergaptol	Extrasynthese, Genay, France
Cytochrom C	Fluka, Neu-Ulm

Demethylsuberosin	Sammlung des Institutes
NADPH	Roth, Karlsruhe
<i>O</i> -Prenylumbelliferon	Sammlung des Institutes
Psoralen	Fluka, Neu-Ulm
<i>trans</i> -2,4-Dihydroxycimtsäure	Sammlung des Institutes
<i>trans</i> -4-Cumarsäure	Roth, Karlsruhe
<i>trans</i> -4-Zimtsäure	Fluka, Neu-Ulm
Umbelliferon	Fluka, Neu-Ulm
Xanthotoxin	Sigma, Deisenhofen
Xanthotoxol	Roth, Karlsruhe

B.1.5 Enzyme

Soweit nicht anders angegeben, stammen alle Enzyme von MBI Fermentas (St. Leon Rot).

Deoxyribonuklease I , RNase frei

Pfu Polymerase

Restriktionsendonukleasen

RiboLock™ Ribonuclease Inhibitor

Ribonuclease A

RT-MMLUV

StrataScript® RT

Stratagene, Heidelberg

T4 DNA Ligase

Taq DNA Polymerase

Terminale Deoxynucleotidyltransferase

B.1.6 Reaktionssysteme (Kits)

DNeasy® Plant mini Kit

Qiagen, Hilden

GeneRacer™ Kit

Invitrogen, Leek, Niederlande

i-NTA His-Bind® Superflow Kit

Novagen, Darmstadt

NucleoSpin® Extract Kit

Macherey-Nagel, Düren

QuikChange® II XL

Stratagene, Heidelberg

Rediprimet™ II-random prime labeling System

Amersham Biotech, Braunschweig

RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit

MBI Fermentas, St. Leon Rot

RNeasy Plant Minikit

Quiagen, Hilden

S. c. EasyComp Transformation Kit	Invitrogen, Leek, Niederlande
Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, Heidelberg
TOPO TA Cloning [®] Kit for Sequencing	Invitrogen, Leek, Niederlande

B.1.7 Bakterien- und Hefestämme

Anzucht und Vermehrung des *Escherichia coli* Stammes Top10 (Tab. 4) erfolgten bei 37°C auf Agarplatten oder als Suspensionsschüttelkultur (220 rpm) in LB-Medium (B.1.9). In Abhängigkeit von dem jeweils verwendeten resistenzvermittelnden Vektor wurde auf Kanamycin oder Ampicillin (30 mg/ 30 ml LB-Medium) selektiert. Anzucht und Vermehrung der Hefestämme (Tab. 4) erfolgten versuchsbezogen auf Voll- oder Minimalmedien (B.1.9) bei 30°C auf Agarplatten oder als Suspensionsschüttelkultur (220 rpm).

Tab. 4: Bakterien und Hefen für Klonierung und Expression

Bezeichnung	Genotyp	Besonderheit	Herkunft
Escherichia coli			
Top10	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>lacX74 recA1 deoR araD139</i> Δ(<i>ara-leu</i>)7679 <i>galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i>		Invitrogen (Leek, Niederlande)
Saccharomyces cerevisiae			
INVSc1	<i>MATα; his 3-Δ1; leu 2; trp 1-289; ura 3-52</i>	endogene Hefe-CPR-Aktivität	Invitrogen (Leek, Niederlande)
Wat11	<i>MATα; ade 2-1; his3-11; leu 2-3; ura 3-1; trp 1; can^R; cyr+</i>	Austausch der hefeeigenen CPR mit ATR1 (als integratives pYeDP110-Konstrukt) aus <i>Arabidopsis thaliana</i> , (Urban <i>et al.</i> , 1997), Galaktose-induzierbare ATR-Überexpression	P. Urban, D. Pompon (Gif-sur-Yvette, Frankreich)
Cinv	<i>MATα; his 3-Δ1; leu 2; trp 1-289; ura 3-52</i>	INVSc1 mit zusätzlicher CPR (als replikatives p423ADH-Konstrukt) aus <i>Ammi majus</i> , konstitutive CPR-Expression	S. Kellner (Inst. für pharmazeut. Biologie, Marburg)

B.1.8 Vektoren

cDNA- und gDNA-Fragmente wurden für die Sequenzierung im Vektor pCR4[®]TOPO („TOPO TA Cloning[®] Kit for Sequencing“) kloniert. Die Expression der vollständigen Klone wurde in den Vektoren pYes2/CT, p423ADH oder pYeDP60 durchgeführt.

Die Vektoren sind tabellarisch und graphisch aufgeführt (Tab. 5, G.4).

Tab. 5: Klonierungs- und Expressionsvektoren

Bezeichnung	Expressionskassette	Selektionsmarker	Insertionsstelle	Herkunft
pCR4 [®] TOPO	-	Letal-Gen <i>ccdB</i> , Kanamycin- & Ampicillin-Resistenz	komplementäre T- Überhänge, assoziiert mit Topoisomerase I (<i>Vaccinia</i> Virus)	Invitrogen, (Leek, Niederlande)
pYes2/CT	GAL1 Promotor (Galaktose-induzierbar), CYC1 Terminator	Ampicillin-Resistenz, URA3 Komplementationsmarker	Polylinker, C-terminaler His- Tag	Invitrogen, (Leek, Niederlande)
p423ADH	ADH Promotor (konstitutiv), CYC1 Terminator	Ampicillin-Resistenz, HIS3 Komplementationsmarker	Polylinker	Mumberg <i>et al.</i> , 1995
pYeDP60	GAL10-CYC1 Hybrid Promotor (Galaktose-induzierbar), PGK Terminator	Ampicillin-Resistenz, URA3, ADE2 Komplementationsmarker	Polylinker	Pompon <i>et al.</i> , 1996

B.1.9 Nährlösungen

Nährlösungen wurden mit H₂O_{dest.} hergestellt und autoklaviert. Ethanol, steril filtrierte Galaktose oder Glukose wurden nach dem Autoklavieren hinzugegeben.

Nährlösungen für Pflanzen

B5 Festmedium und B5* Flüssigmedium wurden nach Gamborg *et al.* (1967) zubereitet:

Makro-Nährstoffe	2 ml/l Na ₂ H ₂ PO ₄ x H ₂ O-Stammlösung (75 g/l), 20 ml/l KNO ₃ - Stammlösung (125 g/l), 2 ml/l (NH ₄) ₂ SO ₄ Stammlösung (67 g/l), 2 ml MgSO ₄ x 7 H ₂ O-Stammlösung (125 g/l), 1 ml/l CaCl ₂ x 2 H ₂ O- Stammlösung (171 g/l), 1 ml/l KJ-Stammlösung (0,75 g/l), 5 ml/l Fe- EDTA-Stammlösung, 2,78 g/l FeSO ₄ x 7 H ₂ O, 3,72 g/l Na ₂ EDTA
Spurenelemente	1 ml/l Stammlösung (1,12 g/l MnSO ₄ x H ₂ O, 300 mg/l H ₃ BO ₃ , 300 mg/l ZnSO ₄ x 7 H ₂ O, 25 mg/l NaMoO ₄ x 2 H ₂ O, 39 mg/l CuSO ₄ x 5 H ₂ O, 25 mg/l CoCl ₂ x 6 H ₂ O)
Vitamine	1 ml/l Stammlösung (1 g/l Nicotinsäure und Thiamin-HCl, 100 g/l myo- Inosit und Pyridoxin-HCl)
Hormone	10 ml/l (B5) bzw. 20 ml/l (B5*) 2,4-D-Stammlösung (100 mg/l)

Aminosäuren	200 mg/l Cystein (B5*)
Kohlenstoffquelle	20 g/l Saccharose
Agarose	10 g/l (B5)

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 5,5 eingestellt.

Nährlösungen für Bakterien und Hefen

Bakterienmedien

LB (Luria Bertani)	nach Sambrook <i>et al.</i> (1989): 10 g/l Pepton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, 1 ml/l 1 M MgSO ₄ , 4 ml/l 50%iges (v/v) Glycerol, pH 7,5, LB-Platten enthalten zusätzlich 1,5% (w/v) Bacto-Agar
SOC	20 g/l Pepton, 5 g/l Hefeextrakt, 0,6 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 1 g/l MgCl ₂ , 3,5 g/l Glukose

Hefemedien

YPG	10 g/l Hefeextrakt, 20 g/l Pepton 20 g/l Glukose
YPGE	10 g/l Hefeextrakt, 20 g/l Pepton 5 g/l Glukose, 3% (v/v) Ethanol
YPGA	10 g/l Hefeextrakt, 20 g/l Pepton 20 g/l Glukose, 0,2 g/l Adenin
SC	6,7 g/l Hefeextrakt (ohne Aminosäuren) 0,1 g/l Adenin, L-Arginin-Cl, Cystein, L-Leucin, L-Lysin, L-Threonin, L-Tryptophan und Uracil 0,05 g/l Asparaginsäure, L-Histidin, L-Isoleucin, L-Methionin, L-Phenylalanin, Prolin, L-Serin, L-Tyrosin und L-Valin 100 ml/l 20% (w/v) Glukose

Das SC-Minimalmedium wurde je nach verwendetem Vektor (B.1.8, G.4) ohne die Aminosäuren Uracil, Histidin oder Adenin hergestellt. Festmedien enthalten zusätzlich 2% (w/v) Bacto-Agar.

B.1.10 Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen wurden mit H₂O_{dest.} hergestellt und autoklaviert. 2-Mercaptoethanol, steril filtrierte Galaktose oder Glukose wurden nach dem Autoklavieren hinzugegeben.

Puffer für die Gelelektrophorese

Agarose-Gelelektrophorese

50x TAE-Puffer 2 M Tris, 1 M Essigsäure, 0,1 M EDTA, pH 8,0

SDS-PAGE

Trenngelpuffer	1,5 M Tris/HCl, pH 8,8
Trenngel (12,2%)	4,1 ml 30% (w/v) Acrylamid, 2,5 ml Trenngelpuffer 400 µl 10% (w/v) SDS, 3 ml H ₂ O _{dest.} , 16 µl TEMED 70 µl 10% (w/v) APS
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris/HCl, pH 6,8
Sammelgel (4,5%)	375 µl 30% (w/v) Acrylamid, 100 µl 10% (w/v) SDS, 625 µl Sammelgelpuffer, 1,4 ml H ₂ O _{dest.} , 5 µl TEMED 20 µl 10% (w/v) APS
Probenpuffer	0,15 M Tris/HCl, 12% (w/v) Glycin, 4,7% (w/v) SDS
SDS-Gel-Färbelösung	45% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure, 0,25% (v/v) Coomassie Brilliant Blue R-250
SDS-Gel-Entfärbelösung	40% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure

Puffer und Lösungen für die Nukleinsäuren-Isolierung

gDNA- und RNA-Isolierung

gDNA-Extraktionspuffer	100 mM Tris/HCl, 50 mM EDTA, 500 mM NaCl, 20 mM 2-Mercaptoethanol
50x TE	50 mM Tris/HCl pH 8,0, 10 mM EDTA
RNA-Extraktionspuffer	4 M Guanidiniumthiocyanat, 1,5 M Natriumacetat, pH 5,3, 0,2% (w/v) Natriumsarcosinat, 0,7% (v/v) 2-Mercaptoethanol

Plasmid-Präparation aus Bakterienzellen

GTE-Puffer	25 mM Tris/HCl, pH 8,0, 50 mM Glukose, 10 mM EDTA, 0,02 mg/ml RNase
Bakterien Lyse Puffer	0,2 N NaOH, 1% (w/v) SDS
PAS-Lösung	5 M Kaliumacetat, pH 4,8

Plasmid-Präparation aus Hefezellen

Yeast Lysis Buffer	10 mM Tris/HCl, pH 8,0, 1% (w/v) SDS, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2% (v/v) Triton X-100
--------------------	--

Lösungen für die Bakterien-Transformation

Lösung 1	100 mM MgCl ₂ -Lösung resuspendiert
Lösung 2	100 mM CaCl ₂ -Lösung, 15% (v/v) Glycerol

Puffer für die Genexpression, Proteinsolubilisierung und CO-Differenzspektroskopie

TEK	50 mM Tris/HCl pH 7,4, 1 mM EDTA, 0,1 M KCl
TES-B*	50 mM Tris/HCl pH 7,4, 1 mM EDTA, 2 mM DTT, 0,6 M Sorbitol
TE(G)*	50 mM Tris/HCl pH 7,4, 1 mM EDTA, 2 mM DTT, (20 % (v/v) Glycerin)
Solubilisierungspuffer	50 mM Natriumphosphat, pH 7,2, 5% (v/v) Glycerin, 320 mM CaCl ₂ , 0,5 – 2% (v/v) Triton X-100

Puffer und Lösungen für Northern und Southern Blot

Denaturierungspuffer-1	0,5 M Formaldehyd, 34% (v/v) Formamid, 0,68x MOPS- Puffer
Denaturierungspuffer-2	0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl
Neutralisierungslösung	0,5 M Tris/HCl, pH 7,4, 1,5 M NaCl
10x MOPS	200 mM MOPS, 50 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA
20x SSC	3 M NaCl, 300 mM Natriumcitrat, pH 7,0
20x SSPE	3 M NaCl, 200 mM NaH ₂ PO ₄ , 20 mM EDTA, pH 7,4
50x Denhardts Reagenz	1% (w/v) Ficoll Typ 400, 1% (w/v) PVP, 1% (w/v) BSA, sterilfiltriert
Prä-/Hybridisierungslösung	5x SSPE, 5x Denhardts Reagenz, 0,2% (v/v) SDS, 0,025% (v/v) Heringssperma DNA (vor Zugabe frisch denaturiert)
Waschlösung 1	2x SSC, 10% (w/v) SDS
Waschlösung 2	1x SSC, 10% (w/v) SDS
Waschlösung 3	0,1x SSC, 10% (w/v) SDS

Puffer und Lösungen für Chromatographie-Systeme

Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel

Laufmittel Toluol:Eisessig (4:1)

HPLC (High pressure liquid chromatography)

Laufmittel A 80% (v/v) Acetonitril

Laufmittel B 1,5% (v/v) Phosphorsäure

IMAC (Metallchelatchromatographie)

Waschpuffer 50 mM NaH₂PO₄, pH 7,2, 300 mM NaCl, 0,5% (v/v)
Triton X- 100, 5% (v/v) Glycerin, 20 mM Imidazol

Elutionspuffer

wie Waschpuffer, mit 150 mM Imidazol

B.1.11 Geräte

Auftrennung von RNA, Proteinen und sekundären Pflanzenstoffen

Minifold I-SRc 96-Dot Blot PAGE-Apparatur

Schleicher & Schüll, Dassel

Miniprotean-II 2D Multicell

Bio-Rad, München

HPLC LaChrom Modell D-7000 HSM

Merck/Hitachi, Darmstadt

DAD L 4500

UV-Detektor L 4250

Interface D 6000

Pumpen L 6200A

Autosampler AS 4000 A

Radioaktivitätsanalyse und Spektralphotometer

Spektralphotometer UV-160

Shimadzu, Kyoto, Japan

Spektralphotometer V550

Jasco, Groß-Umstadt

Tri-CarbTM Liquid Scintillation Analyzers Mode 1900TR

Packard, Meiden, USA

BAS FLA 2000 Bioimaging Analyzer

Fuji Photo Film, Tokyo,
Japan

PCR

Robocycler Gradient 96

Stratagene, Heidelberg

Zentrifugen und Heizgeräte

2K15 Zentrifuge

Sigma, München

Sorvall[®] RC 5C Zentrifuge, RMC 14 Tischzentrifuge

DuPont, Newton, USA

Thermomixer 5336 und 5473

Eppendorf, Hamburg

Uni Equip Hybridisierungsöfen 6/12

Uni Equip, Martinsried

Sonstige Laborgerätschaft

Ultraschallgeräte Sonifier

Uni Equip, Martinsried

B.2 Induktion der Furanocumarinbiosynthese

Die Induktion erfolgte in homogenen Zellsuspensionskulturen von *Ammi majus* (B.1.1), sechs bis sieben Tage nach Subkultur. Jede Kultur wurde vor ihrer Verwendung auf eventuell vorhandene Furanocumarine anhand ihrer blauen Fluoreszenz unter Anregung bei 312 nm geprüft, da verschiedene Stressfaktoren, wie z.B. das Alter, zur Furanocumarin-Produktion führen können. Für die Induktion mit *Pmg*-Elicitor wurden 5 mg Elicitor in 1 ml steril filtriertem H₂O_{dest.} 5 min auf 95°C erhitzt, um ein homogenes Gemisch zu erhalten. Die abgekühlte Elicitor-Lösung wurde zu 40 ml Suspensionskultur gegeben und die Suspension bis zu 28 Stunden weiterkultiviert. Die Kontrollkultur erhielt nur 1 ml steril filtriertes H₂O_{dest.} Die Induktions-Effizienz des *Pmg*-Elicitors wurde im Verlauf der Arbeit mit anderen biotischen und abiotischen Stressoren verglichen (Tab. 6). Zur Elicitierung mit ethanolischem Methyljasmonat wurde eine Kontrolle mit 100 µl Ethanol_{abs.} behandelt.

Tab. 6: Elicitoren für die Induktion der Furanocumarinbiosynthese in *Ammi majus*

Elicitoren ¹⁾	Konzentration
Biotische Elicitoren	
<i>Pmg</i> (Zellwand-Präparation von <i>Phytophthora sojae</i>)	5 mg/40 ml Suspensionskultur
Pep-13 (13 AS große Oligopeptid gewonnen aus Oberflächen-Transglutaminase von <i>Phytophthora sojae</i> , nachgewiesen in 10 <i>Phytophthora</i> -Arten)	5 mg/40 ml Suspensionskultur
Abiotische Elicitoren	
Methyljasmonat (in Ethanol _{abs.})	0,1 mM
CuSO ₄	10 mM
AgNO ₃	0,01-0,05-0,1 mM
CaCl ₂	10 mM
Kälte (4°C)	
Tageslicht (UV-Strahlung)	

¹⁾ Die Bezugsquellen der Elicitoren sind in Kapitel B.1.2 aufgelistet.

Die Pflanzenzellen wurden mittels Vakuumpumpe über einen Filter von der Nährlösung getrennt und vor der Extraktion dreimal mit filtriertem H₂O_{dest.} gewaschen. Die Analyse der extrahierten Furanocumarine (B.4.1) erfolgte durch DC (B.4.2.1) und HPLC (B.4.2.2). Extrakte wurden bei 4°C, Zellen sowie Medium schockgefroren bei -80°C gelagert.

B.3 Molekularbiologische Methoden

B.3.1 Gelelektrophorese

Agarose-Gelelektrophorese

Nukleinsäuren von 2-10 kbp wurden in 0,8%igem ($^{w/v}$), 0,2-3 kbp in 1,5%igem und 0,1-1 kbp in 3%igem Agarosegel aufgetrennt. Soweit nicht anders beschrieben, wurde ein Lauf in 1xTAE-Puffer (B.1.10) für 45 min bei 70 mA, 10 W und 100 V mit einem Verhältnis Probe:Ethidiumbromid von 14:1 ($^{v/v}$) durchgeführt. Die NS-Detektion erfolgte unter 312 nm.

SDS-PAGE

Die SDS-PAGE erfolgte in Anlehnung an Laemmli (1970) in einer Miniprotean-II Apparatur (Biorad, München). Das Protein (5 μ g) wurde mit 5 μ l SDS-Probenpuffer (B.1.10) und 10 μ l DTT-Stammlösung (8 mg DTT/ml $H_2O_{dest.}$) versetzt und für 5 min bei 95°C denaturiert. Überstieg das Volumen der Proteinlösung 30 μ l, wurde das Protein mit gleichem Volumen 24%iger ($^{v/v}$) Trichloressigsäure versetzt, 30 min auf Eis gefällt, für 10 min bei 10.000 rpm zentrifugiert und zweimal 5 min mit 500 μ l eiskaltem Aceton gewaschen, um es dann in einem geringeren Volumen DTT-Stammlösung aufzunehmen. Die Proteine wurden unter 180 V für eine Stunde aufgetrennt, mittels 0,25%iger ($^{v/v}$) Coomassie-Lösung (B.1.10) angefärbt und der Hintergrund mit Entfärbelösung (B.1.10) gewaschen.

B.3.2 Nukleinsäureisolierung und -reinigung

Isolierte Nukleinsäuren wurden luftgetrocknet in 50 μ l filtriertem, sterilem $H_2O_{dest.}$ aufgenommen und bei +4°C (gDNA) bzw. bei -20°C (cDNA) oder nach Schockgefrieren bei -80°C (RNA) gelagert. Der Gehalt wurde durch UV-Spektroskopie bei 260 nm bestimmt und die Integrität sowie gDNA-, bzw. RNA-Kontaminationen auf Agarose-Gel (B.3.1) überprüft. Verunreinigungen durch z. B. Salze, Phenole oder Proteine wurden durch das Verhältnis 230/260 nm bzw. 280/260 nm festgestellt.

B.3.2.1 Gesamt-RNA

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Polyphenol- oder Polysaccharid-reichem Gewebe (z.B. Wurzeln) wurde mit dem „RNeasy Plant Mini Kit“ (Kieselgel-Technologie) von Qiagen (Hilden) in RLC-Puffer nach Herstellerangaben durchgeführt.

In allen anderen Fällen erfolgte die Isolierung nach der „Guanidinium Thiozyanat-Phenol-Chloroform Extraktions-Methode“ von Giuliano *et al.* (1993): Alle Inkubationen wurden auf Eis und Zentrifugationen bei 4°C durchgeführt. Das Pflanzenmaterial (200 mg) wurde in flüssigem Stickstoff zu feinem Pulver gemörsert und durch Vortexen mit auf Eis vorgelegtem 500 µl Extraktionspuffer (B.1.10), 3,5 µl 0,7%igem (v/v) 2-Mercaptoethanol und 400 µl Phenol homogenisiert. Nach Zugabe von 100 µl Chloroform wurde der Ansatz gemischt bis das Homogenat gleichmäßig milchig-trüb erschien und für 20 min inkubiert. Nach Zentrifugation für 20 min bei 13.000 rpm wurde die Oberphase in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit einem Volumen Isopropanol versetzt, für 1 h auf Eis belassen und wie zuvor zentrifugiert. Das luftgetrocknete Pellet wurde in 500 µl steril filtriertem Wasser (pH 7,5) auf Eis resuspendiert, indem das Reaktionsgefäß alle 5 min vorsichtig angeschnippt wurde. Nach 1 h wurde die Lösung mit 100 µl Ethanol_{abs.} versetzt und nach 20 min auf Eis für 10 min bei 10.500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 1/3 Volumen 8 M LiCl vermischt, die RNA nach einer Stunde für 20 min bei 13.000 rpm gefällt, der Überstand abgossen und das Pellet zweimal mit 0,5 ml 80% igem (v/v) Ethanol gewaschen.

B.3.2.2 *gDNA*

Die Isolierung großer gDNA-Mengen erfolgte mittels der SDS-Kaliumacetat-Extraktions-Methode (Dellaporta *et al.*, 1983). Für die schnelle Isolierung kleiner Mengen wurde das „DNeasy[®] Plant Mini Kit“ (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben verwendet.

B.3.2.3 *Plasmid-DNA aus Bakterien und Hefe*

Bakterien

Eine Übernachtskultur (2 ml) wurde durch Zentrifugation (13.000 rpm, 1 min) geerntet und in 150 µl GTE-Puffer (B.1.10) resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl Bakterien Lyse-Puffer und 100 µl PAS-Lösung (B.1.10) wurde jeweils für 5 min auf Eis inkubiert und anschließend für 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 1 ml Ethanol_{abs.} versetzt, einige Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, die DNA durch Zentrifugation (13.000 rpm, 1 min) gefällt und zweimal mit 70% igem (v/v) Ethanol gewaschen.

Hefe

Die Plasmid Präparation aus Hefen erfolgte modifiziert nach einem Protokoll von Hofmann und Winston (1987). Eine Übernachtskultur (10 ml) wurde bei einer OD₆₀₀ von etwa 1,8 durch Zentrifugation bei 1500 rpm für 1 min geerntet, in 1 ml steril filtriertem H₂O_{dest.} gewaschen

und in 200 µl Yeast Lysis Buffer (B.1.10) resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) wurden die Zellwände mit etwa 0,3 g Glasperlen durch Vortexen zerstört, 200 µl TE (B.1.10) zugegeben und wie oben beschrieben zentrifugiert. Die obere Phase wurde abgenommen, mit 1 ml Ethanol_{abs.} versetzt und die DNA durch Zentrifugation (13.000 rpm, 1 min) gefällt. Das luftgetrocknete Pellet wurde in 200 µl steril filtriertem H₂O_{dest.} resuspendiert und RNA-Kontaminationen durch 0,02 mg/ml RNase (37°C, 30 min) verdaut. Die Präzipitation der Plasmid-DNA erfolgte für 30 min bei -20°C durch Zugabe von 2,5 Volumen eiskaltem Ethanol_{abs.} mit 0,1 Volumen 3M Natriumacetat (pH 5,2) und anschließender Zentrifugation (13.000 rpm, 1 min). Die gefällte DNA wurde zweimal mit 70% (^v/_v) Ethanol gewaschen.

B.3.2.4 *Nukleinsäurereinigung*

Allgemeine Reinigung von Salzen, Proteinen, Polysacchariden

Zur Reinigung oder Konzentrierung einer Nukleinsäurelösung wurde diese mit 2,5 Volumen eiskaltem Ethanol und 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat-Lösung pH 5,2 versetzt und bei -20°C für 60 min inkubiert. Das Präzipitat wurde für 15 min bei 13.000 rpm pelletiert, dreimal mit 70% igem (^v/_v) Ethanol gewaschen und das luftgetrocknete Pellet in filtrierten sterilen H₂O_{dest.} aufgenommen. Quantität bzw. Qualität wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese (B.3.1) und photometrischer Messung (260 nm) analysiert und eventuell vorhandene größere Protein-Verunreinigungen durch Zugabe eines Volumens Phenol:Chloroform:Isopropanol (25:24:1:) wie oben beschrieben entfernt und nachträglich mit 70% (^v/_v) Ethanol gewaschen.

Aufreinigung einer mit RNA kontaminierten DNA-Lösung

Die Eliminierung von RNA erfolgte nach Herstellerangaben mit Ribonuclease A (MBI Fermentas, St. Leon Rot) bei 37°C für 30 bis 60 min.

Aufreinigung einer mit DNA kontaminierten RNA-Lösung

Die selektive Präzipitation von RNA in einem DNA-RNA-Gemisch erfolgte durch Zugabe von ¹/₃ Volumen 8 M Lithiumchlorid und anschließender Inkubation bei -20°C für mindestens 60 min. Fällung und Waschen des Pellets erfolgten wie unter B.3.2.1 beschrieben.

Aufreinigung von DNA und Gelelektion mit Kieselgel-Technologie

Verwendet wurde das Kit „NucleoSpin[®] Extract“ (Macherey-Nagel, Düren). Die an Kieselgel-Säulen gebundene DNA wurde mit steril filtriertem, auf 65°C erhitztem H₂O_{dest.}

eluiert. Um die Elutions-Effizienz und die DNA-Konzentration zu erhöhen, erfolgte eine wiederholte Elution mit dem bereits gewonnenen Eluat.

B.3.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

B.3.3.1 Standard-PCR und Primer-Design

Die „Proof Reading“-PCR von Expressionsklonen erfolgte mit der *Pfu*-Polymerase (von *Pyrococcus furiosus*), alle anderen PCR-Reaktionen mit der *Taq*-Polymerase (von *Thermophilus aquaticus*). Jede PCR wurde, sofern nicht anders beschrieben, zunächst mit den in Tab. 7 aufgeführten Parameter durchgeführt, welche individuell optimiert wurden.

Tab. 7: Standard-PCR-Bedingungen

Physikalische Parameter			
Zyklenanzahl	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Reaktion
1x	95	4	Denaturierung
	95	0,5	Denaturierung
	50 – 70	1	Primer-Anlagerung
30x	72	1/kp Amplikon	Amplifikation
1x	72	2	Amplifikation
Reaktionsansatz			
Oligonukleotide/Zusatz		Konzentration	
DNA-Polymerase		0,75 – 1,25 U	
Template		100 ng/50 µl Ansatz	
Primer (20 – 35 bp)		Je 0,2 – 1µM	
dNTPs		0,2 mM	
Puffer		1x	
Mg ²⁺		1 – 2 mM	

Die Primer-Konstruktion erfolgte, soweit möglich, nach folgenden Parametern: Länge 20-35 bp, G/C-Gehalt 45–55%, Anlagerungstemperatur 55-65°C, Basen-Folge am 5'-Ende zwei starke – eine schwache – eine starke Base, am 3'-Ende eine schwache Base. Die Restriktionseffizienz von Endonukleasen für Schnittstellen-modifizierte Primer bzw. die Primer-Anlagerungstemperatur wurden durch zusätzliche Basen vor der Schnittstelle bzw. am Primer-Ende optimiert (<http://www.fermentas.com>). Die physikalischen Eigenschaften

wurden mit dem Programm „Oligo Calculator“ von Eugen Buehler (B.6) berechnet, die Synthese erfolgte bei MWG Biotech (Martinsried) oder Sigma Genosys (Deisenhofen).

B.3.3.2 Cyt P450-spezifische differentielle ACP-PCR

Um 3'-Enden von cDNA-Fragmenten zu isolieren, welche potentiell für Furanocumarin-spezifische Proteine aus *Ammi majus* codieren, wurde eine differentielle PCR in Kombination mit der auf speziellen Primern basierenden ACP-Technologie (Seegene, Korea) durchgeführt (Abb. 14).

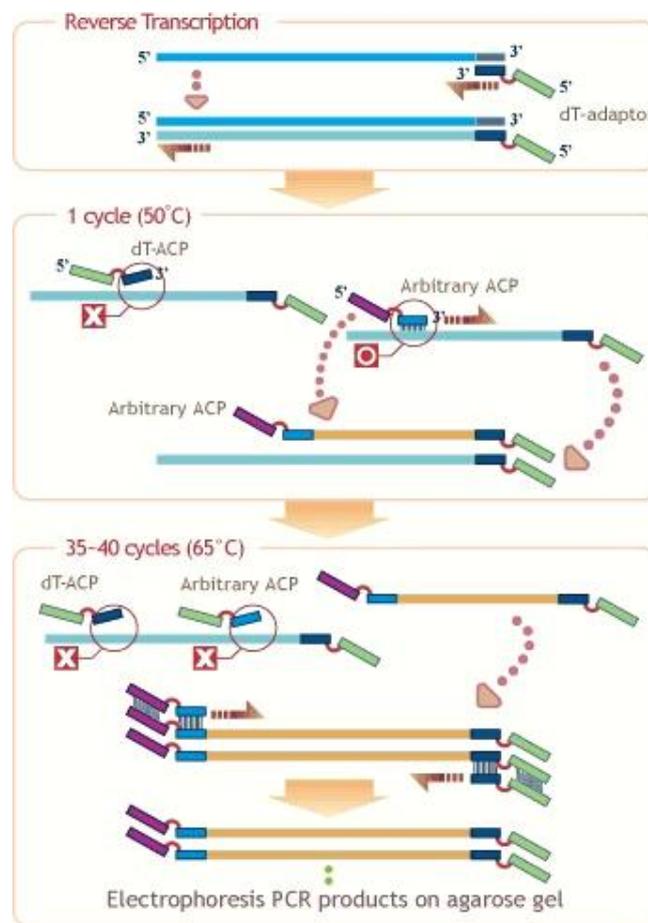


Abb. 14: ACP™-Technologie (Seegene, Seoul, Korea)

- Schritt: Reverse Transkription von mRNA in Antisense cDNA mit dT-ACP1
- Schritt: 1. PCR: Synthese eines Arbitrary-ACP-spezifischen cDNA-Fragmentes mit 5'- und 3'-ACP-Adapter-Sequenz: Antisense cDNA wird mit einem Template-spezifischen Arbitrary ACP und dT-ACP2 in der PCR eingesetzt. Die 5'-Enden des Arbitrary-ACP's und des dT-ACP's sind Template-unspezifisch und können unter der Anlagerungstemperatur von 50°C nicht an das Template hybridisieren. Nur das Template-spezifische 3'-Ende des Arbitrary-ACP's lagert sich an die entsprechende Template-Sequenz an. Die Synthese von Artefakten und von dT-ACP1/dT-ACP2-Produkten wird verhindert.
- Schritt: 2. PCR: Amplifikation von Arbitrary-ACP-spezifischen cDNA-Fragmenten; Die PCR-Reaktion vom 2. Schritt dient unter hoch stringenten Bedingungen (Anlagerungs-Temperatur 65°C) als Template. Es hybridisieren nur die einander entsprechenden genspezifischen ACP-Adapter-Sequenzen und das Template-spezifische 3'-Ende des Arbitrary-ACP's. Die Synthese von Artefakten wird verhindert.

(<http://www.see-gene.com>)

Der Unterschied zur normalen differentiellen PCR beruht auf der speziellen Primer-Struktur (ACP: Annealing Control Primer, G.3), welche aus einer 5'-Adapter-Sequenz, einer 3'-Template-spezifischen Sequenz und einer fünf Inosin-Reste enthaltenden Mittelsequenz besteht. Die dT-ACPs sind komplementär zum poly(A)-Ende der mRNA und besitzen eine zusätzliche Anker-Sequenz für die nested PCR. Die „Arbitrary-ACPs“ wurden auf Basis von Cyt P450-spezifische Nukleinsäuren (G.1) für die vorliegende Arbeit modifiziert (mACP1-mACP6, G.3).

Vor Beginn der Versuche wurde sowohl die Effektivität der mACPs, als auch die differentielle PCR-Technik überprüft. Bekannte Cyt P450-cDNAs (FNSII und F3'H aus *Hieracium pilosella*, Kellner, 2003) wurden mit mACPs in Kombination mit genspezifischen 3'-End-Primern amplifiziert, um die Primerbindung zu untersuchen. Der Nutzen der differentiellen PCR-Technik wurde mit genspezifischen POS-Primern und zwei cDNA-Populationen als Templates geprüft, welche aus der Gesamt-RNA einer elicitierten bzw. einer nicht-elicitierten Suspensionskultur hergestellt worden sind. Nachdem die Kontrollen ein deutlich differenziertes Bild lieferten, wurde die Furanocumarinbiosynthese in *Ammi majus* Suspensionskulturen mit *Pmg*-Elicitor induziert oder parallel die Kultur mit steril filtriertem H₂O_{dest.} behandelt (B.2).

Aus den induzierten Kulturen und Wasser-behandelten Kontrollen wurde stündlich Gesamt-RNA extrahiert (B.3.2.1) und je zwei Extraktionen zu einer RNA-Population zusammengefasst: 1+2h, 3+4h, 5+6h, 7+8h, 9+10h und 11+12h. Aus jeder Population wurde 1 µg RNA mit 20 µM dT-ACP1 versetzt, mit sterilem H₂O_{dest.} auf ein Gesamtvolumen von 6 µl aufgefüllt und für 3 min bei 80°C inkubiert, um eventuelle Sekundärstrukturen aufzulösen. Der Reaktionsansatz wurde mit Wasser auf ein Volumen von 9,5 µl gebracht, 2 min auf Eis belassen und kurz zentrifugiert. Danach erfolgte die Zugabe des Puffers, der dNTPs, des RNase Inhibitors und der reversen Transkriptase MMLUV (MBI, St. Leon-Rot). Die reverse Transkription Reaktion wurde nach dem Protokoll des „GeneFishing™ DEG Premix Kits“ (Seegene, Korea) durchgeführt. Nach 90 min Inkubation bei 42°C wurde die Reaktion zwei Minuten lang bei 94°C abgestoppt, zwei Minuten auf Eis abgekühlt und nach kurzer Zentrifugation für die nachfolgende differentielle PCR 1:5 verdünnt. Die zur PCR eingesetzten Kombinationen von Templates, Primer und MgCl₂-Konzentrationen sind schematisch zusammengestellt (Abb. 15).

Die nach der zweiten PCR-Runde (Abb. 14) unter äquivalenten PCR-Bedingungen gewonnenen Amplikons wurden über Agarose-Gelelektrophorese (B.3.1) aufgetrennt und

verglichen. Differentielle Amplikons (Abb. 15) mit einer Größe von etwa 250 bis 500 bp wurden aus dem Gel eluiert (B.3.2.4) und für die Sequenzierung kloniert (B.3.5).

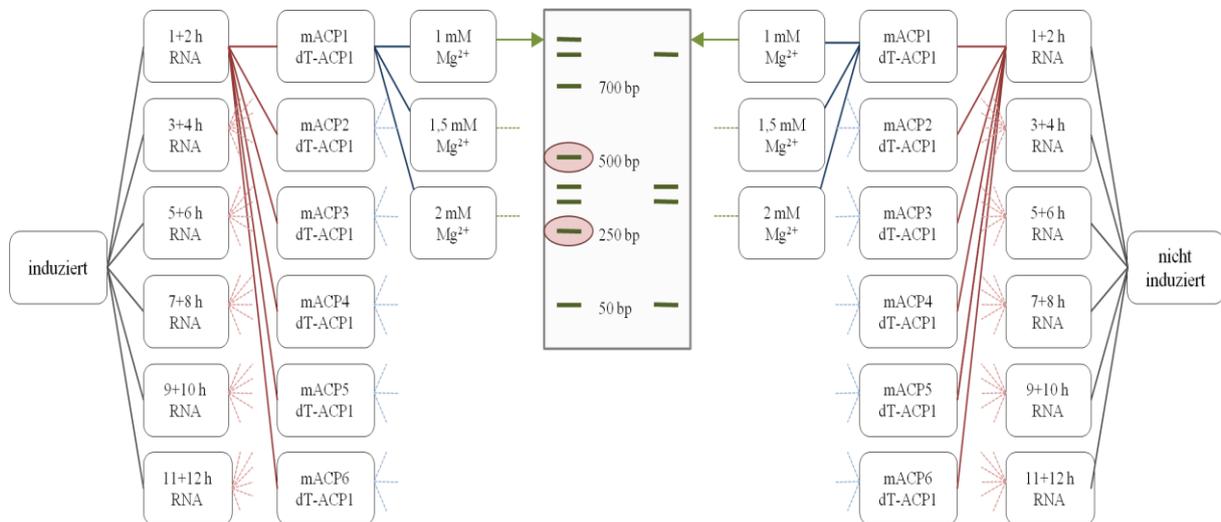


Abb. 15: Kombinationen zur differentiellen ACP-PCR

Für die Isolierung von cDNA-Fragmenten, welche potentiell Cyt P450 Enzyme aus der Furanocumarinbiosynthese kodieren, wurden PCR-Amplifikationen aus *Pmg*-induzierten und nicht-induzierten Zellsuspensionen miteinander verglichen. Eingesetzt wurden RNA-Populationen, welche zu unterschiedlichen Zeiten der Induktion gewonnen worden waren. Die durch RT-PCR abgeleiteten cDNAs wurden mit verschiedenen Primer- und Mg^{2+} -Kombinationen zur PCR-Amplifikation eingesetzt und die Amplikons ‚induziert‘ und ‚nicht-induziert‘ nach Auftrennung in einem Agarosegel verglichen. Induzierte Amplikons innerhalb der gesuchten Größe (250 – 500 bp) stellten potentiell in der Furanocumarinbiosynthese involvierte Cyt P450 cDNA-Fragmente dar und wurden sequenziert.

B.3.3.3 5'-RACE

Die 5'-Verlängerung eines cDNA-Fragmentes aus der differentiellen PCR (B.3.3.2) erfolgte neben der GeneRace-Methode (B.3.3.4) mit dem 5'-RACE. Hierbei wurden durch wiederholte nested PCRs mit genspezifischen Primern die jeweils gesuchten cDNA-Enden gezielt angereichert. Die 5'-Primer wurden von der in der differentiellen PCR erhaltenen Sequenz abgeleitet, wobei ein nested Primer immer „downstream“ des zuvor verwendeten Primers mit dem Template hybridisiert. Durch den Einsatz von mehreren nested Primern kann durch diese Methode die Anzahl und die Akkumulation von falsch positiven Amplikons verringert werden.

Isolierte Gesamt-RNA (B.3.2.1) wurde mit einem genspezifischen 5'-Primer revers transkribiert (B.3.6.2), wobei genau diejenige RNA-Fraktion verwendet wurde, aus welcher bereits das entsprechende 3'-cDNA-Fragment amplifiziert werden konnte (B.3.3.2). Die

cDNA wurde von überschüssigen dNTPs, Primern und Proteinen über eine Kieselgel-Säule (B.3.2.4) gereinigt. Da der untranslatierte 5'-Bereich im Gegensatz zu dem poly(A)-Schwanz des 3'-Bereiches unbekannt ist, wurde mit der Terminalen Deoxynukleotidyl Transferase (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) nach Herstellerangaben ein homopolymerer Schwanz, bestehend aus dCTPs oder dATPs, an das 5'-Ende der transkribierten cDNA angefügt. Die erste nested PCR erfolgte in einer sukzessiv optimierten Standard-PCR mit dem 1:10 verdünnten Template (C- bzw. A-tailed cDNA), einem genspezifischen nested Primer und dem 5'-End-Primer AAP (für dC-tailed cDNA) bzw. 3AP (für dA-tailed cDNA). Die 5'-End-Primer enthalten eine Adapter-Sequenz für Anker-Primer in der nested PCR. Die zweite nested PCR erfolgte mit dem 1:100 verdünnten Amplikon aus der ersten PCR, welches die erwartete Länge des gesuchten cDNA-Fragmentes aufwies. Zum Einsatz kam ein zweiter genspezifischer nested Primer in Kombination mit dem 5'-Anker-Primer AUAP (dC-tailed cDNA) bzw. 3AP Anchor (dA-tailed cDNA). Amplikons mit der erwarteten Länge wurden elektrophoretisch (B.3.1) aufgetrennt, die Amplikons aus dem Gel eluiert (B.3.2.4) und für die Sequenzierung kloniert (B.3.5)

B.3.3.4 *GeneRACE*

Die 5'-Verlängerung eines cDNA-Fragmentes aus der differentiellen PCR (B.3.3.2) erfolgte neben dem 5'-RACE (B.3.3.3) mit der GeneRace-Methode. Dieses Verfahren wurde unter Verwendung des „GeneRacerTM Kit“ (Invitrogen, Niederlande) nach Herstellerangaben durchgeführt. Es beinhaltet mehrere Reaktionsschritte, welche wie beim 5'-RACE das Auftreten von Falsch-Positiven mindern und zusätzlich die Amplifikation von Artefakten und unvollständigen 5'-Enden verhindern sollen. Im ersten Reaktionsschritt erfolgt eine Dephosphorylierung von beschädigten 5'-mRNA-Enden und anderen RNA-Spezies, wobei intakte 5'-mRNA-Enden durch eine Methylguanosin-Kappe vor dem Angriff der Phosphatase geschützt werden. Diese „Schutzkappe“ wird in der nächsten Reaktion durch eine Pyrophosphatase entfernt und damit die Phosphatgruppe der intakten mRNAs freigelegt. An das 5'-Ende wird nachfolgend eine „GeneRacer RNA Oligo“-Sequenz ligiert. Den beschädigten mRNA- und nicht-mRNA-Molekülen fehlt durch die Dephosphorylierung im ersten Schritt eine endständige Phosphatgruppe als Angriffspunkt für die Ligase, wodurch die zu dem GeneRacerTM-5'Primer komplementäre Sequenz nicht angefügt werden kann. In der anschließenden reversen Transkription wird die präparierte mRNA in cDNA umgeschrieben. Für die GeneRACE-PCR kommen somit nur cDNA-Templates zum Einsatz, welche über einen intakten, vollständigen N-Terminus und definierte 5'- und 3'-Enden verfügen.

Grundlage für das GeneRACE war ein bereits mittels differentieller ACP-PCR (B.3.3.2) isoliertes 3'-Ende eines cDNA-Fragmentes, von welchem genspezifische Primer für die RACE-PCR abgeleitet werden konnten. Zur Gewinnung der cDNA wurde diejenige RNA-Fraktion (B.3.2.1) verwendet, aus welcher bereits das entsprechende 3'-cDNA-Fragment isoliert werden konnte (B.3.3.2). Die Amplikons wurden elektrophoretisch aufgetrennt (B.3.1), multiple Banden in der erwarteten Länge der gesuchten Sequenz aus dem Gel eluiert und für die Sequenzierung in Bakterien kloniert (B.3.5).

B.3.3.5 *Semiquantitative RT-PCR*

Um auf Grundlage der RT-PCR relative Transkriptmengen vergleichen zu können, wurden Primer für ein Standard-Template eingesetzt. Hierfür diente die konstitutiv exprimierte 18S rRNA (Oliveira *et al.*, 2004), welche unter gleichen Rahmenbedingungen und bei gleicher Gesamt-RNA-Menge in jeder RT-PCR die gleiche Amplifikationsstärke aufweisen sollte. Hierbei auftretende Abweichungen wurden in die Auswertung miteinbezogen. Vor der RT-PCR wurden die PCR-Bedingungen (B.3.3.1) für jedes der zu analysierenden Transkripte optimiert, wobei die in Tab. 8 aufgelisteten Primerkombinationen verwendet wurden.

Tab. 8: Primerkombinationen für die RT-PCR

Klon	5'-End-Primer	3'-End-Primer
CYP73A41 Zimtsäure 4-Hydroxylase	73A41 5'ete	73A41 3'ete
CYP71AJ1 Psoralensynthase	71AJ1 5'ete	71AJ1 3'ete
Bergaptol-O-Methyltransferase	BOMT 5'ete	BOMT 3'ete
CYP71AZ1	71AZ1 5'RT	71AZ1 3'RT
CYP71D97	71D97 5'RT	71D97 3'RT
CYP71D98	71D98 5'ete	71D98 3'ete
18S rRNA-Fragment	18S rRNA for	18S rRNA rev

Aus dem untersuchten Pflanzenmaterial (Tab. 9) wurde je 1 µg Gesamt-RNA extrahiert (B.3.2.1), welche unter konstanten Bedingungen revers transkribiert (B.3.6.2) und als Template für die RT-PCR eingesetzt wurde. Die Anzahl der PCR-Zyklen bis zum Erreichen des Sättigungsplateaus wurde empirisch ermittelt und um 5 und 10 Zyklen verkürzt, um Proportionalität von Amplikon-Menge zur eingesetzten cDNA-Menge zu gewährleisten. Für jeden Messpunkt wurden demnach drei Amplifikationen durchgeführt von 25, 30 bzw. 35

Zyklen, um Interpretationsfehler durch Sättigung auszuschließen. Die Auftrennung der Amplikons erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese (B.3.1) und diente zur Bestimmung der relativen Transkriptmenge durch das Programm AIDA (Raytest, Straubenhardt). Hierzu wurde die Intensität der amplifizierten Matrizen-cDNA um die Signalstärke des Hintergrundes bereinigt und durch die ebenso berechnete Intensität des 18S rRNA-Amplikons geteilt.

