Molekulare und entwicklungsbiologische Charakterisierung von Schlüsselenzymen der Naturstoffbiosynthese in Drüsenhaaren der Sonnenblume

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

Fakultät Naturwissenschaften Universität Hohenheim

Institut für Botanik

vorgelegt von Jens Christian Göpfert

> aus Sindelfingen 2008

Dekan:	Prof. Dr. Heinz Breer
1. berichtende Person:	Prof. Dr. Otmar Spring
2. berichtende Person:	Prof. Dr. Andreas Schaller
Eingereicht am:	22. Januar 2008
Tag der mündlichen Prüfung:	04. Juni 2008

Die vorliegende Arbeit wurde am 15.05.2008 von der Fakultät Naturwissenschaften der Universität Hohenheim als "Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften" angenommen.

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abbildun	igsverzeichnis	4
Verzeichnis der Tabellen		
Abkürzu	ngsverzeichnis	6
1 Einlei	tung	9
1.1	Die Terpenbiosynthese in Pflanzen	.10
1.2	Terpensynthasen, die Schlüsselenzyme der Terpenbiosynthese	.15
1.3	Sesquiterpene	.16
1.3.1	Vorkommen und Funktion	.16
1.3.2	Biosynthese der Sesquiterpene durch Sesquiterpensynthasen	. 17
1.3.3	Sesquiterpenlactone	.18
1.3.3.1	Biosynthese des Sesquiterpenlacton-Grundgerüstes	.19
1.3.3.2	Sesquiterpenlactone der Sonnenblume H. annuus und des Kultivars HA300	.20
1.4	Glanduläre Trichome	.21
1.4.1	Biosynthese von Sesquiterpenlactonen in den Drüsenhaaren der Sonnenblume	.22
1.5	Ziel dieser Arbeit	.24
2 Mate	rial und Methoden	.25
2.1	Pflanzenmaterial	.25
2.1.1	Helianthus annuus HA300	.25
2.1.2	Helianthus annuus L. Wildtyp	.25
2.1.3	Lactuca sativa	.25
2.2	Chemikalien	.25
2.3	Isolation der fluoreszierenden Hauptkomponente in den Cuticularblasen der	
	glandulären Trichome	.26
2.3.1	Extraktion und Aufreinigung von 5-Deoxynevadensin	.26
2.3.2	Strukturidentifikation durch HRMS und NMR	.27
2.3.3	Bestimmung des Gehalts an 7-hydroxy-6,8,4'-trimethoxyflavon pro Trichom	.27
2.4	Isolierung von Nukleinsäuren	.27
2.4.1	Isolierung von genomischer DNA	.27
2.4.2	Isolierung von Gesamt-RNA	.27
2.4.3	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	.28
2.5	DNA-Techniken	.29
2.5.1	Oligonukleotide	.29
2.5.2	Synthese von cDNA	.30
2.5.3	PCR	.30
2.5.3.1	Standard PCR-Programm	.31
2.5.3.2	PCR mit degenerierten Primern für Sesquiterpensynthasen	.31
2.5.3.3	3'- und 5'-RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)	.32
2.5.4	Identifizierung von CYP/1AVL aus Lactuca sativa	.33
2.5.5	Sequenzierung der genomischen DNA Bereiche für HaGAS1, HaGAS2 und HaCS	.34
2.5.6	Semiquantitative RI-PCR zur gewebe- und entwicklungs-spezifischen Expressions	- 35
257	Amplifikation und Restriktionsverdau von HaGAS1 und HaGAS2 aus Trichom- und	.00
2.0.1	Wurzel-cDNA	.36
2.5.8	Amplifikation des codierenden Bereiches der Sesquiterpensvnthasen HaGAS1.	
	HaGAS2 und HaCS zur Expression in <i>E. coli</i>	.37
2.5.9	Amplifikation der codierenden Bereiche der Sesquiterpensynthasen, CYP71AVS ur	nd
	CYP71AVL für die heterologe Expression in S. cerevisiae	.38

2.5.10	Klonierung der codierenden Sequenzabschnitte verschiedener Gene in Hefe-	
	Expressionsplasmide	.39
2.5.11	Kolonie-PCR	.40
2.5.12	DNA-Gelelektrophorese	.41
2.5.13	RNA-Elektrophorese	.41
2.5.14	Restriktionsverdau von PCR-Fragmenten und Plasmiden	.42
2.5.15	Ligation von DNA	.42
2.5.16	Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	.43
2.5.17	Klonierung von PCR-Fragmenten zur Sequenzierung	.43
2.5.18	Sequenzierung von DNA	.43
2.5.19	Software zur Auswertung von DNA- und Aminosäuresequenzen	.43
2.6	Mikrobiologische Methoden	.45
2.6.1	Bakterienstämme	.45
2.6.2	Plasmide für die Transformation von <i>E. coli</i>	.45
2.6.3	Medien für die Kultivierung und Selektion von Bakterien	.46
2.6.3.1	Antibiotika	.46
2.6.3.2	Kulturmedien	.46
2.6.4	Kultivierung von Bakterien	.46
2.6.5	Glycerinkulturen	.47
2.6.6	Transformation von Escherichia coli	.47
2.6.7	Saccharomyces cerevisiae EPY300	.47
2.6.8	Medien für die Kultivierung von S. cerevisiae	.48
2.6.9	Hefe-Transformation	.48
2.6.10	Glycerinkulturen von S. cerevisiae	.49
2.7	Protein-Techniken	.50
2.7.1	Isolation von Proteinen aus Pflanzenmaterial	.50
2.7.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	.50
2.7.3	Herstellung rekombinanter Sesquiterpensynthasen in E. coli	.51
2.7.3.1	Klonierung von Sesquiterpensynthasen in Expressionsplasmide	.51
2.7.3.2	Expressionsbedingungen der rekombinanten Sesguiterpensynthasen	.52
2.7.3.3	Aufreinigung der heterolg exprimierten Proteine	.53
2.7.3.4	In vitro Enzym-Substrat -Umsetzungsreaktionen mit rekombinanten	
	Sesquiterpensynthasen und dem Substrat Farnesylpyrophosphat	.54
2.7.3.5	Enterokinasebehandlung des rHaCS-Fusionsproteins	.54
2.7.4	Antikörperherstellung	.55
2.7.5	Immunologischer Nachweis von <i>H. annuus</i> Sesquiterpensynthasen durch Western	
	Blot	.55
2.7.6	Expression von Enzymen der Sesquiterpenbiosynthese in Hefen	.56
2.7.6.1	Extraktion der Produkte von HaGAS1. HaGAS2 und HaCS aus dem Kulturmedium	57
2.7.6.2	Extraktion und Nachweis der Germacren A-Carboxylsäure aus dem	•
	Hefezellpellet	.57
2.7.6.3	Aufreinigung membrangebundener Proteine aus S. cerevisiae	.57
2764	Nachweis der Expression von CYP71AVS in Hefen durch Western Blot	58
2765	Gaschromatographische Trennung der Produkte mittels GC-MS und GC-FID	59
277	Identifizierung der Produkte von HaGAS1 HaGAS2 und HaCS	60
১ ⊨rge l	DNISSE	.61
3.1	Flavonoidbiosynthese in den Trichomen der Sonnenblume	.61
3.1.1	Isolierung und Identifizierung von 5-Deoxynevadensin in den Trichomen von H.	
	annuus	.61

3.1.2	Entwicklungsabhängige Expression von Genen des Phenylpropanstoffwechsels	und
242	der Flavonoldbiosynthese in den glandularen michomen der Sonnenblume	03
3.1.3	Die genemischen DNA Sequenzen der Seguiternensunthesen und Identifizierun	00
3.1.4	Die genomischen DNA Sequenzen der Sesquiterpensyntnasen und identifizierun	ig cz
245	Versleich der genemischen Cerwanz von UpCAC1 und UpCAC2 mit den hemele	
3.1.5	Vergleich der genomischen Sequenz von HaGAST und HaGASZ mit den nomolo	gen
0 4 0	Genen eines wildtyps von <i>Hellantnus annuus</i>	68
3.1.6	Vergleich der Sequenzen von HaGAS1, HaGAS2 und HaCS mit anderen	70
	Sesquiterpensynthasen	70
3.2	Gewebespezifische Transkriptanalyse der Sesquiterpensynthasen	72
3.2.1	Nachweis der Transkripte von HaGAS1 und HaGAS2 in Trichomen und Wurzein	/3
3.2.2	Entwicklungsabhangige Expression der Sesquiterpensynthasen in den glandular	en
	Drusennaaren der Sonnenblume	/ 4
3.3	Funktionelle Analyse der Identifizierten Terpensyntnasen	/ /
3.3.1	Heterologe Expression von HaCS in <i>E. coll</i>	/ /
3.3.2	In vitro Enzym-Substrat Reaktion mit rHaCS	/ 8
3.3.3	Funktionelle <i>in vivo</i> Charakterisierung von HaCS in <i>S. cerevisiae</i>	79
3.3.4	Identifizierung der Produkte von HaCS durch Expression in Hefen	81
3.3.5	Antikorper gegen HaCS	84
3.3.6	Funktionelle Analyse rekombinanter Germacren A-Synthasen	86
3.3.7	Heterologe Expression von HaGAS1 und HaGAS2 in E. coli	86
3.3.8	Enzym-Substrat Reaktionen zur funktionellen <i>in vitro</i> Charakterisierung von HaG	AS1
	und HaGAS2	87
3.3.9	Heterologe Expression von HaGAS1 und HaGAS2 in S. cerevisiae	88
3.3.10	Funktionelle Analyse von HaGAS1 und HaGAS2 in vivo durch heterologe Expres	sion
	in Hefen	89
3.4	Identifizierung einer Germacren A-Monooxygenase	91
3.4.1	Biosynthese von Germacren A-Carboxylsäure in transgenen Heten	92
3.4.2	RT-PCR Analyse der CYP71AVS Transkripte	96
3.5	Hypothetische Reaktionsmechanismen für die Bildung von Sesquiterpenen in de	n a-
	Drüsenhaaren der Sonnenblume	97
4 Disk	ussion	101
4.1	Terpensynthasen, die Schlüsselenzyme der Terpenbiosynthese	101
42	Gewebe- und entwicklungsspezifische Expression von drei Sesquiterpen-syntha	sen
	der Sonnenblume	103
43	Expression und funktionelle Charakterisierung der Sesquiterpensynthasen der	
1.0	Sonnenblume	105
44	Zwei Germacren A-Synthasen aus Trichomen der Sonnenblume	106
4.5	Identifizierung des Biosyntheseschrittes von Germacren A zu Germacren A-	
4.0	Carboxylsäure	107
46	Die H annuus Cadinen-Synthase ist ein Multiproduktenzym	109
4.0	5-Deoxynevadensin in Drüsenhaaren der Sonnenblume	111
4.8	Aushlick	 113
F. 700		
5 Zusa	anninennassung	
7 Δnh	atuia	122
	ung	100
7.1	DNA-Sequenzen	133
7.2	Plasmidkarten	138

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1:	Beispiele von Terpenverbindungen verschiedener Klassen11
Abb. 1.2:	Darstellung der Reaktionsschritte des Mevalonat-Weges im Cytosol und des
	Methylerythritolphosphat-Weges in den Plastiden die zur Bildung von IPP und DMAPP
	führen, den Grundbausteinen der Terpene
Abb. 1.3:	Bildung der verschiedenen Sesquiterpen-Grundgerüste aus dem Substrat
	Farnesylpyrophosphat
Abb. 1.4:	Biosyntheseschritte der Bildung der STL-Grundgerüste aus FPP
Abb. 1.5:	Chemische Strukturen der sechs STL-Hauptkomponenten aus Drüsenhaaren von H.
	annuus HA300
Abb. 1.6:	Trichome von H. annuus HA300
Abb. 3.1:	Struktur von 7-hydroxy-6,8,4'-Trimethoxyflavon61
Abb. 3.2:	Absorptionsspektrum von 7-hydroxy-6,8,4'-Trimethoxyflavon und der
	Sesquiterpenlactonhauptkomponenten in den Trichomen von H. annuus HA30061
Abb. 3.3:	Differenzielle Genaktivität von Rubisco. PAL und der Chalkonsvnthase in verschiedenen
	Entwicklungsstadien der Drüsenhaare aus den Antherenanhängen der Sonnenblume64
Abb. 3.4:	PCR-Amplifikate aus cDNA von Trichomen mit degenerierten Primern für Sesquiterpen-
	synthasen
Abb. 3.5:	PCR-Amplifikation von cDNA und genomischer DNA mit spezifischen Primern für
	HaGAS1 67
Abb. 3.6:	Schematische Darstellung der Exon-Intron-Struktur von HaCS, HaGAS1 und HaGAS2
/ 1001 0101	vom Start- bis zum Stoppcodon des jeweiligen Gens
Abb 3.7 [.]	Vergleich der ersten drei Introns und Exons von HaGAS1 und HaGAS2 zwischen H
/ 100. 0.1 .	annuus cv. HA300 und einem Wildtyp von H annuus aus Arizona/USA 69
Abb 3.8 [.]	Vergleich der Aminosäuresquenzen zwischen verschiedenen Sesquiterpensynthasen 71
Δhh 3 9.	Transkrintanalyse der Sesquiternensynthasen in verschiedenen Gewebetynen der
Abb. 0.0.	Sonnenblume
∆hh 3 10·	Lage der Restriktionsschnittstellen von Dral und Paul auf dem codierenden
7.00.0.10.	Sequenzbereiche von HaGAS1 und HaGAS2
Δhh 3 11·	Nachweis der Expression von HaGAS1 und HaGAS2 in Trichomen und Wurzeln durch
Abb. 0.11.	Restriktasen 74
∆hh 3 12.	Differenzielle Genaktivität von Ubiquitin, der EPP-Synthase, HaGAS (1 und 2), sowie
ADD: 0.12.	Hans
Abb 3 13.	Schematische Darstellung des Expressionskonstruktes zur beterologen Expression der
ADD: 0.10.	Sesquiterpensynthesen von H annuus in E coli
Abb 3 11.	Aufreinigung von rHaCS durch Affinitätschromatographie
Abb 2 15	CC Analyse (Iononspur m/z 204) eines in vitre Umsetzungsvorsuchs von rHaCS mit dem
ADD: 5.15.	Substrat EPD
Abb 2 16.	CC Chromatogramme von Produkton der Sosquiternensynthase HaCS durch Expression
ADD: 5.10.	in Lefon
Abb 2 17.	Identifiziorung von Dook 7
ADD. 3.17.	Vergleich der Massenspektren von Beak 2 (Betentionszeit 12.77 min) aus dem
ADD. 3.10.	Expressions were used were the CS in Hefer (links) and since 8 Converbuller Standard
	Expressionsversuch von Flacs III Fleien (IIIIks) und einem p-Caryophylien Standard
Abb 0 10.	(rechts) mit derseiden Retentionszeit
ADD: 3.19:	GC-Analyse und Identifizierung einiger Hauptkomponenten des Produktspektrums von
Abb 0.00	Raco nach Expression in Heren
ADD. 3.20a:	SDS-PAGE von Haus-Fusionsprotein vor und nach einem Verdau mit Enterokinase85
ADD. 3.20b:	vvestern Biot-Analyse der Spezifität der Anti-rHACS-Antikörper
Abb. 3.21:	Autreinigung von rHaGAS1 und rHaGAS2 durch Attinitätschromatographie
Abb. 3.22:	Ausschnitte der GC-Chromatogramme der Enzym-Substrat Reaktionen von HaGAS1 und
	Hagasz mit FPP <i>in vitro</i>

Abb. 3.23:	GC-MS Analyse von in transgenen Hefen produziertem Germacren A	90
Abb. 3.24:	Coexpression von Proteinen zur Bildung von Germacren A-Carboxylsäure in Hefen	92
Abb. 3.25:	Western Blot der mikrosomalen Fraktion aus Hefen zur Untersuchung der Expression	von
	CYP71AVS	93
Abb. 3.26:	Analyse der Produkte verschiedener Hefetransformationsexperimente zur Identifizierur	٦g
	von Germacren A-Carboxylsäure	95
Abb. 3.27:	Transkriptanalyse von CYP71AVS in verschiedenen Geweben und während der	
	Trichomentwicklung	96
Abb. 3.28:	Darstellung der hypothetischen Reaktionsmechanismen für die Produkte der in den	
	glandulären Trichomen der Sonnenblume identifizierten Enzyme HaGAS1, HaGAS2,	
	CYP71AVS und HaCS	98

Verzeichnis der Tabellen

Tab. 2.1:	Sequenzen der in dieser Arbeit verwendeten Primer	.29
Tab. 2.2:	Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für eine Standard PCR-Reaktion	.31
Tab. 2.3:	Standard PCR-Reaktionsbedingungen	.31
Tab. 2.4:	PCR-Reaktionsbedingungen für die Amplifikation von Sesquiterpensynthasen mit den	
	Primern STSdeg-F und STSdeg-R	.31
Tab. 2.5:	3'-RACE-PCR Reaktionsbedingungen	. 32
Tab. 2.6:	Reaktionsbedingungen zur Ligation eines Oligoprimers an Einzelstrang-cDNA	. 33
Tab. 2.7:	5'-RACE PCR-Reaktionsbedingungen	. 33
Tab. 2.8:	Für die Amplifikation des genomischen DNA-Bereichs von HaCS verwendete	
	Primerkombinationen	. 34
Tab. 2.9:	Für die Amplifikation des genomischen DNA-Bereichs von HaGAS1 verwendete	
	Primerpaare	.35
Tab. 2.10:	Primer und PCR-Bedingungen für die Untersuchung von gewebe- und	
	entwicklungsspezifischer Expression von Genen der Phenylpropanoid- und	
	Sesquiterpenbiosynthese	. 36
Tab. 2.11:	Primer für die Amplifikation von HaGAS1, HaGAS2 und HaCS zur Klonierung in den	
	bakteriellen Expressionsvektor pET-32 EK/LIC	. 37
Tab. 2.12:	PCR-Programm zur Amplifikation der codierenden Bereiche von HaGAS1 und HaGAS2	2
	zur Klonierung in pET-32 EK/LIC durch KOD DNA-Polymerase	. 38
Tab. 2.13:	PCR-Programm zur Amplifikation des codierenden Bereichs von HaCS zur Klonierung	in
	pET-32 EK/LIC durch KOD DNA-Polymerase	. 38
Tab. 2.14:	Verwendete Primer für die Amplifikation von Genen der Sesquiterpenbiosynthese zur	
	Expression in S. cerevisiae	. 39
Tab. 2.15:	PCR-Programm für die Erzeugung der DNA-Amplifikationsprodukte zur Klonierung in	
	Hefe-Expressions-vektoren	. 39
Tab. 2.17:	Übersicht über die Klonierungsstrategien der im Hefestamm EPY300 exprimierten	
	Enzyme	.40
Tab. 2.16:	Primerliste für Colony-PCR und Sequenzierung von Plasmiden	.40
Tab. 2.18:	In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme	.45
Tab. 2.19:	In dieser Arbeit verwendete Plasmide	.45
Tab. 2.20:	Übersicht über die verwendeten Antibiotika	.46
Tab. 2.21:	Größe der Expressionskonstrukte	.51
Tab. 2.22:	Verwendete Expressionsbedingungen von E. coli zur Produktion von rekombinanten	
	Sesquiterpensynthasen der Sonnenblume	. 52
Tab. 3.1:	¹ H- und abgeleitete ¹³ C-NMR Spektraldaten von 5-Deoxynevadensin	.62

Abkürzungsverzeichnis

5	
Amp ^R	Ampicillin-Resistenz
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BSA	Rinderserum-Albumin
bp	Basennaar
Opm ^R	Chloromohanical Desistant
CDNA	komplementare DNA
C	Celsius
CHS	Chalkonsynthase
cm	Zentimeter
СоА	Coenzym A
CPR	Cytochrom P450 Reduktase
CYP	Cytochrom P450
CYP71AV1	Amorpha-4.11-dien-Monooxygenase aus Artemisia annua
CYP71AVI	Germacren A-Monooxygenase aus Lactuca sativa
	Germacren A-Monooxygenase aus Helianthus annuus
	deionisiertes Wasser
	dennalt dastilliartes Wasser
	Dieneskisktekensetereskis
DC	Dunnschichtenromatographie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DMAPP	Dimethylallylpyrophosphat
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DTT	DL-Dithiothreitol
DOXP	1-deoxy-D-xylose 5-Phosphat
E. coli	Escherichia coli
FDTA	Ethylendiamintetraessiosäure
FK	Enterokinase
EQT	expressed sequence tag
E4Dr	Ethidiumbromid
FID	
FPP	<i>E,E</i> -Farnesylpyrophosphat
g	Gramm
GC	Gaschromatographie
GC-MS	Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie
gDNA	genomische DNA
GGPP	Geranylgeranylpyrophosphat
h	Stunde
HaCS	Helianthus annuus Cadinen-Synthase
HaGAS	Helianthus annuus Germacren-Synthase
HMG	(S)-3-Hvdroxy-3-Methylglutaryl
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
HRMS	hochauflösende Massensnektroskonie
	Isopentenylpyrophosphat
IF I G	Kilehaaa
KD	Kilopasen
KD	Kilo Daiton
1	Liter
LIC	Ligations-unabhängige Klonierung
LsLTC1	Germacren A-Synthase 2 aus Lactuca sativa
MCS	multiple cloning site
min	Minute
MOPSO	3-(N-Morpholino)-2-Hydroxypropansulfonsäure
MS	Massenspektrometrie
m/z	Masse/Ladungszahl
NCBI	National Center for Biotechnology Information (USA)
	ontische Dichte
OPE	open reading frame
UKE	open reading name

PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAL	Phenylalaninammoniumlyase
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PVPP	Polyvinylpyrrolidon
RACE	rapid amplification of cDNA ends
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkriptase PCR
S	Sekunde
S.	siehe
SIM	scanning ion mode
SDS	Natriumlaurylsulfat
STL	Sesquiterpenlacton(e)
TBE	Tris(hydroxymethyl)aminomethan-Borsäure-EDTA Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TIC	total ion chromatogram
Tricine	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Trx	Thioredoxin
U	Unit
UTR	nicht translatierte Region
UV	Ultraviolett
V	Volt
xg	Erdbeschleunigung
x-gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactosid

1 Einleitung

Pflanzen haben mit ihrer sessilen Lebensweise so gut wie alle Lebensräume der Erde erfolgreich erobert. Durch die fehlende Mobilität sind sie jedoch wechselnden abiotischen Faktoren in extremer Weise ausgesetzt. Zusätzlich werden sie durch eine Fülle von potenziellen Fraßfeinden und mikrobiellen Pathogenen bedroht. So sind beispielsweise etwa zwei Drittel aller Tierarten Herbivore. Um bei der Vielzahl an Gefahren überleben zu können, haben Pflanzen verschiedene Abwehrmechanismen entwickelt. Durch die Entwicklung mechanischer Barrieren wie Dornen, Stacheln oder verstärkten Zellwänden sind sie allgemein geschützt. Ein weiterer wesentlicher Aspekt in der Verteidigung sind sekundäre Pflanzenstoffe. Dies sind pflanzliche Naturstoffe, die nicht für das Aufrechterhalten der primären Lebensprozesse notwendig sind, sondern vom Primärstoffwechsel abgeleitete Verbindungen mit mannigfaltiger Funktion für die Pflanze darstellen. Bis heute wurden mehr als 200.000 solcher Verbindungen chemisch identifiziert (BUCKINGHAM 1998). Die dominierenden Strukturgruppen innerhalb der sekundären Pflanzenstoffe sind die Phenole, Alkaloide und Terpene. Die protektive Wirkung dieser Verbindungen beruht meist auf Toxizität gegenüber Angreifern oder Pathogenen und der Abwehr von Fraßfeinden durch bitteren Geschmack. Innerhalb der Naturstoffe bilden die Terpene die größte Klasse mit mehr als 35.000 beschriebenen Verbindungen, wovon die Mehrzahl aus höheren Pflanzen stammt (DAVIS & CROTEAU 2000; ROHDICH et al. 2004).

Die Bezeichnung "Terpen" stammt von den Hauptkomponenten des Balsams verschiedener Kiefernarten, die als Terpentin bezeichnet werden. Terpentin selbst ist eine Mischung vorwiegend flüchtiger Monoterpene. Der Begriff wurde vom französischen Chemiker Marcelin Berthelot vorgeschlagen und von August Friedrich Kekulé eingeführt (KEKULÉ 1863), um die zu dieser Zeit von vielen Chemikern für Kohlenwasserstoffe mit der Molekülformel C₁₀H₁₆ benutzte Bezeichnung "Camphene" zu ersetzen. Kekulé sah diesen Namen als ungeeignet an, da zu dieser Zeit bereits eine einzelne Verbindung mit dem Namen Camphen beschrieben war und allgemeine Verwirrung gegenüber der diesbezüglichen Bezeichnung und der Benennung neu entdeckter "Champhen"-artiger Verbindungen herrschte.

Wie die Kiefern in ihrem Balsam, so bilden auch die meisten Terpen-produzierenden Pflanzen nicht nur eine einzelne Verbindung, sondern oft eine ganze Reihe strukturell ähnlicher Komponenten. Diese Mischung von Endprodukten des Stoffwechselweges ist die Folge einer Jahrmillionen langen funktionellen Selektion, die den Pflanzen das Überleben ermöglichte und zu ihrem evolutiven Erfolg beitrug. So synthetisieren beispielsweise einige Nadelbäume das Sesquiterpen Juvabione, das die Entwicklung von Insektenlarven durch seine Eigenschaft als Juvenilhormonanalogon stört und somit die Bäume vor diesen Schädlingen zu schützen vermag (BOHLMANN et al. 1998; KEELING & BOHLMANN 2006). Mais

emittiert über die Wurzeln den Sesquiterpenkohlenwasserstoff β-Caryophyllen, der im Boden beheimatete entomopathogene Nematoden anlockt, die natürlichen Feinde von wurzelfressenden Insektenlarven (RASMANN et al. 2005).

Für den Menschen selbst ist das Diterpen Taxol aus der Eibe von großem Interesse, da es bei der Therapie bestimmter Krebsarten mit gutem Erfolg eingesetzt wird (MIYAKE et al. 2000; REINECKE et al. 2000). Das Sesquiterpenlacton Artemisinin aus dem chinesischen Beifuß war in den letzten Jahren Gegenstand intensiver Forschung, da es bei der Behandlung multiresistenter Malariaerkrankungen sehr gute Wirkung zeigte (KLAYMANN 1985; BAIRD 2005). Inzwischen existieren jedoch die ersten Berichte über auftretende Resistenzen auch gegen diesen in China schon seit Jahrhunderten eingesetzten Wirkstoff (WHO, 2007). Manche Terpene dienen aber auch als Lockstoffe für Befruchter (RAGUSO & PICHERSKY 1995; PICHERSKY & GERSHENZON 2002), als antimikrobielle Agenzien (HUANG et al. 2003) oder als Signalstoffe zwischen Pflanzen (KESSLER & BALDWIN 2001; ARIMURA et al. 2002; GERSHENZON 2007).

Neben den Terpenen des Sekundärmetabolismus mit ihren vielfältigen Funktionen erfüllen Terpene im Primärstoffwechsel für die Pflanze lebensnotwendige Aufgaben. Dabei handelt es sich meist um komplexere, längerkettige Moleküle. Gibberelline aus der Klasse der Diterpene wirken als Phytohormone. Phytol, ein anderes Diterpen, verankert das Chlorophyll in den Reaktionszentren des Photosynthesekomplexes (SITTE et al. 2002). Phytosterole sind als Membranbausteine strukturgebende Zellbausteine und Carotenoide erfüllen wichtige Funktionen als akzessorische Photosynthesepigmente.

1.1 Die Terpenbiosynthese in Pflanzen

Die oben genannten Beispiele zeigen die große Vielfalt an Strukturen und Funktionen von nur andeutungsweise. Die Grundstruktur aus der diese Terpenoiden beinahe unüberschaubare Anzahl an verschiedenen Terpenstrukturen hervorgeht ist ein einfacher Baustein aus 5 Kohlenstoffatomen, das Isopren. Es liegt in seiner aktiven Form als Isopentenylpyrophosphat (IPP) vor und isomerisiert zu Dimethylallypyrophosphat (DMAPP). Als Terpene bzw. Isoprenoide werden alle Verbindungen bezeichnet, die sich formal in diese Isopren-Bausteine zerlegen lassen und biosynthetisch von IPP und DMAPP ableitbar sind. Durch eine enzymatische Verknüpfung dieser Bausteine werden die Grundgerüste aller Terpene gebildet und nach der Anzahl der C5-Einheiten klassifiziert. Man unterscheidet Hemi- (C₅), Mono- (C₁₀), Sesqui- (C₁₅), Di- (C₂₀), Sester- (C₂₅), Tri- (C₃₀), Tetra- (C₄₀) und Polyterpene, wobei die Polyterpene aus mehr als 8 C₅-Einheiten aufgebaut sind (Abb. 1.1). Von den Terpenen ausgehend können auch Terpenoide gebildet werden, bei denen in späteren Schritten der Biosynthese einzelne Kohlenstoffatome verloren gehen, so dass die Zahl ihrer C-Atome nicht mehr auf die Grundzahl 5 zurückzuführen ist. In der Natur kommen Terpene als einfache Kohlenwasserstoffe vor oder finden sich in modifizierter Form als Alkohole, Ester, Ketone oder Lactone. Zusammen mit der großen Anzahl an möglichen Kohlenstoffgrundgerüsten führen diese Modifikationen zu Verbindungen mit unterschiedlichsten Funktionen für die Pflanzen.

Den Aufbau der Terpene aus sich wiederholenden Isopreneinheiten erkannte Otto Wallach durch Analysen der Komponenten von ätherischen Ölen und postulierte die "Isoprenregel"



Abb. 1.1 Beispiele von Terpenverbindungen verschiedener Klassen.

(WALLACH 1885; WALLACH 1909). Für diese Arbeiten wurde er 1910 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet. Leopold Ruzicka zeigte die Verknüpfung der Terpene aus biologischen Isopreneinheiten, dem sogenannten "aktiven Isopren", also dem im Gleichgewicht stehenden IPP und DMAPP (Nobelpreis für Chemie 1939). Später formulierte er die "biogenetische Isoprenregel" und zeigte die Möglichkeit der Bildung des Terpengrundgerüstes durch elektrophile Reaktionen, die durch die Bildung carbokationischer Intermediate zu einer Vielzahl verschiedener Zyklisierungen und Umlagerungen führen können (RUZICKA 1953). Damit ließ sich die große Zahl verschiedener Terpenverbindungen erklären. Das von Ruzicka postulierte aktive Isopren wurde von Feodor Lynen als Isopentenylpyrophosphat zusammen mit Farnesylpyrophosphat (FPP) als Intermediat der Squalen-Biosynthese identifiziert (LYNEN et al. 1958). Lynen erhielt für diese Arbeit zusammen mit Konrad Bloch 1964 den Nobelpreis für Medizin.

Die Bildung des IPP und seiner isomeren Form DMAPP geschieht in höheren Pflanzen über zwei Stoffwechselwege. Im Cytosol läuft die Bildung über den bekannten Mevalonat-Weg ab (LYNEN et al. 1958; LYNEN & HENNING 1960). Vor etwa 15 Jahren wurde ein zweiter Biosyntheseweg zur Bildung von IPP und DMAPP entdeckt, der zuerst in Bakterien aufgeklärt wurde (ROHMER et al. 1993; SCHWENDER et al. 1996; LICHTENTHALER et al. 1997). Dieser ist in den Plastiden der Pflanzenzellen lokalisiert und wird aufgrund des dort als Intermediat auftretenden 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphats als DOXP-Weg (oder auch als MEP-Weg) bezeichnet. Über diesen DOXP-Weg werden die Bausteine für die Hemi-, Mono-, Di- und Tetraterpene synthetisiert (EISENREICH et al. 2004).

Im Cytoplasma beginnt die Biosynthese (Abb. 1.2) der Terpengrundkörper IPP und DMAPP mit der Kondensation zweier Acetyl-CoA-Moleküle (1) zu Acetoacetyl-CoA (2). Dieses wird durch die Aldol-Addition eines weiteren Acetyl-CoA-Moleküls zu 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA (3, HMG-CoA) umgewandelt. In Tieren und Pilzen wird diese Reaktion durch zwei verschiedene Enzyme katalysiert, in Pflanzen übernimmt die HMG-CoA-Synthase beide Reaktionsschritte. Die veresterte Carboxygruppe des HMG-CoA wird durch die HMG-CoA-Reduktase unter Verbrauch von zwei NADPH zur Hydroxygruppe reduziert, gleichzeitig geschieht die Spaltung der Thioesterbindung und es entsteht Mevalonat (4). Zwei aufeinanderfolgende Phosphorylierungen durch die Mevalonat-Kinase und die Mevalonatphosphat-Kinase führen über Mevalonatmonophosphat zur Bildung von Mevalonatdiphosphat (5). Der letzte Schritt der Bildung von IPP besteht in der Dehydratisierung Decarboxylierung und des 5-Diphosphomevalonats zu Isopentenyldiphosphat (6). Durch die Aktivität einer Isomerase wird IPP zur DMAPP (7) umgewandelt (EISENREICH et al. 2001; HELDT 2003).



Abb. 1.2 Darstellung der Reaktionsschritte des Mevalonat-Weges im Cytosol und des Methylerythritolphosphat-Weges in den Plastiden die zur Bildung von IPP und DMAPP führen, den Grundbausteinen der Terpene (nach EISENREICH et al. 2001, 2004). (1) Acetyl-CoA, (2) Acetoacetyl-CoA, (3) 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA, (4) Mevalonat, (5) Mevalonatdiphosphat, (6) Isopentenyldiphosphat, (7) Dimethylallyldiphosphat, (8) Pyruvat, (9) D-Glyceraldehyd 3-Phosphat, (10) 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat (DOXP), (11) 2C-Methyl-D-Erythritol 4-Phosphat, (12) 4-Diphosphoscytidyl-2C-Methyl-D-Erythritol, (13) 4-Diphosphocytidyl-2C-Methyl-D-Erythritol 2-Phosphat, (14) 2C-Methyl-D-Erythritol 2,4-Cyclodiphosphat, (15) Hydroxymethylbutenyl-4-Diphosphat.

Im Gegensatz zum cytosolischen Mevalonat-Weg sind die Ausgangsstoffe für die plastidiäre Biosynthese (Abb. 1.2) des IPP über den DOXP-Weg das Pyruvat (8) und das Glycerinaldehyd-3-Phosphat (9). Durch das Enzym 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat-Synthase wird das Pyruvat decarboxyliert, auf Glycerinaldehyd-3-Phosphat übertragen und das für diesen Biosyntheseweg namensgebende 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat (DOXP) (10) gebildet (EISENREICH et al. 2001). Die Umlagerung des Kohlenstoffgerüsts und die Reduktion der Aldehydgruppe führen zum 2C-Methyl-D-Erythritol 4-Phosphat (11) (ROHDICH et al. 2006). Durch drei enzymatische Schritte, unter anderem der Übertragung eines Nukleosid-Restes (Cytidin) auf 2C-Methyl-D-Erythritol 4-Phosphat (GABRIELSEN et al. 2006), wird es zum 2C-Methyl-D-erythritol 2,4-Cyclodiphosphat umgewandelt (MIALLAU et al. 2003). Über 1-hydroxy-2-methyl-2-butenyl 4-diphosphat (15) entstehen IPP (6) und DMAPP (7) (EISENREICH et al. 2004).

Inzwischen ist diese strikte Trennung nachfolgend gebildeter Terpene aus den Grundbausteinen dieser beiden parallelen Biosynthesewege in Frage gestellt. Neuere Ergebnisse zeigen, dass es durchaus zu Austauschvorgängen von IPP zwischen Plastiden und Cytosol kommen kann (PIEL et al. 1998; ADAM et al. 1999; LAULE et al. 2003; DUDAREVA et al. 2005). Dadurch entstehen Mischterpene, deren Grundbausteine sowohl aus dem cytosolischen Mevalonat-Weg als auch aus dem plastidiären DOXP-Weg stammen können.

Ausgehend von den beiden Grundkörpern IPP und DMAPP werden durch Prenyltransferasen die längerkettigen Terpene gebildet. Eine Geranyldiphosphatsynthase verknüpft hierbei ein Molekül IPP (C₅) mit einem DMAPP (C₅), zu Geranylpyrophosphat (GPP, C₁₀), dem linearen Vorläufermolekül der Monoterpene. Als elektrophiler Akzeptor in dieser Reaktion fungiert DMAPP, das nach der Abspaltung des Diphosphatrestes am endständigen C-Atom eine positive Ladung trägt (Allyl-Kation). Daran greift die endständige Doppelbindung des Donormoleküls IPP an und knüpft eine neue C-C-Bindung, abschließend wird ein Proton abgespalten (MCGARVEY & CROTEAU 1995).

Eine Farnesylpyrophosphatsynthase katalysiert die gleiche Reaktion, fügt aber dem entstandenen GPP durch Kopf-Schwanz-Addition (IPP: nukleophiler Kopf, GPP: elektrophiler Schwanz) ein weiteres IPP an und setzt Farnesylpyrophosphat frei (FPP, C₁₅), das Substrat der Sesquiterpensynthasen. Durch eine analog ablaufende Reaktion wird von Geranylgernaylpyrophosphatsynthasen ein weiteres IPP mit FPP verknüpft und Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP, C₂₀) gebildet, das als Ausgangsprodukt für die Bildung von Diterpenen dient. Höhermolekulare Terpene entstehen durch die Verknüpfung der Prenyldiphosphate. So geht der Bildung von Triterpenen die Verknüpfung zweier FPP Moleküle (Schwanz-Schanz-Addition) zum Squalen (C₃₀) voraus. Analog dazu werden zwei Moleküle GGPP zu Phytoen (C₄₀) verknüpft (CHAPPELL 1995; HELDT 2003).

14

1.2 Terpensynthasen, die Schlüsselenzyme der Terpenbiosynthese

Die durch die Prenyltransferasen gebildeten azyklischen Prenyldiphosphate sind die direkten Vorstufen der Terpene, deren Bildung im sich anschließenden Biosyntheseschritt durch Terpensynthasen katalysiert wird. Meist sind es zyklische Produkte, die von den Synthasen gebildet werden, weshalb diese Enzyme auch als Terpenzyklasen bezeichnet werden. Daneben werden vereinzelt auch azyklische Verbindungen synthetisiert. Der Reaktionsmechanismus der Terpensynthasen ist ähnlich den Prenyltransferasen, allerdings kommt es hier zu einer intramolekularen Prenylierung, die oft auch mit der Isomerisierung des Moleküls verbunden ist. Dieser homologe Reaktionsmechanismus ist auf evolutive Verwandtschaft der Prenyltransferasen und Terpensynthasen zurückzuführen (TRAPP & CROTEAU 2001; CHRISTIANSON 2007). Sehr häufig sind Terpensynthasen Multiprodukt-Enzyme mit einem mengenmäßig dominierenden Hauptprodukt.

Da die Terpensynthasen die ersten Kohlenstoffgrundgerüste im jeweiligen Terpenbiosyntheseweg bilden, werden sie als Schlüsselenzyme der Terpenbiosynthese bezeichnet. Von diesen Grundgerüsten ausgehend werden durch sekundäre Modifikationen wie Hydridverschiebungen, Umlagerungen von Doppelbindungen oder Deprotonierungen zahlreiche weitere Moleküle enzymatisch synthetisiert. Viele Verbindungen tragen nicht nur einen zyklischen Ring, sondern besitzen mehrere Ringsysteme, was die Variabilität und Funktion der Moleküle weiter steigert.

Inzwischen sind einige Terpensynthasen aus Pflanzen isoliert, heterolog exprimiert und funktionell charakterisiert worden. Sie besitzen im Allgemeinen eine Größe zwischen 50 und 100 kD (BOHLMANN et al. 1998) und liegen meist als Monomer vor (ALONSO et al. 1992; PICHERSKY et al. 1995). Wesentlich seltener sind Homodimere zu finden (WISE et al. 1998; WHITTINGTON et al. 2002). Monoterpen-, Di- und Tetraterpensynthasen besitzen ein N-terminales Transitpeptid von ca. 50-70 Aminosäuren Länge zur Translokation vom Cytoplasma in die Plastiden und sind deshalb größer als Sesqui- und Triterpensynthasen (TURNER et al. 1999). Nach der Translokation und der einhergehenden Prozessierung des Präproteins liegt ihre Größe aber im Varianzbereich der cytoplasmatisch lokalisierten Terpensynthasen.

Die bisher bekannten Terpensynthasen sind sehr ähnlich bezüglich der physikalischen und chemischen Eigenschaften und alle benötigen divalente Metallionen als Cofaktoren (Mg²⁺ oder Mn²⁺, seltener Fe²⁺; BOHLMANN et al. 1998). Das pH Optimum liegt im allgemeinen bei circa pH 7,0. Alle bekannten Terpensynthasen zeigen ein hochkonserviertes DDxxD-Motiv in ihrer Aminosäuresequenz (D: Asparaginsäure, x: variable Aminosäuren). Die Röntgenstrukturanalyse der 5-epi-Aristolochensynthase (TEAS), einer Sesquiterpensynthase aus *Nicotiana tabacum* (STARKS et al. 1997) und zweier Monoterpensynthasen aus *Salvia officinalis* (WHITTINGTON et al. 2002) und *Mentha spicata* (HYATT et al. 2007) unter

Cokristallisation mit nicht hydrolysierbaren, synthetischen Substratanaloga zeigte eine essenzielle Funktion der Asparaginsäurereste bei der Bindung der divalenten Cofaktoren. Diese dienen wiederum der Bindung des Diphosphatrestes der Prenyldiphosphate und der Positionierung des Substrates im Reaktionszentrum (CANE et al. 1996; STARKS et al. 1997). Auch die Prenyltransferasen tragen dieses Aminosäuremotiv, das dort dieselbe Funktion erfüllt (DAVIS & CROTEAU 2000). Ein weiteres hochkonserviertes und bei fast allen Terpensynthasen gefundenes RxR-Motiv (R: Arginin, x: variable Aminosäure) liegt 35 Aminosäuren stromaufwärts des DDxxD-Motives. Diese Argininreste sind ebenfalls an der Substratbindung und Katalyse beteiligt (THOLL et al. 2005).

1.3 Sesquiterpene

1.3.1 Vorkommen und Funktion

Sesquiterpene sind im Pflanzenreich sehr weit verbreitet. Sie finden sich unter anderem in Cyperaceen, Piperaceen, Solanaceen. Cannabaceen und auch in zahlreichen Gymnospermen. Ihre größte Verbreitung haben sie jedoch innerhalb der Asteraceen. Insgesamt wurden bis heute weit mehr als 8000 verschiedene Verbindungen isoliert und beschrieben (CONNOLLY & HILL 1991, BREITMAIER 2002). Es finden sich hierunter zahlreiche ungesättigte Kohlenwasserstoffe, die oftmals volatile Komponenten darstellen. Daneben kommen durch sekundäre Modifikationen gebildete Sesquiterpene als Alkohole, Ketone, Aldehyde, Carbonsäuren und Lactone vor. Neben wenigen azyklischen Verbindungen werden von den Sesquiterpensynthasen meist Produkte mit mono- bis tetrazyklischen Grundgerüsten gebildet. Für eine Reihe von Verbindungen sind unterschiedliche biologische Aktivitäten belegt. So spielen sie vielfältige Rollen in der Pflanze-Insekt oder Pflanze-Herbivor (KESSLER & BALDWIN 2001; CHEN et al. 2003; KANT et al. 2004; ARIMURA et al. 2005; KAPPERS et al. 2005; SCHNEE et al. 2006), Pflanze-Pathogen (GUIDES et al. 1982; FUCHS et al. 1983; VÖGELI et al. 1990; DEY & HARBORNE 1991; NUGROHO et al. 2002) und Pflanze-Pflanze Interaktion (MACIAS et al. 1996; ORMENO et al. 2004; ENGELBERTH et al. 2004). Der Mehrzahl der Sesquiterpene ist bis heute aber keine definierte Aufgabe für die produzierende Pflanze zugeordnet worden. Anhand der erwähnten Beispiele ist aber davon auszugehen, dass die von den Pflanzen produzierten Verbindungen und deren Gemische allesamt hoch spezialisierte Aufgaben erfüllen.

Für den Menschen interessant sind Sesquiterpene unter anderem als Aromastoffe. Die azyklischen Farnesene sind eine allseits bekannte Duftkomponente in Äpfeln, Birnen und anderen Früchten (HUELLIN & MURRAY 1966; MATICH et al. 1996) und kommen auch in zahlreichen ätherischen Ölen, wie beispielsweise dem Kamillenöl vor (PIRZAD et al. 2006). Genauso sind erhebliche Anteile der aromatischen Gerüche von Sellerie- oder Hopfenöl und

unzähligen weiteren ätherischen Ölen auf Sesquiterpene zurückzuführen, die dort oft in Kombination mit Monoterpenen auftreten. Medizinisch interessant sind unter den Sesquiterpenen beispielsweise die Valerenane aus *Valeriana officinalis* (HOUGHTON 1988; LETCHAMO et al. 2004).

1.3.2 Biosynthese der Sesquiterpene durch Sesquiterpensynthasen

Sesquiterpensynthasen katalysieren die Umwandlung von FPP zu Sesquiterpenen (Abb. 1.3). Intermediär wird hier analog zu der Reaktion der Prenyltransferasen ein hochreaktives Karbokation gebildet. Dieses bildet allerdings nicht den Ausgangspunkt für die Reaktion, sondern dient der intramolekularen Zyklisierung. Der elektrophile Angriff des Karbokations auf die zwei im Molekül vorhandenen Doppelbindungen kann bereits während der primären Zyklisierung zur Bildung von sechs verschiedenen Grundgerüsten führen (Abb. 1.6). Im einfachsten Fall kommt es zur 1,10- oder 1,11 Zyklisierung. Durch Isomerisierung des Farnesylkations über Nerolidyldiphosphat als Intermediat, werden weitere Zyklisierungen ermöglicht (CANE 1990, STEELE et al. 1998; BENDICT et al. 2001). Die Dephosphorylierung des FPP geschieht hierbei unter Beteiligung des an das "DDxxD"-Motiv gebundenen divalenten Metallkations, im Falle von Sesquiterpensynthasen meist Mg²⁺ (DAVIS & CROTEAU 2000). Anschließend führen Hydridverschiebungen, Deprotonierungen oder die Substitution



Abb. 1.3 Bildung der verschiedenen Sesquiterpen-Grundgerüste aus dem Substrat Farnesyldiphosphat. Dargestellt sind die primären Zyklisierungsvarianten des Farnesylkations (nach CANE 1999; DAVIS & CROTEAU 2000).

von Seitenketten zur Bildung der spezifischen Sesquiterpene. In dieser Variabilität der Modifikationen des Grundgerüstes liegt auch die Basis der Vielzahl verschiedener Sesquiterpene mit den unterschiedlichsten Eigenschaften. Mit allein 200 verschiedenen Grundgerüsten bilden die Sesquiterpene die größte Gruppe an Isoprenoiden (BHAT et al. 2005; NUHN 2006).

Aus Asteraceen sind inzwischen mehrere Sesquiterpensynthasen kloniert, exprimiert und charakterisiert worden. Es handelt sich dabei um Germacren A-Synthasen aus *Lactuca sativa, Cichorium intybus, Ixeris dentata* und *Artemisia annua* (BENNETT et al. 2002; BOUWMEESTER et al. 2002; KIM et al. 2005; BERTEA et al. 2006) sowie Germacren D-Synthasen aus *Solidago canadensis* (PROSSER et al. 2004). Daneben wurden eine β-Caryophyllene-Synthase, eine epi-Cedrol-Synthase und eine Amorpha-4,11-dien-Synthase aus *A. annua* beschrieben (MERCKE et al. 1999; WALLAART et al. 2001, CAI et al. 2002). Das große Interesse an Germacren A-Synthasen der vergangenen Jahre beruht darauf, dass es sich bei dieser Verbindung um das erste zyklische Produkt der Biosynthese von Sesquiterpenlactonen handelt. Besonderes Interesse galt dabei der Bildung von Artemisinin aus *Artemisia annua*, einem Sesquiterpenlacton mit einer Endoperoxidbrücke, das bei der Behandlung multiresistenter Infektionen mit *Plasmodium falciparum*, dem Erreger der Malaria tropica eingesetzt wird (KLAYMAN 1985).

1.3.3 Sesquiterpenlactone

Während Sesquiterpenkohlenwasserstoffe generell im Pflanzenreich weit verbreitet sind, stellen Sesquiterpenlactone (STL) die typischen Inhaltsstoffe der Asteraceen dar und kommen außerhalb dieser Familie gehäuft nur noch vereinzelt in Magnolidaceen und Apiaceen vor (PICMAN 1982). Durch ihr spezifisches Vorkommen in Asteraceen sind sie von hohem chemotaxonomischen Wert (SEAMAN 1982; SPRING et al. 1985; BUSCHMANN & SPRING 1993; SPRING et al. 1999, SPRING 2000; DA COSTA et al. 2005).

Sehr viele STL enthalten einen α -Methylen- γ -butyrolacton-Ring, der vom Isopropylrest ausgehend gebildet wird. Durch diese sekundäre Modifikation verlieren die STL den flüchtigen Charakter der Sesquiterpenkohlenwasserstoffe.

Für die Pflanzen spielen die STL eine wichtige Rolle als Fraßschutz durch ihren bitteren Geschmack (MULLIN et al. 1991; MORI & MATSUSHIMA 1995; KNIGHT 1995). Daneben sind antimikrobielle und zytotoxische Eigenschaften nachgewiesen (SPRING et al. 1982; ZHENG 1994; GÖREN et al. 1996; SCHMIDT et al. 1999; ALJANCIC et al. 1999).

Die chemische Grundlage vieler dieser Wirkungen ist die Exomethylengruppe an C₁₁ in Verbindung mit dem Lactonring (HEHNER et al. 1999). Die biologische Wirkung liegt in der Reaktion dieser Gruppe mit Nucleophilen. Über den Thiolrest des Cysteins erfolgt dadurch die kovalente Bindung an Proteine (KUPCHAN et al. 1971; RODRIGUES et al. 1976; GARCÍA-PIÑERES et al. 2001; SCHMIDT & HEILMANN 2002). Diese STL-Protein-Interkation ist häufig die Grundlage der pharmakologischen Bedeutung der STL. Die beschriebenen Wirkungen reichen von antitumoralen Eigenschaften (LEE et al. 1977; WEN et al. 2002; WON et al. 2004) über antimikrobielle (FISCHER et al. 1998; CANTRELL et al. 1999; KONSTANTINOPOULOU et al. 2003) bis hin zu entzündungshemmenden Wirkungen, wie der Hemmung des Transkriptionsfaktors NF-KB (HEHNER et al. 1998, 1999; RÜNGELER et al. 1999). Auf die Hemmung von NF-KB durch STL ist auch die entzündungshemmende Wirkung traditionell medizinisch verwendeter Pflanzen wie *Arnica montana* (KLAAS et al. 2002) oder *Tanacetum parthenium* (LYSS et al. 1997) zurückzuführen. Daneben sind STL oft an der Ausbildung von Kontaktallergien beteiligt (HAUSEN et al. 1975; WARSHAW & ZUG 1996). Diese sind zahlreich für Asteraceen beschrieben, so etwa für *Taraxacum officinale* (LOVELL & ROWAN 1991), *Lactuca sativa, Matricaria recutita* (VAN KETEL 1987) und *Helianthus annuus* (HAUSEN & SPRING 1989).

1.3.3.1 Biosynthese des Sesquiterpenlacton-Grundgerüstes

Die bei weitem größte Gruppe von STL gehört zu den Germacranoliden, die aus einer 1,10 Zyklisierung des Farnesyl-Kations (Abb. 1.3) über die Zwischenstufe des E,E-Germacradienylkations gebildet werden. Ausgehend von diesem Grundgerüst entstehen weitere STL-Klassen (FISCHER 1990). Das einfachste STL mit Germacranolid-Grundgerüst ist das Costunolid, eine bekannte STL-Komponente in der volksmedizinisch genutzten Wurzel von *Saussurea lappa* (ARORA & BHOJWANI 1989; AHMAD & BEG 2001). Das Costunolid wird allgemein als ein gemeinsames Intermediat aller vom Germacranolid-Grundgerüst abgeleiteten STL angesehen (GEISSMAN 1973; SEAMAN 1982; FARALDOS et al. 2007).

Der erste Schritt im Biosyntheseweg der STL besteht in der Zyklisierung des Farnesylpyrophosphats durch eine Sesquiterpensynthase (Abb. 1.4). Für Cichorium intybus wird Germacren A als erstes zyklisches Intermediat für die dort vorkommenden Germacranolid-, Eudesmanolid- und Guaianolid-STL angenommen (DE KRAKER et al. 2001a, 2002). Germacren A nimmt somit eine Schlüsselposition in der Biosynthese verschiedener STL-Grundgerüste ein (GEISSMANN 1973; SEAMAN 1982; SONG & BRASH 1995; DE KRAKER et al. 2002). Der auf die Zyklisierung von FPP durch Germacren A-Synthasen folgende Biosyntheseschritt besteht in der Bildung von Germacren A-Carboxylsäure. Dieser bis dahin nur hypothetisch angenommene Biosyntheseschritt wurde anhand von Wurzelproteinextrakten aus C. intybus untersucht (DE KRAKER et al. 2001a). Er ist zwingend notwendig für den darauf folgenden Ringschluss zwischen C₆ und der Hydroxylgruppe an C₁₃ zum Lactonring durch die Bildung eines inneren Esters (DE KRAKER et al. 2002). Als Intermediate konnten Germacren A-Alkohol und Germacren A-Aldehyd nachgewiesen werden, bevor es zur Bildung von Germacren A-Carboxylsäure kommt. In den Studien von DE KRAKER et al. (2001a) wurde gezeigt, dass die Umwandlung von Germacren A zu seinem Alkohol (Germacra-1(10),4,11(13)-trien-12-ol) durch die Hydroxylase-Aktivität eines membrangebundenen Cytochrom P450 Enzyms katalysiert wird. Die Oxidation von Germacren A-Alkohol zu Germacren A-Carboxylsäure (Germacra-1(10),4,11(13)-trien-12-oat) über die Zwischenstufe Germacren A-Aldehyd (Germacra-1(10),4,11(13)-trien-12-al) wurde ein oder zwei NADP⁺ abhängigen, wasserlöslichen Dehydrogenasen zugeschrieben. Der weitere Biosyntheseschritt des Costunolids aus der Germacren A-Carboxylsäure wird ebenfalls durch ein Cytochrom P450 Enzym katalysiert. Dabei wird eine Hydroxylierung von C₆ angenommen, durch die es zum Ringschluss mit der Carboxylgruppe an C₁₂ kommt. Dieser Schritt wurde ebenfalls nur in einem Proteinextrakt aus Wurzeln von *C. intybus* nachgewiesen und bisher noch nicht weiter enzymatisch aufgeklärt (DE KRAKER et al. 2002).





1.3.3.2 Sesquiterpenlactone der Sonnenblume *H. annuus* und des Kultivars HA300

Die in Nordamerika und Mexiko beheimatete Gattung *Helianthus* (Asteraceae) umfasst 52 einjährige und ausdauernde Arten (SCHILLING 2006). Die bekanntesten sind Topinambur (*H. tuberosus*) und die kommerziell zur Ölgewinnung genutzte Sonnenblume *H. annuus* L.

In *H. annuus* kommen vor allem Heliangolid- und Germacranolid-Sesquiterpenlactone vor (SPRING et al. 1987; SPRING et al. 1989; SPRING & SCHILLING 1989), die in Drüsenhaaren auf den Blattunterseiten (SPRING & BIENERT 1987) und auf den Antherenspitzen (GÖPFERT 2003) lokalisiert sind. Sie besitzen ebenfalls biologische Aktivität (SPRING & HAGER 1982, SPRING et al. 1982; MACIAS et al. 2002, 2006).

Das in dieser Arbeit verwendete *H. annuus*-Kultivar HA300 ist bezüglich seines STL-Musters sehr gut untersucht. Die STL-Hauptkomponenten (HEIL & SPRING 1999) bestehen aus 4 Verbindungen mit Germacranolid-Grundstruktur und 2 Verbindungen, die ein Heliangolid-

Grundgerüst aufweisen (Abb. 1.5). Als Substituenten an C₉ kommen Angelat- und Methylbutyratseitenketten vor. Insbesondere die Sesquiterpenlactone des Germacranolidtyps mit Angelatseitenkette zeigten eine starke Abwehrfunktion gegen *Diabrotica virgifera,* den Westlichen Maiswurzelbohrer (MULLIN et al. 1991, CHOU & MULLIN 1993). Die Larven dieses Blattkäfers befallen vorwiegend Maiswurzeln, während die Käfer neben Maispflanzen auch die Pollen anderer Pflanzenarten wie *H. annuus* fressen (CABRERA WALSH 2003). Neben den STL, die Unterschiede im Substitionsmuster von C₉ aufwiesen, konnten von einigen Verbindungen sowohl die Enol- wie auch die Keto-Isomere nachgewiesen werden (HEIL & SPRING 1999, GÖPFERT 2003).



Abb. 1.5 Chemische Strukturen der sechs STL-Hauptkomponenten aus Drüsenhaaren von *H. annuus* HA300. (1) 15-hydroxy-3-dehydrodesoxyfruticin; (2) Niveusin B; (3) 4,5-dihydro-Niveusin A (Ketoform); (4) 4,5-dihydro-Niveusin A (Enolform); (5) 4,5-dihydro-Niveusin A-methylbutyrat (Enolform); (6) Haageanolid; Ang = Angelat; MeBu = Methylbutyrat.

1.4 Glanduläre Trichome

Trichome sind über das Abschlussgewebe hinausragende epidermale Fortsätze, welche die Funktion der Epidermis beträchtlich erweitern. Die Bildung der Trichome geht von einer protodermalen Initialzelle aus, die sich über die Blattoberfläche nach außen stülpt und durch antikline und perikline Zellteilungen ein mehrzelliges Trichom bildet. Auf pflanzlichen Oberflächen kommen zahlreiche verschiedene Trichomtypen (PAYNE 1978) mit vielfältigen Funktionen vor, sie dienen zum Beispiel dem Schutz vor UV-Strahlung und Verdunstung, der Abwehr von Herbivoren oder als Kletterhilfe (SITTE et al. 2002). Neben diesen Pflanzenhaaren ohne sekretorische Funktionen kommen auch biosynthetisch aktive Haare vor, die in den vielzelligen Stielzellen biologisch aktive Verbindungen produzieren und am apikalen Ende oft in einer Cuticularblase speichern. Die Entwicklung dieser glandulären Trichome wird in eine präsekretorische, eine sekretorische und eine postsekretorische Phase

eingeteilt (ASCENSAO & PAIS 1998). Typischerweise ist ein Drüsenhaar aus einem ein- bis mehrzelligen Stiel und einem ebenso ein- bis mehrzelligen Kopf aufgebaut. Die Sekretion der Verbindungen geschieht von den apikalen Zellen ausgehend in den extrazellulären Raum zwischen Zellwand und Cuticula. Mit fortschreitender Inhaltstoffbildung trennt sich die Cuticula zunehmend von der Zellwand ab und der subcuticuläre Raum vergrößert sich. In den Drüsenhaaren ist das Ende der Sekretion meist mit der Seneszenz der basalen Zellen verbunden (ASCENSAO & PAIS 1998; GÖPFERT 2003). Die gebildeten Inhaltstoffe werden durch Alterungsprozesse oder Verletzungen aus den Cuticularblasen freigesetzt.

zahlreichen Pflanzen auf Glanduläre Trichome sind in die Biosynthese von Sekundärmetaboliten spezialisiert. So werden beispielsweise viele Monoterpene der Lamiaceen in diesem Drüsenhaartyp gebildet (GERSHENZON et al. 1992; MCCASKILL & CROTEAU 1995; ILJIMA et al. 2004; TURNER & CROTEAU 2004). Auch die Sesquiterpene werden oft in spezialisierten Sekretionszellen wie Drüsenhaaren, Harzkanälen oder Öldrüsen in Blättern und Blütenknospen oder Milchkanälen gebildet (BHAT et al. 2005). Bei Asteraceen finden sich Sesquiterpenlactone meist in glandulären Trichomen (SPRING et al. 1987, 1989, 2001; BERTEA et al. 2006; LOMMEN et al. 2006; COVELLO et al. 2007) oder sind Bestandteile des Latex in Milchkanälen von Blättern und Wurzeln (SESSA et al. 2000; BUSHMAN et al. 2006). Neben Terpenverbindungen werden von glandulären Trichomen auch Phenole, Polysaccharide, Lipide und Proteine in unterschiedlichen Zusammensetzungen sekretiert (WERKER & FAHN 1981; ASCENSAO & PAIS 1998; ASCENSAO et al. 1999; HEINRICH et al. 2002). Viele der von Drüsenhaaren gebildeten Verbindungen weisen zytotoxische Eigenschaften auf, weshalb eine extrazelluläre Speicherung sinnvoll erscheint. Die Funktion der sekretierten Substanzen besteht im Schutz der Pflanze vor Fraßfeinden und Mikroorganismen (PICMAN 1986; KELSEY et al. 1984; LANGENHEIM 1994; DUKE et al. 2000; WAGNER et al. 2004).

1.4.1 Biosynthese von Sesquiterpenlactonen in den Drüsenhaaren der Sonnenblume

Auf den Blättern der Sonnenblume *H. annuus* treten zwei verschiedene Typen von Drüsenhaaren auf, mehrzellige glanduläre Trichome und lineare Trichome, die keine Cuticularblasen ausbilden und ihre Inhaltsstoffe in bräunlich gefärbten apikalen Zellen speichern (SPRING et al. 1992). Während in den glandulären Trichomen Sesquiterpenlactone in die Cuticularblasen sekretiert werden, finden sich in den linearen Drüsenhaaren Sesquiterpene. Im Gegensatz zu Lamiaceen (GERSHENZON et al. 1992; MCCASKILL & CROTEAU 1995; ASCENSAO & PAIS 1998; TURNER et al. 1999, GERSHENZON et al. 2000) ist die Bildung der Inhaltsstoffe und die Sekretion in den glandulären Trichomen der Asteraceen nur sehr wenig untersucht. Dies ist auf die abgeschlossene Entwicklung der Trichome in sehr

frühen Entwicklungsstadien der Blätter zurückzuführen (SPRING & BIENERT 1987), die eine Isolation von Drüsenhaaren im sekretorisch aktiven Stadium durch etablierte Methoden (GERSHENZON et al. 1987; YERGER et al. 1992) bisher nicht zuließen. Im Gegensatz zu den Asteraceen besitzen Drüsenhaare auf ausdifferenzierten Blättern der Lamiaceen noch biosynthetische Aktivität (MCCONKEY et al. 2000; TURNER et al. 2000). Die Zunahme des Gehaltes an STL bei *H. annuus* findet dagegen nur während der ersten 8 bis 10 Tage der Blattentwicklung statt (SPRING et al. 1985). Die Quantität der gebildeten Verbindungen ist außerdem von den Lichtbedingungen während der Trichomentwicklung abhängig (SPRING et al. 1986).

Bei vielen Asteraceen finden sich Trichome nicht nur auf den Blättern, sondern auch in den



Abb. 1.6 Trichome von Hannuus HA300. (a) Rasterelektronenmikroskopisches Bild der Antherenspitzen von *H. annuus* HA300 mit Akkumulation von glandulären Trichomen (Pfeilspitzen), Balken = 200 μ m. **(b)** Mikroskopisches Bild eines glanduläres Trichom von *H. annuus* HA300. **(c)** Fluoreszenzmikroskopisches Bild desselben Trichoms. Balken = 20 μ m (aus GÖPFERT 2003).

Spitzen der Antheren. Durch die Größe der Einzelblüten von *H. annuus* eignen sich diese besonders für die Untersuchung der in den Antherenspitzen auftretenden Trichome (Abb. 1.6a). Diese besitzen den typisch mehrzelligen Aufbau der Drüsenhaare von Asteraceen (Abb. 1.6b). Im fluoreszenzmikroskopischen Bild zeigt sich innerhalb der sekretierten Substanzen eine starke blaue Fluoreszenz (Abb. 1.6c), die rot gefärbten Bereiche in den Stielzellen sind auf Chlorophyllfluoreszenz zurückzuführen. Die Entwicklung dieser Trichome geht einher mit der von innen nach außen fortschreitenden ontogenetischen Entwicklung der Röhrenblüten in den Blütenköpfen. Dies bietet die Möglichkeit, die Entwicklung von Trichomen der Asteraceen in allen Stadien zu erfassen und gezielt zu untersuchen. Die Ausprägung morphologischer Merkmale der Röhrenblüten und der Pollen lässt sich exakt mit der Entwicklung der Trichome in den Antherenspitzen korrelieren (HEIL & SPRING 1999; GÖPFERT 2003). Durch eine mikropräparative Technik ist es möglich die Trichome einzeln aus den Antherenspitzen in definierten Entwicklungsstadien zu entnehmen und durch quantitative Analysen die Zunahme des STL-Gehaltes während der Trichomentwicklung von der prä- bis zur postsekretorischen Phase darzustellen. Zusätzlich bietet das System den

Vorteil, in einem Blütenstand fast alle Trichomentwicklungsstadien gleichzeitig vorliegen zu haben (HEIL & SPRING 1999; GÖPFERT 2003).

1.5 Ziel dieser Arbeit

Die Biosynthese von STL stellt auf Grund der interessanten biologischen Aktivitäten und deren möglicher pharmakologischer Nutzung seit einigen Jahren eines der kompetitivsten Forschungsgebiete pflanzlicher Naturstoffe dar. Trotz erheblicher Fortschritte in der Identifizierung von ersten Schlüsselenzymen der STL-Biosynthese in *Lactuca sativa* oder *Cichorium intybus* sind zahlreiche Schritte, die zur Modifikation und Derivatisierung der Grundstrukturen und damit zur funktionellen Spezialisierung der Naturstoffe dienen, unklar. Dies schließt insbesondere auch die zelluläre und histologische Lokalisierung des Syntheseweges ein. Trichome aus den Antherenspitzen der Sonnenblume erwiesen sich in vorausgehenden Arbeiten als außerordentlich gut geeignet, um solche Fragen zu klären.

Da bisher der Verlauf der Biosynthese in Asteraceen-Trichomen nur anhand der Produktakkumulation in Cuticularblasen gemessen wurde, sollte als erstes Ziel dieser Arbeit die Aktivität von Schlüsselenzymen der STL-Bildung direkt in den Trichomen nachgewiesen werden. Da keine Sequenzdaten zu Sesquiterpensynthasen der Sonnenblume vorhanden waren, sollte versucht werden mit Hilfe konservierter Bereiche aus bekannten Enzymen anderer Asteraceen Primer zu konstruieren, die den Nachweis solcher Synthasen in mRNA-Präparationen aus Sonnenblumentrichomen erlauben. Diese Synthasen sollten dann sequenziert und charakterisiert werden. Anhand dieser Sequenzen sollte anschließend durch semiquantitative RT-PCR die Expression dieser Enzyme in verschiedenen Entwicklungsphasen der Trichome nachgewiesen und in anderen Gewebeteilen der Sonnenblume überprüft werden. Hierbei sollte das Hauptaugenmerk auf Germacren A-Synthasen, als Schlüsselenzyme der Sesquiterpenlactonbiosynthese, gerichtet werden.

Um die katalytische Funktion der identifizierten Enzyme zu bestimmen, war eine heterologe Expression der Synthasen und deren funktionelle Charakterisierung durch Enzym-Substrat-Versuche vorgesehen. Durch die heterologe Expression sollte zusätzlich genügend rekombinantes Protein hergestellt werden, um Antikörper gegen diese Enzyme produzieren zu können.

Nach einer funktionellen Charakterisierung von Terpensynthasen sollte die Möglichkeit zur Identifizierung weiterer, an der Sesquiterpenlactonbildung beteiligter Enzyme aus den Trichomen der Sonnenblume überprüft und gegebenenfalls deren funktionelle Charakterisierung durchgeführt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Pflanzenmaterial

2.1.1 Helianthus annuus HA300

Für die Arbeiten mit der Sonnenblume wurde das Kultivar *Helianthus annuus* L. HA300 (Asteraceae) verwendet (Ausnahme s. 2.1.2). Die Samen wurden von V. Hahn, Landessaatzuchtanstalt an der Universität Hohenheim, bezogen und in 8 cm Töpfen in Einheitserde herangezogen. Nach 10-14 Tagen wurden die Sonnenblumen in größere Töpfe (18 x 18 x 16 cm B/T/H) umgetopft. Die Kultur der Pflanzen erfolgte im Gewächshaus bei einer täglichen Beleuchtungsdauer (HQI-Lampen) von 18 Stunden. Einmal wöchentlich erfolgte eine NPK-Düngergabe, gewässert wurde täglich. Bei Bedarf wurden die Pflanzen mit Neem Azal T/S (Trifolio-M GmbH, Lahnau) gegen Schädlinge behandelt. Das Pflanzenmaterial für die Experimente wurde jeweils frisch geerntet und sofort verarbeitet. Für die Isolation von RNA aus jungen Blättern wurden ca. 3-4 cm lange Blätter verwendet. Zur RNA-Extraktion aus alten Blättern wurden vollständig entwickelte Blätter benutzt, bei Wurzeln als Ausgangsmaterial wurden Pflanzen aus den Kulturgefäßen entnommen, die Erde möglichst vollständig abgespült und eine Mischung verschieden alter Wurzelteile verwendet.

2.1.2 Helianthus annuus L. Wildtyp

Für die Extraktion genomischer DNA des Wildtyps von *Helianthus annuus* wurde auf Herbarmaterial von O. Spring, Universität Hohenheim, zurückgegriffen. Da keine keimfähigen Samen zur Verfügung standen, wurde genomische DNA aus Achänen isoliert (Beleg: OS #266, gesammelt 1988 in Apache County, Arizona, USA). Hierzu wurde Fruchtwandmaterial verwendet, das nach dem Öffnen der Samen mit einer Lanzette ausgekratzt wurde.

2.1.3 *Lactuca sativa*

Für die RNA-Extraktion aus Salat wurden Pflanzen von *Lactuca sativa* var. *capitata* L. (Asteraceae) verwendet. Die Pflanzen wurden unter Gewächshausbedingungen ohne zusätzliches Kunstlicht kultiviert, für die Extraktion von RNA wurden Stücke junger Blätter nicht blühender Pflanzen verwendet.

2.2 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Carl Roth GmbH (Karlsruhe) oder Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)

bezogen. Es wurden Chemikalien der höchsten Reinheitsgrade (*reinst* oder *pro analysi*) benutzt.

2.3 Isolation der fluoreszierenden Hauptkomponente in den Cuticularblasen der glandulären Trichome

Drüsenhaare von *H. annuus* HA300 zeigten im Fluoreszenzmikroskop bei einer Anregungswellenlänge von 365 nm und einem Filter von 420 nm eine starke, blaue Fluoreszenz insbesondere innerhalb der sekretierten Substanzen in der Cuticularblase.

2.3.1 Extraktion und Aufreinigung von 5-Deoxynevadensin

Um diese fluoreszierenden Verbindungen extrahieren, aufreinigen und strukturell bestimmen zu können, wurden Drüsenhaare aus den Antherenspitzen verwendet. Von 20 Blütenköpfen wurde hierzu mit einer Rasierklinge das obere Drittel der Röhrenblüten abgeschnitten. Diese Blütenteile wurden zweimal für 10 min mit 100 % CH₂Cl₂ extrahiert. Die Extrakte wurden vereinigt, filtriert und im Rotationsverdampfer eingeengt. Anschließend wurde der Rückstand in CH₂Cl₂ aufgenommen und an 2 g Kieselgel (Merck KGaA, Darmstadt) gebunden. Das Silica-Gel wurde getrocknet, mit n-Hexan aufgeschlämmt und auf eine mit n-Hexan equilibrierte Kieselgelsäule (18 g Kieselgel) aufgebracht. Lipophile Verbindungen wurden durch Flash-Chromatographie mit n-Hexan eluiert. Anschließend wurden die Verbindungen mit einem Lösungsmittelgradienten von 100 % CHCl₃ zu 100 % EtOAc und einem weiteren Gradienten hin zu 100 % MeOH fraktioniert. Fluoreszierende Verbindungen fanden sich unter UV₃₆₅ im Eluat mit CHCl₃-EtOAc (50:50 v/v). Diese Fraktion wurde eingeengt und mittels Dünnschichtchromatographie (DC) auf Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck KGaA, Darmstadt) Trennung erfolgte durch Laufmittelgemisch aufgetragen. Die das Benzen/2-Butanon/MeOH/H₂O (55:22:20:3 v/v/v/v). Als Vergleichsproben wurden MeOH-Extrakte aus Blättern und Röhrenblüten reinen Drüsenhaaren, cochromatographiert, um trichomspezifische identifizieren. Banden zu Unter UV_{365} zeigte sich eine drüsenhaarspezifische fluoreszierende Bande mit einem Rf-Wert von 0,5. Diese wurde mit MeOH vom Kieselgel eluiert, aufkonzentriert und die extrahierte Hauptkomponente durch Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) weiter aufgereinigt (Sykam GmbH, S-1000 liquid chromatograph (Fürstenfeldbruck); Kromasil ODS (Alltech Grom GmbH, Rottenburg), 5 µm, 5 x 250 mm; 50 % MeOH, 1,0 ml min⁻¹; Detektion mittels SPD-M10Avp UV-vis-DAD (Shimadzu GmbH, Duisburg)). Die Absorptionsspektren wurden mit einem Dioden-Array-Detektor (DAD) und der Software Class VP 7.0 (Shimadzu GmbH, Duisburg) aufgenommen.

2.3.2 Strukturidentifikation durch HRMS und NMR

Die NMR-Experimente zur Strukturanalytik wurden von J. Conrad am Institut für Chemie der Universität Hohenheim auf einem Unity *Inova* Spektrometer (Varian GmbH, Darmstadt) mit 500 MHz und einen PFGID Probenkopf durchgeführt. Für 2D-Experimente kamen Varian pulse sequences zum Einsatz. Über HMBC-Kopplungen konnten indirekt die Verschiebungen der ¹³C-Signale berechnet werden. ¹H und ¹³C Verschiebungen wurden auf Signale von verbliebenem Lösungsmittel bei $\delta_{H/C}$ 7,27/77,0 (CDCl₃) bezogen. HRMS-EI Daten wurden auf einem JMS-700 (Joel GmbH, Eching) von Iris Klaiber am Institut für Chemie der Universität Hohenheim erhoben.

2.3.3 Bestimmung des Gehaltes an 7-hydroxy-6,8,4'-trimethoxyflavon pro Trichom

Um den Gehalt des Flavonoids pro Trichom zu bestimmen, wurden zuvor quantifizierte Mengen der isolierten und aufgereinigten Verbindung durch HPLC (Bedingungen s. 2.3.1) aufgetrennt und eine Eichkurve erstellt. Zur Quantifizierung wurden mittels einer "Microsampling" Methode (SPRING 1989) 4 x 200 Drüsenhaare aus Antherenspitzen isoliert, mit MeOH extrahiert und der komplette Extrakt durch HPLC-Analyse ausgewertet.

2.4 Isolierung von Nukleinsäuren

2.4.1 Isolierung von genomischer DNA

Genomische DNA (gDNA) wurde mit Hilfe des GenElute Plant Genomic DNA Miniprep Kits (Sigma-Aldrich GmbH, München) nach Vorschrift des Herstellers isoliert. Für die Isolation von gDNA aus *H. annuus* HA300 wurden frische Blattproben verwendet. Für den Wildtyp von *H. annuus* wurde, wie unter 2.1.2 beschrieben, Achänenmaterial verwendet.

2.4.2 Isolierung von Gesamt-RNA

Für RNA-Isolationen wurden RNase-freie Reaktionsgefäße und Filterspitzen verwendet. Gesamt-RNA wurde für alle Versuche mit dem Aurum[™] Total RNA Isolation Kit (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) isoliert.

Um RNA aus Drüsenhaaren zu gewinnen, wurden Trichome aus den Antherenspitzen der Röhrenblüten isoliert, da diese in genau definierten Entwicklungsstadien gewonnen werden konnten (GÖPFERT 2003). Für die Identifizierung von Sesquiterpensynthasen wurden Trichome gewählt, die sich in der biosynthetisch aktivsten Phase der Sesquiterpenlactonbildung befanden. Es wurden die Trichome aus 200 Blüten verwendet. Für die Darstellung der differenziellen Genaktivität im Laufe der Trichomentwicklung wurden Trichome aus 8 unterschiedlich biosynthetisch aktiven Trichomstadien (1 präsekretorisches Stadium, 5 sekretorische und 2 postsekretorische Stadien) isoliert. Für diese Experimente wurde jeweils RNA aus den Trichomen von 50 Blüten extrahiert. Zur Isolation dieser Trichome aus den Antherenspitzen wurden die Blüten einzeln mit einer Pinzette aus dem Blütenkorb entnommen, auf doppelseitiges Klebeband aufgeklebt und mit einer Skalpellklinge geöffnet. Die Antherenröhren wurden ebenfalls der Länge nach aufgeschnitten und mit einer Pinzette herauspräpariert. Mit der Außenseite nach oben wurde die geöffnete Antherenröhre ausgebreitet auf einem Objektträger mit einen Stück Tesafilm fixiert. Die Isolation der Trichome geschah mit einer Lanzette, indem die Antherenspitze vorsichtig ausgeschabt wurde, ohne dabei weiteres Antherengewebe zu beschädigen (GÖPFERT 2003). eiskalten Isolierte Trichome wurden sofort in 200 μΙ Lysepuffer (enthielt Guanidinisothiocyanat zur Hemmung von RNasen) des RNA-Isolationskits in 2,0 ml Reaktionsgefäße überführt und darin aufbewahrt. Zum vollständigen Aufschluss der Zellen wurden 2 Keramikkugeln (2,8 mm, Precellys, Peglab, Erlangen) in die Reaktionsgefäße gegeben und die Zellen in einer Schüttelmühle (MM300, Retsch GmbH, Hann) mit 11 Hz für 90 s aufgeschlossen. Anschließend erfolgte die Zugabe von weiteren 500 µl Lysepuffer und 14 µg PVPP. Die weiteren Aufreinigungsschritte wurden gemäß der Anleitung des Kitherstellers durchgeführt.

Für die RNA-Isolation aus anderen pflanzlichen Gewebetypen wurde frisches Probenmaterial in flüssigem Stickstoff schockgefroren und mit Mörser und Pistill feinst zerrieben. Von dem pulverisierten Material wurden 30 mg in gefrorenem Zustand in ein 2,0 ml Reaktionsgefäß eingewogen. Sofort nach dem Auftauen erfolgte die Zugabe von 200 µl Lysepuffer aus dem RNA-Extraktionskit. Der vollständige Zellaufschluss erfolgte nach Zugabe von 2 Keramikkugeln in der Schüttelmühle bei 11 Hz für 120 s. Die weitere Probenbehandlung erfolgte nach Vorschrift. Zur Elution der RNA wurde in allen Fällen 80 µl auf 80°C vorgewärmter Elutionspuffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,5) direkt auf die Membran des Spin-Säulchens pipettiert. Die Elution erfolgte in einer Tischzentrifuge bei 11000xg für 2 min. Alle RNA Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -70°C aufbewahrt.

2.4.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Für die Gewinnung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurden 4 ml einer Übernachtkultur benutzt. Die Isolation wurde mit dem GeneJET[™] Plasmid Miniprep Kit (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) oder dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen GmbH, Hilden) jeweils gemäß der Herstellerangaben durchgeführt.

2.5 DNA-Techniken

2.5.1 Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden von den Firmen Sigma-Aldrich GmbH (München), Thermo-Electron GmbH (UIm) oder IDT Inc. (Coralville, USA) bezogen. Von den gelieferten lyophilisierten Primern wurden 100 pmol μ l⁻¹ Stammlösungen mit ddH₂O hergestellt. Die Stammlösungen wurden mit ddH₂O auf 20 μ M verdünnt. Von dieser verdünnten Primerlösung wurde 1 μ l pro 25 μ l PCR-Ansatz verwendet. In der Tabelle 2.1 sind die in dieser Arbeit verwendeten Primer und ihre Sequenzen aufgeführt. Die Sequenzen sind nach dem gängigen IUPAC-IUB Code dargestellt.

Tab. 2.1 Sequenzen der in dieser Arbeit verwendeten Primer.

Name ¹	Sequenz 5'-3' ²	Bemerkung
CYP71AVSF2	CAGTTTACTGAGATTGTGAAGGAG	
CYP71AVSR2	GTTGCACGTTTGCTAGACC	
CYP71IRP	CTTTGATTCGCTCTTTACCGTTC	
CYP71S-F2 (Notl)	ACGT GCGGCCGCGAACATGGAAGT	CTCCCTCACCACTTC
CYP71S-R2 (Spel)	ACGT TGATCAACCTAGAATAGCAGC	AGTAG
HaCHS-F	GTGTGCATACAATGCCCCGTC	
HaCHS-R	CATAAACCGCTTGACCGAAGACC	
HaFPS-F	ACTGCTTGTACGGCTTTGCTTG	
HaFPS-R	TTTCTTGCATCTGCCCTTGGTTG	
HaGs1-3E-R	GTGTATATAACATATCCACTTACACC	AAG
HaGs1-5E-F	GAACACACCTTCCATCAAATAATT	
HaGs2-3E-R	AAACACTAATAAGGATACCCACTAG	ITAG
HaGs2-5E-F	GATAAGCCGCGTTCGTTG	
HaPAL-F	CGGATTCTTCGAGTTACAG	
HaPAL-R	CTTACGGTTGACTTCATGTTC	
HaRbcLSU-F	GATTTGCGAATCCCGACTG	
HaRbcLSU-R	CAGAGTATCAATAACCGCATG	
HaSS1EXP-F	GACGACGACAAGATGGCAGCAATTG	GAGC
HaSS1EXP-R	GAGGAGAAGCCCGGTTTACATGGG	FGAAGAACCAAC
HaSS2EXP-F	GACGACGACAAGATGGCAACAACTG	GAAGC
HaSS2EXP-R	GAGGAGAAGCCCGGTTACATGGGG	ACTGGAAC
HaTPS1-F2 (<i>Xho</i> l)	ACGT CTCGAG AATGGCAGCAGTTGC	GAGCCAGTG
HaTPS1-F3 (Notl)	ACGT GCGGCCGC GAACATGGCAGC	AGTTGGAGCCAGTG
HaTPS1-R1 (<i>Nhe</i> I)	ACGT GCTAGCTTACATGGGTGAAGA	ACCAACAAACAA
HaTPS1-R2 (<i>Xho</i> l)	TACGT CTCGAG TTACATGGGTGAAG	AACCAACAAAC
HaTPS1-R3 (Notl)	ACGT GCGGCCGCTTACATGGGTGAA	AGAACCAACAAACAA
HaTPS1-R4 (<i>BgI</i> II)	ACGT AGATCT TTACATGGGTGAAGA	ACCAACAAACAA
HaTPS2-F2 (<i>Xho</i> l)	ACGT CTCGAG AATGGCAACAACTGA	AGCTAACA
HaTPS2-R (<i>Nhe</i> l)	ACGT GCTAGCTTACATGGGGACTGG	BAACACA
HaTPS2Thio-F (<i>BamH</i> I)	ACGT GGATCC AACATGAGCGATAAA	ATTATTCAC
HaUbiq-F	CAAAACCCTAACCGGAAAGA	
HaUbiq-R	ACGAAGACGGAGGACGAG	
LeuGal10-F	GGATATGTATATGGTGGTAATG	
LeuGal10-R	GACAACCTTGATTGGAGAC	
LeuGal1-F2	GGATCCGTAATACGACTCACT	
LeuGal1-R2	CATGCGTACACGCGTCTGTAC	
LipB	ACTAGGATCCAAGCTTGGAATTCGT	ACGTCTAGAGATATC
	3'-Ende block	kiert mit Fluorescein, 5'-Ende phosphoryliert
	AUGI GGAICC AACAIGGCAGCAGII	
LSGASZ-R (NNEI)		
	ACGITCTAGAGCATGGAAGTCTCCC	
LSGU-K (XDal)	ACGI ICIAGA ICAGAICIIAICGIC	10

M13	GGAAACAGCTATGACCATG	
n1LipB	GATATCTCTAGACGTACGAATTC	
RACE Adapter	GACTCGAGTCGACATCGA	
STag	CGAACGCCAGCACATGGACA	
STSdeg-F	GAYGARAAYGGIAARTTYGA	I=Inosin
STSdeg-R	CCRTAIGCRTCRAAIGTRTCRTC	I=Inosin
Τ7	GTAATACGACTCACTATAGG	
Т7Т	GCTAGTTATTGCTCAGCG	
TPS1FL-F	ATGGCAGCAAGTTGGAGCCAG	
TPS1FL-R	TTACATGGGTGAAGAACCAACAAAC	
TPS1int-F	TTGAGATTGAAAGGGGAAAAC	
TPS1int1-R	GTCTCTTGAAACCTCATATCC	
TPS1int2-R	TGCCAACAGAGTATCTAGGTTCA	
TPS1-1330N	GAGTGTCTTTCCTGGGAAAG	
TPS1-3E	CACGATTGAGATATTGTCCTAG	
TPS1-8-30	CCTTCCATCAAATAATTTTGAAG	
TPS1-G5	AGCATCTTCACTCACTATCTCAC	
TPS1-GD3	TGGTGCTAGATGACACATATGAC	
TPS2int-F	CCAACTAAGAATAAGAGGAGAATC	
TPS2int-R	GACTTCAGAGTAATACGGCTCC	
TPS216-34	TTGCACCAACTCCCATTC	
TPS2-3E	AAACACTAATANGGATACCCACTAG	
TPS2-3R	GGAGCCGTATTACTCTGAAGTC	
TPS2-3RK	ATGGAGACATGCTAAAGAGGTGC	
TPS2-5RN	GATTCTCCTCTTATTCTTAGTTGG	
UraGal1F	TCGGTTTGTATTACTTCTTATTC	
VNdT ₁₈	ΤΤΤΤΤΤΤΤΤΤΤΤΤΤΤΤΤΤΝ	
VNdTRace	GACTCGAGTCGACATCGATTTTTTTTTTTTTTTTVN	

¹Bei Primern, mit denen durch die PCR Restriktionsschnittstellen in das PCR-Produkt eingefügt wurden, sind diese Restriktionsschnittstellen in Klammern angegeben. ²Restriktionsschnittstellen sind fett und kursiv dargestellt, Startcodons sind fett gedruckt.

2.5.2 Synthese von cDNA

Für die Synthese von cDNA wurde das RevertAid[™] First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) nach Herstellervorschrift verwendet. Als Primer für die Erststrangsynthese zur anschließenden PCR-Amplifikation diente ein VNdT₁₈ Primer. Für Routine RT-PCR Experimente wurde 1 µl einer 100 pM Lösung dieses Primers für die reverse Transkription eingesetzt.

2.5.3 PCR

Alle PCR-Reaktionen wurden entweder in einem Mastercycler personal oder einem Mastercycler gradient (Eppendorf AG, Hamburg) durchgeführt. Für Routine-PCR Reaktionen wurde rekombinante *Taq* DNA-Polymerase (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) eingesetzt. Als Puffer wurde der beiliegende 10x Taq Ammoniumsulfat-Puffer genutzt. MgCl₂ wurde in einer Endkonzentration von 12,5 µM eingesetzt, dNTPs (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) in einer Endkonzentration von 0,2 mM je Desoxyribonukleosidtriphosphat verwendet. Für die Amplifikation der DNA wurden 0,2 ml Reaktionsgefäße (Sarstedt AG, Nümbrecht) benutzt.

2.5.3.1 Standard PCR-Programm

Routine PCR-Reaktionen wurden in folgenden Versuchsansätzen durchgeführt:

Tab.	2.2	Zusammensetzung	des	Reaktionsansatzes	für	eine	Standard	PCR-
Reak	tion.							

Komponente	Volumen
10x Taq-Puffer mit (NH ₄) ₂ SO ₄ (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot)	2,5 µl
dNTPs (2mM je dNTP) (Fermentas GmbH)	2,5 µl
MgCl ₂ (25 mM) (Fermentas GmbH)	2 µl
forward Primer (20 pmol μl ⁻¹)	1 µl
reverse Primer (20 pmol µl ⁻¹)	1 µl
DNA/cDNA	x µl
ΤΑQ DNA-Polymerase (1 U μl⁻¹) (Fermentas GmbH)	1 µl
ddH ₂ O, DEPC behandelt	add 25 µl
Gesamtvolumen	25 µl

Die Anlagerungstemperatur wurde den jeweiligen Schmelztemperaturen der Oligonukleotide angepasst. Es wurde eine Temperatur von 3 bis 5 °C unter der Schmelztemperatur der Primer gewählt.

Tab. 2.3 Standard PCR-Reaktionsbedingungen.

Standard PCR-Programm	Temperatur	Zeit	
initiale Denaturierung der DNA-Matrize	94°C	2:00 min	
Denaturierung der DNA-Matrize	94°C	0:40 min	-
Annealing der Primer an die Matrize	50-60°C	0:40 min	30x
Elongation (Synthese des Komplementärstranges)	72°C	1 min/kb*	
finale Elongation (Vervollständigung der DNA Synthese)	72°C	5 min/kb*	

* je kb des erwarteten DNA-Amplifikationsproduktes

2.5.3.2 PCR mit degenerierten Primern für Sesquiterpensynthasen

Um erste Sequenzabschnitte von Sesquiterpensynthasen aus Trichom cDNA zu amplifizieren, wurden zunächst degenerierte Primer verwendet (BOUWMEESTER et al. 2002). Die PCR-Ansätze wurden wie in Tabelle 2.2 angegeben angesetzt. Je Primer (STSdeg-F, STSdeg-R) wurde in den PCR-Reaktionsansätzen 1 μ I einer 100 pmol μ I⁻¹ Lösung verwendet. Als Matrize für die Amplifikation wurde cDNA eingesetzt, die aus RNA isolierter Trichome der Antherenspitzen von 200 Röhrenblüten synthetisiert wurde.

Tab.2.4PCR-ReaktionsbedingungenfürdieAmplifikationvonSesquiterpensynthasen mit den PrimernSTSdeg-FundSTSdeg-R.

	Temperatur	Zeit	
initiale Denaturierung	94°C	2:00 min	_
Denaturierung	94°C	0:40 min	
Annealing	52°C	0:40 min	35
Elongation	72°C	1:20 min	00
finale Elongation	72°C	5:00 min	

2.5.3.3 3'- und 5'-RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)

Die ersten internen Sequenzabschnitte von *HaGAS1* und *HaCS* wurden durch die Verwendung degenerierter Primer ermittelt (2.5.3.2), die fehlenden codierenden sowie nicht translatierten 3'- und 5'-Bereiche wurden durch RACE-PCR identifiziert.

Die 3'-mRNA-Sequenzen der Sesquiterpensynthasen *HaGAS1* und *HaCS* wurden durch 3'-RACE Experimente ermittelt (SAMBROOK & RUSSELL 2001). Die Umschreibung der RNA in cDNA wurde wie unter 2.5.2 angegeben durchgeführt, mit dem Unterschied, dass anstelle des VNdT₁₈ Primers 1 µl einer 100 pmolaren Lösung des 3'-RACE-Primers (VNdTRace) eingesetzt wurde. Um die kompletten 3'-Bereiche der mRNAs zu identifizieren, erfolgte anschließend eine Amplifikation der cDNA durch PCR mit einem zum 5'-Ende des 3'-RACE-Primers komplementären Primer (RACE Adapter) und einem genspezifischem Primer (TPS1int-F für *HaGAS1*, TPS2int-F für *HaCS*). Die verwendeten PCR-Bedingungen sind in Tabelle 2.5 dargestellt und waren für beide Gene identisch. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden durch Gelelektrophorese aufgetrennt, nach Analyse extrahiert und anschließend direkt sequenziert.

Tab 2.5 3'-RACE-PCR Reaktionsbedingungen.

3'-RACE PCR für HaCS, HaGAS1	Temperatur	Zeit	
initiale Denaturierung	94°C	5:00 min	_
erstes Annealing	49°C	5:00 min	
erste Elongation	72°C	40:00 min	
Denaturierung	94°C	0:40 min	
Annealing	49°C	1:00 min	30x
Elongation	72°C	3:00 min	
finale Elongation	72°C	12:00 min	_

Zur Sequenzidentifikation der codierenden, sowie nicht translatierten 5'-Bereiche der Gene *HaGAS1* und *HaCS* wurde nach dem Umschreiben von Trichom-mRNA in cDNA (mit VNdT₁₈ Primer) ein einzelsträngiges DNA-Oligonukleotid (LipA) mittels T4 RNA-Ligase (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) an das 3'-Ende der cDNA angehängt. Vor der Ligation wurde die cDNA aufgereinigt (PCR Purification Kit, Eppendorf AG, Hamburg) um verbliebene VNdT₁₈-Primermoleküle zu entfernen. Zur Ligation wurde ein DNA-Oligonukleotid mit einem phosphorylierten 5'-Ende und einem durch ein angehängtes Fluorescein blockiertes 3'Ende eingesetzt. Die Ligationsreaktion wurde unter den in Tabelle 2.6 angegebenen Reaktionsbedingungen durchgeführt (modifiziert nach EDWARDS et al. 1991; TROUTT et al. 1992).
Bezeichnung/Herkunft	Volumen/Menge
10x T4 RNA Ligase Reaktionspuffer (Fermentas, St. Leon-Rot)	2 µl
ATP (400 μM) (Fermentas, St. Leon-Rot)	1 µl
PEG 6000 (Roth, Karlsruhe)	5 µg
BSA (200 μg/ml) (Fermentas, St. Leon-Rot)	1 µl
CoCl ₂ (20 mM) (Sigma, Taufkirchen)	1 µl
cDNA	10 µl
ddH ₂ O	3 µl
Primer: LiP B (500 nM)	1 µl
T4 RNA Ligase	1 µl
Gesamtvolumen	20 µl

Tab. 2.6 Reaktionsbedingungen zur Ligation eines Oligoprimers an Einzelstrang-cDNA.

Zur Amplifikation des 5'-Bereiches von HaGAS1 und HaCS wurde in der nachfolgenden PCR-Reaktion ein genspezifischer vorwärts Primer verwendet (TPS1int2-R für HaGAS1 und TPS2int-R für HaCS), sowie ein auf das anligierte Oligonukleotid passender nested reverse Primer (n1LipB) eingesetzt. Die PCR-Bedingungen die zur Amplifikation der 5'-Enden von HaGAS1 und HACS führten sind in Tabelle 2.7 angegeben.

Tab. 2.7 5'-RACE PCR-Reaktionsbedingungen.

3'-RACE PCR für HACS, HaGAS1	Temperatur	Zeit
initiale Denaturierung	94°C	5:00 min
Denaturierung	94°C	0:40 min
Annealing	51°C/52°C*	1:00 min
Elongation	72°C	1:20 min
finale Elongation	72°C	10:00 min

*Die Annealingtemperatur betrug 52°C für die Amplifikation des 5'Endes von HaGAS1, bzw. 51°C für die Amplifikation des gleichen Genabschnitts von HACS.

Das 3'-Ende von CYP71AVS war durch die in der Trichom-EST-Datenbank vorhandenen Sequenzdaten bekannt. Zur Identifikation des 5'-Endes von CYP71AVS wurde das SMART[™] RACE cDNA Amplification Kit (Clontech Laboratories Inc., Palo Alto, USA) eingesetzt. Als Ausgangsmaterial für die cDNA Synthese wurde Trichom Gesamt-RNA verwendet. Es wurde nach Vorschrift des Herstellers vorgegangen. Als genspezifischer Primer für die PCR-Reaktion wurde CYP71IRP eingesetzt. Zur PCR wurde das in der Anleitung beschriebene "Programm 2" verwendet, entgegen der Vorschrift wurden 30 Zyklen durchgeführt, alle anderen Parameter wurden übernommen. Das erhaltene PCR-Fragment wurde nach UA-Klonierung sequenziert.

2.5.4 Identifizierung von CYP71AVL aus Lactuca sativa

Da CYP71AVS nicht die gewünschte Aktivität zeigte, wurde ein Gen mit hoher Sequenzähnlichkeit aus *L. sativa* isoliert. Zur Identifizierung der Nukleotidsequenz wurden tblastx-Suchen mit der codierenden Sequenz von *CYP71AVS* in "Genbank" (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) durchgeführt. Hierbei wurde die Suche auf EST Sequenzen von *L. sativa* eingegrenzt. Der 5'-Bereich von *CYP71AVL* konnte hierbei in der Sequenz CLSM19391.b1_N23.ab1 (Genbank accession number: DY968314) des "The Compositae Genome Project" (http://compgenomics.ucdavis.edu/) festgemacht werden. Der 3'-Bereich wurde durch die Sequenz QGI1D04.yg.ab1 (Genbank accession number: BQ873310) repräsentiert. Anhand dieser Sequenzen wurden Primer für den codierenden Bereich konstruiert (LsGC-F, LsGC-R), die an den jeweiligen 5'-Enden zusätzliche Restriktionsschnittstellen enthielten, um den codierenden Bereich nach PCR-Amplifikation (s. 2.5.10) in den Hefevektor pESC-Ura klonieren zu können.

2.5.5 Sequenzierung der genomischen DNA Bereiche für HaGAS1, HaGAS2 und HaCS

Zur Amplifikation der Sequenzen von *HaGAS1*, *HaGAS2* und *HaCS* auf genomischer Ebene wurde aus Blattmaterial des Sonnenblumenkultivars HA300 isolierte DNA eingesetzt. Da diese Exon- und Intronbereiche eine Länge von über 2700 bp aufwiesen, wurde die DNA in mehreren Abschnitten amplifiziert, entsprechende DNA-Banden in das Plasmid pSC-A kloniert und anschließend sequenziert.

Primer für PCR-Reaktion	PCR Bedingungen*	zur Sequenzierung der klonierten PCR-Produkte verwendete Primer
TPS216-34, TPS2 int-R	A: 54°C; E: 1:00 min*	M13, T7, TPS2-5RN
TPS2-3R, TPS2-3E	A: 53°C; E: 2:00 min*	M13, T7, TPS2-3RK
TPS2int-R, TPS2int-F	A: 53°C; E: 1:00 min*	M13, T7

Tab. 2.8 Für die Amplifikation des genomischen DNA-Bereiches von HaCS verwendete Primerkombinationen.

*Für die PCR-Amplifikation wurde das Standard-PCR-Programm (Tab. 2.3) verwendet. Die reaktionsspezifischen Annealingtemperaturen (A) und Elongationszeiten (E) sind in der Tabelle angegeben.

Die Amplifikation der genomischen DNA-Sequenz für HaCS wurde mit den in Tabelle 2.8 aufgeführten Primerpaaren durchgeführt. Für HaGAS1 wurden die in Tabelle 2.9 angegebenen Primerpaare verwendet. Bei der elektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte wurden anstelle des erwarteten einzelnen Fragments zwei Banden unterschiedlicher Größe sichtbar. Diese wurden durch UA-Klonierung in das pSC-A Plasmid inseriert, anschließend wurden Plasmide mit den beiden unterschiedlichen DNA-Fragmenten durch Colony-PCR identifiziert (Primer: M13, T7). Entsprechende DNA-Fragmente wurden anschließend mit den gleichen Primern und genspezifischen, intern gelegenen Primern sequenziert (s. Tab. 2.9). Die unterschiedlichen Banden konnten später zwei verschiedenen *H. annuus* Germacren A-Synthasen zugeordnet werden (HaGAS1, HaGAS2).

Primer für PCR-Reaktion	PCR Bedingungen*	zur Sequenzierung der klonierten PCR-Produkte verwendete Primer
TPS1-8-30, TPS1int1-R	A: 52°C, 0:40 min; E: 72°C, 1:00 min*	M13, T7, TPS1int-F, TPS1-G5
TPS1-GD3, TPS1-3E	A: 54°C, 0:40 min; E 72°C, 2:30 min*	M13, T7, TPS1-G5, TPS1-3E
TPS1int-F, TPS1-G5	A: 53°C, 0:40 min; E: 72°C, 1:30 min*	M13, T7, TPS1int-F, TPS1-1330N

Tab. 2.9 Für die Amplifikation des genomischen DNA-Bereiches von *HaGAS1* verwendete Primerpaare.

*Für die PCR-Amplifikation wurde das Standard-PCR-Programm (Tab. 2.3) verwendet. Die reaktionsspezifischen Annealingtemperaturen (A) und Elongationszeiten (E) sind in der Tabelle angegeben.

2.5.6 Semiquantitative RT-PCR zur gewebe- und entwicklungsspezifischen Expressionsanalyse von Genen der Sesquiterpenund der Flavonoidbiosynthese

Für die Darstellung der differenziellen Expression von Genen der Sesquiterpenbiosynthese und des Phenolstoffwechsels im Laufe der Trichomentwicklung wurden verschiedene Gene dieser beiden Stoffwechselwege durch semiguantitative RT-PCR in ihrer Expressionsstärke bestimmt. Auf der Seite der Sesquiterpenbiosynthese wurden die identifizierten Gene der Germacren A Synthasen (HaGAS1, HaGAS2) und der Cadinen-Synthase (HaCS) untersucht. Als Matrize für die PCR-Reaktionen diente in allen Fällen cDNA, die aus Gesamt-RNA isolierter Trichome synthetisiert wurde. Zusätzlich wurde die transkribierte mRNA für die H. annuus Farnesylpyrophosphat-Synthase (FPPS, Genbank accession number: AF019892) als ein im Stoffwechselweg vorgeschaltetes Enzym auf Ebene der cDNA untersucht. Untersuchte Transkriptionsprodukte von Genen des Phenolstoffwechsels waren die Phenylalaninammoniumlyase (PAL, MAZEYRAT et al. 2005) als frühes Enzym im generellen Phenolstoffwechsel sowie die Chalkonsynthase (CHS, Genbank accession number: AF071887) als Schlüsselenzym der Flavonoidbiosynthese. Aufgrund des Auftretens von Chlorophyllfluoreszenz in den Stielzellen der Trichome wurde das Transkript für die kleine Untereinheit der Rubisco verwendet, um photosynthetische Aktivität innerhalb der Trichome zu dokumentieren (WAKSMANN et al. 1987). In allen Versuchen wurde Ubiguitin (BINET et al. 1989) als konstitutiv exprimiertes Gen bestimmt.

RNA wurde für die semiquantitative RT-PCR aus Trichomen verschiedener Entwicklungsstadien isoliert (2.4.2). Nach der Umschreibung in cDNA wurden verschiedene Verdünnungsstufen unter identischen PCR-Bedingungen mit dem Primerpaar für Ubiquitin amplifiziert. Nach der Auftrennung durch Gelelektrophorese wurden optisch gleichstarke DNA-Banden als Maß für gleiche Ausgangsmengen an cDNA zwischen verschiedenen PCR-Reaktionen gewertet. Alle Expressionsstudien wurden anschließend mit der auf diese Weise bestimmten Verdünnungsstufe der cDNA für die einzelnen Trichomentwicklungsstadien durchgeführt, um einheitliche PCR Ausgangsbedingungen zu erreichen und die differenzielle Expression der verschiedenen Gene darstellen zu können. Eine Unterscheidung zwischen *HaGAS1* und *HaGAS2* war aufgrund der hohen Ähnlichkeit der Nukleinsäuresequenz nicht möglich, da keine spezifischen Primer zur Unterscheidung der beiden Synthasen durch PCR-Reaktionen konstruiert werden konnten. Alle als Germacren A-Synthase bezeichneten Amplifikate beruhen somit auf mRNA von *HaGAS1* und *HaGAS2*.

Zur Darstellung der gewebespezifischen Expression von Enzymen der Sesquiterpenbiosynthese wurde analog zur Untersuchung der verschiedenen Trichomentwicklungsstadien vorgegangen. Als Matrize für die PCR-Reaktionen diente in diesen Versuchen cDNA, die aus Gesamt-RNA Isolationen verschiedener Gewebetypen synthetisiert wurde.

Amplifikationsprodukt	für PCR verwendete Primer (PCR-Reaktionsbedingungen*)	Größe des erwarteten PCR-Produkts
HaGAS1 + HaGAS2	TPS1int-F, TPS1int2-R (A: 53°C, E: 1:00 min)	389 bp
HaCS	TPS2int-F, TPS2int-R (A: 53°C, E: 1:00 min)	393 bp
CYP71AVS	CYP71AVSF2, CYP71AVSR2 (A: 57°C, E: 1:00 min)	744 bp
FPPS	HaFPS-F, HaFPS-F (A: 59°C, E: 1:30 min)	766 bp
Rubisco	HaRbcLSU-F, HaRbcLSU-R (A: 54°C, E: 1:00 min)	465 bp
PAL	HaPAL-F, HaPAL-R (A: 50°C, E: 1:20 min)	872 bp
CHS	HaCHS-F, HaCHS-R (A: 54°C, E: 1:00 min)	240 bp
Ubiquitin	HaUbiq-F, HaUbiq-R (A: 60°C, E: 1:00 min)	440 bp

Tab. 2.10 Primer und PCR-Bedingungen für die Untersuchung von gewebe- und entwicklungsspezifischer Expression von Genen der Phenylpropanoid- und Sesquiterpenbiosynthese.

*Für die PCR-Amplifikation wurde das Standard-PCR-Programm (Tab. 2.3) verwendet. Die reaktionsspezifischen Annealingtemperaturen (A) und Elongationszeiten (E) sind in der Tabelle angegeben.