Tab. 9: Elicitiertes Zellkultur- und Pflanzenmaterial für Transkriptanalysen

Elicitor	Zeit nach Zugabe des Elicitors [h]											
	1	2	3	4	6	8	10	12	16	20	24	28
Pmg	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Pep-13	x	x	x	x	x							
MeJa	x	x	x	x	x							
CaCl ₂	x	x	x	x	x							
Kälte	x	x	x	x	x							
UV	x	x	x	x	x							

Pflanzenentwicklungsstadium	Pflanzenorgan				
	Wurzel	Stängel	Laubblatt	Blüte	Samen
Keimlings-Stadium	x		x		
Vegetatives Stadium	x	x	x		
Blüten-Stadium	x	x	x	x	
Samen-Stadium	x	x	x		x

B.3.4 Mutagenesen

B.3.4.1 *Austausch der N-Termini*

CYP73A1 von *Helianthus tuberosus* wurde als pGem-Konstrukt von Alain Hehn (ENSAIA, Nancy, Frankreich) zur Verfügung gestellt und sein N-Terminus (etwa 100 bp) zum Austausch verwendet. Damit wurden im Rahmen von Expressionsstudien die N-Termini (etwa 100 bp) der Sequenzen CYP71D97, D98 und CYP71AZ1 ersetzt. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind im Anhang G.3 tabellarisch zusammengefasst.

Zunächst wurde mit Hilfe der „Proof Reading“-PCR (B.3.3.1) der CYP73A1 N-Terminus isoliert. Für das 5'-Ende wurden ein genspezifischer CYP73A1-Primer (,73A1 5'ete') und für das 3'-Ende des N-Terminus' drei verschiedene Hybrid-Primer eingesetzt. Die Hybrid-Primer (,71AZ1 N-catch', ,71D97 N-catch', ,71D98 N-catch') bestehen aus der 3'-Endsequenz des CYP73A1 N-Terminus' und einer CYP71AZ1-, CYP71D97-, oder CYP71D98-spezifischen Ankersequenz. Die Anker-Sequenzen hybridisieren etwa 20 Basen „downstream“ des jeweils auszutauschenden N-Terminus. Der amplifizierte N-Terminus von CYP73A1 wurde über Agarose-Gelelektrophorese separiert (B.3.1), aus dem Gel eluiert (B.3.2.4), nach Kontrolle durch Sequenzierung am 5'-Ende mit Hilfe der T4 Polynukleotidkinase (MBI Fermentas, St. Leon Rot) nach Herstellerangaben phosphorylliert (kinasiert) und als 5'-End-Primer für den N-Terminus-Austausch mittels Touch Down PCR eingesetzt. Als entsprechender genspezifischer 3'-End-Primer diente ,71DAZ1 3'ete', ,71D97 3'ete' bzw. ,71D98 3'ete'. Die PCR erfolgte nach dem allgemeinen Schema (B.3.3.1) mit der *Pfu*-Polymerase (MBI Fermentas, St. Leon Rot), wobei sich zunächst innerhalb von 10 Zyklen die Annealing-Temperatur um 1°C je Zyklus erniedrigte und sich dann 20 Zyklen mit gleichbleibender Annealing-Temperatur anschlossen. Die amplifizierten N-Mutanten wurden über Gelelektrophorese aufgetrennt, aus dem Gel eluiert und zur Kontrolle sequenziert.

B.3.4.2 *Punktmutationen*

Punktmutationen erfolgten mit „QuikChange® II XL Site-Directed Mutagenesis Kit“ (Stratagene, Heidelberg) mit leicht modifizierten Herstellerangaben in Zusammenarbeit mit Dr. Joachim Hans (Institut für pharmazeutische Biologie, Universität Marburg).

Das Kit benutzt Vektor-Insert-Konstrukte, welche in dam^+ *E. coli*-Stämmen kloniert wurden. Für die „Proof Reading“-PCR (B.3.3.1) werden zwei gegenläufige, die Mutation enthaltende Primer konstruiert, welche exakt am gleichen Sequenzabschnitt der Ziel-DNA binden. Durch die PCR entstehen Tochter-Plasmide, deren Inserts die Mutation enthalten, nicht methyliert sind und einen „nick“ am jeweiligen Ende der Primer tragen. Durch die anschließende Behandlung mit der Restriktionsendonuklease DpnI, welche spezifisch für methylierte und hemimethylierte DNA ist, werden die methylierten Ausgangs-Plasmide verdaut und die synthetisierten Plasmide mit dem mutierten Insert selektiert. Die „nicks“ werden nach einer erneuten Klonierung in dem Bakterienstamm XL1-Blue repariert. Für den Austausch der Aminosäure Val120 durch Met120 innerhalb der putativen Substraterkennungsregion 1 (SRS1) von CYP71AJ1 (als pYeDP60-Konstrukt, G.4, Abb. 50) wurden die Primer ,71AJ1 M120V for' und ,71AJ1 M120V rev' (G.3) konstruiert. Um die PCR-Amplifikationseffizienz

zu erhöhen wurden diese vor ihrer Verwendung mit der T4 Polynukleotidkinase (MBI Fermentase) am N-Terminus phosphoryliert. Weitere Mutationsversuche innerhalb SRS5 (359 Tyr → His; 360 Phe → Pro; 361 Thr → Pro) erfolgten von Dr. Joachim Hans in Zusammenarbeit mit Alain Hehn (ENSAIA, Nancy, Frankreich).

B.3.5 DNA-Klonierung in Bakterien

Herstellung kompetenter Bakterienzellen

Die Übernachtskultur von *E. coli* (5 ml) in LB-Flüssigmedium (B.1.9) wurde 1:100 verdünnt und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 – 0,6 unter Schütteln inkubiert. Die Zellen wurden für 10 min bei 1500 rpm und 4°C geerntet, in 100 ml Lösung 1 (B.1.10) durch Pipettieren resuspendiert und für 20 bis 30 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 10 ml eiskalter Lösung 2 (B.1.10) aufgenommen und zu 150 µl in eisgekühlte Eppendorfgläser aliquotiert. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

Vektor-Ligation

Der Einbau von DNA-Fragmenten in den Vektor pCR4[®]TOPO (Invitrogen, Leek, Niederlande, G.4, Abb. 51) erfolgte nach Herstellerangaben durch eine Topoisomerase-Reaktion zwischen den überhängenden 3'-T-Enden des Vektors und den überhängenden 5'-A-Enden des Inserts. Die Vektoren pYes2/CT, p423ADH und pYeDP60 (G.4, Abb. 50) verfügen über „multiple cloning sites“. Für die Ligation mit den letztgenannten Vektoren wurden Insert-spezifische „end-to-end“-Primer konstruiert, welche am 5'-Ende mit einer nicht in der Insert-DNA vorkommenden Restriktionsschnittstelle modifiziert waren. Wurde bei der Verwendung des Vektors pYes2/CT der 3'-End-Primer so konstruiert, dass er kein Stopcodon enthält, konnte bei einer späteren Expression des Transgens ein His-Tag an das exprimierte Protein gehängt werden. Mit Hilfe der PCR (B.3.3.1) wurden die Schnittstellen an das 5'- und 3'-Ende des Inserts angefügt. Nach Verdau von Vektor und Insert mit den entsprechenden Restriktionsenzymen (B.3.6.1) wurden diese über Kieselgelsäulen von Enzymen, Puffer und abgeschnittenen Nukleotiden gereinigt und der geschnittene Vektor zusätzlich über Agarose-Gelelektrophorese von nicht geschnittenen Plasmiden getrennt. Die Ligation erfolgte mit der T4 DNA Ligase (MBI Fermentas, St. Leon Rot) nach modifiziertem Protokoll des Herstellers über Nacht bei 14°C. Die Ligationskonstrukte wurden gelelektrophoretisch von nicht ligierter DNA getrennt. Die Restriktionsschnittstellen und die entsprechend konstruierten Primer für die Insert-Vektor-Konstrukte sind tabellarisch zusammengestellt (Tab. 10, G.3).

Tab. 10: Restriktionsschnittstellen-modifizierte Primer für Insert/Vektor-Ligation

Vektor	Insert ¹⁾	Restriktionsschnittstellen-modifizierte 5’-/3’-Enden des Inserts		Restriktionsschnittstellen-modifizierte Primer	
p423ADH	CPR	5’	Bam HI	5’CPR Bam HI	
		3’	Sal I	3’CPR Sal I	
pYeDP60	CYP73A41	5’	Bam HI	5’ C4H Bam HI	
		3’	Eco RI	3’ C4H Eco RI	
	CYP71AZ1	5’	BamHI	71AZ1 5’BamHI	
		3’	KpnI	71AZ1 3’KpnI	
	CYP71AZ1 N-Mutante	5’	BamHI	73A1 5’BamHI	
	CYP71D97	5’	Bam HI	71D97 5’BamHI	
		3’	Eco RI	71D97 3’EcoRI	
	CYP71D97 N-Mutante	5’	Bam HI	73A1 5’BamHI	
	CYP71D98	5’	BglII	71D98 5’BglII	
		3’	KpnI	71D98 3’KpnI	
	CYP71D98 N-Mutante	5’	BglII	73A1 5’BglII	
	pYes2/CT	CYP71AZ1	5’	Hind II	71AZ1 5’HindIII
			3’	XhoI	71AZ1 3’XhoI (-Stop)
		CYP71AZ1 N-Mutante	5’	HindIII	73A1 5’HindIII
CYP71D97		5’	Hind II	71D97 5’HindIII	
		3’	Xho I	71D97 3’XhoI (-Stop)	
CYP71D97 N-Mutante		5’	HindIII	73A1 5’HindIII	
CYP71D98		5’	Eco RI	71D98 5’EcoRI	
		3’	Not I	71D98 3’ NotI (-Stop)	
CYP71D98 N-Mutante		5’	Eco RI	73A1 5’EcoRI	

¹⁾ Die Herstellung von N-Mutanten wird in Kapitel B.3.4.1 erläutert.

Transformation in Bakterienzellen

Die Transformation von kompetenten *E. coli* (B.1.7) erfolgte mit dem „TOPO TA[®] Kit“ (Invitrogen, Leek, Niederlande). Die Selektion der Transformanten erfolgte durch die vektorvermittelte Resistenz auf Antibiotika-LB-Platten (B.1.9). Die Prüfung des Inserts wurde mittels Restriktionsverdau (B.3.6.1) und Sequenzierung der isolierten Vektorkonstrukte (B.3.2.3) durchgeführt.

B.3.6 Sonstige enzymkatalysierte Reaktionen

B.3.6.1 Restriktionsverdau

Der Verdau von cDNA, gDNA, Plasmid-DNA oder RNA erfolgte mit Restriktionsenzymen (MBI Fermentas, St-Leon-Rot) nach Herstellerangaben. Waren mehrere Puffersysteme für verschiedene Enzyme erforderlich, wurden Reinigungsschritte (B.3.2.4) zwischengeschaltet. Die Analyse des Verdaus erfolgte über Agarose-Gelelektrophorese (B.3.1).

B.3.6.2 Reverse Transkription

Die reverse Transkription von Gesamt-RNA (1 µg, B.3.2.1) erfolgte mit dem „RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit“ (MBI Fermentas, St. Leon Rot) nach Herstellerangaben. Die Ausbildung von Sekundärstrukturen wurde mit Hilfe der StrataScript® RT (Stratagene, Heidelberg) bei einer Temperatur von 55°C reduziert. Waren die Zieltranskripte bekannt, so wurden genspezifische Primer eingesetzt, die cDNA-Generierung für die differentielle ACP-PCR (B.3.3.2) erfolgte mit ‚dT-ACP 1‘ und für die reverse Transkription aller mRNAs wurde der ‚3‘-Adapter Primer‘ (‘3AP’) verwendet. Um RNA-Kontaminationen zu entfernen, wurde die cDNA-Lösung mit 0,02 mg/ml RNase versetzt und bei 37°C für 30 min inkubiert.

B.3.7 Northern und Southern Blot

Puffer und Lösungen sind in Kapitel B.1.10 aufgeführt.

Northern Dot Blot

Die Northern Dot Blot-Analyse von CYP71AJ1-Transkripten erfolgte in der Minifold I-SRC 96-Dot Blot Apparatur (Schleicher & Schüll, Dassel) nach Herstellerangaben mit Whatman-Filterpapier und positiv geladener Hybond-N⁺ Nylon-Blotting-Membran (GE Healthcare, München), welche vor Verwendung in steril filtriertem H₂O_{dest.} geschwenkt und mit 10x SSC gewaschen worden waren.

Als Sonde wurde ein etwa 500 bp großes POS-cDNA-Fragment generiert, welches keine der für Cyt P450 typischen konservierten Sequenzregionen enthielt, um Fehlpaarungen zu vermeiden. Der POS „full-length“-Klon wurde mit „Proof Reading“-PCR (B.3.3.1) amplifiziert, über Gelelektion (B.3.2.4) isoliert, mit Hilfe der Restriktionsenzyme Pvu II und Bam HI (B.3.6.1) geschnitten und lieferte zwei Fragmente von etwa 500 und 900 bp. Diese wurden wieder über Gelelektion gereinigt und mit dem „Rediprime™ DNA Labelling System“

(Amersham, Braunschweig) mit [α - 32 P] dCTP (ICN, Meckenheim) nach Herstellerangaben radioaktiv markiert. Die Separation der markierten Sonden erfolgte durch Gelchromatographie über eine 1 ml Sephadex G-50 Säule und die eingebaute Radioaktivität wurde im Szintillationszähler (Tri-CarbTM Liquid Scintillation, Analyzers Mode 1900TR, Packard (Meiden, USA)) quantifiziert. Die markierten Sonden wurden zur Detektion in Northern und Southern Blots eingesetzt.

Für den Blot wurden je 3 μ g Gesamt-RNA (B.3.2.1) mit 22 μ l Denaturierungspuffer-1 versetzt, mit steril filtriertem H₂O_{dest.} auf ein Endvolumen von 30 μ l gebracht und für 15 min bei 68°C denaturiert. Nach einer fünfminütigen Abkühlung auf Eis wurden je 30 μ l eisgekühlter Transferpuffer 20xSSC dazugegeben und die Proben unter Vakuum auf die Membran transferiert. Das Nachspülen erfolgte mit jeweils 30 μ l 10xSSC-Puffer. Nachdem die Membran für einige Minuten luftgetrocknet worden war, wurde die RNA für eine Stunde bei 80°C auf der Membran fixiert. Für die Prähybridisierung wurden 3 mg Heringssperma-DNA bei 95°C für 5 min denaturiert, 5 min auf Eis gelagert, zur Prähybridisierungslösung (30ml) gegeben und mit dieser Lösung die Dot-Blot-Membran für 3 h bei 68°C inkubiert. Nach der Prähybridisierung wurde die Sonde wie die Heringssperma-DNA denaturiert, zugegeben und die Membran für 16 Stunden bei 68°C hybridisiert.

Die Membran wurde für die Auswertung der radioaktiven Signale sukzessiv mit den Waschlösungen 1, 2 und 3 bis zur erforderlichen Reduzierung des Hintergrundes gewaschen. Die Auswertung der radioaktiven Signale erfolgte mit dem Bio Imager FLA-2000 (Fuji Photo Film, Tokyo, Japan).

Southern Blot

Für das Southern Blotting wurde genomische *Ammi majus* DNA (B.3.2.2) mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten, welche die gDNA nicht oder nur einmal schneiden. Hierfür wurden je 20 μ g gDNA mit 25 U von einem der Restriktionsenzyme Pvu II, Xho I, Bam HI, Pae I, Eco RI, Hind III und Bcl I (MBI Fermentas, St. Leon Rot) nach Herstellerangaben 12h verdaut. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte auf einem 0,8%igen (^{w/v}) Agarose-Gel (B.3.1) bei 30 V über Nacht. Das Gel wurde anschließend für 20 min in 0,25 M HCl geschwenkt, was eine teilweise Depurinierung der DNA zur effizienten Übertragung von Fragmenten > 5 kb zur Folge hat. Nach erfolgter Denaturierung für 40 min in Denaturierungspuffer-2 wurde das Gel anschließend zweimal für je 30 min in Neutralisierungslösung gewaschen. Zwischen den einzelnen, auf dem Schüttler durchgeführten Schritten wurde das Gel jeweils mit steril filtriertem H₂O_{dest.} gespült.

Der Aufbau des Blots, sowie die Übertragung der gDNA unter Ausnutzung der Kapillarkräfte auf eine positiv geladene Nylonmembran (Hybond-N⁺, GE Healthcare, München) erfolgte nach Herstellerangaben. Das Gel wurde nach Blotten unter 312 nm überprüft, um die erfolgreiche Übertragung der gDNA auf die Membran sicherzustellen. Die gDNA-Fixierung, die Prä-/Hybridisierung und das Waschen der Membran erfolgten wie beim Northern Dot Blot. Die Anzahl der geschnittenen POS gDNA-Fragmente wurde in getrennte Ansätzen mit Hilfe der zwei radioaktiv markierten POS cDNA-Sonden (500 und 900 bp) detektiert, wie es beim Northern Blot beschrieben wurde.

B.3.8 Heterologe Genexpression und Proteinsolubilisierung

B.3.8.1 Herstellung kompetenter Hefezellen und Transformation

Die Herstellung kompetenter Hefezellen und deren Transformation mit in Bakterien klonierten (B.3.5) und isolierten (B.3.2.3) Expressionskonstrukten erfolgte nach Herstellerangaben mit dem „S. c. EasyComp Transformation Kit“ (Invitrogen, Leek, Niederlande). Die Anzucht des INVSc1- bzw. WAT11-Stammes erfolgte in dem Vollmedium YPG bzw. YPGA (B.1.9). Der Cinv-Stamm wurde für die Selektion auf *Ammi majus* CPR (ADH423-Konstrukt) in dem Minimalmedium SC(-His) kultiviert. In Abhängigkeit von dem verwendeten Hefeexpressions-Vektor (B.1.8, G.4, Abb. 50) und den Eigenschaften des Hefestammes (B.1.7) wurde die Selektion der Transformanten auf verschiedenen Minimalmedien (Tab. 11, B.1.9) durchgeführt.

Tab. 11: Minimalmedien für transformierte Hefestämme

Vektor	Hefestamm		
	INVSc1	Wat11	Cinv
pYes2/CT	SC -Uracil	-	SC -Uracil, -Histidin
pYeDP60	SC -Adenin	SC -Adenin	SC -Adenin, -Histidin

Der Cinv-Stamm enthält ein replikatives CPR/423ADH-Konstrukt mit einem Histidin-Komplementationsmarker, was eine zusätzliche Selektion auf Histidin erfordert. Der Wat11-Stamm besitzt durch ein integratives pYeDP110-Konstrukt (mit CPR) einen Uracil-Komplementationsmarker, weshalb statt auf Uracil auf Adenin selektiert werden muss.

B.3.8.2 *Anzucht und Induktion transformierter Hefezellen*

Die folgende Methode wurde in Anlehnung an Pompon *et al.* (1996) durchgeführt. Von einer Platte wurden einige Kolonien in 30 ml des entsprechenden Minimal-Mediums (Tab. 11) bis zu einer OD₆₀₀ von 0,2 bis 0,4 des 1:10 verdünnten Mediums angezogen und vollständig in 250 ml YPEG (B.1.9) überimpft. Bei einer OD₆₀₀ von 0,8 bis 1,2 erfolgte die Induktion der heterologen Genexpression durch Zugabe von 27 ml 20%iger (^{w/v}) Galaktose-Lösung. Nach 12 bis 16 Stunden, bei einer OD₆₀₀ der 1:10 verdünnten Kultur zwischen 0,6 und 1,2, konnten die Hefezellen geerntet und die Mikrosomen isoliert (B.3.8.3) werden. Im Rahmen der Arbeit mit den Klonen CYP71AZ1, CYP71D97 und CYP71D98 wurden als zusätzliche Erntezeitpunkte 4h, 12h, 24h, 2d, 3d und 4d nach erfolgter Galaktose-Induktion gewählt.

B.3.8.3 *Isolierung und Solubilisierung mikrosomal gebundener Proteine*

Isolierung

Die Isolierung wurde in Anlehnung an Pompon *et al.* (1996) durchgeführt, Puffer und Lösungen sind Kapitel B.1.10 aufgelistet. Hefezellen wurden für 5 min bei 4.000 rpm geerntet. Das Zellpellet wurde in 27 ml TEK Puffer resuspendiert und nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur der Ernteschritt wiederholt. Ab hier wurden alle weiteren Inkubationen auf Eis und die Zentrifugations-Schritte bei 4°C durchgeführt. Nachdem das Zellpellet vollständig in 2,5 ml eisgekühltem TES-B* Puffer resuspendiert worden war, erfolgte der Zellaufschluss mit 7,5 g Glasperlen (425–600 µm) unter kräftigem Schütteln für 20 min, indem der Ansatz abwechselnd jeweils 30 Sekunden geschüttelt und 30 Sekunden auf Eis belassen wurde. Die aufgeschlossenen Zellen wurden mit 5 ml TES-B* Puffer versetzt, der Ansatz gemischt, kurz bis 800 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues Röhrchen überführt. Diese Schritte wurden dreimal wiederholt und die vereinigten Überstände 10 min bei 16.000 rpm zentrifugiert, um restliche Zellbruchstücke und Glasperlen zu entfernen. Der klare Überstand wurde in ein neues Röhrchen überführt, mit TES-B* auf 25 ml aufgefüllt und eine Konzentration von 0,15 M NaCl eingestellt. Anschließend erfolgte die Mikrosomen-Fällung durch Zugabe von PEG 4000 auf eine Endkonzentration 0,1 g/ml und dessen vollständige Lösung durch heftiges Rühren mit einem Glasstab. Nach 15 min Inkubation wurde der Ansatz für 10 min bei 10.500 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nachdem die pelletierten Mikrosomen zweimal mit je 2 ml TES-B* Puffer gewaschen worden waren (5 min Zentrifugation bei 10.500 rpm), wurde der Überstand vollständig entfernt und das Pellet in einem Potter in 2,5 ml TE* Puffer homogenisiert. Die Mikrosomen-Lösung wurde nach Zugabe von 20% (^{v/v}) Glycerin in flüssigem Stickstoff schockgefroren

und bei -70°C gelagert. Die vorliegende Methode wurde im Rahmen der Arbeit mit den Klonen CYP71AZ1, CYP71D97 und CYP71D98 mit unterschiedlich kombinierten Modifikationen durchgeführt: Die Umdrehungszahl und die Zeitdauer der Zentrifugation wurde bis um 50% reduziert. Der Zellaufschluss mit Glasperlen erfolgt in 5 statt 10 Zyklen mit einer Erhöhung der Zeitdauer des Schüttelns und der Ruhephase auf Eis auf je 1 min. Für die Mikrosomen-Fällung wurde PEG 4000 durch MgCl₂ (Diesperger *et al.*, 1974) mit einstündiger Inkubation auf Eis ersetzt.

Solubilisierung

Um membrangebundene Cyt P450s mittels IMAC (B.4.2.3) und SDS-PAGE (B.3.1) isolieren zu können, mussten diese von der Membran gelöst werden. Die Solubilisierung wurde nach Trenkamp (2003) durchgeführt. Dazu wurden 100 mg einer isolierten mikrosomalen Fraktion in 2,5 ml Solubilisierungs-Puffer (B.1.10) aufgenommen und für 2 h durch vorsichtiges Rühren auf Eis gelöst.

B.4 Extraktion und Chromatographie

B.4.1 Furanocumarin-Extraktion

Pflanzenmaterial (200 mg) wurde in flüssigem Stickstoff gemörsert, in 7 ml Ethylacetat aufgenommen und für 30 min bei 200 rpm extrahiert. Um Zellmaterial zu entfernen, wurde der Extrakt zunächst durch Glaswolle filtriert und das Filtrat anschließend für 5 min bei 4°C und 13.000 rpm zentrifugiert. Ein weiterer Reinigungsschritt erfolgte durch Zentrifugation des Überstands für 10 min. Die Furanocumarin-Extraktion aus dem gereinigten Pflanzenmaterial sowie aus Enzymtests (B.5.5) wurde mit 2x 100 µl Ethylacetat durchgeführt, die Überstände vereinigt und bei 4°C gelagert.

B.4.2 Chromatographische Methoden

B.4.2.1 Dünnschichtchromatographie

Furanocumarin-Extrakte (B.4.1) wurden im Speedvac-System eingedampft, in 25 µl Ethylacetat aufgenommen und auf Kieselgel-Platten (Merck, Darmstadt) in Toluol:Eisessig

(4:1) aufgetrennt. Die Detektion erfolgte anhand ihrer Fluoreszenz durch Anregung bei 312 nm bzw. für ^{14}C -markierten Verbindungen (B.1.3) durch Auswertung mit dem Bio Imager FLA-2000 (Fuji Photo Film, Tokyo, Japan) und AIDA Software (Raytest, Straubenhardt).

B.4.2.2 HPLC

Identifizierung und relative Quantifizierung von Furanocumarinen wurden mit einer Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie (B.1.11) auf einer 5 μm Nucleosil C-18 Säule (Macherey & Nagel, Düren) modifiziert nach Hagemeyer *et al.* (1999) durchgeführt. Als Laufmittel dienten (A) 1,5% ige (v/v) Phosphorsäure und (B) 80%iges (v/v) Acetonitril mit in Tab. 12 aufgeführtem Gradientenprofil.

Tab. 12: HPLC-Gradientenprofil

Laufzeit [min]	Laufmittel A [%]		Laufmittel B [%]
0	90	+	10
20	50	+	50
30	0	+	100
35	90	+	10

Die Detektion erfolgte mit einem Diode Array Detector zwischen 200 und 400 nm. Die rohen Extrakte (B.4.1) wurden bis zur Trockene einrotiert und in 50 μl Methanol aufgenommen. 10 μl Aliquots, verdünnt mit 100 μl Methanol, dienten zur Analyse.

B.4.2.3 Immobilisierte Metall-Affinitätschromatographie (IMAC)

Die Durchführung erfolgte unter Verwendung des „Ni-NTA His-Bind® Superflow Kits“ (Merck Chemicals Ltd., Nottingham, UK). Das IMAC-Verfahren beruht auf der Affinität zwischen dem His-Tag eines Fusionsproteins und dem Ni^{2+} -Chelat mit Nitrilessigsäure (NTA) auf der Säulenmatrix. Das Fusionsprotein kann nach Waschen der Säule durch Imidazol verdrängt und dadurch eluiert werden.

Cyt P450-cDNAs wurden unter Verwendung des Vektors pYes2/CT mit einem 5'-Histidin-Tag versehen (B.3.5), in Hefe exprimiert, mit der mikrosomalen Fraktion isoliert und anschließend solubilisiert (B.3.8). Das solubilisierte Protein (2,5 ml) wurde mit 500 μl Ni-NTA-Agarose für 1 h auf Eis unter vorsichtigem Rühren inkubiert und danach in eine leere

PD10-Säule überführt. Nachdem die ungebundenen Proteine zweimal mit 1,5 ml Waschpuffer aus der Säule gewaschen worden waren, wurde das His-Tag-Protein in 2 Schritten mit je 500 µl Elutions-Puffer (B.1.10) eluiert. Der Proteingehalt wurde mittels Bradford-Test (B.5.1) bestimmt und die jeweils gleiche Proteinmenge über SDS-Page (B.3.1) aufgetrennt.

B.5 Enzymologische Methoden

B.5.1 Bestimmung des Gesamtproteingehaltes

Die Bestimmung des Gesamtproteingehaltes einer mikrosomalen Fraktion (B.3.8.3) erfolgte nach Bradford (1976) mit Rinderserum Albumin Fraktion V (BSA) als Standard.

B.5.2 Nachweis der CPR-Aktivität in Hefemikrosomen

Die CPR-Aktivität von membrangebundenen Cyt P450s wurde nach Urban *et al.* (1990) bestimmt. Die Methode beruht auf der Reduktion von Cytochrom c durch CPR unter Absorptionsänderung bei 550 nm. Der Reaktionsansatz enthielt 50 mM Tris/HCl pH 7,5, 1 mM EDTA, 0,1 mM NADPH, 1 mM KCN und 16 µM Cytochrom c. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10–50 µg mikrosomalem Protein bei Raumtemperatur gestartet und die Kinetik bei 550 nm (Spektralphotometer UV-1602, Shimadzu, Kyoto, Japan) für 10 min aufgenommen. Der lineare Bereich der Absorptionsänderung wurde für die Berechnung der spezifischen Enzymaktivität herangezogen:

$$\text{Spezifische } E_{\text{akt.}} = (\Delta A_{550} * V) / (e^{550} * t * p)$$

ΔA_{550} : Absorptionsänderung bei 550 nm

V: Reaktionsvolumen (1 ml)

e^{550} : 21.000 M⁻¹cm⁻¹ (differentieller Absorptionskoeffizient von Cytochrom c)

t: Reaktionszeit der linearen Absorptionsänderung

p: Menge an mikrosomalem Protein.

B.5.3 Messung des NADPH-Verbrauchs in Hefemikrosomen

Cyt P450-Aktivitäten wurden durch die CPR-vermittelte Oxidation von NADPH zu NADP⁺ und Abnahme der Extinktion (Spektralphotometer UV-1602, Shimadzu, Kyoto, Japan) bei

340 nm verfolgt. Die Zusammensetzung der Reaktionen ist für CYP73A1 und CYP73A41 (B.5.5.1) sowie mit Modifikationen für CYP71AZ1, CYP71D97 und CYP71D98 (B.5.5.2) beschrieben und die Kinetik wurde bei Raumtemperatur für 5 min aufgenommen.

B.5.4 Kohlenmonoxid-Differenzspektrum

Um die funktionelle Aktivität von Cyt P450s zu prüfen, wurden in Kooperation mit Ulrich Mühlenhoff (klinische Zytobiologie und Zytopathologie, Philipps-Universität Marburg) reduzierte CO-Differenzspektren am Spektralphotometer V550 (Jasco, Groß-Umstadt) aufgenommen. 400 µl mikrosomale Fraktion einer transformierten Hefekultur (B3.8) wurden mit 1,6 ml TEG*-Puffer (B.1.10) verdünnt, mit einer Spatelspitze Natriumdithionit reduziert und auf 2 Küvetten aufgeteilt. Nach Aufnahme des Grundspektrums von 400 bis 500 nm wurde eine Küvette für 30 s mit Kohlenmonoxid begast und nach etwa 3 min das Differenzspektrum aufgenommen.

B.5.5 Nachweis des Substratumsatzes in Hefemikrosomen

B.5.5.1 *Standard-Enzymtest*

Die Substratspezifität sowie der Substratumsatz von heterolog exprimierten (B.3.8) Cyt P450s wurde in einem Gesamtvolumen von 115 µl nach Urban *et al.* (1994) durchgeführt (Tab. 13). Nach 30 min bei 25°C wurde die Reaktion mit 24%iger ($\frac{v}{v}$) Trichloressigsäure gestoppt, mit Ethylacetat extrahiert (B.4.1) und der Extrakt mittels DC und HPLC analysiert (B.4.2).

Tab. 13: Reaktionsansatz für den Standard-Enzymtest

Komponenten	Konzentration
Tris/HCl (pH 7,4)	50 mM
NADPH	1 mM
Mikrosomales Protein	10 - 40 µg
Substrat	10 nmol
Radioaktiv markiertes Substrat	0,5 nmol (1,702 kBq/nmol)

B.5.5.2 *Modifizierte Enzymtests*

Enzymtests mit CYP71AZ1, CYP71D97 und CYP71D98 wurden sowohl unter Standardbedingungen (B.5.5.1) als auch mit diversen Modifikationen durchgeführt (Tab. 14).

Tab. 14: Modifikationen für Enzymtests

Komponenten	Modifikation			
Mikrosomale Fraktion	frisch	langsam gefroren	schockgefroren	
Puffersystem	50 mM Tris/HCl pH 7,5	100 mM Tris/HCl pH 7,5	200 mM K-Phosphat pH 6,5	100 mM Na-Phosphat pH 7,0
Substrat [μ M]	10	50	100	200
Zeit [min]	30	60	120	Über Nacht
Temperatur [$^{\circ}$ C]	RT	25	30	37

Als Substrate wurden lineare Furanocumarine, ihre Vorstufen und Umbelliferon-Ether geprüft (Tab. 15). Soweit vorhanden wurden zusätzlich zum unmarkierten Substrat 60.000 dpm (1 μ M) radioaktiv markiertes Substrat eingesetzt.

Tab. 15: Substrate für Enzymtests

Furanocumarin-Vorstufen, Umbelliferon-Ether¹⁾	Lineare Furanocumarine¹⁾
4-Cumarsäure	Psoralen
2,4-Dihydroxycoumarin (mit HCl angesäuert oder nicht angesäuert)	Bergapten
Demethylsuberosin	Bergaptol
Umbelliferon	Xanthotoxin
O-Prenylumbelliferon	Xanthotoxol

¹⁾ Einige dieser Substrate standen zusätzlich radioaktiv markiert zur Verfügung (B.1.3).

B.5.5.3 *Biotransformation*

Neben transformierten Hefekulturen (B.3.8) wurden Kontrollen durchgeführt, die aus Galaktose-induzierten transgenen Kulturen ohne Substrat, Glukose-induzierten transgenen Kulturen mit Substrat und nicht transformierten Kulturen mit Substrat bestanden. Von den Glukose- und Galaktose-induzierten Hefekulturen mit Substrat wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten die OD₆₀₀ gemessen und eine Wachstumskurve angelegt. Jeweils 2 mg Substrat

(Tab. 15) wurden in 400 µl DMSO gelöst und in 40 ml Kultur überführt. Die Hefezellen wurden durch Zentrifugation für 5 min bei 4.000 rpm geerntet und mit filtriertem H₂O_{dest.} gewaschen. Umgesetzte bzw. nicht umgesetzte Substrate wurden 0h, 4h, 12h, 24h, 2d, 3d, 4d, 5d, 6d und 8d nach Zugabe aus den gemörsterten Zellen sowie aus dem Medium (1 ml) extrahiert und chromatographisch analysiert (B.4.2.1 und B.4.2.2).

B.6 Bioinformatik-Programme

Eigenschaften der konstruierten Primer wurden mit dem Programm „Oligo Calculator“ von Eugen Buehler (University of Pittsburgh School of Medicine) ermittelt. Die Überprüfung und eventuelle Korrektur der Rohdaten von Sequenzierungsergebnissen erfolgte mit dem Programm „Chromas“, Version 2.31 (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>), die Translation von NS-Sequenzen mit „Protein Engine“ (<http://www.ebi.ac.uk/translate/>) und die ORF-Analyse mit "BCM Search Launcher“ (<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/seq-util/options/sixframe.html>). Zur Erstellung von Restriktionskarten wurde das Programm „Webcutter“, Version 2.0 (<http://www.firstmarket.com/cutter/cut2.html>), zur Erstellung von Nukleinsäuren- und Protein-Alignments das Programm „Multalin“ Version 5.4.1 (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>) und zur Erstellung phylogenetischer Stammbäume die Programme „ClustalW“, Version 1.81 (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) und „Treeview“, Version 1.6.6 (<http://en.bio-soft.net/tree/TreeView.html>) verwendet. Die Berechnung physikalischer und chemischer Parameter von Proteinen erfolgte mit den Programmen „Protcalc“ (<http://www.justbio.com/protcalc>) und „Prot Param Tool“ (<http://us.expasy.org/tools/protparam.html>). Für die Suche nach transmembralen Helices wurden die Programme „HMMTOP“, Version 2.0 (<http://www.enzim.hu/hmmtop1.1/index.html>) und „TMHMM“, Version 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0>) eingesetzt. Genbankrecherchen wurden mit den Blast-Programmen des US-amerikanischen „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>) durchgeführt. Die Auswertung radioaktiver Signale erfolgte mit der Software „Aida Image Analyzer programm“ von der Raytest GmbH (Straubenhardt).

C Ergebnisse

C.1 Induktionsmuster der Furanocumarinbiosynthese in *Ammi majus* Suspensionskulturen

Transkriptanalysen wurden mit semiquantitativer RT-PCR erstellt. Primerkombinationen (Tab. 8) und Ergebnisse der PCR-Optimierung (Tab. 16) sind tabellarisch zusammengestellt.

Tab. 16: Optimierte RT-PCR-Parameter für C4H, BOMT und 18S rRNA

PCR-Bedingungen	Klon		
	C4H	BOMT	18S rRNA
Annealing-Temperatur	54°C	60°C	60°C
MgCl-Konzentration	2 mM	2 mM	1,5 mM

C.1.1 Einfluss verschiedener Elicitoren

Zunächst wurde der Einfluss diverser biotischer und abiotischer Elicitoren auf die Induktion der Furanocumarinbiosynthese getestet (Abb. 16).

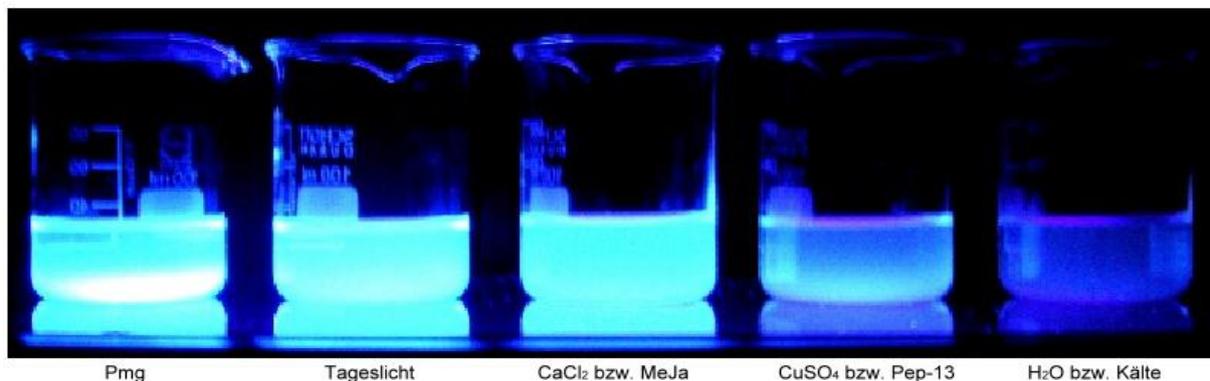


Abb. 16: Elicitoren-Einfluss auf die Induktion der Furanocumarinbiosynthese in *Ammi majus*

Suspensionskulturen wurden mit verschiedenen Elicitoren behandelt und ihr Einfluss auf die Induktion der Furanocumarinbiosynthese untersucht. Nach 10h zeigt die Kulturflüssigkeit unter 312 nm Bestrahlung blaue Fluoreszenz bei Vorhandensein von Cumarinen.

Nach jeweils zwei, vier, acht und zehn Stunden wurde das Medium der unterschiedlich elicierten Suspensions-Kulturen unter 312 nm Bestrahlung auf sekretierte blau fluoreszierende Cumarine überprüft. Bereits zwei Stunden nach Elicitierung zeigte das Medium der *Pmg*-elicierten Kultur blaue Fluoreszenz, welche bei den anderen elicierten Kulturen erst nach 6 bis 8 Stunden einsetzte. Die unter Kälte gehaltene Kultur sowie die mit Wasser behandelte Kontrolle wiesen keine Fluoreszenz auf.

Aufgrund der unterschiedlichen Induktionseffizienz wurden folgend das Cumarin-Muster und die Genexpression von C4H und BOMT unter dem Einfluss von *Pmg*, MeJa, Pep-13 oder Kälte zu verschiedenen Zeiten nach Elicitierung untersucht und als Nullkontrolle eine Kultur mit sterilem H₂O_{dest.} behandelt (Abb. 17).

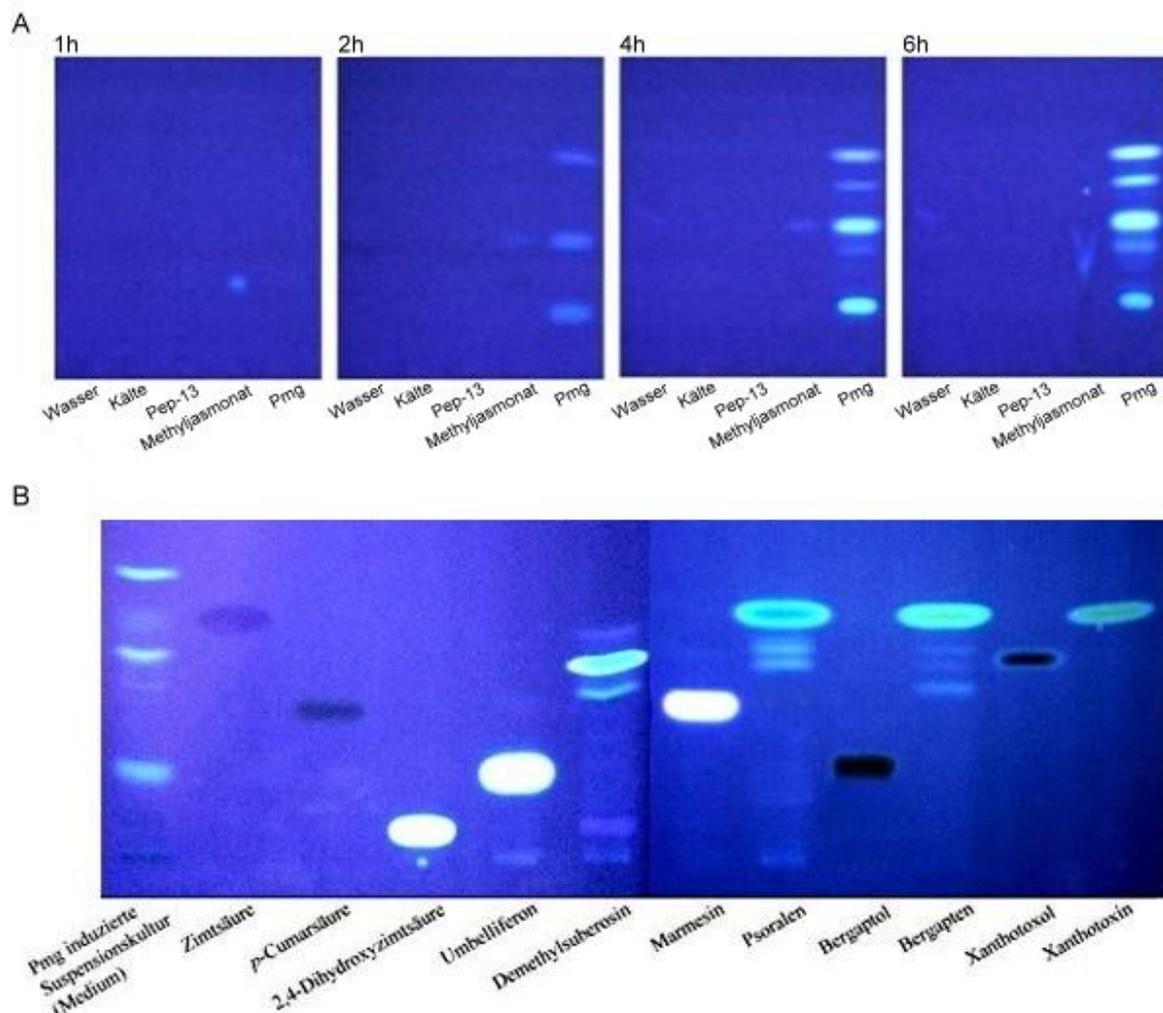
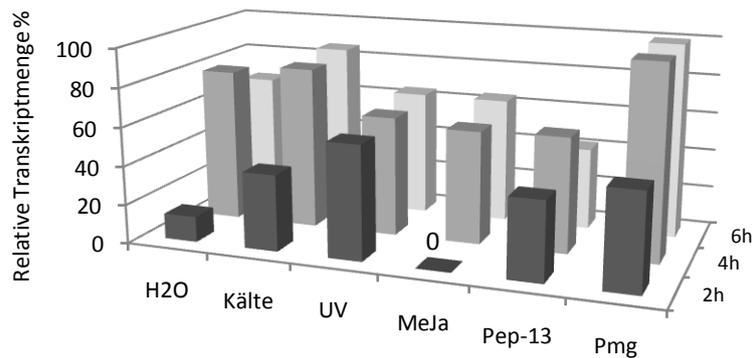


Abb. 17: Elicitor- und Induktionszeit-spezifische Furanocumarin-Muster in *Ammi majus*

A) Die Kulturflüssigkeit verschieden elicierteter *Ammi majus* Suspensionskulturen wurde nach 1, 2, 4 und 6h extrahiert und auf DC aufgetrennt. Die Detektion von Cumarinen erfolgte durch ihre blaue Fluoreszenz unter Anregung bei 312 nm.
 B) Muster der fluoreszierenden Produkte nach 4h *Pmg*-Induktion im Vergleich zu Cumarin-Referenzen und Zimtsäuren.

Die Transkriptanalysen zeigten, dass BOMT sich innerhalb der ersten sechs Stunden nach Zugabe des Elicitors selektiv mit dem *Pmg*-Elicitor induzieren lässt. Eine geringfügige Erhöhung der Transkriptmenge konnte auch durch MeJa und Pep-13 festgestellt werden. Hingegen wurde C4H durch alle Stressoren relativ stark induziert, wobei die höchste Intensität bei der mit *Pmg* behandelten Kultur beobachtet werden konnte (Abb. 18).