2.5.7 Amplifikation und Restriktionsverdau von HaGAS1 und HaGAS2 aus Trichom- und Wurzel-cDNA

Aufgrund der hohen Sequenzidentität zwischen *HaGAS1* und *HaGAS2* war es nicht möglich die Transkripte der beiden Gene selektiv zu amplifizieren. Deshalb wurde zum Nachweis der

Expression beider Gene in Wurzeln und Trichomen ein Restriktionsverdau mit den Restriktionsenzymen *Pau*l und *Dra*l (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) durchgeführt (s. 2.5.14), mit denen die beiden Transkripte unterscheidbar waren. Geschnitten wurden PCR-Produkte der kompletten codierenden cDNA-Sequenz beider Gene. Diese wurden durch die Amplifikation von Trichom, beziehungsweise Wurzel cDNA erzeugt. Es wurden die Primer TPS1FL-F und TPS1FL-R eingesetzt, die Annealingtemperatur betrug 60°C, die Elongationszeit 2:20 min, alle anderen Parameter wurden vom Standard-PCR-Protokoll (Tab. 2.3) übernommen.

2.5.8 Amplifikation des codierenden Bereiches der Sesquiterpensynthasen HaGAS1, HaGAS2 und HaCS zur Expression in *E. coli*

Für die Herstellung rekombinanter Sesquiterpensynthasen in *E. coli* wurden die codierenden Sequenzen von *HaGAS1*, *HaGAS2* und *HaCS* in pET-32 Ek/LIC Plasmide (Novagen, Merck KGaG, Darmstadt) kloniert. Das Einbringen der Inserts in die Plasmide geschah nicht durch Restriktionsverdau und Ligation, sondern durch eine ligationsunabhängige Methode (LIC: ligation independent cloning). Hierbei wurden zur PCR Primer eingesetzt, die am 5'-Ende einen zusätzlichen Sequenzabschnitt trugen, von dem ein Strang komplementär zu einzelsträngigen Überhängen an der Insertionsstelle des verwendeten Plasmids war. Durch eine T4 DNA-Polymerase Behandlung wurden an den Enden der PCR-Produkte einzelsträngige Überhänge erzeugt, die komplementär zu den erwähnten einzelsträngigen Enden des Plasmids waren. Da diese eine Länge von 13 Basenpaaren aufwiesen, waren die Bindungen stark genug um nach komplementärer Anlagerung von Plasmid und Insert das Expressionskonstrukt direkt für eine Transformation verwenden zu können.

	-	
Amplifikationsprodukt	für PCR verwendete Primer	Matrize für PCR-Reaktion
HaGAS1	HaSS1EXP-F, HaSS1EXP-R	Trichom cDNA
HaGAS2	HaSS1EXP-F, HaSS1EXP-R	pESCLeu2d::HaGAS2
HaCS	HaSS2EXP-F, HaSS2EXP-R	Trichom cDNA

Tab. 2.11 Primer für die Amplifikation von *HaGAS1*, *HaGAS2* und *HaCS* zur Klonierung in den bakteriellen Expressionsvektor pET-32 EK/LIC.

Die noch im DNA-Doppelstrang vorhandenen Lücken wurden in den Bakterienzellen durch Reparaturenzyme geschlossen. Für diese Methode wurde das pET-32 EK/LIC-Kit der Firma Novagen (Merck KGaG, Darmstadt) verwendet.

Für die Amplifikation der codierenden Bereiche von *HaGAS1* und *HaGAS2* wurde KOD DNA-Polymerase (Novagen, Merck KGaG, Darmstadt) nach Anleitung des Herstellers verwendet. Die Reaktionen wurden in 50 µl Ansätzen mit 1 Unit Polymerase pro Ansatz

durchgeführt. Um genügend PCR Produkt zur Klonierung in das Plasmid zu erhalten, wurden jeweils fünf parallele Ansätze durchgeführt. Diese wurden anschließend komplett durch Gelelektrophorese aufgetrennt, die PCR-Produkte der richtigen Größe ausgeschnitten und aufgereinigt.

Tab.2.12PCR-ProgrammzurAmplifikationdercodierendenBereiche von HaGAS1 und HaGAS2 zurKlonierung in pET-32EK/LIC durch KOD DNA-Polymerase.

	Temperatur	Zeit	
initiale Denaturierung	98°C	2:00 min	_
Denaturierung	98°C	0:30 min	
Annealing	62°C	0:30 min	30x
Elongation	70°C	1:10 min	
finale Elongation	70°C	5:00 min	

Der codierende Sequenzabschnitt von *HaCS* konnte nur durch Verwendung nativer Pfu-Polymerase (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) amplifiziert werden. Die Reaktionen wurden in 50 µl Ansätzen nach Herstellervorschrift zur Polymerase durchgeführt. Die verwendeten Reaktionsbedingungen sind in Tabelle 2.13 dargestellt.

Tab. 2.13 PCR Programm zur Amplifikation des codierenden Bereiches von HaCS zur Klonierung in pET-32 EK/LIC durch native Pfu-Polymerase.

	Temperatur	Zeit	
initiale Denaturierung	95°C	2:00 min	_
Denaturierung	95°C	0:45 min	
Annealing	55°C	0:45 min	30x
Elongation	72°C	4:00 min	
finale Elongation	72°C	5:00 min	_

Die resultierenden Plasmide wurden nach dem jeweiligen Insert benannt: pET32-HaGAS1, pET32-HaGAS2 und pET32-HaCS.

2.5.9 Amplifikation der codierenden Bereiche der Sesquiterpensynthasen, CYP71AVS und CYP71AVL für die heterologe Expression in *S. cerevisiae*

Um die gesamten codierenden Sequenzabschnitte der Gene *HaGAS1, HaGAS2, CYP71AVS, CYP71AVL* und *LsLTC2* für die Klonierung in Expressionsvektoren zu amplifizieren, wurde cDNA (HaGAS2, CYP71AVL, LsLTC2) oder Plasmid-DNA (HaGAS1, HaCS) als Matrize für die PCR eingesetzt. Die 5'-Bereiche der Primer (Tab. 2.1) wurden für die Klonierung mit Restriktionsschnittstellen versehen. Für alle PCR-Amplifikationen wurden proof-reading Enzyme verwendet. Für die Amplifikation von HaGAS1 wurde KOD Hot Start DNA-Polymerase (Novagen, Merck KGaG, Darmstadt) verwendet, alle anderen Gene wurden mit Phusion-Polymerase (Finnzymes Oy, Espoo, Finnland) amplifiziert. Es wurden

50 µl PCR-Reaktionen durchgeführt, die nach Herstellervorschrift zu den Polymerasen in 0,2 ml Reaktionsgefäßen angesetzt wurden.

Amplifikationsprodukt	für PCR verwendete Primer	Matrize für die PCR-Reaktion
HaGAS1	HaTPS1-F3, HaTPS1-R4	Plasmid pET32-HaGAS1
HaGAS2	HaTPS1-F2, HaTPS1-R1	H. annuus Trichom cDNA
HaCS	HaTPS2-F2, HaTPS2-R	Plasmid pET32-HaCS
HaCSThio	HaTPS2Thio-F, HaTPS2-R	Plasmid pET32-HaCS
LsLTC2	LsGAS2-F, LsGAS2-R	Lactuca sativa Blatt cDNA
CYP71AVS	CYP71S F2, CYP71S R2	H. annuus Trichom cDNA
CYP71AVL	LsGC-F, LsGC-R	Lactuca sativa Blatt cDNA

Tab. 2.14 Verwendete Primer für die Amplifikation von Genen der Sesquiterpenbiosynthese zur Expression in *S. cerevisiae*.

Für beide Polymerasen und alle Amplifikationen wurde das selbe PCR-Programm durchgeführt (Tab. 2.15). Es wurde je PCR-Ansatz jeweils 1 μ l vorwärts und rückwärts Primer (1 μ M) eingesetzt. Für die Amplifikation jedes Gens wurden 2 PCR-Ansätze durchgeführt. Vor dem Restriktionsverdau wurden alle PCR-Produkte durch Gelelektrophorese aufgetrennt und aufgereinigt.

Tab. 2.15 PCR-Programm für die Erzeugung der DNA-Amplifikationsprodukte zur Klonierung in Hefe-Expressionsvektoren.

	Temperatur	Zeit	
initiale Denaturierung	95°C	2:00 min	-
Denaturierung	95°C	0:30 min	
Annealing	62°C	0:30 min	30x
Elongation	70°C	1:10 min	
finale Elongation	70°C	5:00 min	_

2.5.10 Klonierung der codierenden Sequenzabschnitte verschiedener Gene in Hefe-Expressionsplasmide

Nach der Aufreinigung der PCR-Produkte (s. 2.5.16) wurden die PCR-Fragmente zur Erzeugung überhängender Enden für die Klonierung in die Expressionsvektoren mit Restriktionsenzymen behandelt. Der Verdau und die Ligation wurden wie unter 2.5.14 und 2.5.15 angegeben durchgeführt.

In Tabelle 2.17 sind für die in *S. cerevisiae* exprimierten Gene die verwendeten Restriktionsenzyme, die jeweiligen Insertionsstellen sowie der verwendete Vektor dargestellt. Die Ligationsreaktionen wurden zur Transformation von *E. coli* eingesetzt. Positive Kolonien wurden mit Colony-PCR identifiziert. Nach einer Übernachtkultur wurden die Plasmide

aufgereinigt und der korrekte Einbau des Inserts durch einen Restriktionsverdau überprüft. Die auf diese Weise erhaltenen Plasmide wurden anschließend zur Transformation von Hefen des Stammes EPY300 verwendet.

PCR- Fragment	verwendete Restriktions- enzyme	Insertionsstelle im Plasmid (verwendete Restriktionsenzyme, Multiple Cloning Site (MCS), Plasmid)	Plasmid-Bezeichnung
HaGAS1	Bg/II, Notl	BgIII, Notl, MCS1, pESC-Leu2d	pESCLeu2d::HaGAS1
HaGAS2	Nhel, Xhol	Nhel, Xhol, MCS2, pESC-Leu2d	pESCLeu2d::HaGAS2
HaGAS2	Nhel, Xhol	Nhel, Xhol, MCS2, pESC-Leu2	pESCLeu::HaGAS2
HaCS	Nhel, Xhol	Nhel, Xhol, MCS2, pESC-Leu2d	pESCLeu2d::HaCS
HaCSThio	Xhol, BamHl	BamHI, XhoI, MCS2, pESC-Leu2d	pESCLeu2d::HaCSThio
LsLTC2	Nhel, BamHl	Nhel, BamHl, MCS2, pESC-Leu2d	pESCLeu2d::LsLTC2
CYP71AVS	Notl, Spel	Notl, Spel, MCS1, pESC-Ura	pESCUra::CYP71AVS/CPR*
CYP71AVL	Pacl	Pacl, MCS1, pESC-Ura	pESCUra::CYP71AVL/CPR*

Tab. 2.17 Übersicht über die Klonierungsstrategien der im Hefestamm EPY300 exprimierten Enzyme.

*in der MCS2 des Plasmids war bereits eine Cytochrom P450 Reduktase aus Artemisia annua enthalten.

2.5.11 Kolonie-PCR

Zur Identifikation positiver Transformanten, sowie der Bestimmung der Größe von Plasmidinserts wurden Kolonie-PCR Experimente durchgeführt. Hierzu wurden 12,5 µl PCR Reaktionen verwendet, die in Abschnitt 2.5.3.1 angegeben Volumina für die Komponenten der Standard-PCR wurden jeweils halbiert. Anstelle von aufgereinigter DNA als Matrize wurde von einer Agarplatte eine kleine Menge der Bakterienkolonie mit einem sterilen Zahnstocher entnommen und in den PCR-Mastermix überführt. Nach der Mischung des Reaktionsansatzes wurde die PCR-Reaktion durchgeführt. Für alle Kolonie-PCR Reaktionen wurde eine Annealingtemperatur von 55°C gewählt. Die Elongationszeit betrug bei erwarteten Insertgrößen von weniger als 1 kb Länge 1 min je Zyklus, bei allen längeren Fragmenten 2 min. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 2.16 für die verschiedenen Plasmide angegeben. Für die Sequenzierung der Inserts in den Plasmiden wurden die gleichen Primer verwendet.

Tab. 2.16 Primerliste für Kolonie-PCR	und Sequenzierung von Plasmiden
---------------------------------------	---------------------------------

Plasmid	für Kolonie-PCR verwendete Primer
pET-32 EK/LIC	T7T, STag
pSC-A	M13, T7
pESC-Ura	LeuGal10F, LeuGal10R für Inserts in MCS1 UraGal1F, LeuGal1R2 für Inserts in MCS2
pESC-Leu, pESC-Leu2d	LeuGal10F, LeuGal10R für Inserts in MCS1 LeuGal1F2, LeuGal1R2 für Inserts in MCS2

2.5.12 DNA-Gelelektrophorese

Die Trennung von DNA-Gemischen nach Fragmentgrößen erfolgte durch Elektrophorese in 1%igen (w/v) Agarosegelen (SeaKem LE Agarose, BMA Inc., Rockland, USA). Als Puffersystem wurde ein 1x TBE-Puffer (pH 8.0: 89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA) eingesetzt. Die DNA-Proben wurden mit 6x Auftragepuffer (31 % Glycerol (v/v), 65 % H_2O (v/v), 4 % Bromphenolblau/Xylencyanol (w/v) (Sigma-Aldrich GmbH, München)) versetzt und bei einer Spannung von 140 V in einer mit 1x TBE Puffer gefüllten horizontalen Elektrophoreseapparatur aufgetrennt. Als Marker wurden 5 µl GeneRule, GeneRulerPlus 1kb DNA-Leiter eingesetzt oder MassRuler DNA Ladder Mix (alle Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet. Zur Sichtbarmachung der DNA Banden wurden die Gele nach der Elektrophorese für 30 min in 0,0005 % Ethidiumbromidlösung (w/v) gefärbt, kurz in dH₂O gespült, bei UV₃₀₂ (Dual white light/UV, Quantum Appligene, Heidelberg) sichtbar gemacht und mit einem Geldokumentationssystem (Duo-Store, Intas GmbH, Göttingen) aufgenommen.

Die Auftrennung von DNA-Banden mit geringen Größenunterschieden erfolgte mittels Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE). Hierzu wurden 10 % Acrylamidgele verwendet, die analog den PAGE-Gelen für die Proteinelektrophorese (2.7.2) hergestellt wurden. Als Puffersystem für die Herstellung der Gele, wie auch als Laufpuffer wurde das Puffersystem nach LAEMMLI et al. (1970) durch 1x TBE Puffer (s. oben) ersetzt. Es wurden kontinuierliche Gele ohne geringprozentiges Sammelgel gegossen. Auf die Zugabe von SDS wurde verzichtet. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte in einer vertikalen Gelkammer (Mini-Protean-System, 0,75 mm Gele) bei 120 V für 60 min. Zur Sichtbarmachung der DNA wurden die Gele nach der Elektrophorese für 15 min in Ethidiumbromidlösung gefärbt und durch UV₃₀₂ sichtbar gemacht. Für eine Reamplifikation einzelner DNA-Banden nach PAGE wurden diese unter UV-Licht ausgeschnitten und in 2,0 mm Reaktionsgefäße überführt. Nach Zugabe von 150 µl ddH₂0 und 2 Stahlkugeln (Ø 3,0 mm, Sarstedt AG, Nümbrecht) wurde das Gelstück in einer Schüttelmühle (MM300, Retsch GmbH, Haan) mit 11 Hz für 1 min homogenisiert und anschließend für 30 min bei RT geschüttelt (Reax 2000, Heidolph Instruments GmbH, Schwabach). Die Suspension wurde für 5 min bei 12100xg zentrifugiert und der DNA-haltige Überstand in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Zur Reamplifikation der isolierten DNA-Fragmente wurde 1 µl des Überstandes in 25 µl PCR-Reaktionen verwendet.

2.5.13 RNA-Elektrophorese

Für die Qualitätskontrolle der RNA Isolationen aus Blattmaterial wurde ein Aliquot der isolierten Gesamt-RNA durch Gelelektrophorese analysiert. Hierzu wurden 10 µl des 80 ml Eluats aus der RNA-Extraktion (s. 2.4.2.) in 2x RNA-Ladepuffer (95 % Formamid, 0,025 %

SDS (w/v), 0,025 % Bromphenolblau (w/v), 0,025 % Xylencyanol (w/v), 0,025 % Ethidiumbromid (w/v), 0,5 mM EDTA) aufgenommen und für 10 min bei 70°C inkubiert. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte in einem 1%igen TBE-Gel (s. 2.5.7) bei einer konstanten Spannung von 120 V. Als Marker wurde RiboRuler™ RNA Ladder (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) eingesetzt.

Die Quantifizierung und Kontrolle von aus Trichomen isolierter Gesamt-RNA wurde durch Kapillarelektrophorese mit einem Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies GmbH, Böblingen) durchgeführt. Hierzu wurde das RNA 6000 Pico-Kit (Agilent) nach Herstellervorschrift verwendet. Die Aufnahme und Auswertung der erhaltenen Elektropherogramme erfolgte mit der Software "2100 Expert" (Agilent).

2.5.14 Restriktionsverdau von PCR-Fragmenten und Plasmiden

Alle Restriktionsenzyme wurden von den Firmen Fermentas GmbH (St. Leon-Rot) oder New England Biolabs Inc. (Ipswich, USA) bezogen. PCR Fragmente wurden vor dem Restriktionsverdau durch Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Gelextraktion aufgereinigt. Bei PCR-Fragmenten denen durch PCR endständige Restriktionsschnittstellen für die Klonierung in Plasmide angefügt wurden, erfolgte der Verdau über Nacht bei 37°C mit 0,5 U Restriktionsenzym pro 20 µl Reaktionsansatz. Für den internen Verdau von PCR-Produkten und dem Restriktionsverdau von Plasmiden wurde 1 U Restriktionsenzym pro 20 µl Reaktionsansatz verwendet und für 4 h bei 37°C verdaut. Wurden Plasmide oder PCR-Fragmente mit zwei unterschiedlichen überhängenden Enden benötigt, so wurde bei einem kompatiblen Puffersystem, ein Doppelverdau in einem einzigen Reaktionsansatz durchgeführt. Benötigten die Restriktasen verschiedene Pufferbedingungen, so wurde der Ansatz vor dem Verdau mit dem zweiten Restriktionsenzym durch das Perfectprep PCR Cleanup Kit (Eppendorf AG, Hamburg) aufgereinigt.

Vor der Klonierung wurden geschnittene Plasmide und PCR-Produkte durch Gelelektrophorese aufgereinigt, um unerwünschte PCR-Fragmente zu entfernen. Bei Plasmiden, die nur mit einem Restriktionsenzym geschnitten waren, wurde vor der Aufreinigung durch Gelelektrophorese der Restriktionsansatz mit 1 µl Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) pro 20 µl Reaktionsansatz versetzt (Inkubation für 45 min bei 37°C), um durch Dephosphorylierung der 5' Enden des geschnittenen Plasmids eine Religation ohne Insert zu verhindern.

2.5.15 Ligation von DNA

Für die Ligation von PCR-Fragmenten mit überhängenden Enden in Plasmide wurde T4 DNA-Ligase von Fermentas GmbH (St. Leon-Rot) verwendet. Pro 20 µl Ligationsreaktion wurde 1 µl Ligase (10U/µl) eingesetzt. Die Ligation erfolgte entweder für 2 h bei RT oder

über Nacht bei 4°C. Es wurde ein molares Vektor zu Insert Verhältnis von circa 1:5 eingestellt.

2.5.16 Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Für die Extraktion von DNA-Fragmenten aus TBE-Agarosegelen wurden das Perfectprep Gel Cleanup Kit (Eppendorf AG, Hamburg) oder das illustra GFX Gel Band Purification Kit (GE Healthcare GmbH, München) verwendet. Die Elution der Fragmente von den Kieselgelsäulchen erfolgte jeweils mit auf 65°C vorgewärmten ddH₂O.

2.5.17 Klonierung von PCR-Fragmenten zur Sequenzierung

PCR Fragmente über 1 kb wurden nicht direkt nach einer gelelektrophoretischen Trennung und anschließender Extraktion sequenziert, sondern zuvor über UA-Klonierung in das Plasmid pSC-A (Stratagene Inc., La Jolla, USA) kloniert und anschließend in SoloPack E. coli Zellen (Stratagene Inc., La Jolla, USA) transformiert. Diese Methode beruht auf der Eigenschaft der verwendeten Taq-Polymerase, dass am 3'-Ende der PCR-Produkte bei der Elongationsreaktion ein überhängender Adeninrest angefügt wird, welcher bei der Ligation an einen im geöffneten Plasmid 5' überhängenden Uracilrest bindet. Die in den Strängen vorhandenen Brüche werden durch kovalent an das Plasmid gebundene Topoisomerasen behoben. Um möglichst viele PCR Fragmente mit diesem überhängenden Adenin zu versehen und damit den Klonierungserfolg zu erhöhen, wurde der letzte Elongationsschritt jedes für die Klonierungsreaktion vorgesehenen PCR-Ansatzes auf 20 min erhöht. Für die Sequenzierung wurden T7und M13-Primer (Tab. 2.1) verwendet. Die Klonierungsreaktionen wurden nach Angaben des Herstellers (StrataClone PCR Cloning Kit, Stratagene Inc., La Jolla, USA) durchgeführt.

2.5.18 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA-Fragmenten und Plasmiden wurde von der Firma GATC Biotech AG (Konstanz) durchgeführt. Es erfolgte entweder eine direkte Sequenzierung aufgereinigter DNA-Fragmente oder zuvor eine Klonierung in Plasmide (s. 2.5.17) und eine anschließende Sequenzierung der entsprechenden Insertbereiche (zu den verwendeten Primern s. Tab. 2.16).

2.5.19 Software zur Auswertung von DNA- und Aminosäuresequenzen

Das Auslesen von DNA-Rohsequenzen erfolgte mit der Software Chromas Lite (V2.01, Technelysium, Tewantin, Australien). Für das Bearbeiten von Sequenzen wurden die Softwarepakete BioEdit (V7.0.9, Ibis Biosciences, Carlsbad, USA) und Lasergene (V7.0.0, DNASTAR Inc., Madison, USA) eingesetzt. Alignments von Protein und DNA Sequenzen wurden mit GeneDoc (www.psc.edu/biomed/genedoc) vorgenommen. Darstellungen von Plasmiden und Plasmidkarten wurden mit Vector NTI (V10.3.0, Invitrogen GmbH, Karlsruhe) erzeugt.

Datenbankrecherchen und Sequenzvergleiche erfolgten mit Hilfe des Internets unter folgenden Adressen: http://www.ncbi.nlm.nih.gov (Genbank, NCBI-National Centre for Biotechnology Information), http://132.192.64.52/blast/P450.html (Datenbank für Cytochrome P450 Enzyme, University of Tennessee, USA), http://compgenomics.ucdavis.edu (EST-Sequenzen von *H. annuus* und *L. sativa* aus dem Compositae Genome Project, University of California, Davis, USA), http://www.predictprotein.org/ (Signalpeptid-Vorhersage), http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/ (Intron-/Exon-Analyse) und http://www.tigr.org (TIGR-The Institute for Genomic Research, Rockville, USA). Zur Analyse von Aminosäuresequenzen wurden DNA-Sequenzen mit dem Programm Editseq aus dem Lasergene-Programmpaket in Proteinsequenzen umgeschrieben. Molare Massen von Proteinen wurden mit dem Programm Protean (DNASTAR Inc., Madison, USA) berechnet.

2.6 Mikrobiologische Methoden

2.6.1 Bakterienstämme

Für Klonierungs- und Expressionexperimente wurden verschiedene *E. coli* Stämme verwendet. Diese sind in Tabelle 2.18 aufgeführt.

Tab. 2.18 In dieser Ar	beit verwendete	Bakterienstämme
------------------------	-----------------	-----------------

Bezeichnung Herkunft	Eigenschaften/Genotyp	Verwendungszweck
<i>E. coli</i> NovaBlue (Novagen, Merck KGaG, Darmstadt)	K12 Derivat, endA1 hsdR17($r_{K12}^{-}m_{K12}^{+}$) supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lacF'(proA ⁺ B ⁺ lacl ^q Z Δ M15::Tn10) (Tet ^R)	Klonierungsarbeiten, Plasmidvermehrung
StrataClone SoloPack competent cells (Stratagene Inc, La Jolla, USA)	<i>lacZΔM15, recA</i> ⁻ , <i>endA</i> ⁻ ,Cre- Rekombinase, <i>lacZ</i> ⁻ α-complementation cassette	Klonierungsarbeiten
Rosetta 2(DE3) (Novagen, Merck KGaG, Darmstadt)	K12 Derivat, F ⁻ <i>ompT hsdS</i> _B (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal</i> <i>dcm</i> (DE3) pRARE2 (Cam ^R)	Überexpression von Proteinen
Rosetta-gami B(DE3) (Novagen, Merck KGaG, Darmstadt)	K12 Derivat, F ⁻ <i>ompT hsdS</i> _B (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal</i> <i>dcm lacY1 aphC</i> (DE3) <i>gor522</i> ::Tn <i>10 trxB</i> pRARE2 (Cam ^R , Kan ^R , Tet ^R)	Überexpression von Proteinen

2.6.2 Plasmide für die Transformation von *E. coli*

Tab. 2.19 In dieser Arbeit verwendete Plasmide.

Bezeichnung Herkunft	Eigenschaften/Genotyp	Verwendungszweck
pET-32 Ek/LIC (Novagen, Merck KGaG, Darmstadt)	bakterieller Expressionsvektor, 5917 bp, N-terminales His(6)- Tag, Strep-Tag, Thioredoxin, T7-Promotor, Amp ^r	Überexpression His-markierter Proteine in <i>E. coli</i>
pSC-A (Stratagene Inc., La Jolla, USA)	T/A Klonierungsvektor, 3467 bp, Topoisomerase, Amp ^r	Klonierung von PCR Produkten mit 3'-A-Überhang zur Sequenzierung
pESC-Leu (Stratagene Inc., La Jolla, USA)	Hefeexpressionsvektor, 7745 bp, Gal-Promotor, 2 MCS, Hefe <i>LEU2</i> ORF, Amp ^r	Expression von Proteinen in S. cerevisiae
pESC-Leu2d (Dae-Kyun Ro, Calgary University, Kanada)	high-copy Hefeexpressions- vektor durch deletierten <i>Leu2</i> Promotor, pESC-Leu Derivat, 7319 bp, Gal-Promotor, 2 MCS, Hefe <i>LEU2</i> ORF, Amp ^r	Expression von Proteinen in <i>S.</i> cerevisiae
pESC-Ura (Stratagene Inc., La Jolla, USA)	Hefeexpressionsvektor, 6631 bp, Gal-Promotor, 2 MCS, Hefe <i>URA3</i> ORF, Amp ^r	Expression von Proteinen in <i>S.</i> cerevisiae

2.6.3 Medien für die Kultivierung und Selektion von Bakterien

Alle Medien für die Kultivierung von Bakterien wurden vor der Inokulation autoklaviert oder bei nicht autoklavierbaren Chemikalien durch Filtration mittels 0,2 µm Spritzenfilter (Sartorius, Göttingen) keimfrei gemacht.

2.6.3.1 Antibiotika

Als Selektionsmarker für transformierte Bakterien wurden antibiotikahaltige Medien benutzt. Die verwendeten Arbeitskonzentrationen sind in Tabelle 2.20 dargestellt.

Antibiotikum/Hersteller	verwendete Konzentration im Medium
Ampicillin (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)	100 µg ml ⁻¹
Carbenicillin (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)	100 µg ml ⁻¹
Chloramphenico l (Sigma-Aldrich GmbH, München)	34 µg ml⁻¹

Tab. 2.20 Übersicht über die verwendeten Antibiotika

2.6.3.2 Kulturmedien

LB-Flüssigmedium:	25 g Luria-Bertani (LB) Medium (Carl Roth, Karlsruhe) $I^{-1} dH_2O$.
LB-Agar:	25 g LB-Medium; 20 g Agar (Merck KGaG, Darmstadt) $I^{-1} dH_2O$.
SOB-Medium:	20 g Trypton (Carl Roth GmbH, Karlsruhe); 5 g Hefeextrakt
	(Difco Inc., Franklin Lakes, USA); 0,5 g NaCl (Carl Roth GmbH,
	Karlsruhe) I^{-1} dH ₂ O autoklaviert, anschließend Zugabe von 10
	ml I^{-1} steril filtriertem 1 M MgCl ₂ (Merck KGaG, Darmstadt) und
	10 ml l ⁻¹ steril filtriertem 1 M MgSO ₄ .
SOC-Medium:	2 ml 20 % (w/v) Glukose (Carl Roth GmbH, Karlsruhe), steril
	filtriert; 98 ml SOB-Medium.
X-Gal:	2 % (w/v) 5-bromo-4-chloro-3-inodlyl- $\beta\text{-}D\text{-}Galactopyranosid$ in
	Dimethylformamid, pro Agarplatte wurden 40 µl ausgestrichen.

2.6.4 Kultivierung von Bakterien

Flüssigkulturen von *E. coli* wurden, soweit nicht anders angegeben, bei 37°C im Schüttelinkubator (Excella E24, New Brunswick Scientific Co. Inc., Edison, USA) bei 250 rpm kultiviert. Agarplatten wurden im Wärmeschrank (3158, Forma Scientific Inc., Marietta, USA) über Nacht bei 37°C inkubiert. Die heterologe Expression von Proteinen erfolgte unter verschiedenen Bedingungen, siehe hierzu Tabelle 2.22.

2.6.5 Glycerinkulturen

Zur dauerhaften Stammhaltung von *E. coli* Stämmen wurden 500 μ l Übernachtkultur (selektives LB-Flüssigmedium) mit 500 μ l 65 % (v/v) steril filtriertem Glycerin (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) gemischt, bei -70°C eingefroren und bei dieser Temperatur gelagert.

2.6.6 Transformation von Escherichia coli

Alle Transformationsexperimente wurden mit chemisch kompetenten Zellen der in Tab. 2.18 angegebenen *E. coli* Stämme durchgeführt. Für die Klonierung von Plasmiden in NovaBlue und StrataClone Zellen wurden pro Transformationsansatz 25 µl Zellen verwendet. Für die Transformation von Plasmiden in die Expressionsstämme Rosetta 2(DE3) und Rosetta-gami B(DE3) wurden 10 µl Zellen verwendet. Die kompetenten Zellen wurden bei -70°C gelagert und zur Transformation 5 min auf Eis aufgetaut. Nach der Zugabe von 1 µl Plasmid oder 1 µl Ligationsansatz erfolgte eine Inkubation von 5 min auf Eis, bevor die Zellen für 45 s einem Hitzeschock von 42°C im Wasserbad ausgesetzt wurden. Nach einer 2 minütigen Inkubation auf Eis erfolgte die Zugabe von 250 µl SOC-Medium. Vor dem Ausplattieren auf selektiven LB-Agarplatten erfolgte eine Kultivierung für 60 min im Schüttelinkubator bei 37°C.

2.6.7 Saccharomyces cerevisiae EPY300

Für alle Expressionsexperimente in S. cerevisiae wurde der Stamm EPY300 (erhalten von D.-K. Ro, University of Calgary, Department of Biological Sciences, Alberta, Kanada) verwendet. Dieser Stamm basierte auf dem Stamm S. cerevisiae BY4742, einem Derivat von S288C (Ro et al. 2006). Es handelte sich um eine auxotrophe Mutante für die Aminosäuren Leucin und Tryptophan sowie die Base Uracil. EPY300 war für die biotechnologische Produktion von Sesquiterpenen optimiert. Analog zum Stamm EPY224 (Ro et al. 2006) war der ERG9 Promotor durch den reprimierbaren Promotor P_{MET3} -ERG9 ersetzt. Durch die Methionin Wachstumsmedium Zugabe ins wurde die Expression von der Farnesylpyrophosphate-Farnesyl-Transferase (ERG9, Squalen-Synthase) weitgehend reprimiert. Dadurch wurde FPP nicht mehr von den Hefen in der Sterolbiosynthese umgesetzt, sondern in den Zellen akkumuliert. Wurden nun in den Hefezellen Sesquiterpensynthasen exprimiert, so stand diesen die lineare Ausgangsverbindung für die Bildung des ersten zyklischen Produktes zur Verfügung. Um die Produktion von FPP in den Hefen weiter zu steigern, befand sich eine weitere Kopie der 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym A-Reduktase im Hefe-Chromosom integriert (Ro et al. 2006).

2.6.8 Medien für die Kultivierung von S. cerevisiae

- YPAD: 0,037 g Adenin-Hemisulfat, 5 g Hefeextrakt (Difco Inc., Franklin Lakes, USA), 10 g BactoPepton (BD Bioscience, Sparks, USA), 10 g BactoAgar (BD Bioscience, Sparks, USA), mit ddH₂O auf 450 ml aufgefüllt und autoklaviert. Nach dem Abkühlen erfolgte die Zugabe von 50 ml 20%iger (w/v) sterilfiltrierter Glukose für die Anzucht und Kultivierung der Hefen ohne Expression der plasmidkodierten Gene.
- **YPA** (für Proteinexpression): Zusammensetzung wie YPAD, der Kohlenhydratanteil wurde durch 0,2 % (w/v) Glukose und 1,8 % (w/v) Galaktose ersetzt.
- **SC drop-out**: Synthetic Complete drop-out/Hopkins Medium Mix: 3,35 g Nitrogen base w/o amino acids (BD Bioscience, Franklin Lakes, USA), 0,695 g Synthetic Complete (SC) Aminosäuremischung – His -Met -Leu -Trp -Ura (Qbiogen Inc., Montreal, Kanada), 42,8 mg Tryptophan, mit ddH₂O auf 450 ml aufgefüllt und steril filtriert. Je nach gewünschtem Selektionsmarker wurden 85,6 mg Uracil Γ¹ oder 173,4 mg Leucin Γ¹ zugegeben. Als Kohlenstoffquelle wurde dem Medium 50 ml 20%ige (w/v) Glukose zur Kultivierung der Hefen zugesetzt. Zur Induktion der Proteinexpression wurden dagegen 50 ml einer Mischung aus 20 % Glukose/20 % Galaktose (1:10 v/v) zugesetzt. Zur Repression des Promotors P_{MET3}-*ERG9* wurde der Kulturansatz mit Methionin (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim) versetzt (1 mM Endkonzentration).
- Agar-Platten:Zusammensetzung wie SC-Drop-out Medien mit zusätzlich 2 %
(w/v) Agar (Merck KGaG, Darmstadt).

2.6.9 Hefe-Transformation

Transformationsmix 240 μl 50 % (w/v) Polyethylenglykol 3350 (Carl Roth, Karlsruhe), 36 μl 1 M LiAc (Fluka AG, Buchs, Schweiz), 50 μl aufgekochte Einzelstrang-Carrier DNA (Stammlösung: 200 mg Lachstestis-DNA (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim) gelöst in 100 ml TE-Puffer, pH 8,0, 1 mM EDTA), 24 μl H₂O,10 μl Plasmid-Lösung. Für alle Transformationen von *S. cerevisiae* wurde der Stamm EPY300 verwendet und entsprechend dem Protokoll von GIETZ & WOODS (2002) vorgegangen.

50 ml YPAD-Medium wurden mit 2,0 ml einer Übernachtkultur in selektivem SC-Medium angeimpft. Die Kultivierung erfolgte bei 30°C und 200 rpm im Schüttelinkubator für 5 Stunden. Anschließend wurde die Kultur in sterile 50 ml Plastikröhrchen überführt und bei 3000xg für 5 min zentrifugiert. Der Kulturüberstand wurde verworfen und die Zellen in 25 ml sterilem ddH₂O resuspendiert. Die Hefen wurden ein zweites Mal bei 3000xg für 5 min zentrifugiert, in 1,0 ml ddH₂O aufgenommen und dann in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Nach erneuter Zentrifugation (3000xg, 1 min) wurde der Überstand entfernt, ddH₂O bis zu einem Gesamtvolumen von 1,0 ml zugegeben und die Zellen resuspendiert. Die so erhaltene Suspension wurden gleichmäßig auf die gewünschte Zahl an Transformationsansätzen in 1,5 ml Reaktionsgefäßen verteilt. Abermals wurden die Gefäße zentrifugiert (3000xg, 1 min) und der Überstand verworfen. Zu jedem Transformationsansatz wurde ein vorbereiteter, eisgekühlter Reaktionsmix mit dem individuellen Plasmid zugegeben. Die Zellen wurden mit dem Reaktionsmix resuspendiert und zur Transformation für 40 min bei 42°C im Wasserbad inkubiert. Nach dem Hitzeschock wurden die Gefäße bei 2000xg für 30 s zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 400 µl ddH₂O resuspendiert. Davon wurden 50 µl beziehungsweise 350 µl auf zwei selektive Agarplatten (SC-Medium, 2.6.8) vorsichtig ausgestrichen und für 48 bis 72 h bei 30 °C kultiviert.

2.6.10 Glycerinkulturen von S. cerevisiae

0,5 ml Übernachtkultur in selektivem SC-Flüssigmedium wurden mit 0,5 ml 50 % (v/v) sterilem Glycerin versetzt, bei -70°C eingefroren und bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.7 Protein-Techniken

2.7.1 Isolation von Proteinen aus Pflanzenmaterial

Proteine aus der Sonnenblume wurden sowohl aus frischem Pflanzenmaterial als auch aus in flüssigem Stickstoff zerkleinert und bei -70°C gelagertem Material isoliert. Frische Proben wurden vor der Isolation mit einer Rasierklinge zerkleinert. Der Aufschluss aller Proben erfolgte in 2,0 ml Reaktionsgefäßen mit 200 µl Proteinpuffer (100 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1mM EDTA; 0,1 mM MgCl₂) nach Zugabe von 3 Keramikkugeln (2,8 mm, Precellys, Peqlab GmbH, Erlangen) in einer Schüttelmühle (MM300, Retsch GmbH, Hann) bei 11 Hz für 3 min. Nach dem Aufschluss wurden Zelltrümmer bei 21000xg und 4°C für 15 min pelletiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das Pellet mit 200 µl Proteinpuffer resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (21000x, 4°C, 15 min) wurde der Überstand mit dem ersten vereinigt. Der Proteinextrakt wurde mit Proteinpuffer im Reaktionsgefäß auf 500 µl aufgefüllt und mit 280 µg Ammoniumsulfat versetzt. Die Proteine wurden für 3 Stunden auf Eis unter gelegentlichem Schütteln gefällt und anschließend durch Zentrifugation (21000xg, 20 min, 4°C) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 200 µg Proteinpuffer resuspendiert.

2.7.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Proteinproben wurden vor dem Auftrag in die Geltaschen mit 4x Probenpuffer (200 mM Tris, pH 6,8; 40 % Glycerol (v/v); 8 % SDS (w/v); 0,2 % Bromphenolblau (w/v); 400 mM DTT; modifiziert nach SAMBROOK & RUSSELL (2001)) versetzt und zur Denaturierung für 5 min bei 95°C inkubiert. Die Elektrophorese wurde wie von LAEMMLI et al. (1970) beschrieben in Minigelen (Mini-Protean System, Bio-Rad GmbH, München) durchgeführt. Die Proteinproben wurden in 4%igen Sammelgelen (0,125 M Tris-HCl, pH 6,8, 4 % Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1) (v/v) (Carl Roth GmbH, Karlsruhe), 0,1 % SDS (w/v), 0,075 % APS (w/v), 0,05 % TEMED (v/v)) konzentriert und in 10%igen Trenngelen (0,375 M Tris-HCI, pH 8,8, 10 % Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1) (v/v) (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) 0,1 % SDS (w/v), 0,075 % APS (w/v), 0,05 % TEMED (v/v)) elektrophoretisch aufgetrennt. Die Trennung wurde bei 120 V für 80 min in Laufpuffer (50 mM Tris, pH 8,3, 384 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS) durchgeführt. Nach der Trennung wurden die Sammelgele abgetrennt, die Gele für 15 min in Fixierlösung (79 % H₂O, 1 % 85% ige ortho-Phosphorsäure, 20 % Methanol) inkubiert und anschließend in Färbelösung (60 % (v/v) H₂O, 20 % (v/v) Methanol, 20 % (v/v) Roti-Blue (kolloidale Lösung, Carl Roth GmbH, Karlsruhe)) über Nacht bei RT geschüttelt. Falls nötig wurden die Gele für 1-2 h entfärbt (5 % Methanol, 7 % Eisessig, 88 % ddH₂O). Für die Standardelektrophorese wurden 0,75 mm Gele verwendet, für Western Blot Experimente kamen 1,5 mm Gele zum Einsatz. Als Marker wurde PageRuler Prestained Protein Ladder Plus (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) verwendet. Die Gele wurden in selbst hergestellten Trockenrahmen (Bilderrahmen Raket, Ikea GmbH & Co KG, München) zwischen zwei Lagen Cellophan getrocknet und nach der vollständigen Trocknung mit einem Scanner (Perfection 6400U, Seiko Epson Corp., Hirooka, Japan) digitalisiert.

2.7.2.1 Proteinquantifizierung

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen in Lösungen wurde nach BRADFORD (1976) in Mikroansätzen durchgeführt. Jeweils 800 μ l Proteinlösung wurden mit 200 μ l Bradford-Reagenz (25 mg Coomassie Brilliant Blue G250 in 12,5 ml Ethanol (99 %) und 25 ml 85%ige ortho-Phosphorsäure gelöst, mit H₂O auf 250 ml aufgefüllt und zweimal filtriert) versetzt. Nach 5 min Inkubation bei RT erfolgte eine photometrische Quantifizierung bei 595 nm (Lambda 12, PerkinElmer Inc., Waltham, USA). Als Eichstandard diente eine Konzentrationsreihe von 1 bis 20 μ g/ml BSA in ddH₂O. Für die photometrische Messung wurden Einmalplastikküvetten (Sarstedt AG, Nümbrecht) verwendet.

2.7.3 Herstellung rekombinanter Sesquiterpensynthasen in *E. coli*

2.7.3.1 Klonierung von Sesquiterpensynthasen in Expressionsplasmide

Für die heterologe Expression der Sesquiterpensynthasen aus *H. annuus* in *E. coli* wurde der Expressionsvektor pET-32 EK/LIC (Novagen, Merck KGaG, Darmstadt) ausgewählt. Die Verwendung führte zur Bildung eines Fusionsproteins (s. Abb. 3.19). Dem rekombinanten Protein wurden am N-Terminus ein 6xHis-Tag und ein S-Tag zur Proteinaufreinigung durch Affinitätschromatographie angefügt. Darüber hinaus befand sich am Aminoende des Fusionsproteins eine Plasmid codierte Sequenz für Thioredoxin (Größe des exprimierten Thioredoxinproteins: 12,8 kD). Diese führte bei allen exprimierten Enzymen zu einer deutlichen Verbesserung der Löslichkeit und einer erheblichen Verringerung der Menge an Einschlusskörperchen während der Proteinexpression in den verwendeten *E. coli* Stämmen. Eine Enterokinase-Schnittstelle direkt vor der ersten Aminosäure des gewünschten Expressionsproduktes erlaubte die komplette Entfernung aller aminoterminalen Tags sowie des Thioredoxins. Im verwendeten System wurde das zu exprimierende Gen nicht über

Abschnitt	Länge der codierenden Sequenz	Aminosäuren	kD
HaGAS1	1680 bp	560	64,4
HaGAS2	1680 bp	560	64,4
HaCS	1668 bp	556	64,2
Thioredoxin	327 bp	109	12,8
vom Transkriptionsstart bis zur ersten Aminosäure der Sesquiterpensynthasen	474 bp	158	19,0

Tab. 2.21 Größe der Expressionskonstrukte

Restriktionsschnittstellen in das Plasmid eingefügt. Stattdessen wurden überhängenden Enden durch eine Behandlung mit T4 DNA-Polymerase erzeugt, die komplementär zu den überhängenden Enden des Plasmids waren (s. 2.5.8). Eine Plasmidkarte befindet sich im Anhang.

2.7.3.2 Expressionsbedingungen der rekombinanten Sesquiterpensynthasen

Die Expression der in H. annuus identifizierten Terpen-Synthasen für in vitro Umsetzungsreaktionen erfolgte in E. coli. Da hierfür nativ gefaltetes und lösliches Protein nötig ist, wurden verschiedene E. coli Expressionsstämme (BL21 (DE3), Rosetta 2(DE3), Rosetta-gami B(DE3)) unter verschiedenen Bedingungen getestet und auf die Bildung löslicher rekombinanter Proteine hin untersucht. Für alle drei Proteine zeigte sich lösliches Protein nur, wenn diese als Fusionsproteine mit aminoterminalem Thioredoxin exprimiert wurden. In allen anderen Fällen wurden fast ausschließlich unlösliche Einschlußkörperchen gebildet. Die codierenden Nukleinsäuresequenzen für alle drei Proteine wurden hierzu in das Plasmid pET-32 EK/LIC kloniert. Die Expressionsbedingungen und verwendeten Bakterienstämme sind in Tab. 2.22 dargestellt. Für alle Expressionsversuche wurde LB-Flüssigmedium mit Chloramphenicol und Carbenicillin als Selektionsmarker verwendet. Bis zum Erreichen der zur Induktion geeigneten optischen Dichte (OD) wurden die Bakterien bei 37°C im Schüttler (Excella E24, New Brunswick Scientific Co. Inc., Edison, USA) kultiviert. Anschließend wurden die Expressionskulturen für 30 min an die bei der Expression verwendeten Temperaturen adaptiert, bevor die Zugabe des synthetischen Induktors Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) erfolgte. Die Expression bei 10°C erfolgte in einem auf 4°C temperierten Kühlraum in einem Wasserbad-Rundschüttler (Aquatron, Infors AG, Einbach, Schweiz), Expressionen bei 30°C wurden im Excella E24 Schüttler durchgeführt.

exprimiertes Protein Bakterienstamm		Induktion bei OD	Expressions- termperatur	IPTG Konz im Medium	Expressions- dauer
HaGAS1 Rosetta-gami B (Novagen, Madison, USA)		0,8-1,0	30°C	0,5 mM	4 h
HaGAS2	Rosetta-gami B (Novagen, Madison, USA)	0,8-1,0	30°C	0,5 mM	4 h
HaCS	Rosetta 2 (Novagen, Madison, USA)	1,5-2,0	10°C	0,1 mM	20 h

Tab. 2.22 Verwendete Expressionsbedingungen von *E. coli* zur Produktion von rekombinanten Sesquiterpensynthasen der Sonnenblume

2.7.3.3 Aufreinigung der heterolog exprimierten Proteine

Waschpuffer 1:	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8,0
Waschpuffer 2:	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 100 mM Imidazol, pH 8,0
Elutionspuffer:	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 8,0
Reaktionspuffer:	15 mM 3-(N-Morpholino)-2-hydroxypropansulfonsäure (MOPSO), 10 %
	Glycerin, 1 mM Ascorbinsäure, 10 mM MgCl ₂ , 1 mM MnCl ₂ , pH 7,0
	(modifiziert nach BENNETT et al. (2002); BERTEA et al. (2006)).

Nach dem Ende des Expressionszeitraums wurden die E. coli-Kulturen portionsweise in 50 ml Plastikröhrchen überführt (Sarstedt AG, Nümbrecht) und die Zellen sedimentiert (9000xg, 5 min, 4°C). Der Überstand wurde jeweils verworfen und die Bakterien aus dem gesamten Kulturvolumen sukzessive im selben 50 ml Röhrchen abzentrifugiert. Der Niederschlag wurde anschließend sofort bei -25°C eingefroren und zwischengelagert. Für die Extraktion löslicher Proteine aus dem E. coli Bakterienpellet wurden pro 1 g Pellet 5 ml BugBuster Protein Extraction Reagent (Novagen, Merck KGaG, Darmstadt) zugegeben. Der Verdau freigesetzter Nukleinsäuren erfolgte durch 1 µl Benzoase (Novagen) je ml BugBuster-Reagenz. Zur Zelllyse wurden die Ansätze für 20 min bei RT geschüttelt (Reax 2000, Heidolph Instruments GmbH, Schwabach). Unlösliche Proteine und Zellbestandteile wurden bei 4°C mit 9000xg für 25 min pelletiert. Der Überstand, der die löslichen Proteine enthielt, wurde durch einen 45 µm Spritzenfilter gereinigt und in ein 15 ml Plastikröhrchen (Sarstedt AG, Nümbrecht) überführt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1,0 ml präequilibrierter Ni-NTA-Agarose (50 % Suspension, Novagen) pro 5 ml BugBuster Reagenz. Zur Bindung der 6xHis-Tag Sequenzen der rekombinanten Enzyme an die Ni-NTA-Agarose wurden die Ansätze für 60 min bei 4°C geschüttelt. Der gesamte Ansatz wurde in ein vertikal aufgehängtes Chromatographie-röhrchen (Novagen, Merck KGaG, Darmstadt) überführt, nach 10 min Sedimentationszeit wurde der ungebundene Anteil abgelassen. Um verbliebene ungebundene Proteine zu entfernen, wurden die Säulen zweimal mit 4 ml eiskaltem Waschpuffer 1 gespült. Bei der Aufreinigung von HaCS erfolgte ein dritter Waschschritt mit 4 ml Waschpuffer 2. Die Elution des an die Ni-NTA-Matrix gebundenen His-Tag Proteins erfolgte durch fünfmalige Zugabe von je 500 µl eiskaltem Elutionspuffer. Die fünf Fraktionen wurden hierbei einzeln aufgefangen. Zur Konzentration der Proteinlösungen wurden 500 µl Elutionslösung durch Ultrazentrifugation in Vivaspin 500 Säulchen (Ausschlussgröße 30 kDa, Sartorius AG, Göttingen) auf 50 µl eingeengt (21000xg, 20 min, 4°C). Die Entsalzung und das Umpuffern erfolgten ebenfalls in den Vivaspin 500 Röhrchen durch mehrmalige Zugabe von Reaktionspuffer und erneutem Zentrifugieren (21000xg, 40 min, 4°C).

53

2.7.3.4 *In vitro* Enzym-Substrat-Umsetzungsreaktionen mit rekombinanten Sesquiterpensynthasen und dem Substrat Farnesylpyrophosphat

Die funktionelle Charakterisierung von in Ε. coli heterolog exprimierten Sesquiterpensynthasen wurde in 750 µl Ansätzen in 2,0 ml Reaktionsgefäßen durchgeführt. Es wurden zwischen 200 und 400 µg rekombinantes und in Reaktionspuffer (15 mM MOPSO pH 7,0, 10 % Glycerin, 1 mM Ascorbinsäure, 10 mM MgCl₂, 1mM MnCl₂, modifiziert nach BENNETT et al. (2002) und BERTEA et al. (2006)) umgepuffertes Protein eingesetzt. Zum Reaktionsansatz wurde das Substrat Farnesylpyrophosphat (FPP, Sigma-Aldrich GmbH, München) in einer Endkonzentration von 50 µM zugegeben, das Volumen mit Reaktionspuffer auf 750 µl aufgefüllt und der Ansatz gemischt. Um die gebildeten Verbindungen zu extrahieren, wurden die Ansätze vorsichtig mit 250 µl n-Pentan überschichtet und für 60 min bei 30°C mit 100 rpm geschüttelt (Excellera E24, New Brunswick Scientific Co. Inc., Edison, USA). Anschließend wurden die Ansätze kräftig gemischt (Vortex Genie 2, Scientific Industries Inc., New York, USA), um im Puffer enthaltene Reaktionsprodukte in die Pentanphase zu überführen. Nach einem kurzen Zentrifugationsschritt wurde die Oberphase mittels Pipette abgenommen. Der Reaktionsansatz wurde erneut mit 250 µl Pentan überschichtet, ausgeschüttelt und die Pentanphasen vereinigt. Der Reaktionsansatz wurde ein drittes Mal mit 500 µl Pentan und Diethylether (1:4 v/v) ausgeschüttelt. Die Pentanphasen wurden über eine kurze, mit MgSO₄ überschichtete Aluminiumoxidsäule (60, neutral, Carl Roth GmbH, Karlsruhe) in einer Pasteurpipette geleitet. Der Pentan-Diethyletherextrakt wurde ebenso über die Säule geleitet und mit dem Pentanextrakt vereinigt. Anschließend wurde das Säulchen mit 1,5 ml Diethylether gespült und dies mit den anderen Fraktionen vereinigt. Der Extraktionsansatz wurde unter einem leichten Stickstoffstrom auf ca. 50 µl aufkonzentriert. Für GC-FID Analysen wurde 1 µl dieses Konzentrates direkt eingespritzt. Für GC-MS Messungen wurden 25 µl dieses Ansatzes mit 375 µl Pentan verdünnt und 1 µl pro gaschromatographischer Messungen injiziert (s. 2.7.6.5).

2.7.3.5 Enterokinasebehandlung des rHaCS-Fusionsproteins

Bei der Expression rekombinanter Enzyme im pET-32 Ek/LIC System ist die Entfernung des kompletten aminoterminalen Fusionsproteinanteiles genau vor der ersten Aminosäure des gewünschten rekombinanten Enzyms durch einen Verdau mit Enterokinase (EK) möglich (Erkennungssequenz: AspAspAspAspLys↓). Für die Herstellung von Antikörpern wurden die zusätzlich zum HaCS Protein im Fusionprotein enthaltenen N-terminalen Bereiche (His-Tag, Thioredoxin) proteolytisch entfernt, um möglichst spezifische Antikörper gegen das native Protein zu erhalten. 2 mg über Ni-NTA-Agarose aufgereinigte rekombinante HaCS (rHaCS) wurde hierzu in Vivaspin 500 Röhrchen (21000xg, 20 min, 4°C) aufkonzentriert und viermal

mit dem entsprechenden 1x EK-Reaktionspuffer (20 mM Tris-HCI, 50 mM NaCI, 2 mM CaCl₂, 2mM MgCl₂, pH 7.4) verdünnt um eine Entsalzung durch Ultrazentrifugation (21000xg, 25 min, 4°C) zu erreichen. Das endgültige Proteinkonzentrat wurde auf 400 µl verdünnt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. 40 U rekombinante Enterokinase (Novagen) wurden mit 1x EK-Reaktionspuffer auf 100 µl verdünnt und zu den 400 µl rHaCS-Lösung zugegeben. Der proteolytische Verdau wurde bei RT für 5 Stunden unter gelegentlichem leichten Schütteln durchgeführt. Zum Entfernen der Protease wurde EKapture Agarose (Novagen, Merck KGaG, Darmstadt) verwendet. Laut Hersteller bindet rEK spezifisch an diese Agarose und konnte durch Zentrifugation entfernt werden. Hierzu wurden 1,0 ml EKapture-Agarose (50 % Suspension) bei 1000xg für 5 min sedimentiert. Der Überstand wurde durch 500 µl 1x EK-Reaktionspuffer ersetzt und wiederum sedimentiert. Zur Equilibrierung wurde dieser Schritt 2 weitere Male wiederholt. Anschließend wurde die Agarose mit 250 µl 1x EK-Reaktionspuffer resuspendiert und in einen 2 ml Zentrifugationsfilter (Novagen) überführt. Der gesamte Ansatz des proteolytischen Verdaus wurde ebenfalls in den Zentrifugationsfilter pipettiert und mit diesem die Agarose resuspendiert. Zur Bindung der Enterokinase wurde der Ansatz 10 min bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert und anschließend bei 1000xg für 5 min zentrifugiert. Im Filter wurde die Agarose mit der gebundenen Protease zurückgehalten, während sich im Durchfluss das rekombinante HaCS und der entfernte N-terminale Abschnitt befanden. Zu den 500 µl Durchflussvolumen wurden 250 µl (50% ige Suspension) an präequilibierter Ni-NTA-Agarose gegeben um den N-terminalen Bereich des Fusionsproteins durch Bindung der darin enthaltenen 6xHis-Tag Sequenz zu entfernen. Die Bindung wurde bei 4°C unter leichtem Schütteln in einem 2,0 ml Reaktionsgefäß durchgeführt (60 min). Anschließend wurde die Suspension in ein Chromatographiesäulchen (Novagen) überführt, nach dem Absinken der Agarose wurde der Durchfluss abgenommen. Für die Herstellung der Antikörper wurde das aufgereinigte Protein HaCS in Vivaspin 500 Zentrifugationsröhrchen in PBS-Puffer (150mM NaCl, 150 mM NaH₂PO₄, 5 mM MgCl₂ pH 7,2) für die Immunisierung umgepuffert (dreimalige Zentrifugation, 21000xg, 15 min).

2.7.4 Antikörperherstellung

Antikörper gegen HaCS wurden von der Firma Biogenes GmbH (Berlin) mit dem gelieferten Antigen rHaCS hergestellt. Mit dieser Lösung wurden 2 Kaninchen immunisiert. Das gelieferte Antiserum wurde mittels Western Blot auf Spezifität und Kreuzreaktionen getestet.

2.7.5 Immunologischer Nachweis von *H. annuus* Sesquiterpensynthasen durch Western Blot

Für Western Blot Experimente wurden partiell aufgereinigte Proteine oder Proteingemische in 1,5 mm Mini Gelen (10 % PAGE) elektrophoretisch aufgetrennt. Der Transfer der Proteine

auf Nitrocellulose geschah nach dem Semidry-Verfahren in einer Multiphor-Blottingapparatur (2117, LKB Bromma, Schweden) auf Nitrocellulose bei 150 mA (ECPS 3000/150, Pharmacia, Schweden) für 90 min. Nach dem Elektrotransfer wurde die Membran sofort für 1 h in Blockierungslösung (1x TBS, 0,1 % Tween, 6 % Magermilchpulver (w/v)) bei RT geschwenkt (Neolab Shaker DRS-12, 30 rpm). Die Blockierungslösung wurde durch 10 ml primäre Antikörper-Lösung (1:5.000 Anti-HaCS in Blockierungslösung) ersetzt und unter Schütteln über Nacht bei 4°C an die Proteine gebunden. Die Membran wurde anschließend dreimal für 10 min mit 100 ml Waschlösung (1x TBS, 0,1 % Tween) unter Schütteln gewaschen. Zur Detektion des primären Antikörpers wurde die Nitrocellulosemembran in einer 1:10.000 Verdünnung des sekundären Antikörpers (Anti-Kaninchen-Meerrettichperoxidase gekoppelt, Sigma-Aldrich GmbH, München) für 1 h bei RT geschwenkt. Die Lösung des sekundären Antikörpers wurde abgegossen und der Blot dreimal für 10 min mit jeweils 100 ml Waschlösung unter leichtem Schwenken gewaschen. Die Detektion der Proteine erfolgte durch eine Chemilumineszenzreaktion der an den sekundären Antikörper gekoppelten Meerrettichperoxidase. Hierzu wurde der Blot für 2 min in einer Mischung aus 13 ml ECL-1-Lösung (100 mM Tris-HCl pH 8,5; 0,2 mM p-Coumarsäure (Sigma-Aldrich GmbH, München); 5 mM 3-Aminophtalhydrazide (Fluka AG, Buchs, Schweiz) und 50 µl ECL-2-Lösung (3 % H₂O₂) geschwenkt. Der Blot wurde aus der ECL-Lösung entnommen und in einer zurechtgeschnittenen Klarsichthülle in einer Röntgenkassette fixiert. Die Detektion der Chemilumineszenz erfolgte durch Belichtung von Röntgenfilm.

2.7.6 Expression von Enzymen der Sesquiterpenbiosynthese in Hefen

Zur Expression von Proteinen der Sesquiterpenbiosynthese in Hefen wurden Plasmide der pESC-Serie (Stratagene Inc., Cedar Creck, USA) verwendet (s. Tab. 2.19). Diese besaßen je Plasmid zwei "multiple cloning sites" (MCS), die beide unter der Kontrolle eines durch Galaktose induzierbaren Promotors standen. Zur Expression von Proteinen, die in das high-copy Plasmid pESC-Leu2d kloniert waren, wurden die Zellen in YPAD-Medium mit 0,2 % Glukose und 1,8 % Galaktose kultiviert. Da Hefen Glukose bevorzugt als Kohlenstoffquelle nutzen, wird Galaktose erst verstoffwechselt, nachdem die gesamte Glukose des Mediums aufgebraucht ist. Da es sich hierbei um eine aktive Aufnahme in die Zellen handelt, erfolgt die Aufnahme von Galaktose und damit die Induktion der Expression der auf den Plasmiden codierten Proteine erst nach circa 24 h. Insgesamt wurden die Hefezellen 4 Tage bei 30°C kultiviert, bevor die Produkte aus dem Kulturansatz aufgereinigt und analysiert wurden. Bei der Verwendung der Plasmide pESC-Leu und pESC-Ura erfolgte die Kultur der Hefen in einem selektiven SC-Drop-out Medium, ebenfalls mit 0,2 % Glukose und 1,8 % Galaktose als Kohlenstoffquelle und zur Induktion.

2.7.6.1 Extraktion der Produkte von HaGAS1, HaGAS2 und HaCS aus dem Kulturmedium

Die Flüssigmedien wurden Inokulation transformierten nach der mit den Hefeexpressionsstämmen, mit 10 % des Kulturvolumens an Dodecan (Sigma-Aldrich GmbH, München) überschichtet. In der Dodecanschicht wurden die von den Hefen freigesetzten Sesquiterpene gelöst und somit von den Hefezellen abgetrennt. Nach dem Ende der Kulturzeit der Hefen wurde der gesamte Ansatz in 50 ml Plastikröhrchen abgefüllt und für 5 min mit 10000xg zentrifugiert (Sorvall Legend RT, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA). Der Überstand wurde abgenommen und der Rest der Kultur verworfen. Für GC-MS und GC-FID Messungen wurden 10 µl des Dodecan-Überstandes mit 990 µl Ethylacetat in GC-Glasgefäßen (Agilent Inc., Mississauga, Kanada) gemischt und direkt für die GC-Messung verwendet.

2.7.6.2 Extraktion und Nachweis der Germacren A-Carboxylsäure aus dem Hefezellpellet

Die Produkte der Germacren A Synthase HaGAS2 und den Cytochrom P450 Monooxygenasen CYP71AVS oder CYP71AVL zusammen mit der Cytochrom P450 Reduktase aus Artemisia annua wurden aus dem Zellpellet der entsprechenden Kulturansätze extrahiert. 200 ml Kulturmedium wurden nach einer 4-tägigen Kulturdauer sukzessive in einem 50 ml Plastikröhrchen pelletiert (9000xg, 5 min). Der Kulturüberstand wurde verworfen, das Pellet mit zweimal 2,5 ml Extraktionspuffer (50 mM Tris-HCl, pH 9,0, eingestellt mit 2 M NaOH) resuspendiert und gewaschen und die Hefezellen nach jedem Extraktionsschritt durch Zentrifugation pelletiert. Die Überstände wurden vereinigt. Für GC-MS Messungen wurde 1 ml des vereinigten Extraktionspuffers mit 2 M HCl (ca. 23 µl) auf pH 2,0 eingestellt um eine Protonierung der Carboxylgruppe zu erreichen. Die Germacren A-Carboxylsäure wurde durch Ausschütteln mit 1x 500 µl und 2x 300 µl Ethylacetat (Sigma-Aldrich GmbH, München) aus dem Puffer extrahiert. Zur Vorbereitung der GC-MS Messungen wurde der Extrakt mit 40 µl Trimethylsilyldiazomethan (Sigma-Aldrich GmbH, München) und 100 µl Methanol versetzt. Nach einer 30 minütigen Inkubation bei RT wurde die Lösung mit 5 µl Eisessig versetzt und nach der vollständigen Entfärbung direkt für GC-MS Messungen verwendet.

2.7.6.3 Aufreinigung membrangebundener Proteine aus S. cerevisiae

Cytochrom P450 Proteine sind membranverankerte Enzyme. Zum Nachweis der Expression dieser Proteine in transgenen Hefen erfolgte die Isolation von Mikrosomen aus Hefezellen, um diese membrangebundenen Proteine für Western Blot Experimente anzureichern.

Für die Aufreinigung der mikrosomalen Proteine wurden Hefen in 250 ml selektivem Medium (SC) herangezogen. Es wurde mit 2 ml einer Hefe-Übernachtkultur angeimpft und für 50 h bei 30°C mit 200 rpm geschüttelt (Multitron 2, Infors AG, Bottmingen, Schweiz). Anschließend wurden die Zellen sukzessive in 50 ml Plastikgefäßen durch Zentrifugation (8000xg, 5 min, 20°C) pelletiert. Die Extraktion der Cytochrom P450 Proteine erfolgte wie bei POMPON et al. (1996) beschrieben. Der Überstand wurde entnommen und die Zellen in 10 ml TEK (10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 1 mM EDTA, 100 mM KCl) resuspendiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Suspension wurde für 5 min mit 4700xg bei 20°C zentrifugiert und der Überstand anschließend entfernt. Die Zellen wurden in 800 µl TES-B (10 mM Tris-HCI, pH 7,4, 1 mM EDTA, 0,6 M Sorbitol) resuspendiert und in ein 7 ml Plastikgefäß überführt. In das Gefäß wurden Glaskugeln (0,5 mm, Sigma-Aldrich GmbH, München) bis knapp unter den Flüssigkeitsstand gefüllt. Der Zellaufschluss erfolgte durch 10 min Schütteln bei 4°C mit einem MiniBeadBeater 8 (BioSpec Products Inc., Bartlesville, USA) bei maximaler Frequenz. Alle darauf folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Nach dem Zellaufschluss wurden weitere 3 ml TES-B zugegeben, das Gefäß geschüttelt und der Überstand abgenommen. Die Zellfragmente und löslichen Proteine wurden durch weitere 3 Waschschritte der Glasperlen mit jeweils 3 ml TES-B von den Glasperlen abgewaschen und in einem 30 ml Ultrazentrifugenröhrchen vereinigt. Intakte Zellen und Zellorganellen wurden bei 11000g für 10 min bei 4°C abzentrifugiert (RC-6 Plus, Sorvall Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA). Der Überstand wurde in neue Ultrazentrifugenröhrchen überführt. Zur Pelletierung der Mikrosomen wurde für 1 h bei 100000xg und 4°C zentrifugiert (Optima L-70 mit Rotor Ti 55.2, Beckman Coulter Inc., Fullerton, USA). Das Pellet wurde in 300 µl TEG (10 mM Tris-HCl pH 7,4, 1 mM EDTA, 20 % (v/v) Glycerol) mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Durch Pipettieren mit Pipettenspitzen verschiedener Größen wurde das Pellet zerkleinert und die Lösung homogenisiert.

2.7.6.4 Nachweis der Expression von CYP71AVS in Hefen durch Western Blot

Bei der PCR-Amplifikation von CYP71AVS wurde durch eine entsprechend gewählte Primersequenz das Stoppcodon entfernt. Durch die Klonierung des PCR-Fragmentes in das Plasmid pESC-Ura wurde bei der heterologen Expression am carboxyterminalen Ende ein FLAG-Tag von 11 Aminosäuren angefügt. Dieses Flag-Tag diente als Epitop für einen entsprechenden Antikörper, mit dem dieses Protein durch Western Blot detektierbar wurde. Für den Nachweis der Expression von CYP71AVS in transgenen Hefen wurden mikrosomale Proteine verwendet (s. 2.7.6.3). Durch SDS-PAGE wurden je Probe (CYP71AVS, Negativund Positivkontrolle) 10 µg Protein aufgetrennt. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurde das Gel 2x in 20 ml ddH₂O gewaschen und anschließend für 30 min in Towbin-Puffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 10 % MeOH) äquilibriert. Ein passendes Stück PVDF-Membran

(Bio-Rad GmbH, München) wurde in 100 % MeOH befeuchtet und anschließend ebenfalls für 30 min in Towbin-Puffer äquilibriert. Der Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran geschah nach dem Semidry-Verfahren (Trans-Blot SD Cell, Bio-Rad GmbH, München) bei 13 V für 40 min. Nach dem Transfer wurde die Membran einmal mit ddH₂O und zweimal für 5 min mit TBS-T (500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,1 % Tween20 (v/v)) gewaschen. Zur Blockierung unspezifischer Bindungen wurde die Membran in TBS-T mit 5 % Blocking reagent (w/v, GE Healthcare GmbH, München) für 1 h bei RT geschwenkt. Nach 2 Waschschritten mit TBS-T (je 10 min) unter Schütteln wurde die Membran in eine kleine Plastiktüte überführt und mit einer 1:10000 Verdünnung von primärem Anti-Flag-Antikörper (Sigma-Aldrich GmbH, München) in TBS-T mit 3 % (w/v) "Blocking reagent" für 1 h geschüttelt. Die Membran wurde 3 x für 10 min in TBS-T unter Schwenken gewaschen, bevor der sekundäre Antikörper (anti-Maus IgG, Meerrettich-Peroxidase gekoppelt, GE Healthcare GmbH, München) in einer Verdünnung von 1:10000 in TBS-T mit 3 % "blocking Reagent" (w/v) hybridisiert wurde. Es folgten 4 weitere Waschschritte mit TBS-T (je 10 min) bevor die Membran mit 1 ml ECL-Plus Western Blotting Detection Reagent (GE-Healthcare) nach Anleitung des Herstellers überschichtet wurde. Nach 5 min wurde die Lösung von der Membran entfernt und die Chemielumineszenz wie unter 2.7.3.8 angegeben detektiert.

2.7.6.5 Gaschromatographische Trennungen der Produkte mittels GC-MS und GC-FID

Die GC-MS Messungen der Produkte der Terpensynthasen nach Expression in transgenen Hefen, sowie der Produkte des Expressionskonstruktes aus HaGAS2, CYP71AVS und Cytochrom-P450-Reduktase wurden an der Universität Calgary, Department of Biological Sciences, Kanada, in der Arbeitsgruppe von Dae-Kyun Ro durchgeführt. Es handelte sich um ein System der Firma Agilent Technologies GmbH (Böblingen) und bestand aus einem Gaschromatographen (Modell 6890N) mit angekoppeltem Massenspektrometer (5975B). Die Injektion der Proben erfolgte mit einem Autoinjektor (7683B, Agilent). Quantifizierungen der gebildeten Produkte wurden mit einem baugleichen System durchgeführt. Anstelle des Massenspektrometers wurden die Proben durch FID gemessen. Als Trägergas wurde in beiden Fällen Helium mit einer konstanten Flussrate von 1,0 ml min⁻¹ benutzt. Die GC-MS-Messungen wurden mit folgenden Einstellungen vorgenommen: Injektortemperatur: 250°C, Injektionsvolumen: 1,0 µl (splitless). Die Ofentemperatur wurde für 1 min konstant bei 40°C gehalten, anschließend in einem linearen Gradienten mit 10°C/min auf 250°C erhöht. Weiter wurde die Temperatur mit 30°C/min auf 300°C erhöht. Das Massenspektrometer wurde mit Parametern betrieben: Quadrupol-Temperatur: folgenden 150°C, Quelle: 230°C, Ionisierungspotenzial: 70 eV. Scan-Bereich: 50-500 Atommasseneinheiten. Als Chromatographiesäule kam eine HP-5MS Säule (30 m x 250 µm (Innendurchmesser) x 0,25 µl Filmdicke, Agilent) zum Einsatz. Für Aufnahme und Auswertung der Ergebnisse wurde die Software MSD ChemStation D.03.00.611 (Agilent) verwendet. Diese GC-MS Anlage wurde als GC-Anlage A bezeichnet.

Die verwendete GC-MS Anlage am Institut für Chemie der Universität Hohenheim (Anlage B) unterschied sich von der oben aufgeführten GC-MS Anlage durch den verwendeten Detektor (MS5973, Agilent Technologies GmbH, Böblingen). Die eingesetzten Säulen und Messparameter waren identisch. Die Messungen wurden von Stefan Fox durchgeführt.

Als dritte Anlage (bezeichnet als Anlage C) am Institut für Lebensmittelchemie der Universität Hohenheim, wurde ein GC3400 Gaschromatograph (Varian GmbH, Darmstadt) verwendet. Dieser war gekoppelt an ein Saturn 4D Ion-Trap Massenspektrometer (Varian). Die Trennung der Verbindungen erfolgte auf einer DB5-Säule (50 m x 320 µm (Innendurchmesser) x 0,25 µl Filmdicke, Agilent). Die Messungen wurden mit folgenden Parametern vorgenommen: Injektortemperatur: 250°C, Injektionsvolumen: 1,0 µl splitless, Flussrate des Helium-Trägergases: 1,0 ml min⁻¹, Die Ofentemperatur wurde für 2 min auf 50°C gehalten, anschließend mit 10°C min⁻¹ auf 300°C erhöht und diese Temperatur für 3 min gehalten. Detektortemperatur: 250°C, Scan Modus: EI, full scan mode. Die Messungen wurden von Thomas Kapp durchgeführt.

2.7.7 Identifizierung der Produkte von HaGAS1, HaGAS2 und HaCS

Die Identifizierung des Produktes von *HaGAS1* und *HaGAS2* erfolgte durch die Biosynthese von Germacren A in transgenen Hefen mittels Expression der charakterisierten Germacren A-Synthase LsLTC2 aus *Lactuca sativa* (BENNETT et al. 2002). Es erfolgte ein Vergleich der Retentionszeit und des erhaltenen Massenspektrums.

Die Bestimmung von Produkten der Sesquiterpensynthase HaCS erfolgte, soweit möglich, durch einen Vergleich der durch GC-MS Messungen erhaltenen Massenspektren einzelner Signale mit in der NIST05 Mass Spectral Library (John Wiley & Sons Inc., Mississauga, Kanada) vorhandenen Referenzspektren. Die Datenbankangaben wurden, sofern Referenzverbindungen verfügbar waren, durch eine Analyse dieser Standardverbindungen unter Berücksichtigung der Massenspektren und Retentionszeiten überprüft. γ -Cadinen wurde durch die GC-Analyse eines Standards der Firma Sigma-Aldrich (München) bestimmt, zur Identifizierung von ß-Caryophyllen wurde ebenfalls eine authentische Referenzsubstanz (Fluka, Buchs, Schweiz) verwendet. Zum Nachweis von α -Copaen und α -Muurolen wurde ein Öl von *Aloysia sellowii* (erhalten von J. Degenhardt, Jena) verwendet, dessen Kohlenwasserstoffkomponenten identifiziert waren.

3 Ergebnisse

3.1 Flavonoidbiosynthese in den Trichomen der Sonnenblume

3.1.1 Isolierung und Identifizierung von 5-Deoxynevadensin in den Trichomen von *H. annuus*

Werden köpfchentragende Drüsenhaare des Sonnenblumenkultivars HA300 im Fluoreszenzmikroskop betrachtet, fällt eine sehr starke blaue Fluoreszenz vorwiegend innerhalb der sekretierten Substanzen in der Cuticularblase auf (Abb. 1.6). Diese starke Fluoreszenz konnte nicht auf Sesquiterpenlactone, den hauptsächlich von den glandulären Trichomen in die Cuticularblasen sekretierten Verbindungen, zurückgeführt werden. Aus den Drüsenhaaren der Antherenspitzen von 20 Blütenköpfen wurden die Inhaltsstoffe mit CH₂Cl₂ extrahiert und mittels Flash-Chromatographie und HPLC getrennt (s. 2.3.1). Die Isolation erbrachte circa 2,5 mg der fluoreszierenden Hauptkomponente und deren spektroskopische Identifikation 7-hydroxy-6,8,4'-Trimethoxyflavon Analyse führte zur von (5-Deoxynevadensin), einem neuen Naturstoffprodukt (Abb. 3.1). Diese Verbindung gehört mit dem unsubstituierten C₅ im A-Ring zur seltenen Gruppe der 5-deoxy-Flavone. Die Strukturaufklärung erfolgte nach Aufreinigung der Substanz aus einem Blütenextrakt durch ¹H-NMR Spektroskopie in Kombination mit ¹H-¹H COSY Experimenten und NOE Messungen. Die ¹³C chemischen Shifts wurden indirekt durch HSQC und HMBC ermittelt (Tab. 3.1). hochauflösende Experimente Die Masse wurde durch



Abb. 3.1 Struktur von 7-hydroxy-6,8,4'-Trimethoxyflavon.



Abb. 3.2 Absorptionsspektrum von 7hydroxy-6,8,4'-Trimethoxyflavon (fette Linie) und der Sesquiterpenlactonhauptkomponenten in den Trichomen von *H. annuus* HA300 (gemessen in 50 % MeOH). F: 15-hydroxy-3-dehydrodesoxyfruticin; N: 4,5-dihydro-Niveusin A (Enolform).

Massenspektroskopie (HR-EIMS) mit *m/z* 328,0941 bestimmt, und stimmt mit der für die Summenformel C₁₈H₁₆O₆ kalkulierten Masse von *m/z* 328,0947 überein. Die Absorptionsmaxima lagen bei: UV/VIS λ_{max} (MeOH) 215 nm, 233 nm (Schulter), 271 nm und 332 nm (Abb. 3.2).

Die Quantifizierung des Flavons aus 200 mechanisch gesammelten Drüsenhaaren (4 Wiederholungen) mittels HPLC ergab einen Gehalt von 1,3 ng 5-Deoxynevadensin für ein einzelnes Drüsenhaar (s. 2.3.3). Diese Menge entspricht ca. 1 % der gesamten in die Cuticularblase sekretierten Substanzen eines Trichoms nach Abschluss der Biosynthese in der postsekretorischen Phase. Neben 5-Deoxynevadensin als Hautkomponente konnten zwei weitere 5-Deoxyflavone durch ¹H-NMR in den sekretierten Substanzen nachgewiesen werden. Diese tragen zusätzliche Methylgruppen am B-Ring des Moleküls, sind in den Trichomen aber nur in sehr geringen Mengen vorhanden. Deshalb war eine vollständige Strukturaufklärung dieser Substanzen nicht möglich.

Ein Vergleich des Absorptionsspektrums von 5-Deoxynevadensin mit den Absorptionsspektren der Sesquiterpenlacton-Hauptkomponenten in den Drüsenhaaren zeigte besonders im kurzwelligen, energiereichen UV-Wellenlängenbereich von 200-230 nm deutliche Übereinstimmungen (Abb. 3.2). Da Sesquiterpene die aufgenommene Strahlungsenergie selbst nicht in Form von Autofluoreszenz abgeben, könnte das Auftreten der Flavonoide in den Cuticularblasen einen UV-Schutz für die Sesquiterpenlactone darstellen.

500 MHz).			
Position	¹ Η (δ, mult; <i>J</i> [Hz])	¹³ C	
2		162.8	
3	6.72, s	105.5	
4		177.9	
5	7.41, s	99.4	
6		145.8	
7		143.9*	
8		135.3	
9		117.1	
10		146.0*	
1'		124.3	
2'	7.91, d; 9.0	127.4	
3'	7.00, d; 9.0	114.0	
4'		162.3	
5'	7.00, d; 9.0	127.4	
6'	7.91, d; 9.0	114.0	
7-OH	6.18, brs		
6-OMe	4.01, s	56.4	
8-OMe	4.18, s	61.5	
4'-OMe	3.90, s	55.4	

Tab.	3.1	¹ H-	und	abgeleitete	¹³ C-NMR
Spekt	raldat	en vo	n 5-De	eoxynevadens	in (CDCI₃,
500 M	Hz).				

*Zuordnung austauschbar, s: Singlet, d: Doublet, brs: breites Singlet.

3.1.2 Entwicklungsabhängige Expression von Genen des Phenylpropanstoffwechsels und der Flavonoidbiosynthese in den glandulären Trichomen der Sonnenblume

Die Trichomisolierung bei Lamiaceen und Solanaceen geschah bisher vorwiegend durch das von Blattoberflächen mittels Glaskugeln Abschlagen der Trichome nach dem Schockgefrieren der Blätter in flüssigem Stickstoff (GERSHENZON et al. 1987; YERGER et al. 1992; ZHANG & OPPENHEIMER 2004). Dies führte bei den genannten Pflanzenfamilien zu einer relativ sauberen Trichompräparation, jedoch stößt diese Methode bei Asteraceen an ihre Grenzen. Im Gegensatz zu den Trichomen der Lamiaceen und Solanaceen befinden sich auf vollständig entwickelten Blättern der Asteraceen keine biosynthetisch aktiven Trichome. Die Biosynthese der in die Cuticularblase sekretierten Inhaltsstoffe geschieht in frühen Phasen der Blattentwicklung, die den Einsatz der Glaskugelmethode zur Trichompräparation nicht erlauben, da die Blätter hierfür noch keine ausreichende Stabilität besitzen. Darüber hinaus ist eine Präparation von Trichomen in genau definierten Entwicklungsstadien von Blättern der Asteraceen nicht möglich. Gänzlich unmöglich ist bei der Verwendung von Blättern die Isolation von Trichomen vor dem Beginn der Biosynthesephase der sekretierten Substanzen, die morphologisch durch das Fehlen der Cuticularblase gekennzeichnet ist.

Neben den Trichomen auf Blättern finden sich bei Asteraceen häufig Drüsenhaare in den Antherenanhängen der Röhrenblüten. Sie kommen dort wesentlich konzentrierter als auf Blättern vor und bieten den großen Vorteil, dass in verschiedenen Teilen des Blütenkorbes alle Trichomstadien auftreten und anhand des Fortschrittes der Blütenentwicklung identifiziert werden können. Durch die Präparation dieser Trichome aus den Antherenanhängen konnten erstmals alle Stadien von der prä- bis hin zur postsekretorischen Phase isoliert werden und standen für Untersuchungen des zeitlichen Verlaufes der sekundären Inhaltstoffbildung durch HPLC-Analysen zur Verfügung (GÖPFERT 2003). Für die Untersuchung der differenziellen Genaktivität im Laufe der Trichomentwicklung wurde dieses System nun ebenfalls verwendet, um die Bildung von Inhaltstoffen nicht durch HPLC, sondern anhand auftretender mRNA Transkripte von Schlüsselenzymen der Flavonoid- und später der Sesquiterpenbiosynthese nachzuweisen.

Das Flavon 5-Deoxynevadensin wurde durch HPLC-Experimente und Dünnschichtchromatographie-Analysen spezifisch in Extrakten aus Trichomen nachgewiesen. Die genauere Lokalisation, vorwiegend innerhalb der Cuticularblasen der Drüsenhaare, war durch Fluoreszenzmikroskopie darstellbar. Um zu untersuchen, ob die Biosynthese der Flavonoide auch direkt in den Trichomen stattfindet, wurden diese in verschiedenen Entwicklungsstadien aus den Antherenanhängen von Röhrenblüten der Sonnenblume präpariert und für RNA-Isolationen verwendet. Durch RT-PCR Experimente



Abb. 3.3 Differenzielle Genaktivität von Rubisco, PAL und der Chalkonsynthase in verschiedenen Entwicklungsstadien der Drüsenhaare aus den Antherenanhängen der Sonnenblume. (a) Schematische Darstellung eines Querschnittes durch einen Asteraceen-Blütenkorb mit geschlossenen Blüten in frühen Entwicklungsstadien in der Mitte des Blütenkorbes und zunehmend weiter entwickelten Blüten Richtung äußerem Rand. (b) Mikroskopische Aufnahmen von Trichomen in repräsentativen Entwicklungsstadien von der präsekretorischen bis zur postsekretorischen Phase, welche aus den Antherenanhängen unterschiedlich entwickelter Röhrenblüten entsprechend der Entwicklungslinie im Blütenkorb entnommen wurden. Obere Reihe: lichtmikroskopische Aufnahmen; untere Reihe: fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen derselben Trichome. (c) Semiguantitative RT-PCR Experimente zum Nachweis der differenziellen Aktivität von Enzymen während der Trichomentwicklung anhand der transkribierten Gene. Die mRNA von Ubiquitin als konstitutiv exprimiertes Protein wurde als Positivkontrolle und interner Standard für die RT-PCR Experimente eingesetzt. Rubisco: Nachweis von Transkripten für die große Untereinheit der Rubisco als Nachweis aktiver Photosyntheseprozesse innerhalb der Trichomstielzellen. PAL: Nachweis des Transkriptes für PAL als Schlüsselenzym des Phenylpropanstoffwechsels. CHS: Amplifikation der in den Trichomen transkribierten mRNA nach Umschreibung in cDNA für die Chalkonsynthase als Schlüsselenzym der Flavonoidbiosynthese.

für Phenolstoffwechsel Auftreten wurde den das von Transkripten der Phenylalaninammonium-Lyase (PAL) und der Chalkonsynthase (CHS) untersucht. Als konstitutiv exprimiertes Kontrollgen und interner Standard wurde Ubiguitin verwendet. Zusätzlich wurde vorhandene Photosyntheseaktivität innerhalb der Drüsenhaarzellen durch das Auftreten von Transkripten der Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (Rubisco) untersucht, da sowohl in den licht- als auch in den fluoreszenzmikroskopischen Bildern Chloroplasten in den unteren Stielzellen der Trichome sichtbar waren. Zum Nachweis der photosynthetischen Kapazität dieser Trichomzellen wurde das Auftreten des Transkripts für die große Untereinheit der Rubisco untersucht.

Für diese Experimente zur differenziellen Expression verschiedener Proteine im Laufe der Trichomentwicklung wurden ein präsekretorisches, 5 aufeinanderfolgende sekretorische und 2 postsekretorische Trichomstadien untersucht. Hierzu wurden für jedes Stadium die Trichome aus den Antherenanhängen von 50 Blüten isoliert und die daraus gewonnene RNA (s. 2.4.2) zur cDNA Synthese (s. 2.5.2) eingesetzt. Um einheitliche Ausgangsmengen an cDNA für die anschließende semiquantitative RT-PCR zu bestimmen, wurden PCR-Amplifikationen mit unterschiedlichen Verdünnungen der hergestellten cDNA vorgenommen (s. 2.5.6). Aus gleich starken Amplifikationsprodukten der mRNA für das konstitutiv exprimierte Ubiquitin wurde auf gleiche cDNA Ausgangsmengen geschlossen (Abb. 3.3).

Transkripte für Ubiquitin waren in allen untersuchten Trichomstadien nachweisbar, im Gegensatz dazu war für die große Untereinheit der Rubisco eine starke Transkriptionsrate nur bis zum Ende der sekretorischen Phase detektierbar. In der postsekretorischen Phase wurde die Abnahme der Genexpression durch schwächere Banden nach einer PCR-Amplifikation deutlich. Ähnlich verhielt sich die Transkription von PAL, dem Schlüsselenzym des Phenylpropanstoffwechsels, jedoch mit dem Unterschied, dass die Transkriptmenge für zu einem späteren Stadium abnahm. der dieses Protein erst In letzten Trichomentwicklungsphase war analog zur Rubisco nur noch sehr wenig Transkript für PAL nachweisbar. Die Chalkonsynthase, das Schlüsselenzym der Flavonidbiosynthese, zeigte ein gegenüber den anderen untersuchten Genen unterschiedliches Expressionsverhalten. In der präsekretorischen Phase konnte keine mRNA nachgewiesen werden, die ersten schwachen Produkte zeigten sich mit dem Eintritt der Trichome in das sekretorische Entwicklungsstadium. Bis auf das vierte sekretorische Stadium blieb die Transkriptmenge vergleichsweise gering. Jedoch zeigte sich in diesem vierten sekretorischen Stadium ein starker Anstieg der mRNA für CHS, die in den darauf folgenden Stadien wieder deutlich zurückging. Dieses Ergebnis der stark regulierten Expression der CHS zeigte sich bei wiederholten RT-PCR Reaktionen in konstanter Form. Auch eine Neukonstruktion der Primer zur Amplifikation dieses Gens zeigte keine Veränderung im Ergebnis. Die Resultate der semiguantitativen RT-PCR zeigten eine stark regulierte Genaktivität mit deutlichen Unterschieden zwischen verschiedenen Biosynthese- und Stoffwechselwegen innerhalb des Trichomlebenszykluses.

3.1.3 Identifizierung von Sesquiterpensynthasen

Sesquiterpenlactone stellen die typischen sekundären Inhaltsstoffe der Asteraceen dar. Schlüsselenzyme ihrer Biosynthese sind die Sesquiterpensynthasen, die aus dem linearen Vorläufermolekül Farnesylpyrophosphat (FPP) das erste zyklische Produkt formen.

Da bisher keine Nucleotid- oder Aminosäuresequenzen für Sesquiterpensynthasen der Sonnenblume bekannt waren, galt es zunächst diese zu identifizieren, um später eine funktionelle Charakterisierung durchführen zu können. Für diese Versuche wurden RNA aus den Trichomen von *H. annuus* cv. HA300 verwendet. Zur Identifizierung erster Sequenzabschnitte wurden degenerierte Primer eingesetzt, die zuvor schon erfolgreich für die Identifizierung von Germacren A-Synthasen in *Cichorium intybus* verwendet worden waren (DE KRAKER et al. 1998). Die PCR-Amplifikation von cDNA (s. 2.5.3.2), die aus Trichom-RNA (s. 2.4.2) synthetisiert wurde, zeigte zwei Banden im erwarteten Größenbereich von circa 550-650 bp (Abb. 3.4). Nach einer Sequenzierung der PCR-Fragmente zeigten die abgeleitete Aminosäuresequenzen beider DNA-Amplifikate eine hohe Sequenzähnlichkeit zu Sesquiterpensynthasen anderer Asteraceen wie *C. intybus* und *Lactuca sativa* (s. Abb. 3.8). Um die vollständigen kodierenden mRNA-Sequenzen beider Sesquiterpensynthasen zu identifizieren wurden 3'-und 5'-RACE Experimente durchgeführt (s. 2.5.3.3). Die mRNA Sequenz der ersten *H. annuus* Sesquiterpensynthase wies eine





Gesamtlänge von 1913 bp auf, mit einem offenen Leserahmen von 1680 bp Länge (entspricht 559 Aminosäuren). Dieses Gen wurde als *HaGAS1* (<u>*Helianthus annuus* <u>Germacren A-Synthase</u> 1)bezeichnet. Die mRNA-Sequenz der zweiten identifizierten Sesquiterpensynthase (*HaCS*, <u>*Helianthus annuus* <u>C</u>adinen <u>Synthase</u>) besaß eine Länge von 1944 bp mit einem offenen Leserahmen von 1668 bp (555 Aminosäuren). Beide mRNA-Sequenzen enthielten sowohl 3'- wie auch 5'-seitig untranslatierte Regionen sowie einen Poly(A)-Schwanz.</u></u>

3.1.4 Die genomischen DNA Sequenzen der Sesquiterpensynthasen und Identifizierung von HaGAS2

Zur systematischen Einordnung der Synthasen (BOHLMANN et al. 1998; TRAPP und CROTEAU 2001) wurden die genomischen DNA-Sequenzen (gDNA) der beiden identifizierten Sesquiterpensynthasen der Sonnenblume bestimmt. Hierzu wurde die Sequenz vom Startbis zum Stoppcodon analysiert. Der gDNA Bereich wurde mit verschiedenen spezifischen Primerpaaren abschnittsweise amplifiziert und nach Sequenzierung der einzelnen Fragmente anhand überlagernder Bereiche zusammengesetzt (s. 2.5.5). Für *HaCS* ergaben die PCR-Reaktionen jeweils eine einzelne Bande. Im insgesamt 2791 bp langen Gen *HaCS* konnten 6 Introns identifiziert werden (Abb. 3.6). Die Sequenzen der Exonbereiche stimmten mit der mRNA-Sequenz überein.

Die Amplifikation eines Sequenzabschnittes von HaGAS1 auf Ebene der gDNA zeigte nach gelelektrophoretischer Auftrennung der PCR-Produkte entgegen den Erwartungen zwei Banden unterschiedlicher Größe (Abb. 3.5). Die Sequenzanalyse beider Banden wies auf das Vorhandensein von zwei unterschiedlichen gDNA-Bereichen im Genom von *H. annuus*



Abb. 3.5 PCR-Amplifikation von cDNA und genomischer DNA mit spezifischen Primern für *HaGAS1*. Die Amplifikation von cDNA zeigte eine einzelne Bande (cDNA), während die Verwendung desselben Primerpaares bei gDNA zu 2 PCR-Fragmenten führte (gDNA). L: Markerbanden (in bp).

HA300 hin, deren Nukleotidsequenzen eine sehr hohe Identität in den Exonbereichen aufwiesen, aber deutliche Unterschiede in Sequenz und Größe der Introns zeigten. Die vollständige Sequenzierung beider genomischer Abschnitte führte zur Identifizierung einer weiteren Sesquiterpensynthase (*Helianthus annuus Germacren A-Synthase 2, HaGAS2*), die durch die Amplifikation von cDNA nicht aufgedeckt wurde (s. 3.2.1). Die mRNA- und Aminosäuresequenz dieser weiteren Synthase wurde durch einen Vergleich mit den Intronund Exonabschnitten der gDNA von *HaGAS1* ermittelt. Auf diese Weise konnte für *HaGAS2* ein offener Leserahmen von ebenfalls 1680 bp bestimmt werden, welcher für ein Protein von 64,4 kD (559 Aminosäuren) kodiert.

Die genomischen Sequenzen besaßen Längen von 2826 bp für *HaGAS1* und 3312 bp für die zusätzlich erhaltene Sequenz *HaGAS2*. Der Unterschied in der Sequenzlänge kam vor allem durch zusätzliche Sequenzabschnitte in den Introns 2 und 4 von *HaGAS2* zustande (Abb. 3.6).

Alle drei Sesquiterpensynthasen der Sonnenblume zeigten dieselbe Genstruktur aus sieben Exons und sechs intervenierenden Introns. Nach der Einteilung von TRAPP und CROTEAU (2001) sind sie somit zu den evolutiv spät entstandenen Terpensynthasen der Klasse III zu rechnen, beziehungsweise den Enzymen der *Tpsa*-Genfamilie zuzuordnen (BOHLMANN et al. 1998).



Abb. 3.6 Schematische Darstellung der Exon-Intron-Struktur von HaCS, HaGAS1 und HaGAS2 vom Start- (links) bis zum Stoppcodon (rechts) des jeweiligen Gens. Die grauen Kästen repräsentieren Exonbereiche, die Linien Introns. Die Sequenzlänge ist in Basenpaaren für jedes Intron und Exon angegeben. Die Größe der Kästen und Linien repräsentiert die Sequenzlänge des jeweiligen Elements. Die Gesamtlänge des genomischen Abschnittes ist links unter der Sequenzbeschriftung aufgeführt.

3.1.5 Vergleich der genomischen Sequenz von HaGAS1 und HaGAS2 mit den homologen Genen eines Wildtyps von *Helianthus annuus*

Für die Identifizierung der Sesquiterpensynthasen der Sonnenblume wurde das Kultivar HA300 insbesondere aufgrund der im Vergleich zu anderen Zuchtformen sehr hohen Zahl an Drüsenhaaren in den Antherenanhängen ausgewählt. Da in dieser Zuchtform zwei
Germacren A-Synthasen nachgewiesen wurden (*HaGAS1*, *HaGAS2*), sollte durch die Analyse der genomischen DNA des Wildtyps von *H. annuus* untersucht werden, ob es sich um ein züchterisches Ergebnis handelt oder ob beide Enzyme auch natürlicherweise im Genom von *H. annuus* codiert vorliegen.

Da keine keimungsfähigen Samen des Wildtyps von *H. annuus* zur Verfügung standen, um diese Untersuchungen auf cDNA Ebene durchzuführen, wurde genomische DNA aus Achänen von Herbarbelegen des Wildtyps von *H. annuus* isoliert, die 1988 in Arizona gesammelt worden waren (s. 2.1.2). Zum Vergleich mit HA300 wurden die ersten drei Exons und Introns herangezogen, die durch PCR amplifiziert wurden. Für die PCR-Reaktionen wurden Primerpaare eingesetzt, die an identische Sequenzabschnitte von *HaGAS1* und *HaGAS2* binden, um beide Gene in einer Reaktion zu amplifizieren (s. 2.5.5). Wie bei HA300 zeigte eine elektrophoretische Auftrennung der PCR 2 Banden unterschiedlicher Größe, diese wurden kloniert, sequenziert und konnten durch Sequenzvergleiche mit den bereits vorliegenden genomischen DNA Daten von HA300 den Genen *HaGAS1* und *HaGAS2* zugeordnet werden (Abb. 3.7). Zur Unterscheidung der Sequenzen wurden die genomischen Abschnitte des Wildtyps als *wHaGAS1* und *wHaGAS2* bezeichnet.



Abb. 3.7 Vergleich der ersten drei Introns und Exons von HaGAS1 und HaGAS2 zwischen *H. annuus* cv. HA300 und einem Wildtyp von *H. annuus* aus Arizona/USA. Als *wHaGAS* sind die DNA-Bereiche des Wildtyps bezeichnet. Die Kästen repräsentieren Exons (E1-E3), die Linien Introns (I1-I3). Die Zahlen in den Kästchen geben die Anzahl der im jeweiligen Exon kodierten Aminosäuren an, die Nummern oberhalb der Intronlinien zeigen die Zahl der Nukleotidbasenpaare für jedes Intron an. Die Prozentzahlen geben die Sequenzidentität zwischen dem DNA-Abschnitt von HA300 und dem Wildtyp wieder. Bei Introns wurde dafür die Nukleotidsequenz zugrunde gelegt, bei Exons die abgeleitete Aminosäurensequenz verwendet. Bei der Berechnung der Ähnlichkeit zwischen den sich jeweils entsprechenden Introns wurden zusätzlich vorkommende Nukleotide in einem Intron als Unterschiede gewertet.

¹ *HaGAS1* besitzt in Intron 3 einen Sequenzabschnitt von zusätzlich 20 bp Länge. Die Identität des restlichen Sequenzabschnitts zu *wHAGAS1* beträgt 97,6%. ² *HaGAS2* besitzt einen Einschub von 6 bp in Intron 2. Ohne dieses Insert beträgt die Identität 97,2 %. ³ *HaGAS2* trägt einen zusätzlichen Sequenzabschnitt von 55 bp Länge. Die Sequenzidentität der restlichen DNA Sequenzen zueinander beträgt 99,5 %.

Der Vergleich der Sequenzidentitäten der jeweils homologen Gene zwischen Wildtyp und Kultivar HA300 ergab für die untersuchten DNA-Abschnitte sowohl für die Exons, als auch die Introns sehr hohe Übereinstimmungswerte. Die Länge der einzelnen Exonsequenzen von Kultivar und Wildtyp waren für beide untersuchten DNA-Abschnitte identisch und wiesen bezüglich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen mit Identitätswerten von jeweils über 96 % eine sehr hohe Übereinstimmung auf. Die Intronsequenzen variierten etwas stärker. So war zum Beispiel in Intron 3 des genomischen Abschnitts von *HaGAS1* in der Sequenz von HA300 ein zusätzlicher 55 bp langer Bereich vorhanden, der sich im Wildtyp-Intron nicht wiederfand. Die restlichen Sequenzabschnitte dieses Introns waren nahezu identisch (99,5 %).

Es konnte somit gezeigt werden, dass die im Kultivar HA300 identifizierten Sesquiterpensynthasen HaGAS1 und HaGAS2 auch im Wildtyp vorkommen und nicht das Ergebnis eines züchterischen Eingriffs darstellen. Die sehr hohe Sequenzidentität zwischen Wildtyp und HA300 in den untersuchten Exonbereichen lässt zudem auf eine gleiche Funktionalität der codierten Proteine schließen.

3.1.6 Vergleich der Sequenzen von HaGAS1, HaGAS2 und HaCS mit anderen Sesquiterpensynthasen

Die Gene und die dadurch kodierten Proteine wurden nach den Umsetzungsprodukten der Enzyme bezeichnet: "HaGAS" <u>Helianthus annuus Germacren A-Synthase</u>, HaCS. <u>Helianthus</u> annuus Cadinen-Synthase. Da zwei Germacren A Synthasen identifiziert werden konnten, wurden diese als HaGAS1 und HaGAS2 unterschieden. Die entsprechenden Gene HaGAS1, HaGAS2 und HaCS codieren für Proteine mit für Terpensynthasen charakteristischen Merkmalen und Sequenzmotiven (Abb. 3.8). Die kalkulierten Molekulargewichte (HaGAS1: 64,4 kD; HaGAS2: 64,4 kD; HaCS: 64,2 kD) lagen im Bereich der Molekulargewichte anderer pflanzlicher Sesquiterpensynthasen (BACK & Chappell 1995; BOHLMANN et al. 1998; STARKS et al. 1997). Eine Analyse der von der mRNA-Sequenz abgeleiteten Proteinsequenzen mit Programmen zur Signalpeptid-Vorhersage (s. 2.5.19) erbrachte keine Hinweise auf das Vorhandensein möglicher Signalpeptide, somit handelt es sich bei den Enzymen mit hoher Wahrscheinlichkeit um nicht sekretierte Proteine, deren Lokalisierung im Zytoplasma zu erwarten ist. Das für Terpensynthasen charakteristische DDxxD-Motiv, eine hochkonservierte Bindestelle für Magnesiumionen, wurde in allen drei identifizierten Proteinen gefunden. Auch das 35 Aminosäuren stromaufwärts gelegene RxR-Motiv war in allen Synthasen vorhanden.

Die von den mRNA-Sequenzen abgeleiteten Aminosäuresequenzen zeigten eine Sequenzidentität von 95,2 % zwischen HaGAS1 und HaGAS2. Beide Germacren A-Synthasen wiesen eine Sequenzidentität von ca. 62,5 % auf Ebene der Aminosäuren

gegenüber HaCS auf. Die hohe Sequenzähnlichkeit zwischen HaGAS1 und HaGAS2 deutete auf eine ähnliche katalytische Funktion hin, während der Unterschied zu HaCS eine andere Funktion dieses Proteins nahelegte.

Gegenüber den charakterisierten Germacren A-Synthasen aus C. intybus und L. sativa



Abb. 3.8 Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz von HaGAS1, HaGAS2, HaCS und der Germacren A- Synthasen von *Lactuca sativa* (LsLTC2, Genbank accession number: AAM11627) und *Cichorium intybus* (CiGAS, Genbank accession number: AAM21659), sowie der 5-epi-Aristolochen-Synthase aus *Nicotiana tabacum* (TEAS, Genbank accession number: AAM11627). TEAS war die erste identifizierte Terpensynthase und ist die einzige Sesquiterpensynthase, von welcher eine Röntgenstrukturanalyse vorliegt. Schwarz hinterlegte Aminosäuren sind in allen Sequenzen identisch, dunkelgraue in fünf und hellgraue in vier. Die hochkonservierten DDxxD- und RxR-Motive sind gekennzeichnet.

zeigten HaGAS1 und HaGAS2 mit 87-88 % Sequenzidentität und Sequenzähnlichkeitswerten (Identität plus isofunktionelle Aminosäuren) von 93-94 % hohe Übereinstimmungen hinsichtlich des biochemischen Aufbaues der Proteine. HaCS zeigte mit 40 % Sequenzähnlichkeit gegenüber den einzigen bisher charakterisierten Cadinen-Synthasen von *Gossypium hirsutum* und *G. arboreum* (δ-Cadinen-Synthasen, Genbank accession numbers: X96429, Y18484) eine deutlich niedrigere Identität als gegenüber HaGAS1 und HaGAS2. Die höchsten Übereinstimmungswerte von HaCS zu in öffentlichen Datenbanken vorhandenen Einträgen zeigten sich ebenfalls zu den Aminosäuresequenzen der Germacren A-Synthasen von *L. sativa* und *C. intybus*.

3.2 Gewebespezifische Transkriptanalyse der Sesquiterpensynthasen

Das Auftreten von Transkripten der identifizierten Sesquiterpensynthasen in verschiedenen Geweben der Sonnenblume wurde mittels semiquantitativer RT-PCR bestimmt (s. 2.5.6). Als Positivkontrolle diente wiederum das konstitutiv exprimierte Ubiquitin (s. 3.1.2). Untersucht wurde cDNA aus Wurzeln, Stängeln, Kotyledonen, jungen und alten Blättern, Strahlenblüten und Trichomen des Sonnenblumenkultivars HA300.

Die Ergebnisse (Abb. 3.9) zeigten Transkripte des internen Standards Ubiquitin in allen untersuchten Gewebetypen. Über die einheitliche Amplifikationsstärke des Ubiquitin-Produktes wurden einheitliche cDNA Ausgangsmengen für alle PCR-Reaktionen definiert. Das Transkript für die Farnesylpyrophosphatsynthase (FPPS), als Enzym für die Bildung des linearen Ausgangsproduktes FPP der Sesquiterpenbiosynthese aus Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) und Isopentenylpyrophosphat (IPP) war in allen Geweben außer den Kotyledonen nachzuweisen. Die mRNAs für die im Biosyntheseweg nachgeschalteten Enzyme HaGAS1, HaGAS2 und HaCS fanden sich in Wurzeln, jungen Blättern sowie Trichomen. In Stängeln, Strahlenblüten und Kotyledonen waren keine Transkripte detektierbar. Aufgrund der hohen Sequenzidentiät zwischen HaGAS1 und HaGAS2 war eine Unterscheidung dieser beiden Gene durch selektive PCR-Amplifikation nicht möglich. Amplifikationsprodukte mit Primern für HaGAS zeigten somit sowohl die Expression von HaGAS1 wie auch von HaGAS2 an. Die stärkste Expression von HaGAS konnte in Trichomen nachgewiesen werden, weniger stark in jungen und alten Blättern und nur schwach in Wurzeln. Das Expressionsmuster von HaCS verhielt sich ähnlich, aber nicht identisch, wie HaGAS. Die mit Abstand stärkste Transkriptionsrate war auch hier in Trichomen nachzuweisen. In Wurzeln zeigten die PCR-Ergebnisse dagegen eine etwas geringere Expression dieses Gens, in alten Blättern konnte gegenüber HaGAS keine mRNA für HaCS nachgewiesen werden. Die im Vergleich zu den anderen Gewebetypen sehr starken Amplifikationsprodukte der Sesquiterpensynthasen HaGAS und HaCS für Trichom-RNA zeigten deutlich die primäre Lokalisation dieser Enzyme in den glandulären Drüsenhaaren. Die in den Blattproben sichtbaren Banden für HaGAS und HaCS waren wahrscheinlich auf die Aktivität dieser Gene in Trichomen auf den Blättern zurückzuführen.