C4H



BOMT

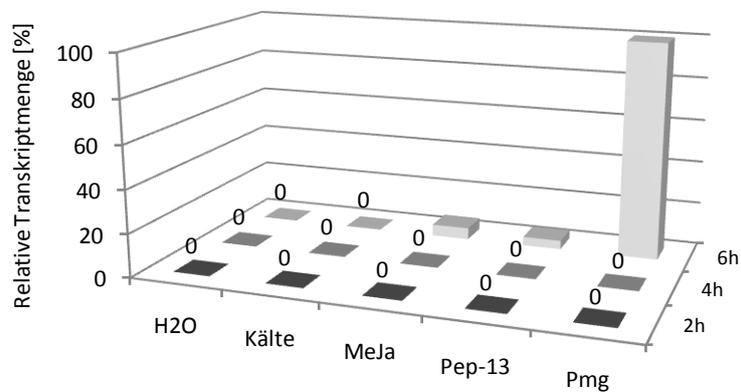


Abb. 18: Einfluss verschiedener Elicitoren auf die C4H- und BOMT-Transkription

Eine *Ammi majus* Zellsuspensionskultur wurde in fünf Fraktionen aufgeteilt und diese mit je einem der angegebenen Elicitoren behandelt. Die Transkriptmengen wurden nach 2, 4 und 6h mittels semiquantitativer RT-PCR untersucht und in Relation zu dem 18S rRNA-Standard mit der Software AIDA ausgewertet.

C.1.2 Zeitliches Induktionsprofil

Die zeitlichen Induktionsprofile wurden mit *Pmg* als effizientesten Elicitor (C.1) überprüft. Die relative Quantität der Metabolite wurde über zuvor angelegte HPLC-Eichreihen bei 312 nm (Abb. 19) bestimmt.

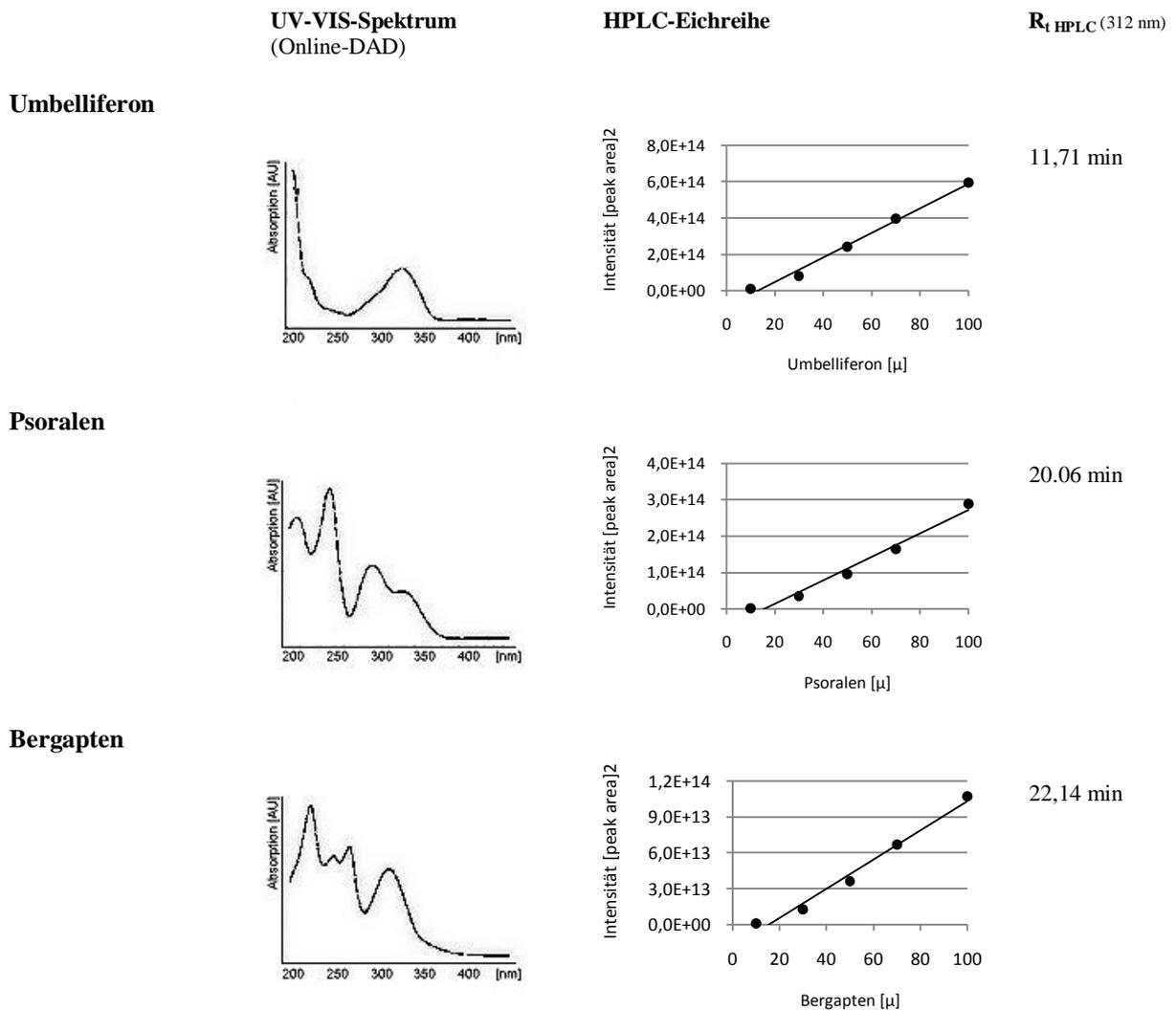


Abb. 19: Extinktion und quantitative Bestimmung von Umbelliferon, Psoralen und Bergapten

Bergapten und Isopimpinellin sind kaum deutlich zu trennen und ihre UV-VIS-Spektren sind nahezu identisch. Auch der Versuch, über Extraktionsverfahren die Trennbedingungen zu verbessern, was parallel zu dieser Arbeit im Rahmen einer Diplomarbeit von Frau Sarah Schneider (Institut für pharmazeutische Biologie, Philipps-Universität Marburg) durchgeführt wurde, verlief erfolglos.

Umbelliferon und C4H

Umbelliferon war bereits vor der *Pmg*-Induktion von C4H-Transkripten nachweisbar, stieg aber transient stark an und fiel mit einer kurzen Verzögerung zwischen der 4. und 6. Stunde steil ab. Für die Transkripte wurde ein biphasischer Verlauf mit Maxima in der 3. und 10. Stunde beobachtet (Abb. 20). Es zeigte sich eine enge Korrelation zwischen dem ersten Maximum und der Umbelliferon-Akkumulation.

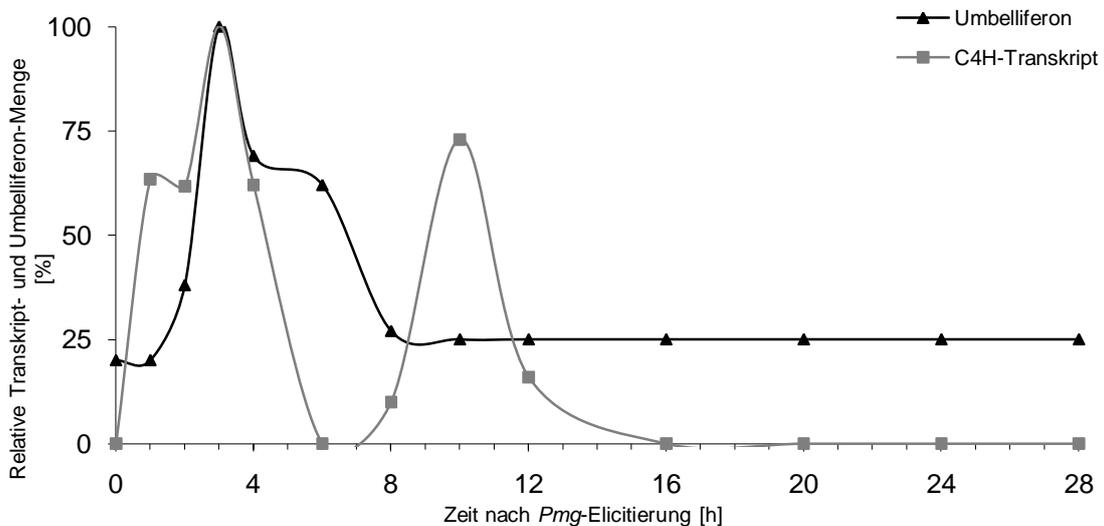


Abb. 20: Induktion der relativen C4H-Transkript- und Umbelliferon-Menge

Eine *Ammi majus* Zellsuspensionskultur wurden mit *Pmg*-Elicitor behandelt und Zellen bzw. Nährflüssigkeit zu unterschiedlichen Zeiten nach erfolgter Elicitierung auf Transkript- bzw. Metabolitakkumulation geprüft. Die Transkripte wurden mittels semiquantitativer RT-PCR untersucht und die Menge in Relation zu dem 18S rRNA-Standard durch die Software AIDA ausgewertet. Die Messung der relativen Metabolitmengen erfolgte mittels HPLC.

Bergapten/Isopimpinellin und BOMT

Zu- und Abnahme von Bergapten/Isopimpinellin verliefen nach Zugabe des *Pmg*-Elicitors bezüglich ihrer Geschwindigkeit annähernd gleich, wobei ein flaches Maximum in der 16. Stunde erreicht wurde und sich nach der 24. Stunde bei einer relativen Menge von etwa 60% des Maximums keine weitere Veränderung mehr zeigte. Die relative BOMT-Transkriptmenge wurde transient induziert, erreichte über ein schwaches Maximum ein Plateau bei 6-8 Stunden, das Maximum bei etwa 7 Stunden und fiel dann steil ab (Abb. 21).

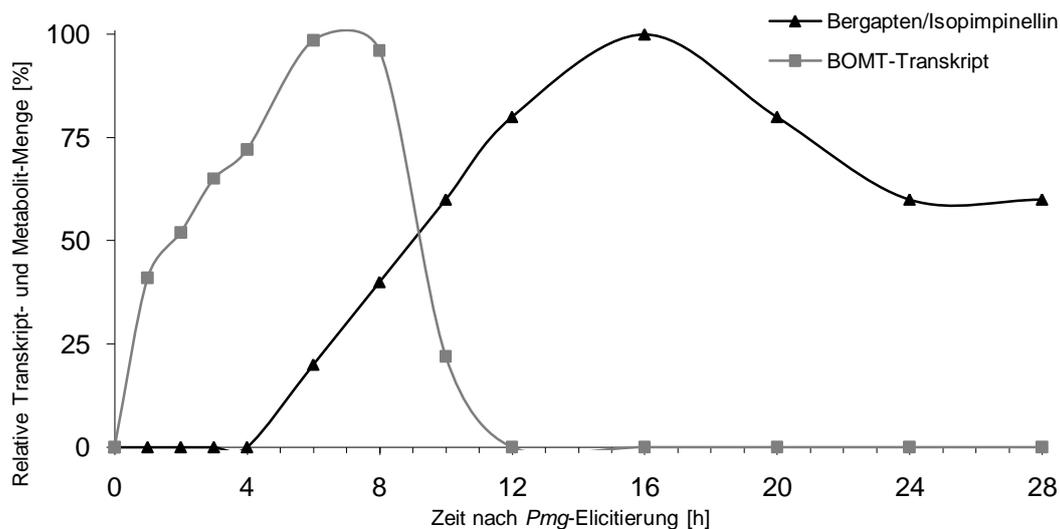


Abb. 21: Induktion der relativen BOMT-Transkript- und Produktmenge

Eine *Ammi majus* Zellsuspensionskultur wurden mit *Pmg*-Elicitor behandelt und Zellen bzw. Nährflüssigkeit zu unterschiedlichen Zeiten nach erfolgter Elicitierung auf Transkript- bzw. Metabolitakkumulation geprüft. Die Transkripte wurden mittels semiquantitativer RT-PCR untersucht und die Menge in Relation zu dem 18S rRNA-Standard durch die Software AIDA ausgewertet. Die Messung der relativen Metabolitmengen erfolgte mittels HPLC.

C.2 Induktionsmuster und funktionelle Charakterisierung von *CYP71AJ1*

Um die Beteiligung des funktionell unbekanntes *CYP71AJ1* aus *Ammi majus* (Specker, 2003) an der Furanocumarinbiosynthese abzuschätzen, wurde zunächst mittels Northern Dot Blot-Analyse die Transkriptakkumulation nach *Pmg*-Elicitierung untersucht (Abb. 22).

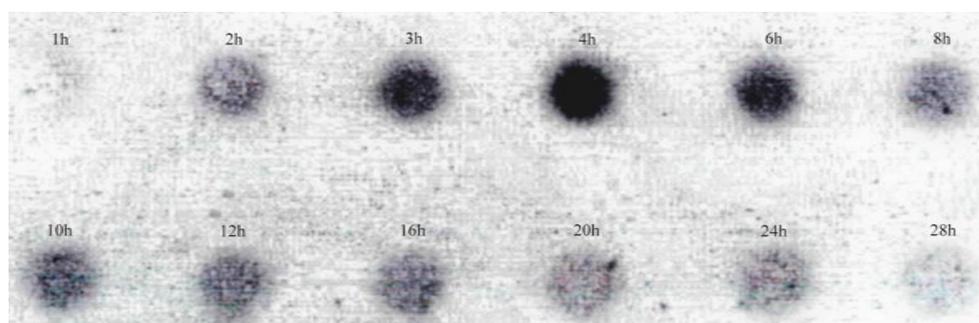


Abb. 22: Northern Dot Blot-Analyse der zeitabhängigen *CYP71AJ1*-Transkription

Eine *Ammi majus* Suspensionskultur wurde mit *Pmg*-Elicitor behandelt und zu unterschiedlichen Zeiten nach erfolgter Elicitierung auf *CYP71AJ1*-Transkription geprüft. Jeweils 3 µg Gesamt-RNA pro Spur wurden mit einem 900 bp P^{32} -markierten *CYP71AJ1* cDNA-Fragment (Sonde II) hybridisiert. Exposition: 24h.

Die Analyse ergab eine transiente Induktion mit einem Maximum nach vier Stunden, womit CYP71AJ1 gut in das Zeitfenster der Furanocumarinbildung passte (C.1.2) und deswegen näher untersucht wurde. Die funktionelle Charakterisierung erfolgte von Alain Hehn und Romain Larbat (ENSAIA, Nancy, France). Da das Enzym sehr labil ist, wurde zunächst der N-Terminus gegen den N-Terminus von CYP73A1 (C4H aus *Helianthus tuberosus*) ausgetauscht und der modifizierte Klon heterolog in *S. cerevisiae* exprimiert. Enzymtests mit (+)-Marmesin als Substrat ergaben eine enge Psoralensynthese Aktivität (POS). Darauffolgend wurden in dieser Arbeit analog zu den Untersuchungen von C4H und BOMT (C.1) weitere POS-Transkriptionsprofile erstellt (siehe auch C.5). Dies diente dem Ziel, in Kombination mit den C4H- und BOMT-Profilen das Zeitfenster für die Isolierung weiterer Furanocumarin-spezifischer cDNAs einzugrenzen sowie Vergleichsdaten für die Isolierung Furanocumarin-spezifischer Transkripte zu gewinnen.

Zur Bestimmung der relativen Transkriptmenge diente die semiquantitative RT-PCR (Abb. 23) mit den optimierten Bedingungen 2 mM Mg²⁺ und 64°C Anlagerungstemperatur.

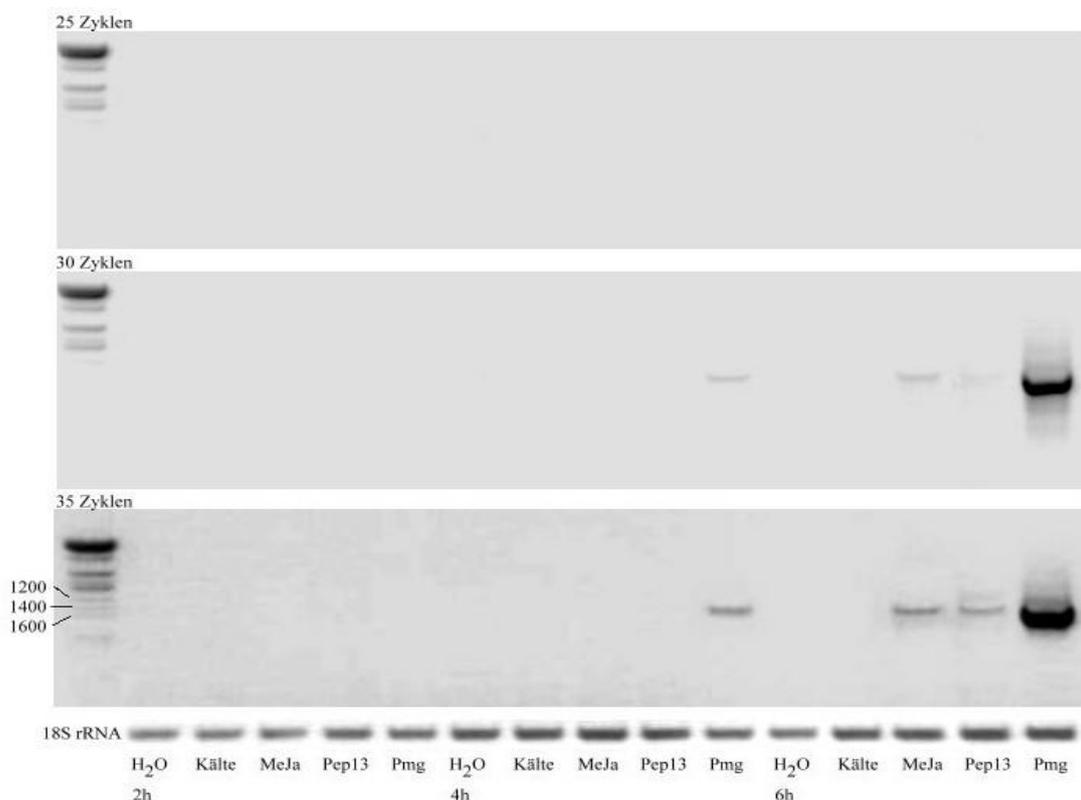


Abb. 23: RT-PCR-Analyse der Elicitor-abhängigen CYP71AJ1-Transkription

Eine *Ammi majus* Zellsuspensionskultur wurde in fünf Fraktionen aufgeteilt und diese mit je einem der angegebenen Elicitoren behandelt. Nach 2, 4 und 6h wurde Gesamt-RNA extrahiert für die Prüfung der CYP71AJ1-Transkription mittels semiquantitativer RT-PCR (0,5 µg RNA, POS-,end-to-end“-Primer). Die Analyse der Amplikons erfolgte nach 25, 30 und 35 Zyklen, als Ladekontrolle diente 18S rRNA (25 Zyklen) und als Längenkontrolle der cDNA-Fragmente ein DNA-Größenstandard (linke Spur).

Die Analyse des Elicitor-Einflusses (Abb. 24) ergab eine selektive Induktion durch *Pmg*, eine leichte Erhöhung der Transkriptmenge durch MeJa und noch geringer durch Pep-13.

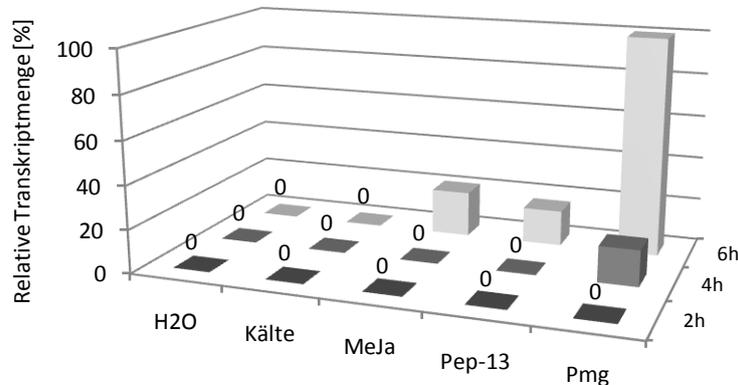


Abb. 24: Einfluss verschiedener Elicitoren auf die CYP71AJ1-Transkription

Eine *Ammi majus* Zellsuspensionskultur wurde in fünf Fraktionen aufgeteilt und diese mit je einem der angegebenen Elicitoren behandelt. Die Transkriptmengen wurden nach 2, 4 und 6h mittels semiquantitativer RT-PCR untersucht und in Relation zu dem 18S rRNA-Standard mit der Software AIDA ausgewertet.

Die transiente Akkumulation der Transkripte (Maximum bei vier Stunden) korreliert mit der transienten Akkumulation von Psoralen, welches aber erst sechs Stunden später das Maximum erreicht (Abb. 25). Die Zunahme erfolgte sehr rasch, die Abnahme verlief deutlich langsamer, wobei sich zeitlich versetzt jeweils ein leichtes Plateau für mehrere (Transkripte) bzw. einige Stunden (Psoralen) entwickelte.

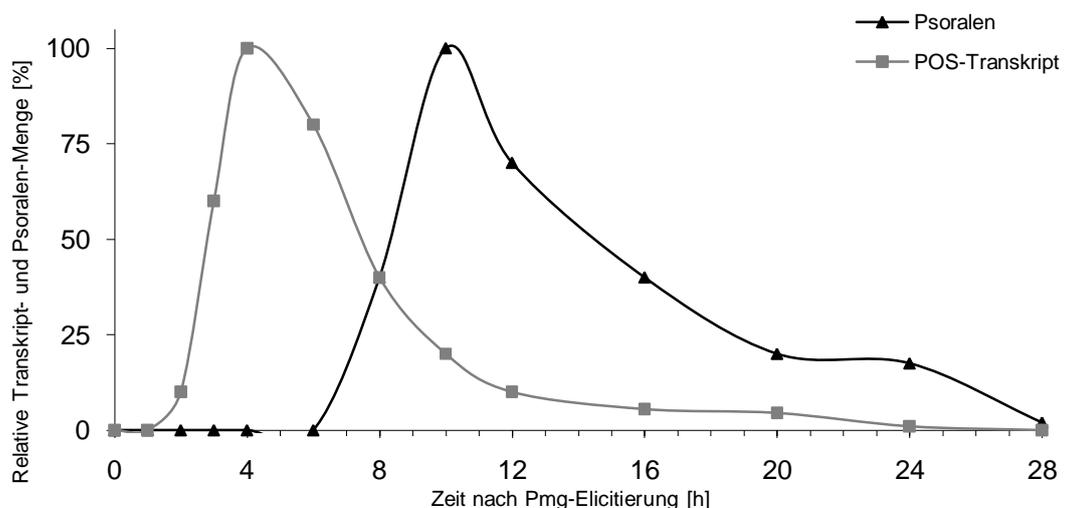


Abb. 25: Induktion der relativen POS-Transkript- und Produktmenge

Eine *Ammi majus* Zellsuspensionskultur wurden mit *Pmg*-Elicitor behandelt und Zellen bzw. Nährflüssigkeit zu unterschiedlichen Zeiten nach erfolgter Elicitierung auf Transkript- bzw. Metabolitakkumulation geprüft. Die Transkripte wurden mittels semiquantitativer RT-PCR untersucht und die Menge in Relation zu dem 18S rRNA-Standard durch die Software AIDA ausgewertet. Die Messung der relativen Metabolitmengen erfolgte mittels HPLC.

C.3 *Differentielle Isolierung potentiell Furanocumarin-spezifischer Cyt P450-Transkripte*

C.3.1 **Isolierungsstrategie**

Design von modifizierten „Arbitrary-ACPs“

Die differentielle PCR sollte weitere Furanocumarin-spezifische Cyt P450s isolieren und wurde zunächst unter Verwendung der degenerierten CYB-A und CYP-B (Akashi *et al.*, 1997) bzw. der Cyt P450-spezifischen Decamer-Primer (Schopfer & Ebel, 1998), abgeleitet von konservierten Cyt P450-Bereichen, fortgesetzt. Das Ergebnis war eine große Anzahl von Fragmenten, von welchen der größte Teil auf Nonsense-Sequenzen und der Rest auf schon bekannten Sequenzen von *Ammi majus* entfiel. Ein großes Problem bestand darin, dass diese Primer entworfen wurden, als etwa erst 500 Cyt P450-Sequenzen bekannt waren (Mansuy, 1998). Seitdem ist die Zahl pflanzlicher Klone auf über 3000 angestiegen (Nelson, 2007). Damit steigt das Risiko, dass die bekannten Primer nicht mit den gesuchten Cyt P450s hybridisieren. Deshalb wurden neue Primer auf der Grundlage umfassender Alignments entworfen.

Aus furanocumarinreichen Apiaceae, Rutaceae, Moraceae und Fabaceae (Psoralea, Coronilla) sind außer den C4H- nur wenige Cyt P450-Sequenzen bekannt. Deshalb musste die Datengrundlage für Alignments erweitert werden. Insgesamt sind 97 Cyt P450-Familien bei Pflanzen registriert (Nelson, 2007). Davon kann eine große Anzahl als irrelevant für die Alignment-Erstellung eingestuft werden (Nelson, 2004; NCBI, 2007; EMBL, 2007). Hierzu gehören Familien, welche nur bei grünen Algen, Moosen, Gräsern und Pflanzen ohne Furanocumarine vorkommen. Des Weiteren sind die Mitglieder von CYP730 – 732, welche bisher nur aus *Oryza sativa* isoliert werden konnten, nach eigenen Angaben der Entdecker wahrscheinlich auf Kontaminationen der cDNA-Bibliothek zurückzuführen (Nelson *et al.*, 2004; Nelson, 2004). Von den restlichen Cyt P450-Familien wurden insgesamt 99 Sequenzen ausgesucht, wobei Sequenzen aus furanocumarinreichen Familien bevorzugt wurden. Nicht verwendet wurden Monokotyledonen-Sequenzen und Sequenzen von Proteinen, welche nicht in der Furanocumarinbiosynthese vorkommende Reaktionen wie zum Beispiel Deamination oder Dehydrierung katalysieren. Ferner wurde darauf geachtet, dass Sequenzen, welche für das gleiche Enzym codieren, sich nicht zu häufig wiederholen. Innerhalb der C4H-Familie CYP73A konservierte Regionen sowie Basenfolgen, welche nur bei den bereits isolierten

Ammi majus Cyt P450-cDNAs vorkommen, wurden nicht berücksichtigt, um das Risiko einer erneuten Klonierung bekannter Sequenzen aus *Ammi majus* zu reduzieren. Die Sequenzen aller verwendeten Klone sind tabellarisch zusammengefasst (G.1).

In dem Alignment erwies sich die ‚PERF‘-Region als der konservierteste Bereich. In Tab. 17 ist die entsprechende Region aus dem Alignment dargestellt, wobei in der ersten Zeile die am häufigsten beobachtete AS und NS aufgeführt und die nicht für das Primer-Design verwendeten AS und NS durchgestrichen dargestellt sind.

Tab. 17: Ableitung der ACPs von der PERF-Region

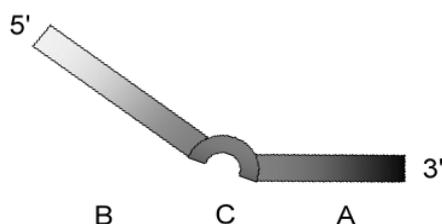
Aminosäuren					Nukleinsäure-Tripletts				
F	X	P	E	R	TTT	NDN	CCN	GAA	CG
					TTC			GAG	AG
Y		A ¹⁾	D		TAT			GAT	
					TAC			GAC	
W		G ¹⁾	S		TGG			TCA	
					TCT				
					TCC				
					TCG				
					AGT ²⁾				
					AGC ²⁾				
Q					CAA				
					CAG				
M ³⁾									

¹⁾ **A, G:** Chloroplasten-lokalisiert, 3-Schritt Reaktionen mit linearen Substraten; A: CYP74A (Allen-Oxid-Synthase, Jasmonsäure-Biosynthese), G: CYP74B (Fettsäure-Hydroperoxid-Lyase, Lipoxigenase-Weg)

²⁾ **AGT, AGC:** In nur zwei Fällen beobachtet → starke Degeneration der Primer

³⁾ **M:** Nur bei CYP72A1 (Secologanin Synthase, Indol-Alkaloid-Biosynthese)

Basierend auf dem Alignment wurden degenerierte Primer, „mACPs“ (Abb. 26, G.3), entworfen, welche alle oben aufgeführten Basenfolgen repräsentieren. Die Degeneration wurde durch Konstruktion von sechs mACP-Varianten (mACP1–6) eingeschränkt.



A: „Core target sequence“: Cyt P450-spezifische Region

B: „Universal sequence“: Adaptersequenz, welche nicht an das Template bindet und als Anker für die nested PCR dient

C: „Regulator“: verbindet die beiden oberen Regionen miteinander und besteht aus 5 Inosin-Resten

Abb. 26: ACP-Struktur

Region A und B besitzen unterschiedliche Hybridisierungstemperaturen in der PCR und Region C reguliert die alleinige Anlagerung von A oder B. Somit werden Fehlpaarungen vermieden und gezielt spezifische cDNA-Fragmente amplifiziert.

Vorversuche und Prüfung der Methodik

Vor Durchführung der differentiellen ACP-PCR wurden zunächst die mACP/Cyt P450 cDNA-Hybridisierung, die Effizienz der PCR-Methode sowie die Induktion der Furanocumarinbiosynthese (siehe auch C.1 und C.2) überprüft. Hierfür wurden mACPs in PCR-Reaktionen eingesetzt, welche das Template FNS II- oder F3'H-cDNA aus *Hieracium pilosella* (Kellner, 2003) und den jeweils genspezifischen 3'-End-Primer enthielten. Die Templates wurden in beiden Fällen sehr effizient amplifiziert. Die Überprüfung der Amplikons über Restriktionsverdau bestätigten die FNS II- bzw. F3'H-Spezifität der PCR-Produkte. Die Furanocumarin-Bildung in *Pmg*-elicitierten Zellen bzw. das Fehlen von Furanocumarinen in den nicht elicitierten Vergleichskulturen für die differentielle PCR wurde über die Amplifikation von POS-Transkripten nachgewiesen (Abb. 27).

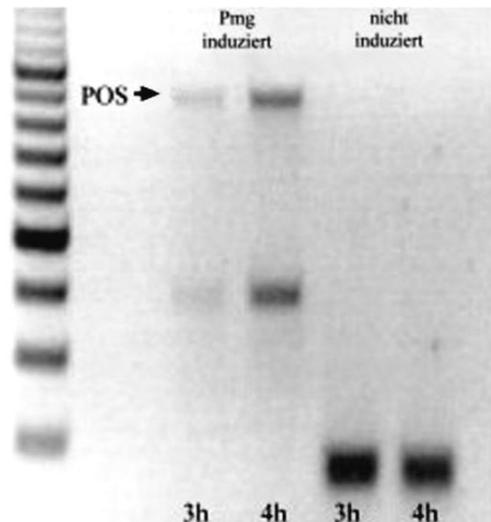


Abb. 27: Induktionskontrolle durch POS RT-PCR

Gesamt-RNA aus *Pmg*-induzierten und nicht induzierten *Ammi majus* Suspensionskulturen wurde 3 und 4h nach Elicitierung extrahiert und 0,5 µg mit POS-„end-to-end“-Primern für die RT-PCR eingesetzt. Als Längenkontrolle der cDNA-Fragmente diente ein DNA-Größenstandard (linke Spur). Nur induzierte Kulturen enthielten POS-Transkripte.

Differentielle ACP-PCR

Die maximale transiente Induktion von C4H-, POS- und BOMT-Transkripten war zwei bis acht Stunden nach *Pmg*-Zugabe beobachtet worden. Für die Isolierung von Transkripten ‚späterer‘ Enzyme wurde dieser Zeitraum für die hier beschriebenen Untersuchungen auf zwölf Stunden erweitert. Die differentielle ACP-PCR, auf der Grundlage von Gesamt-RNA aus *Pmg*-induzierten bzw. nicht induzierten *Ammi majus* Suspensionskulturen, lieferte bei unterschiedlichen Primern, Anlagerungstemperaturen und Mg^{2+} -Konzentrationen unterschiedliche Ergebnisse (Abb. 28). Die Verwendung von mACP2 lieferte distinkte

Banden der gesuchten Größenordnung von 250 – 500 bp, welche nur mit RNA aus induzierten Kulturen entstanden. Die anderen Primer generierten entweder keine bzw. cDNA-Fragmente falscher Größe oder nur solche, die auch mit RNA aus nicht-induzierten Suspensionskulturen auftraten. Die Beteiligung dieser Fraktionen an der Furanocumarinbiosynthese kann ausgeschlossen werden. Die Sequenzierung (MWG Biotech, Martinsried) der differentiellen Amplikons ergab drei neue putative Cyt P450-Sequenzen mit einer Länge von etwa 300 bp, welche durch Ableitung genspezifischer Primer mit Hilfe des '5'RACE' oder GeneRACE' vervollständigt wurden (G.2).

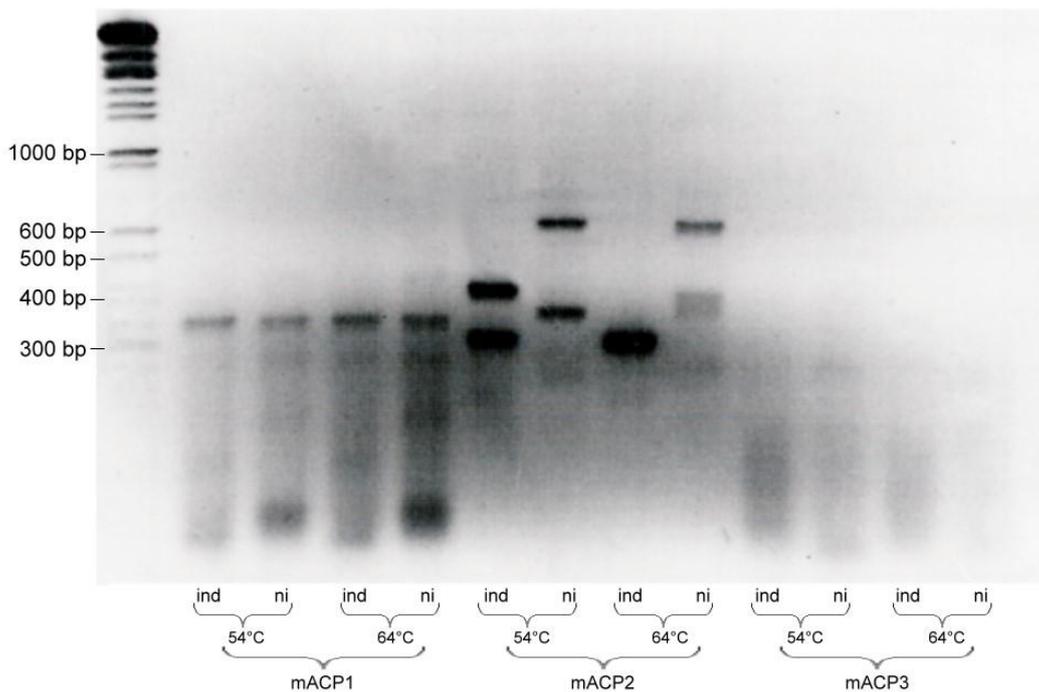


Abb. 28: Differentielle ACP-PCR

Cyt P450-spezifische cDNA-Fragmente aus der Gesamt-RNA von *Pmg*-induzierten (ind) und H₂O-behandelten (ni) *Ammi majus* Suspensionskulturen amplifiziert. Die Ergebnisse mit den zusammengefassten RNA-Fractionen von Zellen, die 3 und 4 Stunden eliciert waren, und unterschiedlichen Primern (ACP1-3) ist für verschiedene Temperaturen dargestellt. Nur die Verwendung von mACP2 resultierte in distinkten differentiellen Amplikons mit der gesuchten Länge (250 – 500 bp) aus den induzierten Proben.

C.3.2 CYP71AZ1

Der „full-length“-Klon wurde mittels 5'-RACE generiert. Nur das mit dem Primer ‚mACP2 5.a‘ bei 55°C (StrataScript® reverse Transkriptase) hergestellte und mit einem 5'-Oligo-dC-tail modifizierte cDNA-Template führte zu einer PCR-Amplifikation. Die in der ersten PCR-Runde mit ‚mACP2 5.0‘ unter verschiedenen Bedingungen erhaltenen Amplikons in der gesuchten Länge von 1200 bis 1500 bp wurden isoliert und 1:100 verdünnt als Template mit ‚mACP2 5.01‘ in einer nested PCR eingesetzt. Das Ergebnis der in mehreren Schritten

optimierten PCR war ein distinktes Amplikon, dessen Sequenzierung Übereinstimmung mit dem 3'-Ende des gesuchten cDNA-Fragmentes aus der differentiellen ACP-PCR zeigte.

Aus den einzelnen Sequenz-Informationen wurde der ORF bestimmt. Ein erster Vergleich mit AS-Sequenzen aus der NCBI-Datenbank unterstützte die Lage des Start- und des Stop-Codons und damit die kodierende Region mit einer Länge von 1527 bp und einem berechneten Molekulargewicht des abgeleiteten Proteins von 58,3 kDa. Der sequenzierte untranslatierte 5'-Bereich umfasst 19 bp und die bekannte Region nach dem ORF 164 bp. Eine Analyse der N-terminalen Region ergab einen putativen Membran-Anker zwischen der 5. und 24. Aminosäure. Die Sequenz wurde von Dr. Nelson (University of Minnesota, USA) als erstes Mitglied einer neuen Cyt P450-Unterfamilie (CYP71AZ1) klassifiziert. Eine BLAST-Analyse auf AS-Basis ergab mit 72 und 73% die größte Ähnlichkeit zu mehreren putativen Cyt P450s aus *Vitis vinifera* (Accession Number u.a. CAN64422, CAO61025, CAO61029), gefolgt mit 68 und 69% von CYP71AT2v1, v2 und v3 aus *Nicotiana tabacum* (ABC69408 - ABC69410). Die funktionelle Charakterisierung dieser Sequenzen fehlt.

C.3.3 CYP71D97

Die Generierung des „full-length“-Klons erfolgte mittels 5'-RACE. Als Template wurde mit dem Primer ‚C54 5.0‘ hergestellte und 5'-dC-tailed cDNA verwendet. Die erste PCR-Runde mit ‚C54 5.1‘ resultierte unter verschiedenen Bedingungen in multiple Banden unter anderem in der gesuchten Länge zwischen 1200 und 1500 bp. Um ein distinktes Amplikon zu erhalten, wurden die Amplikons 1:100 verdünnt als Template in zwei aufeinanderfolgenden optimierten nested PCRs mit den Primern ‚C54 5.2‘ und ‚C54 5.3‘ eingesetzt. Ein Amplikon zeigte übereinstimmende Sequenzbereiche mit dem gesuchten cDNA-Fragment aus der differentiellen ACP-PCR und konnte als dessen 5'-Ende identifiziert werden.

Der ORF wurde aus den Sequenzen abgeleitet und in der NCBI-Datenbank fand sich die höchste Ähnlichkeit zu CYP71Ds. Ein Vergleich zu diesen bestätigte die Lage des Start- und Stop-Codons und damit die codierende Region mit einer Länge von 1521 bp und einem berechneten Molekulargewicht des abgeleiteten Proteins von 57,3 kDa. Von der gesamten Sequenz entfallen 57 bp auf den untranslatierten Bereich vor und 25 bp nach dem ORF. Eine Analyse der transmembralen Region ergab einen putativen Membran-Anker zwischen der 5. und 22. Aminosäure. Die Sequenz wurde von Dr. Nelson (University of Minnesota, USA) als 97. Mitglied der Cyt P450 Subfamilie CYP71D klassifiziert. Ein BLAST auf Proteinebene von NCBI zeigte mit 72% die größte Ähnlichkeit zu putativen Cyt P450s aus *Hyoscamus*

muticus (Accession number ABS00393) und *Solanum tuberosum* (CAC24711) und mit 69% zu putativen Cyt P450s aus *Vitis vinifera* (CYO45095) und *Solanum chacoense* (CYP71D7, P93531). Es folgt eine Reihe meist nicht funktionell charakterisierter Sequenzen aus diversen Pflanzenfamilien. Die höchste Ähnlichkeit ergibt sich zu dem ebenfalls neu isoliertem Klon CYP71D98 mit 63% identischen und 89% ähnlichen Aminosäuren.

C.3.4 CYP71D98

Für die Vervollständigung des gesuchten cDNA-Fragmentes aus der differentiellen ACP-PCR wurde zunächst erfolglos das 5'RACE eingesetzt, welches später von der GeneRACE-Methode ersetzt wurde. In drei optimierten nested PCRs mit den Primern ‚CYPB3.1 5.0‘, ‚CYPB3.1 5.1‘ und ‚CYPB3.1 5.2‘ wurden distinkte Banden in der gesuchten Länge (1200 bis 1500 bp) amplifiziert, welche 1:100 verdünnt als Template für die jeweils nachfolgende PCR-Reaktion eingesetzt wurden. Die Sequenzierung der damit in ihrer Anzahl stark reduzierten Banden ergab die Übereinstimmung einer Sequenz mit dem gesuchten cDNA-Fragment.

Der aus den Sequenzen abgeleitete ORF zeigte im AS-Alignment mit Sequenzen aus der NCBI-Datenbank die höchste Ähnlichkeit zu CYP71Ds. Der Vergleich untermauerte die Lage des Start- und des Stop-Codons mit einem untranslatierten Bereich von 26 bp vor und 33 bp nach dem ORF. Der ORF enthält 1542 bp, translatiert zu 514 Aminosäuren, mit einem Molekulargewicht des abgeleiteten Proteins von 57,7 kDa. Der putative Membran-Anker befindet sich zwischen der 5. und 24. Aminosäure. Die Sequenz wurde von Dr. Nelson (University of Minnesota, USA) als CYP71D98 klassifiziert. Ein Vergleich mit CYP71D97 ergab die höchste Übereinstimmung mit 63% identischen und 89% ähnlichen Aminosäuren.

C.4 Untersuchungen zur Korrelation von Cyt P450s aus Ammi majus mit der Furanocumarin-Biosynthese

C.4.1 Phylogenetische Analyse

Die Analyse der Verwandtschaftsverhältnisse der neuen *Ammi majus* Cyt P450s erfolgte mit der „Neighbour Joining“-Methode unter Einbezug von Sequenzen, welche laut BLAST-Analyse die größte Ähnlichkeit zu den isolierten cDNAs besitzen (Abb. 29).

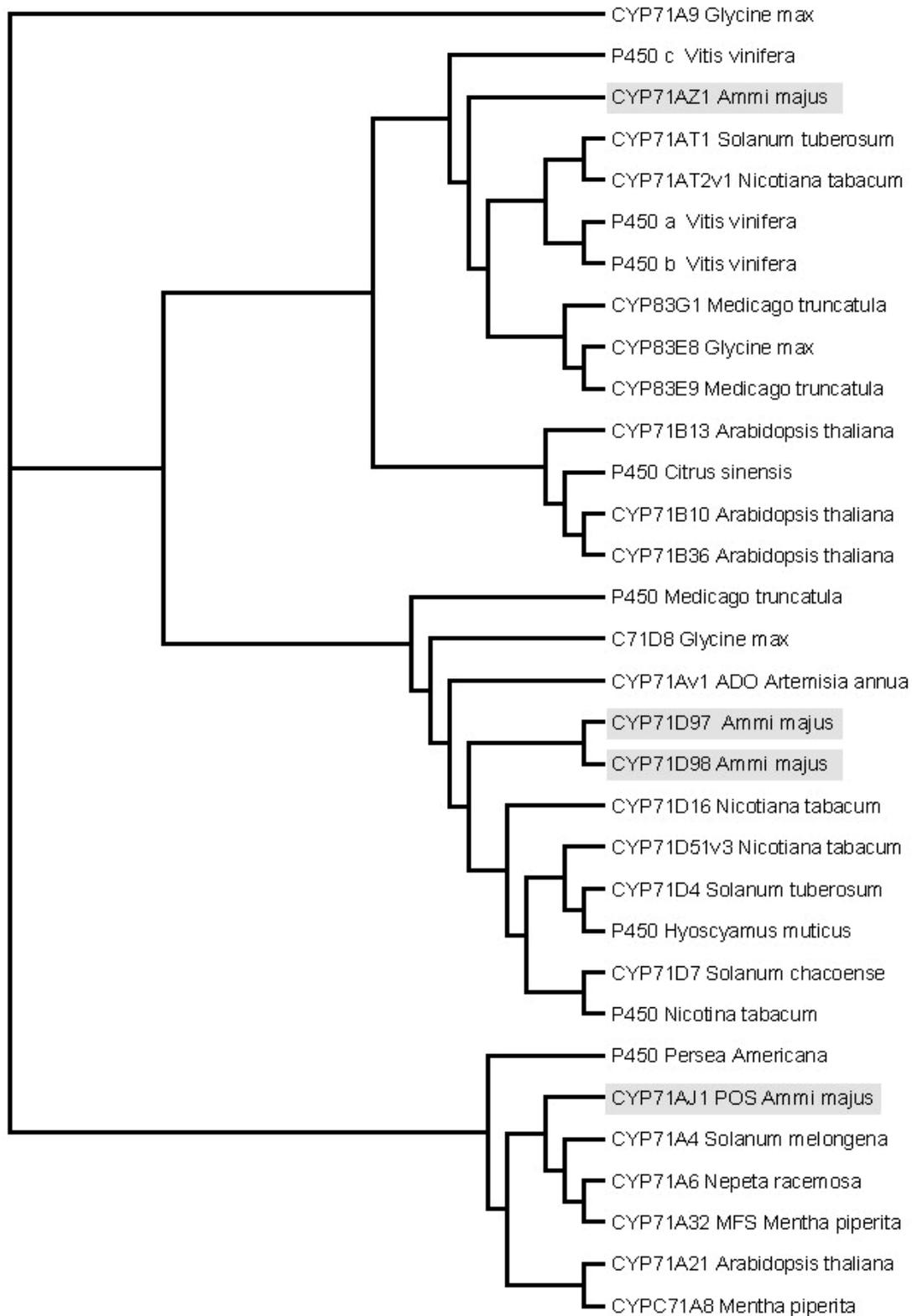


Abb. 29: Phylogenetische Analyse

Als Basis für die phylogenetische Analyse dienten Protein-Alignments von Sequenzen mit der höchsten Ähnlichkeit zur POS und den neu aus *Ammi majus* isolierten Klonen CYP71AZ1, CYP71D97 und CYP71D98 (grau unterlegt). Die Verwandtschaftsverhältnisse wurden mit der „Neighbour-Joining“-Methode berechnet und unter Verwendung des Programms TreeView 1.6.6 als ‚rectangular Cladogramm‘ dargestellt.

Die POS aus *Ammi majus* ist in einem CYP71A-Cluster zu finden, welcher aus Sequenzen verschiedener Pflanzenfamilien (Fabaceae, Brassicaceae und Solanaceae) besteht. CYP71AZ1 clustert mit Cyt P450-Sequenzen aus *Vitis vinifera* (Vitaceae), einigen Solanaceae-Sequenzen aus der CYP71AT-Unterfamilie und Fabaceae-Sequenzen aus der CYP83-Familie. CYP71D97 und D98 gruppieren ausschließlich mit CYP71-Vertretern aus den Familien der Solanaceae und Fabaceae. Hierbei zeigt das in dieser Gruppe einzige funktionell bekannte Cyt P450, die Amorpha-4,11-diene-C-12 Oxidase (ADO) aus *Artemisia annua*, die nahste Verwandtschaft zu den neuen Klonen. Während CYP71AZ1 und die beiden CYP71D-Klone 97 und 98 sich aus einer langen gemeinsamen Entwicklung abzuleiten scheinen, weist CYP71AJ1 (POS) eine entferntere Verwandtschaft auf.

C.4.2 Vergleichende Analyse von Substraterkennungsregionen

Der Vergleich mit 46 Cyt P450 AS-Sequenzen aus der CYP73A-, CYP71A- und CYP71D-Familie sowie anderen Cyt P450s aus furanocumarinhaltigen *Apiaceae* und *Rutaceae* identifizierte Auffälligkeiten für die *Ammi majus* Cyt P450-AS-Sequenzen in den Substraterkennungsregionen (Abb. 11). Ein Auszug aus diesem Vergleich ist in Tab. 18 aufgelistet.

Tab. 18: SRS1 und SRS5

P450	SRS1 (Auszug)	SRS5 (Auszug)
CYP71AJ1 (POS)	KD M V 121	L YFT APLL 365
CYP71AZ1	LDVA 119	L YPT GALL 372
CYP71D97	RDIV 118	LHPPVPLL 373
CYP71D98	RDIV 120	LHAPVPLL 375
CYP (<i>C. sinensis</i>)	SDIA 105	LHPPAPLL 366
CYP71A9	STVS 161	LHPPAPLL 369
CYP71A10	KDVA 126	LHPPLPLL 381
CYP71D8	TDIA 120	LHPPSQLI 374
CYP71D9	KGVA 121	LHPPAPLL 366
CYP71D10	SGIV 129	LHPPVPLL 380
Zimtsäure 4-Hydroxylasen	QDMV ~118	LRMAIPLL ~374
Hydroperoxidlyasen	HLFD ~100	LNPPVPLQ ~362
Allenoxidsynthase	VLFD ~98	MEPPVPLQ ~365

SRS1 und SRS5 von POS und CYP71AZ1 enthalten auffällige Abweichungen. Die POS kodiert in Position 120 für Met, während andere CYP71s hier die hydrophoben Aminosäuren Ile oder Val benutzen. Allerdings wird Met häufig auch zu hydrophoben AS gezählt. Noch deutlicher ist der Unterschied in den Aminosäuren 359-361 (YFT), wohingegen die meisten anderen CYP71-Sequenzen an dieser Stelle HPP exprimieren. Prolin ist bekannt als Helix-Brecher und der Austausch muss erhebliche Effekte auf die Tertiär-Struktur haben. Dieses Muster kann in ähnlicher Weise auch bei CYP71AZ1 (YPT 366 - 368) beobachtet werden.

C.4.3 Genstruktur

Genomische DNA wurde aus jungen Blättern von *Ammi majus* isoliert, die Gene von CYP71AJ1, CYP71AZ1, CYP71D97 und CYP71D98 mit „end-to-end“-Primern amplifiziert, über Agarosegel aufgetrennt, eluiert, in Bakterien kloniert, sequenziert und mit den entsprechenden cDNAs verglichen. Regionen, welche voneinander in der NS-Sequenz abwichen, wurden nach den NS-Paaren GT und AG durchsucht, welche oft Beginn und Ende eines Introns anzeigen. Das putative Intron wurde aus der gDNA-Sequenz entfernt und die verbleibende Sequenz nochmals mit der cDNA verglichen. Wurde eine 100%ige Übereinstimmung aller NS gefunden, konnten mit diesem Resultat Lage und Länge des Introns bestimmt werden.

C.4.3.1 CYP71AJ1

Aufgrund der großen Länge der gDNA konnte die vollständige Sequenz in einer Sequenzierungsreaktion nicht ermittelt werden. Deswegen wurde ein weiterer Primer (,71AJ1 Intron‘) mit Bindestelle vor dem Intron konstruiert und damit ein kürzeres gDNA-Fragment amplifiziert, welches vollständig sequenziert werden konnte. Das Ergebnis zeigte ein Intron 876 NS nach dem Start mit einer Länge von 476 bp und eine Gesamtlänge der isolierten gDNA inklusive UTR-Bereiche von 2290 bp (Abb. 30).

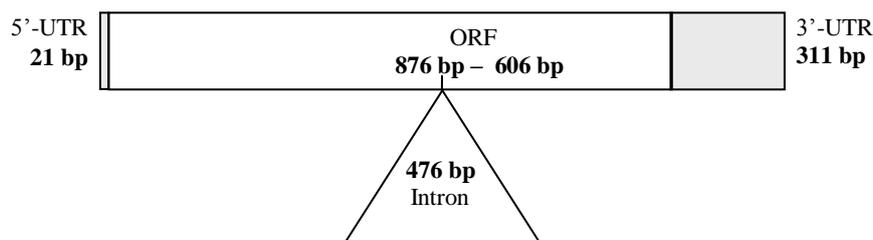


Abb. 30: Genomische CYP71AJ1-Struktur

Die Kopien-Anzahl im Genom wurde durch Southern Blotting geprüft. Die hierfür verwendeten Restriktionsendonukleasen schneiden in der gesamten Intron-Exon-Sequenz nicht oder nur einmal. Für eine genauere Abschätzung wurde der Blot zweimal mit verschiedenen Sonden (I: 500 bp, II: 900 bp) durchgeführt, was je nach verwendetem Enzym in einer unterschiedlichen Anzahl von gDNA-Fragmenten resultiert. Die Restriktionsschnittstellen innerhalb der POS gDNA, sowie die Hybridisierungsregionen der Sonden sind in Abb. 31 graphisch dargestellt.

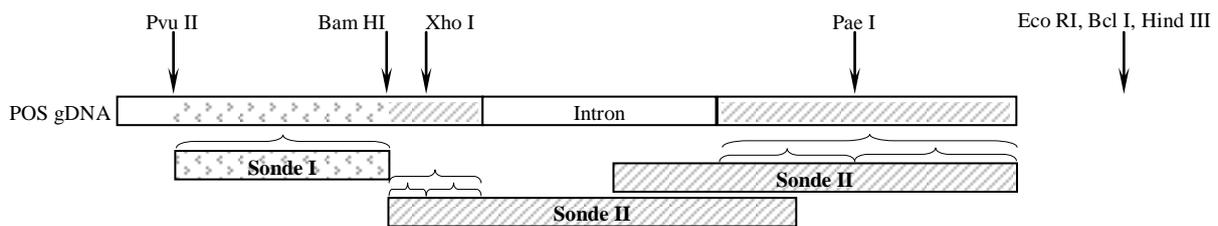


Abb. 31: Schema zum POS Southern Blotting

Die Hybridisierungsregionen der POS gDNA mit der cDNA-Sonde I sind gepunktet, mit der cDNA Sonde II schraffiert dargestellt. Sonde II kann an einer kurzen Region vor als auch an einer längeren Region nach dem Intron binden. Die mit Pfeilen gekennzeichneten Schnittstellen der Restriktionsenzyme liegen innerhalb oder außerhalb der POS gDNA.

Der Verdau mit Xho I bei einer einzelnen Kopie bzw. bei mehreren Kopien mit dazwischen liegenden Restriktionsschnittstellen führt beim Nachweis mit Sonde II zu einem langen und einem sehr kurzen Hybridisierungsfragment. Dies kann dazu führen, dass die Sonde II zwar an der längeren Sequenz gut bindet, an der kürzeren jedoch eine nur sehr schwache Bindung aufweist. Da die Membran mehrmals gewaschen wurde, um eine Reduzierung des Hintergrundes und deutliche Signale zu erreichen, könnte ein solcher Fall in der Ausbildung eines starken und eines schwachen radioaktiven Signales resultieren, was in der Analyse berücksichtigt wurde.

Die Zahl der zu erwartenden POS gDNA-Fragmente bei ein bis drei Kopien (Tab. 19) hängt vom Restriktionsenzym und von eventuellen Restriktionsschnittstellen für das jeweils verwendete Enzym zwischen den Genkopien ab. Die Abschätzung der Genkopien-Anzahl erschwert sich zudem durch die nicht immer eindeutig distinkten Signale von Sonde I, wohingegen der Einsatz von Sonde II in deutlich detektierbare Signale resultierte (Abb. 32). So können z.B. beim Bcl I-Verdau ein bis drei mögliche Signale von Sonde I auf ein bis drei Kopien hinweisen (Tab.19 und 20). In Kombination mit den mindestens drei deutlichen Signalen von Sonde II weist dies jedoch auf die Existenz von mindestens drei voneinander getrennten Genkopien hin. Werden auf diese Weise alle Signale analysiert, so ergibt sich eine Anzahl von mindestens drei POS-Genkopien.

Tab. 19: Erwartete Anzahl der hybridisierenden gDNA-Fragmente im POS Southernblot

Anzahl Genkopien ¹⁾	Restriktionsenzym und Sonde I oder II								
	Pvu II		Bam HI		Xho I ²⁾		Pae I		Eco RI, Bcl I, Hind III
	I	II	I	II	I	II	I	II	I bzw. II
1	1	1	1	1	1	1 (+1)	1	2	1
2 getrennt	2	2	2	2	2	2 (+2)	2	4	2
2 gekoppelt	2	2	2	2	2	2 (+1)	2	3	1
3 getrennt	3	3	3	3	3	3 (+3)	3	6	3
1 getrennt + 2 gekoppelt	3	3	3	3	3	3 (+2)	3	5	2
3 gekoppelt	3	3	3	3	3	3 (+1)	3	4	1

¹⁾ Zwischen den Genkopien liegt keine (gekoppelte Kopien) bzw. mind. eine (getrennt Kopien) der geprüften Schnittstellen.

²⁾ Die durch Xho I-Verdau kurzen Hybridisierungsstellen für Sonde II (Abb. 31) führen zu einer schwachen Bindung und damit zu schwachen Signalen (in Klammern).

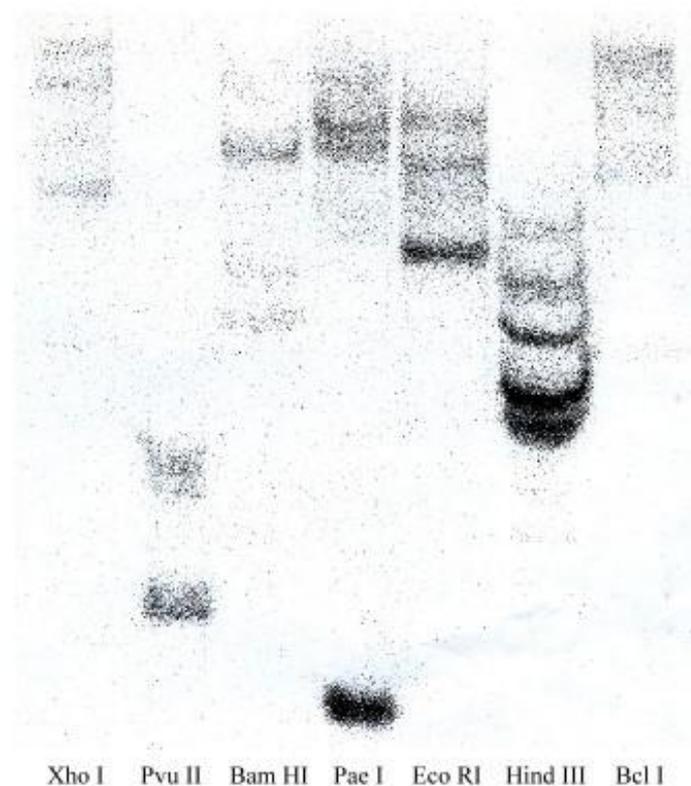


Abb. 32: Hybridisierungsmuster im POS Southernblot

20 µg gDNA pro Spur wurden mit den angegebenen Restriktionsenzymen verdaut und auf einem 0,8%igem (^{w/v}) Agarosegel aufgetrennt. Die Hybridisierung erfolgte mit einem P³²-markierten 900 bp großen POS cDNA-Fragment (Sonde II).

Tab. 20: Detektierte Signale im POS Southernblot

Restriktionsenzym und Sonde I oder II													
Pvu II		Bam HI		Xho I ¹⁾		Pae I ¹⁾		Eco RI ¹⁾		Bcl I ¹⁾		Hind III ¹⁾	
I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
2	3	3	3	3	3 (+ 1)	2 - 3	3 (+ 3)	1 - 3	3	1-3	3 (+ ?)	1 - 3	3 (+ ?)

¹⁾ Schwache Signale sind in Klammern angegeben, die Signalanzahl konnte nicht immer eindeutig bestimmt werden.

C.4.3.2 CYP71AZ1

Wie im Falle von CYP71AJ1 konnte CYP71AZ1 „full-length“ gDNA in einer Reaktion nicht vollständig sequenziert werden und ließ sich nur schwer amplifizieren. Deshalb wurde eine größere gDNA-Menge in Bakterien kloniert und unter Verwendung eines zusätzlich konstruierten internen Primers sequenziert (MWG Biotech, Martinsried). Die vollständige Intron-Sequenz (740 bp) beginnt bei 898 bp, womit die Länge der isolierten Exon-Intron-Struktur inklusive UTR-Bereiche 2450 bp beträgt (Abb. 33).

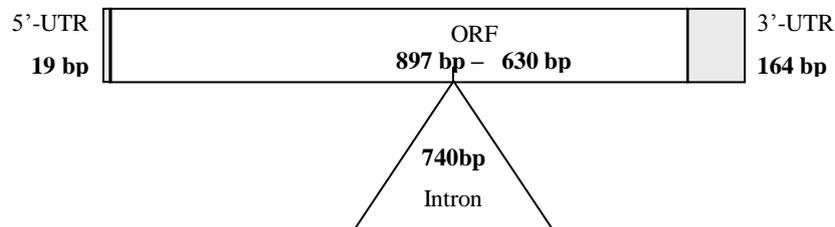


Abb. 33: genomische CYP71AZ1-Struktur

C.4.3.3 CYP71D97 und CYP71D98

Die Sequenzierung der mit „end-to-end“-Primern amplifizierten CYP71D97- und CYP71D98-gDNA ergab vollständige Sequenzen mit jeweils nur einem Intron (Abb. 34).

In der CYP71D97-gDNA von insgesamt 1745 bp wurde das Intron 900 bp nach dem Start mit einer Länge von 142 bp nachgewiesen. Die CYP71D98gDNA mit einer Gesamtlänge von 1684 bp enthält das Intron von nur 83 bp Länge 907 bp nach dem Startcodon.

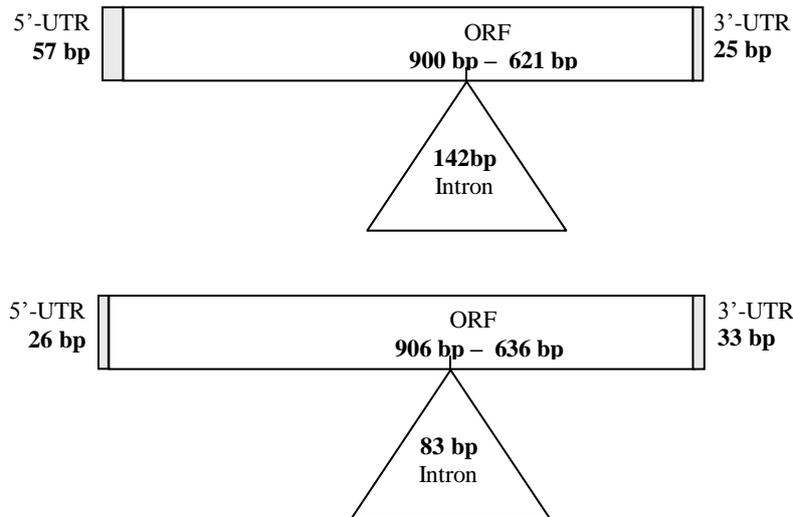


Abb. 34: genomische CYP71D97 und CYP71D98-Struktur

C.4.4 Transkript-Muster von CYP71AZ1, CYP71D97 und CYP71D98

Die RT-PCR-Amplifikation von CYP71AZ1 und CYP71D97 mit „end-to-end“-Primern erwies sich für eine vergleichende quantitative Analyse als problematisch, da stark unterschiedliche GC-Gehalte am 5'- und 3'-Ende der „full-length“-Sequenzen vorliegen und Artefakte beobachtet wurden. Aus diesem Grund wurden Primer entworfen, die etwa 500 Basen voneinander entfernt an die cDNA binden, nicht in konservierten Cyt P450-Regionen liegen und gleiche Bindungseigenschaften aufweisen. Primer und Hybridisierungsbedingungen sind tabellarisch zusammengefasst (Tab. 8, Tab. 16 und 21).

Tab. 21: Optimierte RT-PCR-Parameter für CYP71AZ1, CYP71D97 und CYP71D98

PCR-Bedingungen	Klon		
	CYP71AZ1	CYP71D97	CYP71D98
Annealing-Temperatur	60°C	60°C	60°C
MgCl-Konzentration	1,5 mM	1,5 mM	2 mM

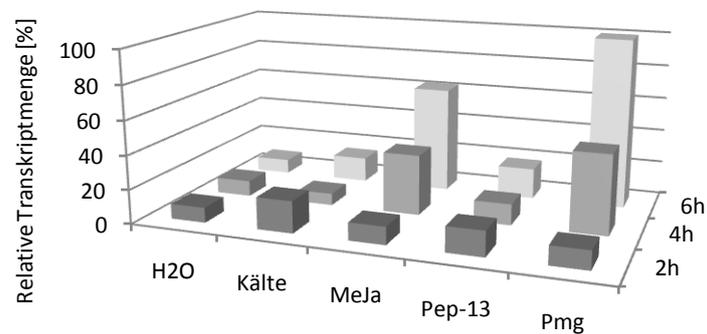
C.4.4.1 Induktions-Muster in *Ammi majus* Zellkulturen

Die Analyse der Induktionsmuster erfolgte äquivalent zu den Untersuchungen der C4H-, BOMT- und POS-Profile (C.1 und C.2).

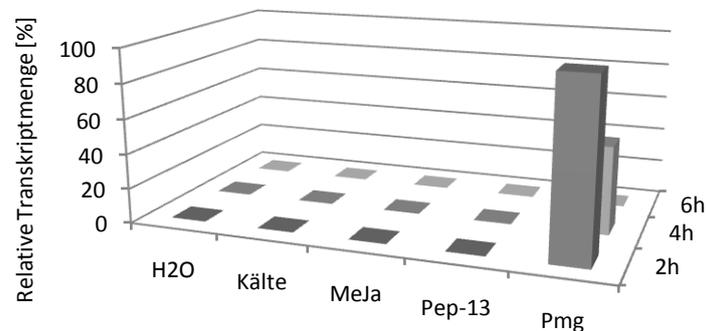
Relative Transkriptmenge in Abhängigkeit vom Elicitor

Es zeigte sich deutlich, dass die stärkste Transkription der neuen CYP71-Klone durch den *Pmg*-Elicitor bewirkt wurde (Abb. 35). Das Maximum von CYP71D97 liegt bei zwei und das von CYP71D98 bei vier Stunden, durch die restlichen Elicitoren erfolgte keine Induktion. CYP71AZ1 zeigt einen kontinuierlichen Anstieg der Transkriptmenge durch *Pmg*, etwas schwächer durch MeJa und sehr gering durch Pep-13, wodurch sich eine auffallende Ähnlichkeit zum Induktionsprofil der POS (Abb. 24) ergibt.

CYP71AZ1



CYP71D97



CYP71D98

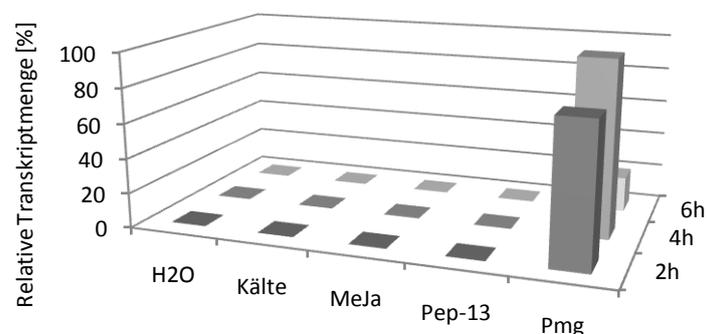


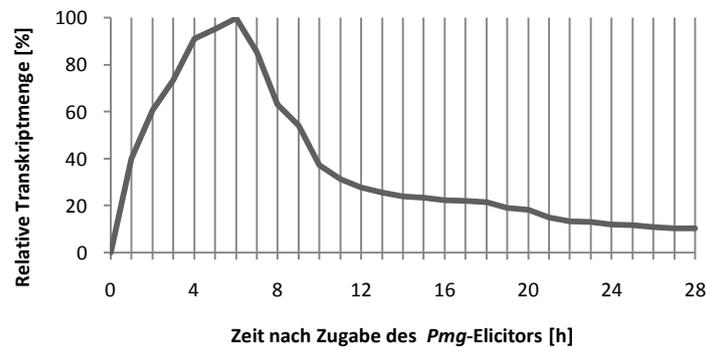
Abb. 35: Einfluss verschiedener Elicitoren auf die CYP71AZ1-, D97- und D98-Transkription

Eine *Ammi majus* Zellsuspensionskultur wurde in fünf Fraktionen aufgeteilt und diese mit je einem der angegebenen Elicitoren behandelt. Die Transkriptmengen wurden nach 2, 4 und 6h mittels semiquantitativer RT-PCR untersucht und in Relation zu dem 18S rRNA-Standard mit der Software AIDA ausgewertet.

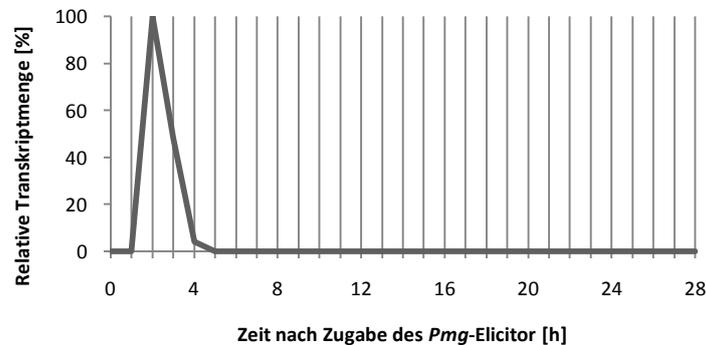
Induktionszeit-spezifische Transkript-Muster

Pmg-elicitierte Suspensionskulturen zeigten eine deutliche und transiente Akkumulation aller Transkripte (Abb. 36). CYP71AZ1-Transkripte akkumulierten langsam mit einem Maximum in der 6. Stunde, die Transkriptmenge nahm mit der gleichen Geschwindigkeit wieder ab und änderte sich ab der 12. Stunde nur noch wenig. Zu- und Abnahme von CYP71D97-Transkripten mit dem Maximum in der 2. Stunde erfolgten sehr rasch, von CYP71D98-Transkripten hingegen langsam mit einem Maximum in der 5. bis 6. Stunde.

CYP71AZ1



CYP71D97



CYP71D98

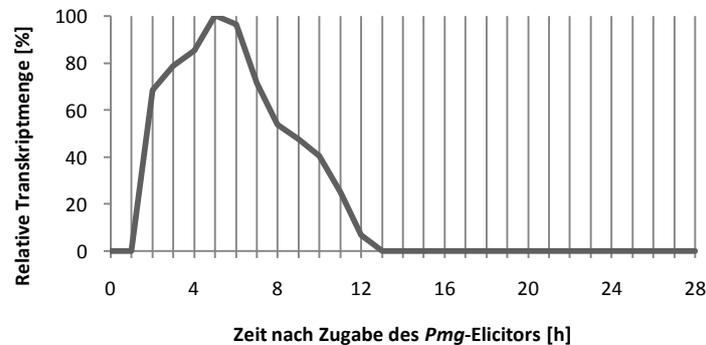


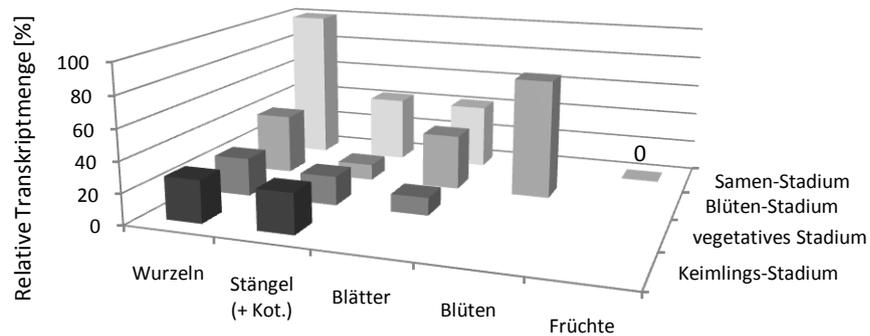
Abb. 36: Induktion der relativen CYP71AZ1-, D97- und D98-Transkriptmenge

Ammi majus Zellsuspensionskulturen wurden mit *Pmg*-Elicitor behandelt, die relativen Transkriptmengen zu unterschiedlichen Zeiten nach erfolgter Elicitierung mit semiquantitativer RT-PCR untersucht und mit Hilfe der Software AIDA in Relation zu dem 18S rRNA-Standard ausgewertet.

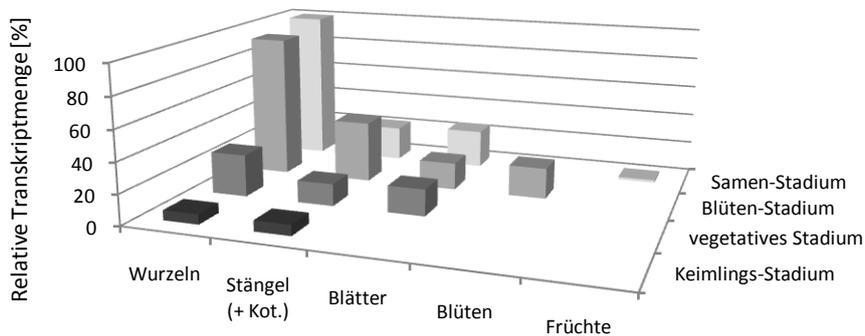
C.4.4.2 Entwicklungs- und gewebespezifische Transkript-Muster

Die Akkumulation der Transkripte von CYP71AZ1, CYP71D97 und CYP71D98 wurde in verschiedenen Geweben und Entwicklungsstadien untersucht (Abb. 37). Es zeigte sich eine deutliche Transkript-Akkumulation in den Wurzeln während des Samen-Stadiums, während Früchte und Stängel während der gesamten Vegetationsperiode am wenigsten akkumulierten.

CYP71AZ1



CYP71D97



CYP71D98

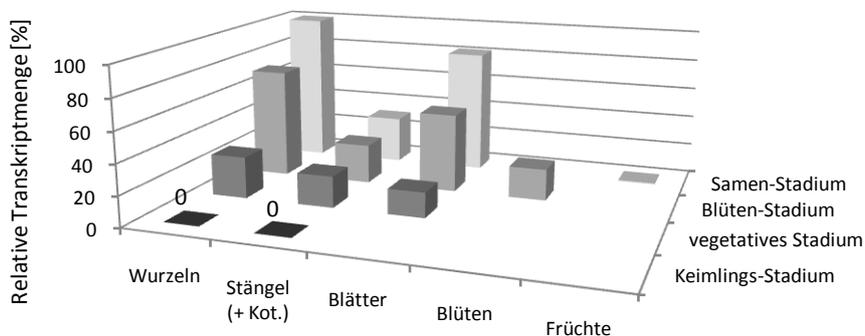


Abb. 37: Relative CYP71AZ1-, D97- und D98-Transkriptmengen in der Pflanze

Verschiedene *Ammi majus* Entwicklungsstadien und Organe wurden auf Akkumulation der neu isolierten Cyt P450-Transkripte geprüft. Die relativen Transkriptmengen wurden mittels semiquantitativer RT-PCR untersucht und mit der Software AIDA in Relation zu dem 18S rRNA-Standard ausgewertet.

C.4.5 Expressionsstudien

C.4.5.1 Versuche zur funktionellen Analyse

Heterologe Genexpression

Die Optimierung der „Proof Reading“-PCR für den „full-length“-Klon von CYP71AZ1 und CYP71D98 bzw. CYP71D97 unter Verwendung der Ligationsprimer für die Klonierung in pYes2/CT (Tab. 10, G.3) ergab eine Anlagerungstemperatur von 60°C und eine Mg²⁺-Konzentration von 2 mM bzw. 1 mM. Der Expressionsvektor besitzt ein internes Stopcodon, welchem eine His-Tag-Sequenz vorgelagert ist, wodurch das exprimierte Enzym über das IMAC-Verfahren isoliert werden kann. Die Expressionskonstrukte wurden in den Hefestamm INVSc1 transformiert und die Analyse der funktionellen Aktivität der drei Cyt P450-Klone erfolgte mit der isolierten Mikrosomen-Fraktion.

Die Enzymtests wurden mit Furanocumarin-Vorstufen, Umbelliferon-Ethern oder linearen Furanocumarinen (Tab. 15) als Substrate durchgeführt. Unter Standardbedingungen konnte kein Substratumsatz detektiert werden. Um Fehler im rekombinanten Enzym zu minimieren, wurde die Expression mit verschiedenen Modifikationen und Kontrollen wiederholt.

Modifikationen und Kontrollen

Die Expression von CYP73A1 (C4H aus *Helianthus tuberosus*) und CYP73A41 (C4H aus *Ammi majus*) als Positiv-Kontrolle lieferte aktive Enzyme im Standardtest.

Die Sequenzierung von aus Hefekolonien isolierten Expressionskonstrukten zeigte keine Fehler in der Replikation und die korrekte Orientierung des Transgens zum Promotor. Ferner bewies die SDS-PAGE-Auftrennung der solubilisierten Membranproteine aus Mikrosomen induzierter Hefe-Transformanten nach Vortrennung über IMAC, dass das rekombinante Protein exprimiert worden war (Abb. 39).

Das Kohlenmonoxid-Differenzspektrum mit Absorptionsmaximum bei 450 nm wird zum Nachweis der korrekten Faltung des Proteins bzw. des Häm-Einbaus benutzt. Die Messung der exprimierten Cyt P450s wie von CYP71AZ1 (Abb. 39) zeigte einen deutlichen Peak bei etwa 420 nm, was das Vorliegen von denaturierten Enzymen als eine Ursache für die nicht messbaren Substratumsätze in den vorangegangenen Enzymtests vermuten lässt.

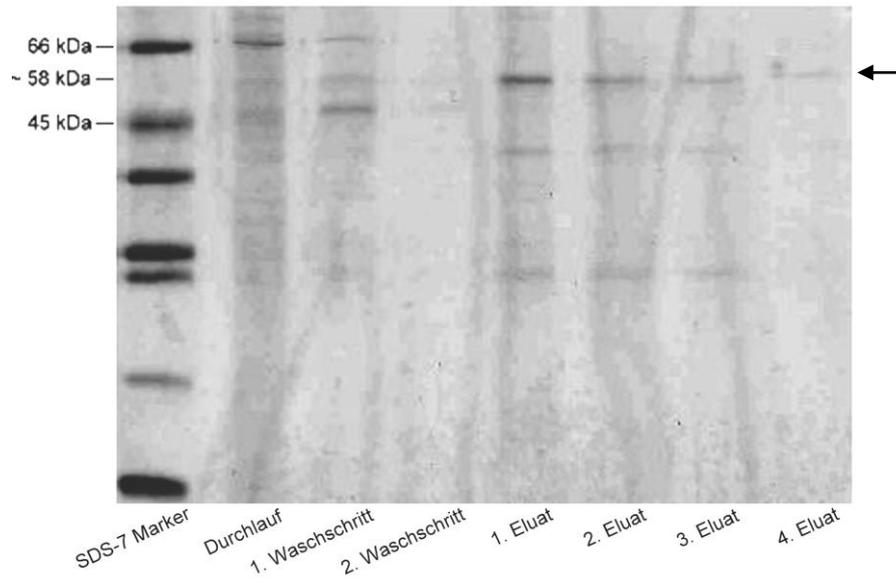


Abb. 38: Expression des rekombinanten Proteins von CYP71AZ1

Das mit His-Tag ligierte Protein wurde solubilisiert und über das IMAC-Verfahren gereinigt. Von jeder Säulenfraktion wurden 5 µg Protein über die SDS-PAGE aufgetrennt und mit 0,25% iger ($\frac{v}{v}$) Coomassie-Lösung angefärbt. In der Größe des berechneten Molekulargewichtes von CYP71AZ1 (58,3 kDa) kann in den Eluat-Fractionen deutlich eine Proteinbande erkannt werden. Als Größenkontrolle diente der SDS-7 Marker (linke Spur).

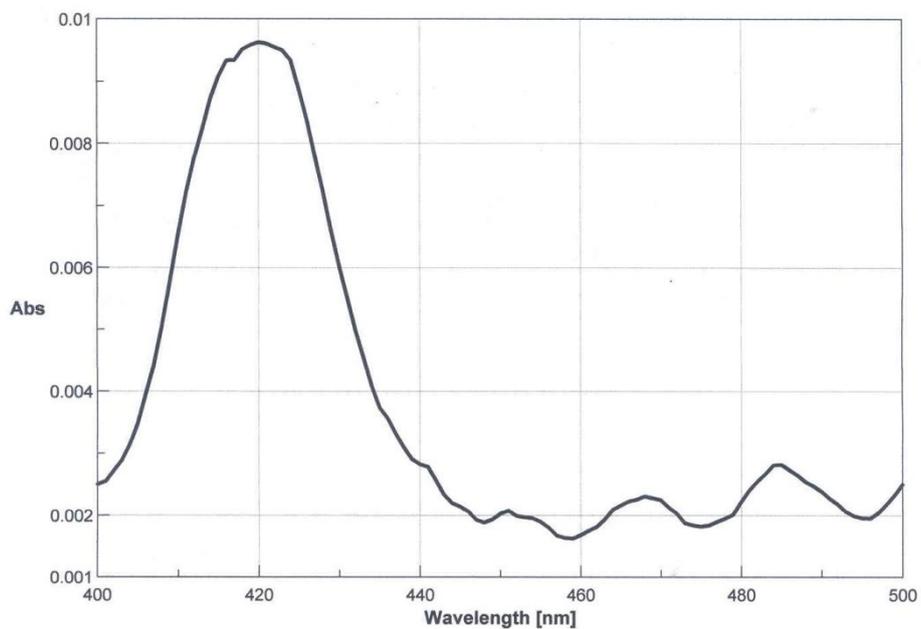


Abb. 39: CO-Differenzspektrum von CYP71AZ1-transformierten Hefemikrosomen

400 µl mikrosomale Fraktion wurden 1:5 mit TEG*-Puffer verdünnt, mit Natriumdithionit reduziert und auf zwei Küvetten verteilt. Nach Aufnahme des Grundspektrums von wurde eine Küvette für 30 s vorsichtig mit Kohlenmonoxid begast und nach etwa 3 min das Differenzspektrum aufgenommen.

Es blieb als weitere Erklärungsmöglichkeit eine zu geringe Aktivität, da der Nachweis nicht mit radioaktiv markiertem Substrat geführt wurde. Deshalb wurden die Substrattests nochmals durchgeführt und während der Inkubationsdauer der Verbrauch des Cyt P450-Cofaktors NADPH gemessen. Es konnte ein Verbrauch beobachtet, allerdings nicht zuverlässig reproduziert werden. Die schwankenden Ergebnisse lassen eher vermuten, dass kein Substratumsatz stattgefunden hat.

Unter der Annahme, dass es sich bei den isolierten Sequenzen um ORFs für mikrosomale Cyt P450s der Klasse II handelt, ist die CPR essentiell für den Elektronentransport und die Enzymaktivität. Deshalb wurde in einem weiteren Enzymtest die Reduktion von Cytochrom c durch die CPR gemessen (Abb. 40). Bei allen Klonen konnte eine aktive endogene Hefe-CPR nachgewiesen werden, was z.B. eine zu schwache oder inaktive Cyt P450-Reduktase als Grund für die Inaktivität des P450-Systems ausschließt. Allerdings lässt dies keine Aussage über die „Zusammenarbeit“ von Cyt P450 und CPR zu. Dieser Aspekt wurde im späteren Verlauf der Arbeit untersucht (C.4.5.2).

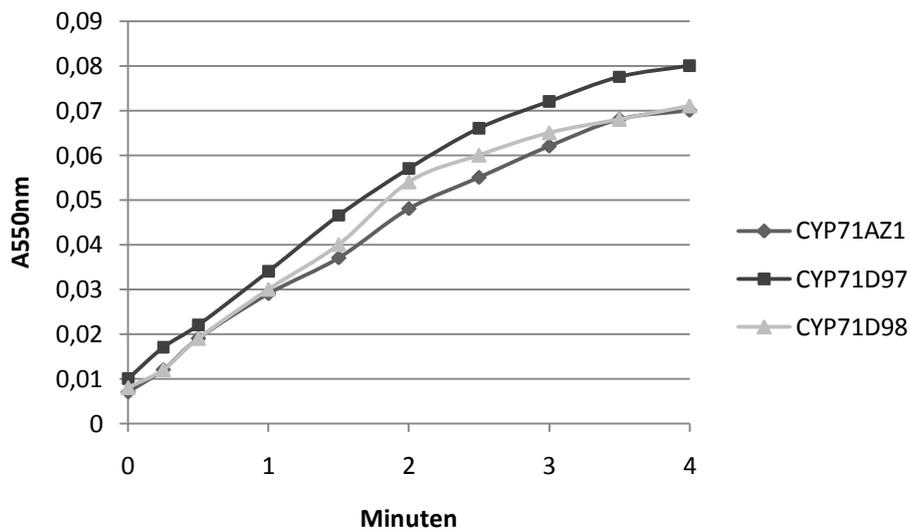


Abb. 40: CPR-Aktivität des INVSc1-Transformanten

Die Messung der CPR-Aktivität als Bestandteil des P450-Systems erfolgte mit je 50 µg Gesamtprotein aus CYP71AZ1-, CYP71D97- bzw. CYP71D98-transformierten INVSc1-Hefezellen. Die durch die CPR katalysierte Reduktion von Cytochrom c zeigt sich in einer Absorptionsänderung, deren lineare Bereich für die Berechnung der spezifischen Enzymaktivität (spezifische $E_{akt.}$) herangezogen wird.

Da es sich bei den neuen Cyt P450s aus *Ammi majus* um eventuell sehr labile Enzyme wie die POS handeln kann, wurden Expression und Aufschluss der Hefe-Transformanten modifiziert, um ein möglichst schonendes Verfahren zu gewährleisten. Zunächst wurde die Induktionszeit der Hefezellen auf vier bis zwölf Stunden verkürzt. Die Zentrifugationsschritte während der

Mikrosomen-Isolierung wurden in Umdrehungszahl und Dauer um 50% reduziert. Zudem erfolgte der Hefe-Aufschluss durch Glasperlen mit einer veränderten Zyklen-Anzahl und – Dauer (5x 1 min Schütteln + 1 min auf Eis) und die Mikrosomen-Fällung mit MgCl₂ (1 h auf Eis) statt unter Rühren mit PEG 4000. Die anschließenden Enzymtests wurden sowohl mit frischen Hefemikrosomen gleich nach deren Isolierung, als auch mit langsam eingefrorenen oder schockgefrorenen Mikrosomen durchgeführt. Eine weitere Ursache für inkorrekte Faltung konnte in der His-Tag-Modifikation des Proteins liegen. Deshalb wurden die 3'-End-Primer mit einem Stopcodon versehen und neue „full-length“-Klone amplifiziert, die keinen His-Tag aus dem Vektor enthielten. Alle Maßnahmen blieben jedoch ohne Auswirkung auf die Enzymaktivität.

Ferner wurde die Expressionsdauer nach Galaktose-Induktion auf ein bis vier Tage verlängert, mit dem Ziel, durch eine erhöhte Konzentration des exprimierten Proteins eine messbare Enzymaktivität zu erlangen. Zusätzlich wurden die Parameter des Enzymtests (Puffersysteme, Substratmenge, Zeitdauer, Temperatur) verändert. Dennoch konnte auch unter diesen Bedingungen kein Substratumsatz gemessen werden.

Im Falle der POS führte erst der Austausch der N-terminalen Ankerregion zu messbarer Aktivität. Obwohl die Ursache für diesen Effekt noch unklar ist, wurde das Verfahren für die neuen Cyt P450s aus *Ammi majus* übernommen. Die N-terminale Sequenz incl. Membran-Anker und der basischen Aminosäuren-Region bis zur prolinreichen Region wurde gegen den N-Terminus der C4H aus *Helianthus tuberosus* (CYP73A1) ausgetauscht (Abb. 41).

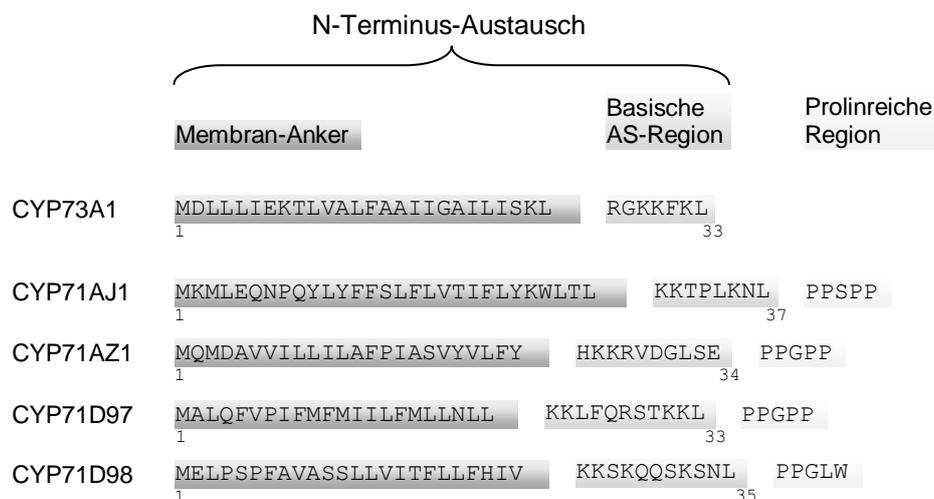


Abb. 41: Austausch der N-Termini von POS, CYP71AZ1, D97 und D98 mit CYP73A1

Membrananker und basische AS-Region (ca. 100 bp) der C4H aus *Helianthus tuberosus* (CYP73A1) dienen zum Austausch der N-Termini von Cyt P450s aus *Ammi majus* (N-Mutanten).

Die PCR-Optimierung mit den „N-catch“-Primern (G.3) ergab eine Anlagerungs-Temperatur von 50°C und eine Mg²⁺-Konzentration von 1 mM. Der Austausch des 5'-Endes erfolgte mit den „N-change“-Primern (G.3) bei 50°C und 2 mM (CYP71AZ1, CYP71D98) bzw. 1 mM Mg²⁺ (CYP71D97).

Biotransformation

Ergänzend zu den *in vitro*-Messungen wurde eine Biotransformation durchgeführt, welche die eventuellen Proteinstabilitäts-Probleme umgehen und anhand von Kontrollen Proteinexpression und Substratumsatz prüfen sollte. Die Kontrollen bestanden aus Galaktose-induzierten transgenen Kulturen ohne Substrat, Glukose-induzierten transgenen Kulturen mit Substrat und nicht transformierten Kulturen mit Substrat.

Die mit Glukose behandelten Kulturen wiesen eine höhere Wachstumsrate auf als die Galaktose-induzierten Hefen, welche die verfügbare Energie für die induzierte Cyt P450-Expression benötigen. Die mit Galaktose induzierten transformierten Hefekulturen setzten 4-Cumarsäure, Psoralen, Bergaptol und Xanthotoxol um, was jedoch auch bei nicht transformierten Kulturen, vermutlich im Rahmen eines Detoxifizierungsmechanismus, beobachtet werden konnte.

C.4.5.2 *Optimierung der heterologen Expression*

Das bisher verwendete Expressionssystem sollte für die weitere Untersuchung der funktionellen Aktivität speziell für Cyt P450s aus der *Ammi majus* Furanocumarinbiosynthese optimiert werden. Es besteht die Möglichkeit, dass die Enzyme aus *Ammi majus* mit der endogenen CPR nicht interagieren bzw. dass die CPR-Aktivität für die transgenen Cyt P450s zu schwach ist. Deshalb wurde der INVSc1-Stamm (Invitrogen, Heidelberg) mit der *Ammi*-CPR (p423ADH/CPR-Konstrukt) transformiert und die transgene Hefe als ‚Cinv‘ bezeichnet. Die Optimierung der Amplifikation der „full-length“-CPR mit Restriktionsschnittstellen-modifizierten Primern (Tab. 10, G.3) ergab eine Mg²⁺-Konzentration von 1,5 mM und eine Anlagerungstemperatur von 65°C. Der Cinv-Stamm besitzt somit die Eigenschaft zur konstitutiven Expression zweier CPRs (*Ammi majus*, *Saccharomyces cerevisiae*). Zum Vergleich wurde WAT11 aufgrund seiner Fähigkeit zur Überexpression der CPR aus *Arabidopsis thaliana* (ATR1) verwendet und der INVSc1-Stamm diente als ‚Nullkontrolle‘. Im folgenden wurde der Einfluss der verschiedenen CPRs auf die Aktivität der ebenfalls transformierten C4H aus *Ammi majus* untersucht.

Als erstes wurde die CPR-Aktivität der transformierten Hefestämme geprüft. Hierbei wies der INVSc1-Stamm die geringste und der WAT11-Stamm die höchste Aktivität auf (Abb. 42), was durch die Anzahl und konstitutive bzw. Überexpression der verschiedenen CPRs erklärbar ist.