Abb. 3.9 Transkriptanalyse der Sesquiterpensynthasen in verschiedenen Gewebetypen der Sonnenblume. Das konstitutiv exprimierte Gen für Ubiquitin diente als interner Standard. Die Amplifikate für *HaGAS* repräsentieren mRNA von *HaGAS1* und *HaGAS2*, da eine selektive Amplifikation durch die hohe Identität der DNA-Sequenzen nicht möglich war. Für alle Reaktionen wurden genspezifische Primer verwendet. FPPS: Amplifikation der cDNA für die Farnesylpyrophosphatsynthase.

Wu: Wurzel; St: Stängel; Ko: Kotyledone; jB: junge Blätter; aB: alte Blätter; Sb: Strahlenblüten; Tri: Trichome. L: Leiter in bp.

3.2.1 Nachweis der Transkripte von HaGAS1 und HaGAS2 in Trichomen und Wurzeln

Da die Transkripte von *HaGAS1* und *HaGAS2* aufgrund der hohen Sequenzidentität nicht durch selektive PCR-Amplifikation unterscheidbar waren, wurde zur Untersuchung der Expression beider Gene im Wurzelbereich und in den Trichomen ein Restriktionsexperiment durchgeführt (s. 2.5.7). *HaGAS1* kann - anders als *HaGAS2* - durch das Restriktionsenzym *Pau*I geschnitten werden, nicht aber durch *Dra*I, welches aber *HaGAS2* schneidet (Abb. 3.10). Zum Verdau wurde die gesamte codierende Sequenz beider Germacren A-Synthasen durch PCR aus cDNA von Trichomen und Wurzeln amplifiziert und anschließend selektiv verdaut. Der Restriktionsverdau von PCR-Produkten der Germacren A-Synthasen zeigte Restriktionsfragmente in den erwarteten Größen, sowohl beim Verdau mit *Pau*I, als auch bei der Verwendung von *Dra*I (Abb. 3.11). Die Bande von 274 bp nach Verdau von *HaGAS2* mit *Dra*I war aufgrund der geringen DNA-Menge nur sehr schwach als Bande im Bereich der 300

bp Leiterbande zu erkennen. Die Differenz im Laufverhalten gegenüber der erwarteten Größe war auf das Vorhandensein von Reaktionspuffer aus den Restriktionsverdaus zurückzuführen. Bei diesem Experiment wurde der Restriktionsverdau direkt mit Ladepuffer versetzt und aufgetragen. Die finale lonenzusammensetzung störte aber insbesondere das Migrationsverhalten von kleineren Banden in Agarosegelen.

Die Gelbilder (Abb. 3.11) zeigten sowohl für die PCR-Amplifikate aus Trichomen, als auch für die aus Wurzeln, das Vorhandensein beider Sesquiterpensynthasen und wiesen damit die Expression beider Gene nach. Für alle Versuche zur Expression dieser zwei Gene in Wurzeln und Trichomen konnte somit davon ausgegangen werden, dass dem Amplifikationsprodukt HaGAS die mRNA von HaGAS1 und HaGAS2 zugrunde lag.



Abb. 3.10 Lage der Restriktionsschnittstellen von Dral und Paul auf den codierenden Sequenzbereichen von HaGAS1 und HaGAS2.



nicht



3.2.2 Entwicklungsabhängige Expression der Sesquiterpensynthasen in den glandulären Drüsenhaaren der Sonnenblume

Neben der gewebespezifischen Expression der Sesquiterpensynthasen konnte hier zum ersten Mal die Genexpression in verschiedenen Stadien der Trichomentwicklung bei Asteraceen untersucht werden. Hierzu wurde das Entwicklungsstadium der Röhrenblüten durch Analyse der Pollenentwicklung und der Blütengröße bestimmt (GÖPFERT 2003). Die damit einhergehende Trichomentwicklung wurde von diesen morphologischen Parametern abgeleitet und mikroskopisch kontrolliert. Die Versuche wurden wie unter 3.1.2 beschrieben



Abb. 3.12 Differenzielle Genaktivität von Ubiquitin, der FPP-Synthase, HaGAS (1 und 2), sowie HaCS. (a) Schematische Darstellung eines Querschnittes durch den Blütenkorb der Sonnenblume mit geschlossenen Blüten im Zentrum des Blütenkorbes und zunehmend entwickelten Blüten Richtung äußerem Rand. (b) Mikroskopische Bilder von Trichomen verschiedener Entwicklungsstadien von der präsekretorischen bis zur postsekretorischen Phase, die aus den Antherenanhängen unterschiedlich entwickelter Röhrenblüten entlang der Entwicklungsreihe innerhalb des Blütenkorbes entnommen wurden (siehe a). Oben: lichtmikroskopische Aufnahmen; unten: fluoreszenzmikroskopische Bilder. (c) Ergebnisse semiquantitativer RT-PCR Experimente zum Nachweis der differenziellen Genaktivität verschiedener Enzyme anhand der vorhandenen Transkripte. Ubiquitin: als konstitutiv exprimiertes Gen und interner Standard. FPP-Synthase: Farnesyldiphosphat-Synthase. HaGAS: Germacren A-Synthasen 1 und 2. HaCS: Cadinen-Synthase. Linke Spur: Größenmarker in bp.

durchgeführt. Für die Untersuchung der Expression von Ubiquitin, der FPP-Synthase, der Sesquiterpensynthasen HaGAS1, HaGAS2 und HACS wurden wiederum ein präsekretorisches, 5 aufeinanderfolgende sekretorische und 2 postsekretorische Trichomstadien analysiert (Abb. 3.12).

Die Intensität der Amplifikate für Ubiquitin wurden als Maß für den Einsatz gleicher cDNA Ausgangsmengen in allen Proben verwendet. Ein Vergleich mit den amplifizierten Transkripten der Farnesylpyrophosphatsynthase zeigte das Vorhandensein von mRNA für dieses Enzym in allen untersuchten Stadien, wobei aber eine Abnahme nach dem Ende der sekretorischen Phase zu verzeichnen war. Deutlich stärker reguliert zeigten sich die amplifizierten Genprodukte für die Germacren A-Synthasen (HaGAS1, HaGAS2), deren Transkripte in hoher Konzentration nur während des sekretorischen Zeitraums nachgewiesen werden konnten. Für beide HaGAS war keine Genexpression im präsekretorischen oder postsekretorischen Zeitraum detektierbar.

Der Expressionszeitraum dieser beiden Germacren A-Synthasen stimmte mit dem durch HPLC detektierten Zeitraum der Zunahme des Gehaltes an Sesquiterpenlactonen in den Trichomen (GÖPFERT 2003) überein. Ähnlich verhielt sich die Transkription von *HaCS*. Die Expression dieser Sesquiterpensynthase begann jedoch schon vor der Ausbildung der Cuticularblase und war auch noch am Ende der sekretorischen Phase in den Trichomen nachweisbar. Wie für HaGAS war auch für HaCS die Transkriptionsrate während des sekretorisch aktiven Zeitraumes stark gesteigert.

Die semiquantitativen RT-PCR-Experimente zeigten eine stark regulierte Expression der Sesquiterpensynthasen in den glandulären Trichomen der Sonnenblume. Diese Ergebnisse deuten den hohen Spezialisierungsgrad dieses Zelltyps für die Synthese von Sesquiterpenen und Sesquiterpenlactonen an und zeigten deren stark regulierte Genaktivität zu bestimmten Abschnitten der Drüsenhaarentwicklung. Gegenüber den Terpensynthasen wurde die Synthese der Vorläufersubstanz FPP durch die FPP-Synthase unterschiedlich reguliert. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass FPP für die Biosynthese weiterer elementarer Moleküle in den Pflanzenzellen außerhalb der Sesquiterpenbiosynthese benötigt wird.

3.3 Funktionelle Analyse der identifizierten Terpensynthasen

Derzeit ist es noch nicht möglich, auf Grundlage der Aminosäuresequenz von Terpensynthasen Aussagen zur enzymatischen Aktivität zu machen. Zur funktionellen Charakterisierung wurden daher die Genprodukte von HaGAS und HaCS in einem heterologen System in *E. coli* exprimiert und anschließend funktionell *in vitro* durch Enzym-Substrat-Reaktionen charakterisiert. Später konnte die Funktion der Sesquiterpensynthasen *in vivo* in Hefen getestet werden.

3.3.1 Heterologe Expression von HaCS in *E. coli*

Auf Grundlage der identifizierten mRNA-Sequenz der Sesquiterpensynthase HaCS wurden Primer zur Amplifikation des codierenden Bereichs durch PCR konstruiert. Die Primer enthielten Adapterbereiche, um durch eine T4 DNA-Polymerasebehandlung einzelsträngige Enden mit 13 bp Überhängen zu erzeugen. Diese waren komplementär zu überhängenden Enden des Vektors pET-32 Ek/LIC, so dass durch ligationsunabhängige Klonierung (LIC) die codierende Sequenz von HaCS in den Expressionsvektor inseriert werden konnte (s. 2.7.3.1). Die heterologe Expression von HaCS in E. coli wurde unter zahlreichen Bedingungen und mit verschiedenen E. coli Stämmen getestet. Lösliches Protein in ausreichender Menge für eine funktionelle Charakterisierung der rekombinanten HaCS (rHaCS) wurde nur bei einer Expression bei 10°C in Rosetta 2-Zellen unter Verwendung des Plasmids pET-32 EK/LIC gebildet (pET32-HaCS). Alle anderen Expressionsversuche führten zur fast ausschließlichen Bildung von Einschlusskörperchen. Die Verwendung des Plasmids pET-32 EK/LIC führte zur Bildung eines Fusionsproteins mit einer ca. 18 kD langen aminoterminalen Thioredoxinsequenz. Dieses Protein ist dafür bekannt, die Löslichkeit von anderen Proteinen positiv zu beeinflussen und zur nativen Faltung von Proteinen beizutragen. Des weiteren befand sich zwischen Thioredoxin und Startcodon eine His-Tag Sequenz zur Aufreinigung des Proteins nach Expression durch Affinitätschromatographie.



Fusionsprotein Trx-Tag + Sesquiterpensynthase

Abb. 3.13 Schematische Darstellung des Expressionskonstruktes zur heterologen Expression der Sesquiterpensynthasen von *H. annuus* in *E. coli*.

Direkt vor der ersten Aminosäure von HaCS befand sich im rekombinanten Fusionsprotein eine Enterokinaseerkennungsstelle, die es erlaubte, das native Protein durch einen Proteaseverdau von den zusätzlichen N-terminalen Sequenzabschnitten abzutrennen (Abb. 3.13).

Zur Charakterisierung der funktionellen Aktivität von HaCS wurde die Sesquiterpensynthase in *E. coli* exprimiert und anschließend durch Affinitätschromatographie aus dem bakteriellen Rohextrakt gereinigt (Abb. 3.14).

Die Aufreinigung von rHaCS (rekombinantes HaCS-Protein, 2.7.3.3) gelang mit einer Reinheit von geschätzten 85%. Bei der Elution des Proteins von der Ni-NTA Agarose koeluierten wenige Proteine mit einer Größe zwischen 55 und 70 kD, sowie zwei kleinere mit Größen zwischen 15 und 27 kDa (Abb. 3.14). Dieses partiell aufgereinigte Protein wurde zum einen für Umsetzungsreaktionen mit dem natürlichen Substrat Farnesylpyrophosphat (FPP) verwendet (s. 2.7.3.4), zum anderen für die Herstellung von Antikörpern gegen rHaCS eingesetzt (s. 2.7.4).



Abb. 3.14 Aufreinigung von rHaCS durch Affinitätschromatographie. SDS-Polyacrylamid Gel zur Dokumentation der Reinigungsschritte. n.ind: Proteinextrakt der löslichen Proteine einer nicht induzierten Rosetta 2-Kultur mit dem Plasmid pET-32 HaCS; ind.: Proteinextrakt der induzierten *E. coli* Kultur mit dem Plasmid pET-32 HaCS; ung.: nicht an das Ni-NTA gebundener Anteil der Proteine/Durchlauf der Säule; W1 und W2: erster und zweiter Waschschritt der Chromatographiesäule mit 20 mM Imidazol; W3: dritter Waschschritt mit 100 mM Imidazol; E1, E2, E3: aufeinanderfolgende Elutionsschritte mit 250 mM Imidazol. M: Größenmarker (kD).

3.3.2 In vitro Enzym-Substrat Reaktion mit rHaCS

Für die *in vitro* Umsetzungsreaktion von FPP mit HaCS wurden pro Versuchsansatz 400 µg rekombinantes und aufgereinigtes Protein eingesetzt (s. 2.7.3.4). Die Umsetzung geschah in einem geeigneten Probenpuffer bei pH 7,0 und 30 °C mit Pentanüberschichtung unter Schütteln in 2,0 ml Reaktionsgefäßen. Die FPP-Konzentration betrug 50 µM. Nach dem Ausschütteln des Reaktionsansatzes mit dem zur Überschichtung verwendeten Pentan wurde dieses direkt für GC-MS Analysen verwendet (s. 2.7.6.5). Trotz mehrfacher Versuche war nur eine schwache Umsetzungsaktivität der rHaCS zu erreichen. Die Mengen an

gebildetem und gemessenem Produkt reichten für eine Identifikation der Produkte nicht aus. Die Messergebnisse eines *in vitro* Umsetzungsversuchs sind in Abbildung 3.15 dargestellt.



Abb. 3.15 GC-Analyse (Ionenspur m/z 204) eines *in vitro* Umsetzungsversuchs von rHaCS mit dem Substrat FPP. (Die Messungen erfolgten auf GC-MS Anlage C (s. 2.7.6.5)). Oben: extrahierte Ionenspur (m/z 204) der GC-MS Analyse. Nummerierung der gebildeten Produkte wie in Abb. 3.19. Der mit X markierte Bereich ist vermutlich auf Kontamination des Probenansatzes zurückzuführen. Unten: Negativkontrolle. Ansatz wie oberes Chromatogramm, jedoch ohne die Zugabe von rHaCS.

3.3.3 Funktionelle in vivo Charakterisierung von HaCS in S. cerevisiae

Im Laufe der Arbeit ergab sich die Möglichkeit zur funktionellen Charakterisierung der Terpensynthasen *in vivo* in einem Hefe-Expressionssystem. Da die *in vitro* Aktivität von rHaCS unbefriedigend ausgefallen war, sollte die Aktivität in einem *in vivo* System getestet und mit den *in vitro* Daten verglichen werden. Zur Expression von HaCS in Hefen wurde der codierende Bereich durch PCR amplifiziert (s. 2.5.10). Hierfür wurden Oligonukleotide konstruiert, mit denen an beiden Enden des DNA-Fragments Restriktionsschnittstellen eingeführt wurden. Die Klonierung in den Vektor pESC-Leu2d geschah durch "sticky end"-Klonierung als *Nhel/Xhol*-Fragment in die multiple cloning site 2 (MCS2) des Plasmids (Benennung pESCLeu2d::HaCS). Nach Vermehrung des Plasmides in *E. coli* wurde es für die Transformation des Hefestammes EPY300 verwendet (s. 2.6.7), der einen modifizierten erg9-Promotor besaß. Dieser Promotor ist natürlicherweise für die transkriptionelle Regulation des ERG9 Gens verantwortlich, das für die Squalen-Synthase von *S. cerevisiae* codiert, welche die Kondensation von zwei FPP-Molekülen katalysiert. Dieser Promotor war im verwendeten Hefestamm EPY300 zu einem durch Methionin reprimierbaren Promotor verändert worden (Ro et al. 2006). Die Zugabe von Methionin ins Kulturmedium hatte somit

die Repression des erg9-Promotors zur Folge. Dies führte zu einer Akkumulation von FPP in den Hefezellen, das somit als Substrat für Sesquiterpensynthasen zur Verfügung stand. Die Induktion der Expression von HaCS erfolgte durch die Zugabe von Galaktose ins Kulturmedium (s. 2.7.6). Da Hefen in den Zellen synthetisierte Sesquiterpene an das umgebende Medium abgeben, wurden die Kulturansätze mit Dodecan überschichtet, um die gebildeten Produkte abzufangen und anzureichern (s. 2.7.6.1). Zur Analyse der entstandenen Produkte wurde das Dodecan abgenommen, mit Ethylacetat verdünnt und direkt für GC-MS Messungen eingesetzt (Abb. 3.16).

Die in Abbildung 3.16 dargestellte gaschromatographische Analyse der Dodecan-Überschichtung einer mit dem Plasmid pESCLeu2d::HaCS transformierten Hefeflüssigkultur zeigte mehrere deutliche Peaks, von denen zwei Verbindungen (Peaks 6 und 7) mit ähnlicher Retentionszeit (13,96 min, 14,04 min) die Hauptkomponenten darstellten. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz desselben Hefestammes der mit dem einfachen pESC-Leu2d Plasmid transformiert war. Die Negativkontrolle zeigte kein vergleichbares Peakmuster (Abb. 3.16). Jedoch waren die Produkte von HaCS in der Dodecan-Überschichtung in zu geringer Konzentration vorhanden um aussagekräftige Massenspektren zu erhalten und somit die Verbindungen mittels Datenbankrecherche bestimmen oder näher eingrenzen zu können. Um die Menge an gebildetem Produkt zu erhöhen, wurde der Versuch unternommen, HaCS wie für die Expression in E. coli, auch in S. cerevisiae als Fusionsprotein mit N-terminalem Thioredoxin zu exprimieren. Ein PCR-



Abb. 3.16 GC-Chromatogramme von Produkten der Sesquiterpensynthase HaCS durch Expression in Hefen. Die Dodecan-Überschichtung der Hefe-Flüssigkulturen wurde nach 3tägiger Kulturdauer bei 30 °C mit Ethylacetat verdünnt und direkt analysiert. Für die Messungen wurde eine unpolare HP-5ms Säule verwendet, gemessen wurde der Totalionenstrom (TIC). NK: Negativkontrolle: mit dem Plasmid pESC-Leu2d ohne Insert transformierte EPY300-Kultur. HaCS: mit pESCLeu2d::HaCS transformierte EPY300-Kultur. HaCSThio: GC-MS Chromatogramm der Messung der Dodecanüberschichtung einer mit pESCLeu2d::HaCSThio transformierten EPY300-Kultur. I: Farnesol.

Fragment, das durch die Verwendung des pET32-HaCS Plasmids als Matrize erzeugt wurde und die codierende Sequenz für HaCS sowie das stromaufwärts gelegene Thioredoxin beinhaltete, wurde als *BamHI/NheI* Restriktionsfragment in den pESC-Leu2d Vektor kloniert (pESCLeu2d::HaCSThio). Mit diesem Plasmid wurden wiederum EPY300 Zellen transformiert und das Protein in den Hefen zur Expression gebracht.

Der Vergleich der GC-MS Messung von Hefen in denen nur die codierende Seguenz von HaCS exprimiert wurde und solchen die das Fusionsprotein aus Thioredoxin und HaCS bildeten, zeigte unter gleichen Expressionsbedingungen eine vielfach höhere Signalstärke der Peaks im GC-MS-Chromatogramm für das Fusionsprotein (Abb. 3.16). Ansonsten blieb das Peakmuster gualitativ vom zusätzlichen N-terminalen Proteinteil unbeeinflusst. Die auf diese Weise erreichten Produktmengen genügten für Massenspektren der einzelnen Verbindungen, die eine Interpretation der Spektren unter Verwendung der NIST05 Datenbank zuließ (s. 3.3.4). In der Negativkontrolle zeigte sich ein starker Peak mit einer Retentionszeit von 16,29 min, der bei der Expression von HaCS schwächer und bei der Expression des Fusionsproteins nicht auftrat. Datenbankrecherchen konnten die Verbindung als Farnesol identifizieren. Dies zeigte, dass in den Hefen angereichertes und nicht weiter verstoffwechseltes FPP durch endogene Prozesse, etwa durch Phosphohydrolasen, zu Farnesol umgewandelt wurde. Wurde hingegen ein weiteres Enzym exprimiert, welches das akkumulierte FPP als Substrat akzeptierte, so nahm auch die Farnesolkonzentration ab. Anhand des bei Expression von HaCS noch vorhandenen Farnesolpeaks spiegelte sich die gegenüber dem Fusionsprotein niedrigere Aktivität wieder. Die Ergebnisse zeigten, dass durch die Konstruktion des Fusionsproteins eine aktive Sesquiterpensynthase erzeugt wurde, die gegenüber dem nativen Protein eine vielfach höhere Aktivität in S. cerevisiae besaß. Aufgrund des fehlenden Farnesols in den gaschromatographischen Analysen kann davon ausgegangen werden, dass das gesamte in den Hefen gebildete FPP als Substrat umgesetzt wurde.

3.3.4 Identifizierung der Produkte von HaCS durch Expression in Hefen

Durch die hohe Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz von HaCS zu in der Literatur beschriebenen Germacren A-Synthasen wurde zu Versuchsbeginn diese katalytische Funktion auch für HaCS angenommen. Entgegen den Erwartungen handelt es sich aber um eine Multiproduktsynthase, wie sie bisher für Asteraceen nur einmal beschrieben wurde (MERCKE et al. 1999). Die Identifizierung der gebildeten Produkte erfolgte durch einen Vergleich der ermittelten Massenspektren mit den in der Datenbank NIST05 vorhandenen Referenzspektren. Anschließend wurde versucht, die Identität der einzelnen Verbindungen, durch die GC-MS Analyse von authentischen Referenzsubstanzen zu verifizieren (s. 2.7.7).

Sieben der acht in Abbildung 3.19 gekennzeichneten Peaks zeigten bei der Auswertung der Massenspektren Molekül-Ionenpeaks von 204 und sind demnach Sesquiterpenen zuzuordnen. Lediglich Peak zwei besaß einen Ionenpeak von 189.



Abb. 3.17. Identifizierung von Peak 7. (a) Überlagerte GC-Chromatogramme der Produkte aus pESC-Leu2d::HaCSThio transformierten Hefen (schwarze Linie), sowie von γ-Cadinen (graue Linie). **(b)** Vergleich der Massenspektren von γ-Cadinen (oben) und Peak 7 (unten). Die Massen der einzelnen Hauptfragmente sind über den jeweiligen Signalen angegeben.

Eine der beiden Hauptverbindungen (Peak 7 mit Retentionszeit 14,04 min) zeigte im Massenspektrum eine hohe Ähnlichkeit mit dem Spektrum von γ -Cadinen, einem bizyklischen Sesquiterpen. Zur eindeutigen Identifikation dieser Substanz wurde eine γ -Cadinen Referenzsubstanz unter gleichen Bedingungen analysiert. Die Retentionszeiten waren bei beiden Substanzen mit 14,04 min einheitlich, auch die Massenspektren erwiesen sich als identisch. Es handelt sich somit eindeutig um γ -Cadinen (Abb. 3.17).

Das Massenspektrum von Peak 2 in Abbildung 3.19 (Retentionszeit 12,77 min) zeigte eine hohe Übereinstimmung mit β-Caryophyllen, einem ebenfalls bizyklischen Sesquiterpenkohlenwasserstoff. Die Analyse einer authentischen Referenzsubstanz zeigte die gleiche Retentionszeit wie die durch heterologe Expression von HaCS in Hefen produzierte Verbindung (Abb. 3.18). Die Referenzsubstanz zeigte neben dem Molekülmassenpeak von 204 einen zusätzlichen Peak der Masse 221, der wahrscheinlich auf eine Kontamination des Standards zurückzuführen ist. Das Massensignal des Molekülpeaks sowie das Fragmentationssignal von 175 waren in der durch HaCS produzierten Verbindung wahrscheinlich durch eine zu geringe Menge des analysierten Produkts nicht nachweisbar. Aufgrund der identischen Retentionszeit und des sehr ähnlichen Massenspektrums wurde die Verbindung mit der Retentionszeit von 12,77 min als (-)-β-Caryophyllen identifiziert.

Durch die Analyse weiterer Referenzverbindungen konnten α -Copaen (Peak 1, Retentionszeit 12,16 min) und α -Muurolen (Peak 5, Retentionszeit 13,75 min) im Produktspektrum von HaCS ebenfalls eindeutig identifiziert werden. Die Hauptkomponente im GC-MS Spektrum (Abb. 3.19, Peak 6) konnte nur mit Referenzspektren der NIST05-Datenbank verglichen werden, da geeignete Standardverbindungen nicht verfügbar waren. Mit hoher Wahrscheinlichkeit handelt es sich hierbei um eine weitere Verbindung mit Cadinan-Grundgerüst, deren Substitutionsmuster aber nicht genauer bestimmt werden konnte. Auch die Struktur der schwächer auftretenden Nebenpeaks (Abb. 3.19; Peaks 3, 4,



Abb. 3.18 Vergleich der Massenspektren von Peak 2 (Retentionszeit 12,77 min) aus dem Expressionsversuch von HaCS in Hefen (links) und einem β -Caryophyllen Standard (rechts) mit derselben Retentionszeit.



Abb. 3.19 GC-Analyse und Identifizierung einiger Hauptkomponenten des Produktspektrums von HaCS nach Expression in Hefen. Die Produkte γ -Cadinen, β -Caryophyllen, α -Muurolen und α -Copaen konnten durch einen Vergleich mit authentischen Standards nachgewiesen werden. Der Hauptpeak (6) und die kleineren Nebenpeaks (3,4,8) konnten nicht genauer bestimmt werden, zeigten jedoch ebenfalls eine Gesamtmasse von 204 und sind Sesquiterpenen zuzuordnen.

8) konnte nicht genauer bestimmt werden, da keine Datenbankübereinstimmungen vorlagen und eingesetzte Referenzverbindungen keine identischen Retentionszeiten oder Massenspektren aufwiesen. Die Ergebnisse zeigten eindeutig, dass es sich bei HaCS um ein Multiprodukt-Enzym handelt, das die Bildung von Sesquiterpenkohlenwasserstoffen katalysiert.

3.3.5 Antikörper gegen HaCS

Das mikroskopische Bild der glandulären Trichome der Sonnenblume zeigte morphologisch deutlich differenzierte Stielzelltypen (GÖPFERT 2003). Während die oberen beiden Zellpaare keine Chloroplasten besitzen, sind diese vielzählig in den weiteren Stielzellen vorhanden. Diese Zweiteilung könnte auf unterschiedliche biosynthetische Aufgaben ausgerichtet sein. Trichome anderer Asteraceen-Arten wie zum Beispiel *Artemisia annua* zeigen insgesamt weniger Stielzellen (FERREIRA & JANICK 1995), aber den gleichen Aufbau bezüglich der Differenzierung in morphologisch unterschiedliche Zellen. Da weder über die zelluläre Lokalisation der Sesquiterpensynthasen innerhalb der Trichome, noch über die subzelluläre Lokalisation bisher Erkenntnisse vorliegen, wurden für zukünftige, weiterführende Untersuchungen polyklonale Antikörper gegen rHaCS hergestellt.

Als Antigen für die Herstellung der Antikörper wurde das zu diesem Zeitpunkt noch nicht funktionell charakterisierte rHaCS eingesetzt. Um eine möglichst hohe Spezifität zu erreichen, wurde der N-terminale Bereich mit der His-Tag-Sequenz und dem Thioredoxin durch einen Verdau mit Enterokinase (s. 2.7.3.5) entfernt (Abb. 3.20). Nach der spezifischen Bindung der Enterokinase an Agarose konnte diese durch Zentrifugation abgetrennt und das native Protein weiter aufgereinigt werden. Nach Aufkonzentrierung und Umpufferung durch Ultrazentrifugation wurde rHaCS von einem kommerziellen Anbieter (Biogenes GmbH, Berlin) als Antigen für die Produktion rekombinanter Antikörper in Kaninchen verwendet. Das auf diese Weise produzierte Antiserum mit den polyklonalen Antikörpern wurde durch Western Blot-Experimente (s. 2.7.5) auf Spezifität und Kreuzreaktionen getestet (Abb. 3.20).

Zum Test auf Spezifität wurden als Positivkontrollen rekombinante Fusionsproteine von HaGAS1 und HaCS eingesetzt. Detektiert werden sollten die natürlicher Weise vorkommenden Sesquiterpensynthasen in einem Proteinextrakt aus Röhrenblüten, deren Antherenanhänge Trichome in biosynthetisch aktiven Stadien trugen. Als Negativkontrolle diente ein Proteinextrakt aus Keimblättern, bei denen zuvor durch RT-PCR Experimente gezeigt werden konnte, dass keine Transkripte der Sesquiterpensynthasen vorhanden waren (Abb. 3.9). Aus diesem Ergebnis wurde auf die Abwesenheit der Proteine geschlossen.

Beim Western Blot zeigte der polyklonale Antikörper eine starke Reaktion bei der Bindung an durch Affinitätschromatographie aufgereinigtes rHaGAS1 und rHaCS, das durch heterologe Expression in *E. coli* erzeugt worden war. Eine spezifische Unterscheidung zwischen HaGAS1 und HaCS war nicht erkennbar. Neben der starken Hauptbande mit ungefähr 75 kD

Molekulargewicht, die dem Fusionsprotein zuzuordnen ist, zeigten sich zahlreiche weitere unspezifische Bindungen an bakterielle Proteine über den gesamten Größenbereich von 15-70 kDa, die durch die Affinitätschromatografie nicht vollständig entfernt worden waren, aber in dieser Intensität in Coomassie gefärbten Gelen nicht zu sehen waren. Im Gegensatz dazu zeigte der polyklonale Antikörper bei der Trennung von Blütenprotein nur eine einzige starke Reaktion mit einem Protein der Größe von circa 59 kD, dies entspricht 5 kD weniger als das berechnete Molekulargewicht der H. annuus Terpensynthasen. Eine weitere, wenn auch sehr schwache Reaktion, gab es mit einem Protein von ungefähr 40 kD Größe (Pfeil in Abb. 3.20b). Zum Größenvergleich wurde rekombinantes Fusionsprotein mit Enterokinase verdaut und durch SDS-PAGE analysiert. Während das unverdaute Fusionsprotein eine Größe von circa 75 kD im Gel aufwies, verhielt sich rHaCS wie ein Protein von circa 59 kD und zeigte auf einer SDS-PAGE dieselbe Größe wie das durch Western Blot in der Blütenproteinfraktion detektierte Protein (Abb. 3.20). Die Proteinprobe aus Keimblättern der Sonnenblume zeigte keine detektierbare Bindung von Anti-rHaCS-Antikörpern. Bei dem in den Blütenproteinen durch Immunodetektion nachgewiesenem Protein handelte es sich somit mit höchster Wahrscheinlichkeit um die Sesquiterpensynthasen HaCS und HaGAS der Sonnenblume aus den glandulären Trichomen. Der Antikörper zeigt somit für Pflanzenproteinextrakte eine große Spezifität und steht nun für weitere Experimente zur Verfügung.



Abb. 3.20. (a) SDS-PAGE von HaCS-Fusionsprotein vor und nach einem Verdau mit Enterokinase. Vergleich des Laufverhaltens von rekombinantem Fusionsprotein aus HaCS, His-Tag und Thioredoxin (rFP) und dem Protein rHaCS nach 30 min Enterokinaseverdau. Der abgespaltene N-terminale Bereich mit circa 19 kD ist in der rechten Spur mit einem Pfeil gekennzeichnet. (b) **Western Blot-Analyse der Spezifität der Anti-rHACS-Antikörper**. Zur Fixierung auf Nitrocellulosemembran wurden Proteingemische durch SDS-PAGE aufgetrennt. rHaGAS1: rekombinantes HaGAS1-Fusionsprotein; rFP: rekombinantes HaCS-Fusionsprotein; leer: freie Spur ohne Proteinauftrag. Blüte: Proteinextrakt aus Röhrenblüten (10 μg Gesamtprotein); Kotyl: Proteinextrakt (10 μg) aus Kotyledonen als Negativkontrolle. Als primärer Antikörper wurde AntirHaCS-Serum in einer Verdünnung von 1:5000 eingesetzt. Pfeil in Spur "Blüte": leichte Bande mit einer Größe von ca. 40 kDa.

3.3.6 Funktionelle Analyse rekombinanter Germacren A-Synthasen

Auch wenn die Aminosäuresequenz von HaCS bei Datenbankrecherchen die höchsten Sequenzübereinstimmungen zu Germacren A-Synthasen aufwies, so konnte diese zunächst angenommene Funktion für HaCS nicht bestätigt werden. Der erste Schritt der Biosynthese von Sesquiterpenlactonen nach der Bildung der Prenyldiphosphate besteht in der Zyklisierung von Farnesylpyrophosphat durch Germacren A-Synthasen. Um diese Schlüsselenzyme in glandulären Trichomen zu identifizieren, wurden die beiden weiteren identifizierten Sesquiterpensynthasen ebenfalls heterolog exprimiert und funktionell charakterisiert.

3.3.7 Heterologe Expression von HaGAS1 und HaGAS2 in *E. coli*

Die codierenden Bereiche von *HaGAS1* und *HaGAS2* wurden analog zur Expression von HaCS durch PCR amplifiziert und durch Ligase-unabhängige Klonierung in den Vektor pET-32 Ek/LIC inseriert (s. 2.7.3.1). Es wurden ebenfalls Fusionsproteine erzeugt, die N-terminal eine 6xHis-Tag Sequenz sowie ein Thioredoxinprotein besaßen (Abb.3.13). Zur Expression wurde der *E. coli* Stamm Rosetta-gami B mit den erzeugten Plasmiden (pET32-HaGAS1, pET32-HaGAS2) transformiert. Die Expression der Proteine erfolgte im Gegensatz zur heterologen Expression von HaCS für 4 Stunden bei 30°C. Die Aufreinigung der Proteine aus den bakteriellen Rohextrakten erfolgte durch Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Agarose (Abb. 3.21). Bei der Aufreinigung von HaGAS1 und HaGAS2 wurden weniger stringente Waschschritte angewendet, da anders als HaCS, die beiden Proteine schon bei einer Imidazolkonzentration von 50 mM von der Säule eluierten. Die Aufreinigung gelang für beide Proteine mit einer Reinheit von geschätzten 80-85 %. Vorwiegend kleinere Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 10 und 30 kDa koeluierten bei der Lösung der Proteine von der Ni-NTA-Säule.



Abb. 3.21 Aufreinigung von rHaGAS1 und rHaGAS2 durch Affinitätschromatographie. Die SDS-Gele (10 %) dokumentieren die Aufreinigung der rekombinanten Enzyme aus den Bakterienprotein-Rohextrakten. n.ind: Proteinextrakt der löslichen Proteine einer nicht induzierten *E. coli* Kultur mit dem Plasmid pET32-HaGAS1 oder pET32-HaGAS2; ind.: Proteinextrakt der mit IPTG induzierten *E. coli* Kulturen; ung.: nicht an das Ni-NTA gebundener Anteil der Proteine/Durchlauf der Säule; W1 und W2: erster und zweiter Waschschritt der Chromatographiesäule mit 20 mM Imidazol; E1-E4: aufeinanderfolgende Elutionsschritte mit 250 mM Imidazol. L: Größenmarker (kDa).

3.3.8 Enzym-Substrat Reaktionen zur funktionellen *in vitro* Charakterisierung von HaGAS1 und HaGAS2

Die heterolog exprimierten Enzyme HaGAS1 und HaGAS2 wurden zur funktionellen Charakterisierung in vitro mit dem potenziel natürlichen Substrat FPP inkubiert. Aus den Enzym-Substrat-Reaktionen wurden die gebildeten Produkte durch Pentan extrahiert und mittels GC-MS analysiert. Für die Umsetzung von FPP wurden pro Ansatz 200 µg aufgereinigtes Protein eingesetzt, die FPP-Konzentration betrug 50 µM (s. 2.7.3.4). Als Negativkontrolle wurde Protein des zur Expression verwendeten Bakterienstammes Rosettagami B (untransformiert) unter gleichen Bedingungen ebenfalls mit FPP inkubiert. In den gaschromatographischen Analysen der Umsetzungsreaktionen von FPP mit Enzym (Abb. 3.22) wurden gegenüber der Negativkontrolle 2 zusätzliche Peaks (1;2) detektiert. Durch eine Auswertung der Massenspektren konnte der Hauptpeak (2, RT = 14,41 min) als das Injektortemperatur beim Einspritzvorgang am Gaschromatographen nach Cope-Umlagerung aus Germacren A, wie bei Injektionen des reinen Standards gezeigt werden konnte (Abb. 3.22). Es handelt sich hierbei um eine vielfach beschriebene wärmeinduzierte Reaktion des Germacren A (DE KRAKER et al. 2001b; PROSSER et al. 2002; BERTEA et al. 2006). Germacren A selbst war bei der Verwendung der Analyse der hier benutzten GC-Anlage



Abb. 3.22 Ausschnitte der GC-Chromatogramme der Enzym-Substrat-Reaktionen von HaGAS1 und HaGAS2 mit FPP *in vitro*. Dargestellt ist der Ausschnitt des Chromatogramms der Unterschiede zwischen Negativkontrolle und Enzymreaktionen zeigte. Als Negativkontrolle wurde ein Proteinextrakt aus einer untransformierten Bakterienkultur (Rosetta-gami B) verwendet und zusammen mit FPP unter gleichen Bedingungen wie die aufgereinigten Proteine inkubiert. Der Germacren A Standard wurde durch die Expression einer Germacren A Synthase aus *L. sativa* in Hefen hergestellt (s. 3.3.7). Peak 1 und Peak 2 zeigten ähnliche Massenspektren, die Identität von Peak 1 konnte nicht geklärt werden. Durch Datenbankvergleiche des Massenspektrums von Peak 2 konnte dieser als β -Elemen identifiziert werden, ein Umlagerungsprodukt von Germacren A. Die Peakhöhe der Analyse des Germacren A-Standards wurde zur besseren Darstellung in der Höhe reduziert und entspricht in der Signalstärke nicht den an der Y-Achse angegeben Werten.

(Anlage B, s. 2.7.6.5) nicht nachzuweisen, jedoch konnte aus dem Auftreten von β -Elemen auf Germacren A als Ausgangsprodukt geschlossen werden. Abbildung 3.22 zeigt die Existenz eines weiteren Peaks mit etwas kürzerer Retentionszeit (1, 14,31 min). Die Massenspektren beider Peaks zeigten eine hohe Ähnlichkeit zueinander was auf ähnliche chemische Strukturen schließen lies. Dennoch konnte Peak 1 noch nicht identifiziert werden. Außerhalb des in Abbildung 3.22 dargestellten Bereiches zeigten sich keine Peaks mit sesquiterpentypischen Massen oder Massenspektren. Als Standard konnte auf der gleichen GC-MS-Anlage später eine Germacren A-Referenzprobe getestet werden, die wie unter 3.3.6 beschrieben durch Expression einer Germacren A-Synthase in transgenen Hefen produziert worden war. Auch bei der Analyse dieses Standards traten Peak 1 und 2 auf, es kam ebenfalls zur vollständigen Umlagerung von Germacren A zu β -Elemen. Die Ergebnisse zeigen eindeutig, dass es sich bei den in den Drüsenhaaren identifizierten Sesquiterpensynthasen HaGAS1 und HaGAS2 um Germacren A-Synthasen handelt. Diese beiden Proteine stellen somit die Schlüsselenzyme der Sesquiterpenlactonbiosynthese in den Drüsenhaaren der Sonnenblume dar.

3.3.9 Heterologe Expression von HaGAS1 und HaGAS2 in *S. cerevisiae*

Die *in vitro* Umsetzungsexperimente von HaGAS1 und 2 mit dem natürlichen Substrat FPP haben gezeigt, dass es sich um Germacren A-Synthasen handelt. Als Biokatalysatoren für die von Germacren A ausgehenden weiteren Schritte der Biosynthese von Sesquiterpenlactonen werden Cytochrom P450 Enzyme angenommen. Cytochrome P450 Oxidasen (CYP) benötigen für die Katalyse der Reaktionen das Coenzym NADPH+H⁺, ein aktives Häm-Schwefel Zentrum und als membranverankerten Elektronenlieferanten eine Cytochrom P450 Reduktase (CPR). Da die Expression eines solchen Systems mit funktionsfähigen CYPs in *E. coli* sehr schwierig ist (CHANG et al. 2007), sollte zur Charakterisierung nachfolgender Schritte in der Biosynthese von Sesquiterpenlactonen die Expression von Kandidatengenen *in vivo* in *S. cerevisiae* durchgeführt werden. Um entsprechende Gene auf ihre Produkte testen zu können, musste zuerst das Substrat Germacren A in den Zellen zur Verfügung gestellt werden. Zu diesem Zweck wurden die beiden Gene *HaGAS1* und *HaGAS2* in Hefen exprimiert und dort auf Funktionalität und ihr Produktspektrum getestet und dann mit den durch *in vitro* Umsetzungsreaktionen erhaltenen Daten verglichen. Analog zur Expression von HaCS in Hefen wurden die codierenden Bereiche von HaGAS1 und HaGAS2 durch PCR amplifiziert und in den Expressionsvektor pESC-Leu2d kloniert. HaGAS1 wurde hierzu durch "sticky-end" Klonierung als Notl/Bgl/I Fragment in die multiple cloning site 1 des Plasmids kloniert, während HaGAS2 als Xhol/Nhel Fragment in die multiple cloning site 2 (MCS2) des gleichen Vektors inseriert wurde (Benennung der erzeugten Plasmide: pESCLeu2d::HaGAS1, bzw. pESCLeu2d::HaGAS2). Die Plasmide wurden in E. coli vermehrt und anschließend zur Transformation von Hefen des Stammes EPY300 eingesetzt (s. 2.6.9). Die Expression der Proteine erfolgte durch Zugabe von Galaktose ins Kulturmedium, um die Transkription der unter der Kontrolle eines Galaktoseinduzierbaren Promotors stehenden HaGAS1 oder HaGAS2 zu induzieren (s. 2.6.8). Wie bei der Expression von HaCS (s. 3.3.3) wurde die Dodecanüberschichtung des Flüssigkulturmediums mit Ethylacetat verdünnt und direkt zur GC-MS Messung verwendet. Da kein authentischer Standard von Germacren A verfügbar war, wurde eine bereits charakterisierte Germacren A-Synthase aus L. sativa (BENNETT et al. 2002) mittels PCR amplifiziert und als BamHI/Nhel-Fragment in die MCS2 des gleichen Plasmids eingebaut (pESCLeu2d::LsLTC2). Die Expression von LsLTC2 sollte zur Herstellung von Germacren A als Referenzsubstanz für die Identifizierung der Produkte von HaGAS1 und HaGAS2 dienen. Die Ergebnisse der gaschromatographischen Analyse der in vivo Reaktionsprodukte aller drei Germacren A-Synthasen sind in Abbildung 3.23 dargestellt. Die GC-MS Chromatogramme der Produkte von HaGAS1, HaGAS2 und LsLTC2 wiesen ein übereinstimmendes Peakmuster auf. In der Negativkontrolle war kein Reaktionsprodukt nachweisbar. Der Vergleich der Massenspektren der Peaks bei einer Retentionszeit von 13,87 min zeigte identische Fragmentationsmuster. Der vorhandene Molekül-Ionenpeak stimmte mit dem erwarteten Molekulargewicht von 204 für Germacren A überein. Neben dem Hauptpeak trat in allen Analysen ein kleinerer Nebenpeak mit einer Retentionszeit von 12,37 min auf. Dieser Peak konnte durch einen Vergleich seines Massenspektrums mit der Massenspektrenbibliothek NIST05 als β-Elemen, dem Cope-Umlagerungsprodukt von Germacren A identifiziert werden. Entgegen den Literaturangaben und den Erfahrungen bei gaschromatographischen Analysen auf GC-Anlage B kam es bei der Analyse auf Anlage A trotz identischer Laufparameter nicht zu einer vollständigen Umlagerung von Germacren A zu β-Elemen. Die vor dem Germacren A ansteigende Basislinie im GC-MS Chromatogramm ist vermutlich auf weitere hitzeinduzierte Umlagerungsprodukte (DE KRAKER et al. 1998,



Abb. 3.23 GC-MS Analyse von in transgenen Hefen produziertem Germacren A. (a), Ausschnitt aus den GC-MS Analysen des Dodecan Überstandes von *S. cerevisiae*, die entweder die Germacren A-Synthase 1 oder 2 aus *H. annuus* (HaGAS1, HaGAS2) oder eine Germacren A-Synthase aus *L. sativa* (LsLTC2) exprimieren. Als Kontrolle diente eine mit dem Plasmid pESC-Leu2d ohne Insert transformierte *S. cerevisiae*-Kultur (Kontrolle). (b) Massenspektren von Peak 1 (RT=12,37 min) und Peak 2 (RT=13,87 min). Die Spektren auf der linken Seite sind die Massenspektren von Peak 1 der Probe HaGAS2 (oben) und von β -Elemen aus der NIST05 Datenbank (unten). Die Massenspektren auf der rechten Seite stammen von Germacren A (Peak 2, RT=13,87 min). Oben das Massenspektrum der Probe LsLTC2, unten von HaGAS2.

2001b) zurückzuführen. Da sowohl durch die Expression der charakterisierten Germacren A-Synthase LsLTC2, wie auch durch die Expression von HaGAS1 und 2, die gleichen Verbindungen in den Hefen synthetisiert wurden, kann die *in vitro* gezeigte Funktion von HaGAS1 und 2 durch diese *in vivo* Experimente bestätigt werden. Darüber hinaus zeigten diese Versuche aber vor allem, dass die heterologe Expression von HaGAS1 und 2 in Hefen zur Produktion von Germacren A genutzt werden kann und damit die Grundlage bildet, um Germacren A als Substrat für nachfolgende Enzymreaktionen bereitzustellen.

3.4 Identifizierung einer Germacren A-Monooxygenase

Im Biosyntheseweg der Sesquiterpenlactone der Sonnenblume konnten Germacren A-Synthasen als Schlüsselenzyme erfolgreich in den Drüsenhaaren nachgewiesen werden. Der auf die Germacren A-Bildung folgende Biosyntheseschritt besteht in der Bildung von Germacren A-Carboxylsäure. Von DE KRAKER et al. (2001a) wurde in einem Proteinextrakt aus *C. intybus* Wurzeln die Aktivität einer Cytochrom P450 (+)-Germacren A-Hydroxylase und mindestens einer NADP⁺-abhängigen Sesquiterpen-Dehydrogenase nachgewiesen, deren aufeinanderfolgende Aktivität zur Bildung von Germacren A-Carboxylsäure führt. Die einzelnen Intermediate konnten ebenfalls isoliert und charakterisiert werden (DE KRAKER et al. 2001a). Enzyme, welche die Biosynthese von Germacren A zu Germacren A-Carboxylsäure katalysieren, waren bisher nicht weitergehend identifiziert worden. Aus *Artemisia annua* wurde ein Enzym bekannt (Ro et al. 2006), welches in der Lage ist aus Amorpha-4,11-dien über eine dreistufige Oxidation den Artemisinin Vorläufer Artemisinin-Säure zu produzieren. Es handelt sich hierbei um eine Cytochrom P450 Monooxygenase (CYP71AV1).

Aus Antherenspitzen von 3500 Röhrenblüten des Sonnenblumenkultivars HA300 wurden die Trichome mechanisch isoliert (s. 2.4.2) und daraus die gesamt-RNA isoliert. Diese wurde von K. Newman am Berkeley Center for Synthetic Biology an der University of California (Berkeley, USA) zur Konstruktion einer Trichom EST-Datenbank verwendet. Die Suche in dieser Datenbank nach ähnlichen Nukleinsäuresequenzen zeigte 11 Kopien eines Transkriptes für ein Cytochrom P450 Protein, das eine Sequenzidentität von 88 % bei einer Ähnlichkeit von 95 % zu CYP71AV1 aufwies. Mit 11 Kopien bei einer Gesamtzahl von 795 Sequenzen innerhalb der Trichom EST-Bank zeigte dieses Gen eine sehr hohe Transkriptionsrate (1,4 % der Gesamttranskripte).

3.4.1 Biosynthese von Germacren A-Carboxylsäure in transgenen Hefen

Der 3'-Bereich dieses in der Trichom EST-Bank identifizierten Gens war durch die Sequenzen der EST-Bank abgedeckt, das 5'-Ende der mRNA wurde durch 5'-RACE bestimmt (s. 2.5.3.3). Da dieses Protein aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeit der gleichen Familie (≥ 40 % Sequenzidentität auf der Aminosäureebene) und Unterfamilie (≥ 55 % Sequenzidentität auf der Aminosäureebene (KAHN & DURST 2000)) der Cytochrome wie CYP71AV1 zuzuordnen war, wurde es in den weiteren Experimenten als CYP71AV5 bezeichnet. Die codierende Sequenz wurde durch PCR aus Trichom cDNA amplifiziert und als *Notl/Bg/II* Fragment in die MCS1 des Vektors pESC-Ura kloniert. Als Redoxpartner für CYP71AVS befand sich in der MCS2 desselben Plasmids bereits eine Cytochrom-P450-Reduktase (CPR) aus *Artemisia annua*, die von Ro und Mitarbeitern (2006) für die Aufklärung der Funktion von CYP71AV1 benutzt wurde.



Abb. 3.24 Coexpression von Proteinen zur Bildung von Germacren A-Carboxylsäure in Hefen. Der Hefestamm EPY300 wurde entweder mit den Plasmiden pESC-Leu2::HaGAS2 und pESC-Ura::CPR/CYP71AVS oder pESC-Leu2::HaGAS2 und pESC-Ura::CPR/CYP71AVL transformiert. Dies führte zur Expression von drei an der Biosynthese von Germacren A-Carboxylsäure beteiligten Proteinen. FPP wurde endogen in den Hefen gebildet und diente als Substrat für HaGAS2. Die Expression einer Cytochrom P450 Reduktase (CPR) aus *Artemisia annua* zusammen mit CYP71AVS (aus *H. annuus*) oder des Enzyms CYP71AVL aus *L. sativa* führte zur Bildung von Germacren A-Carboxylsäure. Diese wurde zur Analyse durch GC-MS aus den Hefen extrahiert.

Leu2, Ura3: Selektionsmarker. Gal1/Gal10 Promotoren: durch Galaktose induzierbare Promotoren. Für detaillierte Plasmidkarten siehe 7.2.

Zur funktionellen Charakterisierung dieses Plasmids wurden Hefedoppeltransformanten hergestellt (s. 2.6.9), mit *HaGAS2* als Insert im Vektor pESC-Leu (pESCLeu::HaGAS2) sowie CPR und *CYP71AVS* im Plasmid pESC-Ura (pESCUra::CYP71AVS/CPR). Alle Gene standen, wie in den Experimenten zuvor, unter der Kontrolle von Galaktose induzierbaren Promotoren (Abb. 3.24). Die Expression der Proteine geschah in Flüssigkulturmedien für 3 Tage, die Medien wiesen nach dieser Kulturdauer einen pH-Wert von 2-3 auf. Gebildete und sekretierte Germacren A-Carboxylsäure blieb unter diesen Bedingungen protoniert und an die Zellwand der Hefen gebunden. Nach der Pelletierung der Hefezellen wurden diese mit Tris-Puffer (pH 9,0) gewaschen. Die Carbonsäuren wurden damit deprotoniert und wieder wasserlöslich. Nach dem Pelletieren und der Abnahme des Überstandes wurde dieser auf pH 2 angesäuert und die Produkte mit Ethylacetat aus dem Puffer extrahiert. Für GC-MS Messungen wurden die Extrakte mit TMS-Diazomethan derivatisiert (s. 2.7.6.2).

Die gaschromatographische Analyse der Umsetzungsprodukte eines mit pESC-Leu::HaGAS2 und pESCURA::CYP71AVS/CPR transformierten Hefestammes zeigte einen kleinen zusätzlichen Peak (Abb. 3.26, Peak 4, RT = 17,04 min), der nicht in den Kontrollen auftrat und das erwartete Molekulargewicht von 248 für die derivatisierte Germacren A-Säure besaß. Die gebildeten Mengen dieses Produktes waren äußerst gering, obwohl das Protein exprimiert wurde, wie durch einen Western Blot der mikrosomalen Fraktion (s. 2.7.6.3) entsprechend transformierter EPY300 Hefezellen nachgewiesen wurde (Abb. 3.25).

Da trotz des exprimierten Proteins nur sehr wenig Produkt in den Proben nachweisbar war, wurde zum Vergleich ein Gen mit hoher Sequenzähnlichkeit aus *L. sativa* anhand der Nukleotidsequenz in EST Daten des "Compositae Genome Project" (http://compgenomics.ucdavis.edu/) identifiziert. Es konnte der gesamte codierende Bereich in Datenbanken aufgedeckt werden (s. 2.5.4). Das Gen erhielt den Arbeitstitel *CYP71AVL*.