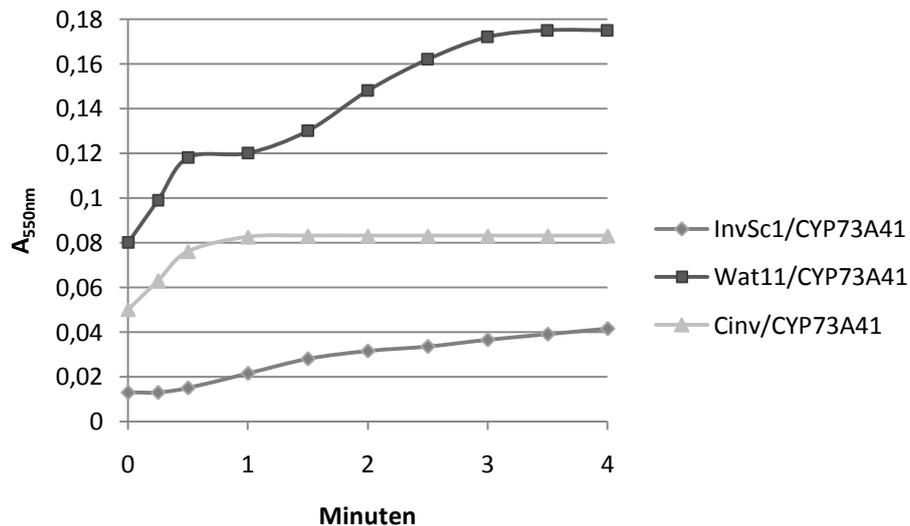


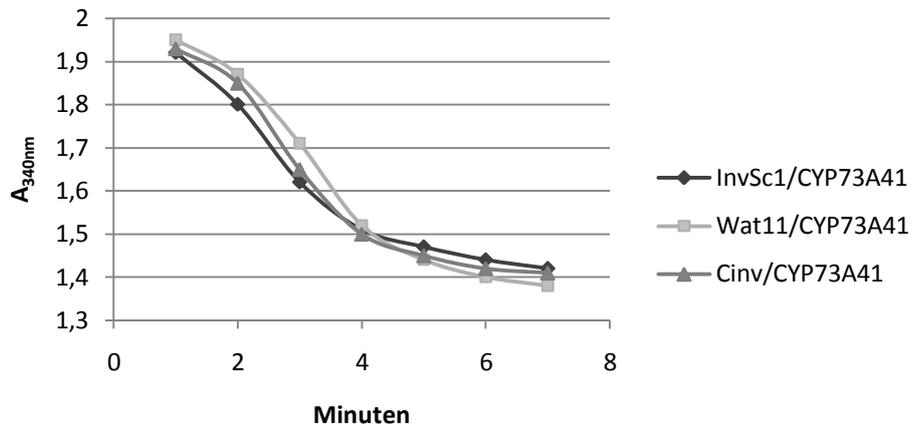
Abb. 42: CPR-Aktivität verschiedener Hefe-Transformanten

Die Messung der CPR-Aktivität erfolgte mit 50 µg Gesamtprotein aus verschiedenen CYP73A41-transformierten Hefestämmen. Die CPR-katalysierte Reduktion von Cytochrom c zeigt sich in einer Absorptionsänderung, deren linearer Bereich für die Berechnung der spezifischen Enzymaktivität (spezifische $E_{akt.}$) herangezogen wird.

Um den Einfluss der CPR bzw. auf die C4H-Aktivität zu untersuchen, wurde mit den isolierten Hefe-Mikrosomen ein NADPH-Verbrauchstest und Substratumsatztest mit radioaktiver Zimtsäure durchgeführt (Abb. 43). Hinsichtlich des NADPH-Verbrauches konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Hefestämmen festgestellt werden. Die Ergebnisse des radioaktiven Tests zeigten für INVSc1 und Cinv einen geringfügig höheren Substratumsatz (~60%) als bei WAT11 (~55%). Dieses Ergebnis konnte in einem Enzymtest mit CYP73A1 (C4H aus *Helianthus tuberosus*) wiederholt werden.

Trotz der deutlich unterschiedlichen CPR-Aktivität konnte kein signifikanter Einfluss auf die C4H-Aktivität festgestellt werden. Zu beachten ist dennoch, dass es sich hierbei um ein C4H-spezifisches Ergebnis handeln kann, welches sich nicht ohne weiteres auf andere Cyt P450 übertragen lässt.

A



B

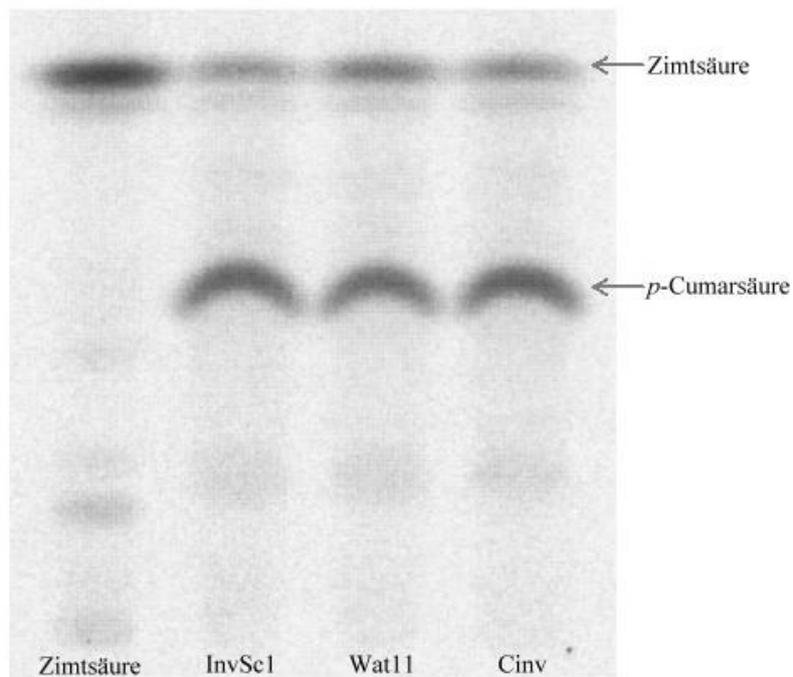


Abb. 43: CYP73A41-Aktivität in Abhängigkeit von verschiedenen CPRs

- A) Aktivitätsnachweis durch NAPH-Verbrauch: Ein Enzymtest mit 30 µg Gesamtprotein aus CYP73A41-transformierten INVSc1-, Wat11- bzw. Cinv-Hefezellen wurde durch Zugabe von NADPH gestartet und die Absorptionsänderung bei 340 nm gemessen.
- B) Aktivitätsnachweis durch Substratumsatz: Der Reaktionsansatz (115 µl) enthielt je 30 µg Gesamtprotein, 10 nmol *trans*-Zimtsäure und 0,5 nmol [U-¹⁴C]-Zimtsäure (1,702 kBq/nmol). Substrat und Produkt wurden mit EtOAc extrahiert, auf DC aufgetrennt und die radioaktiven Signale mittels Bio-Imager FLA-2000 detektiert.

C.5 Furanocumarinbiosynthese in *Ammi majus* Pflanzen

Organ- und entwicklungsspezifische Transkript-Muster von C4H, POS und BOMT wurden mit RT-PCR (Optimierung Tab. 16, C.2) untersucht. Die HPLC-Parameter für die quantitative und qualitative Metaboliten-Detektion sind in Abb. 19 zusammengestellt (vgl. C.1.2).

Die Zuordnung von Furanocumarinen (Abb. 7) erwies sich vor allem während des Blüten- und Samenstadiums als schwierig aufgrund der enormen Vielfalt an Inhaltsstoffen bzw. aufgrund einer zu geringen Inhaltsstoffmenge. Untersucht wurden Wurzeln, Stängel, Blätter, Blüten und Früchte in vier verschiedenen Entwicklungsstadien vom Keimling bis zum Samenstadium. Wurzeln enthielten allgemein nur geringe Mengen an Umbelliferon, Psoralen und Bergapten/ Isopimpinellin mit einem kontinuierlichen Anstieg bis zum Blütenstadium und einer Abnahme im Samenstadium. Stängel und Blätter zeigten eine deutliche Stoffakkumulation mit der höchsten Menge im vegetativen und im Blütenstadium, im Samenstadium nahm die Menge mit vegetationsbedingter Rückbildung der Blätter drastisch ab. Der höchste Gehalt (v.a. Bergapten/Isopimpinellin und Xanthotoxin) war in den generativen Organen zu finden, wobei Früchte etwa dreimal so viel wie Blüten enthielten. Die Transkripte konnten im Gegensatz zur Metabolit-Verteilung vor allem in Wurzeln und Blüten lokalisiert werden, mit einer deutlichen Zunahme während der Entwicklungsphasen.

Umbelliferon und C4H

Umbelliferon konnte in den Wurzeln nicht oder nur in Spuren nachgewiesen werden. Ein Anstieg zeigte sich erst in den oberirdischen Organen des vegetativen Stadiums mit einer deutlichen Akkumulation in den Blättern. Blüten- und Samenstadium lieferten aufgrund mehrfacher Signalüberlagerung keine eindeutigen Ergebnisse (Tab. 22).

Tab. 22: Relative Umbelliferon-Mengen in der Pflanze

Organ	Keimling	Vegetatives Stadium	Blüten-Stadium	Samen-Stadium
Wurzeln	nd	nd	~	~
Blätter	~	++	SÜ	SÜ
Stängel		+	SÜ	SÜ
Blüten			SÜ	
Samen				SÜ

SÜ: Signalüberlagerung, nd: nicht detektierbar, ~: in Spuren detektierbar, +/++: große/sehr große Menge

Die semiquantitative RT-PCR (Abb. 44) die höchsten Transkriptmengen in Wurzeln und Stängel des Blütenstadiums (Abb. 45).

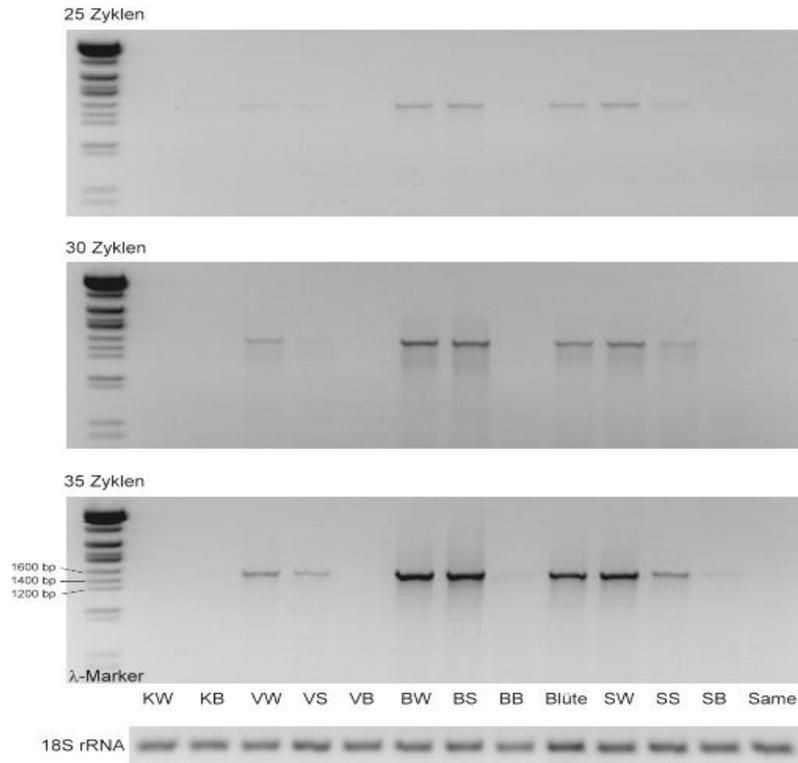


Abb. 44: RT-PCR-Analyse der CYP73A41-Transkription in der Pflanze

Von verschiedenen *Ammi majus* Entwicklungsstadien und Organen wurde Gesamt-RNA extrahiert für die Prüfung der CYP73A41-Transkription mittels semiquantitativer RT-PCR (0,5 µg RNA, C4H-, „end-to-end“-Primer). Die Analyse der Amplikons erfolgte nach 25, 30 und 35 Zyklen, als Ladekontrolle diente 18S rRNA (25 Zyklen) und als Längenkontrolle der cDNA-Fragmente ein DNA-Größenstandard (linke Spur). K = Keimlingsstadium, V = vegetatives Stadium, B = Blütenstadium, S = Samenstadium; W = Wurzel, B = Blätter bzw. Kotyledonen, S = Stängel

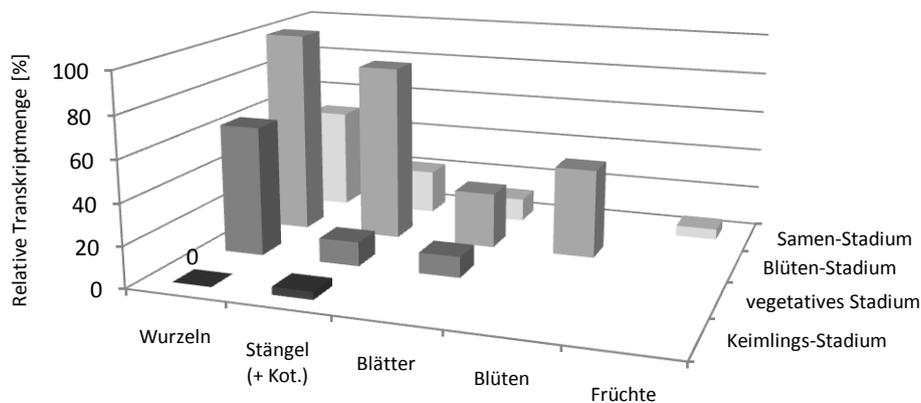


Abb. 45: Relative C4H-Transkriptmengen in der Pflanze

Verschiedene *Ammi majus* Entwicklungsstadien und Organe wurden auf Akkumulation von C4H-Transkripten geprüft. Die relativen Transkriptmengen wurden mittels semiquantitativer RT-PCR untersucht und mit der Software AIDA in Relation zu dem 18S rRNA-Standard ausgewertet.

Psoralen und POS

Psoralen war nur in sehr geringen Spuren vorhanden und wurde meist durch andere Signale verdeckt (Tab. 23). Jedoch fehlte es in dem Keimling, in den Wurzeln des vegetativen sowie in den Stängeln des Blütenstadiums.

Tab. 23: Relative Psoralen-Mengen in der Pflanze

Organ	Keimling	Vegetatives Stadium	Blüten-Stadium	Samen-Stadium
Wurzeln	nd	nd	SÜ	SÜ
Blätter	nd	~	SÜ	SÜ
Stängel		~	nd	SÜ
Blüten			SÜ	
Samen				SÜ

SÜ: Signalüberlagerung, nd: nicht detektierbar, ~: in Spuren detektierbar, +/++: große/sehr große Menge

Die größten POS-Transkriptmengen konnten in Wurzeln und Blüten und hinsichtlich der Entwicklungsphase im Blütenstadium gezeigt werden, wobei das Maximum in den Blüten zu finden war (Abb. 46). Sowohl in den Keimlingswurzeln, als auch in den Früchten wurden keine Transkripte detektiert. In den Wurzeln des vegetativen Stadiums wie auch im Stängel des Samenstadiums konnten Transkripte nur in Spuren festgestellt werden.

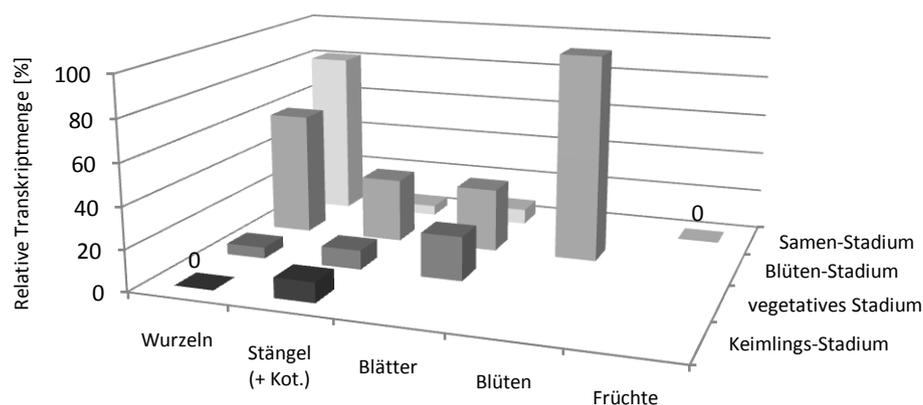


Abb. 46: Relative POS-Transkriptmengen in der Pflanze

Verschiedene *Ammi majus* Entwicklungsstadien und Organe wurden auf Akkumulation von POS-Transkripten geprüft. Die relativen Transkriptmengen wurden mittels semiquantitativer RT-PCR untersucht und mit der Software AIDA in Relation zu dem 18S rRNA-Standard ausgewertet.

Bergapten/Isopimpinellin und BOMT

Bergapten bzw. Isopimpinellin waren sowohl im Keimlings- als auch im vegetativen Stadium nicht detektierbar, wohingegen in Blüten und Blättern des Blütenstadiums und noch mehr in Samen die höchsten relativen Mengen zu finden waren. Die restlichen Analysen wurden durch die zu starke Signalüberlagerung verhindert (Tab. 24).

Tab. 24: Relative Bergapten/Isopimpinellin-Mengen in der Pflanze

Organ	Keimling	Vegetatives Stadium	Blüten-Stadium	Samen-Stadium
Wurzeln	nd	nd	~	~
Blätter	nd	nd	++	SÜ
Stängel		nd	~	SÜ
Blüten			++	
Samen				+++

SÜ: Signalüberlagerung, nd: nicht detektierbar, ~: in Spuren detektierbar, +/++: große/sehr große Menge

Das Transkript akkumulierte vor allem in Wurzeln und Blüten, mit Maximum in den Wurzeln des Samenstadiums (Abb. 47). Hingegen konnten in den Wurzeln des Keimlings keine Transkripte und in seinen oberirdischen Pflanzenteilen wie auch in den Früchten nur Spuren detektiert werden.

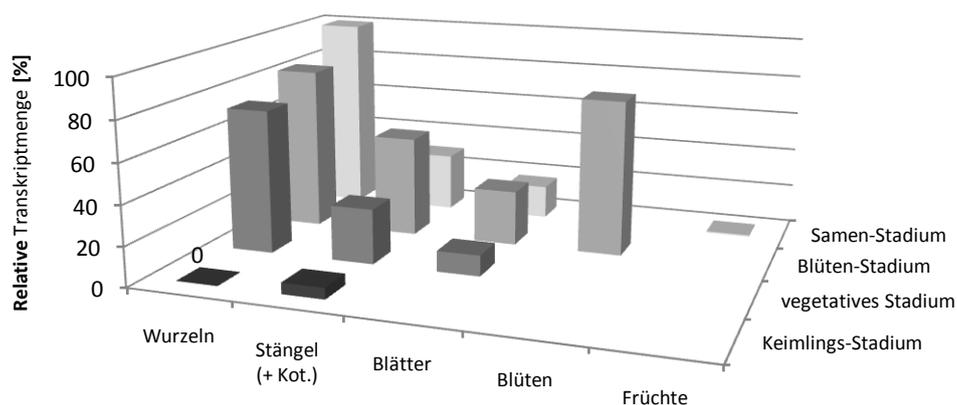


Abb. 47: Relative BOMT-Transkriptmengen in der Pflanze

Verschiedene *Ammi majus* Entwicklungsstadien und Organe wurden auf Akkumulation von BOMT-Transkripten geprüft. Die relativen Transkriptmengen wurden mittels semiquantitativer RT-PCR untersucht und mit der Software AIDA in Relation zu dem 18S rRNA-Standard ausgewertet.

D Diskussion und Ausblick

Induktion der Furanocumarinbiosynthese in *Ammi majus* Suspensionskulturen

Die *in vitro* Untersuchung der Biosynthese über Identifizierung Furanocumarin-spezifischer Transkripte setzt eine kontrollierte Induktion der Furanocumarinbildung und das Fehlen von Furanocumarinen bzw. spezifischen Transkripten in Vergleichskulturen voraus. Dies schränkt die Auswahl an geeigneten Pflanzen erheblich ein. So konnte z.B. für *Psoralea cinerea* bisher noch keine Zellkultur etabliert werden (Bourgaud *et al.*, 1992) oder die Furanocumarin-Produktion erwies sich als labil, wie bei *Pastinaca sativa* (Ekiert & Gomolka, 2000b). *Ruta graveolens* lässt sich gut *in vitro* kultivieren, weist jedoch konstitutiv gebildete Furanocumarine auf, wie die Expression der C6-Prenyltransferase in nicht induzierten Zellkulturen zeigte (Dhillon & Brown, 1976; Matern *et al.*, 1988). Die Prenyltransferasen aus *Ammi majus* konnten hingegen erst nach Induktion der Furanocumarinbiosynthese in dunkel kultivierten Zellsuspensionskulturen beobachtet werden (Hamerski *et al.*, 1990b). Die vorliegende Arbeit wurde daher auf Basis elicitierter und nicht elicierter *Ammi majus* Zellen durchgeführt und zunächst deren Eignung für die differentielle Klonierung von Furanocumarin-spezifischen Transkripten geprüft.

Die Furanocumarine akkumulierten, wie schon bei *Petroselinum crispum* gezeigt (Kombrink & Hahlbrock, 1986), im Gegensatz zu den Zellen in einer hohen Menge in der Nährflüssigkeit, was ihren Nachweis erleichterte. Die selektive Identifizierung von Bergapten als Produkt der BOMT war jedoch mittels DC und HPLC schwierig, weil es nicht eindeutig von Isopimpinellin getrennt werden konnte (Herde, 2005). Blazek & Stary (1965) zeigten für *Ammi majus* polnischer Herkunft, dass Bergapten und Isopimpinellin hinsichtlich Lokalisierung und Menge in der Pflanze sehr eng miteinander korrelieren. Dadurch wäre das Problem eliminiert, da der hier detektierte HPLC-Peak vermutlich Isopimpinellin und Bergapten in etwa gleichen Mengen repräsentiert. Vor der Induktion wurde eine sehr geringe Umbelliferon-Menge nachgewiesen, allerdings konnten keine Transkripte der C4H detektiert werden. Krollicka *et al.* (2001a) und Staniszewska *et al.* (2003) beobachteten ebenfalls das Vorkommen von Umbelliferon neben dem Fehlen linearer Furanocumarine in unbehandelten *Ammi majus*-Zellkulturen. So könnte Umbelliferon als Substrat für andere Verbindungen wie *O*-Prenyl-Umbelliferonen oder als „Vorstufen-Speicher“ für lineare Furanocumarine dienen, was z.B. bei einem Phytopathogen-Angriff zur schnelleren Bildung von Furanocumarin-Phytoalexinen führt. Erst nach spezifischer Elicitierung mit *Pmg* oder MeJa konnte, im

Gegensatz zu Wasser-behandelten Kulturen, eine erhöhte Umbelliferon-Akkumulation bzw. die Bildung weiterer Cumarine anhand ihrer blauen Fluoreszenz unter 312 nm Bestrahlung festgestellt werden. Die ebenfalls spezifisch durch *Pmg* bzw. sehr gering durch MeJa oder Pep-13 induzierte BOMT-Expression im Vergleich zur durch alle verwendeten Elicitoren induzierten Expression der C4H, die verschiedenen Stoffwechselwegen dient, bestätigen die kontrollierte Induktion der Furanocumarinbiosynthese. Nach *Pmg*-Elicitierung zeigten sich zwei C4H-Transkriptmaxima vor und nach dem BOMT-Transkriptmaximum. Das erste Maximum korrelierte mit dem Maximum der Umbelliferon-Akkumulation und zeigt somit vermutlich den Beginn der Furanocumarinbildung an. Da nach dem zweiten C4H-Maximum keine weitere Akkumulation von Umbelliferon, Psoralen und Bergapten, jedoch eine rasche Zunahme an anderen Verbindungen erfolgte (Hamerski *et al.*, 1990a; Hehmann *et al.*, 2004; Specker, 2003), wurden wahrscheinlich noch weitere von C4H ausgehende Stoffwechselwege induziert. Eine ausschließliche Induktion der Furanocumarinbiosynthese war, wie auch andere Studien ergeben haben (z.B. Hagemeier *et al.*, 1999), nicht möglich.

Auf Basis der C4H- und BOMT-Transkript-Akkumulationskurven wurde das Zeitfenster für die Furanocumarin-Bildung auf wenige Stunden nach Elicitierung eingegrenzt. CYP71AJ1, ein bereits isolierter jedoch nicht näher charakterisierter Cyt P450-Klon aus *Ammi majus*, wurde näher untersucht und passte hinsichtlich seines Induktionsprofils genau in diesen Zeitrahmen mit einem Transkriptmaximum nach dem der C4H und vor dem der BOMT. In Kombination mit der spezifischen Induktion durch *Pmg* zeigte sich dieses Cyt P450 vielsprechend für eine Funktion in der Furanocumarinbiosynthese und wurde diesbezüglich geprüft. In Kooperation mit der ENSAIA (France) konnte CYP71AJ1 funktionell als Psoralensynthase (POS) identifiziert werden. Die POS ist das erste Cyt P450 aus der Furanocumarinbiosynthese, welches genetisch und biochemisch charakterisiert worden ist.

Die Dokumentation der kontrollierten Induktion der Furanocumarinakkumulation in Kombination mit den umfassenden differentiellen Transkriptmustern von Furanocumarin-spezifischen Enzymen soll künftig zum Vergleich für die Identifizierung weiterer spezifischer Transkripte verwendet werden.

Isolierung von Furanocumarin-spezifischen Cyt P450-Transkripten

Die Transkript-Untersuchungen der POS grenzten den Zeitpunkt für maximale Akkumulation auf dreieinhalb bis viereinhalb Stunden nach erfolgter Induktion ein. Die BOMT erreichte ihr Transkriptmaximum zwischen der sechsten und achten Stunde. Daher sollten weitere Furanocumarin-spezifische Transkripte etwa drei bis sechs Stunden nach *Pmg*-Zugabe zu

finden sein. Werden späte Reaktionen wie die Synthese von 8-Hydroxybergapten mit einbezogen, erweitert sich der Zeitrahmen bis auf den Zeitpunkt der maximalen Bergapten-Akkumulation bei etwa 16 Stunden. Die Suche nach weiteren Furanocumarin-spezifischen Transkripten in den ersten Stunden nach Induktion reduzierte jedoch das Risiko, Transkripte aus später induzierten Stoffwechselwegen zu isolieren. In der vorliegenden Arbeit beschränkte sich die Suche auf Cyt P450s, da diese an zahlreichen Reaktionsschritten der Furanocumarinbiosynthese beteiligt sind (Bourgaud *et al.*, 2006).

Auf die konventionelle biochemische Reinigung als Isolierungsstrategie wurde verzichtet, da diese für membrangebundene Proteine problematisch ist (Ruppert, 2001). Als molekularbiologische Methode bot sich die differentielle oder subtraktive Hybridisierung von Genbanken an (Vetter *et al.*, 1992), mit deren Hilfe die Gesamtheit aller differentiell transkribierter Cyt P450s isoliert werden kann. Allerdings ist das Screening sehr zeitaufwendig und kostspielig und macht den Einsatz von Radioaktivität notwendig (Reece, 2003). Deshalb wurde zunächst die „Differential Display“-Methode (DD-RT-PCR) modifiziert nach Liang & Pardee (1992) unter Verwendung von Cyt P450-spezifischen kurzen „Decamer“-Primern (Schopfer und Ebel, 1998) bzw. langen degenerierten „CYP-A“- und „CYP-B“-Primern (Akashi *et al.*, 1997) verwendet. Dies führte jedoch zur Bildung multipler Amplikons und zu einem großen Anteil an Falsch-Positiven. Der Grund liegt vermutlich in der geringen Primer-Stringenz und in der verschwindend geringen Transkriptmenge eines spezifisch aktivierten Gens im Vergleich zur mRNA-Gesamtmenge in einer Zelle (Debouck, 1995; Liang & Pardee, 1995; Wan *et al.*, 1996). Zudem lässt sich mit diesen Primern wahrscheinlich nur ein geringer Teil der Cyt P450s isolieren, da sich die Zahl und Variation möglicher Cyt P450-Sequenzen seit Konstruktion dieser Primer enorm erweitert hat (Nelson, 2007).

Um dieses Problem zu lösen, wurde die DD-RT-PCR mit der auf speziellen Primern basierenden ACP-Technologie kombiniert und diese für Cyt P450s modifiziert. Mit Hilfe dieser Technik konnte die Anzahl von differentiellen Banden und Falsch-Positiven deutlich reduziert werden. Eine vollständige Vermeidung von Falsch-Positiven war aufgrund der Degeneration der modifizierten Primer nicht möglich (Liang *et al.*, 1993; Bauer *et al.*, 1993). Zudem sollte, wie schon in einigen Studien bewiesen (Hwang *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2004), die Wahrscheinlichkeit erhöht werden, auch bei geringer Transkriptmenge möglichst alle potentiellen Ziel-Sequenzen zu isolieren. Unter Verwendung der differentiellen ACP-PCR konnten die Transkripte der differentiell exprimierten CYP71D97, CYP71D98 und CYP71AZ1 isoliert werden.

Untersuchungen zur Beteiligung der neuen Cyt P450s an der Furanocumarinbiosynthese

Die neuen Cyt P450s aus *Ammi majus* passten mit ihren *Pmg*-induzierten Transkriptmaxima genau in das durch C4H-, POS- und BOMT-Induktionsmuster charakterisierte Zeitfenster der Furanocumarin-Bildung in Zellsuspensionskulturen. CYP71AZ1 wies zudem, im Gegensatz zu CYP71D97 und CYP71D98, auffällige Übereinstimmungen mit der POS hinsichtlich des Transkriptionsmusters in Abhängigkeit von verschiedenen Elicitoren auf.

Eine zeitliche Korrelation von Transkript- und Produktmaximum ist zu erwarten für transkriptionell regulierte Gene und wurde schon verschiedentlich für pflanzliche Abwehrgene nach Induktion mit pilzlichen Elicitoren beschrieben (Chappell & Hahlbrock, 1984) und in dieser Arbeit für C4H, POS und BOMT dokumentiert. Die Suche nach Metaboliten, welche mit den Transkriptmaxima korrelieren, ist aber schwierig. Eine eindeutige Zuordnung konnte nicht erstellt werden, da viele Metabolite nicht identifizierbar waren bzw. zu viele mögliche Korrelationen denkbar gewesen wären. Frühere Studien mit elicitierten bzw. unter sonstigem Stress stehenden *Ammi majus* Zellkulturen berichteten nur von Furanocumarinen (z.B. Purohit *et al.*, 1995; Ekiert & Gomolka, 2000a), Cumarinen und Cumarin-Derivaten und Umbelliferon-Ethern (z.B. Krolicka *et al.*, 2001a; Staniszewska *et al.*, 2003, Hamerski *et al.*, 1990a). Weiterhin lassen sich in Apiaceae häufig Monoterpene oder Fettsäurederivate wie 3-Butylphthalid oder Ligustilid (Szebeni-Galambosi *et al.*, 1992; Hagemeyer *et al.*, 1999) induzieren, die unter UV-Bestrahlung unauffällig, jedoch in *Ammi majus* noch nicht nachgewiesen sind. Auf der anderen Seite kann eine Beteiligung an bestimmten Stoffwechselwegen ausgeschlossen werden, welche wie z.B. die Sterol-Biosynthese in *Ammi majus* und *Petroselinum crispum* durch Elicitierung von Zellkulturen gehemmt werden (Fulton *et al.*, 1993; Haudenschild & Hartmann, 1995).

Vergleichende Analysen der AS-Sequenz sollten weiteren Aufschluss über die Funktion von CYP71D97, CYP71D98 und CYP71AZ1 geben. Die Klassifizierung einer Sequenz in eine Enzymfamilie mit bekannten Funktionen kann einen Hinweis bezüglich ihrer Funktion liefern. Allerdings sind die katalytischen Aktivitäten der meisten Mitglieder der CYP71-Familie, eine Familie mit hoher Anzahl an Elicitor-induzierten Sequenzen, noch unbekannt (Nelson, 2007). Die bereits funktionell charakterisierten CYP71s wurden als sehr unterschiedliche Hydroxylasen im Sekundärstoffmetabolismus identifiziert. Hierzu gehören z.B. die Menthofuransynthase (Bertea *et al.*, 2001), die Indolin-2-on 3-Hydroxylase (Frey *et al.*, 1997), die Flavonoid 6-Hydroxylase (Latunde-Dada *et al.*, 2001), die Tabersonin 16-Hydroxylase (Schröder *et al.*, 1999) und verschiedene Limonen-Hydroxylasen (Haudenschild

et al., 2000). Aber auch multifunktionale Enzymaktivitäten sind bekannt. So katalysiert die Sesquiterpen-Hydroxylase CYP71AV1 in drei Oxidationsschritten die Synthese von Amorpha-4,11-dien zu Artesiminsäure (Teoh *et al.*, 2006). Im Zusammenhang mit der Furanocumarinbiosynthese ist bislang außer der POS kein CYP71 funktionell charakterisiert worden. Die Polypeptide von CYP71D97 und CYP71D98 weisen innerhalb der CYP71s mit bekannter Funktion die größte Ähnlichkeit zur Amorpha-4,11-dien C-12 Oxidase (49%) und zu den Limonen 3- und 6-Hydroxylasen (44%) auf. In der linearen Furanocumarinbiosynthese gibt es keine Parallele zur Oxidase, aber mehrere Hydroxylierungsschritte. Es ist möglich, dass CYP71Ds eher Reaktionen im Stoffwechsel von Terpenen katalysieren. CYP71AZ1 weist mit mindestens 30% identischen Aminosäuren nur Ähnlichkeiten zu Cyt P450s mit unbekannter Funktion auf. Interessanterweise besitzt nur diese Sequenz zudem eine hohe Ähnlichkeit zu Mitgliedern der CYP83-Familie, welche bislang ausschließlich aus Sequenzen von nicht furanocumarinhaltigen Vertretern der Fabaceae besteht und welche ebenso wie die CYP71-Familie bis heute noch nicht genauer charakterisiert wurde (Schuler *et al.*, 2006). Ähnlichkeiten zwischen Mitgliedern der CYP71 und CYP83 sind jedoch nicht ungewöhnlich. So weist z.B. eine von Nelson (1999) durchgeführte phylogenetische Analyse darauf hin, dass CYP83 einen divergenten Seitenzweig der überaus zahlreichen und heterogenen CYP71-Familie darstellt (Abb. 48).

Wie die katalytische Aktivität ist auch die Gewebespezifität von Mitgliedern der CYP71-Familien und -Unterfamilien sehr heterogen, was in umfangreichen Studien mit über 50 *Arabidopsis thaliana* CYP71-Sequenzen gezeigt werden konnte (Schuler *et al.*, 2006). Werden diese CYP71-Sequenzen dieser Pflanze mit CYP71AZ1 verglichen, so zeigt sich bei den Sequenzen mit über 40% identischen Aminosäureresten als Hauptort der Expression die Wurzel, was kongruent zu den Ergebnissen der Transkriptanalysen der neuen Cyt P450s und der POS aus *Ammi majus* ist (siehe S. 99f.). Leider ist die Funktion dieser Sequenzen aus *Arabidopsis thaliana* noch unbekannt. Eine gemeinsame Lokalisation mit katalytisch bekannten CYPs hätte eventuell Spekulationen zu möglichen Funktionen der isolierten Sequenzen erlaubt!

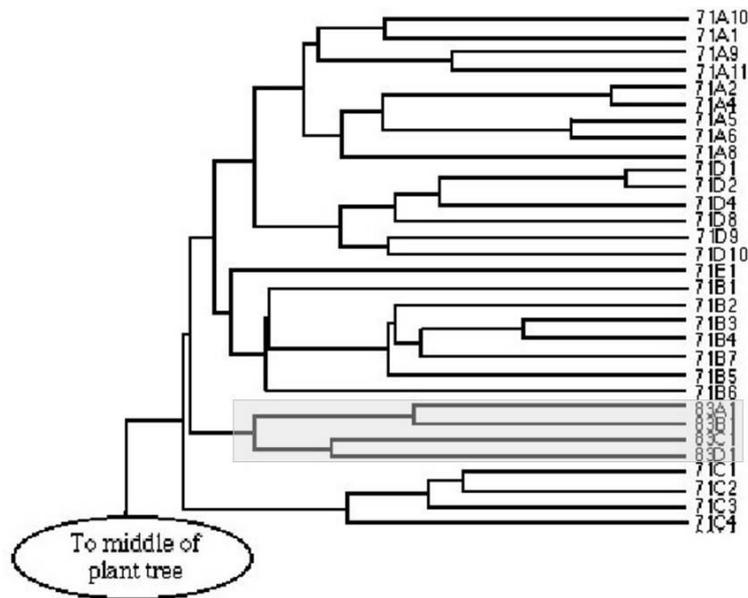


Abb. 48: Phylogenetische Analyse der pflanzlichen Cyt P450 Sequenzen

Innerhalb der CYP71-Familie bildet die CYP83 einen divergenten Seitenzweig (modifiziert nach <http://drnelson.utmem.edu/Plant.tree.html>).

Auffallend bei der Analyse der Exon-Intron-Struktur war die große Ähnlichkeit von CYP71AZ1 und POS. Eine umfassende vergleichende Analyse könnte einen Hinweis auf die katalytische Zuordnung von CYP71AZ1 liefern, da zwischen Enzymen mit ähnlicher oder gleicher Funktion (z.B. Flavonoid 3'-Hydroxylasen) Übereinstimmungen hinsichtlich ihrer Exon-Intron-Struktur existieren (Kellner, 2003; Seitz *et al.*, 2006). Die positive Korrelation zwischen konservierten Intron-Positionen und der Funktion innerhalb eines bestimmten Stoffwechselweges konnte in vielen Studien aufgezeigt werden (z.B. (Rozman *et al.*, 1996; Paquette *et al.*, 2000; Tijet *et al.*, 2001). Dies ist auf die evolutionäre Entwicklung zurückzuführen, da die ‚Weiterentwicklung‘ eines Enzyms unter anderem mit einer Veränderung der Exon-Intron-Struktur eines Gens einhergeht (Werck-Reichhart & Feyereisen, 2000; Paquette *et al.*, 2000).

Auch die Untersuchung der Substraterkennungsregionen (SRS) hat auffallende Übereinstimmungen zwischen POS und CYP71AZ1 gezeigt, in SRS5 mit einem deutlichen Unterschied zu anderen CYP71s. Das postulierte Enzymmodell für die POS (Abb. 49) zeigt, dass dieser Bereich (Tyr359- Pro367) nahe dem katalytischen Zentrum liegt. In dieser Region besitzt die POS an Position 360 ein Phenylalanin, wohingegen die meisten anderen CYP71Ds, wie auch CYP71AZ1, ein Prolin aufweisen. Prolin führt zu einem Bruch in der Helix und hat große Auswirkungen auf die Sekundär-/Tertiärstruktur des Proteins. Diverse

Mutationsversuche in SRS5 von POS, wie die Substitution von Phenylalanin durch Prolin, führten zu einer verminderten oder keiner Aktivität und konnten die Beteiligung dieser Region an der Substraterkennung bzw. -positionierung von Marmesin beweisen (F. Bourgaud, ENSAIA, Frankreich und J. Hans, Philipps-Universität Marburg, persönliche Mitteilung). Auch in CYP71AZ1 kann diese SRS eine ähnliche Bedeutung haben. Interessant in diesem Zusammenhang ist eine Studie mit Limonen-Hydroxylasen, in welcher der Austausch von F363 in I363 die Änderung einer C6- in eine C3-Hydroxylase bewirkt (Schalk & Croteau, 2000). POS und CYP71AZ1 unterscheiden sich an genau dieser Position (F359 bzw. P367), wobei die benachbarten Positionen von gleichen AS-Resten besetzt werden. Dass durch die Substitution einer einzigen Aminosäure innerhalb einer SRS die Spezifität für ein Substrat mit vollkommen anderer Struktur verändert werden kann, konnten schon Ramarao & Kemper (1996) bei CYP2C2 zeigen.

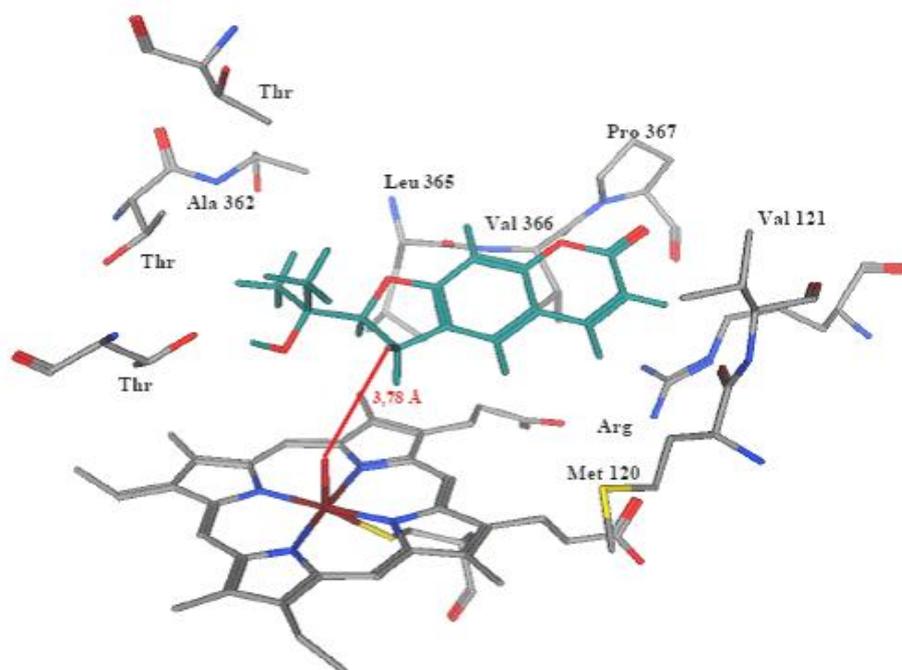


Abb. 49: hypothetisches dreidimensionales POS-Modell

Das hypothetische Docking-Modell für (+)-Marmesin (grün) platziert das C3'-*syn*-Hydrogen mit einem Abstand von 3,78 Å zum reaktiven Eisen-Oxo-Häm des katalytischen Zentrums (grau), Sauerstoffatome sind rot, Stickstoffatome blau und Schwefelatome gelb dargestellt (Larbat, 2007). SRS1 (Arg104-Val121) und SRS5 (Leu358-Glu369) umgeben das Substrat und sind vermutlich an der Substratbindung und -positionierung beteiligt.

Für die weitere Diskussion hinsichtlich der Bedeutung von SRS5 in CYP71AZ1 wurden Cumarin-metabolisierende Cyt P450s in die Vergleiche miteinbezogen. Dabei muss beachtet werden, dass tierische Cyt P450s im Gegensatz zu pflanzlichen in der Regel eine weite

Substratspezifität aufweisen und demzufolge eine ‚flexible‘ Bindungsstelle besitzen. Aufschlussreich war die Beobachtung von am Furanocumarinmetabolismus beteiligten SRSn von CYP6Bs aus Insekten (Chen *et al.*, 2002), wo eine koevolutionäre Entwicklung zwischen der linearen, der angulären Furanocumarinbiosynthese und dem Furanocumarin-Detoxifizierungs-Mechanismus von Insekten besteht (Berenbaum, 2002; vgl. Li, W. *et al.*, 2004). Eine Studie verglich CYP6B8 vom Generalisten *Helicoverpa zea* mit CYP6B1-Varianten vom auf furanocumarinhaltige Pflanzen spezialisierten *Papilio polyxenes* (Li, X. *et al.*, 2004). Tatsächlich zeigt das Xanthotoxin, Psoralen und Isopimpinellin metabolisierende CYP6B1 eine größere Übereinstimmung mit POS und CYP71AZ1 in SRS5 als CYP6B8. Ein weiterer Vergleich zwischen CYP6B1- und CYP6B3-Varianten, welche die Furanocumarine Visnagin und Khellin als Substrate besitzen, zeigt eine identische SRS5-Region (vgl. Baudry *et al.*, 2003; Mao *et al.*, 2007), welche sich nur in einer einzigen die Substratspezifität determinierende Aminosäure unterscheidet:

CYP6B8	365	MYSIVE
CYP6B1v1	365	KYPV AD
CYP6B1v2	365	KYPV AD
CYP6B1v3	365	KYPV AD
CYP6B3v1	365	KYPV GD
CYP6B3v2	365	KYPV GD
CYP6B3v3	365	KYPV GD
CYP71AJ1	358	LYFT AP
CYP71AZ1	365	LYPT GA
(CYP71D97	366	LHPPVP)
(CYP71D98	368	LHAPVP)

Während CYP6B1 an dieser Position (369) ein Alanin besitzt, weist CYP6B3 hier ein Glycin auf (Wen *et al.*, 2006), wobei dieser Unterschied auch zwischen POS (Ala362) und CYP71AZ1 (Gly369) besteht. Es gibt vereinzelt Hinweise auf das Vorkommen von Visnagin und Khellin in *Ammi majus* und in der sehr nahe verwandten *Ammi visnaga* konnten große Mengen detektiert werden (z.B. Chen *et al.*, 1969; Sener *et al.*, 1986). Für die Analyse eventueller Substrate für CYP71AZ1 könnten diese Verbindungen miteinbezogen werden.

Da die gerade beschriebenen Untersuchungen keinen konkreten Hinweis auf die Substratspezifität der neuen Cyt P450s aus *Ammi majus* ergaben, wurden in den enzymatischen Tests zunächst Verbindungen aus der ‚geradlinigen‘ linearen Furanocumarinbiosynthese (Abb. 7) getestet. Die heterologe Expression in Hefe und die

Verwendung der Hefe-Mikrosomen für Substrattests führten bereits zur funktionellen Charakterisierung einiger CYP71-Mitglieder mit bis dato neuartigen katalytischen Aktivitäten wie CYP71D6, eine Flavonoid-6-Hydroxylase (Latunde-Dada *et al.*, 2001), oder CYP71AV1, eine Sesquiterpen-Hydroxylase (Teoh *et al.*, 2006). Allerdings ließ sich unter Verwendung dieses Systems für CYP71AZ1, CYP71D97 und CYP71D98 keine enzymatische Funktion nachweisen. Das kann verschiedene Ursachen haben, da die Enzyme sehr labil bzw. inaktiv sein können oder das Detektionsverfahren bei geringen Umsätzen nicht ausreicht bzw. bei der bekannten engen Substratspezifität von pflanzlichen Cyt P450s nicht das korrekte Substrat eingesetzt wurde. So konnte z.B. die katalytische Aktivität der sehr labilen POS erst nach Veränderung des Membran-Ankers und auch nur mit einem sehr sensitiven Verfahren bei äußerst geringem Substratumsatz nachgewiesen werden (Larbat *et al.*, 2007). Deshalb wurden zunächst die verschiedenen Verfahrensschritte auf Stufe der Transkription, der Translation und hinsichtlich der Aktivität der beteiligten Enzyme des P450-Systems (CPR/Cyt P450) geprüft und modifiziert, um die Expression eines funktionell aktiven Cyt P450 zu gewährleisten.

Sowohl die Kontrolle der Transkription mittels PCR als auch der Translation mittels Isolierung des „His-tagged“ Cyt P450s über Affinitäts-Chromatographie und SDS-PAGE verliefen positiv. Jedoch besteht die Möglichkeit, dass durch Interaktion des His-Tags mit dem Fusionsprotein die funktionell aktive Enzymstruktur verändert wurde. Ein weiteres Problem bei diesem Verfahren kann in der sehr seltenen Isolierung fremder Proteine mit His₆-Motiven und gleichem Molekulargewicht wie die untersuchten Cyt P450s liegen. Dies könnte bedeuten, dass die Cyt P450s entweder nicht exprimiert wurden oder nicht mikrosomal gebunden waren. Zwar wurden die isolierten Cyt P450s über Computeranalysen der Targeting-Sequenz in den Mikrosomen lokalisiert, jedoch gibt es Beobachtungen, welche die Ergebnisse solcher ‚Lokalisierungs-Analysen‘ widerlegen (z.B. Pan *et al.*, 1995, Maucher *et al.*, 2000). Pflanzliche Cyt P450s aus Mitochondrien wurden bisher noch nicht beschrieben, dagegen konnten Chloroplasten-gebundene Cyt P450s unter anderem aus dem Fettsäure-Metabolismus (z.B. CYP74B, Fröhlich *et al.*, 2001) und der Auxin-Biosynthese (z.B. CYP79B2, Hull *et al.*, 2000) identifiziert werden. Auch die Lokalisierung in der Plasmamembran (Kjellbom *et al.*, 1985) oder in der Provakuole (Madyastha *et al.*, 1977) wurde schon beobachtet. Neueste kombinierte Erkenntnisse von Endler *et al.* (2008) und Kai *et al.* (2008) deuten zudem auf eine plastidäre Lokalisierung der Furanocumarin/Cumarin-Biosynthese bis mindestens zum Demethylsuberosin/Scopoletin in *Ruta graveolens* und *Arabidopsis thaliana* hin.

Die CO-Differenzspektroskopie wies auf einen denaturierten Zustand der exprimierten Cyt P450s bzw. auf eine gestörte Häm-Assoziation hin. Dieser Test ist nicht immer zuverlässig und die Enzyme können trotzdem funktionell aktiv sein, wie schon mehrfach beobachtet (Alain Hehn, ENSAIA, Nancy, Frankreich, persönliche Mitteilung). Im Rahmen dieser Arbeit konnte dies durch Kontrolluntersuchungen mit C4H aus *Helianthus tuberosus* (CYP73A1) bestätigt werden. Eine veränderte Struktur oder die unkorrekte Lage des Häm kann zu einer verringerten Aktivität und damit zu einem für das verwendete Detektionsverfahren zu geringem Substratumsatz geführt haben. Eine strukturelle Veränderung kann auch eine erhöhte Labilität des Enzyms zu Folge haben, was die nicht reproduzierbaren Ergebnisse der NADPH-Verbrauchstests erklären könnte.

In verschiedenen Studien konnte beobachtet werden, dass die unterschiedliche „Codon Usage“ von Pflanze und Hefe Probleme in der Genexpression machen kann (z.B. Batard *et al.*, 1997; Perlak *et al.*, 1994; Rouwendal *et al.*, 1997). Je näher die Codons der Hefe-„Usage“ stehen, desto stärker wird es exprimiert (Sharp *et al.*, 1986; Jansen *et al.*, 2003). Umgekehrt nimmt die Labilität eines Transkriptes mit erhöhter Anzahl an seltenen Codons zu (Herrick *et al.*, 1990). Dieses Problem könnte über eine „Codon Adaption“ z.B. durch stille Mutationen gelöst werden.

Obwohl *Saccharomyces cerevisiae* im Vergleich zu Pflanzen Codons mit einem deutlich niedrigeren GC-Gehalt verwendet (Cherry, 2007), stabilisiert offenbar ein hoher GC-Gehalt im Membran-Anker den exprimierten Enzym-Membran-Komplex (Zhang *et al.*, 2002). So konnte die katalytische Aktivität der POS erst nach Austausch des N-Terminus‘ mit 36% GC gegen die entsprechende Sequenz mit 50% GC von CYP73A1 detektiert werden (Larbat *et al.*, 2007). Aus diesem Grund wurde das „N-Swapping“ auch bei CYP71AZ1, CYP71D97 und CYP71D98 durchgeführt, allerdings ohne Erfolg. Eine weitere Auswirkung auf die Stabilität der Cyt P450-Verankerung in der Membran kann in der großen Variabilität pflanzlicher und in der Konserviertheit hefeeigener Membran-Anker liegen (Bargmann, 1998). Dies ist in Anbetracht der zitierten Expression der POS aber weitgehend auszuschließen.

Die Transkriptionsterminations- und Polyadenylierungselemente in Hefe sind nur schwach konserviert und besitzen einen hohen AT-Gehalt (Zhao *et al.*, 1999), wodurch es möglich ist, dass zufällig längere AT-Basenfolgen in den isolierten Cyt P450-Sequenzen falsch erkannt wurden und zu einer entsprechenden Prozessierung der mRNA geführt haben. Diese

Problematik konnte bereits in einigen Studien als Grund für eine erfolglose heterologe Genexpression erkannt werden (z.B. Milek *et al.*, 2000).

Die Aktivität der CPR als Coenzym für die CYP71AZ1-, CYP71D97- und CYP71D98-Transformanten wurde unter Verwendung des Aktivitätsnachweises mit Cyt c geprüft und kann nicht der Grund für die mangelnde Aktivität sein.

Manche Cyt P450s benötigen jedoch anstelle der CPR die Cytochrom b₅/b₅-Reduktase (Schuler *et al.*, 2006), was die aufgrund des CO-Differenzspektrums vermutete labile Faltung der neuen Cyt P450s erklären würde. Der Einfluss der coexprimierten Reduktase auf die korrekte katalytisch aktive Faltung eines Cyt P450s wurde bereits für CYP71A19 und CYP71A20 aus *Arabidopsis thaliana* gezeigt (Duan & Schuler, 2006).

In anderen Fällen reicht die Menge oder das Reduktionspotential der endogenen Hefe-CPR nicht aus für messbare Enzymaktivität des transgenen Cyt P450 oder die CPR ist für eine Interaktion mit dem zu exprimierenden Cyt P450 nicht geeignet (Truan *et al.*, 1993). Für die elektrostatische Interaktion zwischen CPR und Cyt P450 spielen die oberflächennahen basischen (Cyt P450) bzw. sauren (CPR) Aminosäurereste in bestimmten Regionen eine entscheidende Rolle (Nadler & Strobel, 1988; Nikfarjam *et al.*, 2006). Basierend auf einer Interaktionsstudie zwischen dem humanen CYP71α und einer CPR aus Ratte (Nikfarjam *et al.*, 2006) wurden über Sequenzvergleiche die interagierenden Regionen der Cyt P450s aus *Ammi majus* mit der *Ammi*-eigenen CPR sowie mit den in Expressionssystemen verwendeten CPRs aus *Saccharomyces cerevisiae* und *Arabidopsis thaliana* (ATR2) verglichen:

CYP17α	326	KKIQQEEIDHN	346	DRNRLLMLEATIREVLRIRP
CYP73A1	331	KKLRHELDTV	351	DVQKLPYLQAVIKETLRIRM
CYP71AJ1	321	FKLQNEVREI	341	DLVKMNYLQAVMKESMRLYF
CYP71AZ1	328	KKVQEEIRSV	348	DIQNLPYLRAVVKETMRLYP
CYP71D97	329	KKAQDELRNA	349	DIQGLTYLKLVIKETLRLHP
CYP71D98	331	KKVQSEVREV	351	DIQNMSYLKLVVKETLRLHA

CPR Ratte	59	TTAPPVKESSEFVEKEM
CPR <i>A. majus</i>	53	PPKLIVPKVEIEDEV
CPR <i>S.c.</i>	40	ITAVSSGNRDIAQVV
CPR <i>A.t.</i> (ATR2)	57	WANYLRPDIKRGSEFS

CPR Ratte	113	DPEEYDLADLSSLPKIDK-SLVVFCMATYGE	GDPTDNAQDFYDWLQETD	VD
CPR <i>A. majus</i>	109	DLDDYAAEEDDEEYEEKFKKESFAFFFLATYGD	GEPTDNAARFYKWFSE	GEK
CPR <i>S.c.</i>	95	DVENYDFESLNDVPVIVS-----IFISTYGE	GDFPDGAVNFEDFICNAEAG	
CPR <i>A.t.</i> (ATR2)	115	RLKQKGIDAITHKPINSTGQTG--FEPKVNKPVYSSGSARLLNRVASKYAV		

Die interagierenden Aminosäurereste zwischen den Cyt P450s aus *Ammi majus* und CYP17 α sowie, im Gegensatz zu *Ammi*-fremden CPRs, zwischen der *Ammi*-eigenen CPR und der Ratten-CPR, zeigen eine hohe Übereinstimmung. Dies deutet auf die beste Interaktion zwischen den *Ammi*-eigenen Enzymen hin. Zudem gibt es Hinweise auf eine Korrelation der CPR aus *Ammi majus* und der Furanocumarinbiosynthese: *Petroselinum crispum* besitzt zwei CPRs, wobei CPR2 differentiell auf Transkriptionsebene induziert wird (Koopmann & Hahlbrock, 1997) und eine 97%ige Übereinstimmung mit der isolierten CPR AS-Sequenz aus *Ammi majus* (Specker, 2003) aufweist. Da *Petroselinum crispum* ebenfalls Furanocumarine produziert und eng mit *Ammi majus* verwandt ist, besteht die Möglichkeit, dass *Ammi majus* ebenfalls zwei CPRs besitzt und die bekannte CPR, transkriptionell reguliert, mit der Furanocumarinbiosynthese im Zusammenhang steht.

Um diese Theorie zu prüfen, wurden die verschiedenen CPRs in den nachfolgend aufgeführten Hefestämmen hinsichtlich ihres Einflusses auf die Aktivität der C4H aus *Ammi majus* untersucht, mit dem Ziel, ein optimiertes Expressionsverfahren für Cyt P450s aus *Ammi majus* zu entwickeln.

- 1) INVSc1 (*Saccharomyces cerevisiae*) mit endogener CPR
- 2) WAT11 mit überexprimierter ATR2 aus *Arabidopsis thaliana*
- 3) Cinv = INVSc1 mit zusätzlicher CPR aus *Ammi majus*

In Voruntersuchungen mit Mikrosomen zeigte ATR2 das höchste und die endogene Hefe-CPR das niedrigste Reduktionspotential. Hinsichtlich der exprimierten C4H-Aktivität wurden jedoch keine Unterschiede detektiert. Also scheinen die Herkunft, die Anzahl und die Expressionsintensität der CPRs sowie die Position der sauren Aminosäurereste auf der Proteinoberfläche kein limitierender Faktor für die Aktivität des transgenen Cyt P450's zu sein. Unter der Voraussetzung, dass NADPH im Überangebot ist, deutet dies entweder auf einen Überschuss an CPRs im Vergleich zu dem exprimierten Cyt P450 oder auf einen vollständigen Substratumsatz hin. Letzterer kann jedoch ausgeschlossen werden, da bei allen Enzymtests noch Reste des Substrates Zimtsäure detektiert werden konnten.

Furanocumarinbiosynthese in *Ammi majus* Pflanzen

Um weitere Vergleichsdaten für die Untersuchung der neuen Cyt P450-Transkripte hinsichtlich ihrer Beteiligung an der Furanocumarinbiosynthese zu erhalten, wurden die Transkriptanalysen von C4H, POS und BOMT auf die Pflanze erweitert. In Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium und Organ wurde ein Profil erstellt, welches in dieser Komplexität bislang noch nicht existierte und im Zusammenhang mit der Produktakkumulation zudem

erste Hinweise auf den Transport von Cumarinen und Informationen zur Altersabhängigkeit der Biosynthese liefern sollte.

Die relative Furanocumarin-Menge war im Keimling noch sehr gering und stieg, wie bereits von Lohman & McCannaughy (1998) beobachtet, mit der Pflanzenentwicklung kontinuierlich an, was mit dem zunächst erhöhten Energieaufwand für den Primärstoffwechsel der juvenilen Pflanze zu erklären ist. Psoralen war als Zwischenprodukt der Furanocumarinbiosynthese kaum zu detektieren, was die Ergebnisse früherer Studien bestätigt (z.B. Diawara *et al.*, 1995; Hiraoka *et al.*, 2002). Bergapten/Isopimpinellin und andere Furanocumarine wie Xanthotoxin hingegen akkumulierten in der adulten Pflanze in Blättern, Blüten und Samen. Ähnliche Beobachtungen konnten nicht nur in *Ammi majus* (Blažek & Starý, 1965; Ekiert & Gomolka., 2000a und b; Pande *et al.*, 2002; Herde, 2005), sondern auch in weiteren pharmazeutisch oder agrarwirtschaftlich interessanten Pflanzen wie *Pastinaca sativa* (Ekiert & Gomolka, 2000b), *Psoralea spec.* (Innocenti *et al.*, 1997), *Ruta graveolens* (Milesi *et al.*, 2001) oder *Zanthoxylum americanum* (Bafi-Yebova *et al.*, 2005) gemacht werden, wobei sich diese Studien nur auf einzelne Organe oder Entwicklungsstadien beziehen.

Die größte Akkumulation der POS- und BOMT-Transkripte wurde in den Wurzeln detektiert. Entweder werden die Furanocumarine auch in den Wurzeln gebildet und sofort in die oberirdischen Pflanzenteile transportiert oder erst dort durch die aus den Wurzeln verlagerten Enzyme synthetisiert. Im späteren Entwicklungsverlauf kommt es zu einer zusätzlichen Transkript-Akkumulation in der Blüte, was sinnvoll erscheint in Anbetracht hoher Mengen Furanocumarine als allelopathisch wirkende Keimungsinhibitoren in Samen. Allerdings gibt es auch gegenteilige Beobachtungen mit der größten Furanocumarin-Menge in Wurzeln wie bei *Glehnia littoralis* (Hiraoka *et al.*, 2002) oder *Stauranthus perforatus* (Anaya *et al.*, 2005). Vermutlich herrschen im Habitat dieser Pflanzen Bedingungen, welche Furanocumarine in den Wurzeln erforderlich machen.

Die Transkriptmuster von CYP71AZ1, POS und BOMT zeigen wie beim Induktionsprofil große Ähnlichkeiten, während CYP71D97, CYP71D98 und C4H stark davon abweichen. In Kombination mit den bereits beschriebenen Sequenzanalysen und Induktionsstudien verstärkt dies die Vermutung, dass eine Korrelation von CYP71AZ1 mit der Furanocumarinbiosynthese besteht.

Ausblick

Die neuen Cyt P450s aus *Ammi majus* wurden auf Transkript-, cDNA- und gDNA-Ebene charakterisiert, jedoch konnte bis zum Schluss dieser Arbeit ihre funktionelle Aktivität nicht

geklärt werden. Weiterführende Studien sollten sich vor allem auf die funktionelle Charakterisierung von CYP71AZ1 konzentrieren, da die Korrelation mit POS und BOMT vielversprechend ist.

Neben verfahrenstechnischen Modifikationen sollten sich weitere Arbeiten mit der Optimierung der *Saccharomyces cerevisiae*-Kultivierung, z.B. durch erhöhte Stickstoff-Versorgung auf Aminosäurebasis (Moat & Foster, 1995), oder mit der Erhöhung der Cyt P450-Aktivität, z.B. durch Zugabe von Zusatzstoffen wie Häm-Präkursoren (Jiang & Morgan, 2004), beschäftigen. Neben *S. cerevisiae* können auch andere Hefen wie *Yassowaria lypolytica* (Müller *et al.*, 1998) zur Expression geprüft werden. Die Expression in bakteriellen Systemen, wie sie für lösliche Enzyme verwendet werden, ist schnell und effizient, jedoch benötigt sie einen integrierten regenerierbaren Elektronentransfer-Komplex. Vereinzelt konnten mit diesem System bereits Erfolge erzielt werden. So gelang es Haudenschild *et al.* (2000) verschiedene CYP71D Proteine sowohl in *Saccharomyces cerevisiae* als auch in *Escherichia coli* und Hotze *et al.* (1995) die C4H aus *Catharanthus roseus* in *Escherichia coli* zu exprimieren. Da jedoch viele pflanzliche Cyt P450s außerhalb des Membran-Komplexes äußerst instabil sind, ist der Erfolg dieser Methode empirisch zu ermitteln und muss für jedes Enzym individuell getestet werden. Expressionssysteme unter Verwendung von Insektenzellen sind eher verbreitet und konnten bereits vielfach erfolgreich eingesetzt werden. Vor der Suche nach geeigneten Substraten muss in jedem Fall die Sauerstoff-Bindungsaktivität des Cyt P450s nachgewiesen werden. Auf der Basis der hier verwendeten Methode der Kohlenmonoxid-Differenzspektroskopie konnte keine eindeutige Aussage erfolgen. Weitere Erkenntnisse können in Zukunft immunologisch-spektroskopische Methoden liefern, welche zwar aufwendiger sind, aber dafür größere Aussagekraft besitzen (Humphreys & Chapple, 2004).

Es sind nicht alle Verbindungen, welche in den induzierten Suspensionskulturen produziert wurden, identifiziert. Um die Anzahl der möglichen Substrate auf die tatsächlich innerhalb der Versuchsbedingungen vorkommenden Metabolite einzuschränken, können z.B. Extrakte unterschiedlicher Polarität aus dem Medium der *Pmg*-elicitierten und nicht induzierten Zellkulturen hergestellt werden. Die Probenentnahme sollte dabei zu unterschiedlichen Zeitpunkten bis einige Stunden nach dem Transkriptmaximum der isolierten Klone erfolgen und die Extrakte mittels chromatographischer Methoden in Verbindung mit massenspektrometrischer Substanzidentifizierung isoliert und analysiert werden. Substanzen oder Substanzgemische, die nur größerer Menge oder allein in den elicitierten Kulturen vorkommen, können als Substrate und Referenzen für Enzymtests eingesetzt werden.

Weitere Möglichkeiten zur funktionellen Charakterisierung bieten genetische Techniken wie „gene silencing“. Mit dieser Methode wurden schon zahlreiche Cyt P450s identifiziert, wie CYP83B1 (Indol Glucosinolat Synthese, Winkler *et al.*, 1998) oder CYP51G1 (Sterol Synthese, Kim *et al.*, 2005). Die Funktionen von mehr als 350 „full-length“ und partiellen Cyt P450s aus *Arabidopsis thaliana* sowie 80 Cyt P450s aus *Caenorhabditis elegans* sollen künftig mit Hilfe von Knockout-Versuchen identifiziert werden (Nelson, 2007). Bevor solche Analysen bei *Ammi majus* erfolgen können, muss jedoch erst ihre Transformierbarkeit geprüft werden.

Eine Verbesserung im Primer-Design und die Erweiterung von Sequenz-Alignments auf Furanocumarin-metabolisierende bzw. durch Furanocumarine inhibierte Cyt P450s (z.B. CYP3A4, Pain *et al.*, 2005) sollte zu weiteren Furanocumarin-spezifischen Cyt P450-Transkripten führen.

Die Identifizierung weiterer Furanocumarin-spezifischer Gene kann zur Identifizierung der besonderen SRSn führen bzw. zu den Unterschieden im linearen und angulären Weg. Interessant für die Pflanze-Insekt-Interaktion wäre der Vergleich der äquivalenten Gene aus beiden Wegen, da sich vermutlich der anguläre Zweig aus dem linearen Zweig entwickelt hat (Berenbaum & Zangerl, 1998; Berenbaum, 1981 und 2002). Die Reaktionsmechanismen weisen sehr große Ähnlichkeiten auf, wie die Untersuchung der Angelicinsynthese im Vergleich zur POS gezeigt hat (Stanjek & Boland, 1998). Die genetische Analyse könnte im Zusammenhang mit phylogenetischen Untersuchungen Hinweise auf die Gültigkeit dieser Hypothese bieten.

Die Bedeutung linearer und angulärer Furanocumarine in der Landwirtschaft, Lebensmittelindustrie und Humantherapie wird schon seit langem diskutiert und genutzt. Über genetische Manipulation ergäben sich z.B. neue Möglichkeiten für Herbizid-Toleranz und Bioremediation (Siminszky, 2006) oder die Entwicklung von Arzneipflanzen Transformanten (z.B. Tabak, Negrouk *et al.*, 2004) mit erhöhtem Gehalt an pharmazeutisch relevanten Furanocumarinen. Die Produktion von diversen Furanocumarinen als Fungizide, Insektizide, Bakterizide oder Humantherapeutika könnte in mikrobiellen Systemen erfolgen. Eine Studie von Daoubi *et al.* (2004) beschäftigt sich bereits mit der Einsatzmöglichkeit gegen *Botrytis cinerea*. Unerwünscht hingegen ist z.B. die durch Furanocumarine veränderte Bioverfügbarkeit von Arzneistoffen (z.B. Schempp *et al.*, 2002). Durch genauere Kenntnisse der Furanocumarinbildung und -verteilung in der Pflanze könnte der Cumaringehalt durch Anbaumaßnahmen oder gentechnologische Veränderungen reduziert werden.

E Zusammenfassung

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stand die Isolierung und Charakterisierung neuer Cyt P450s aus der Furanocumarinbiosynthese von *Ammi majus*. Der grundsätzliche Biosyntheseweg zu den Furanocumarinen war im Prinzip aus Vorstufen-Experimenten bekannt. Die einzelnen Schritte sind bereits *in vitro* nachgewiesen worden, wobei die meisten Schritte von Cyt P450 katalysiert werden. Molekular charakterisiert waren zu Beginn dieser Arbeit aus *Ammi majus* nur die Zimtsäure 4-Hydroxylase (C4H, Hübner *et al.*, 2003) sowie die Bergaptol *O*-Methyltransferase (BOMT, Hehmann *et al.*, 2004). C4H katalysiert eine „frühe“ Reaktion noch vor dem spezifischen Weg zu Cumarinen und ist an mehreren Stoffwechselwegen beteiligt, das lösliche BOMT ist ein Furanocumarin-spezifisches Enzym im „späten“ Verlauf der Furanocumarinbiosynthese. Die molekulare Charakterisierung eines Furanocumarin-spezifischen Cyt P450 war bislang noch nicht bekannt.

Die differentielle Klonierung aus elicitierten *Ammi majus* Zellen hatte bereits einige, funktionell nicht charakterisierte Cyt P450-Klone, unter anderem CYP71AJ1, geliefert (Specker, 2003). Im Verlauf dieser Arbeit konnte CYP71AJ1 als Psoralensynthase (POS) identifiziert (Larbat *et al.*, 2007) und molekular charakterisiert werden. Die POS ist somit das erste genetisch und biochemisch charakterisierte Cyt P450 aus der Furanocumarinbiosynthese.

Unter mehreren Elicitoren war die stärkste Induktion der Furanocumarinbiosynthese in Zellsuspensionskulturen mit *Pmg* zu beobachten. Das Zeitfenster der Furanocumarin-Bildung lag in den ersten 10 Stunden, danach wurden verstärkt weitere Stoffwechselwege induziert, wie das Transkriptmuster der C4H vermuten lässt. In der Pflanze konnte die Induktion spezifischer Transkripte v.a. in den Wurzeln und Blüten lokalisiert werden, während die Furanocumarine tendenziell in den Blättern, sowie im späteren Entwicklungsverlauf in den generativen Organen akkumulierten. Die zusätzliche Transkript-Akkumulation in den Blüten verdeutlicht die Bedeutung der Furanocumarine als Phytoalexine und als allelopathische Keimungsinhibitoren für den Fortbestand der Pflanze. Das zeitliche Muster, die Abhängigkeit von unterschiedlichen Elicitoren und die Gewebespezifität können hilfreich sein bei der Suche nach weiteren Cumarin-spezifischen Cyt P450s.

Drei neue Cyt P450-Transkripte und gDNAs (CYP71AZ1, CYP71D97, CYP71D98) wurden isoliert und charakterisiert, unter denen die Substraterkennungsregionen und das Induktionsmuster von CYP71AZ1 eine Beteiligung an der Furanocumarinbiosynthese vermuten lassen. Allerdings konnte die funktionelle Expression bisher nicht erreicht werden.

F Literaturverzeichnis

- ABDEL-HAY, F., ABU-MUSTAFA, E. & FAYEZ, M. (1966). Isolation of isopimpinellin from the fruits of *Ammi majus* L. *Naturwissenschaften* **53**, S. 406.
- ABU-MUSTAFA, E. & FAYEZ, M. (1961). Natural coumarins. I. Marmesin and Marmesinin, further products from the fruits of *Ammi majus* L. *J. Org. Chem.* **26**, S. 161.
- ABU-MUSTAFA, E., EL-BAY, F. & FAYEZ, M. (1968). *Rec. Trav. Chim.* **87**, S. 925.
- ABU-MUSTAFA, E., EL-BAY, F. & FAYEZ, M. (1971a). Natural coumarins. XII. Umbelliprenin, a constituent of *Ammi majus* L. *J. Pharm. Sci.* **60** (5), S. 788-789.
- ABU-MUSTAFA, E., EL-BAY, F. & FAYEZ, M. (1971b). The structure of Majurin, a new constituent of *Ammi majus* L. fruits. *Tetrahedron Letters* **20**, S. 1657-1658.
- ABU-MUSTAFA, E., FAYEZ, M. & EL-BAY, F. (1975). Alloimperatorin from *Ammi majus* fruits. Natural COUMARINS, part XX. *Die Naturwissenschaften* **62** (1), S. 40.
- AFEK, U., ORENSTEIN, J. & AHARONI, N. (2002). The involvement of marmesin and its interaction with GA 3 and psoralens in parsley decay resistance. *Can. J. Plant Pathol.* **24**, S. 61-64.
- AKASHI, T., AOKI, T., TAKAHASHI, T., KAMEYA, N., NAKAMURA, I. & AYABE, S. I. (1997). Cloning of cytochrome P450 cDNAs from cultured *Glycyrrhiza echinata* L. cells and their transcriptional activation by elicitor-treatment. *Plant Sci.* **126**, S. 39-47.
- ANAYA, A., MACIA-RUBALCAVA, M., CRUZ-ORTEGA, R., GARCIA-SANTANA, C., SANCHEZ-MONTEERRUBIO, P., HERNANDEZ-BAUTISTA, B., *et al.* (2005). Allelochemicals from *Stauranthus perforatus*, a Rutaceae tree of the Yucatan Peninsula, Mexico. *Phytochem.* **66**, S. 487-494.
- BAFI-YEBOA, N., ARNASON, J., BAKER, J. & SMITH, M. (2005). Antifungal constituents of Northern prickly ash, *Zanthoxylum americanum* Mill. *Phytomed.* **12**, S. 370-377.
- BARGMANN, C. (1998). Neurobiology of the *Caenorhabditis elegans* genome. *Science* **282**, S. 2028-2033.
- BASKIN, J., LUDLOW, C., HARRIS, T. & WOLF, T. (1967). Psoralen, an inhibitor in the seeds of *Psoralea subcaulis* (Leguminosae). *Phytochem.* **6**, S. 1209-1213.
- BATARD, Y., SCHALK, M., PIERREL, M.-A., ZIMMERLIN, A., DURST, F. & WERCK-REICHHART, D. (1997). Regulation of the cinnamate 4-hydroxylase (CYP73A1) in jerusalem artichoke tubers in response to wounding and chemicals treatments. *Plant Physiol.* **113**, S. 951-959.
- BAUDRY, J., LI, W., PAN, L., BERENBAUM, M. & SCHULER, M. (2003). Molecular docking of substrates and inhibitors in the catalytic site of CYP6B1, an insect cytochrome P450 monooxygenase. *Protein Eng.* **16** (8), S. 577-587.

- BAUER, D., MÜLLER, H., REICH, J., RIEDEL, H., AHRENKIEL, V., WARTHOF, P., *et al.* (1993). Identification of differentially expressed mRNA species by an improved display technique (DD-RT-PCR). *Nucleic Acid Research* **21**, S. 4272-4280.
- BEHL, P. (1955). Leucoderma and its treatment with *Ammi majus*. *J. Indian Med. Assoc.* **24** (16), S. 615-618.
- BEIER, R. & NIGG, H. (1992). Natural toxicants in food. In H. N. Nigg (Hrsg.), *Phytochemical Resources for Medicine and Agriculture* (S. 247-367). New York: Plenum Press.
- BEIER, R. & OERTLI, E. (1983). Psoralen and other linear furcoumarins as phytoalexins in celery. *Phytochem.* **22**, S. 2595-1597.
- BERENBAUM, M. (1981). Patterns of furanocoumarin distribution and insect herbivory in the umbelliferae: Plant chemistry and community structure. *Ecology* **62**, S. 1254-1266.
- BERENBAUM, M. (2002). Postgenomic chemical ecology: from genetic code to ecological interactions. *J. Chem. Ecol.* **28**, S. 873-896.
- BERENBAUM, M. & ZANGERL, A. (1993). Furanocoumarin metabolism in *Papilio polyxenes* - Biochemistry, genetic variability and ecological significance. *Oecologia* **95**, S. 370-375.
- BERENBAUM, M. & ZANGERL, A. (1998). Chemical phenotype matching between a plant and its insect herbivore. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, S. 13743-13748.
- BERKLEY, S., HIGHTOWER, A., BEIER, R., FLEMING, D., BROKOPP, C., IVIE, G., *et al.* (1986). Dermatitis in grocery workers associated with high natural concentrations of furanocoumarins in celery. *Ann. Intern. Med.* **105**, S. 351-355.
- BERTEA, C., SCHALK, M., KARP, F., MAFFEI, M. & CROTEAU, R. (2001). Demonstration that menthofuran synthase of mint is a cytochrome P450 monooxygenase: cloning, functional expression, and characterization of the responsible gene. *Arch. Biochem. Biophys.* **390**, S. 279-286.
- BETHEA, D., FULLMER, B., SYED, S., SELTZER, G., TIANO, J., RISCHKO, C., *et al.* (1999). Psoralen photobiology and photochemotherapy: 50 years of science and medicine. *J. Dermatol. Sci.* **19**, S. 78-88.
- BLAZEK, Z. & STARY, F. (1965). Qualitative und quantitative Veränderungen der Furanocoumarinergehalte bei *Ammi majus* L. im Laufe der Vegetation. *Mitt. Dtsch. Pharm. Ges. Pharm. Ges. DDR* **7**, S. 117-127.
- BOHLMANN, J., GIBRALTARSKAYA, E. & EILERT, U. (1995). Elicitor induction of furanocoumarin biosynthetic pathway in cell cultures of *Ruta graveolens*. *Plant Cell, Tissue & Organ Cult.* **43**, S. 155-161.
- BOURGAUD, F., ALLARD, N., GUCKERT, A. & FORLOT, P. (1989). Natural sources for furocoumarins. In T. Fitzpatrick, P. Forlot, M. Pathak & F. Urbach, *Psoralens, past, present and future of Phytochemoprotection and other biological activities* (S. 301-306). Paris: J. Libbey Eurotext.

- BOURGAUD, F., BRUNEL, M., GUCKERT, A. & FORLOT, P. (1992). Effect of nitrogen nutrition and environmental conditions on the production of pharmaceutically useful metabolites by *Psoralea cinerea*. *Aur. J. Agron.* **1** (1), S. 37-43.
- BOURGAUD, F., HEHN, A., LARBAT, R., DOERPER, S., GONTIER, E., KELLNER, S., *et al.* (2006). Biosynthesis of coumarins in plants: a major pathway still to be unravelled for cytochrome P450 enzymes. *Phytochem. Rev.* **5**, S. 293-308.
- BRADFORD, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of proteindye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, S. 248-254.
- BROWN, S. & STECK, W. (1973). 7-Demethylsuberosin and Osthenoil as intermediates in furanocoumarin-biosynthesis. *Phytochem.* **12**, S. 1315-1324.
- CASSIER, C., CHANET, R. & MOUSTACCHI, E. (1984). Mutagenic and recombinagenic effects of DNA cross-links induced in yeast by 8-methoxypsoralen photoaddition. *Photochem. Photobiol.* **39**, S. 799-803.
- CHAPPELL, J. & HAHLBROCK, K. (1984). Transcription of plant defense genes in response to UV light or fungal elicitor. *Nature* **311**, S. 76-78.
- CHAPPLE, C. (1998). Molecular-Genetic Analysis Of Plant Cytochrome P450-Dependent Monooxygenases. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**, S. 311-343.
- CHEN, J., BERENBAUM, M. & SCHULER, M. (2002). Amino acids in SRS1 and SRS6 are critical for furanocoumarin metabolism by CYP6B1v1, a cytochrome P450 monooxygenase. *Insect Mol. Biol.* **11**, S. 175-186.
- CHEN, M., STOHS, S. & STABA, E. (1969). The biosynthesis of visnagin from 2-14-acetate by *Ammi visnaga* suspension cultures and the metabolism of ¹⁴C-visnagin and ¹⁴C-khellin by *A. visnaga* and *A. majus*. *Lloydia* **32** (3), S. 339-346.
- CERRY, J. (2007). *Saccharomyces cerevisiae* codon usage table. Von <ftp://genome-ftp.stanford.edu/pub/codon/ysc.g63.cod> abgerufen.
- CHIMICHI, S., BOCCALINI, M., COSIMELLI, B., VIOLA, G., VEDALDI, D. & DALL'ACQUA, F. (2002). A convenient synthesis of psoralens. *Tetrahedron* **58**, S. 4859-4863.
- CIMINO, G., GAMPER, H., ISSACS, S. & HEARST, J. (1985). Psoralens as photoactive probes of nucleic acid structure and function: Organic chemistry, photochemistry and biochemistry. *Annu. Rev. Biochem.* **54**, S. 1151-1193
- CONN, E. (1984). Compartmentation of secondary compounds. In: Boudet, A., Alibert, G., Lea, P. (Herausgeber), *Membranes and compartmentation in the regulation of plant function*. Oxford University Press, Oxford, S. 1-28.
- DALL'ACQUA, F., VEDALDI, D. & RECHER, M. (1978). The photoreaction between furanocoumarins and various DNA with different base compositions. *Photochem. Photobiol.* **27**, S. 33-36.

- DAOUBI, M., DURAN-PATRON, R., HMAMOUCI, M., HERNANDEZ-GALAN, R., BENHARREF, A. & COLLADO, I. (2004). Screening study for potential lead compounds for natural product-based fungicides. *Pest Manag. Sci.* **60**, S. 927-932.
- DEBOUCK, C. (1995). Differential display or differential dismay? *Curr. Opin. Biotechnol.* **6**, S. 597-599.
- DEGTYARENKO, K. (1995). Structural domains of P450-containing monooxygenase systems. *Protein Eng.* **8**, S. 737-747.
- DELLAPORTA, S., WOOD, J., & HICKS, J. (1983). A plant DNA miniprep: version II. *Plant Molecular Biology Reports* **1**, S. 19-21.
- DHILLON, D. & BROWN, A. (1976). Localization, purification, and characterization of Dimethylallylpyrophosphate:Umbelliferon Dimethylallyltransferase from *Ruta graveolens*. *Arch. Biochem. Biophys.* **177**, S. 74-83.
- DIAWARA, M., TRUMBLE, J., QUIROS, C. & HANSEN, R. (1995). Implications of Distribution of Linear Furanocoumarins within Celery. *J. Agric. Food Chem.* **43**, S. 723-727.
- DIESPERGER, H., MÜLLER, C. R., & SANDERMANN, J. (1974). Rapid isolation of a plant microsomal fraction by MG2+-precipitation. *FEBS Letters* **43**, S. 155-158.
- DONALDSON, R. & LUSTER, G. (1991). Multiple forms of plant cytochromes P-450. *Plant Physiol.* **96**, S. 669-674.
- DUAN, H. & SCHULER, M. (2006). Heterologous expression and strategies for encapsulation of membrane-localized plant P450s. *Phytochem. Rev.* **5**, S. 507-523.
- DURST, F. & NELSON, D. R. (1995). Diversity and evolution of plant P450s and P450 reductases. *Drug Metab. Drug Interact.* **12**, S. 189-206.
- EILERT, U. (1989). Elicitor induction of secondary metabolism in dedifferentiated in vitro system of *Ruta graveolens*. In W. G. Kurz (Hrsg.), *Primary and secondary metabolism of plant cell cultures* (S. 219-228). Berlin: Springer.
- EKIERT, H. & GOMÓLKA, E. (2000a). Coumarin compound in *Ammi majus* L. callus cultures. *Pharmazie*, **55** (9), S. 684-687.
- EKIERT, H. & GOMÓLKA, E. (2000b). Furanocoumarins in *Pastinaca sativa* L. in vitro culture. *Pharmazie* **55** (8), S. 618-620.
- ELGAMAL, M., SHALABY, N., DUDDECK, H. & HIEGEMANN, M. (1993). Coumarins and coumarin glycosids from the fruits of *Ammi majus*. *Phytochem.* **34**, S. 819-823.
- EMBL (European Molecular Biology Laboratory). (2004). Von <http://www.ebi.ac.uk/embl/> abgerufen.
- ENDLER, A., MARTENS, S., WELLMANN, F., MATERN, U. (2008). Unusually divergent 4-coumarate:CoA-ligases from *Ruta graveolens* L. *Plant Mol. Biol.* **67**, S. 335-346.
- FABIAN, P. & DEGTYARENKO, K. N. (1996). The directory of P450-containing Systems in 1996. *Nucleic Acids Res.* **25**, S. 274-277.

- FAHMY, I. R. & ABUSHADY, H. (1948). Isolation of properties of ammoidin, ammidin and majudin, and their effect in treatment of leukodermia. *Q. J. Pharm. Pharmacol.* **21**, S. 499-503.
- FAHMY, I., ABUSHADY, H., SCHÖNBERG, A. & SINA, A. (1947). A crystalline principle from *Ammi majus* L. *Nature* **160**, S. 468-469.
- FREAR, D. S., SWANSON, H. R. & TANAKA, F. S. (1969). N-Demethylation of substituted 3-(phenyl) 1-methyl-ureas: isolation and characterization of a microsomal mixed function oxidase from cotton. *Phytochem.* **8**, S. 2157-2169.
- FREY, M., CHOMET, P., GLAWISCHNIG, G., STETTNER, C., GRUN, S., WINKLMAIR, A. (1997). Analysis of chemical plant defense mechanism in grasses. *Science* **277**, S. 696-699.
- FRÖHLICH, J., ITOH, A. & HOWE, G. (2001). Tomato Allene Oxide Synthase and Fatty Acid Hydroperoxide Lyase, Two Cytochrome P450s Involved in Oxylipin Metabolism, Are Targeted to Different Membranes of Chloroplast Envelope. *Plant Physiol.* **125**, S. 306-317.
- FUCHS, L. (2001). *The New Herbal Of 1543*. Köln: Taschen GmbH.
- FULTON, D., KROON, P., MATERN, U., THRELFALL, D. & WHITEHEAD, J. (1993). Inhibition of Phytosterol Biosynthesis in elicitor-treated cultures of *Ammi majus*. *Phytochem.* **34** (1), S. 139-145.
- GAMBORG, O. L., MILLER, R. A., & OJIMA, K. (1967). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* **50**, S. 151-158.
- GARCIA, C., MOYNA, P., FERNANDEZ, G. & HEINZEN, H. (2002). Alleopathic activity of *Ammi majus* L. fruit waxes. *Chemoecology* **12**, S. 107-111.
- GARFINKEL, D. (1958). Studies on pig liver microsomes. I. Enzymic und pigment composition of different microsomal fractions. *Arch. Biochem. Biophys.* **77**, S. 493-509.
- GIULIANO, G., BARTLEY, G. & SCOLNIK, P. (1993). Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato development. *The Plant Cell* **5**, S. 379-387.
- Giftpflanzen.* (2007). Von <http://www.giftpflanzen.com> abgerufen.
- GOOSEN, T., CILLIE, D., BAILEY, D., YU, C., HE, K. & *et al.*, (2004). Bergamottin contribution to the grapefruit juice-felodipine interaction and disposition in humans. *Clinical Pharmacology & therapeutics* **76** (6), S. 607-617.
- GUO, L.-Q., TANIGUCHI, M., CHEN, Q.-Y., BABA, K., YAMAZOE, Y. (2001). Inhibitory potential of herbal medicines on human cytochrome P450-mediated oxidation: properties of Umbelliferous or Citrus crude drugs and their relative prescriptions. *Jpn. J. Pharmacol.* **85**, S. 399-408.
- GRAVOT, A., LARBAT, R., HEHN, A., LIEVRE, K., GONTIER, E., GOERGEN, J., *et al.* (2004). Cinnamic acid 4-hydroxylase mechanism-based inactivation by psoralen derivatives: cloning and characterization of a C4H from a psoralen producing plant - *Ruta graveolens*-exhibiting a low sensivity to psoralen inactivation. *Arch. Biochem. Biophys.* **422**, S. 71-80.

- HAGEMEIER, J., BATZ, O., SCHMIDT, J., WRAY, V., HAHLBROCK, K. & STRACK, D. (1999). Accumulation of phtalides in elicitor-treated cell suspension cultures of *Petroselinum crispum*. *Phytochem.* **51**, pp. 629-635.
- HAMERSKI, D. (1989). *Ammi majus* L. Zellsuspensionskulturen al Modellsystem zum Studium der Cumarin-Biosynthese. Dissertation, Universität Freiburg.
- HAMERSKI, D. & MATERN, U. (1988). Elicitor-induced biosynthesis of psoralens in *Ammi majus* L. suspension cultures. *Eur. J. Biochem.* **171**, S. 369-375.
- HAMERSKI, D., BEIER, R. C., KNEUSEL, R. E., MATERN, U. & HIMMELSPACH, K. (1990a). Accumulation of coumarins in elicitor-treated cell suspension cultures of *Ammi majus*. *Phytochem.* **29**, S. 1137-1142.
- HAMERSKI, D., SCHMITT, D. & MATERN, U. (1990b). Induction of two prenyltransferases for the accumulation of coumarin phytoalexins in elicitor-treated *Ammi majus* cell suspension cultures. *Phytochem.* **29** (4), S. 1131-1135.
- HANI, M., ELGAMAL, A., NAGWA, M., SHALABY, M., DUDDECK, H. & HIEGEMANN, M. (1993). Coumarins and coumarin glycosides from the fruits of *Ammi majus*. *Phytochem.* **34**, S. 819-23.
- HASEMANN, C., KURUMBAIL, R., BODDUPALLI, S., PETERSON, J. & DEISENHOFER, J. (1995). Structure and function of cytochromes P450: a comparativ analysis of three crystal structures. *Structure* **2**, S. 41-62.
- HAUDENSCHILD, C. & HARTMANN, M. (1995). Inhibition of sterol biosynthesis during elicitor-induced accumulation of furanocoumarins in parsley cell suspension cultures. *Phytochem.* **40** (4), S. 1117-1124.
- HAUDENSCHILD, C., SCHALK, M., KARP, F. & CROTEAU, R. (2000). Functional expression of regiospecific cytochrome P450 limonene hydroxylases from mint in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cervisiae*. *Arch. Biochem. Biophys.* **379**, S. 127-136.
- HEGNAUER, R. (1973). *Chemotaxonomie der Pflanzen* (Bd. 6). Basel und Stuttgart: Birkhäuser Verlag.
- HEHMANN, M., LUKACIN, R., EKIERT, H. & MATERN, U. (2004). Furanocoumarin biosynthesis in *Ammi majus* L. Cloning of bergaptol O-methyltransferase. *Eur. J. Biochem.* **271** (5), S. 932-940.
- HERDE, A. (2005). *Untersuchung der Cumarinmuster in Früchten ausgewählter Apiaceae*. Hamburg.
- HERRICK, D., PARKER, R. & JACOBSON, A. (1990). Identification and comparison of stable and unstable mRNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* **10**, S. 2269-2284.
- HIRAOKA, N., CHANG, J.-I., BOHM, L. & BOHM, B. (2002). Furanocoumarin and polyacetylenic compound composition of wild *Glehnia littoralis* in North America. *Biochem. System. Ecol.* **30**, S. 321-325.

- HOFMANN, C. S., & WINSTON, F. (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* **57**, S. 267-272.
- HOPPE, A. (1978). *Drogenkunde*. Berlin, New York: Walter de Gruyter.
- HOTZE, M., SCHRÖDER, G. & SCHÖDER, J. (1995). Cinnamate 4-hydroxylase from *Catharanthus roseus*, and a strategy for the functional expression of plant cytochrome P450 proteins as translational fusions with P450 reductases in *Escherichia coli*. *FEBS Letters* **374**, S. 345-350.
- HÜBNER, S., HEHMANN, M., SCHREINER, S., MARTENS, S., LUKACIN, R. & MATERN, U. (2003). Functional expression of cinnamate 4-hydroxylase from *Ammi majus* L. *Phytochem.* **64** (2), S. 445-452
- HULL, A., VIJ, R. & CELENZA, J. (2000). Arabidopsis cytochrome P450s that catalyze the first step of tryptophan-dependent indole-3-acetic acid biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, S. 2379-2384.
- HUMPHREYS, J. & CHAPPLE, C. (2004). Immunodetection and quantification of cytochromes P450 using epitope tagging: immunological spectroscopic and kinetic analysis of cinnamate 4-hydroxylase. *J. Immunol. Meth.* **292**, S. 97-107.
- HWANG, I.-T., KIM, Y.-J., KIM, S.-H., KWAK, C.-I., GU, Y.-Y. & CHUN, J.-Y. (2003). Annealing control primer system for improving specificity of PCR amplification. *BioTechniques* **35** (6), S. 1180-1184.
- INNOCENTI, G., PIOVAN, A., FILIPPINI, R., CANIATO, R. & CAPPELLETTI, E. (1997). Quantitative Recovery of Furanocoumarins from *Psoralea bituminosa*. *Phytochemical Analysis* **8**, S. 84-86.
- Invitrogen. (2000). Advanced RACE Method Amplifies Only Full-Length cDNA Ends. *Expression Newsletters* **7** (3), S. 2-3.
- IVIE, G. (1978). Linear furanocoumarins (Psoralens) from the seed of Texas *Ammi majus* L. (Bishop's weed). *J. Agric. Food Chem.* **6**, S. 1349-1402.
- JANSEN, R., BUSSEMAKER, H. & GERSTEIN, M. (2003). Revisiting the codon adaptation index from a whole-genome perspective: analyzing the relationship between gene expression and codon occurrence in yeast using a variety of models. *Nucleic Acids Res.* **31**, S. 2242-2251.
- JIANG, H. & MORGAN, J. (2004). Optimization of an in vivo plant P450 Monooxygenase system in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotech. Bioeng.* **85**, S. 130-137.
- JIWANDIJA, S., SANTISOPASRI, V. & OHIGASHI, H. (2000). Coumarin-related compounds as plant growth inhibitors from two Rutaceae plants. *Biocsi. Biotechnol. Biochem.* **64** (2), S. 420-423.
- KALB, V. F. & LOPER, J. C. (1988). Proteins from eight eukaryotic cytochrome P-450 families share a segment region of sequence similarity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, S. 7221-7225.