Abb. 3.25 Western Blot der mikrosomalen Fraktion aus Hefen zur Untersuchung der Expression von CYP71AVS. Pro Spur wurden 10 µg Protein aufgetragen und durch SDS-PAGE aufgetrennt. Als Positivkontrolle (PK) wurde ein Hefestamm welcher verwendet, mit dem Plasmid pESCURA::CYP71AV1/CPR transformiert war und bei dem die Expression und Funktionalität von CYP71AV1 (57 kD) bereits nachgewiesen war (Ro et al. 2006). Als Negativkontrolle (NK) wurde ein mit dem Plasmid pESC-Ura ohne Insert transformierter EPY300 Stamm verwendet. Zur Expression von CYP71AVS (57 kD) wurde EPY300 mit dem Plasmid pESCUra::CYP71AVS/CPR transformiert (HA) und unter gleichen Bedingungen wie PK und NK kultiviert und induziert. Die exprimierten Proteine CYP71AV1 und CYP71AVS trugen ein N-terminales FLAG-Tag. Zur Detektion der Proteine wurde als primärer Antikörper Anti-Flag-Antikörper eingesetzt. L: Leiter in kD.

Die % Sequenzidentität der Aminosäuren gegenüber CYP71AV1 betrug 89 (Sequenzähnlichkeit: 95 %). Nach Amplifikation durch PCR aus L. sativa wurde die Sequenz Fragment zusammen mit CPR in das Plasmid pESC-Ura als Pacl kloniert (pESCUra::CYP71AVL/CPR) und analog zu CYP71AVS exprimiert (Abb. 3.24).

Die Doppeltransformation von EPY300 mit der H. annuus Germacren A-Synthase HaGAS2 und CYP71AVL/CPR führte zu einem vielfach höheren Signal für den schon durch die Expression von CYP71AVS identifizierten Peak mit der Retentionszeit von 17,04 min (Abb. 3.26, Peak 4). Die Aktivität des Enzyms aus L. sativa wies somit unter den Expressionsbedingungen in den Hefezellen eine gegenüber CYP71AVS vielfach gesteigerte Aktivität auf. Neben dem Hauptpeak traten zwei weitere Peaks auf, die ebenfalls einen Massenpeak von 248 zeigten (Peak 5 mit RT = 17,25 min; Peak 7 mit RT = 18,95 min). Die Identität dieser Peaks konnte noch nicht geklärt werden. Im Aufreinigungsprotokoll wurde mehrfach unter sauren pH-Bedingungen gearbeitet. Da Germacren A-Carboxylsäure, wie auch Germacren A, eine relativ instabile Verbindung ist, könnte es zu einem säurebedingten Ringschluss zwischen C₅ und C₁₀ gekommen sein (Bildung von Costic-Säure). Ebenso wäre eine durch die Wärme des Injektors am Gaschromatographen hervorgerufenen Umlagerung zu Elema-1,3,11(13)-trien-12-oat möglich gewesen (DE KRAKER et al. 2001b). Da die Germacren A-Säure nach Literaturangaben eine höhere Retentionszeit als die Umlagerungsprodukte aufweisen müsste (DE KRAKER et al. 2001a), sind der aufgetretene Hauptpeak und Peak 5 eventuell den beschriebenen Umlagerungsprodukten zuzuschreiben, während Peak 7 die derivatisierte Germacren A-Säure darstellen könnte (Abb. 3.26).

Ein in allen Chromatogrammen aufgetretener Peak mit einer Retentionszeit von 14,46 min (Peak 1) konnte als das lineare Sesquiterpen Nerolidol identifiziert werden. Farnesol, ein weiterer linearer Sesquiterpenalkohol, der durch saure Isomerisierung aus Nerolidol gebildet werden kann, wurde als sein Methylester in allen Proben nachgewiesen (Peak 3, RT = 16,96 min). Es ist anzunehmen, dass diese Isomerisierung durch die Säurebehandlung während der Aufreinigung der Produkte aus dem Hefezellpellet eintrat. Ein weiteres säurebedingtes Umwandlungsprodukt stellt α -Selinen (Peak 2) dar, das in allen Extrakten aus Hefen, die HaGAS2 exprimierten, detektiert wurde. Im Kontrollansatz mit pESCUra::CYP71AVS/CPR war es nicht nachweisbar. α-Selinen ist hierbei als säurebedingtes Umwandlungsprodukt von Germacren A zu sehen (DE KRAKER et al. 1998, 2001b), das aus dem Zellpellet koextrahiert wurde und anschließend durch die eingesetzte Säure entstand. Die höchsten Konzentrationen von α -Selinen waren bei der alleinigen Expression von HaGAS2 in Hefen und bei der Koexpression von HaGAS2 und CYP71AVS/CPR zu finden. Dies ist ein weiterer Hinweis auf die Ableitung dieses Peaks von Germacren A und die Stoffwechselvorgänge in den transformierten Hefen. Im ersten Falle stellt Germacren A das erwartete Endprodukt dar. Aufgrund der fehlenden Dodecanüberschichtung wurde es in diesen Ansätzen nicht vollständig von den Hefen abgegeben und deshalb in diesen Versuchen detektiert. Im zweiten Fall wurde aufgrund der niedrigen Aktivität von CYP71AVS nur wenig Germacren A zu Germacren A-Säure verstoffwechselt und blieb so teilweise in den Hefen akkumuliert. Bei der deutlich höheren Aktivität von CYP71AVL wurde Germacren A fast vollständig zu Germacren A-Carboxylsäure umgewandelt, weshalb der α -Selinen Peak deutlich kleiner ausfiel.

Aus dem Bereich der Fettsäuren konnte in den Proben Palmitoleinsäuremethylester (Peak 6 mit RT = 18,18 min) in unterschiedlichen Quantitäten identifiziert werden (Abb. 3.26). Alle



Abb. 3.26 Analyse der Produkte verschiedener Hefetransformationsexperimente zur Identifizierung von Germacren A-Carboxylsäure. (a) GC-Chromatogramme der Extrakte aus transgenen Hefen zur funktionellen Charakterisierung von CYP71AVS und CYP71AVL. Es wurden Hefen des Stammes EPY300 mit verschiedenen Plasmidkonstrukten transformiert, die jeweiligen Kombinationen sind in (a) angegeben. Identifikation der einzelnen Verbindungen: Peak 1: Nerolidol (RT = 14,46); Peak 2: α -Selinen (RT = 15,65); Peak 3: Methylfarnesol (RT = 16,96); Peak 4: derivatisierte Germacren A-Säure oder ein Umwandlungsprodukt davon, mit dem Molekulargewicht von 248 (RT = 17,04), Peak 5 (RT = 17,25) und Peak 7 (RT = 18,95) sind weitere Verbindungen mit einem Molekulargewicht von 248; Peak 6: Palmitoleinsäuremethylester (RT = 18,18). (b) Massenspektrum von Peak 4 (Germacren A-Carboxylsäure oder Umlagerungsprodukt davon) mit der Retentionszeit von 17,04 min.

weiteren aufgetretenen Nebenpeaks zeigten keine für Sesquiterpene oder deren Derivate typische Massenspektren. Die Ergebnisse der GC-MS Messungen belegen eindeutig, dass durch die Expression von CYP71AVS und CYP71AVL ein neues Produkt in den Hefen gebildet wurde, das nur nachweisbar war, wenn gleichzeitig auch Germacren A synthetisiert wurde. Die Masse des Molekül-Ionenpeaks dieser Verbindung ist ein weiterer deutlicher Hinweis darauf. dass es sich um Germacren A-Carboxylsäure handelt. Referenzverbindungen waren nicht verfügbar. Die exakte strukturelle Aufklärung mittels NMR-Spektroskopie war aufgrund zu geringer Produktausbeuten bisher noch nicht möglich. Dennoch können CYP71AVS und CYP71AVL sicher als Germacren A-Monooxygenasen, beziehungsweise Germacren A C12-Oxidasen, bezeichnet werden. Es handelt sich dabei um neue, bisher nicht identifizierte Enzyme.

3.4.2 RT-PCR Analyse der CYP71AVS Transkripte

Das Auftreten von Transkripten von CYP71AVS wurde in verschiedenen Geweben (Abb. 3.9) der Sonnenblume und während der Trichomentwicklung (Abb. 3.12) durch semiquantitative RT-PCR untersucht. Bezüglich der gewebespezifischen Transkription konnte ein Nachweis von mRNA für CYP71AVS in Wurzeln, jungen und alten Blättern sowie



Abb. 3.27 Transkriptanalyse von CYP71AVS in verschiedenen Geweben und während der Trichomentwicklung. (a) Untersuchung der gewebespezifischen Expression von CYP71AVS durch RT-PCR mit spezifischen Primern. (Wu) Wurzel, (St) Stängel; (Ko) Kotyledone; (jB) junge Blätter; (aB) alte Blätter; (Sb) Strahlenblüten; (Tri) Trichome. L: Leiter in bp. (b) Analyse der Transkriptionsstärke von CYP71AVS während der Trichomentwicklung von der prä- bis zur postsekretorischen Phase. (L) Leiter in bp.

In beiden Versuchen wurde eine einheitliche Menge an cDNA für die PCR-Reaktionen durch die Amplifikation der konstitutiv exprimierten mRNA für Ubiquitin eingestellt. Diese Amplifikationsergebnisse für den internen Standard sind in den Abbildungen 3.9 (für Abb. 3.27a) und 3.12 (für Abb. 3.27b) dargestellt.

Trichomen erbracht werden. Bei einer genaueren Betrachtung des Expressionszeitraumes in den Trichomen zeigte sich eine schwache Transkriptmenge in präsekretorischen und späten sekretorischen Stadien. Die Hauptexpressionszeit in den Trichomen liegt in vier aufeinanderfolgenden sekretorisch aktiven Trichomstadien (Abb. 3.27).

Der Vergleich der gewebespezifischen Expression von CYP71AVS mit den Germacren A-Synthasen der Sonnenblume zeigte eine vollkommene Übereinstimmung bezüglich der Lokalisation. Auch der Zeitraum der Expression in den Trichomen war mit HaGAS identisch. Dies ist ein Indiz für die Beteiligung der Germacren A-Synthasen und CYP71AVS am selben Biosyntheseweg, der Bildung von Sesquiterpenlactonen.

3.5 Hypothetische Reaktionsmechanismen für die Bildung von Sesquiterpenen in den Drüsenhaaren der Sonnenblume

Die Trichome der Sonnenblume stellen einen hochspezialisierten Gewebetyp dar, dessen primäre Funktion die Biosynthese von Sesquiterpenkohlenwasserstoffen und vor allem Sesquiterpenlactonen darstellt. In dieser Arbeit wurden drei an der Biosynthese dieser Substanzen beteiligte Enzyme identifiziert. Abbildung 3.28 gibt einen Überblick über die von den Germacren A-Synthasen, der Cadinen-Synthase und des Cytochromes CYP71AVS katalysierten Reaktionen.

Die Bildung der Sesquiterpene läuft über eine Serie hochreaktiver carbokationischer Intermediate (CANE 1990; STEELE et al. 1998; CANE 1999). Die Reaktion wird durch Abspaltung eines Protons oder durch die Anlagerung einer nukleophilen Gruppe gestoppt und resultiert, wie im Fall von HaCS, oft in der Bildung mehrerer Produkte.

Ausgangpunkt für die Biosynthese der Sesquiterpene ist in allen Fällen das lineare Farnesylpyrophosphat (Abb. 1.3), das unter Beteiligung eines zweiwertigen Metallions (meist Mg^{2+}) im aktiven Zentrum der Sesquiterpensynthasen ionisiert wird. Im Falle der Bildung von β -Caryophyllen durch HaCS kommt es zu einem elektrophilen Angriff von C₁ an die Doppelbindung zwischen C₁₀ und C₁₁. Dies resultiert in der 1,11-Zyklisierung und einer Hydridverschiebung. Durch einen weiteren elektrophilen Angriff auf die Doppelbindung zwischen C₂ und C₃ kommt es zur Bildung der Doppelbindung zwischen C₂ und C₁₀, und damit zur Ausbildung des Cyclobutanrings. Durch Deprotonierung dieses Intermediats entsteht die Doppelbindung zwischen C₃ und C₁₁ kann das Farnesylkation von HaCS, auch zum Nerolidyldiphosphat umgewandelt werden, durch eine Drehung entsteht aus dem trans- das cis-Isomer dieses Moleküls. Nach der Abspaltung des Pyrophosphatrestes kommt es ebenfalls zum 1,10-Ringschluss. Ein Hydridshift innerhalb des Moleküls und eine weitere Zyklisierung (1,6) führt zur Bildung des Cadinen-Grundgerüstes. Durch Deprotonierung



entsteht aus diesem Molekül mit γ -Cadinen eines der beiden Hauptprodukte von HaCS sowie α -Muuorlen. Zur Bildung des trizyklischen Sesquiterpens α -Copaen ist vor der Deprotonierung der Ringschluss zwischen C₂ und C₇ nötig.

Die beiden Germacren A-Synthasen HaGAS1 und HaGAS2 katalysieren gegenüber HaCS weniger Reaktionsschritte und bilden jeweils nur ein Endprodukt. Nach der Bildung des Farnesylkations kommt es durch einen Ringschluss zwischen C₁ und C₁₀ zur Bildung des Germacren-Grundgerüstes. Die anschließende Deprotonierung führt zur Doppelbindung zwischen C₁₁ und C₁₂ und zum Endprodukt dieser Enzyme, dem Germacren A. Germacren A dem bildet jedoch nur ein Intermediat auf biosynthetischen Weg zu den Sesquiterpenlactonen. Die durch die Monooxygenasen CYP71AVS und CYP71AVL katalysierten Reaktionen der Umwandlung von Germacren A zur Germacren A-Carbonsäure (Germacratrien-12-oat) verläuft vermutlich analog zur von Ro und Mitarbeitern (2006) beschriebenen Oxidation von Amorpha-4,11-diene zu Artemisininsäure, die durch das sequenzähnliche Enzym CYP71AV1 katalysiert wird. Für CYP71AV1 konnte von Ro et al. (2006) und Teoh et al. (2006) durch in vitro Experimente gezeigt werden, dass dieses Enzym die dreistufige Oxidation von Amorpha-4,11-dien über Artemisininalkohol und Artemisininaldehyd zu Artemisininsäure katalysiert. Im ersten Schritt der Oxidation von C12 übernimmt es hierbei eine Oxidasefunktion während die beiden nächsten Schritte einer Dehydrogenasereaktion entsprechen. Analog hierzu besteht der erste Schritt der Bildung von Germacren A-Säure somit in der Hydroxylierung der Isopropenyl-Seitenkette des Germacren A, die zur Bildung eines Germacren A-Alkohols (Germacra-1(10),4,11(13)-trien-12-ol) führt. Die Umwandlung des Alkohols zur Germacren A-Säure (Germacra-1(10),4,11(13)-trien-12oat) verläuft über Germacren A-Aldehyd (Germacra-1(10),4,11(13)-trien-12-al) als Zwischenprodukt (Abb. 3.28). Mit der Aufklärung dieser durch ein einzelnes Enzym katalysierten Reaktionsschritte ist ein weiteres Intermediat auf dem Weg zu den Sesquiterpenlactonen erreicht. Zur Bildung der 7,6-Sesquiterpenlactone ist anschließend eine Hydroxylierung von C₆ und die darauf folgende Bildung des inneren Esters des Lactonrings durch ein weiteres P450-Enzym nötig.

4 Diskussion

4.1 Terpensynthasen, die Schlüsselenzyme der Terpenbiosynthese

Sesquiterpenlactone sind neben den Polyacetylenen die typischen Sekundärmetabolite der Asteraceen. Die Schlüsselenzyme des Sesquiterpenlacton-Biosyntheseweges stellen die Terpensynthasen dar. Diese sind seit einigen Jahren Gegenstand großen Interesses. Zu Beginn der Arbeiten an Terpensynthasen wurden diese aus Pflanzenmaterial isoliert, aufgereinigt und biochemisch charakterisiert (POULOSE & CROTEAU 1978; DEHAL & CROTEAU 1988; VÖGELI et al. 1990). Dies war mit zahlreichen Schwierigkeiten verbunden. Zum einen werden die Terpensynthasen oft nur in spezifischen Geweben gebildet, die wie im Falle der Trichome nicht einfach zugänglich sind. Desweiteren findet die Biosynthese oft nur in zeitlich begrenzten Lebensphasen der Pflanzen- oder Gewebeentwicklung statt. Zusätzlich ist die Konzentration dieser Enzyme in den Pflanzen meist relativ gering. Fortschritte in den molekulargenetischen Arbeitstechniken haben dazu geführt, dass heute die Enzyme über die Isolierung und Klonierung der cDNA und die anschließende heterologe Expression in Mikroorganismen verfügbar gemacht und untersucht werden.

Terpensynthasen wurden hierzu vorwiegend durch die Analyse von mRNA aus Elicitorbehandelten Pflanzen (YOSHIOKA et al. 1999; BENNETT et al. 2002) oder Zellsuspensionskulturen isoliert (BACK & CHAPPELL 1995). Zur Identifizierung von Monoterpensynthasen der Lamiaceen wurden vor allem in der Arbeitsgruppe von Croteau auch gezielt Drüsenhaare isoliert (MCCASKILL & CROTEAU 1995; CROCK et al. 1997; TURNER et al. 1999; HOELSCHER et al. 2003; IIJIMA et al. 2004). Die am häufigsten angewendete Methode ist hierbei das Abschlagen der Trichome mittels Glaskugeln von gefrorenen Blättern (GERSHENZON et al. 1987; GERSHENZON et al. 1992). Da bei Asteraceen die Trichome oft in die Blattoberfläche eingesenkt sind und die Zahl der Trichome gegenüber Lamiaceen oder Solanaceen deutlich geringer ist, stößt diese Methode bei dieser Pflanzenfamilie an ihre Grenzen. Zusätzlich ist die biosynthetisch aktive Phase dieser Trichome deutlich kürzer als die der Lamiaceen und schon in früheren Entwicklungsstadien der Blätter abgeschlossen (SPRING et al. 1987). Außer den drei in dieser Arbeit erstmals beschrieben Sesquiterpensynthasen, wurde bisher mit der Germacren A-Synthase aus Artemisia annua (BERTEA et al. 2006) nur eine einzelne weitere Terpensynthase aus Drüsenhaaren von Asteraceen beschrieben. Die ersten Germacren A-Synthasen dieser Familie wurden aus Lactuca sativa nach der Inokulation mit dem Oomyceten Bremia lactuca isoliert (BENNETT et al. 2002). Gleichzeitig wurden zwei weitere Germacren A-Synthasen in Blättern von Cichorium intybus gefunden (BOUWMEESTER et al. 2002). Auch für die Isolierung aller weiteren bekannten Germacren A-Synthasen der Asteraceen wurden Blätter als Ausgangsmaterial für die Extraktion von RNA genutzt (PROSSER et al. 2002; KIM et al. 2005; REN et al. 2006).

In dieser Arbeit konnten erstmals mehrere Sesquiterpensynthasen direkt aus den Trichomen von Asteraceen isoliert und ihre entwicklungsspezifische Expression dargestellt werden. Zu allen drei identifizierten Sesquiterpensynthasen konnten die kompletten offenen Leserahmen ermittelt werden. Die berechneten Molekulargewichte dieser Enzyme (64 kD) lagen im Bereich der Molekulargewichte bereits bekannter pflanzlicher Terpensynthasen (BOHLMANN et al. 1998). Alle drei Enzyme zeigten in der von der mRNA-Seguenz abgeleiteten Aminosäuresequenz für Terpensynthasen typische Sequenzmotive. Das in allen Prenyltransferasen und Terpensynthasen vorhandene hoch konservierte DDxxD-Motiv ist in den Sesquiterpensynthasen an der Bindung des Farnesylpyrophosphates beteiligt. Durch ein dort die Aspartatreste gebundenes divalentes Magnesiumion an wird die Pyrophosphatgruppe des Prenyldiphosphates komplexiert (CANE & XUE 1996; STARKS et al. 1997). 35 Aminosäuren stromaufwärts befindet sich das ebenfalls hoch konservierte RxR-Motiv. Für dieses Motiv wird angenommen, dass die Argininreste die im aktiven Zentrum unter Beteiligung des DDxxD-Motives abgespaltene Pyrophosphatgruppe fixieren und eine Addition dieser Gruppe an das entstehende Carbokation verhindern (THOLL et al. 2005).

Nach einer von BOHLMANN et al. (1998) vorgeschlagenen Klassifizierung der pflanzlichen Terpensynthasen, werden diese basierend auf der Ähnlichkeit ihrer Aminosäuresequenz in sechs Untergruppen eingeteilt. Die Enzyme einer Untergruppe zeigen hierbei untereinander mindestens 40 % Aminosäureidentität. Sesquiterpen- und Diterpensynthasen der Angiospermen bilden die Klasse Tpsa, die sich deutlich von den Monound Sesquiterpensynthasen der Gymnospermen unterscheiden. Die in der Sonnenblume gefundenen Enzyme sind aufgrund ihrer Aminosäuresequenz erwartungsgemäß den Enzymen der Untergruppe Tpsa zuzuordnen. Evolutiv wird für alle Terpensynthasen ein gemeinsames Vorläufergen postuliert. Phylogenetische Rekonstruktionen zeigten, dass die Trennung von Terpensynthasen des Primär- und des Sekundärmetabolismus in einem gemeinsamen Vorläufer der Angio- und Gymnospermen stattgefunden hat (BOHLMANN et al 1998). Diese Ergebnisse wurden durch die Analyse der Exon-Intron-Struktur einiger Terpensynthasen bestätigt (TRAPP & CROTEAU 2001). In dieser Untersuchung wurde auch die Einteilung der Terpensynthasen in drei Klassen vorgeschlagen, wobei die Entwicklung der Terpensynthasen durch den Verlust von Introns nachvollzogen werden konnte. Die Sequenzierung des genomischen Abschnittes der Sesquiterpensynthasen der Sonnenblume zeigte die für Terpensynthasen der Klasse III typische Größe und Anordnung der einzelnen Introns auf dem sequenzierten genomischen DNA-Abschnitt. Die Sesquiterpensynthasen der Sonnenblume gehören somit zu den evolutiv jungen Terpensynthasen.

4.2 Gewebe- und entwicklungsspezifische Expression von drei Sesquiterpensynthasen der Sonnenblume

Untersuchungen an *Lactuca sativa* hatten eine deutliche Korrelation der Expression von Sesquiterpensynthasen mit dem Befall durch den Oomyceten *Bremia lactucae* gezeigt (BENNETT et al. 2002), was auf die Bedeutung der gebildeten Terpenoide in der induzierten Pathogenabwehr hinweist. Für die Sesquiterpensynthasen der Sonnenblume konnte dieser Zusammenhang nicht gezeigt werden. Der Befall mit dem Oomyceten *Plasmopara halstedii* führte zu keiner Erhöhung der Expression in den getesteten Geweben (Daten nicht dargestellt). Alle bisher erhobenen Daten weisen auf eine konstitutive Bildung und endogene Regulation der Sesquiterpensynthasen in bestimmten Organen, beziehungsweise Geweben der Sonnenblume hin.

Die Analyse der gewebespezifischen Expression zeigte das Auftreten von Transkripten der H. annuus Germacren A-Synthasen in Wurzeln, jungen und alten Blättern, vor allem aber in den glandulären Trichomen. Bei der genaueren Betrachtung der Expression innerhalb verschiedener Stadien der Trichomentwicklung konnte gezeigt werden, dass die Expression stark reguliert ist, nur während der sekretorisch aktiven Phase geschieht und keiner Induktion außen bedarf. Eine derartige Feinauftrennung verschiedener von Trichomen und deren Nutzung für molekularbiologische Entwicklungsstadien von Untersuchungen wurde bisher für keine andere Pflanzenart gezeigt. Der dadurch ermittelte Zeitraum der Aktivität der Sesquiterpensynthasen deckt sich genau mit dem durch HPLC-Analysen ermittelten Entwicklungsabschnitt der Trichome, in dem die Sekretion von Sesquiterpenlactonen stattfindet (HEIL & SPRING 1999; GÖPFERT 2003). Die Bildungsphase der Sesquiterpenlactone war anhand der HPLC-Analysen mit 8 bis 9 Tagen angenommen worden, was sich durch die in dieser Arbeit gezeigten Untersuchungen bestätigte. Die Untersuchung des STL-Gehaltes in Blättern von H. annuus zeigte, dass nach den ersten 10 Tagen der Blattentwicklung keine weitere Zunahme erfolgte (SPRING et al. 1987). Auch dieses Ergebnis wird durch die Analyse der Trichome aus den Antherenspitzen gestützt und weist auf die entwicklungsmäßige Übereinstimmung von Haaren der Blätter und der Blüten hin. Messungen des Monoterpengehaltes der Blätter von Mentha x piperita erfassten den Beginn der Bildung von Monoterpenen in Trichomen auf 8-10 Tage alten Blättern. Die Biosynthese erfolgte dort ebenfalls über einen Zeitraum von 10 Tagen (GERSHENZON et al. 2000). Während der Bildungszeitraum identisch ist, scheint der Beginn der Inhaltstoffbildung zwischen Lamiaceen und Asteraceen verschieden gesteuert zu sein.

Die Regulation weiterer untersuchter Gene des Terpenstoffwechsels in den Trichomen geschieht unabhängig von der Expression der Germacren A-Synthasen. Transkripte der Farnesylpyrophosphat-Synthase waren schon in den ersten präsekretorischen- und auch noch in der postsekretorischen Phase der Trichome nachweisbar. FPP dient in den Zellen

jedoch nicht nur als Ausgangsprodukt für die Biosynthese von Sesquiterpenen, sondern ist auch ein Intermediat für die Bildung von Steroiden und den davon abgeleiteten Verbindungen (SITTE et al. 2002). Dies lässt eine eigenständige Regulation sinnvoll erscheinen.

Interessant ist der Zusammenhang mit dem Primärstoffwechsel der Drüsenhaarzellen. Gleichzeitig mit dem Ende der Rubisco-Expression endet auch die Expression der Germacrensynthasen, die offensichtlich von einem funktionierenden Primärstoffwechsel in den Haarzellen selbst abhängen und nicht aus anderen Gewebezellen der Antheren beziehungsweise des Blattes energetisiert werden. Nach dem Ende der biosynthetisch aktiven Zeit der Trichome beginnen die Stielzellen zu degenerieren und sterben ab (GÖPFERT 2003).

Transkripte für die Germacren A-Synthasen waren außer in Trichomen auch in jungen und alten Blättern, sowie in Wurzeln nachweisbar. Auf jungen Blättern ist dies durch die Aktivität der Synthasen in den vorwiegend auf der Blattunterseite auftretenden glandulären Trichomen erklärbar. Sowohl diese Arbeit, als auch früherer Untersuchungen zur STL-Akkumulation auf Blättern (SPRING et al. 1987) haben gezeigt, dass die Biosynthese der STL in den Trichomen auf vollständig entwickelten Blättern weitgehend beendet ist. Dass dennoch Transkripte der Germacren-Synthasen nachgewiesen werden konnten, könnte ein Hinweis auf die Biosynthese von STL in weiteren Zelltypen ausdifferenzierter Blätter sein. Untersuchungen hierzu liegen bisher nicht vor. Auf den Blättern der Sonnenblume werden Sesquiterpene auch in linearen Drüsenhaaren gebildet, und dort in den apikalen Zellen gespeichert. Die Biosynthese des Bisabolen-Grundgerüstes der dort identifizierten Glandulone (SPRING et al. 1992) verläuft jedoch nicht über das Intermediat Germacren A. Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass in den linearen Drüsenhaaren weitere, bisher nicht identifizierte STL vorkommen, deren Biosynthese unter Beteiligung von Germacren A-Synthasen abläuft.

Neben dem Transkript für HaGAS wurde in ausdifferenzierten Blättern auch die Expression von CYP71AVS gezeigt. Dieses Enzym ist ebenfalls an der Biosynthese von Sesquiterpenlactonen beteiligt und zeigt in Trichomen, Blättern und Wurzeln das identische Expressionsmuster wie HaGAS. Das Auftreten des Transkripts für CYP71AVS im Wurzelbereich kann als Indiz dafür angesehen werden, dass die Bildung von STL bei der Sonnenblume auch in diesen Pflanzengeweben stattfindet. Die zelluläre Lokalisierung ist bisher nicht nachgewiesen, jedoch können die in dieser Arbeit beschriebenen Antikörper dazu genutzt werden diese Frage zu klären. Die gezeigte hohe Spezifität gegenüber den Sesquiterpensynthasen lässt es möglich erscheinen, diese Enzyme ohne Kreuzreaktionen in verschiedenen Geweben der Sonnenblume zu detektieren. Da es sich um polyklonale
Antikörper handelt, wird eine Unterscheidung zwischen verschiedenen Sesquiterpensynthasen jedoch nicht möglich sein.

Die intrazelluläre Aufteilung der Biosynthese verschiedener Terpenklassen zwischen Cytosol und Chloroplasten wurde molekularbiologisch gezeigt und für Monoterpensynthasen durch Hybridisierungsexperimente mit Antikörpern geklärt (BOUVIER et al. 2000). Dabei konnten diese Monoterpensynthasen in den Leucoplasten der Drüsenhaare von Lamiaceen nachgewiesen werden (TURNER et al. 1999). Sesquiterpensynthasen werden allgemein als im Cytosol lokalisierte Enzyme angesehen. Ein subzellulärer Nachweis durch in situ Lokalisierungsexperimente wurde bisher noch nicht erbracht. Im mikroskopischen Bild unterschieden sich die beiden apikalen Zellpaare der paarig angeordneten Stielzellen von glandulären Trichomen der Sonnenblume durch das Fehlen von Chloroplasten von allen anderen Stielzellen (GÖPFERT 2003). Dieser Unterschied ist auch für andere glanduläre Trichome aus Asteraceen bekannt, die alle einen ähnlichen Aufbau zeigen (DUKE & PAUL 1993). Dies könnte ein Indiz dafür sein, dass auch die Funktionen der Zellen variieren, und es sich bei diesen Zellpaaren um die Orte der Biosynthese der Sesquiterpenlactone handelt. Eingehende Untersuchungen dazu werden mit den getesteten Antikörpern ebenfalls möglich sein und weitere Einblicke in die Biosynthese der STL in den Trichomen und anderen Geweben der Sonnenblume erbringen.

4.3 Expression und funktionelle Charakterisierung der Sesquiterpensynthasen der Sonnenblume

Zur funktionellen Charakterisierung der drei aus Trichomen der Sonnenblume isolierten Sesquiterpensynthasen wurden diese heterolog in *E. coli* und *S. cerevisiae* exprimiert. Die Herstellung der rekombinanten Enzyme in *E. coli* erfolgte für die verschiedenen Enzyme unter unterschiedlichen Bedingungen, um die Bildung von Einschlusskörperchen möglichst gering zu halten. Die Puffersysteme für *in vitro* Enzym-Substrat-Umsetzungversuche wurden nach vorhandenen Literaturangeben modifiziert (BENNETT et al. 2002; BOUWMEESTER et al. 2002; BERTEA et al 2006). Für Versuche mit den Germacren A-Synthasen erwiesen sich diese Puffer als geeignet, jedoch zeigte rHaCS unter diesen Bedingungen nur eine sehr geringe Aktivität, weshalb dieses Enzym durch eine *in vivo* Expression in Hefen funktionell charakterisiert wurde.

4.4 Zwei Germacren A-Synthasen aus Trichomen der Sonnenblume

Das durch *in vitro* Enzym-Substrat-Reaktionen gebildete Produkt beider rekombinanter Germacren A-Synthasen (HaGAS1, HaGAS2) war identisch und unterschied sich nicht vom Produkt der Synthese nach heterologer Expression der Gene in Hefen.

Bei der Analyse des gebildeten Germacren A auf verschiedenen GC-MS Anlagen kam es nicht immer zu einer vollständigen Umlagerung des Germacren A zu β-Elemen, wie es durch die verwendete Injektor-Temperatur aufgrund von Literaturangeben zu erwarten gewesen wäre (DE KRAKER et al. 2001b; BERTEA et al. 2006; FARALDOS et al. 2007). Warum es auf ähnlichen Geräten mit den selben Injektions- und Trennparametern zu unterschiedlich starken Umlagerungsreaktionen kam, konnte nicht ermittelt werden. Die teilweise vor dem Germacren A-Peak ansteigende Basislinie der GC-Chromatogramme ist in der Literatur mehrfach als breiter "hump" beschrieben worden und ebenfalls mit Umlagerungsreaktionen aufgrund der Injektortemperatur des Gaschromatographen zu erklären (DE KRAKER et al. 2001b; BERTEA et al. 2007).

Da für Germacren A-Synthasen schon einige vollständige Charakterisierungen vorlagen und diese sich bezüglich Km-Werten und pH-Optimum kaum unterschieden (BENNETT et al 2002; BOUWMEESTER et al. 2002; KIM et al. 2005; BERTEA et al. 2006; REN et al. 2006), wurden diese Parameter für die beiden Germacren A-Synthasen aus *H. annuus* nicht ermittelt. Eine funktionelle Charakterisierung bezüglich des Produktspektrums war für die Aussagen zu den Vorgängen innerhalb der Trichome ausreichend.

Inzwischen zeigt sich zunehmend, dass die Expression von Sesquiterpensynthasen in Hefen gegenüber der heterologen Expression in E. coli weitere große Vorteile bietet. So wurden in den letzten zwei Jahren mehrere Synthasen erfolgreich heterolog in den S. cerevisiae exprimiert und modifizierende Schritte charakterisiert (LINDAHL et al. 2006; Ro et al. 2006; TAKAHASi et al. 2007). Die auf die Bildung der Sesquiterpen-Grundgerüste folgenden Modifikationen werden oftmals von Cytochrom P450-Enzymen katalysiert. Deren funktionelle Expression in E. coli ist sehr kompliziert, da E. coli als Prokaryont nicht über die nötige Membranausstattung zur richtigen subzellulären Lokalisation dieser Enzyme verfügt (CHANG et al. 2007). Eine Coexpression der Schlüsselenzyme der Sesquiterpenbiosynthese zusammen mit den modifizierenden Enzymen ist daher in Hefen wesentlich vielversprechender. Die potenzielle Nutzungsmöglichkeit einer solchen Coexpression zur Herstellung von Intermediaten der Sesquiterpenlactonbiosynthese zeigte sich am Beispiel der Produktion der Artemisininsäure (Ro et al. 2006).

4.5 Identifizierung des Biosyntheseschrittes von Germacren A zu Germacren A-Carboxylsäure

Cytochrom P450 Enzyme stellen eine außergewöhnliche Superfamilie von Biokatalysatoren dar, die jede andere Enzymgruppe bezüglich der Zahl potenzieller Substrate und katalysierter Reaktionen übertrifft (NELSON 2006). Diese Enzyme fungieren als Monooxygenasen oder Oxidasen und finden sich fast ausschließlich membrangebunden am endoplasmatischen Retikulum und nach Aufreinigung aus Proteinextrakten in der mikrosomalen Fraktion. Als Redoxpartner sind mit nur einzelnen Ausnahmen NADPH-P450 Reduktasen beteiligt (SONG & BRASH 1991; MATSUI et al. 1999), die ebenfalls membrangebunden auftreten.

P450 Enzyme sind bekanntermaßen auch an der Biosynthese von Terpenen beteiligt, so war etwa die Geraniol 10-Hydroxylase eines der ersten charakterisierten pflanzlichen P450 Proteine (MEEHAN & COSCIA 1973). Zahlreiche weitere Enzyme mit modifizierenden Funktionen der Terpengrundgerüste zählen zur CYP71A Unterfamilie der Cytochrome (KARP et al. 1990; HALLAHAN et al. 1994; LUPIEN et al. 1999; MAU & CROTEAU 2006).

Die Identifizierung des P450 Enzyms CYP71AVS in Trichomen von *H. annuus* (CYP71AVS) fügt der Cytochromfamilie CYP71 ein weiteres sehr wichtiges Element hinzu. Das sequenzähnliche Enzym aus *Artemisia annua*, welches die Synthese von Artemisininsäure aus Amorphadien katalysiert (Ro et al. 2006), war das erste publizierte Enzym für die der Zyklisierungsreaktion folgenden Biosynthese von Sesquiterpenlactonen. Armorphadien besitzt allerdings ein Cadinan-Grundgerüst und gehört damit nicht zu den sehr viel häufiger vorkommenden Sesquiterpenlactonen mit Germacranolid- bzw. Heliangolidskelett. Zu den beiden letztgenannten gehören auch die in den Trichomen der Sonnenblume am stärksten vertretenen STL. Mit der Identifizierung von CYP71AVS wurde somit ein weiterer essenzieller Schritt in der Biosynthese von Sesquiterpenlactonen beschrieben.

Aufgrund der niedrigen Aktivität von CYP71AVS musste die Funktion durch die Expression eines Enzyms mit hoher Sequenzähnlichkeit aus *Lactuca sativa* (CYP71AVL) bestätigt werden. Die Ergebnisse zeigten eindeutig, dass die Funktion beider Enzyme identisch ist. Die Identität des gebildeten Produktes konnte aufgrund zu geringer Produktausbeute bisher nur indirekt nachgewiesen werden. Es zeigte sich jedoch, dass die durch CYP71AVS und CYP71AVL gebildete Verbindung nur dann auftrat, wenn als Substrat Germacren A in den Hefezellen vorhanden war. Als Intermediate im angenommenen Reaktionsschritt kamen Germacren A-Alkohol und Germacren A-Aldehyd in Frage, sofern man die für CYP71AV1 beschriebenen Reaktionsschritte (Ro et. al. 2006) zu Grunde legt. Die Ergebnisse zeigten einen Molekül-Ionenpeak von 248 für das von CYP71AVS/L gebildete Produkt. Dies ist exakt die erwartete Masse für die Germacren A-Carboxylsäure nach Methylierung, die zur Analyse durch Gaschromatographie erforderlich war. Für die beiden Intermediate wären kleinere Molekül-Ionenpeaks zu erwarten gewesen. Auch wenn die Verbindung noch nicht strukturell durch NMR bestätigt ist, so lassen die Ergebnisse doch kaum Zweifel an der Identität des Produktes zu. Die Enzyme CYP71AVS und CYP71AVL sind somit als multifunktionelle Monooxygenasen anzusehen. Es werden drei aufeinanderfolgende Oxidationsschritte an C₁₂ des Germacren A Moleküls katalysiert, weshalb sie auch als Germacren A-Monoxygenasen oder Germacren A-C₁₂-Oxidasen bezeichnet werden können. Der Reaktionsmechanismus mit drei aufeinanderfolgenden oxidativen Schritten ist eine bisher nur selten nachgewiesene Funktion eines einzelnen Cytochrom P450 Enzyms. Weitere Enzyme, die diese Reaktionen durchführen sind aus der Gibberellin-Biosynthese bekannt (HELLIWELL et al. 1999, 2001).

Zur strukturellen Bestätigung durch NMR-Spektroskopie muss die Menge an gebildetem Produkt deutlich erhöht werden. Für die Expressionsversuche wurden selektive Medien verwendet. Eigene Versuche haben jedoch gezeigt, dass die Expressionsstärke von plasmidkodierten Enzymen im verwendeten Hefestamm sehr stark abhängig vom eingesetzten Medium war. Bei der Expression der Sesquiterpensynthasen in Hefen zeigte sich eine vielfach höhere Produktkonzentration durch die Kultivierung der Hefen in einem Vollmedium (YPA) gegenüber den selektiven Medien. Entgegen den vielfach für die Expression von Cytochrom P450 verwendeten WAT-Hefestämmen mit bereits integrierten pflanzlichen P450-Reduktasen (POMPON et al. 1996), ist der Stamm EPY300 für die Expression von Sesquiterpensynthasen optimiert und besitzt diese zusätzlichen Reduktasen nicht (Ro et al. 2006). Dies hat zur Folge, dass für die Expression von CYP71AVS und CYP71AVL neben der Germacren A-Synthase auch eine pflanzliche Cytochrom P450-Reduktase eingebracht werden musste. Da im vorhandenen high-copy Hefevektor jedoch nur zwei multiple cloning sites vorhanden waren, mussten die drei exprimierten Gene auf zwei low copy Plasmide mit unterschiedlichen Selektionsmarkern verteilt werden. Für die Expression in einem Vollmedium ist die Verwendung von high-copy Vektoren jedoch Voraussetzung, da ansonsten die Hefen während der Inkubationszeit die nicht benötigten Plasmide verlieren. Da bisher nur das high-copy Plasmid zur Verfügung stand (pESC-Leu2d), ist derzeit die Konstruktion eines high-copy Expressionsplasmid mit drei multiple cloning sites in Arbeit (D.-K. Ro, persönliche Mitteilung). Dies würde die Expression aller drei benötigten Gene unter Vollmediumbedingungen erlauben und könnte zu einer deutlich gesteigerten Produktbildung führen, welche ausreichend für eine Identifizierung durch NMR-Spektroskopie sein sollte.

Von DE KRAKER et al. (2001a) wurde die Biosynthese von Germacren A-Carboxylsäure aus Germacren A auf die Aktivität von mindestens zwei Enzymen zurückgeführt. Für diese Versuche wurde ein Wurzelextrakt aus *Cichorium intybus* verwendet. Die Biosynthese von Germacren A-Alkohol aus Germacren A-Säure wurde dabei einem Cytochrom P450 zugeschrieben, die beiden darauf folgenden Schritte der Umwandlung dieses Produktes zu

Germacren A-Säure wurde auf die Aktivität von ein oder zwei löslichen Dehydrogenasen zurückgeführt. Diese Ergebnisse können mit den Daten aus dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Es konnte gezeigt werden, dass alle drei Schritte von derselben membrangebundenen Monooxygenase übernommen werden. Offen bleibt die Frage warum CYP71AVS trotz der sehr hohen Aminosäureidentität zu CYP71AVL eine viel schwächere Aktivität zeigte. Es kann vermutet werden, dass die unterschiedliche cytologische Herkunft dieser beiden Enzyme eine Rolle spielt. Eventuell entsprechen die Bedingungen in den Hefenzellen mehr den Optimumsbedingungen für die natürlicherweise in den Milchröhren von *L. sativa* exprimierten CYP71AVL als denen des in Trichomen lokalisierten CYP71AVS. Als Redoxpartner für beide Enzyme wurde eine Cytochrom-Reduktase aus *Artemisia annua* verwendet. Die Aktivitäts-Unterschiede könnten also auch auf eine schlechtere Interaktion zwischen CYP71AVS und dieser Reduktase zurückzuführen sein.

4.6 Die H. annuus Cadinen-Synthase ist ein Multiproduktenzym

Bei der Isolation von Enzymen zur Bildung der Sesquiterpenkohlenwasserstoffe aus FPP wurde mit der Cadinen-Synthase (HaCS) neben den beiden Germacren A-Synthasen auch ein Multiproduktenzym identifiziert.

Die Umsetzung von FPP durch rHaCS in vitro erbrachte nur sehr geringe Produktmengen, die eine Aussage über die Struktur der Verbindungen nach GC-MS Analysen nicht erlaubten. Ob HaCS generell eine wesentlich geringere Aktivität als HaGAS aufweist, oder die gewählten Reaktionsbedingungen nicht optimal waren, ist bisher nicht geklärt. Da es sich aber sowohl bei HaCS, als auch bei HaGAS wahrscheinlich um lösliche Enzyme handelt, deren intrazelluläre Lokalisation im Cytosol der selben Zellen angenommen wird, sollten die funktionellen Bedingungen in vivo ähnlich sein. Eine Optimierung der in vitro Umsetzungsreaktion von HaCS hätte die Messung von zahlreichen Proben durch GC-MS erfordert. Da aber für diese Vielzahl an Proben kein ausreichender Zugang zu einem solchen Gerät bestand, wurde auf eine diesbezügliche Optimierung verzichtet. Mittels Expression von HaCS in transgenen Hefen gelang es, die Produktmenge für GC-MS Analysen deutlich zu erhöhen. Durch die Expression als Thioredoxin-Fusionsprotein wurde die Aktivität des heterolog exprimierten Proteins in Hefen nochmals vielfach gesteigert und es wurden Produktmengen erreicht, die zu aussagekräftigen Massenspektren führten. Die Nutzung des Fusionsproteins für in vitro Umsetzungsversuche hatte keinen Einfluss auf die Produktspezifität der Synthasen, verglichen mit der Expression des nativen Proteins in S. cerevisiae. Ebenso zeigte sich das Produktspektrum identisch zu den Daten, welche durch in vitro Umsetzungsversuche erreicht wurden. Durch Datenbankvergleiche und dem anschließenden Einsatz von Referenzverbindungen konnten die meisten Produkte von HaCS identifiziert werden. Die Benennung des Enzyms erfolgte nach einem der beiden eindeutig identifizierten Hauptpeaks (γ-Cadinen). Trotz ausgiebiger Datenbankrecherche und der Analyse verschiedener Referenzverbindungen konnte die Identität des zweiten Hauptpeaks nicht eindeutig geklärt werden. Das Massenspektrum dieser Verbindung lässt jedoch auf eine weitere Verbindung mit Cadinan-Grundgerüst und struktureller Ähnlichkeit zur zweiten Hauptkomponente schließen, so dass die Bezeichnung Cadinen-Synthase als richtig angesehen werden kann.

Sesquiterpensynthasen mit einem Multiproduktspektrum sind aus einigen Pflanzenfamilien bekannt. Als Extrembeispiele lassen sich die γ -Humulensynthase und δ -Selinensynthase aus *Abies grandies* anführen, die 52, beziehungsweise 34 Produkte synthetisieren (STEELE et al. 1998). Aus der Familie der Asteraceen war bisher mit der epi-Cedrol-Synthase aus *Artemisia annua* (MERCKE et al. 1999) nur eine einzige weitere Sesquiterpen-Synthase bekannt, die ebenfalls ein Multiproduktspektrum aufwies. Daneben waren aus der gesamten Familie der Asteraceen bisher nur sechs weitere Sesquiterpensynthasen bekannt, welche nicht als Germacren A-Synthasen charakterisiert wurden (MERCKE et al. 1999; SCHMIDT et al. 1999; WALLART et al. 2001; CAI et al. 2002; PROSSER et al. 2004). Mit den δ -Cadinen Synthasen aus *Gossypium hirsutum* und *G. arboreum* sind bisher überhaupt nur aus zwei Pflanzenarten Cadinen-Synthasen beschrieben worden (CHEN et al. 1995; DAVIS et al. 1996; MENG et al. 1999).

Die bisherige Fokussierung auf Germacren A-Synthasen ist auf das hohe Interesse an der Identifizierung von Enzymen der Sesquiterpenlacton-Biosynthese und der daraus resultierenden Substanzen mit hoher biologischer Aktivität zurückzuführen. Für die Pflanze selbst spielen diese Sesquiterpenlactone eine sehr wichtige Rolle in der direkten Abwehr von Fraßfeinden oder Pathogenen. Dagegen sind emittierte Sesquiterpene oft für die indirekte Abwehr von Herbivoren von Bedeutung, etwa durch die Anlockung von Hyperparasiten (RASMANN et al. 2005). Hierzu erscheint jedoch eine bedarfsangepasste Produktion und Freisetzung dieser Substanzen sinnvoll. Eine Induktion der Bildung der Transkripte von HaCS konnte bei der Sonnenblume jedoch nicht nachgewiesen werden. Die Ergebnisse zeigten, dass es sich um ein in Wurzeln, jungen Blättern, vor allem aber in Trichomen exprimiertes Enzym handelt. Der Nachweis von Transkripten in jungen Blättern ist mit Sicherheit auf die Expression von HaCS in Drüsenhaaren in biosynthetisch aktiven Stadien zurückzuführen. In alten Blättern konnte kein Transkript für HaCS mehr nachgewiesen werden, somit ist davon auszugehen, dass auch keine Bildung der Produkte dieser Synthase mehr stattfindet. Die Ergebnisse der entwicklungsabhängigen Transkriptanalyse in den Drüsenhaaren haben gezeigt, dass HaCS ähnlich wie die Germacren-Synthasen sehr stark in sekretorisch aktiven Stadien der Trichome exprimiert wird. Die Transkription und Aktivität einer solchen Synthase in glandulären Trichomen bei Asteraceen war bisher nicht bekannt. Die biologische Funktion dieser vorwiegend in den Trichomen gebildeten Verbindungen ist unklar. Es kann spekuliert werden, dass die freigesetzten Verbindungen als Schutz des sich noch in der Entwicklung befindenden Blattes gegenüber Herbivoren dienen. Wie gezeigt wurde, benötigt die Synthese und die vollständige Ausbildung der Cuticularblase einige Tage (GÖPFERT 2003). In dieser Zeit könnten die flüchtigen Sesquiterpenkohlenwasserstoffe eine erste Schutzfunktion gegenüber Fraßfeinden bilden und so die Zeit bis zum vollständig entwickelten Schutz durch die STL überbrücken.

Ob die vermutlich flüchtigen Produkte von HaCS tatsächlich aus den Trichomen der Sonnenblume freigesetzt werden, wurde bisher nicht untersucht. Als Trichominhaltsstoffe wurden diese Komponenten bei den auf die polaren STL ausgerichteten Extraktionen und Analysen an Sonnenblumen bislang nicht nachgewiesen. Allerdings zeigten SCHUH et al. (1997) das Vorkommen von β -Caryophyllen in Messungen der volatilen Emissionen von *H. annuus*. Neben einigen Monoterpenen wurde von SCHUH et al. (1997) als weiteres Sesquiterpen α -Humulen identifiziert, dessen Quantität deutlich geringer als die des β -Caryophyllens war. Eventuell handelt es sich bei einer der nicht identifizierten Nebenkomponenten im Produktspektrum von HaCS um diese Verbindung. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen den Schluss nahe, dass HaCS in Trichomen für die Bildung von Sesquiterpenen verantwortlich ist. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass ähnlich wie bei *Artemisia annua*, eine in fast allen Gewebetypen aktive Caryophyllen-Synthase auch in der Sonnenblume vorkommt und an der Produktion dieser Verbindung mit beteiligt ist.

In einer Untersuchung des Genoms von *Arabidopsis thaliana* wurden 40 Terpen-Synthase Gene entdeckt, von denen 32 potenziell aktiv sind (AUBORG et al. 2002). Es wird zunehmend deutlich, dass die Terpensynthasen in den meisten Pflanzenarten große Gen-Familien darstellen (KÖLLNER et al. 2004). Aufgrund dieser Daten und der nachgewiesenen Biosynthese von Sesqui- und Monoterpenen in der Sonnenblume kann ebenfalls davon ausgegangen werden, dass eine größere Anzahl von Terpensynthasen exprimiert wird. So ist es auch nicht unwahrscheinlich, dass außerhalb der Trichome noch weitere Sesquiterpensynthasen aktiv sind.

4.7 5-Deoxynevadensin in Drüsenhaaren der Sonnenblume

Die von den glandulären Trichomen in die Cuticularblase sekretierte und fluoreszierende Verbindung konnte erfolgreich isoliert und strukturell als 7-hydroxy-6,8,4'-trimethoxyflavon identifiziert werden. Flavonoide sind aus Trichomen von Asteraceen (SCHILLING 1983; BURNETT et al. 1974; MULLIN et al. 1991) und zahlreicher anderer Pflanzenfamilien (ASENCAO et al. 1997, 1999; BISIO et al. 1999; TATTINI et al 2000) beschrieben worden. Für die Gattung

Helianthus wurden Flavonoid-Aglycone nur in den sekretierten Substanzen der Trichome nachgewiesen (SCHILLING 1983; GAO et al. 1987; RIESEBERG et al. 1987; SCHILLING et al. 1987, BOHM & STUESSY 2001). 5-Deoxyflavone sind hauptsächlich aus Fabaceen bekannte Flavonoide (SCHIJLEN et al. 2004). Innerhalb der Asteraceen wurden sie nur sehr selten beschrieben (CHUMBALOV & FADEEVA 1969; AHMAD et al. 1995) und waren zuvor für den Tribus Heliantheae s.l. nicht bekannt.

Die Expressionsanalyse von Genen der Flavonoidbiosynthese zeigte die Expression von PAL schon in präsekretorischen Trichomstadien und zeitlich lang andauernd bis in den postsekretorischen Entwicklungsabschnitt. Neben der Flavonoidbiosynthese greifen auch Enzyme des Phenylpropanstoffwechsels und der Ligninbiosynthese auf das durch PAL synthetisierte Produkt zurück. Dagegen erschien die Biosynthese der nachgeschalteten CHS deutlich stärker reguliert. Mit dem Eintritt der Trichome in die sekretorische Phase kam es zu einer schwachen Transkription der CHS. Bis auf ein Stadium kurz vor dem Ende der sekretorisch aktiven Zeit war die Transkriptionsrate durchgehend gering. Der Einsatz weiterer Primerpaare und neu isolierter RNA erbrachte kein anderes Ergebnis. Mikroskopisch ist ein Auftreten der vom sekretierten 5-Deoxynevadensin stammenden blauen Fluoreszenz in den Trichomen schon vor dieser starken Transkriptionsaktivität nachweisbar, so dass die Aktivität der CHS auch vor diesem Stadium als sicher angenommen werden kann.