- KELLNER, S. (2003). Molekularbiologische Untersuchungen und Charakterisierung der Flavonoidbiosynthese bei *Hieracium pilosella*. Diplomarbeit, TU München.
- KAI, K., MIZUTANI, M., KAWAMURA, N., YAMAMOTO, R., TAMAI, M., YAMAGUCHI, H., SAKATA, K., SHIMIZU, B. (2008). Scopoletin is biosynthesized via ortho-hydroxylation of feruloyl CoA by a 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, doi: 10.1111/j.1365-313X.2008.03568.x.
- KIM, H., SCHALLER, H., GOH, C., KWON, M., CHOE, S., AN, C., *et al.* (2005). *Arabidopsis* CYP51 mutant shows postembryonic seedling lethality associated with lack of membrane integrity. *Plant Physiol.* **138** (4), S. 2033-2047.
- KIM, Y.-J., KWAK, C.-I., GU, Y.-Y., HWANG, I.-T. & CHUN, J.-Y. (2004). Annealing control primer system for identification of differentially expressed genes on agarose gels. *BioTechniques* **36** (3), S. 424-434.
- KINDL, H. (1971). Ortho-hydroxylation of aromatic carboxylic acids in higher plants. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* **352**, S. 78-84.
- KJELLBOM, P., LARSSON, C., ASKERLUND, P., SCHELIN, C. & WIDELL, S. (1985). Cytochrome P450/420 in plant plasma membranes: a possible component of the bluelight-reducible flavoprotein-cytochrome complex. *Photochem. Photobiol.* **42**, S. 779-783.
- KOENIGS, L. & TRAGER, W. (1998). Mechanism-based inactivation of cytochrome P450 2B1 by 8-methoxypsoralen and several other furocoumarins. *Biochemistry* **37**, S. 13184-13193.
- KOMBRINK, E. & HAHLBROCK, K. (1986). Responses of cultures parsley cells to elicitors from phytopathogenic fungi. *Plant Physiol.* **81**, S. 216-221.
- KOOPMANN, E. & HAHLBROCK, K. (1997). Differentially regulated NADPH:cytochrome P450 oxidoreductases in parsley. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, S. 14954-14959.
- KOUL, S. & KOUL, A. (1993). Development of media for growth and furanocoumarin production of *Ammi majus* cells. *Fitoterapia* **5**, S. 415-422.
- KRÒLICKA, A., KARTANOWICZ, R., WOSINSKI, S. A., SZPITTER, A., KAMINSKI, M. & LOJKOWSKA, E. (2006). Induction of secondary metabolite production in transformed callus of *Ammi majus* L. grown after electromagnetic treatment of the culture medium. *Enzym Microb. Tech.* **39** (7), S. 1386-1391.
- KRÒLICKA, A., LOJKOWSKA, E., STANISZEWSKA, I., MALINSKI, E. & SZAFRANEK, J. (2001a). Identification of secondary metabolites in in vitro culture of *Ammi majus* treated with elicitors. *Acta Horticulturae* **560**, S. 255-258.
- KRÒLICKA, A., STANISZEWSKA, I., BIELAWSKI, K., MALINSKI, E., SZAFRANEK, J. & LIJKOWSKA, E. (2001b). Establishment of hairy root cultures of *Ammi majus*. *Plant Sci.* **160**, S. 259-264.
- LAEMMLI, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, S. 680-685.

- LARBAT, R., KELLNER, S., SPECKER, S., HEHN, A., GONTIER, E., HANS, J., BOURGAUD, F. & MATERN, U. (2007). Molecular cloning and functional characterization of Psoralen synthase, the first committed Monooxygenase of furanocoumarin biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **282**, S. 542-554.
- LATUNDE-DADA, A., CABELLO-HURTADO, F., CZITTRICH, N., DIDIERJEAN, L., SCHOPFER, C., HERTKORN, N., *et al.* (2001). Flavonoid 6-hydroxylase from soybean, a novel plant P-450 monooxygenase. *J. Biol. Chem.* **276**, S. 1688-1695.
- LI, W., SCHULER, M. A. & BERENBAUM, M. R. (2003). Diversification of furanocoumarin-metabolizing cytochrome P450 monooxygenases in two papilionids: Specificity and substrate encounter rate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, S. 10920-10924.
- LI, W., ZANGERL, A., SCHULER, M. & BERENBAUM, M. (2004). Characterization and evolution of furanocoumarin-inducible cytochrome P450s in the parsnip webworm, *Depressaria pastinacella*. *Insect Mol. Biol.* **13** (6), S. 603-613.
- LI, X., BAUDRY, J., BERENBAUM, M. & SCHULER, M. (2004). Structural and functional divergence of insect CYP6B proteins: from specialist to generalist cytochrome P450. *PNAS* **101**, S. 2939-2944.
- LIANG, P. & PARDEE, A. (1992). Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* **257**, S. 967-970.
- LIANG, P. & PARDEE, A. (1995). Recent advances in differential display. *Curr. Opin. Immunol.* **7**, S. 274-280.
- LIANG, P., AVERBOUKH, L. & PARDEE, A. (1993). Distribution and cloning of eucaryotic mRNAs by means of differential display: refinements and optimization. *Nucleic Acids Res.* **21**, S. 3269-3275.
- LIANG-QING, G. & YASUSHI, Y. (2004). Inhibition of cytochrome P450 furanocoumarins in grapefruit juice and herbal medicines. *Acta Pharmacol. Sin.* **25**, S. 129-136.
- LOHMAN, D. & MCCAUNNAUGHAY, K. (1998). Patterns of defensive chemical production in wild parsnip seedlings. *Chemoecology* **8**, S. 195-200.
- MA, R., SCHULER, M., BERENBAUM, M. & COHEN, M. (1994). Black swallowtail (*Papilio polyxenes*) alleles encode cytochrome P450s that selectively metabolize linear furanocoumarins. *Arch. Biochem. Biophys.* **310**, S. 332-340.
- MADYASTHA, K., RIDGWAY, J., DWYER, J. & COSCIA, C. (1977). Subcellular localization of a cytochrome P-450-dependent monooxygenase in vesicles of the higher plant *Catharanthus roseus*. *J. Cell Biol.* **72**, S. 302-313.
- MAKKI, S., MURET, P., SAID, A. M., BASSIGNOT, P., HUMPERT, P., Agache, P., *et al.* (1996). Percutaneous absorption of three psoralens commonly used in therapy: Effect of skin occlusion. *Int. J. Pharmaceut.* **133**, S. 245-252.
- MANSUY, D. (1998). The great diversity of reactions catalyzed by cytochromes P450. *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* **121**, S. 5-14.

- MAO, W., RUPASHINGE, S., ZANGERL, A., BERENBAUM, M. & SCHULER, M. (2007). Allelic Variation in the *Depressaria pastinacella* CYP6AB3 Protein Enhances Metabolism of Plant Allelochemicals by Altering a Proximal Surface Residue and Potential Interactions with Cytochrome P450 Reductase. *J. Biol. Chem.* **382** (14), S. 10544-10552.
- MATERN, U. (1991). Coumarins and other phenylpropanoid compounds in the defense response of plant cell. *Planta Med.* **57**, S. 15-20.
- MATERN, U., LÜER, P., KREUSCH, D. (1999). Biosynthesis of coumarins. In: Sankawa, U. (Herausgeber), *Comprehensive natural products chemistry 1: Polyketides and other secondary metabolites including fatty acids and their derivatives*. Pergamon, Oxford, S. 623-637.
- MATERN, U., STRASSER, H., WENDORFF, H. & HAMERSKI, D. (1988). Coumarins and Furanocoumarins. In F. V. Constabel (Hrsg.), *Cell culture and somatic cell genetics of plants* (Bd. 5). New York: Academic Press.
- MAUCHER, H., HAUSE, B., FEUSSNER, I., ZIEGLER, J. & WASERNACK, C. (2000). Allene oxide synthases of barley (*Hordeum vulgare* cv Salome): tissue specific regulation in seedling development. *Plant* **21**, S. 199-213.
- MAYS, D., HILIARD, J., WONG, D. & GERBER, N. (1989). Activation of 8-methoxypsoralen by cytochrome P-450 enzyme kinetics of covalent binding and influence of inhibitors and inducers of drug metabolism. *Biochem. Pharmacol.* **38** (10), S. 1647-1655.
- MCKEY, D. (1979). The distribution of secondary compounds within plants. In *Herbivores: their interactions with secondary plant metabolites* (S. 56-133). New York.
- MIKSCH, M. & BOLAND, W. (1996). Airborne methyl jasmonate stimulates the biosynthesis of furanocoumarins in the leaves of celery plant (*Apium graveolens*). *Experientia* **52**, S. 739-743.
- MILEK, R., STUNNENBERG, H. & KONINGS, R. (2000). Assembly and expression of a synthetic gene encoding the antigen Pfs48/45 of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* in yeast. *Vaccine* **18**, S. 1402-1411.
- MILESI, S., MASSOT, B., GONTIER, E., BOURGAUD, F. & GUCKERT, A. (2001). *Ruta graveolens* L.: a promising species for the production of furanocoumarins. *Plant Sci.* **161** (1), S. 189-199.
- MOAT, A. & FOSTER, J. (1995). *Microbial physiology*. New York: John Wiley & Sons.
- MÜLLER, H.-J. (2001). *PCR*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- MÜLLER, S., SUNDAL, T., KAMP-HANSEN, P. & DALBOGE, H. (1998). Comparison of expression systems in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis*, *Schizosaccharomyces pombe* and *Yarrowia lipolytica*. Cloning of two novel promoters from *Yarrowia lipolytica*. *Yeast* **14**, S. 1267-1283.
- MUMBERG, D., MÜLLER, R., & FUNK, M. (1995). Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene* **156**, S. 119-122.

- MURPHY, P. & WEST, C. (1969). The role of mixed function oxidases in kaurene metabolism. *Arch. Biochem. Biophys.* **133**, S. 395-407.
- MURRAY, R., MÈNDEZ, J. & BROWN, S. A. (1982). *The natural coumarins. Occurrence, chemistry and biochemistry*. New York: Wiley.
- NADLER, S. & STROBEL, H. (1988). Role of electrostatic Interactions in the Reaction of NADPH-Cytochrome P-450 Reductase with Cytochrome P450. *Arch. Biochem. Biophys.* **261** (2), S. 418-429.
- NASSER, A. & SINGAB, B. (1998). Acetylated flavonol triglycosides from *Ammi majus* L. *Phytochem.* **49**, S. 2177-2180.
- NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). (2007). Von <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> abgerufen.
- NEGROUK, V., EISNER, G., MIDHA, S., LEE, H., BASCOMB, N. & GLEBA, Y. (2004). Affinity purification of streptavidin using tobacco mosaic virus particles as purification tags. *Anal. Biochem.* **333**, S. 230-235.
- NELSON, D. (1999). Cytochrome P450 and the Individuality of Species. *Arch. Biochem. Biophys.* **369** (1), S. 1-10.
- NELSON, D. (2004). *Cytochrome P450 Homepage*. Von <http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html> abgerufen.
- NELSON, D. (2007). *Cytochrome P450 Homepage*. Von <http://drnelson.utmem.edu> abgerufen.
- NELSON, D., SCHULER, M., PAQUETTE, S., WERCK-REICHHART, D. & BAK, S. (2004). Comparative Genomics of Rice and Arabidopsis. Analysis of 727 Cytochrome P450 Genes and Pseudogenes from a Monocot and a Dicot. *Plant Physiol.* **135** (2), S. 756-772.
- NGUYEN, C., BOUQUE, V., BOURGAUD, F. & GUCKERT, A. (1997). Quantification of daidzein and furanocoumarin conjugates of *Psoralea cinerea* L (Leguminosae). *Phytochem. Anal.* **8**, S. 27-31.
- NIGG, H., STRANDBERG, J., BEIER, R., PETERSEN, H. & HARRISON, J. (1997). Furanocoumarins in florida celery varieties increased by fungicide treatment. *J. Agric. Food Chem.* **45**, S. 1430-1436.
- NIKFARJAM, L., IZUMI, S., YAMAZAKI, T. & KOMINAMI, S. (2006). The interaction of cytochrome P450 17a with NADPH-cytochrome P450 reductase, investigated using chemical modification and MALDI-TOF mass spectrometry. *Biochim. Biophys. Acta* **1764**, S. 1126-1131.
- NÜRNBERGER, T., NENNSTIEL, D., JABS, T., SACKS, W. R., HAHLBROCK, K. & SCHEEL, D. (1994). High affinity binding of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma membranes triggers multiple defense responses. *Cell* **78**, S. 449-460.
- OHKAWA, H., IMAISHI, N. SHIOTA, T., YAMADA, H. INUI & Y. OHKAWA. 1998. Molecular mechanisms of herbicide resistance with special emphasis on cytochrome P450 monooxygenases. *Plant Biotechnology* **15**, S. 173-176.

- OLIVEIRA, C., VAN DEN HEUVEL, J. & MCCARTHY, J. (1993). Inhibition of translational initiation in *Saccharomyces cerevisiae* by secondary structure: the roles of the stability and position of stem-loops in the mRNA leader. *Mol. Microbiol.* **9**, S. 521-532.
- OLIVEIRA, R. & LUCAS, C. (2004). Expression studies of GUP1 and GUP2, genes involved in glycerol active transport in *Saccharomyces cerevisiae*, using semi-quantitative RT-PCR. *Curr. Genet.* **46**, S. 140-146.
- PAIN, M., CRISS, A. & WATKINS, P. (2005). Two major grapefruit juice components differ in time to onset of intestinal CYP3A4 inhibition. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **312**, S. 1151-1160.
- PAN, L., WEN, Z., BAUDRY, J., BERENBAUM, M. & SCHULER, M. (2004). Identification of variable amino acids in the SRS1 region of CYP6B1 modulating furanocoumarin metabolism. *Arch. Biochem. Biophys.* **422**, S. 31-41.
- PAN, Z., DURST, F., WERCK-REICHHART, D., GARDNER, H., CAMARA, B., CORNISH, K., *et al.* (1995). The major protein of guayule rubber particles is a cytochrome P450. *J. Biol. Chem.* **15**, S. 8487-8494.
- PANDE, D., PUROHIT, M. & SRIVASTAVA, P. S. (2002). Variation in Xanthotoxin content in *Ammi majus* L. cultures during in vitro flowering and fruiting. *Plant Sci.* **162**, S. 583-587.
- PAQUETTE, S., BAK, S. & FEYEREISEN, R. (2000). Intron-exon organization and phylogeny in a large superfamily, the paralogous cytochrome P450 genes of *Arabidopsis thaliana*. *DNA Cell Biology* **19**, S. 307-317.
- PATHAK, M. & FITZPATRICK, T. (1992). The evolution of photochemotherapy with psoralens and UVA (PUVA): 2000 BC to 1992 AD. *J. Photochem. Photobiol. B.* **14**, S. 3-22.
- PERLAK, F., FUCHS, R., DEAN, D., MCPHERSON, S. & FISCHHOFF, D. (1994). Catalytic properties of the plant cytochrome P450 CYP73 expressed in yeast. Substrate specificity of a cinnamate hydroxylase. *Eur. J. Biochem.* **224**, S. 835-844.
- POMPON, D., LOUERAT, B., BRONNE, A. & URBAN, P. (1996). Yeast expression of animal and plant P450s in optimized redox environments. *Methods in Enzymology* **272**, S. 51-64
- PURASHIGE, S., BAUDRY, J. & SCHULER, M. (2003). Common active site architecture and binding strategy of four phenylpropanoid P450s from *Arabidopsis thaliana* as revealed by molecular modeling. *Protein Eng.* **16**, S. 721-731.
- PUROHIT, M., PANDE, D., DATTA, A. & SRIVASTAVA, P. (1995). Enhanced Xanthotoxin Content in Regenerating Cultures of *Ammi majus* and Micropropagation. *Planta Med.* **66** (481), S. 481-482.
- RAMARAO, M. & KEMPER, R. (1996). Substitution at residue 473 confers progesterone 21-hydroxylase activity to cytochrome P450 2C2. *Mol. Pharmacol.* **48**, S. 417-424.
- REECE, R. (2003). *Analysis of Genes and Genome*. London, UK: John Wiley.
- ROUWENDAL, G., MENDES, O., WOLBERT, E. & DOUWE DE BOER, A. (1997). Enhanced expression in tobacco of the gene encoding green fluorescent protein modification of its codon usage. *Plant Mol. Biol.* **33**, S. 989-999.

- ROZMAN, D., STROMSTEDT, M., TSUI, L., SCHERER, S. & WATERMAN, M. (1996). Structure and mapping of the human lanosterol 14 α -demethylase gene (CYP51) encoding the cytochrome P450 involved in cholesterol biosynthesis; comparison of exon/intron organization with other mammalian and fungal CYP genes. *Genomics* **38**, S. 371-381.
- RUPASINGHE, S., SCHULER, M., KAGAWA, N., YUAN, H., LEI, L., ZHAO, B., *et al.* (2006). The cytochrome P450 gene family CYP751 does not contain EXXR in the K-helix reducing the absolute conserved P450 residues to a single cysteine. *FEBS letters* **580**, S. 6338-6342.
- RUPPERT, M. (2001). Cytochrome P450-Enzyme der Ajmalin-Biosynthese aus Rauwolfia serpentina. Dissertation, J. Gutenberg-Universität Mainz.
- SAMBROCK, J., FRITSCH, E. & MANIATIS, T. (1989). *Molecular cloning – a laboratory manual* (2. Ausgabe). New York: Cold Spring Harbor Press.
- SASABE, M., WEN, Z., BERENBAUM, M. & SCHULER, M. (2004). Molecular analysis of CYP321A1, a novel cytochrome P450 involved in metabolism of plant allelochemicals (furanocoumarins) and insecticides (cypermethrin) in *Helicoverpa zea*. *Gene* **338**, S. 163-175.
- SCHALK, M. & CROTEAU, R. (2000). A single amino acid substitution (F361) converts the regiochemistry of the spearmint (-)-limonene hydroxylase from a C6- to a C3-hydroxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, S. 11948-11953.
- SCHEMPF, C., SCHÖPF, E. & SIMON, J. (2002). Durch Pflanzen ausgelöste toxische und allergische Dermatitis. *Hautarzt* **2**, S. 93-97.
- SCHILLER, G. & HILLER, K. (1999). *Arzneidrogen* (4. Ausg.). Spektrum Akademischer Verlag.
- SCHÖBERG & SINA. (1948). Xanthotoxin from the fruits of *Ammi majus*. *Nature* **161**, S. 481.
- SCHOPFER, C. & EBEL, J. (1998). Identification of elicitor-induced cytochromes P450s of soybean using differential display of mRNA. *Molecular Gene Genetics* **258**, S. 315-322.
- SCHRÖDER, G., UNTERBUSCH, E., KALTENBACH, M., SCHMIDT, J., STRACK, D., DE LUCA, V., *et al.* (1999). Light-induced cytochrome P450-dependent enzyme in indole alkaloid biosynthesis: tabersonine 16-hydroxylase. *FEBS Letters* **458**, S. 97-102.
- SCHULER, M. & BERENBAUM, M. (2003). Diversification of furanocoumarin-metabolizing cytochrome P450 monooxygenases in two papilionids: Specificity and substrate encounter rate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, S. 14593-14598.
- SCHULER, M., DUAN, H., BILGIN, M. & ALI, S. (2006). Arabidopsis cytochrome P450s through the looking glass: a window on plant biochemistry. *Phytochem. Rev.* **5**, S. 205-237.
- SEITZ, C., DEIML, B., KELLNER, S., MARTENS, S. & FORKMANN, G. (2006). Cloning, Functional Identification and Sequence Analysis of Flavonoid 3'-hydroxylase and Flavonoid 3',5'-hydroxylase cDNAs Reveals Independent Evolution of Flavonoid 3',5'-hydroxylase in the Asteraceae Family. *Plant Mol. Biol.* **65** (3) S. 365-381.
- SENER, B., EVREN, N. & BAYKAL, T. (1986). Separation and Determination of Khellin and Visnagin in *Ammi majus* L. Fruits by HPLC. *J. Fac. Pharm. Gazi.* **3** (2), S. 149.

- SHARP, P., TUOHY, T. & MOSURSKI, K. (1986). Codon usage in yeast: cluster analysis clearly differentiates highly and lowly expressed genes. *Nucleic Acid Res.*, **14**, S. 5125-5143.
- SIMINSZKY, B. (2006). Plant cytochrome P450-mediated herbicide metabolism. *Phytochem. Rev.* **5** (2-3), S. 445-458.
- SIMINSZKY, B., CROBIN, F., WARD, E., FLEISCHMANN, T. & DEWEY, R. (1999). Expression of a soybean cytochrome P450 monooxygenase cDNA in yeast and tobacco enhances the metabolism of phenylurea herbicides. *Proc. Natl. Acad. Science.* **96**, S. 1750-1755.
- SPECKER, S. (2003). Klonierung von Cytochrome abhängigen Monooxygenasen aus *Ammi majus* und funktionelle Expression der Zimtsäure 4-Hydroxylase. *Dissertation*, Philipps-Universität Marburg.
- STANISZEWSKA, I., KRÓLICKA, A., MALINSKI, E., LOJKOWSKA, E. & SZAFRANEK, J. (2003). Elicitation of secondary metabolites in in vitro cultures of *Ammi majus* L. *Enzym Microb. Tech.* **33**, S. 565-658.
- STANJEK, V. & BOLAND, W. (1998). Biosynthesis of Angular Furanocoumarins: Mechanism and Stereochemistry of the Oxidative Dealkylation of Columbianetin to Angelicin in *Heracleum mantegazzianum*. *Helvetica Chimica* **81**, S. 1596-1607.
- STANJEK, V., MIKSCH, M., LUEER, P., MATERN, U. & BOLAND, W. (1999). Biosynthesis of psoralen: Mechanism of a cytochrome P450 catalyzed oxidative bond cleavage. *Angewandte Chemie - international Edition* **38**, S. 400-402.
- STANLEY, W. & VANNIER, S. H. (1967). Psoralens and substituted coumarins from expressed oil of lime. *Phytochem.* **6**, S. 585-596.
- SZEBENI-GALAMBOSI, Z., GALAMBOSI, B. & HOLM, Y. (1992). Growth, yield and essential oil of lovage in Finland. *J. Essent. Oil Res.* **4**(4), S. 375 - 380.
- TADA, Y., SHIKISHIMA, Y., TAKAISHI, Y., SHIBATA, H., HIGUTI, T., HONDA, G., *et al.* (2002). Coumarins and Pyrone derivatives from *Prangos pabularia*: antibacterial activity and inhibition of cytokine release. *Phytochem.* **59**, S. 649-654.
- TEOH, K., POLICHUK, R., REED, D., NOWAK, G. & COVELLO, P. (2006). *Artemisia annua* L. trichome-specific cDNAs reveal CYP71AV1, a cytochrome P450 with a key role in the biosynthesis of the antimalarial sesquiterpene lactone artemisinin. *FEBS Letters* **580**, S. 1411-1416.
- TEUTSCH, H., HASENFRATZ, M., LESOT, A., STOLTZ, K., GARNIER, J. & JELTSCH, J. (1993). Isolation and sequence of a cDNA encoding the Jerusalem artichoke cinnamate 4-hydroxylase, a major plant cytochrome P450 involved in the general phenylpropanoid pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90** S. 4102 - 4106.
- TIETJEN, K. G. & MATERN, U. (1983). Differential response of cultured parsley cells to elicitors from non-pathogenic strains of fungi: 2. Effects on enzyme activity. *Eur. J. Biochem.* **131**, S. 409-413.

- TIETJEN, K., HUNKLER, D. & MATERN, U. (1983). Differential response of cultured parsley cells to elicitors from two non-pathogenic strains of fungi: 1. Identification of induced products as coumarin derivates. *Eur. J. Biochem.* **131**, S. 401-407.
- TIJET, N., HELVIG, C. & FEYEREISEN, R. (2001). The cytochrome P450 gene superfaily in *Drosophila melanogaster*: annotation, intron-exon organization and phylogeny. *Gene* **262** (1-2), S. 189-198.
- TRENKAMP, S. (2003). Pflanzliche Fettsäure-Elongasen als Wirkort von Herbiziden. *Dissertation*, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf.
- TRUAN, G., CULLIN, C., REISDORF, P., URBAN, P. & POMPON, D. (1993). Enhanced in vivo monooxygenase activities of mammalian P450s in engineered yeast cells producing high levels of NADPH-P450 reductases and human cytochrome b5. *Gene* **125**, S. 49-55.
- TRUMBLE, J., DERCKS, W., QUIROS, C. & BEIER, R. (1990). Host plant resistance and linear furanocoumarin content of *Apium* accession. *J. Econ. Entomol.* **83**, S. 519-525.
- UEYAMA, Y., SUZUKI, K., FUKUCHI-MIZUTANI, M., FUKUI, Y., MIYAZAKI, K., OKHAWA, H., *et al.* (2002). Molecular and biochemical characterization of *Torenia* Flavonoid 3'-hydroxylase and flavone synthase II and modification of flower color by modulation the expression of these genes. *Plant Sci.* **163**, S. 253-263.
- URBAN, P., CULLIN, C., & POMPON, D. (1990). Maximizing the expression of mammalian cytochrome P450 monooxygenase activities in yeast cells. *Biochimie* **72**, S. 463-472.
- URBAN, P., MIGNOTTE, C., KAZMAIER, M., DELORME, F. & POMPON, D. (1997). Cloning, yeast expression, and Characterization of the coupling of two distantly related *Arabidopsis thaliana* NADPH-cytochrome P450 reductases with P450 CYP73A5. *J. Biol. Chem.* **272**, S. 19176-19186
- URBAN, P., WERCK-REICHHART, D., TEUTSCH, H., DURST, F., REGNIER, S., KAZMEIER, M., *et al.* (1994). Characterization of recombinant plant cinnamate 4-hydroxylase produced in yeast. *Eur. J. Biochem.* **222**, S. 843-850.
- VETTER, H., MANGOLD, U., SCHRÖDER, G., MARNER, F., WERCK-REICHHART, D. & SCHRÖDER, J. (1992). Molecular analysis and heterologous expression of an inducible cytochrome P-450 protein from periwinkle. *Plant Physiol.* **100**, S. 998-1007.
- WAMER, W., TIMMER, W., WEI, R., MILLER, S. & KORNHAUSER, A. (1995). Furanocoumarin-photosensitized hydroxylation of Guanosin in RNA and DNA. *Photobiol.* **61**, S. 336-340.
- WAN, J., SHARP, G., POIRIER, P., WAGAMAN, J., CHAMBERS, J., PYATI, Y.-L., HOM, Y., GALINDO, J., HUVAR, A., PETERSON, P., JACKSON, M. & ERLANDER, M. (1996). Cloning differential expressed mRNAs. *Nat. Biotechnol.* **14**, S. 1685-1691.
- WARD E., UKNES S., WILLIAMS S., DINCHER S., WIEDERHOLD D., ALEXANDER D., AHL-GOY P., METRAUX J. & RYALS J. (1991). Coordinate Gene Activity in Response to Agents That Induce Systemic Acquired Resistance. *Plant Cell* **3**, S. 1085-1094.
- WEN, Y., SAHI, J., URDA, E., KULKARNI, S., ROSE, K., ZHENG, X., *et al.* (2002). Effects of bergamottin on human and monkey drug-metabolizing enzymes in primary cultured hepatocytes. *Drug Metab. Dispos.* **30**, S. 977-984.

- WEN, Z., RUPASHINGE, S., NIU, G., BERENBAUM, M. & SCHULER, M. (2006). CYP6B1 and CYP6B3 of the Black Swallowtail (*Papilio polyxenes*): Adaptive Evolution through Subfunctionalization. *Mol. Biol. Evol.* **23** (12), S. 2434-2443.
- WENDORFF, H. & MATERN, U. (1986). Differential response of cultured parsley cells to elicitors from two nonpathogenic strains of fungi. Microsomal conversion of (+)marmesin into psoralen. *Eur. J. Biochem.* **161**, S. 391-398.
- WERCK-REICHHART, D. & FEYEREISEN, R. (2000). Cytochrome P450: a success story. *Genome Biology* **1**, S. 3003.1-3003.9.
- WINKLER, R., FRANK, M., GALBRAITH, D., FEYEREISEN, R. & FELDMANN, K. (1998). Systematic reverse genetics of transfer-DNA-tagged lines of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **118**, S. 743-750.
- YAMAZAKI, S., SATO, K., SUHARA, K., SAKAGUCHI, M., MIHARA, K. & OMURA, T. (1993). Importance of the prolin-rich region following signal-anchor sequenz in the formation of correct corporation of microsomal cytochrome P-450s. *Journal of Biochemistry* **114**, S. 652-657.
- ZHANG, H., HOWARD, E. & ROEPE, P. (2002). Analysis of the antimalarial drug resistance protein Pfert expressed in yeast. *J. Biol. Chem.* **277**, S. 49767-49775.
- ZHAO, J., HYMAN, L. & MOORE, C. (1999). Formation of mRNA 3'ends in eukaryotes: mechanism, regulation, and interrelationships with other steps in mRNA synthesis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**, S. 405-445.
- ZHOU, P., TAKAISHI, Y., DUAN, H., CHEN, B., ITOH, M., TAKEDA, Y., *et al.* (2000). Coumarins and bicoumarin from *Ferula sumbul*: anti-HIV activity and inhibition of cytokine release. *Phytochem.* **53**, S. 689-697.
- ZOBEL, A. & BROWN, S. (1998). Determination of furanocoumarins on the leaf surface of *Ruta graveolens* L. with an improved extraction technique. *J. Nat. Prod.* **51**, S. 941-946.
- ZUMWALT, J. & NEAL, J. (1993). Cytochromes P450 from *Papilio polyxenes*: adaption to host plant allelochemicals. *Comp. Biochem. Physiol.* **106C**, S. 111-118.

G Anhang

G.1 Beschreibungen und Referenzen der Sequenzen

Tab. 25: Beschreibung der isolierten und in Laborversuchen eingesetzten Sequenzen

Bezeichnung	Funktion	Herkunft	Accession Nr.	Referenzen
ATR1	NADPH : Cyt P450 Reduktase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	X66016	Urban <i>et al.</i> , 1997
BOMT	Bergaptol-O-Methyltransferase	<i>Ammi majus</i>	AAR24096	Hehmann <i>et al.</i> , 2004
CPR	NADPH : Cyt P450 Reduktase	<i>Ammi majus</i>	AAS90127	Specker, 2003
CYP71AJ1	Psoralensynthase	<i>Ammi majus</i>	AAT06911	Specker, 2003 Larbat <i>et al.</i> , 2007
CYP71AZ1	Putatives CYP	<i>Ammi majus</i>	unveröffentlicht	Kellner, 2008 unveröffentlicht
CYP71D97	Putatives CYP	<i>Ammi majus</i>	unveröffentlicht	Kellner, 2008 unveröffentlicht
CYP71D98	Putatives CYP	<i>Ammi majus</i>	unveröffentlicht	Kellner, 2008 unveröffentlicht
CYP73A1	Zimtsäure-4-Hydroxylase	<i>Helianthus tuberosus</i>	Q04468	Teutsch <i>et al.</i> , 1993
CYP73A41	Zimtsäure-4-Hydroxylase	<i>Ammi majus</i>	AA062904	Specker, 2003

Tab. 26: Alignment-Sequenzen für das ACP-Design

Bezeichnung	Funktion	Herkunft
CYP51G-like	Unbekannte Funktion	<i>Nicotiana tabaccum</i>
CYP71A1	Menthofuran Synthase	<i>Mentha x piperita</i>
CYP71A5	Durch pilzlichen Elicitor induziert, Funktion unbekannt	<i>Nepeta racemosa</i>
CYP71A10	Phenylurea-Herbizid-Metabolismus	<i>Glycine max</i>
CYP71B-like	Durch pilzlichen Elicitor induziert, Funktion unbekannt	<i>Citrus sinensis</i>
CYP71D1	N-Hydroxylase in der Linamarin und Lotaustralin Biosynthese	<i>Manihot esculenta</i>
CYP71D12	Tabersonin 16-Hydroxylase	<i>Catharanthus roseus</i>
CYP71D13	(-)-Limonen-3-Hydroxylase	<i>Mentha x piperita</i>
CYP71D9	Durch pilzlichen Elicitor induziert, Funktion unbekannt	<i>Glycine max</i>
CYP71E1	Multifunktionelles P450 in Dhurrin-Biosynthese	<i>Sorghum bicolor</i>
CYP72A-like	Funktion unbekannt	<i>Citrus sinensis</i>
CYP72A1	Secologanin Synthase	<i>Catharanthus roseus</i>
CYP74A2	Allenoxid Synthase	<i>Parthenium argentatum</i>
CYB74B-like	Unbekannte Funktion	<i>Murraya paniculata</i>
CYP74B4	13-Hydroperoxide Lyase	<i>Medicago truncatula</i>
CYP74D1	Divinylether Synthase	<i>Lycopersicon esculentum</i>
CYP75A1	Flavonoid 3',5'-Hydroxylase	<i>Penunia hybrida</i>
CYP75B2	Flavonoid 3'-Hydroxylase	<i>Penunia hybrida</i>
CYP76B-like	Durch pilzlichen Elicitor induziert, Funktion unbekannt	<i>Apium graveolens</i>
CYP76B1	7-Ethoxycumarin O-Deethylase	<i>Helianthus tuberosus</i>
CYP76B6	Geraniol 10-Hydroxylase	<i>Catharanthus roseus</i>
CYP76B7	Durch mechanischen Schaden induziert, Funktion unbekannt	<i>Pastinca sativa</i>
CYP76B8	Durch pilzlichen Elicitor induziert, Funktion unbekannt	<i>Ammi majus</i>
CYP76C-like	Funktion unbekannt	<i>Prunus persica</i>
CYP77A3	Phenylurea-Herbizid-Metabolismus	<i>Glycine max</i>
CYP78A3	Phenylurea-Herbizid-Metabolismus	<i>Glycine max</i>
CYP79B1	Konversion von Tryptophan in Indol-3-Acetaldoxim	<i>Sinapsis alba</i>
CYP79D4	Biosynthese von Rhodiocyanosiden, Lotaustralin und Linamarin	<i>Lotus corniculatus</i>
CYP79E1	Konversion von Tyrosin in <i>p</i> -Hydroxyphenylacetaldoxim	<i>Triglochin maritima</i>
CYP80A1	Berbamunin Synthase	<i>Berberis stolonifera</i>
CYP80B1	(S)-N-Methylcoclaurin 3'-Hydroxylase	<i>Eschschuliza cali formica</i>
CYP81B-like	Durch MeJa induziert, Funktion unbekannt	<i>Panax ginseng</i>
CYP81D-like	Unbekannte Funktion	<i>Glycyrrhiza echinata</i>
CYP81E1	Isoflavon 2'-Hydroxylase	<i>Glycyrrhiza echinata</i>
CYP81E-like	Putative Hydroxylierung von Isoflavonen	<i>Cicer arietinum</i>
CYP81E-like	Putative Hydroxylierung von Isoflavonen	<i>Lotus corniculatus</i>
CYP82A1	Durch mechanischen Schaden induziert, Funktion unbekannt	<i>Pisum sativum</i>
CYP82A4	Durch pilzlichen Elicitor induziert, Funktion unbekannt	<i>Glycine max</i>
CYP82C-like	Unbekannte Funktion	<i>Poncirus trifoliata</i>
CYP82C1p	Phenylurea-Herbizid-Metabolismus	<i>Glycine max</i>
CYP82H1	Durch pilzlichen Elicitor induziert, Funktion unbekannt	<i>Ammi majus</i>
CYP83G-like	Unbekannte Funktion	<i>Citrus x paradisi</i>
CYP84A-like	Ferulate 5-Hydroxylase	<i>Medicago sativa</i>
CYP84A3	Coniferylaldehyd 5-Hydroxylase	<i>Liquidambar styraciflua</i>
CYP85A-like	Unbekannte Funktion	<i>Citrus sinensis</i>
CYP85A-like	Unbekannte Funktion	<i>Phaseolus vulgaris</i>
CYP86A23	Unbekannte Funktion	<i>Medicago trunculata</i>
CYP87A-like	Unbekannte Funktion	<i>Citrus sinensis</i>

CYP88A2	ent-Kaurensäure-Oxidase	<i>Cucurbita maxima</i>
CYP89A2	Unbekannte Funktion	<i>Arabidopsis thaliana</i>
CYP90A-like	Unbekannte Funktion	<i>Vigna radiata</i>
CYP92B-like	Unbekannte Funktion	<i>Pisum sativum</i>
CYP93A1	Dihydroxypterocarpan 6-alpha-hydroxylase	<i>Glycine max</i>
CYP93A-like	Unbekannte Funktion	<i>Glycyrrhiza echinata</i>
CYP93B-like	Unbekannte Funktion	<i>Citrus sinensis</i>
CYP93B1	(2S)-Flavanon 2-Hydroxylase	<i>Glycyrrhiza echinata</i>
CYP93C1	Isoflavon Synthase	<i>Glycine max</i>
CYP93C3	Putative Isoflavon Synthase	<i>Cicer arietinum</i>
CYP93C-like	Putative Isoflavon Synthase	<i>Lotus corniculatus</i>
CYP93E1	Beta-Amyrin und Sophoradiol 24-Hydroxylase	<i>Glycine max</i>
CYP94A-like	Durch MeJa induziert, Funktion unbekannt	<i>Panax ginseng</i>
CYP94A1	Fettsäure Omega-Hydroxylase	<i>Vicia sativa</i>
CYP94A5	Fettsäure Hydroxylase	<i>Nicotiana tabacum</i>
CYP94D-like	Unbekannte Funktion	<i>Citrus x paradisi</i>
CYP96A1	Unbekannte Funktion	<i>Arabidopsis thaliana</i>
CYP97B1	Unbekannte Funktion	<i>Pisum sativum</i>
CYP97B2	Phenylurea-Herbizid-Metabolismus	<i>Glycine max</i>
CYP98A13	p-Cumarylshimikat Hydroxylase	<i>Ocimum basilicum</i>
CYP98A2	Phenylurea-Herbizid-Metabolismus	<i>Glycine max</i>
CYP98A20	p-Cumarsäure 3-Hydroxylase	<i>Sesamum indicum</i>
CYP98A21	Durch pilzlichen Elicitor induziert	<i>Ammi majus</i>
CYP701A	Ent-Kauren-Oxidase	<i>Pisum sativum</i>
CYP703A1	Laurensäure Monooxygenase	<i>Penunia hybrida</i>
CYP704A1	Unbekannte Funktion	<i>Arabidopsis thaliana</i>
CYP705A1	Unbekannte Funktion	<i>Arabidopsis thaliana</i>
CYP706B1	(+)-Delta-Cadinen-8-Hydroxylase	<i>Gossypium barbadense</i>
CYP707A2	Unbekannte Funktion	<i>Arabidopsis thaliana</i>
CYP709B4	Unbekannte Funktion	<i>Medicago truncatula</i>
CYP710A1	Unbekannte Funktion	<i>Arabidopsis thaliana</i>
CYP711A1	Unbekannte Funktion	<i>Arabidopsis thaliana</i>
CYP712A1	Unbekannte Funktion	<i>Arabidopsis thaliana</i>
CYP714A1	Unbekannte Funktion	<i>Arabidopsis thaliana</i>
CYP715-like	Unbekannte Funktion	<i>Persea americana</i>
CYP716	Durch mechanischen Schaden induziert	<i>Citrus sinensis</i>
CYP718A1	Unbekannte Funktion	<i>Arabidopsis thaliana</i>
CYP720A1	Unbekannte Funktion	<i>Arabidopsis thaliana</i>
CYP721A1	Unbekannte Funktion	<i>Arabidopsis thaliana</i>
CYP722A1	Unbekannte Funktion	<i>Arabidopsis thaliana</i>
CYP723A2	Unbekannte Funktion	<i>Oryza sativa</i>
CYP724B10	Durch MeJa induziert, unbekannt Funktion	<i>Panax ginseng</i>
CYP727B3	Durch Stress induziert	<i>Citrus x paradisi</i>
CYP728A1	Unbekannte Funktion	<i>Oryza sativa</i>
CYP729A1	Unbekannte Funktion	<i>Oryza sativa</i>
CYP733A1	Unbekannte Funktion	<i>Poncirus trifoliata</i>
CYP734A1	Unbekannte Funktion	<i>Arabidopsis thaliana</i>
CYP735A1	Unbekannte Funktion	<i>Arabidopsis thaliana</i>
CYP736A12	Unbekannte Funktion	<i>Panax ginseng</i>
CYP749-like	Unbekannte Funktion	<i>Citrus sinensis</i>
CYP764A1	Unbekannte Funktion	<i>Panax ginseng</i>

G.2 Nukleinsäure- und Aminosäure-Sequenzen

Legende:

Fett:	PCR-Primer
<i>Kursiv, unterstrichen:</i>	Start- und Stopcodon
Hervorgehoben:	Membran-Anker
<u>Punktirt unterstrichen:</u>	Prolinreiche Region
<u>Strich-Punkt unterstrichen:</u>	Putative Sauerstoffaktivierung-Region in der I-Helix
<u>Einfach unterstrichen:</u>	Putative Proteinstabilisierung-Region in der K-Helix
<u>Doppelt unterstrichen:</u>	Häm-Bindungsregion
C:	Absolut konserviertes Cystein (Häm- und O ₂ -Ligand)
Gerahmt:	Intron

G.2.1 CYP71AZ1

cDNA-Sequenz einschließlich Bindungsstellen der wesentlichen Primer

```

71AZ1 5'ete >
1  TGGCCACGGTTGATATGTACGGTGGGGGGGGGGGGGGGGATCTTCTTCACATGCAGAATGCAGATGGATGCAGTAGTTATCCTTCTT
1  M Q M D A V V I L L
71AZ1 N-change >
91  ATTCTAGCATTTCCAATGCATCAGTATATGTCTTGTGTTTTACCACAAAAAAGAGTTGATGGTCTTTCTGAACCACCCGGTCCACCAGGC
11  I L A F P I A S V Y V L F Y H K K R V D G L S E P P G P P G
181 CTTCCGTTTCATTGGAAACTTTTACCAACTATACAAAGCACCATGCATTCACGAATATTTATGTACCCTATCAAAACGATATGGATCTCTC
41  L P F I G N F Y Q L Y K A P C I H E Y L C T L S K R Y G S L
271 ATGACTTTACGCATGGGCTCCGTTCCAATACTAGTTGTATCATCACCCAAAATGGCCAAAGAAGTGCTGAAAACCTCAAGATCTGGCCTAC
71  M T L R M G S V P I L V V S S P K M A K E V L K T Q D L A Y
361 TGTAGCAGGCCTATGATGACTGGGATGCAAAAATTGTCATATAATGGATTAGATGTTGCGTTTTCTCCATATAGTGAACACTGGAGGCAG
101 C S R P M M T G M Q K L S Y N G L D V A F S P Y S E H W R Q
451 GTGAGAAAGTTTTGTACGCTCGAATTGTTTACTCAAAAAGAGCTCAAATGATTTTCGTCATGTTTCATGAACAAGAGGTTTTCTCGAATG
131 V R K F C T L E L F T Q K R A Q I D F R H V H E Q E V S R M
541 ATTGCCGACTTTTCAGAGACAGCTGCTGCTTCAAAAGATGTAACGCCCTTTGAATGTTTTTCGAATTTGGCTACTTCAATTATTTCTAGA
161 I A R L S E T A A A S K D V N A F E C F S N L A T S I I S R
631 GTTGCAATTCGGGAAGAGGCATGATGAAGATGGGATAGGAAAAGAGAGATTACAGCGAATGTTGTCAGAGTTGGACACCATGCTTTCGGTC
191 V A F G K R H D E D G I G K E R L Q R M L S E L D T M L S V

```

721 TATTTTGTTCAGATTTCTTCTCTAATGTTTGGCTGGATTGATAGCCTTACTGGAATGAGAGCTAGACTTGATCGGACTTTCAAGGAGATG
221 Y F V S D F F P M F G W I D S L T G M R A R L D R T F K E M

811 GATATGTTCTACGAAGAACTCATTGATGATCACCTTAAACCCGACAGACCCGAGTCTCTAACCGAGGATATCATTGATGTCATGTTGAAA
251 D M F Y E E L I D D H L K P D R P E S L T E D I I D V M L K

901 AACAAAGGCTGCTCTTCTCTCTAACAAGGATACTATGAAAGCAATTCTCTTGAATGTATTCAACGGAGGAACCGGTACGAGTGGC
281 N K G C S S S S L T K D T M K A I L L N V F N G...G...T...G...T...S A
71AZ1 5'RT >

991 AGTTTGTGGTCTGGGCAATGACAGCATTAAATGCGTAACCGAGGAGTCATGAAGAAAGTCCAGGAAGAGATTAGAAGTGTGATTGGGAAA
311 S L L V W A M T A L M R N R G V M K K V Q E E I R S V I G K

1081 AAAGGGAATGTAGACGAAGATGATATTGAGAATCTTCTTACTTAAAGGCAGTTGTAAAGGAGACAATGCGATTATACCTTACTGGTGC
341 K G N V D E D D I Q N L P Y L R A V V K E T M R L Y P T G A