Die Menge an sekretiertem 5-Deoxynevadensin machte ein Prozent der gesamten sekretierten Substanz in der Cuticularblase aus. Über die biologische Funktion dieses Flavons kann nur spekuliert werden, allerdings sind Flavonoide bekannt für ihre herausragende antioxidative Wirkung (RICE-EVANS et al. 1996). Die Analyse der Trichominhaltsstoffe aus getrocknetem Herbarmaterial zeigte auch nach vielen Jahren noch keine Veränderung in der Zusammensetzung der Komponenten (SPRING et al. 1999). Dies könnte auf die Funktion des Schutzes vor Oxidation der sekretierten Verbindungen hinweisen. Eine weitere mögliche Funktion des Flavonoids könnte im Schutz vor UV-bedingten Veränderung der STL bestehen. Ein Vergleich der Absorptionsspektren von 5-Deoxynevadensin und der STL-Hauptkomponenten aus den Trichomen von HA300 zeigte besonders im kurzwelligen UV-Bereich eine große Übereinstimmung. Da Flavonoide aufgenommene Energie in Form von Fluoreszenz wieder abgeben können, könnte dies die STL vor einem Abbau schützen. Zusätzlich wurden O-methylierte Flavonoide, zu denen auch 5-Deoxynevadensin zählt, als Fraßschutzkomponenten in den glandulären Trichomen von *H. annuus* beschrieben (RIESEBERG et al. 1987).

4.8 Ausblick

Zwei wichtige Schritte der Biosynthese von Sesquiterpenlactonen konnten mit den Enzymen HaGAS1, HaGAS2 und CYP71AVS identifiziert werden. Als nächster Schritt im diesem Biosyntheseweg wird der Lacton-Ringschluss angenommen. Der Bildung dieses inneren Esters muss die Oxidation von C₆ des Germacren A-Carboxylsäuremolekül voraus gehen (alternativ die Oxidation von C₈ zur Bildung von 7,8-Lactonen). Die Katalyse dieses Schrittes geht mit hoher Wahrscheinlichkeit von einem weiteren Cytochrom P450-Enzym aus. Ob dasselbe Enzym auch den Ringschluss katalysiert, kann nicht vorausgesagt werden.

Nachdem nun die Biosynthese der Germacren A-Carboxylsäure aufgeklärt wurde, ist die Identifikation des Lactonring-bildenden Enzyms der verbleibende letzte Schritt, um den gesamten Biosyntheseweg vom Acetyl-CoA bis hin zum Costunolid, der Grundstruktur der meisten STL, beschreiben zu können.

Sesquiterpen-Grundgerüste werden allgemein durch Cytochrom P450-Enzyme modifiziert und funktionalisiert. So tragen auch die Sesquiterpenlactone der Sonnenblume Substituenten am Grundgerüst. Inzwischen sind Enzyme identifiziert worden, welche die Einführung von Hydroxylgruppen an Sesquiterpenen katalysieren. Versuche mit diesen aus Solanaceen isolierten Enzymen zeigten eine erstaunlich geringe Substratspezifität (RALSTON et al. 2001; TAKAHASI et al. 2005, 2007). Durch die Nutzung der verfügbaren Sequenzinformationen aus diesen Arbeiten könnten auch weitere Enzyme der Sesquiterpenlacton-Biosynthese identifiziert werden. Hierzu bietet sich die Nutzung der Trichome der Sonnenblume aus den Antherenanhängen geradezu an. Die Ergebnisse dieser Arbeit haben die Biosynthese der STL direkt in den Trichomen mit molekularbiologischen Methoden gezeigt. Genauso konnte die Nutzungsmöglichkeit zur Identifizierung bisher unbekannter Enzyme dargestellt werden. Dies zeigt das hohe Potenzial, das in der Nutzung der Trichome der Sonnenblume für die Isolation weiterer wichtiger Enzyme der Biosynthese der Sesquiterpenlactonen besteht.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnten durch Sequenzvergleiche mit bereits bekannten pflanzlichen Sesquiterpensynthasen drei in den Trichomen der Sonnenblume exprimierte Sesquiterpensynthasen identifiziert werden. Die Nuklein- und Aminosäuresequenzen wiesen für Terpensynthasen charakteristische Merkmale auf. Zur funktionellen Charakterisierung wurden alle identifizieren Terpensynthasen heterolog in *E. coli* exprimiert. Nach Aufreinigung und *in vitro* Umsetzungsreaktionen mit dem natürlichen Substrat Farnesylpyrophosphat wurden die Reaktionsprodukte durch GC-MS Messungen analysiert und die gebildeten Verbindungen anschließend anhand von Referenzproben bestimmt. Zwei der identifizierten Sesquiterpensynthasen (HaGAS1, HaGAS2) erwiesen sich als Germacren A-Synthasen und somit als die Schlüsselenzyme der Biosynthese der Sesquiterpenlactone der Sonnenblume. Die heterologe Expression der Germacren A-Synthasen *in vivo* in *S. cerevisiae* führte ebenfalls nur zur Bildung von Germacren A und war damit übereinstimmend mit den *in vitro* Daten.

Die funktionelle Charakterisierung der dritten Terpensynthase erwies ich aufgrund schwacher *in vitro* Aktivität als schwierig. Eine heterologe Expression *in vivo* in *S. cerevisiae* führte zu einer deutlichen Steigerung der erhaltenen Produktmengen. Doch erst die Expression als Thioredoxin-Fusionsprotein in Hefen ermöglichte die Bildung genügend hoher Produktmengen zur Identifizierung der gebildeten Verbindungen. Bei dieser Sesquiterpensynthase (HaCS) handelt es sich um ein Multiproduktenzym, welches als eine von zwei Hauptkomponenten γ -Cadinen bildet und als weitere Produkte α -Copaen, α -Muurolen und β -Caryophyllen produziert.

In einer *H. annuus* Trichom EST-Bank wurde ein Cytochrom P450-Enzym identifiziert, das eine hohe Sequenzähnlichkeit zu einem bereits charakterisierten Gen aus *Artemisia annua* aufwies, welches an der Bildung von Artemisinin-Säure beteiligt ist. Die heterologe Expression dieses Enzyms und eines weiteren Proteins mit hoher Sequenzähnlichkeit aus *Lactuca sativa* zusammen mit der Germacren A-Synthase HaGAS2 in *S. cerevisiae* führte zur Bildung von Germacren A-Carboxylsäure und damit zur Aufklärung eines bisher nicht auf enzymatischer Ebene identifizierten Biosyntheseschrittes der Sesquiterpenlactone. Bei den identifizierten Enzymen aus *H. annuus* beziehungsweise *L. sativa* handelt es sich um multifunktionelle Germacren A-Monooxygenasen, die drei aufeinanderfolgende oxidative Schritte der Bildung von Germacren A-Carboxylsäure aus Germacren A katalysieren.

Semiquantitative RT-PCR Experimente konnten die Expression aller drei identifizierten Sesquiterpensynthasen, sowie der Monooxygenase der Sonnenblume, direkt in den Trichomen zeigen. Die Expression der Gene fand nur während der biosynthetisch aktiven Phase der Trichome statt und konnte in dieser Feinheit zum ersten Mal überhaupt gezeigt

werden. Daneben wurden Transkripte der Sesquiterpensynthasen in trichomtragenden Blättern und im Wurzelbereich nachgewiesen. Neben Sesquiterpenlactonen wurden von den Drüsenhaaren auch Flavonoide gebildet, deren Biosynthese ebenfalls in den Trichomen angesiedelt ist. Mit 5-Deoxynevadensin konnte ein bisher unbekanntes und trichomspezifisches 5-deoxy-Flavon identifiziert werden.

Summary

Glandular trichomes from anther appendages of sunflower were collected and their RNA was isolated. Sequence comparison with known plant sesquiterpene synthases was used to identify sunflower synthases in RT-PCR reactions. Three enzymes, HaGAS1, HaGAS2 and HaCS with high similarities to already characterized sesquiterpene synthases were identified. Their nucleotide sequences were completely established on the genomic level and as RNA transcripts. The nucleotide sequences as well as the deduced amino acid sequences showed typical characteristics of terpene synthases.

In order to characterize the enzymes, the sesquiterpene synthase genes were cloned and expressed in *E. coli. In vitro* assays with the recombinant enzymes were carried out using the native substrate farnesyldiphosphate. The resulting products were extracted and analysed by GC-MS. They were identified by comparison of data base MS-data and using reference samples under identical analytical conditions. Two expressed enzymes, HaGAS1 and HaGAS2, synthesized germacrene A as a single product. Heterologous *in vivo* expression of both germacrene A-synthases in *S. cerevisiae* confirmed the *in vitro* result, since the analysis of the synthesized product showed a single germacrene A peak.

Due to a very low *in vitro* activity of HaCS, the products of the third synthase could not be directly determined by MS-analysis. Therefore, the enzyme was expressed as a thioredoxin-fusion protein *in vivo* in transgenic yeast. This attempt resulted in a much higher rate of product yield. Two main and at least six minor products were traced in GC-analysis. They were confirmed as sesquiterpene hydrocarbons by GC-MS analysis. One of the two main products was identified as γ -cadinene, whereas the second main peak could not be determined conclusively. Among the minor compounds α -copaene, α -muurolene und β -caryophyllene were identified.

Screening of a *H. annuus* EST library (established at the Berkeley Center for Synthetic Biology, University of California, Berkeley, USA) from mRNA of trichomes revealed the presence of a cytochrome P450 protein which showed high similarity to an *Artemisia annua* enzyme involved in artemisinic acid biosynthesis. This enzyme and another similar protein from *Lactuca sativa* were cloned and coexpressed with the germacrene A-synthase HaGAS2 in yeast. The resulting product was indirectly determined as germacrene A carboxylic acid using GC-MS analysis. These novel cytochrome P450 enzymes from sunflower and lettuce

can be characterized as multifunctional germacrene A-monooxygenases. They catalyse a three-step oxidation leading from germacrene A to germacrene A carboxylic acid. This oxidation process represents an essential step towards the biosynthesis of sesquiterpene lactones.

Semiquantitative RT-PCR analysis demonstrated that the expression of all three sesquiterpene synthases and the sunflower P450 monooxygenase occurred directly within trichome cells. The expression was highly upregulated during the secretory stage of the capitate glandular trichomes. This developmentally regulated expression was shown for the first time in trichomes. Additionally to sesquiterpene synthase activity in trichomes of anthers and leaves, it also was detected in sunflower roots.

In addition, 5-deoxynevadensin was identified as a new constituent of the glandular trichomes of sunflower. This 5-deoxy-flavone is responsible for the bright blue fluorescence of sunflower trichomes detected by fluorescence microscopy. The newly identified component may act as protectant for the STL against UV-degradation.

6 Literatur

- Adam, K.P., Thiel, R. & Zapp, J. (1999) Incorporation of 1-[1-¹³C]deoxy-D-xylulose in Chamomile Sesquiterpenes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **369** (1), 127-132.
- Ahmad, V.U., Khan, M.A., Baqai, F.T. & Tareen, R.B. (1995) Santoflavone, a 5-deoxyflavonoid from Achillea santolina. Phytochemistry, **38** (5), 1305-1307.
- Ahmad, I. & Beg, A.Z. (2001) Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. *Journal of Ethnopharmacology*, 74 (2), 113-123.
- Aljancic, I., Vajs, V., Menkovic, N., Karadzic, I., Juranic, N., Milosavljevic, S. & Macura, S. (1999) Flavones and sesquiterpene lactones from *Achillea atrata* subsp. *multifida*: Antimicrobial activity. *Journal of Natural Products*, **62** (6), 909-911.
- Alonso, W.R., Rajaonarivony, J.I.M., Gershenzon, J. & Croteau, R. (1992) Purification of 4Slimonene synthase, a monoterpene cyclase from the glandular trichomes of peppermint (*Mentha x piperita*) and spearmint (*Mentha spicata*). *Journal of Biological Chemistry*, **267** (11), 7582-7587.
- Arimura, G.I., Ozawa, R., Nishioka, T., Boland, W., Koch, T., Kühnemann, F. & Takabayashi, J. (2002) Herbivore-induced volatiles induce the emission of ethylene in neighbouring lima bean plants. *Plant Journal*, **29** (1), 87-98.
- Arimura, G.I., Kost, C. & Boland, W. (2005) Herbivore-induced, indirect plant defences. *Biochimica* et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids, **1734** (2), 91-111.
- Arora, R. & Bhojwani, S.S. (1989) In vitro propagation and low temperature storage of *Saussurea lappa* C.B. Clarke An endangered, medicinal plant. *Plant Cell Reports*, 8 (1), 44-47.
- Ascensao, L., Mota, L. & Castro, M.D.M. (1997) Peltate Glandular Trichomes of Leonotis leonurus Leaves: Ultrastructure and Histochemical Characterization of Secretions. International Journal of Plant Sciences, 158, 249-258.
- Ascensao, L. & Pais, M.S. (1998) The leaf capitate trichomes of *Leonotis leonurus*: Histochemistry, ultrastructure and secretion. *Annals of Botany*, **81** (2), 263-271.
- Ascensao, L., Mota, L. & Castro, M.D.M. (1999) Glandular trichomes on the leaves and flowers of *Plectranthus ornatus*: Morphology, distribution and histochemistry. *Annals of Botany*, 84 (4), 437-447.
- Aubourg, S., Lecharny, A. & Bohlmann, J. (2002) Genomic analysis of the terpenoid synthase (AtTPS) gene family of Arabidopsis thaliana. Molecular Genetics and Genomics, 267 (6), 730-745.
- Back, K. & Chappell, J. (1995) Cloning and Bacterial Expression of a Sesquiterpene Cyclase from Hyoscyamus muticus and Its Molecular Comparison to Related Terpene Cyclases. The Journal of Biological Chemistry, 13, 7375-7381.
- Baird, J.K. (2005) Effectiveness of antimalarial drugs. New England Journal of Medicine, 352 (15).
- Bath, S.V., Nagasampagi, B.A. & Sivakumar, M. (2005) Chemistry of Natural Products. Springer, Heidelberg.
- Bennett, M.H., Mansfield, J.W., Lewis, M.J. & Beale, M.H. (2002) Cloning and expression of sesquiterpene synthase genes from lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Phytochemistry*, **60** (3), 255-261.

- Bertea, C.M., Voster, A., Verstappen, F.W.A., Maffei, M., Beekwilder, J. & Bouwmeester, H.J. (2006) Isoprenoid biosynthesis in *Artemisia annua*: Cloning and heterologous expression of a germacrene A synthase from a glandular trichome cDNA library. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **448** (1-2), 3-12.
- Binet, M.-N., Steinmetz, A. & Tessier, L.-H. (1989) The primary structure of sunflower (*Helianthus annuus*) ubiquitin. *Nucleic Acids Research*, **17** (5), 2119.
- Bisio, A., Corallo, A., Gastaldo, P., Romussi, G., Ciarollo, G., Fontana, N., De Tommasi, N. & Profumo, P. (1999) Glandular Hairs and Secreted Material in Salvia blepharophylla Brandegge ex Epling Grown in Italy. Annals of Botany, 83, 441-452.
- Bohlmann, J., Croteau, R. & Meyer-Gauen, G. (1998) Plant terpenoid synthases: Molecular biology and phylogenetic analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95** (8), 4126-4133.
- Bohm, B.A. & Stuessy, T.F. (2001) Flavonoids of the Sunflower Family (Asteraceae). Springer, Wien.
- Bouvier, F., Suire, C., d'Harlingue, A., Backhaus, R.A., Camara, B. (2000) Molecular cloning of geranyl diphosphate synthase and compartimentation of monoterpene synthesis in plant cells. The Plant Journal, **24** (2), 241-252
- Bouwmeester, H.J., Kodde, J., Verstappen, F.W.A., Altug, I.G., De Kraker, J.W. & Wallaart, T.E. (2002) Isolation and characterization of two germacrene A synthase cDNA clones from chicory. *Plant Physiology*, **129** (1), 134-144.
- Bradford, M.M. (1976) A Rapid and Sesitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Bindung. *Analytical Biochemistry*, **71**, 248-254
- Breitmaier, E. (2005) Terpene. Wiley-VCH, Heidelberg.
- Buckingham, J. (1998) Dictionary of natural products. Chapman & Hall, London.
- Burnett, W.C., Jones, S.B., Mabry, T.J. & Padolina, W.G. (1974) Sesquiterpene Lactones Insect Feeding Deterrents in Veronia. Biochemical Systematics and Ecology, 2, 25-29.
- Buschmann, H. & Spring, O. (1993) Impact of interspecific hybridization on sesquiterpene lactone patterns of *Helianthus* species. *Planta Medica*, **59** (7 Suppl.).
- Bushman, B.S., Scholte, A.A., Cornish, K., Scott, D.J., Brichta, J.L., Vederas, J.C., Ochoa, O., Michelmore, R.W., Shintani, D.K. & Knapp, S.J. (2006) Identification and comparison of natural rubber from two *Lactuca* species. *Phytochemistry*, 67 (23), 2590-2596.
- Cabrera Walsh, G. (2003) Host range and reproductive traits of *Diabrotica speciosa* (Germar) and *Diabrotica viridula* (F.) (Coleoptera: Chrysomelidae), two species of South American pest rootworms, with notes on other species of Diabroticina. *Environmental Entomology*, **32** (2), 276-285.
- Cai, Y., Jia, J.W., Crock, J., Lin, Z.X., Chen, X.Y. & Croteau, R. (2002) A cDNA clone for betacaryophyllene synthase from *Artemisia annua*. *Phytochemistry*, **61** (5), 523-529.
- Cane, D.E. (1990) Enzymatic formation of sesquiterpenes. Chemical Reviews, 90 (7), 1089-1103.
- Cane, D.E. & Xue, Q. (1996) Trichodiene synthase. Enzymatic formation of multiple sesquiterpenes by alteration of the cyclase active site. *Journal of the American Chemical Society*, **118** (6), 1563-1564.
- Cane, D.E. (1999) Sesquiterpene biosynthesis: cyclization mechanisms. In *Comprehensive Natural Products Chemistry* (D.E. Cane, Editor). Elsevier, Amsterdam.

- Cantrell, C.L., Abate, L., Fronczek, F.R., Franzblau, S.G., Quijano, L. & Fischer, N.H. (1999) Antimycobacterial eudesmanolides from *Inula helenium* and *Rudbeckia subtomentosa*. *Planta Medica*, **65** (4), 351-355.
- Chang, M.C.Y., Eachus, R.A., Trieu, W., Ro, D.K. & Keasling, J.D. (2007) Engineering Escherichia coli for production of functionalized terpenoids using plant P450s. Nature Chemical Biology, 3 (5), 274-277.
- **Chappell, J.** (1995) Biochemistry and molecular biology of the isoprenoid biosynthetic pathway in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **46**, 521-547.
- Chen, X.Y., Chen, Y., Heinstein, P. & Davisson, V.J. (1995) Cloning, expression and characterization of (+)-delta-cadinene synthase: A catalyst for cotton phytoalexin biosynthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **324** (2), 255-266.
- Chen, X.Y., Wang, M., Chen, Y., Davisson, V.J. & Heinstein, P. (1996) Cloning and heterologous expression of a second (+)-δ-cadinene synthase from *Gossypium arboreum*. *Journal of Natural Products*, **59** (10), 944-951.
- Chen, F., Tholl, D., D'Auria, J.C., Farooq, A., Pichersky, E. & Gershenzon, J. (2003) Biosynthesis and emission of terpenoid volatiles from *Arabidopsis* flowers. *Plant Cell*, **15** (2), 481-494.
- Chou, J.C. & Mullin, C.A. (1993) Distribution and antifeedant associations of sesquiterpene lactones in cultivated sunflower (*Helianthus annuus* L.) on western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte). Journal of Chemical Ecology, **19** (7), 1439-1452.
- Christianson, D.W. (2007) Roots of biosynthetic diversity. Science, 316 (5821), 60-61.
- Chumbalov, T.K. & Fadeeva, O.V. (1969) Flavonoids of Artemisia transiliensis. Khimiya Prirodnykg Soedinenii, 5 (5), 439.
- Connolly, J.D. & Hill, R.A. (1991) Dictionary of terpenoids. Chapmann & Hall, London.
- Covello, P.S., Teoh, K.H., Polichuk, D.R., Reed, D.W. & Nowak, G. (2007) Functional genomics and the biosynthesis of artemisinin. *Phytochemistry*, **68** (14), 1864-1871.
- **Crock, J., Wildung, M. & Croteau, R.** (1997) Isolation and bacterial expression of a sesquiterpene synthase cDNA clone from peppermint (*Mentha x piperita*, L.) that produces the aphid alarm pheromone (*E*)-β-farnesene. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, **94**, 12833-12383.
- Da Costa, F.B., Terfloth, L. & Gasteiger, J. (2005) Sesquiterpene lactone-based classification of three Asteraceae tribes: A study based on self-organizing neural networks applied to chemosystematics. *Phytochemistry*, 66 (3), 345-353.
- Davis, E.M., Tsuji, J., Davis, G.D., Pierce, M.L. & Essenberg, M. (1996) Purification of (+)-deltacadinene synthase, a sesquiterpene cyclase from bacteria-inoculated cotton foliar tissue. *Phytochemistry*, **41** (4), 1047-1055.
- Davis, E.M. & Croteau, R. (2000) Cyclization Enzymes in the Biosynthesis of Monoterpenes, Sesquiterpenes, and Diterpenes. In *Topics in Current Chemistry*, Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 54-95 Seiten.
- De Kraker, J.W., Franssen, M.C.R., De Groot, A., König, W.A. & Bouwmeester, H.J. (1998) (+)-Germacrene A biosynthesis - The committed step in the biosynthesis of bitter sesquiterpene lactones in chicory. *Plant Physiology*, **117** (4), 1381-1392.
- De Kraker, J.W., Franssen, M.C.R., Dalm, M.C.F., De Groot, A. & Bouwmeester, H.J. (2001a) Biosynthesis of germacrene a carboxylic acid in chicory roots. Demonstration of a cytochrome p450 (+)-germacrene a hydroxylase and NADP⁺-dependent sesquiterpenoid dehydrogenase(s) involved in sesquiterpene lactone biosynthesis. *Plant Physiology*, **125** (4), 1930-1940.

- De Kraker, J.W., Franssen, M.C.R., De Groot, A., Shibata, T. & Bouwmeester, H.J. (2001b) Germacrenes from fresh costus roots. *Phytochemistry*, **58** (3), 481-487.
- De Kraker, J.W., Franssen, M.C.R., Joerink, M., De Groot, A. & Bouwmeester, H.J. (2002) Biosynthesis of costunolide, dihydrocostunolide, and leucodin. Demonstration of cytochrome P450-catalyzed formation of the lactone ring present in sesquiterpene lactones of chicory. *Plant Physiology*, **129** (1), 257-268.
- **Deavours, B.E. & Dixon, R.A.** (2005) Metabolic engineering of isoflavonoid biosynthesis in alfalfa. *Plant Physiology*, **138** (4), 2245-2259.
- Dehal, S.S. & Croteau, R. (1988) Partial purification and characterization of two sesquiterpene cyclases from sage (*Salvia officinalis*) which catalyze the respective conversion of farnesyl pyrophosphate to humulene and caryophyllene. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 261 (2), 346-356.
- Dey, P.M. & Harborne, J.B. (1991) Terpenoids. Academic Press, London.
- Dudareva, N., Andersson, S., Orlova, I., Gatto, N., Reichelt, M., Rhodes, D., Boland, W. & Gershenzon, J. (2005) The nonmevalonate pathway supports both monoterpene and sesquiterpene formation in snapdragon flowers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102** (3), 933-938.
- Duke, S.O. & Paul, R.N. (1993) Development and fine structure of the glandular trichomes of Artemisia annua L.. International Journal of Plant Sciences, 142 (1), 107-108
- Duke, S.O., Canel, C., Rimando, A.M., Tellez, M.R., Duke, M.V. & Paul, R.N. (2000) Current Potential Exploitation of Plant Glandular Trichome Productivity. In *Plant Trichomes* (Editoren: D.L. Hallahan und J.C. Gray). Academic Press, San Diego.
- Edwards, J.B.D.M., Delort, J. & Mallet, J. (1991) Oligodeoxyribonucleotide ligation to singlestranded cDNAs: A new tool for cloning 5' ends of mRNAs and for constructing cDNA libraries by in vitro amplification. *Nucleic Acids Research*, **19** (19), 5227-5232.
- **Eisenreich, W., Rohdich, F. & Bacher, A.** (2001) Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids. *Trends in Plant Science*, **6** (2), 78-84.
- Eisenreich, W., Bacher, A., Arigoni, D. & Rohdich, F. (2004) Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **61** (12), 1401-1426.
- Engelberth, J., Alborn, H.T., Schmelz, E.A. & Tumlinson, J.H. (2004) Airborne signals prime plants against insect herbivore attack. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101** (6), 1781-1785.
- Faraldos, J.A., Wu, S., Chappell, J. & Coates, R.M. (2007) Conformational analysis of (+)germacrene A by variable temperature NMR and NOE spectroscopy. *Tetrahedron*, **63**, 7733-7742.
- Ferreira, J.F. & Janick, J. (1995) Floral morphology of *Artemisia annua* with special reference to trichomes. *International Journal of Plant Sciences*, **156** (6), 807-815.
- Fischer, N.H. (1990) Sesquiterpene lactones: Biogenesis and biomimetiv transformations. In *Biochemistry of the Mevalonic Acid Pathway to Terpenoids* (Editoren: G. Towers und H. Towers), New York: Plenum Press, pp 161-201.
- Fischer, N.H., Lu, T., Cantrell, C.L., Castaneda-Acosta, J., Quijano, L. & Franzblau, S.G. (1998) Antimycobacterial evaluation of germacranolides. *Phytochemistry*, **49** (2), 559-564.
- Fuchs, A., Slobbe, W., Mol, M.C. & Posthumus, M.A. (1983) GC/MS analysis of fungitoxic terpenoids from tobacco. *Phytochemistry*, **22**, 1197-1199.

- Gabrielsen, M., Kaiser, J., Rohdich, F., Eisenreich, W., Laupitz, R., Bacher, A., Bond, C.S. & Hunter, W.N. (2006) The crystal structure of a plant 2C-methyl-D-erythritol 4-phosphate cytidylyltransferase exhibits a distinct quaternary structure compared to bacterial homologues and a possible role in feedback regulation for cytidine monophosphate. *FEBS Journal*, **273** (5), 1065-1073.
- Gao, F., Wang, H. & Mabry, T.J. (1987) Sesquiterpene Lactones and Flavonoids from *Helianthus* Species. *Journal of Natural Products*, **50** (1), 23-29.
- Garcia-Pineres, A.J., Castro, V., Mora, G., Schmidt, T.J., Strunck, E., Pahl, H.L. & Merfort, I. (2001) Cysteine 38 in p65/NF-κB Plays a Crucial Role in DNA Binding Inhibition by Sesquiterpene Lactones. *Journal of Biological Chemistry*, **276** (43), 39713-39720.
- **Geissman, T.A.** (1973) The biogenesis of sesquiterpene lactones of the compositae. In Rencent Advances in Phytochemistry (Editoren: V.C. Runeckles und T. Marby). Academic Press, New York.
- Gershenzon, J., Duffy, M.A., Karp, F. & Croteau, R. (1987) Mechanized Techniques for the Selective Extraction of Enzymes from Plant Epidermal Glands. *Analytical Biochemistry*, 163, 159-164.
- Gershenzon, J., McCaskill, D., Rajaonarivony, J.I.M., Mihaliak, C., Karp, F. & Croteau, R. (1992) Isolation of Secretory Cells from Plant Glandular Trichome and Their Use in Biosynthetic Studies of Monoterpenes and Other Gland Products. *Analytical Biochemistry*, **200**, (130-138).
- Gershenzon, J., McConkey, M.E. & Croteau, R.B. (2000) Regulation of monoterpene accumulation in leaves of peppermint. *Plant Physiology*, **122** (1), 205-213.
- Gershenzon, J. (2007) Plant volatiles carry both public and private messages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104** (13), 5257-5258.
- Gietz, R.D. & Woods, R.A. (2002) Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods in Enzymology*, **350**, 87-96.
- **Göpfert, J.** (2003) Entwicklungsabhängige Naturstoffbildung und Proteinexpression in den Drüsenhaaren der Sonnenblume. Diplomarbeit, Universität Hohenheim, Stuttgart.
- Gören, N., Woerdenbag, H.J. & Bozok-Johansson, C. (1996) Cytotoxic and antibacterial activities of sesquiterpene lactones isolated from *Tanacetum praeteritum* subsp. *praeteritum*. *Planta Medica*, 62 (5), 419-422.
- Guides, M.E.M., Kuc, J., Hammerschmidt, R. & Bostock, R. (1982) Accumulation of six sesquiterpenoid phytoalexins in tobacco leaves infiltrated with *Pseudomonas lachrymans*. *Phytochemistry*, **21**, 2987-2988.
- Hallahan, D.L., Lau, S.M., Harder, P.A., Smiley, D.W.M., Dawson, G.W., Pickett, J.A., Christoffersen, R.E. & O'Keefe, D.P. (1994) Cytochrome P-450-catalysed monoterpenoid oxidation in catmint (*Nepeta racemosa*) and avocado (*Persea americana*); evidence for related enzymes with different activities. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1201 (1), 94-100.
- Hausen, B.M., Schulz, K.H. & Jarchow, O. (1975) A first allergenic sesquiterpene lactone from *Chrysanthemum indicum* L. arteglasin A. *Naturwissenschaften*, **62** (12), 585-586.
- Hausen, B.M. & Spring, O. (1989) Sunflower allergy. On the constituents of the trichomes of Helianthus annuus L. (Compositae). Contact Dermatitis, 20 (5), 326-334.
- Hehner, S.P., Heinrich, M., Bork, P.M., Vogt, M., Ratter, F., Lehmann, V., Schulze-Osthoff, K., Dröge, W. & Schmitz, M.L. (1998) Sesquiterpene lactones specifically inhibit activation of NF-κB by preventing the degradation of IκB-α and IκB-β. *Journal of Biological Chemistry*, 273 (3), 1288-1297.

- Hehner, S.P., Hofmann, T.G., Dröge, W. & Schmitz, M.L. (1999) The antiinflammatory sesquiterpene lactone parthenolide inhibits NF-κb by targeting the IκB kinase complex. *Journal of Immunology*, **163** (10), 5617-5623.
- Heil, N. & Spring, O. (1999) Sesquiterpenlakton-Bildung im Verlauf der Drüsenhaarentwicklung bei Sonnenblumen. Sektionstagung der Sektion pflanzliche Naturstoffe der Deutschen Botanischen Gesellschaft, Bonn.
- Heinrich, G., Pfeifhofer, H.W., Stabentheiner, E. & Sawidis, T. (2002) Glandular Hairs of Sigesbeckia jorullensis Knuth (Asteraceae): Morphology, Histochemistry and Composition of Essential Oil. Annals of Botany, 89, 459-469.
- Heldt, H.W. (2003) Pflanzenbiochemie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Helliwell, C.A., Poole, A., Peacock, W.J. & Dennis, E.S. (1999) *Arabidopsis* ent-kaurene oxidase catalyzes three steps of gibberellin biosynthesis. *Plant Physiology*, **119** (2), 507-510.
- Helliwell, C.A., Chandler, P.M., Poole, A., Dennis, E.S. & Peacock, W.J. (2001) The CYP88A cytochrome P450, ent-kaurenoic acid oxidase, catalyzes three steps of the gibberellin biosynthesis pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98** (4), 2065-2070.
- Hoelscher, D.J., Williams, D.C., Wildung, M.R. & Croteau, R. (2003) A cDNA clone for 3-carene synthase from *Salvia stenophylla*. *Phytochemistry*, **62** (7), 1081-1086.
- Houghton, P.J. (1988) The biological activity of valerian and related plants. *Journal of Ethnopharmacology*, **22** (2), 121-142.
- Huang, J., Cardoza, Y.J., Schmelz, E.A., Raina, R., Engelberth, J. & Tumlinson, J.H. (2003) Differential volatile emissions and salicylic acid levels from tobacco plants in response to different strains of *Pseudomonas syringae*. *Planta*, **217** (5), 767-775.
- Huelin, F.E. & Murray, K.E. (1966) Alpha-farnesene in the natural coating of apples. *Nature*, **210** (42), 1260-1261.
- Hyatt, D.C., Youn, B., Zhao, Y., Santhamma, B., Coates, R.M., Croteau, R.B. & Kang, C. (2007) Structure of limonene synthase, a simple model for terpenoid cyclase catalysis. *Proceedings* of the National Academy of Sciences of the United States of America, **104** (13), 5360-5365.
- **lijima, Y., Gang, D.R., Fridman, E., Lewinsohn, E. & Pichersky, E.** (2004) Characterization of Geraniol Synthase from the Peltate Glands of Sweet Basil. *Plant Physiology*, **134** (1), 370-379.
- Kant, M.R., Ament, K., Sabelis, M.W., Haring, M.A. & Schuurink, R.C. (2004) Differential timing of spider mite-induced direct and indirect defenses in tomato plants. *Plant Physiology*, **135** (1), 483-495.
- Kappers, I.F., Aharoni, A., Van Herpen, T.W.J.M., Luckerhoff, L.L.P., Dicke, M. & Bouwmeester, H.J. (2005) Plant science: Genetic engineering of terpenoid metabolism attracts bodyguards to *Arabidopsis*. *Science*, **309** (5743), 2070-2072.
- Karp, F., Mihaliak, C.A., Harris, J.L. & Croteau, R. (1990) Monoterpene biosynthesis: Specificity of the hydroxylations of (-)-limonene by enzyme preparations from peppermint (*Mentha piperita*), spearmint (*Mentha spicata*), and perilla (*Perilla frutescens*) leaves. Archives of Biochemistry and Biophysics, 276 (1), 219-226.
- Keeling, C.I. & Bohlmann, J. (2006) Genes, enzymes and chemicals of terpenoid diversity in the constitutive and induced defence of conifers against insects and pathogens. *New Phytologist*, 170 (4), 657-675.
- Kekulé, A. (1863) Lehrbuch der organischen Chemie. Verlag von Ferdinand Enke, Erlangen.

- Kelsey, R.G., Reynolds, G.W. & Rodriguez, E. (1984) The Chemistry of Biologically Active Constituents Secreted and Stored in Plant Glandular Trichomes. In Biology and Chemistry of Plant Trichomes (E. Rodriguez, P.L. Healey, and I. Mehta, eds), New York: Plenum Press, pp 187-240.
- Kessler, A. & Baldwin, I.T. (2001) Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. Science, 291 (5511), 2141-2144.
- Kim, M.Y., Chang, Y.J., Bang, M.H., Baek, N.I., Jin, J., Lee, C.H. & Kim, S.U. (2005) cDNA isolation and characterization of (+)-germacrene A synthase from *Ixeris dentata* form. *albiflora* Hara. *Journal of Plant Biology*, 48 (2), 178-186.
- Klaas, C.A., Wagner, G., Laufer, S., Sosa, S., Della Loggia, R., Bomme, U., Pahl, H.L. & Merfort,
 I. (2002) Studies on the anti-inflammatory activity of phytopharmaceuticals prepared from *Arnica* flowers. *Planta Medica*, 68 (5), 385-391.
- Klayman, D.L. (1985) Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China. *Science*, **228**, 1049-1055.
- Knight, D.W. (1995) Feverfew: Chemistry and biological activity. *Natural Product Reports*, **12** (3), 271-276.
- Köllner, T.G., Schnee, C., Gershenzon, J. & Degenhardt, J. (2004) The sesquiterpene hydrocarbons of maize (*Zea mays*) form five groups with distinct developmental and organ-specific distributions. *Phytochemistry*, **65** (13), 1895-1902.
- Konstantinopoulou, M., Karioti, A., Skaltsas, S. & Skaltsa, H. (2003) Sesquiterpene lactones from *Anthemis altissima* and their anti-*Helicobacter pylori* activity. *Journal of Natural Products*, **66** (5), 699-702.
- Kupchan, S.M., Eakin, M.A. & Thomas, A.M. (1971) Tumor Inhibitors. 69. Structure–Cytotoxicity Relationship among the Sesquiterpene Lactones. *Journal of Medicinal Chemistry*, **14** (12), 1147-1152
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 (259), 680-685.
- Langenheim, J.H. (1994) Higher Plant Terpenoids: a Phytocentric Overview of Their Ecological Roles. *Journal of Chemical Ecology*, **20** (6), 1223-1280.
- Laule, O., Fürholz, A., Chang, H.S., Zhu, T., Wang, X., Heifetz, P.B., Gruissem, W. & Lange, B.M. (2003) Crosstalk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100** (11), 6866-6871.
- Lee, K.H., Hall, I.H. & Mar, E.C. (1977) Sesquiterpene antitumor agents: inhibitors of cellular metabolism. *Science*, **196** (4289), 533-536.
- Letchamo, W., Ward, W., Heard, B. & Heard, D. (2004) Essential oil of Valeriana officinalis L. cultivars and their antimicrobial activity as influenced by harvesting time under commercial organic cultivation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52** (12), 3915-3919.
- Lichtenthaler, H.K., Rohmer, M. & Schwender, J. (1997) Two independent biochemical pathways for isopentenyl diphosphat and isoprenoid biosynthesis in higher plants. *Physiologia Plantarum*, **101**, 643-652.
- Lindahl, A.L., Olsson, M.E., Mercke, P., Tollbom, O., Schelin, J., Brodelius, M. & Brodelius, P.E. (2006) Production of the artemisinin precursor amorpha-4,11-diene by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters*, **28** (8), 571-580.

- Lommen, W.J.M., Schenk, E., Bouwmeester, H.J. & Verstappen, F.W.A. (2006) Trichome Dynamics and Artemisinin Accumulation during Development and Senescence of *Artemisia annua* Leaves. *Planta Medica*, **72**, 336-345.
- Lovell, C.R. & Rowan, M. (1991) Dandelion dermatitis. Contact Dermatitis, 25 (3), 185-188.
- Lupien, S., Karp, F., Wildung, M. & Croteau, R. (1999) Regiospecific cytochrome P450 limonene hydroxylases from mint (*Mentha*) species: cDNA isolation, characterization, and functional expression of (-)- 4S-limonene-3-hydroxylase and (-)-4S-limonene-6-hydroxylase. Archives of Biochemistry and Biophysics, 368 (1), 181-192.
- Lynen, F., Eggerer, H., Henning, U. & Kessel, I. (1958) Farnesyl-pyrophosphat und 3-Methyl-Δ³butenyl-1-pyrophosphat, die biologischen Vorstufen des Squalens. *Angewandte Chemie*, **70** (24), 738-741.
- Lynen, F. & Henning, U. (1960) Über den biologischen Weg zum Naturkautschuk. Angewandte Chemie, 72 (22), 820-829.
- Lyss, G., Schmidt, T.J., Merfort, I. & Pahl, H.L. (1997) Helenalin, an anti-inflammatory sesquiterpene lactone from *Arnica*, selectively inhibits transcription factor NF-κB. *Biological Chemistry*, **378** (9), 951-961.
- Matich, A.J., Rowan, D.D. & Banks, N.H. (1996) Solid Phase Microextraction for Quantitative Headspace Sampling of Apple Volatiles. *Analytical Chemistry*, **68** (23), 4114-4118.
- Macias, F.A., Torres, A., Molinillo, J.M.G., Varela, R.M. & Castellano, D. (1996) Potential allelopathic sesquiterpene lactones from sunflower leaves. *Phytochemistry*, **43** (6), 1205-1215.
- Macias, F.A., Torres, A., Galindo, J.L.G., Varela, R.M., Alvarez, J.A. & Molinillo, J.M.G. (2002) Bioactive terpenoids from sunflower leaves cv. Peredovick. *Phytochemistry*, **61** (6), 687-692.
- Macias, F.A., Fernandez, A., Varela, R.M., Molinillo, J.M.G., Torres, A. & Alves, P.L.C.A. (2006) Sesquiterpene lactones as allelochemicals. *Journal of Natural Products*, **69** (5), 795-800.
- Matsui, K., Wilkinson, J., Hiatt, B., Knauf, V. & Kajiwara, T. (1999) Molecular cloning and expression of *Arabidopsis* fatty acid hydroperoxide lyase. *Plant and Cell Physiology*, **40** (5), 477-481.
- Mau, C.J.D. & Croteau, R. (2006) Cytochrome P450 oxygenases of monoterpene metabolism. Phytochemistry Reviews, 5 (2-3), 373-383.
- Mazeyrat, F., Salles, S., Drevet, J., Roeckel-Drevet, P., Tourvieille, D. & Ledoigt, G. (1998) Isolation of a complete PAL cDNA from sunflower (Accession No. Y12461). *Plant Physiology*, 117, 719
- McCaskill, D. & Croteau, R. (1995) Monoterpene and sesquiterpene biosynthesis in glandular trichomes of peppermint (*Mentha x piperita*) rely exclusively on plastid-derived isopentenyl diphosphate. *Planta*, **197** (1), 49-56.
- McConkey, M.E., Gershenzon, J. & Croteau, R. (2000) Developemental Regulation of Monoterpene Biosynthesis in the Glandular Trichomes of Peppermint. Plant Physiology, **122**, 215-223.
- McGarvey, D.J. & Croteau, R. (1995) Terpenoid Metabolism. The Plant Cell, 7, 1015-1026.
- Meehan, T.D. & Coscia, C.J. (1973) Hydroxylation of geraniol and nerol by a monooxygenase from Vinca rosea. Biochemical and Biophysical Research Communications, **53** (4), 1043-1048.
- Meng, Y.L., Jia, J.W., Liu, C.J., Liang, W.Q., Heinstein, P. & Chen, X.Y. (1999) Coordinated accumulation of (+)-δ-cadinene synthase mRNAs and gossypol in developing seeds of *Gossypium hirsutum* and a new member of the cad1 family from *G. arboreum*. *Journal of Natural Products*, 62 (2), 248-252.

- Mercke, P., Crock, J., Croteau, R. & Brodelius, P.E. (1999) Cloning, expression, and characterization of epi-cedrol synthase, a sesquiterpene cyclase from *Artemisia annua* L. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **369** (2), 213-222.
- Miallau, L., Alphey, M.S., Kemp, L.E., Leonard, G.A., McSweeney, S.M., Hecht, S., Bacher, A., Eisenreich, W., Rohdich, F. & Hunter, W.N. (2003) Biosynthesis of isoprenoids: Crystal structure of 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100** (16), 9173-9178.
- Miyake, H., Monia, B.P. & Gleave, M.E. (2000) Inhibition of progression to androgen-independence by combined adjuvant treatment with antisense Bcl-XL and antisense Bcl-2 oligonucleotides plus taxol after castration in the Shionogi tumor model. *International Journal of Cancer*, **86** (6), 855-862.
- Mori, K. & Matsushima, Y. (1995) Synthesis of mono- and sesquiterpenoids; XXIV: (-)-Homogynolide A, an insect antifeedant isolated from *Homogyne alpina*. *Synthesis* (7), 845-850.
- Mullin, C.A., Alfatafta, A.A., Harman, J.L., Everett, S.L. & Serino, A.A. (1991) Feeding and toxic effects of floral sesquiterpene lactones, diterpenes, and phenolics from sunflower (*Helianthus annuus* L.) on western corn rootworm. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **39** (12), 2293-2299.
- Nelson, D.R. (2006) Plant cytochrome P450s from moss to poplar. *Phytochemical Reviews*, **5**, 193-204.
- Nugroho, L.H., Peltenburg-Looman, A.M.G., Verberne, M.C. & Verpoorte, R. (2002) Is accumulation of sesquiterpenoid phytoalexins induced in tobacco plants constitutively producing salicylic acid? *Plant Science*, **162** (6), 989-993.
- Nuhn, P. (2006) Naturstoffchemie. S. Hirzel-Verlag, Stuttgart.
- Ormeno, E., Fernandez, C. & Mevy, J.P. (2007) Plant coexistence alters terpene emission and content of Mediterranean species. *Phytochemistry*, **68** (6), 840-852.
- Payne, W. (1978) A Glossary of Plant Hair Terminology. Brittonia, 30 (2), 239-255.
- Pichersky, E., Lewinsohn, E. & Croteau, R. (1995) Purification and characterization of S-linalool synthase, an enzyme involved in the production of floral scent in *Clarkia breweri*. Archives of Biochemistry and Biophysics, **316** (2), 803-807.
- Pichersky, E. & Gershenzon, J. (2002) The formation and function of plant volatiles: Perfumes for pollinator attraction and defense. *Current Opinion in Plant Biology*, **5** (3), 237-243.
- Picman, A.K. (1986) Biological activities of sesquiterpene lactones. *Biochemical Systematics and Ecology*, **14**, 255-281.
- Piel, J., Donath, J., Bandemer, K. & Boland, W. (1998) Mevalonate-independent biosynthesis of terpenoid volatiles in plants: Induced and constitutive emission of volatiles. *Angewandte Chemie - International Edition*, **37** (18), 2478-2481.
- Pirzad, A., Alyari, H., Shakiba, M.R., Zehtab-Salmasi, S. & Mohammadi, A. (2006) Essential oil content and composition of German chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) at different irrigation regimes. *Journal of Agronomy*, 5 (3), 451-455.
- Pompon, D., Louerat, B., Bronine, A. & Urban, P. (1996) Yeast Expression of Animal and Plant P450s in Optimized Redox Environments. *Methods in Enzymology*, **72**, 51-64.
- **Poulose, A.J. & Croteau, R.** (1978) γ-Terpinene Synthase: A Key Enzyme in the Biosynthesis of Aromatic Monoterpenes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **191** (1), 400-411.

- Prosser, I., Altug, I.G., Phillips, A.L., König, W.A., Bouwmeester, H.J. & Beale, M.H. (2004) Enantiospecific (+)- and (-)-germacrene D synthases, cloned from goldenrod, reveal a functionally active variant of the universal isoprenoid-biosynthesis aspartate-rich motif. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **432** (2), 136-144.
- Raguso, R.A. & Pichersky, E. (1995) Floral volatiles from *Clarkia breweri* and *C. concinna* (Onagraceae): Recent evolution of floral scent and moth pollination. *Plant Systematics and Evolution*, **194** (1-2), 55-67.
- Ralston, L., Kwon, S.T., Schoenbeck, M., Ralston, J., Schenk, D.J., Coates, R.M. & Chappell, J. (2001) Cloning, heterologous expression, and functional characterization of 5-epi-Aristolochene-1,3-Dihydroxylase from tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **393** (2), 222-235.
- Rasmann, S., Köllner, T.G., Degenhardt, J., Hiltpold, I., Toepfer, S., Kuhlmann, U., Gershenzon, J. & Turlings, T.C.J. (2005) Recruitment of entomopathogenic nematodes by insect-damaged maize roots. *Nature*, 434 (7034), 732-737.
- Reinecke, P., Knopf, C., Schmitz, M., Schneider, E.M., Gabbert, H.E. & Gerharz, C.D. (2000) Growth inhibitory effects of paclitaxel on human epithelioid sarcoma in vitro: Heterogeneity of response and the multidrug resistance phenotype. *Cancer*, 88 (7), 1614-1622.
- Ren, J., Liu, Y.Q., Yang, L., Ni, R. & You, S. (2006) Molecular cloning and bacterial expression of germacrene A synthase cDNA from *Crepidiastrum sonchifolium*. *Chemical Research in Chinese Universities*, 22 (5), 606-611.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. & Paganga, G. (1996) Structure-antioxidant Activity Relationships of Flavonoids and Phenolic Acids. *Free Radical Biology & Medicine*, 20 (7), 933-956
- Rieseberg, L.H., Soltis, D.E. & Doug, A. (1987) Variation and Localization of Flavonoid Aglycones in Helianthus annuus (Compositae). American Journal of Botany, **74** (2), 224-233.
- Ro, D.K., Paradise, E.M., Quellet, M., Fisher, K.J., Newman, K.L., Ndungu, J.M., Ho, K.A., Eachus, R.A., Ham, T.S., Kirby, J., Chang, M.C.Y., Withers, S.T., Shiba, Y., Sarpong, R. & Keasling, J.D. (2006) Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. *Nature*, 440 (7086), 940-943.
- Rodriguez, E., Dillon, M.O. & Mabry, T.J. (1976) Dermatologically active sesquiterpene lactones in trichomes of *Parthenium hysterophorus* L. (Compositae). *Experientia*, **32** (2), 236-238.
- Rohdich, F., Bacher, A. & Eisenreich, W. (2004) Perspectives in anti-infective drug design. The late steps in the biosynthesis of the universal terpenoid precursors, isopentenyl diphosphate and dimethylallyl diphosphate. *Bioorganic Chemistry*, **32** (5), 292-308.
- Rohdich, F., Lauw, S., Kaiser, J., Feicht, R., Köhler, P., Bacher, A. & Eisenreich, W. (2006) Isoprenoid biosynthesis in plants - 2C-methyl-D-erythritol-4-phosphate synthase (IspC protein) of *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Journal*, **273** (19), 4446-4458.
- Rohmer, M., Knani, M.h., Simonin, P., Sutter, B. & Sahm, H. (1993) Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochemical Journal*, **295**, 517.
- Rüngeler, P., Castro, V., Mora, G., Gören, N., Vichnewski, W., Pahl, H.L., Merfort, I. & Schmidt, T.J. (1999) Inhibition of transcription factor NF-κB by sesquiterpene lactones: A proposed molecular mechanism of action. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 7 (11), 2343-2352.
- **Ruzicka, L.** (1953) The Isoprene Rule and the Biogenesis of Terpenic Compounds. *Experientia*, **9** (10), 357-396.
- Sambrook, J. & Russell, D.W. (2001) Molecular Cloning A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

- Schijlen, E.G.W.M., Ric De Vos, C.H., Van Tunen, A.J. & Bovy, A.G. (2004) Modification of flavonoid biosynthesis in crop plants. *Phytochemistry*, **65** (19), 2631-2648.
- Schilling, E.E. (1983) Flavonoids of Helianthus Series Angustifolii. Biochem. Sys. Ecol., 11, 341-344.
- Schilling, E.E., Panero, J.L. & Strobeck, T.A. (1987) Flavonoids of *Helianthus* Series *Microcephali*. *Biochemical Systematics and Ecology*, **15**, 671-672.
- Schilling, E.E. (2006) *Helianthus*. In *Flora of North America* (Editor: N.R. Morin). Oxford University Press, New York.
- Schmidt, C.O., Bouwmeester, H.J., Bülow, N. & König, W.A. (1999) Isolation, characterization, and mechanistic studies of (-)-alpha-gurjunene synthase from *Solidago canadensis*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 364 (2), 167-177.
- Schmidt, T.J. & Heilmann, J. (2002) Quantitative structure-cytotoxicity relationships of sesquiterpene lactones derived from partial charge (Q)-based fractional Accessible Surface Area descriptors (Q_frASAs). Quantitative Structure-Activity Relationships, 21 (3), 276-287.
- Schnee, C., Köllner, T.G., Held, M., Turlings, T.C.J., Gershenzon, J. & Degenhardt, J. (2006) The products of a single maize sesquiterpene synthase form a volatile defense signal that attracts natural enemies of maize herbivores. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103** (4), 1129-1134.
- Schuh, G., Heiden, A.C., Hoffmann, T., Kahl, J., Rockel, P., Rudolph, J. & Wildt, J. (1997) Emissions of volatile organic compounds from sunflower and beech: Dependence on temperature and light intensity. *Journal of Atmospheric Chemistry*, **27** (3), 291-318.
- Schwender, J., Seemann, M., Lichtenthaler, H.K. & Rohmer, M. (1996) Biosynthesis of isoprenoids (carotenoid, sterols, prenyl side-chains of chlorophylls and plastoquinone) via novel pyruvat/gylceraldehyd 3-phosphate non-mevalonate pathway in the green alga *Scenedesmus*. *Biochemical Journal*, **316**, 73-80.
- Seaman, F.C. (1982) Sesquiterpene Latones as Taxonomic Characters in the Asteraceae. *The Botanical Review*, **48**, 121-592.
- Sessa, R.A., Bennett, M.H., Lewis, M.J., Mansfield, J.W. & Beale, M.H. (2000) Metabolite profiling of sesquiterpene lactones from *Lactuca* species: Major latex components are novel oxalate and sulfate conjugates of lactucin and its derivatives. *Journal of Biological Chemistry*, 275 (35), 26877-26884.
- Sitte, P., Weiler, E.W., Bresinsky, A., Kadereit, J.W. & Körner, C. (2002) Lehrbuch der Botanik für Hochschulen. Heidelberg Berlin: Spektrum Akademischer Verlag.
- Song, W.-C. & Brash, A.R. (1991) Purification of an Allene Oxide Synthase and Identification of the Enzyme as a Cytochrome P-450. *Science*, **253**, 781-784.
- Spring, O. & Hager, A. (1982) Inhibition of elongation growth by two sesquiterpene lactones isolated from *Helianthus annuus* L. *Planta*, **156**, 433-440.
- Spring, O., Kupka, J., Maier, B. & Hager, A. (1982) Biological activities of sesquiterpene lactones from *Helianthus annuus*: antimicrobial and cytotoxic properties; influence on DNA, RNA, and protein synthesis. *Zeitschrift fur Naturforschung. Section C: Biosciences*, **37** (11-12), 1087-1091.
- Spring, O., Priester, T., Stransky, H. & Hager, A. (1985) Sesquiterpene lactones in the sunflower seedlings: distribution in the plant and occurrence in genetic varieties as determined by an isocratic HPLC technique. *Journal of Plant Physiology*, **120**, 312-329.
- Spring, O., Priester, T. & Hager, A. (1986) Light-induced accumulation of sesquiterpene lactones in sunflower seedlings. *Journal of Plant Physiology*, **123**, 79-89.