1171 CTTCTAATTCCTCGTAAACAAATAGAAAGCTCGATCATTGGTGAAGATAAAGATCATATGTACATGATCAAACCGAAAACCTTAGTTTAT
371 L L I P R K T I E S S I I G E D K D H M Y M I K P K T L V Y

1261 GTAAGCATGTGGGCAATTGGAAGAGACCCGAAATCTGGAAAAATCCCATGAAGTTTGTGCCAGAGAGATTCTTGAACGACATGATATT
401 V S M W A I G R D P E I W K N P M K F V P E R F L E R H D I

1351 AATTACCAAGGACAACAATTTGAGTATATTCCATTGGTGTGGCAGAAGAATATGTCCCGAATTACCTTAGGACTAACGACCGTGGAG
431 N Y Q G Q Q F E Y I P F G A G R R I C P G I H L G L T T V E
< 71AZ1 3'RT

1441 CTTGCACTTGCTAATCTTCTTTACACTTTTAAATGGGAACCACCTGTTGGGACGAGATTTGAGGACATCAATGACGAGACCGTGAATGGT
461 L A L A N L L Y T F N W E P P V G T R F E D I N D E T V N G
< 71AZ1 3'ete

1531 ATAACCTTGCAGAAAAAATGCACCTTTACATTGACCTAAACATATATGTTTCA~~TAA~~TTAAGGTTATTTTGTTTTCTTTGTATT
491 I T L Q K K N A L Y I R P K T Y M F S *

1621 TTGGCAATGGAAGATTTTTCATTGATTGAAAGATTACCATTTAGAGGGACAAAGTTTCCATTGTTTCGCTCCATAATTAAGGGTATTTTTG
1711 TTTTATTTACACTTACAAATTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

gDNA-Sequenz einschließlich Primer für Intron-Sequenzierung

1 ATCTTCTTCACATGCAGAATGCAGATGGATGCAGTAGTTATCCTTCTTATTCTAGCATTTCCAATGCATCAGTATATGCTTGTTTAA
91 CCACAAAAAAGAGTTGATGGTCTTCTGTAACCCCGGTCCACCAGGCCCTCCGTTTCATTGGAACTTTTACCAACTATACAAAGACC
181 ATGCATTACGAATATTTATGTACCCTATCAAAACGATATGGATCTCTCATGACTTTACGCATGGGCTCCGTTCCAATACTAGTTGTATC
271 ATCACCCAAAAATGGCCAAAGAAGTGTGAAAACCAAGATCTGGCCTACTGTAGCAGGCCTATGATGACTGGGATGCAAAAATGTGATA
361 TAATGGATTAGATGTTGCGTTTTCTCCATATAGTGAACACTGGAGGCAGGTGAGAAAGTTTTGTACGCTCGAATTGTTTACTCAAAAAAG
451 AGCTCAAATTGATTTTCGTCATGTTTCATGAACAAGAGGTTTTCTCGAATGATTGCCGACTTTCAGAGACAGCTGCTGCTTCAAAGATGT
541 AAACGCCTTTGAATGTTTTTCGAATTTGGCTACTTCAATTATTTCTAGAGTTGCATTCCGGAAAGAGCATGATGAAGATGGGATAGGAAA
631 AGAGAGATTACAGCGAATGTTGTGAGAGTTGGACACCATGCTTTCCGTTCTATTTTGTTCAGATTTCTTTCTATGTTTGGCTGGATTGA
721 TAGCCTTACTGGAATGAGAGCTAGACTTGATCGGACTTTCAAGGAGATGGATATGTTCTACGAAGAACTCATTGATGATCACCTTAAACC
811 CGACAGACCCGAGTCTCTAACCGAGGATATCATTGATGTCATGTTGAAAAACAAAGGCTGCTCTTCTCTCTAACAAGGATACTAT
901 GAAAGCAATTCCTTGGTAATGAGCTAGCTTCTTTAACTCTTAATCATCTTACAGGTTTTTAAAGTGAAGCACCTTTTAGGGTTTATGAT
991 TATGATTTATATATAAACCAGTAGATATTAATCTTGCAAGGCTACCTATTACCATTTTTTGTACCCTATCTACTTCCATGCTCCGTAA
1081 AACCTTGCATTTTTTTTATCACCTTATCTACTCTATGCTTTTTTAAACCTTAAGGTGGTAAAAGAACCTGGATCTTATGCTTTCC
1171 AACAATTTTCTCAACAACCGCATCTAAATCTTACGACTGAACCTAATCTGAACAATCGAAAACCCCAACTACCAACAACAATAACAT
1261 AAATATATTTTAAATTAATGTTGATGGGAGGAGTCGAACCCGTGACCAATCCCTAACCGAGCTCTTACATGTTAAGTAATCATTCAA

1351 **TACTTTCTAAAACGGTCCTAGAGGAAGGACACACACAGTTTGAATCTTATATTACTGAACATCTAGCTCATAATGTTCTACAAACAATACG**

1441 **GACAACCTAGTATGTAAGATAATATTTTGCCTTTTGATAATTGGGTAGTCATTATACTAAGAAATCTACTAACCCCTAAGATCTACTATTATA**

< 71A21 Intron

1531 **AATGGCAAAAATAATATATTTTTTTAGTAATAGAGAAAAATATGCATGC**ACATCTACAAAAGCACCTACTCGTATACACC**TACACACAT**

1621 **TATTAATAACTTAGTTGTTGCTTTGAATATTTGCAG**AATGTATTCAACGGAGGAACCGGTACGAGTGCAGTTTGTGGTCTGGGCAATG

1711 ACAGCATTAAATGCGTAACCGAGGAGTCATGAAGAAAGTCCAGGAAGAGATTAGAAGTGTGATTGGGAAAAAGGGAATGTAGACGAAGAT

1801 GATATTGAGAATCTTCCTACTTAAGGGCAGTTGTAAGGAGACAATGCGATTATACCCTACTGGTGCACCTCTAATTCCCCGTAAAAACA

1891 ATAGAAAGCTCGATCATTGGTGAAGATAAAGATCATATGTACATGATCAAACCGAAAACCTTAGTTTATGTAAGCATGTGGGCAATTGGA

1981 AGAGACCCGGAATCTGGAAAAATCCCATGAAGTTTGTCCAGAGAGATTCTTGAACGACATGATATTAATTACCAAGGACAACAATTT

2071 GAGTATATTCCATTTGGTGTGGCAGAAGAATATGTCCCGAATTCACCTAGGACTAACGACCGTGGAGCTGCACCTGCTAATCTTCTT

2161 TACACTTTTAATTGGGAACCACTGTTGGGACGAGATTGAGGACATCAATGACGAGACCGTGAATGGTATAACTTTGCAGAAAAAAAAT

2251 GCACTTTACATTCGACCTAAAACATATATGTTTCA**TA**ATTAAGGGTATTTTGTTTTTTCTTTGTATTTTGGCAATGGAAGATTTTTCA

2341 TTGATTGAAAGATTACCATTTAGAGGGACAAAGTTCCATTGTTTCGCTCCATAATTAAGGGTATTTTGTTTTATTTACACTTACAAAT

2431 GAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

G.2.2 CYP71D97

cDNA-Sequenz einschließlich Bindungsstellen der wesentlichen Primer

71D97 5'ete >

1 GGGGAT**CATCCATATATCACAAACAC**TTACAGATACATTTAAATTGCTAAATATCCA**AT**GGCTCTCCAGTTTGTGCCATCTTTAT

M A L Q F V P I F M

11 **F M I I L F M L L N L L** K K L F Q R S T K K L P P G P F K F

71D97 N-change >

91 GTTCATGATCATCCTTTTCATGCTTCTCAATCTACTCAAAAAATTGTTCAAAGGTCCACTAAAAA**CTTCTCCAGGGCCATCAAGTT**

181 **TCCCATAGTTGGAACTTGTTACAAGTGACTGGTGGACTCCCTCACCGCGTCTCTACAACCTATCGAAAACCTCATGGCCCTCTCATGCA**

41 P I V G N L L Q V T G G L P H R R L Y N L S K T H G P L M H

271 CCTACAACCTGGTGAAGTCTCCGCTGTTGTAATCTCAAATCCTAGAGTGGCTAAAGAGTTCTGAAAACCTCATGATCTTTGTTTGTCTGA

71 L Q L G E V S A V V I S N P R V A K E V L K T H D L C F A D

361 CCGTCCAACACTACTACTTGAAAAATTTGTTGTTGCCAATTGTAGAGACATAGTTTGGCTAAGTATGGTGAACACTGGAGGCAATTCCG

101 R P T L L L G N I V L S N C R D I V L A K Y G E H W R Q F R

451 AAAAAATTTGTACCTTGGAGCTCTTGAGTGTAGCAAAGTTAGGTCTTTCAGAACTATTCGTGAGGAGGAGGCTTCGGATCTTATTCAATC

131 K I C T L E L L S A S K V R S F R T I R E E E A S D L I Q S

541 CATTCAATCAACTTCAGGATCTCCAGTCAATGTTAGCGAAAAGGTTTCTCATTTGGCTAACTCGATAACTGCAGGTCTACAATTGGAAA

161 I Q S T S G S P V N V S E K V S H L A N S I T C R S T I G K

631 GAGATACAAGTATGAACATGAACCTCATCGAGGCTACTGAAAATATAGCCTATTGGGGTGTGGTTTTTTTATGGCTGATTTGTTCCCTTC

191 R Y K Y E H E L I E A T E N I A Y W G A G F F M A D L F P S

71D97 5'RT >

721 TATGCTAGTTTTTCCATTTCTTAGTGAATGAAACCTGCACATAAAAA**AGATTAGCGGGACCTTGAT**CATATTTTGGATTACATAATTA

221 M L V F P I L S G M K P A L K K I R R D L D H I F D Y I I N

811 CGAGCACAAGGAAAAGTTGGCTAGTAGAAAAGATCAAGGAACCAAACTTGATGCTGAGGAGGAAGACCTTGTGATATTCTATTGAGGAT

251 E H K E K L A S R K D Q G T K L D A E E E D L V D I L L R I
 901 TAACGATACTCTGCAACTTGAATTTCTGTACTTCCAACGACATCCAAGGCATCGTTCAGGATATGTTCCACCGGGAACTGATACGTC
 281 N D T L Q L E F P V T S N D I Q G I V Q D M F T A G T D T S
 991 TTCAGCAGTCTGGAATGGGCAATGTCAGAGTTGATGAAAAACCAAGCGCAATGAAAAAGGCACAAGATGAACCTGAGAAATGCACCTAAG
 311 S A V L E W A M S E L M K K P S A M K K A Q D E L R N A L R
 1081 AGGAAAGGAAAGAATTTGTGAAGCTGATATTCAGGGATTGACTTACCTAAAGCTAGTGATCAAAGAAACGCTACGTTTACATCCACCAGT
 341 G K E R I C E A D I Q G L T Y L K L V I K E T L R L H P P V
 1171 TCCACTACTACTCCCTAGAGAATGTAGAAAAGAGTGCGAAATAGATGGATACACTATTCCAGTTGGAACCAAAGTCATGGTAAATGCATG
 371 P L L L P R E C R K E C E I D G Y T I P V G T K V M V N A W
 1261 GGCTATCGGAAGAGATCCAGATTATTGGGTTGATGCTGACAGTTTCATTCCGGAAAGGTTTGTGGAAGTTCAGTTAATTATAATGGTGC
 401 A I G R D P D Y W V D A D S F I P E R F D G S S V N Y N G A
 1351 TAACTTTGAGTACATTCGGTTTGGTGTGACGAAAGGATGTGCGCTGGAATCACATTCGGCATTGCTAGTATTGAGCTTCCTCTTGCTCA
 431 N F E Y I P F G A G R R M C A G I T F G I A S I E L P L A Q
 1441 ACTACTCTATCACTTTGACTGGACACTTCCTAATGGAATGAAGCCGGAAGATTTGGACATGGATGAAACATTCGGAGCAACTACTAAAAG
 461 L L Y H F D W T L P N G M K P E D L D M D E T F G A T T K R
 1531 AAAGAACAGCTTGGTTTTGAATGTCACCTTCTCACATTTCCAGCCTGGAAGAA TGAATAAACAAGTTATTTTAGCGAA
 491 K N S L V L N V T S H I S S L E E *

gDNA-Sequenz

1 GTACGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTCATCCATATATCACAAACAACTTACAGATACATTTA
 91 AATTGTCTAAATATCCAATGGCTCTCCAGTTTGTGCCATCTTTATGTTTATGATCATCCTTTTCATGCTTCTCAATCTACTCAAAAAAT
 181 TGTTTCAAAGATCCACTAAAAAATTCCTCCAGGGCCATTCAAAGTTCCCATAGTTGGAAACTTGTACAAAGTACTGGTGGACTCCCTC
 271 ACCGCCGTCTCTACAACCTATCGAAAACCTATGGCCCTCTCATGCACCTACAACCTGGTGAAGTCTCTGCTGTTGTAATCTCAAACTCTA
 361 GAGTGGCTAAAGAAGTTCTGAAAACCTATGATCTTTGTTTTGCTGACCGTCCAACACTACTACTTGAAATATTGTTGTCCAATTGTA
 451 GAGACATAGTTTTGGCTAAGTATGGTGAACACTGGAGGCAATTCGAAAAATTTGTACCTTGGAGCTCTTGAGTCTAGCAAAGTTAGGT
 541 CTTTCAGAACTATTCGTGAGGAGGAGGCTTCGGATCTTATTCAATCCATTCAATCAACTTCAGGATCTCCAGTCAATGTTAGCGAAAAAG
 631 TTTCTCATTTGGCTAATCGATAACTTGCAGGTCTACAATTGGAAGAGATGCAAGTATGAACATGAACTCATCGAGGCTACTGAAAAATA
 721 TAGCCTATTGGGGTCTGGTTTTTTTTATGGCTGATTTGTTTCTCTATGCTAGTTTTTCTGTTCTTAGTGGAAATGAAACCTGCACTAA
 811 AAAAGATTAGGCGGACCTTGATCATATTTTGTATTACATAATTAACGAGCACAAGGAAAAGTTGGCTAGTAGAAAAATCAAGGAACCA
 901 AACTTGATGCTGAGGAGGAAGACCTTGTGATATTTCTATTGAGGATTAACGATACTCTGCAACTTGAATTTCTGTTACTTCCAACGACA
 991 TCCAAGGCATCGTTCAGTAAAGTCATACCATTTCTTAAAAAATGCCCTTACTTTCGAGTTTCATCTAAAGCTTTAAATATTAGCAAGTA
 1081 ATTAAGTTAATTCACTCATTTTTCTTCTGGCAAATCATTTTGCTTACAATATTTTTATCATTGTACAGTATGTTCCACCGGGAACT
 1171 GATACGTCTCAGCAGTCTGGAATGGGCAATGTCAGAGTTGATGAAAAACCAAGCGCAATGAAAAAGGCACAAGATGAACCTGAGAAAT
 1261 GCACCTAAGAGGAAAGGAAAGAATTTGTGAAGCTGATATTCAGGGATTGACTTACCTAAAGCTAGTGATCAAAGAAACGCTACGTTTACAT
 1351 CCACCAGTTCCTACTACTCCCTAGAGAATGTAGAAAAGAGTGCGAAATAGATGGATACACTATTCCAGTTGGAACCAAAGTCATGGTA
 1441 AATGCATGGGCTATCGGAAGAGATCCAGATTATTGGGTTGATGCTGACAGTTTCATTCCGGAAAGGTTTGTGGAAGTTCAGTTAATTAT
 1531 AATGGTCTAACTTTGAGTACATTCGGTTTGGTGTGACGAAAGGATGTGCGCTGGAATCACATTCGGCATTGCTAGTATTGAGCTTCTC
 1621 CTTGCTCAACTACTCTATCACTTTGACTGGACACTTCCTAATGGAATGAAGCCGGAAGATTTGGACATGGATGAAACATTCGGAGCAACT
 1711 ACTAAAAGAAAGAACAGCTTGGTTTTGAATGTCACCTTCTCACATTTCCAGCCTGGAAGAA TGAATAAACAAGTTATTTTAGCGAAGGGAA
 1801 GAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATCGCCCTATAGGA

G.2.3 CYP71D98

cDNA-Sequenz einschließlich Bindungsstellen der wesentlicher Primer

```

                                71D98 5'ete >
1  ACTAATAGCGGCGGAATTCGCCCTTATGGAAATTACCATCCCTTTGCTGTGCATCTTCCCTCTTAGTTATCACTTTTCTTTTATTC
1  M E L P S P F A V A S S L L V I T F L L F
                                71D98 N-change >
91  ATATAGTAAAGAAATCGAAACAACAATCCAAATCTAATCTTCCTCCAGGGCTATGGAACTACCGGTCTTCGGAAATTTATTCCAAGTGG
22  H I V K K S K Q Q S K S N L P P G L W K L P V F G N L F Q V

181 CTGGAAAAATCCACACCGCGTCTCAGAAAAC TAGCTGATAAATTTGGACCTCTTATGCACCTCCAAC TCGGTGAAATTTCCGCTATTG
52  A G K I P H R G L R K L A D K F G P L M H L Q L G E I S A I

271 TGATATCGGATCCCAGGGTTGCCAAAGAAGTACTAAGAACACATGATCTTGCATTTGCGGACAGACCAGTAGTGTGCTAGGCAATATTA
82  V I S D P R V A K E V L R T H D L A F A D R P V V L L G N I

361 TTTTGGCAAATTCGGAGACATAGTTCTGGCTCTTTATGGTGATTATTGGAGACAGATGCGAAAAATTTGCACCTTTAGAACTTTTAAAGT
112  I L A N C R D I V L A L Y G D Y W R Q M R K I C T L E L L S

451 CAAATAAAGTAAGTCTTTTCGTTCAATCCGGGAGGATGAGACATGGAAGCTAATTCAATCCATCAAATATCTTCGGGATCATCACTAG
142  A N K V R S F R S I R E D E T W K L I Q S I K L S S G S S L

541 TTGATGTGAGTCATAAGGTTTCTGCATTGGCCAACGCAGTAACTTGTAGGGCTACAATTGGACAGGCCTGCAAGTACCAAGATGAGCTCA
172  V D V S H K V S A L A N A V T C R A T I G Q A C K Y Q D E L

631 TCGAGCTAGTTGAAGAAATAGCTTACCTCGGTTCAAGTTTTTTCTGGCTGATTTATTTCTTCAATATTTTTTCTTCCAACGCTTAGTG
202  I E L V E E I A Y L G S G F F L A D L F P S I F F L P T L S

721 GGATGAAGCCTGCATTGAAGAAGATAAGGAAAAAGCTTGACGTTATCTTTGATAATATTATCAAGGAGCATAATGATAAGTTGAGCAGGA
232  G M K P A L K K I R K K L D V I F D N I I K E H N D K L S R

811 GGAAAAAGGATCTGAAATCGATGCTGAAGAGGAAGATTTGGTCGACGTACTTTTGAGAATCAATGACAGTCAGCGCCTTGAGTTTCCCA
262  R K K G S E I D A E E E D L V D V L L R I N D S Q R L E F P

901 TTTTCATCTGGTGACATCCAAGGCCTTGTCTTGGACATGCTTACTGTGGAAGTACACATCTTCAGCAGTACTTGAATGGGCTATGTCAG
292  I S S G D I Q G L V L D M L T A G T D T S S A V L E W A M S

991 AGTTGATGAGAAACCCGAAGGTAATGAAAAAGTCCAATCTGAAGTAAGAGAGGTAGTGAAGGAAAAGAAAAAATTGAAGAAGCAGATA
322  E L M R N P K V M K K V Q S E V R E V V K G K E K I E E A D

1081 TACAGAACATGAGTTACCTAAAACCTTGTGGTAAAAGAAACACTACGTTTACATGCACCTGTTCCACTATTGCTACCAAGAGAATGTAGAA
352  I Q N M S Y L K L V V K E T L R L H A P V P L L L P R E C R

1171 AAGAATGTGAGATTAATGGATACACTATTCTGTGTTGGAACCAAAGTCATGGTAAACGTATGGGCTATTGCAAGAGATCCTGAGTGTGGG
382  K E C E I N G Y T I P V G T K V M V N V W A I A R D P E C W

1261 ATGATGCTGAAAGTTTTATCCCGGAGAGGTTTCGAGAATAGTTCAAGTTGATTATATTGGAGCAAACCTTGAGTTTCTTCCATTTGGGGCTG
412  D D A E S F I P E R F E N S S V D Y I G A N F E F L P F G A

1351 GCCGGAGGATGTGTGCGGGAATCTCATTCGGTATAGCTACAGTTGAGCTTCTCTAGCTCAATTACTGCACTCCTTTGACTGGAAGCTGC
442  G R R M A A G I S F G I A T V E L P L A Q L L H S F D W K L

1441 CTAATGAAATGAAGCCGGAAGATTTGGACATGGATGAGACAAATGCAGCTACTTGAAGAGAAAGAATAATCTTATGCTTATTGCCACAG
472  P N E M K P E D L D M D E T N A A T C K R K N N L M L I A T

                                < 71D98 3'ete
1531 ATTGCAGTCACACAATCGAATCCGTGACTGAAGTAAGCTAAAGCCAGAAGGGCGAATCGTAGCTGAAGATT
502  D C S H T I E S V T E V S *
```

gDNA-Sequenz

1 ACTAATAGCGGCGCGAATTTCGCCCTTATGGAAATTACCATCTCCCTTTGCTGTTGCATCTCCCTCTTAGTTATCACTTTTCTTTTATTTTC
91 ATATAGTAAAGAAATCGAAACAACAATCCAAATCTAATCTTCTCCAGGGCTATGGAACTACCGGTCTTCGGAAATTTATTCCAAGTGG
181 CTGAAAAAATTCACACCGCGGTCTCAGAAAACTAGCTGATAAATTTGGACCTCTTATGCACCTCCAACCTCGGTGAAATTTCCGCTATTG
271 TGATATCGGATCCCAGGGTTGCCAAAGAAGTACTAAGAACACATGATCTTGCATTTGCGGACAGACCAGTAGTGTGCTAGGCAATATTA
361 TTTTGGCAAATTGCCGAGACATAGTTCTGGCTCTTTATGGTGATTATTGGAGACAGATGCGAAAAATTTGCACCTTAGAACTTTTAAGTG
451 CAAATAAAGTAAGTCTTTTCGTTCAATCCGGGAGGATGAGACATGGAAGCTAATTCATCCATCAAATTTCTTCGGGATCATCACTAG
541 TTGATGTGAGTCATAAGTTTCTGCATTGGCCAACGCAGTAACTTTAGGGCTACAATTGGACAGGCTGCAAGTACCAAGATGAGCTCA
631 TCGAGCTAGTTGAAGAAATAGCTTACCTCGGTTCCAGGTTTTTCTTGGCTGATTTATTTCTTCAATATTTTTCTTCCAACGCTTAGTG
721 GGATGAAGCTGCATTGAAGAAGATAAGGAAAAAGCTTGACGTTATCTTTGATAATATTATCAAGGAGCATAATGATAAGTTGAGCAGGA
811 GGAAAAAGGATCTGAAATCGATGCTGAAGAGGAAGATTTGGTCGACGTACTTTTGGAGAATCAATGACAGTCAGCGCCTTGAGTTTCCCA
901 TTTTATCTGGTGACATCCAAGGCTTGTCTTCTGTAAGCTTCTTGTATATTTAACTCATTTTTATTGTAAATTTCTTCTTAGAACCAAAG
991 ATTTATCATGATTTTCGTATTGCAGGACATGCTTACTGCTGGAAGTACACATCTTCAGCAGTACTTGAATGGGCTATGTCAGAGTTGAT
1081 GAGAAACCCGAAGTAAATGAAAAAGTCCAATCTGAAGTAAGAGAGGTAGTGAAAGGAAAAAGAAAAAATTGAAGAAGCAGATATACAGAA
1171 CATGAGTTACCTAAAACCTTGTGGTAAAAGAAACACTACGTTTACATGCACCTGTCCACTATTGCTACCAAGAGAATGTAGAAAAGAATG
1261 TGAGATTAATGGATACACTATTCTCTTGGAAACAAAGTATGGTAAACGTATGGGCTATTGCAAGAGATCCTGAGTGTGGGATGATGC
1351 TGAAAGTTTTATCCCGAGAGGTTGAGAAATAGTTAGTTGATTATATTGGAGCAAACCTTGAGTTTCTTCCATTTGGGGCTGGCCGGAG
1441 GATGTGTGCGGGAATCTCATTCGGTATAGCTACAGTTAGCTTCTCTAGCTCAATTACTGCACCTCTTACTGGAAGCTGCCTAATGA
1531 AATGAAGCCGGAAGATTTGGACATGGATGAGACAAATGCAGCTACTTGCAAGAGAAAGAATAATCTTATGCTTATTGCCACAGATTGCAG
1621 TCACACAATCGAATCCGTGACTGAAGTAAGC TAAAGCCAGAAGGGCGAATCGTAGCTGAAGATT

G.2.4 CYP71AJ1

gDNA-Sequenz mit Primern für die Transkript- und gDNA-Analyse

71AJ1 5'ete
1 GCAGAGTGCAGAGCAATAGAAATGAAGATGCTGGAACAGAATCCCCAGTACCTGTATTTCTTTTCATTGTTTCTTGTGCACAATATTTCTG
91 TACAAATGGTTAACACTGAAGAAAACACCCCTTGAAAAATCTGCCACCTTCTCCACCACAATATCCCATAAATTGGAAACCTTTCATCAAAT
181 GGTCCAGACCCGCAAGCATCACTCAGAGACTTGGCTCAAAGTATGGTCCCTCTAATGTTTCTTAAGTTTGGGACTGTACCTGTCTTGT
271 GTTTCTTCAGCTGATGCAGCTCGTGAGGCTTTGAAAACCCATGATCTTGTTTTTCGCAGACCGGCCTTATTCAAGTGTGGCCAATAAAATC
361 TTCTACAATGGGAAGGACATGGTGTGTTGCTCGTTTACTGAAATATTGGAGACAAGTAAAGAGTATCTGCGTTACTCAGCTCCTAAGTAAC
451 AAAAGGGTTAATCTTTTCACTATGTCAGAGAAGAAGAAGTTGATCTTTTAGTCCAAAATCTCGAAAATTTCTATTGAAAAGTAGCAAAT
541 TTAAGTGAAGTGAATCGAAGTAACTGGCAATGTAGTCTGCAGGTTTTCAGTAGGAAGTGGTGACAAAGTGATTCATACAGATTTTA
631 ATCTGGAATAATGGATATGTTAGGCTATTCCCGCAGCATAGAGGATTTTTTCCATTGCTCGGTTGGGTTGATTGGCTTACTGGATTG
721 AGGGGAAAGGTTGCGGAAGCAGCCAAAGGGTTGATACTTTTCTGGAAGGTGTTCTTAAAGAACATCTAAGTACTACTGGATCCAAATAC
71AJ1 Intron >
811 AATGACTTTGTATCCATTTTGCTCGAGATTCAGAGGCAGATGC

901 AGTAACAAATCTTTCTCTTATTTACACACTAAAGTGAAAATTTGGGAGTCTGGACACCCTTTTACGGTAAACCTGAACACTCTTTTGA

991 CACAAACACTCGCGCAAAGTGTCTTTCTCTACACACAAATGTAATTTTATATACACCACCTCTATCGCAAATTTAGCGCAGATTTCCC

1081 CCACGCGCACACGTGCACAATATGTGAGAACACTCTCGCCCCATGCTCATTTCTATCCGCGGAGATATTGAAAAAATCATAACACACA

1171 CTCGCGCCCCAAAAACACAAACGACTCTAAAAGAGTACCCCTTTTCTCACGCGCATTAACTGTTCTCAAATTTGATTTGACTCTCTC

1261 TTGAAACTAGGAGAATAACATGTCCAATTTTCAAATTTAATCTTTACCACCTAACATTTAAATTTATAAACTTAAAATTTATTTAATCCTTT

1351 ACGGGGTTATAAACTTCTTGTAGGATATGTTGGGTGCCGGAACGAAACAATATCGACAGCTTTGGAGTGGACACTAGCAGCGCTAATAA

1441 AAAATCCGGACGCCATGTTCAAATGCAAAATGAGGTCAGAGAAATGGCAAAGGCAAATCAAAGATATCAGAGGCTGATCTAGTCAAAA

1531 TGAACCTACCTGCAAGCAGTAATGAAAGAGAGCATGCGATTGTATTTTACAGCCCCACTACTAGTTCTTAGAGAAGCGAGGCAGGACATAA

1621 AATTTATGGGGTATGACATAAGCTCAGGAACACAAGTACTGATAAATGCATGGGCAATGCAAGAGACCCCTTTATTTGGGACAAAACGAG

1711 AGGAGTTCGGCCCTGAGAGGTTCTTGAATAGTCTATTGATTACAAAGGCTTTCACTATGAGTTTCTCCCTTTGGAGCCGGTCGGAGGG

1801 GTTGCTCTGGTATCCAGTTTGCAATGTGTATTAATGAGCTTGTAGTGGCAAATCTTGTGCACAAGTTAATTTGCAATTGCCTGATGGGA

< 71AJ1 3'ete

1891 AAAGATTGGAAGATTTGGATATGACTGCTGCCAGTGGCATTACTCTTCGTAATAAATCCTCTCTTGGTGGTTGCCAGACCACATGTTT

1981 GATTTCTTAATTTTCACTTGCAGTTGCTTTGGGGATGCATGCAACTGAAGACTCCTTTTGCCTTGATAGATTATCTTTTACTCAAACCTGT

2071 TCTATTAGCCTATAAATAAAATGTTAATGAAGGCCAGCCTTCATGCCATGTCAATACTCATTCCCAGCTCAAAATTTCTCAACTCTGCA

2161 TAAAGCAACATTTTGTAAAGGCTAAGAGAGGCCCTTCGGGCATTCTCCACCACCTTATGATTCTATCCATTAAGTGTAAATATGTCTATCAA

2251 TTTATGTAAAACGCAAGGATCTAATTACATTTCTATACA

G.3 Übersicht der verwendeten Primer

Tab. 27: Sequenzen und Referenzen der verwendeten Primer

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Referenz
Standard-Primer		
3AP	GGCCACGCGTCGACTAGTAC (T) ₁₇	Invitrogen, Karlsruhe
3AP Anchor	GGCCACGCGTCGACTAGTAC	
AAP	GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGIIGGGIIGGGIIG	
AUAP	GGCCACGCGTCGACTAGTAC	
Random Primers		
ACP-Primer		
dT-ACPI	CTGTGAATGCTGCGACTACGAT (I) ₅ (T) ₁₈	ACP™-Technologie, (Seegene, Korea)
dT-ACP2	CTGTGAATGCTGCGACTACGAT (I) ₅ (T) ₁₅	
mACP 1	GTCTACCAGGCATTTCGCCTTCAT (I) ₅ TWYNDNCCNTCNMG	Sandra Kellner Institut für pharmazeut. Biol. Universität Marburg
mACP 2	GTCTACCAGGCATTTCGCCTTCAT (I) ₅ TWYNDNCCNGANMG	
mACP 3	GTCTACCAGGCATTTCGCCTTCAT (I) ₅ TWYNDNCCNCANMG	

mACP 4	GTCTACCAGGCATTTCGCCTTCAT (I) ₅ TGGNDNCCNTCNMG	
mACP 5	GTCTACCAGGCATTTCGCCTTCAT (I) ₅ TGGNDNCCNGANMG	
mACP 6	GTCTACCAGGCATTTCGCCTTCAT (I) ₅ TGGNDNCCNCANMG	
Genspezifische Primer		
18S rRNA forward	AGGAATTGACGGAAGGGCAC	Oliveira <i>et al.</i> (2004)
18S rRNA revers	GCACATCTAAGGGCATCACA	
73A41 5'ete	ACATGATGGACTTTGTTCTGTTAGAG	Sandra Kellner Institut für pharmazeut. Biol. Universität Marburg
73A41 3'ete	GGTATAATGGTATCAAGTCCACC	
73A41 5'BamHI	CGGATCCACATGATGGACTTTGTTCTGTT	
73A41 3'EcoRI	CGAATTCGGTATAATGGTATCAAGTCCACC	
71AJ1 5'ete	ATGAAGATGCTGGAACAGAATCCCCAG	
71AJ1 3'ete	TCAAACATGTGGTCTGGCAACCACC	
71AJ1 Intron	CCATTTTGCTCGAGATTCAGGAGGCAGATGC	
BOMT 5'ete	GCCAAAACCTGAATCAATGGCAG	
BOMT 3'ete	CCGAACATGGAACAATCTTCCTTCC	
CPR 5' <u>BamHI</u>	<u>CGGATCCCAATGGCTGGTGAGAGCTTGGCCACGTC</u> ACTACC	
CPR 3' <u>SalI</u>	GGAGT <u>CGAC</u> CCTCTACATAACCAAGGTCGGCTGCACTGG	
73A1 5'ete	ATGGACCTCCTCCTCATAGAA	
73A1 5' <u>BamHI</u>	<u>GGATCC</u> ATGGACCTCCTCCTCATAGA	
73A1 5' <u>HindIII</u>	ATTAAGCTTATGGACCTCCTCCTCATAGA	
73A1 5' <u>EcoRI</u>	ATGAATTCATGGACCTCCTCCTCATAGA	
73A1 5' <u>BglII</u>	CCAGATCTATGGACCTCCTCCTCATAGA	
73A1 3'ete	TTAAAATGACCTAGGTTTAGCTACG	
mACP2 5.a	CCATTCACAGTCTCATCGTC	
mACP2 5.0	CGATGTCCCTCAAATCTCGTCCCAGCAG	
mACP2 5.01	CTCCACAGTCGTTAGTCCTAGGTG	
71AZ1 5'ete	AGAATGCAGATGGATGCAGT	
71AZ1 3'ete	TTATGAAAACATATATGTTTTAGGTCG	
71AZ1 5' <u>HindIII</u>	GCAAGCTTAGAATGCAGATGGATGCAGT	
71AZ1 3' <u>XhoI</u>	ATCTCGAGTTATGAAAACATATATGTTTTAGGTCG	
71AZ1 3' <u>XhoI</u> (-Stop)	ATCTCGAGTGAAAACATATATGTTTTAGGTCG	
71AZ1 5' <u>BamHI</u>	CTGGATCCATCTTCTTCACATTGCAGAA	
71AZ1 3' <u>KpnI</u>	CTGGTACCGAAAAATCTTCCATTGCCAAA	
71AZ1 5'RT	TCTGGGCAATGACAGCATTA	
71AZ1 3'RT	AAATCTCGTCCCAACAGGTG	
71AZ1 Intron	GGTGATACGAGTAGGTGCTTTTGTAGA	
C54 5.0	CCAGCACCCCAATAGGCTATATTTTCAGTAGCC	
C54 5.1	CGATGAGTTCATGTTTCATACTTGCATC	
C54 5.2	CCAATTGTAGACCTGCCAGTTATCGAG	

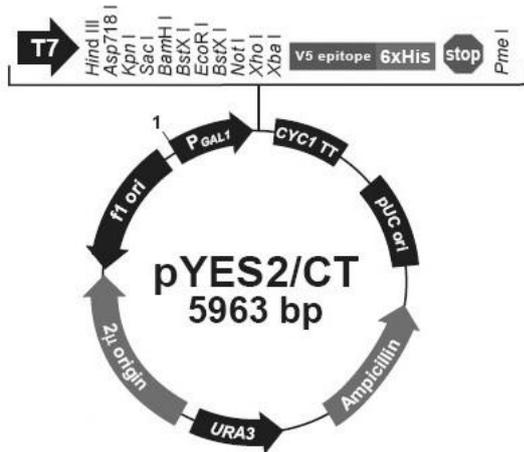
C54 5.3	C GCGGTGAACATATCCTGAACGATGCCTTGGAT
71D97 5'ete	CATCCATATATCACAACAAACAC
71D97 3'ete	CCC-Anker TTCGCTAAAATAACTTGTTT
71D97 5' <u>HindIII</u>	GCAAGCTTCATCCATATATCACAACAAACAC
71D97 3' <u>XhoI</u>	ATCTCGAGTTCGCTAAAATAACTTGTTT
71D97 3' <u>XhoI</u> (-Stop)	ATCTCGAGTTCCTCCAGGCTGGAAATGTGAG
71D97 5' <u>BamHI</u>	GGATCCCCAATGGCTCTCCAGTTTGT
71D97 3' <u>EcoRI</u>	GAATTCATTCATTCTCCAGGCTGG
71D97 5'RT	AGATTAGGCGGGACCTTGAT
71D97 3'RT	CGATAGCCCATGCATTTACC
Cyb3.1 5.0	GCAAGTAGCTGCATTTGTCTCATCCAT
Cyb3.1 5.1	CCGGCTTCATTTATTAGGCAG
Cyb3.1 5.2	GCTATACCGAATGAGATTCCCGCAC
71D98 5'ete	ATGGAATTACCATCTCCCTTTGCTGTTGC
71D98 3'ete	CTGGCTTTAGCTTACTTCAGTCACGGATTCCG
71D98 5' <u>EcoRI</u>	CGAATTCGCAATGGAATTACCATCTCCC
71D98 3' <u>NotI</u>	AGCGGCCCGCTGGCTTTAGCTTACTTCAGTCACGGATTCCG
71D98 3' <u>NotI</u> (-Stop)	ATCGGCCGCTTACTTCAGTCACGGATTCCG
D98 5' <u>BglII</u>	CCAGATCTGAATTCGCCCTTATGGAAT
D98 3' <u>KpnI</u>	GTGGTACCTTCTGGCTTTAGCTTACTT

Mutagenese Primer (Fettdruck: gegenüber der Originalsequenz veränderte Nukleotide)

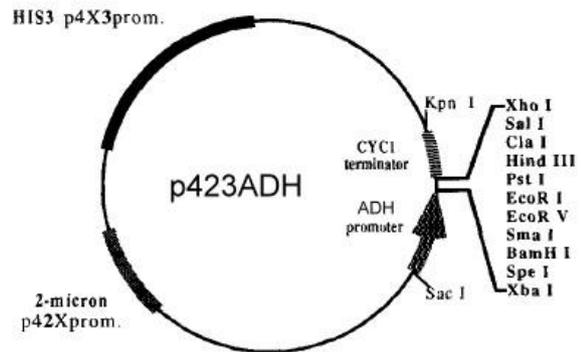
71AZ1 N-catch	CGGAAGGCCTGGTGGACCGGGTGG GAGCTTGAATTTTTTACC GCGG	Sandra Kellner Institut für pharmazeut. Biol. Universität Marburg
71AZ1 N-change	ATGGACCTCCTCCTCATAGAAAAACCCTCGTCGCCTTATTCGCCG CCATTATCGGCGCAATAC TAATCTCCAAAC TCCGCGGTAAAAAATT CAAGCTCCACCCGGTCCACCAGGCCTTCCG	
71D97 N-catch	GGGAAACTTGAATGGCCCTGGAGG GAGCTTGAATTTTTTACC GCGG	
71D97 N-change	ATGGACCTCCTCCTCATAGAAAAACCCTCGTCGCCTTATTCGCCG CCATTATCGGCGCAATAC TAATCTCCAAAC TCCGCGGTAAAAAATT CAAGCTCCCTCCAGGGCCATTC AAGTTTCC	
71D98 N-catch	CGGTAGTTTCCATAGCCCTGGAGG GAGCTTGAATTTTTTACC GCGG	
71D98 N-change	ATGGACCTCCTCCTCATAGAAAAACCCTCGTCGCCTTATTCGCCG CCATTATCGGCGCAATAC TAATCTCCAAAC TCCGCGGTAAAAAATT CAAGCTCCCTCCAGGGCTATGGAACTACCG	
71AJ1 M120V for	CCAATAAAATCTTCTACAATGGGAAGGAC GT CGTGTGTTGCTCGTTA CACTGAATATTGG	Joachim Hans, Sandra Kellner Institut für pharmazeut. Biol. Universität Marburg
71AJ1 M120V rev	CCAATATTCAGTGTAACGAGCAAACAC GAC GTCCCTCCCATTGTAG AAGATTTTTATTGG	

G.4 Vektorkarten

Hefeexpressionsvektor pYES2/CT
(Invitrogen, Leek, Niederlande)



Hefeexpressionsvektor p423ADH
(Mumberg *et al.*, 1995)



Hefeexpressionsvektor pYeDP60
(Pompon *et al.*, 1996)

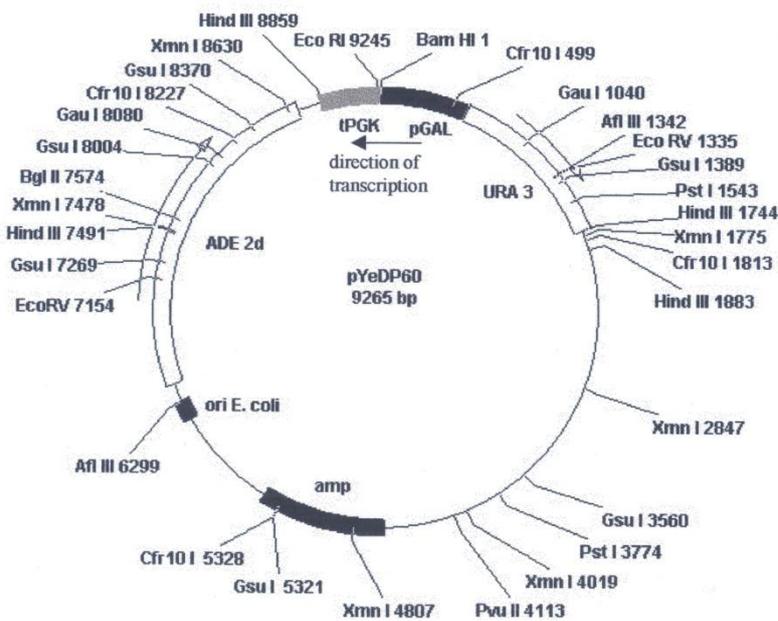
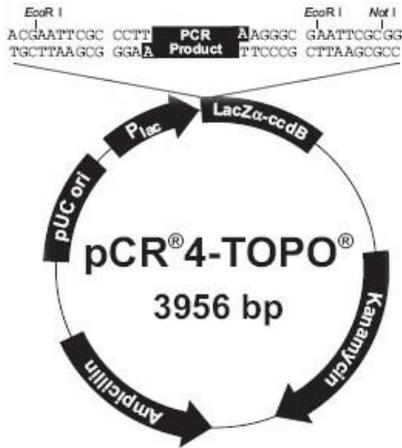


Abb. 50: Hefeexpressionsvektoren

Klonierungsvektor pCR®4-TOPO
(Invitrogen, Leek, Niederlande)



Klonierungsvektor pGem®-T
(Promega, Mannheim)

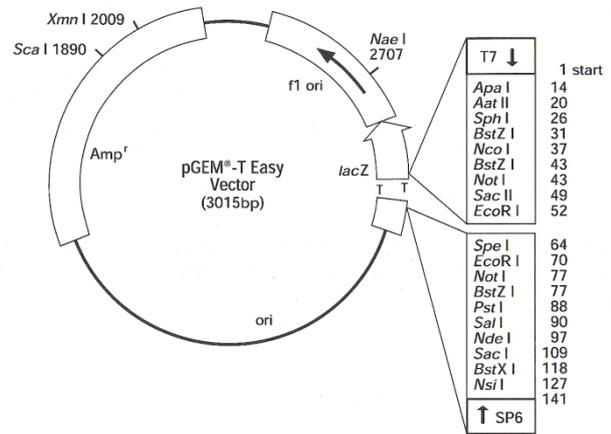


Abb. 51: Klonierungsvektoren

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Ulrich Matern danke ich für die Möglichkeit, in seinem Arbeitskreis meine Promotionsarbeit anfertigen zu dürfen, für die anspruchsvolle und interessante Promotions-Thematik und für die anregenden Diskussionspunkte.

Frau Prof. Dr. Petersen danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens, für das entgegengebrachte Vertrauen in den Praktika und für das ‚Lächeln‘ zwischendurch.

Herrn Dr. Joachim Hans danke ich für seine stete Hilfsbereitschaft, für den Schokoladenvorrat und die kameradschaftliche Atmosphäre in unserer Arbeitsgruppe sowie für meine Teilnahme an einer Fachtagung, was ohne seinen Einsatz nicht möglich gewesen wäre.

Der Forschungsgruppe von Frederic Bourgaud an der ENSAIA (Nancy, France) danke ich für die kooperative Zusammenarbeit, insbesondere Daniele Werck-Reichhart für die Überlassung des Klons CYP73A41. Herrn Prof. Dr. Thorsten Nürnberger danke ich für die Überlassung des Elicitors Pep-13.

Herrn Dr. Dieter Kreusch danke ich für das wöchentliche Frühstück und für die Initiative zu gemeinschaftlichen Veranstaltungen.

Ein ganz besonderer Dank gilt Herrn Rudel, welcher sich liebevoll und voller Einsatz um *Ammi majus* gekümmert hat.

Für die Durchsicht dieser Arbeit danke ich Dr. Joachim Hans, Stefan Anders und Maggie Hartmann.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern, meinem Bruder Stefan, meiner Schwägerin Maggie und meinem Freund Tristan für ihre grenzenlose Unterstützung. Sie waren immer für mich da, ihrer Liebe habe ich die Festigung meiner inneren Stärke zu verdanken. Diesen Menschen ist meine Dissertation gewidmet.

Für die finanzielle Unterstützung danke ich der DFG.

Curriculum vitae

Persönliche Daten:

Name: Sandra Simone Kellner
Geburtsdatum/-ort: 27.01.1975, München
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung:

07/1994 Anger-Gymnasium, München
Abschluss: allgemeine Hochschulreife

Berufsausbildung und Studium

10/1996 – 01/2003 Technische Universität München-Weihenstephan, München
Studium der Gartenbauwissenschaften
Diplomarbeit: „Molekularbiologische Untersuchungen und
Charakterisierung der Flavonoidbiosynthese bei
Hieracium pilosella“
Abschluss: Dipl.-Ing. agr. (Univ.)

08/2003 – 11/2008 Philipps-Universität, Marburg
Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für pharmazeutische
Biologie
Promotionsthema: „Molekulare und biochemische Aspekte der
Furanocumarin-Biosynthese in *Ammi majus* L.“

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

Molekulare und biochemische Aspekte der Furanocumarinbiosynthese in *Ammi majus* L.

selbstständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Siegen, den 12. September, 2008

A handwritten signature in blue ink that reads "Helene Sandra". The signature is written in a cursive, flowing style.