- **Spring, O. & Bienert, U.** (1987) Capitate Glandular Hairs from Sunflower Leaves: Development, Distribution and Sesquiterpene Lactone Content. *Journal of Plant Physiology*, **130**, 441-448.
- Spring, O., Bienert, U. & Klemt, V. (1987) Sesquiterpene Lactones in Glandular Trichomes of Sunflower Leaves. Journal of Plant Physiology, 130, 433-439.
- Spring, O. (1989) Microsampling, an alternativ approach to use sesquiterpene lactones for systematics. Part I in the series "The Sesquiterpene Lactone Chemistry of Helianthus (Asteraceae)". Biochemical Systematics and Ecology, 17, 509-517.
- Spring, O., Benz, T. & IIg, M. (1989) Sesquiterpene Lactones of the Capitate Glandular Trichomes of Helianthus annuus. Phytochemistry, 28 (3), 745-749.
- Spring, O. & Schilling, E.E. (1989) Chemosystematic investigation of the annual species of Helianthus (Asteraceae). Part II in the series "The Sesquiterpene Lactone Chemistry of Helianthus". Biochemical Systematics and Ecology, 17, 519-528.
- Spring, O., Rodon, U. & Macias, F.A. (1992) Sesquiterpenes from noncapitate glandular trichomes of *Helianthus annuus* L. *Phytochemistry*, **31**, 1541-1544.
- Spring, O., Heil, N. & Eliasson, U. (1999) Chemosystematical studies on Scalesia (Asteraceae). Biochemical Systematics and Ecology, 27 (3), 277-288.
- Spring, O. (2000) Chemotaxonomy based on metabolites from glandular trichomes. Advances in Botanical Research, 31, 153-174.
- Spring, O., Zipper, R., Reeb, S., Vogler, B. & Da Costa, F.B. (2001) Sesquiterpene lactones from glandular trichomes of *Viguiera quinqueremis* (Heliantheae, Asteraceae). *Phytochemistry*, **57**, 267-272.
- Starks, C.M., Back, K., Chappell, J. & Noel, J.P. (1997) Structural basis for cyclic terpene biosynthesis by tobacco 5-epi-aristolochene synthase. *Science*, **277** (5333), 1815-1820.
- **Steele, C.L., Crock, J., Bohlmann, J. & Croteau, R.** (1998) Sesquiterpene synthases from grand fir (*Abies grandis*): Comparison of constitutive and wound-induced activities, and cDNA isolation, characterization, and bacterial expression of δ-selinene synthase and γ-humulene synthase. *Journal of Biological Chemistry*, **273** (4), 2078-2089.
- Takahashi, S., Zhao, Y., O'Maille, P.E., Greenhagen, B.T., Noel, J.P., Coates, R.M. & Chappell, J. (2005) Kinetic and molecular analysis of 5-epiaristolochene 1,3-dihydroxylase, a cytochrome P450 enzyme catalyzing successive hydroxylations of sesquiterpenes. *Journal of Biological Chemistry*, **280** (5), 3686-3696.
- Takahashi, S., Yeo, Y.S., Zhao, Y., O'Maille, P.E., Greenhagen, B.T., Noel, J.P., Coates, R.M. & Chappell, J. (2007) Functional Characterization of Premnaspirodiene Oxygenase, a Cytochrome P450 Catalyzing Regio- And Stereo-specific Hydroxylations of Diverse Sesquiterpene Substrates. *Journal of Biological Chemistry*, **282** (43), 31744-31754.
- Tattini, M., Gravano, E., Pineli, P., Mulinacci, N. & Romania, A. (2000) Flavonoids Accumulate in Leaves and Glandular Trichomes of Olea europaea Leaves: Differences in Flavonoid Distribution. New Phytologist, 148, 69-77.
- Teoh, K.H., Polichuk, D.R., Reed, D.W., Nowak, G. & Covello, P.S. (2006) Artemisia annua L. (Asteraceae) trichome specific cDNAs reveal CYP71AV1, a cytochrome P450 with a key role in the biosynthesis of the antimalarial sesquiterpene lactone Artemisinin. *FEBS letters*, 580, 1411-1416
- Tholl, D., Chen, F., Petri, J., Gershenzon, J. & Pichersky, E. (2005) Two sesquiterpene synthases are responsible for the complex mixture of sesquiterpenes emitted from *Arabidopsis* flowers. *Plant Journal*, **42** (5), 757-771.

- Trapp, S.C. & Croteau, R.B. (2001) Genomic organization of plant terpene synthases and molecular evolutionary implications. *Genetics*, **158** (2), 811-832.
- Troutt, A.B., McHeyzer-Williams, M.G., Pulendran, B. & Nossal, G.J.V. (1992) Ligation-anchored PCR: A simple amplification technique with single-sided specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **89** (20), 9823-9825.
- Turner, G.W., Gershenzon, J., Nielson, E.E., Froehlich, J.E. & Croteau, R. (1999) Limonene synthase, the enzyme responsible for monoterpene biosynthesis in peppermint, is localized to leucoplasts of oil gland secretory cells. *Plant Physiology*, **120** (3), 879-886.
- Turner, G.W., Gershenzon, & Croteau, R. (2000) Distribution of Peltate Glandular Trichomes on Developing Leaves of Peppermint. Plant Physiology, 14, 655-663.
- Turner, G.W. & Croteau, R. (2004) Organization of monoterpene biosynthesis in *Mentha*. Immunocytochemical localizations of geranyl diphosphate synthase, limonene-6-hydroxylase, isopiperitenol dehydrogenase, and pulegone reductase. *Plant Physiology*, **136** (4), 4215-4227.
- Van Ketel, W.G. (1987) Allergy of Matricaria chamomilla. Contact Dermatitis, 16 (1), 50-51.
- Vögeli, U., Freeman, J.W. & Chappell, J. (1990) Purification and Characterization of an Inducible Sesquiterpene Cyclase from Elicitor-Treated Tobacco Cell Suspension Cultures. *Plant Physiology*, 93, 182-187.
- Wagner, G.J., Wang, E. & Shepherd, R.W. (2004) New Approaches for Studying and Exploiting an Old Protuberance, the Plant Trichome. *Annals of Botany*, **93**, 3-11.
- Waksman, G., Lebrun, M. & Freyssinet, G. (1987) Nucleotide sequence of a gene encoding sunflower ribulose-1,5-bisphosphate. *Nucleic Acids Research*, **15** (17), 7181.
- Wallaart, T.E., Bouwmeester, H.J., Hille, J., Poppinga, L. & Maijers, N.C.A. (2001) Amorpha-4,11diene synthase: Cloning and functional expression of a key enzyme in the biosynthetic pathway of the novel antimalarial drug artemisinin. *Planta*, **212** (3), 460-465.
- Wallach, O. (1885) Zur Kenntnis der Terpene und der ätherischen Oele. Annalen der Chemie, 227, 277-302.
- **Wallach, O.** (1909) Terpene und Campher: Zusammenfassung eigener Untersuchungen auf dem Gebiet der alicyclischen Kohlenstoffverbindungen. Veit, Leipzig.
- Warshaw, E.M. & Zug, K.A. (1996) Sesquiterpene lactone allergy. American Journal of Contact Dermatitis, 7 (1), 1-23.
- Wen, J., You, K.R., Lee, S.Y., Song, C.H. & Kim, D.G. (2002) Oxidative stress-mediated apoptosis: The anticancer effect of the sesquiterpene lactone parthenolide. *Journal of Biological Chemistry*, 277 (41), 38954-38964.
- Werker, E. & Fahn, A. (1981) Secretory hairs of *Inula viscosa* (L.): development, ultrastructure, and secretion. *Botanical gazette*, **142**, 461-476.
- Whittington, D.A., Wise, M.L., Urbansky, M., Coates, R.M., Croteau, R.B. & Christianson, D.W. (2002) Bornyl diphosphate synthase: Structure and strategy for carbocation manipulation by a terpenoid cyclase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99** (24), 15375-15380.
- WHO. (2007) Resistance to artemisinin derivatives along the Thai-Cambodian border. Weekly epidemiological record/Health Section of the Secretariat of the League of Nations, 82 (41), 360.
- Wise, M.L., Savage, T.J., Katahira, E. & Croteau, R. (1998) Monoterpene synthases from common sage (*Salvia officinalis*). cDNA isolation, characterization, and functional expression of (+)-

sabinene synthase, 1,8-cineole synthase, and (+)-bornyl diphosphate synthase. *Journal of Biological Chemistry*, **273** (24), 14891-14899.

- Won, Y.K., Ong, C.N., Shi, X. & Shen, H.M. (2004) Chemopreventive activity of parthenolide against UVB-induced skin cancer and its mechanisms. *Carcinogenesis*, **25** (8), 1449-1458.
- Yerger, E.H., Grazzini, R.A, Hesk, D., Cox-Foster, D.L., Craig, R.& Mumma, R.O. (1992) A Rapid Method for Isolating Glandular Trichomes. *Plant Physiology*, **99**, 1-7.
- Yoshioka, H., Yamada, N. & Doke, N. (1999) cDNA Cloning of Sesquiterpen Cyclase and Squalene Synthase, and Expression of the Genes in Potato Tube Infected with *Phytophthora infestans*. *Plant Cell Physiology*, **40** (9), 993-998.
- Zhang, X. & Oppenheimer, D.G. (2004) A Simple and Efficient Method for Isolating Trichomes for Downstream Analyses. *Plant and Cell Physiology*, **45** (2), 221-224.
- Zheng, G.-Q. (1994) Cytotoxic Terpenoids and Flavonoids from Artemisia annua. *Planta medica*, **60** (1), 54-57.

7 Anhang

7.1 DNA-Sequenzen

HaGAS1, Helianthus annuus Germacren A-Synthase 1, mRNA-Sequenz, (Genbank accession number: DQ016667). Start- und Stoppcodon sind fett gedruckt.

 ${\tt ATG} {\tt GCAGCAGTTGGAGCCAGTGCTACCCCCTTAACAAACACCAAAAGCACTGCAGAGCCAGTGCGTCCTGTGGCCAACTTCCC$ ACCTTCTGTATGGGGTGATTTGTTCCTATCATTCTCTCTTGACAAATCGATAATGGAAGAATACGCTGAAGCCATGGAAGAGC CAAAAGAACAAGTGAGAAGATTGATCTTGGATCCTACAATGGATTCAAACAAGAAACTGAGCTTGATTTATACCGTTCACCGT ${\tt CTCGGTCTGACATACATGTTCTTGAAAGAGATTGAAAGCCCAGCTTGACAGACTTTTCAAAGAGTTCAACTTGGAAGATTATGT}$ TGAACTTGACTTATACACAATTTCGATTAACTTTCAAGCTTTTCGACACCTTGGTTACAAGCTGCCTTGTGATGTGTTTAACA AATTCAAGAACGACGACTCGACTACATTCAAGGAATCTATTACTGGTGATGTGAGGGGTATGTTAGGCTTATATGAATCTGCA CAATTGAGATTGAAAGGGGAAAACATTCTAGACGAAGCCTCGGCGTTCGCGGAAACTAAACTGAAGAGTTTGGTAAATACTCT GGAAGGCAGTCTTGCACAACAGGTGAAACAATCTTTGAGAAGACCATTTCATCAAGGGATGCCAATGGTAGAGGCAAGGCTAT ATTTCTCCAACTATCAAGAAGAATGCTCCGCACATGACTCCATACTGAAAACTTGCAAAACTTCAACTATTTGCAGCTA CAACAAAAGGAAGAACTTAGGATTGTTTCACAGTGGTGGAAGGATATGAGGTTTCAAGAGACAACTCCTTATATAAGGGATAG ${\tt AGTGCCAGAGATTTATTATGGATATTAGGACTCTACTTTGAACCTAGATACTCTTTGGCACGAATCATTGCCACCAAGATTA}$ CGTTGTTGTTGTGGTGCTAGATGACACATATGACGCTTATGCTACCATTGAAGAGATCCGCCTTCTAACCGATGCAATAAAT AGGTGGGACATTAGTGCTATGAATCAAATTCCAGAGTACATTAGACCATTCTACAAGATTCTCCCTGGATGAGTATGCTGAACT TGAGAAGCAACTAGCAAAAGAAGGGCGCGCAAATAGTGTTATTGCTTCAAAAGAAGCGTTCCAAGACATAGCTAGAGGGTACC TTGAAGAGGCTGAGTGGACAAACAGTGGATATGTGGCATCATTTCCAGAGTACATGAAGAACGGATTAATCACTTCTGCCTAC GATTCTGCAAGCTTCAGAGTTAATTTCAAGACTCCAAGATGATGTTATGACATACCAGTTTGAGCGCGAAAGAGGACAATCCG CCACAGGTGTTGATTCATACATCAAGACCTATGGCGTATCAGAAAAGGTAGCAATTGACGAGCTCAAGAAAATGATTGAAAAAT GCATGGAAAGAAATAAACGAGGGGTGTCTCAAGCCAAGAGAAGTCTCAATGGATTTGCTGGCCCCAATTCTTAACCTTGCTCG AATGATAGATGTGGTATACAGGTATGACGATGGGTTTACTTTCCCAGGAAAGACACTCAAAGAGTACATTACTCTCTTGTTTG TTGGTTCTTCACCCATG**TAA**

HaGAS2, Helianthus annuus Germacren A-Synthase 2, mRNA-Sequenz (Genbank accession number: EU327785). Start- und Stoppcodon sind fett gedruckt.

 ${\tt ATG} {\tt GCAGCAGTTGGAGCCAGTGCTACCCTCCTAACAAACACCCAAAAGCGCTGAAGAGCCGGTGCGTCCTGTGGCCAACTTTCC$ ${\tt CAAAAGGACAAGTGAGAAAATTGATCTTGGATCCTACAATGGATTCAAACAAGAAATTGAGCTTGATTTATACCGTTCACCGT$ CTTGGTCTAACATACATGTTCTTTAAAGAGATTGAAGGCCAGCTTGATAGACTTTTCAAAGAGTTCAACTTGGAAGATTATGT TGAAGTTGATTTATACACAAATTTCGACCAACTTTCCAAGCTTTCCGACACCTTGGTTACAAACTATCTTGTGATGTGTTTAACA AATTCAAGAACTACGACTCGAATACATTCAAGGAATCTATTACCAGTGATGTGAGGGGTATGTTAGGCTTATATGAATCTGCA CAATTGAGATTGAAAGGAGAAAAGATTCTAGACGAAGCATCGGCATTCACAGAAACTAAACTGAAGAGTTTAGTAAAGACTCT GGAAGGCAGTCTTGCACAACAGGTGAAACAATCCTTGAAAAGACCATTTCATCAAGGGATGCCAATGGTAGAGGCAAGGCTAT ATTTCTCCAACTATCAAGAAGAATGCTCCAGACATGACTCACTACTAAAACTTGCAAAACTTCACTTCAACTATTTGCAGCTA CAACAAAAGGAAGAACTTAGGATTGTTTCACAGTGGTGGAAGGATATGAGGTTTCAAGAGACTACTCCTTATATAAGGGATAG AGTACCAGAGATTTATTATGGATATTAGGACTCTACTTTGAACCTAGATACTCTTTGGCACGAATCATTGCCACTAAGATTA CGTTGTTCTCGTGGTGCTAGATGACACATATGACGCTTATGCTACCATTGAAGAGGTCCGCCTTCTAACAGATGCAATAAAT AGGTGGGATATTGGTGCTATGAGCCAAATTCCAGAGTACATTAGACCATTCTACAAGATTCTCTTGGATGAGTATGCTGAACT TGAGAAGCAACTAGCTAAAGAAGGGCGTGCAAATAGTGTTATTGCTTCAAAAGAAGCGTTCCAAGACATAGCTAGAGGGTACC TTGAAGAGGCTGAGTGGACAAACAGTGGATATGTGGCATCATTTCCAGAGTACATGAAGAACGGATTAATCACTTCTGCCTAC GATTCTGCAAGCTTCAGAGTTGATTTCCAGACTTCAAGATGATGTTATGACATACCAGTTCGAGCGCGAAAGAGGACAATCCG CCACAGGTGTTGATGCATACATCAAGACCTATGGCGTATCAGAAAAAGAAGCAATCGACGAGCTCAAGAAAATGATTGAAAAT GCATGGAAAGAAATCAACGAGGGGTGTCTCAAGCCAAGAGAAGTCTCAATGGATTTGCCTCGCCCCAATTCTTAATCTTGCTCG AATGATAGATGTGGTATACAGGTATGATGATGGGTTTACTTTCCCAGGAAAGACCCCTCAAAGAGTACATTACCCTCCTGTTTG TTGGTTCTTCACCCATG**TAA**

HaCS, Helianthus annuus Cadinen-Synthase, mRNA-Sequenz, (Genbank accession number: DQ016668). Start- und Stoppcodon sind fett gedruckt.

 ${\tt ATG} {\tt GCAACAACTGAAGCTAACACTATGGCGCAAGCTAACTCACAAAACCACCATAGAGCCGGTGCGTCATCTGGCAAACTTTCC$ GCCTTCGATTTGGGGTGATCAGTTTCTATCATTCTCTCTTGATAATTCCCAATTGGAAGCATACAGTAAAGCTATGGAGCAGC ${\tt CAAAAGAAAACGTTAGAAGAATGATATTAAACCCTGCTATTGATACAAATGAGAAATTGGGTTTGATTTATTGTGTCTATCGT$ ${\tt CTTGGTTTGACGTATAATTTCTCAAAAGATATTGATGGTCAACTTGATGAACTTTTCAAACAGCTTAACTTGCAAAGTTACAA}$ ${\tt CGAAGCAGATCTCTATACAATATCCATTCACTTTCAAGTTTTTAGACACTTTGGTTATAGATTTTCTTGTGATGTGTTTAACA}$ AGTTCAAGGACTCCAGTTCTGGTAAATTCAAGGAAGACATGACTAGAGATGTGAGGGGGTATGATAAGTTTGTATGAGAGTGCC CAACTAAGAATAAGAGGAGAATCTATACTAGATGAAGCCGGTGCATTCGCAGAAAGTAAACTTAAAACGATAGAAAAAACACT TGATGGTACACTTGCACAACAAGTCAAACATGTATTGGAGAGACCTTTTAATCGAGGGCATCAGATGGTTGAAGCGAGGAAGT CTACAAAAGGAAGAACTTCGATCTGTATCAAAGTGGTGGAAAGACTTGGACCTACCGGCGAAAACACTATATGTAAGAGATAG AGTACCTGAACTCTATGTATGGATTTTGGCGTTTTTCTTGGAGCCGTATTACTCTGAAGTCCGAATAATAACGACCAAAATCG TACTGCTTGTATTGGTGTTAGATGACACGTATGATGCATATGCTACTACTATTGAGGAGAGCCCGACTTCTAACCCATGCAATAAAT AGGTGGGAAGTTAGTGCTATGTTGCAACTTCCAGAATACATGAAACCATTGTATGAAATTTTGCTCAACGAGTATGATGGATT TTACAAACATGGAAGAACAAATGTCATTGAGACTTCAAAAAAGCTTTCCAAGACTTGGCTAGAAGTTACCATCAAGAGTCTG AATGGAGACATGCTAAAGAGGTGCCATCATTTGAAGAGTATATGAAAATTGGGACAACTACTTCTGCACATAATGTTCTTAGT AAGACTGCATTGATTGGTATGGGCAACATTGTAACACGCGAGGCTTTAGCTTGGTACGAAAGCTATCCAAAGATCGTACAACT TTCAGAGTTGATCGGAAGGCTCGAAGATGATGTCGTCAGTGTTGAGTTTGAGCGTGAAAGAGCTCCAACAGCCACAAGTGTAG ${\tt GGCGTACAGGCACAATGATGGTTTAACTTTTCCAGAAAAGACTCTTAAGGAATATATTACACTCCTGTTTTGTGTTCCAGTCC$ CCATG**TAA**

HaGAS1, genomische (+)-Strang DNA-Sequenz (Genbank accession number: EU439590). Introns sind unterstrichen dargestellt, Start- und Stoppcodon sind fett gedruckt.

 ${\tt ATG} {\tt GCAGCAGTTGGAGCCAGTGCTACCCCCTTAACAAACACCAAAAGCACTGCAGAGCCAGTGCGTCCTGTGGCCAACTTCCC$ GGCGGAACCAACTCACCAAGGGGTCAAGAGGGTTTGCTAATCCCCCGGTTACTAGAATTTGTTGGTTTTTTATATTAAAAAATA AATAAAAATAAGGTGTTTTCTTTTCTAGATAATGGAAGAATACGCTGAAGCCATGGAAGAGCCAAAAGAACAAGTGAGAAGAT TTGAAAGAGATTGAAGCCCAGCTTGACAGACTTTTCAAAGAGTTCAACTTGGAAGATTATGTTGAACTTGACTTATACACAAT ${\tt ACTTTTGCATCAGTACTTGTTTTTTTCACAGAGTCCATTATGGTTGCCATCAAATGATTTACAATATAAGTTACTCATGT$ ${\tt CTTCTCTTTTTCATGACATAAGTGATACAATATTTTATATTAATTTGTGACCGAACAGATGTGTTTAACAAAATTCAAGAACGA$ CGACTCGACTACATTCAAGGAATCTATTACTGGTGATGTGAGGGGTATGTTAGGCTTATATGAATCTGCACAATTGAGATTGA AAGGGGAAAACATTCTAGACGAAGCCTCGGCGTTCGCGGAAACTAAACTGAAGAGTTTGGTAAATACTCTGGAAGGCAGTCTT GCACAACAGGTGAAACAATCTTTGAGAAGACCATTTCATCAAGGGATGCCAATGGTAGAGGCAAGGCTATATTTCTCCCAACTA TCAAGAAGAATGCTCCGCACATGACTCCATACTGAAACTTGCAAAAACTTCACTATCACTATTTGCAGCTACAACAAAAGGAAG AAAACATAATAAATACTCATATGAAAAAGGGAAATATCTATGAAGCAACGTGTCTTAAACCCAACCGAAAACAAGAGTACAAAA TACACACTCACAATATATGCAATACAAACTAAGAATTTATTGAAGATGTGAGAAATTATAAAAGTGAAAAAGTTGATGGAAGTT TATTCTACCTTGTTTCACAGGTGGTGGAAGGATATGAGGTTTCAAGAGACAACTCCTTATATAAGGGATAGAGTGCCAGAGAT TTATTTATGGATATTAGGACTCTACTTTGAACCTAGATACTCTTTGGCACGAATCATTGCCACCAAGATTACGTTGTTTCTTG ${\tt TACCAAGTGTTGCTTTAAACCATCATGCACTTCGAAATAAAATTACTAATGCTTGAAGATCTCTCGTTATATATCAACATTTGCAACATTGCAACATTTGCAACATTTGCAACATTTGCAACATTTGCAACATTTGCAACATTTGCAACATTTGCAACATTTGCAACATTTGCAACATTTGCAACATTTGCAACATTTGCAACATTTGCAACATTTGCAACATTTGCAACATTTGCAACATTTGCAACATTGCAACATTGCAACATTTGCAACATTTGCAACATTTGCAACATTTGCAACATTTGCAACATTTGCAACATTAACATTTGCAACATTTGCAACAACATTAACATTTGCAACATTTTGCAACATTTGCAACATTTGC$ ATATTTTAGGTGGGACATTAGTGCTATGAATCAAAATTCCAGAGTACATTAGACCATTCTACAAGATTCTCCTGGATGAGTATG ${\tt CTGAACTTGAGAAGCAACTAGCAAAAGAAGGAGGCGCGCAAATAGTGTTATTGCTTCAAAAGAAGCGGTATGATCGATATGTTAT$ AAATTCTGGATTTTTCATGTACTGATTAACCTCTTTAATATAGAGGTGTAACCAAATTACACGATAATGATAATGATAGAA AAATTATAATAACTATAACAGATAATAAACTAGCCTAACAATTTGTATGTTATGTTAAATGAAAATTTCATCTCCATAGATAT TTTGTTAATCTTTGGCTTATTGTATATCTATATGGAGTTCAGTTCCAAGACATAGCTAGAGGGTACCTTGAAGAGGGCTGAGTG GACAAACAGTGGATATGTGGCATCATTTCCAGAGTACATGAAGAACGGATTAATCACTTCTGCCTACAATGTTATTTCCAAAT ${\tt CTGCTTTAGTGGGAATGGGTGAGATAGTGAGTGAAGATGCTTTGGTTTGGTATGAGAGTCATCCACAGATTCTGCAAGCTTCA$ GAGTTAATTTCAAGACTCCAAGATGATGTTATGACATACCAGGTAAACAATTAAACTGGTTTAAAATGCAAAGTTAACTTATA AACATCATGTATTCTCACTAACACTATGACTATTTGTTTAAGTTTGAGCGCGAAAGAGGACAATCCGCCACAGGTGTTGATTC ACGAGGGGTGTCTCAAGCCAAGAGAAGTCTCAATGGATTTGCTGGCCCCAATTCTTAACCTTGCTCGAATGATAGATGTGGTA TACAGGTATGACGATGGGTTTACTTTCCCAGGAAAGACACTCAAAGAGTACATTACTCTCTTGTTGGTTCTTCACCCAT ${\tt G} {\tt TAA} {\tt TAA} {\tt TAA} {\tt TAA} {\tt TATGTTGTTGTTGTTGTTGTGGTGTATCTCTAGGACAATATCTCAATCGTGATTTTTGTACCGTATAAGGATAT$ TAATATATTTTGTAACATAATCGACATTGTCGATGTATGAATATTTTTATGACTTGGTGTAAGTGGATATGTTATATACAC

HaGAS2, genomische (+)-Strang DNA-Sequenz (Genbank accession number: EU443249). Introns sind unterstrichen dargestellt, Start- und Stoppcodon sind fett gedruckt.

 ${\tt ATG} {\tt GCAGCAGTTGGAGCCAGTGCTACCCTCCTAACAAACACCCAAAAGCGCTGAAGAGCCGGTGCGTCCTGTGGCCAACTTTCC$ GACGGAACCTAAACACCAAGGGGTCAAGAGGATTTGCTGAACCCCAATCACTAGAATTTGTTGGGTTTTTATACATAAAAGTA TGAGTTGTTTCCTAAAGAGAAACTCATGATAACCCATACAAAAAAAGTTCTGGTTCTGTCACCGTACATGTTACAATCACATG AGGTTATGTATGTTGTTTTTTTATTAAGAAAATTTGATGTGTTCTTTTCTAGATGATGGAAGAATATGCTGAAGCCATGGAAG AACCAAAAAGGACAAGTGAGAAAAATTGATCTTGGATCCTACAATGGATTCAAACAAGAAATTGAGCTTGATTTATACCGTTCAC ${\tt CGTCTTGGTCTAACATGATGTTCTTTAAAGAGATTGAAGGCCAGCTTGATAGACTTTTCAAAGAGTTCAACTTGGAAGATTA$ TGTTGAAGTTGATTTATACACAAATTTCGACCAACTTTCAAGCTTTCCGACACCTTGGGTACAAACTATCTTGTGGTACCGGAT AATACAATCTTTTATGGTTGCTATAAATTGATTTACAACATAAATTTCTCCCTATCTTCTCTTTTTAAAGATAATCTTTGATAA ATTTGTGACCATACAGATGTGTTTAACAAATTCAAGAACTACGACTCGAATACATTCAAGGAATCTATTACCAGTGATGTGAG GGGTATGTTAGGCTTATATGAATCTGCACAATTGAGATTGAAAGGAGAAAAGATTCTAGACGAAGCATCGGCATTCACAGAAA CTAAACTGAAGAGTTTAGTAAAGACTCTGGAAGGCAGTCTTGCACAACAGGTGAAACAATCCTTGAAAAGACCATTTCATCAA GGGATGCCAATGGTAGAGGCAAGGCTATATTTCTCCAACTATCAAGAAGAATGCTCCAGACATGACTCACTAAAAACTTGC AAAACTTCACTTCAACTATTTGCAGCTACAACAAAAGGAAGAACTTAGGATTGTTTCACAGTGAGCACATATCATCCTTATAAA AAAGATCTATGAAGCAAAGTGTCTTAAACCCCAAAACCCGAAAACCAAGAATACAAAATTCATACTTAAAATATATGCA TTTGAACCTAGATACTCTTTGGCACGAATCATTGCCACTAAGATTACGTTGTTTCTCGTGGTGCTAGATGACACATATGACGC AAAATAAAATTAATACTCCCTCCGTCCCATTAAAAGTGTCCTATTTTGAATTTTCAAAAATCTTTATTATAAACTTTGACCTT AAAAAATTTTGTTTGTGTTAGATAATACTGGATGAAAGTTATATGATTTGAGTGTGTTTTACAAGTGTTTTTATCGGGTTAAT ${\tt CACTTTTAATGGGACGGAGGTAGTAATGTTTTGTTGATTTCTTGTTATATATCAACTTTTTATATATTAGGTGGGATATTGGT$ GCTATGAGCCAAATTCCAGAGTACATTAGACCATTCTACAAGATTCTCTTGGATGAGTATGCTGAACTTGAGAAGCAACTAGC TAAAGAAGGGCGTGCAAATAGTGTTATTGCTTCAAAAGAAGCGGTATGATAGATTCTGCTAAATTCAGGGTTATTCATGTATT GATCAACCATGATTAACCTCTTTAAATATAGAGGTGTGACCCAATTACAAGATACTGAAACAATGATCATAAAAACGTTAATAA GTTATAGAAAAATAAACTAGGCTAACAATTTGCACGTTATGTTCAATGAAAATTTGATCTCCATATTGATATTTGTTAATCTTT GGTTTTTTATATATCTATATGGAATCCAGTTCCAAGACATAGCTAGAGGGTACCTTGAAGAGGCTGAGTGGACAAACAGTGGA TATGTGGCATCATTTCCAGAGTACATGAAGAACGGATTAATCACTTCTGCCTACAATGTTATTTCCAAATCTGCTTTAGTGGG ${\tt GACTTCAAGATGATGATGATATCAACATAACCAGGTAAACAATTAAACTGGTTTTTACTGCAAAGTTAACTTATAAACATTATGTATT$ CTAACCAACACTATGAATATTTTCTTTAAGTTCGAGCGCGAAAGAGGACAATCCGCCACAGGTGTTGATGCATACATCAAGAC ${\tt TCAAGCCAAGAGAAGTCTCAATGGATTTGCTTGCCCCAATTCTTAATCTTGCTCGAATGATGATGTGGTATACAGGTATGAT$

HaCS, genomische (+)-Strang DNA-Sequenz (Genbank accession number: EU443250). Introns sind unterstrichen dargestellt, Start- und Stoppcodon sind fett gedruckt.

 ${\tt ATG} {\tt GCAACAACTGAAGCTAACACTATGGCGCAAGCTAACTCACAAAACCACCATAGAGCCGGTGCGTCATCTGGCAAACTTTCC$ GCCTTCGATTTGGGGTGATCAGTTTCTATCATTCTCTCTTGATAATTCCGTAAGTGCTCAATCGATTACTCGCACAAACTTGT TGTGGATTATACTTTAGTACATTCACCTCTCATCAATTCCTATCATAGTCACACAAACTTGTGGCGCCATACGCACAGTTGCAA AACATTCTTCTGTTTCTTAATATTAAGAATACGTTGTTTCATTTTCTAGCAATTGGAAGCATACAGTAAAGCTATGGAGCAGC ${\tt CAAAAGAAAACGTTAGAAGAATGATATTAAACCCTGCTATTGATACAAATGAGAAATTGGGTTTGATTTATTGTGTCTATCGT$ ${\tt CTTGGTTTGACGTATAATTTCTCAAAAGATATTGATGGTCAACTTGATGAACTTTTCAAAACAGCTTAACTTGCAAAGTTACAA$ ACCCGGGTTTATGCAGATGTGTTTAACAAGTTCAAGGACTCCAGTTCTGGTAAATTCAAGGAAGACATGACTAGAGATGTGAG GGGTATGATAAGTTTGTATGAGAGTGCCCAACTAAGAATAAGAGGAGAATCTATACTAGATGAAGCCGGTGCATTCGCAGAAA ${\tt GTAAACTTAAAACGATAGAAAAAAACACTTGATGGTACACTTGCACAACAAGTCAAACATGTATTGGAGAGACCTTTTAATCGA$ GGGCATCAGATGGTTGAAGCGAGGAAGTATTTGTTCCTATTTGAAGAAGAAATTTCACGGTATGATTCCCTATTGATGCTTGC ${\tt GTTTTTCTTGGAGCCGTATTACTCTGAAGTCCGAATAATAACGACCAAAAATCGTACTGCTTGTATTGGTGTTAGATGACACGT$ GTTGATGCCTTTGCGTTCAACTTATGGTAATGCCGAATACTGCTCATCAGGTATCCTTTTGTATGATATTAGTTGTTGTTTCT ATCTTTTTAGGTGGGAAGTTAGTGCTATGTTGCAACTTCCAGAATACATGAAACCATTGTATGAAATTTTGCTCAACGAGTAT

TATTGTTCACCCGGCCATTCATATTTATATCATGTCTGTTATGAGTGCAGTTCCAAGACTTGGCTAGAAGTTACCATCAAGAG TCTGAATGGAGACATGCTAAAGAGGTGCCATCATTTGAAGAGTATATGAAAATTGGGACAACTACTTCTGCACATAATGTTCT TAGTAAGACTGCATTGATTGGTATGGGCAACATTGTAACACGCGAGGCTTTAGCTTGGTACGAAAGCTATCCAAAGATCGTAC ${\tt TAACAAAAATTTAATTTTGTACGACAAAATTTCTAAAAATTCCAAAAATGGATACCCCAAGAAGCAACAAGAAAACTTTGTCGTT$ TCCAACAGTATTGTCAGAAATGTGTATAAAACGAGTAGCAAACACTTTCTGAAACAAAACCTATTTTACGAGAAAAAACTATA TCCCCCTTTTCTAGTAGTAAAGTCAAGTGTCATAAGCTTATTAAATGAAGCATTTACGGCAGTGAGTTGTTTCCTTCAAATTG TCAATATCCCCTATAGATCTGAATTACTAGGTAATCTTATTTAGTTTCACCTAGTCTAATAACATTTGCCAATTTGGGGTTCA CATGAAGTTTGAGCGTGAAAGAGCTCCAACAGCCACAAGTGTAGATGCTTATATGAAGACTTATGGGGTGTCGGAAAATGTAG GATCTGCTTGCTCCGATTATTGGTCTTACAAACATGACAGACGTGGCGTACAGGCACAATGATGGTTTAACTTTTCCAGAAAA ${\tt GACTCTTAAGGAATATATTACACTCCTGTTTTGTGTTCCAGTCCCCATG{\tt TAA}CAACTAGTGTGTTAGTTCGTGTTGTTGTTCT$ TCTCTTTCGCTTTTGTTTTGTTTCTCCAGTTTCTTACTGGCTCTCTATATAAACATATAGTGTGGTTGCCGTTTAAAAAAA ACAACTAGTGTGTTAGTGGTTAC

wHaGAS1, Abschnitt der genomischen (+)-Strang DNA-Sequenz. Introns sind unterstrichen dargestellt, das Startcodon ist fett gedruckt.

 ${\tt ATG} {\tt GCAGCAGTTGGAGCCAGTGCTACCCCCTTAACAAACACCAAAAGCACTGCAGAGCCAGTGCGTCCTGTGGCCAACTTCCC$ AAAAATAAGGTGTTTTCTTTTCTAGATAATGGAAGAATACGCTGAAGCCATGGAAGAGCCAAAAGAACAAGTGAGAAGAATTGA AAAGAGATTGAAGCTCAGCTTGACAGACTTTTCAAAGAGTTCAACTTGGAAGATTATGTTGAACTTGACTTAACACCACTTC GATTAACTTTCAAGCTTTTCGACACCTTGGTTATAAGCTGCCTTGTGGTACATACCGGATTCTAACATTAAATACTTGCCACT TTTGCATCAGTACTTGTTTTTTTCACATAGTCCATTATGGTTGCCATCAAATGATTTACAATATAAGTTACTCATGTCT TCTCTTTTTCATGACATAAGTGATACAATATTTTATATTAATTTGTGACCGAACAGATGTGTTTAACAAATTCAAGAACGACG ${\tt ACTCGACTACATTCAAGGAATCTATTACTGGTGATGTGAGGGCTATGTTAGGCTTATATGAATCTGCTCAATTGAGATTGAAA$ GGGGAAAAGATTCTAGACGAAGCCTCAGCGTTCGCGGAAACTAAACTGAAGAGTTTGGTAAATACTCTGGAAGGCAGTCTTGC ${\tt AAGAAGAATGCTCCGCACATGACTCAATACTGAAAACTTGCAAAAACTTCACTTCAACTATTTGCAGCTACAAAAAGGAAGAA$ AAGTAGATAAAAACACAATAAATACTCATATGAAAGGCTAGGGAAATATCTATGAAGCAACGTGTCTTAAACCCAACCGAAAA CAAGAGTACAAAATACACACTCAGAATATATGCAATACAAACTAAGAATTTATTGAAGATGTGAGAAAATATAAAAGTGAAGA GTTGATGGAAGTTTATTCTACTTTGCTTTCAGGTGGTGGAAGGATATGAGGTTTCAAGAGAC

wHaGAS1, Abschnitt der genomischen (+)-Strang DNA-Sequenz. Introns sind unterstrichen dargestellt, das Startcodon ist fett gedruckt.

 ${\tt ATG} {\tt GCAGCAGTTGGAGCCAGTGCTACCCCCTTAACAAACACCAAAAGCACTGAAGAGCCGGTGCGTCCTGTGGCCAACTTTCC$ GACGGAACCAAAACACCAAGGGGTTAAGAGGATTTGCTGATCCCCAATCACTAGAATTTGTTGGTTTTTTATACATAAAAGTA TGAGTTGTTTCCTAAAGAGAAACTCATGATAACCCATACAAAAAAAGTTCTGGTTCTGTCACCGTACATGTTACAATCGCATG AGGTTATGTATGTTGTTTTTTTTTTATTAAGAAAATTTGGTGTGTTCTTTTTCTAGATGAAGAAGAATATGCTGAAGCCATGGAAG ${\tt AGCCAAAAGAACAAGTGAGAAAAATTGATCTTGGATCCTACAATGGATTCAAACAAGAAATTGAGCTTGATTTATACTGTTCAC$ CGTCTTGGTCTAACATGATGTTCTTTAAAGAGATTGAAGGCCAGCTTGATAGACTTTTCAAAGAGTTCAACTTGGAAGATTA TGTTGAAGTTGATTTATACACAAATTTCGACCAACTTTCAAGCTTTCCGACACCTTGGTTACAAAACTATCTTGTGGTACTGGAT ATCTTTTATGGTTGCTATAAATTGATTTACAACATAAATTACTCCTATCTTCTCTTTTTAAAGATAATCTTTGATAAATTTGT GACTATACAGATGTGTTTAACAAATTCAAGAACGACGACTCGAATACATTCAAGGATTCTATTACCAGTGATGTGAGGAGGAGTAT GTTAGGCTTATATGAATCTGCACAATTGAGATTGAAAGGAGAAAAGATTCTAGACGAAGCCTCGGCATTCACAGAAACTAAAC TGAAGAGTTTAGTAAAGACTCTGGAAGGCAGTCTTGCACAACAGGTGAAACAATCCTTGAAAAGACCATTTCATCAAGGGATG ${\tt CCAATGGTAGAGGCAAGGCTATATTTCTCCCAACTATCAAGAAGAATGCTCCAGACATGACTCACTACTAAAACTTGCAAAACT$ TCACTTCAACCATTTGCAGCTACAACAAAAGGAAGAACTTAGGATTGTTTCACAGTGAGCACATATCATCCTATAAATTGAAA TTAATACTCATGCATTATTTTACCATGCATGAAGCAAAGTGTCTTAAACCCCCAAACAACCGAAAACCGGAAAACAGGAATACAA AATTCATACTTAAAATATATGCAATAAAAACTGAGATTTTATTGTAGATGTGAATATAAAGGTGAAAAGTTGATGGAAGTTTC TTCTACTTTGCTTTCAGGTGGTGGAAGGATATGAGGTTTCAAGAGAC

CYP71AVS, Helianthus annuus Cytochrom P450 Monooxygenase, mRNA-Sequenz (unveröffentlicht). Start- und Stoppcodon sind fett gedruckt.

ATGGAAGTCTCCCTCACCACTTCCATTGCACTAGCCACCATTGTCTTCCTTTACAAGCTCCTCACTCGTCCCACATCCTC CAAAAACCGCCTTCCTGAGCCATGGCGTCTCCCCCATCATCGGTCACATGCATCATCTGATCGGCACAATGCCACATCGCGGGGG TTATGGACTTAGCCCGAAAATACGGATCATTGATGCATCTACAGCTCGGTGAAGTCTCCGCAATCGTAGTATCCTCTCCAAAA TGGGCCAAAGAGATCCTAACCACATACGACATCCCCTTCGCAAACAGACCCGAGACTCTAACGGGTGAGATCATCGCATATCA ${\tt CAACACGGACATAGTTCTTGCACCCTACGGCGAATACTGGCGACAATTACGCAAACTTTGCACTCTAGAGCTTCTAAGTGTAA}$ AGAAAGTGAAGTCATTCCAATCACTCCGTGAAGAGGAATGTTGGAACTTGGTTCAGGAAATCAAAGCATCCGGTTCGGGTACA GAAACAGTTTACTGAGATTGTGAAGGAGATATTGAGAGAAAACTGGTGGGTTTGATGTGGCGGATATCTTTCCATCTAAGAAGT GAACACCTGTTAGTAAGTCGAGTAAAGTGAATGAGACTTTGCTTGATGTGTTGCTGAGGCTTAAAAATAGTGAGGAGTTCCC TTTGACTGCTGATAATGTTAAAGCCATCATTTTGGACATGTTCGGAGCCGGAACCGACACCTCCTCCGCGACAGTCGAATGGG CGATTTCCGAGCTAATAAGGTGTCCGCGAGCGATGGAGAAGGTACAAGCCGAACTAAGGCAAGCGTTGAACGGTAAAGAGCGA ATCAAAGAAGAAGAAATTCAAGACTTGCCCTACTTAAACCTTGTGATCCGAGAAACACTACGGTTGCATCCTCCACTACCTTT GGTCATGCCAAGAGAGTGCCGACAGGCAATGAATCTAGCTGGATACGATGTAGCCAACAAGACCAAACTCATTGTCAACGTGT TTGCAATAAACCGGGATCCCGAATACTGGAAAGACGCTGAAAGTTTCAACCCCGAGAGGTTTGAAAACAGCAACAACAACCATT ATGGGTGCGGATTATGAGTATCTTCCGTTTGGGGCTGGAAGGAGGATGTGTCCAGGATCGGCACTCGGTCTAGCAAACGTGCA ACTACCGTTGGCTAATATACTTTATTACTTTAAGTGGAAACTCCCCAATGGTGCTAGCCATGACCAACTTGACATGACCGAGA GCTTTGGAGCCACGGTTCAAAGGAAGACTGAGTTGATGCTTGTACCAAGTTTTGCACTAGTATCGAtqGATTACAAGGATGAC GACGATAAGATC**TGA**

CYP71AVL, Lactuca sativa Cytochrom P450 Monooxygenase, mRNA-Sequenz (unveröffentlicht). Start- und Stoppcodon sind fett gedruckt.

ATGGAGCTTTCAATAACCACCTCCATTGCTCTCGCCACCATCGTCTTCCTTTACAAGCTTGCCACTCGTCCCAAATCCAC TAAAAAGCAACTTCCAGAGGCATCGCGACTCCCCATAATCGGTCACATGCACCATCTAATCGGTACAATGCCACATCGTGGTG TTATGGATTTAGCAAGAAAGCATGGATCTTTGATGCATCTGCAGCTTGGTGAGGTCTCCGACAATCGTGGTGTCATCTCCAAAA TGGGCTAAAGAGATTTTAACGACTTACGACATTACCTTCGCTAACAGGCCTGAGACCCTAACTGGTGAGATCATTGCATATCA AGAAAGTTAAGTCGTTTCAGTCAATTCGTGAAGAGGAGTGCTGGAATTTGGTTAAAGAAGTTAAGGAGTCAGGGTCAGGGAAA CCGATCAATCTTTCAGAGAGGATTTTTCACGATGATAGCGACTATATTGAGTCGAGCAGCGTTTGGAAAAGGAATCAAGGATCA AAGAGAGTTTACAGAGATTGTTAAAGAGATCTTGAGGCAAACTGGTGGTTTTGATGTGGCGGATATCTTTCCTTCGAAGAAAT ${\tt TCCTTCATCATCTTTCCGGCAAGAGGGCTAGGTTAACCAGTATTCACAAAAAGCTTGATAATTTGATCAACAACATCGTCGCT$ GAACACCATGTTAGCACCTCAAGCAAAGCCAACGAGACACTTCTCGATGTGCTTCTACGGCTTAAAGATAGCGCTGAGTTCCC ATTAACAGCCGATAACGTTAAAGCCATTATTTTGGATATGTTCGGAGCTGGAACAGACACTTCATCCGCCACAGTAGAATGGG ATCCAAGAGGAGGACATTCAAGACCTCGCATACCTAAACCTCGTGATCCGAGAAACCCTCCGCTTACACCCTCCACTACCATT GGTTATGCCACGAGAATGCCGTGAGCCAGTGAACTTAGCAGGTTATGAAATAGCCAATAAGACCAAACTTATTGTCAATGTCT TTGCAATCAACAGAGACCCTGAATACTGGAAAGACGCTGAGGCTTTCATCCCTGAGAGGTTTGAAAACAACCCCTAATAACATC ATGGGAGCAGATTATGAGTATCTTCCATTTGGAGCTGGGAGAAGGATGTGTCCTGGAGCTGCACTAGGGTTAGCTAATGTTCA ${\tt GCTTTGGAGCCACGGTTCAAAGGAAGACTGAGTTGTTACTCGTACCGAGTTTT{\tt TAG}$

7.2 Plasmidkarten

pET32-HaGAS1, pET32-HaGAS2, pET32-HaCS



pESCLeu2d::HaGAS2, pESCLeu2::HaGAS2, pESC-Leu2d::LsLTC2, pESCLeu2d::HaCS, pESCLeu2d::HaCSThio



pESCLeu2d::HaGAS1



pESCUra::CYP71AVS/CPR, pESCUra::CYP71AVL/CPR,



bla: Amp^r pUC: Plasmid University of California CYC1: Cytochrom C1 Gal1 / Gal10 Promotoren: durch Galaktose induzierbare Promotoren ADH1: Alkohol-Dehydrogenase 1 Ura3: 3Orotidin-5'-monophosphat-Decarboxylase als Selektionsmarker

Danke...

An erster Stelle gilt mein besonderer Dank Herrn Prof. Spring für die Bereitstellung des Themas dieser Arbeit und die vielen Freiheiten, die mir stets bei der Durchführung der Experimente gewährt wurden. Sehr geschätzt habe ich seine stete Erreichbarkeit und sowie seine Hilfs- und Diskussionbereitschaft die zur Überwindung aller großen und kleinen Probleme des Laboralltags beigetragen haben. Bei dem Vorhaben einen Teil meiner Arbeit in Kanada durchzuführen, gewährte mir Herr Prof. Spring jederzeit seine volle Unterstützung. In diesem Zusammenhang muss Herr Prof. Ro von der Universität Calgary unbedingt erwähnt werden. In der Zeit in seinem Labor habe ich viele neue Einsichten in die Molekularbiologe bekommen, nicht nur durch die durchgeführten Experimente, sondern auch durch die vielen anregenden Diskussionen und Ideen während vieler Kaffeepausen oder so manchem Abend im Labor.

Herrn Prof. Schaller möchte ich für die Bereitschaft zur Übernahme des Zweitgutachtens danken, sowie der Möglichkeit zur Durchführung von Experimenten in seinem Labor. Dabei darf auch Benjamin Pickel nicht unerwähnt bleiben, der mir dabei hilfreich zur Seite stand.

Froh war ich über die Hilfe und Zeit von Stefan Fox (Institut für organische Chemie), Roland von der Racke und Thomas Knapp (Institut für Lebensmittelchemie) bei der Analyse von Produkten "meiner" Enzyme. Dass es überhaupt dazu kommen konnte, verdanke ich auch Susanne Neefe aus dem Institut für Mikrobiologie. Sie hat immer und immer wieder Geräte im Kühlraum unter ihrem Namen für mich reserviert. In einer früheren Phase der Experimente erleichterte Andreas Walz die Arbeit, indem er Laborräume und Geräte für viele Tage dauernde gentechnische Arbeiten zur Verfügung stellte, als dies in der Botanik noch nicht erlaubt war.

Bei Frank Brändle und Timo Hammer bedanke ich mich für die stets gute Laune und netten Gespräche, die lustigen Stunden im Labor und für die immer verlässliche Hilfe. Genauso danke ich Reinhard Zipper, auf den ich ebenfalls bei allen kleinen und großen technischen Problemen zählen konnte

Ganz besonders herzlich möchte ich mich bei Katrin für Ihre Unterstützung, Aufmunterung und Geduld bedanken. Ein ebensolcher Dank geht an meine Eltern, die jederzeit hinter mir standen und mir diese Arbeit erst ermöglicht haben.
Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name:	Jens Christian Göpfert
Geburtsdatum:	07.09.1977 in Sindelfingen
Familienstand:	ledig
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Schulbildung	
1984 – 1988	Grundschule in Weil der Stadt
1988 – 1997	Johannes-Kepler-Gymnasium in Weil der Stadt
Zivildienst	
1997 – 1998	Krankenhaus Leonberg
Studium	
10/1998 – 12/2003	Studium der Biologie, Universität Hohenheim, Stuttgart, Diplomarbeit zum Thema: Entwicklungsabhängige Natur- stoffbildung und Proteinexpression in den Drüsenhaaren der Sonnenblume
wissenschaftliche Tätigkeit	
01/2004-12/2007	Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Universität Hohenheim, Stuttgart, Institut für Botanik, Fachgebiet Biodiversität und pflanzliche Interaktion.
02/2006	Erwerb des Projektleiterscheines gem. §15 GenTSV
04/2007 – 07/2007	Forschungsaufenthalt an der Universität Calgary, Kanada auf Einladung von Prof. Dr. Dae-Kyun Ro
04/2006-02/2007 und 07/2007-02/2008	Lehrbeauftragter an der PH Ludwigsburg (Botanik; Genetik und Molekularbiologie)

Wissenschaftliche Publikationen

Publikationen

Göpfert, J.C., Conrad, J. & Spring, O. (2006) 5-Deoxynevadensin, a novel flavone in sunflower and aspects of biosynthesis during trichome development. *Natural Products Communications*, **1** (11), 335 – 340.

Göpfert, J.C., Heil, N., Conrad, J. & Spring, O. (2005) Cytological development and sesquiterpene lactone secretion in capitate glandular trichomes of sunflower. *Plant Biology*, **7** (2), 148-155.

Vorträge

Göpfert, J.C. & Spring, O. (2005) Cytological development, metabolite secretion and molecular identification of terpenoid cyclases in sunflower glandular trichomes. *Terpnet*, Wageningen (Niederlande), April 2005

Göpfert, J.C. & Spring, O. (2005) Entwicklungsabhängige Naturstoffbildung und Identifikation von Terpensynthasen in den Drüsenhaaren der Sonnenblume. *Sektionstreffen Pflanzliche Naturstoffe der Deutschen Botanischen Gesellschaft*, Kaub am Rhein, März 2005

Posterpräsentationen

Göpfert, J.C. & Spring, O. (2007) Genomic, proteomic and metabolomic studies on terpenoid and flavonoid biosynthesis in sunflower glandular trichomes. *Botanikertagung*, Hamburg, September 2007

Heller-Dohmen, M., Göpfert, J.C., Hammerschmidt, R. & Spring, O. (2006) Characteristics of the mycovirus in Plasmopara halstedii, the downy mildew pathogen of the sunflower (*Helianthus annuus*). *Joint Meeting of The American Phytopathology Society* (*APS*), *The Canadian Phytopathology Society* (*CPS*) and *Mycological Society of America* (*MSA*), Quebec, Kanada, Juli/August 2006

Göpfert, J.C. & Spring, O. (2006) Sesquiterpene synthases, a novel tool for phylogenetic studies in Helianthinae. *The International Compositae Alliance*, Barcelona, Spanien, Juli 2006

Göpfert, J.C. & Spring, O. (2005) Cytological development, metabolite secretion and molecular identification of terpenoid cyclases in sunflower glandular trichomes. *XVII International Botanical Congress*, Wien (Österreich), Juli 2005

Göpfert, J.C., Heil, N. & Spring, O. (2004) Metabolic studies on developing trichomes of sunflower. *Botanikertagung*, Braunschweig, September 2004