Neue Cytochrom P450 Enzyme des Sesquiterpenlacton Stoffwechsels der Sonnenblume (*Helianthus annuus* L.)

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

Fakultät Naturwissenschaften

Universität Hohenheim

Institut für Botanik (210)

Fachgebiet Biodiversität und pflanzliche Interaktion

vorgelegt von

Maximilian Frey

aus Freudenstadt

2016

Dekan:	Prof. Dr. Heinz Breer
1. berichtende Person:	Prof. Dr. Otmar Spring
2. berichtende Person:	Prof. Dr. Armin Huber
Eingereicht am:	19.12.2016
Mündliche Prüfung am:	07.02.2017

Die vorliegende Arbeit wurde am 26.01.2017 von der Fakultät Naturwissenschaften der Universität Hohenheim als „Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften“ angenommen.

Abkürzungsverzeichnis VIII

1 Einleitung 2

1.1 Terpene 2

1.2 Strukturmerkmale von Sesquiterpenen und Sesquiterpenlactonen 2

1.3 Die Verbreitung der Sesquiterpenlactone 5

1.4 Sesquiterpenlactone - Bioaktivität und pharmakologische Bedeutung 6

1.4.1 Funktionelle Gruppen und Reaktivität 6

1.4.2 Bioaktivität: Funktionen der Sesquiterpenlactone in der Natur 7

1.4.3 Bioaktivität: Pharmakologisches Potential 9

1.5 Die Sesquiterpenlactone von *Helianthus annuus* 10

1.6 Cytochrom P450 Enzyme und Terpenstoffwechsel 11

1.7 Der Sesquiterpenlacton Stoffwechselweg in der Sonnenblume 12

1.8 Ziele der Arbeit 14

2 Material und Methoden 16

2.1 Pflanzenmaterial 16

2.1.1 Pflanzenmaterial aus *Helianthus annuus* Kultivar HA300 16

2.1.2 *Nicotiana benthamiana* 17

2.2 Chemikalien 17

2.2.1 Sesquiterpenlacton-Referenzsubstanzen 17

2.2.2 Herstellung synthetischer STL Addukte 18

2.3 Naturstofftechniken 19

2.3.1 Extraktion von Sesquiterpenlactonen aus transformierten Tabakblättern 19

2.3.2 Extraktion von Sesquiterpenlactonen aus Hefe-Kulturen 19

2.3.2.1 Extraktion analytischer Hefekulturen 19

2.3.2.2 Extraktion präparativer Hefekulturen 19

2.3.3 Hochleistungsflüssigchromatographie 20

2.3.3.1 Analytische Hochleistungsflüssigchromatographie 20

2.3.3.2 Präparation mittels Hochleistungsflüssigchromatographie 20

2.3.4 Flüssig-Chromatographie /Massenspektroskopie 21

2.3.4.1 LC-MS System 1 21

2.3.4.2 LC-MS System 2 21

2.3.4.3 LC-MS System 3 21

2.3.5 Kernspinresonanzspektroskopie 22

2.3.6 Gaschromatographie/Massenspektroskopie 22
2.4 Isolierung von Nukleinsäuren 23
2.4.1 Isolation von genomischer DNA aus Pflanzenmaterial 23
2.4.2 Isolation von Plasmid DNA aus *E. coli* 23
2.4.3 Isolation von DNA aus Agarosegelen 23
2.4.4 Isolation von Gesamt-RNA 24
2.4.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren 25
2.5 DNA Techniken 26
2.5.1 Oligonukleotide 26
2.5.1.1 Oligonukleotide für Klonierungen 26
2.5.1.2 Oligonukleotide für quantitative PCR 27
2.5.1.3 Oligonukleotide für Sequenzierungen und Kontroll-Reaktionen 28
2.5.1.4 Oligonukleotide für RACE PCR 29
2.5.2 Synthese von cDNA 30
2.5.3 Synthese von RACE-Ready cDNA 31
2.5.3.1 Standard PCR Programme 31
2.5.3.2 RACE PCR 32
2.5.3.3 Kolonie-PCR 33
2.5.3.4 Quantitative PCR 34
2.5.4 Auftrennung von Nukleinsäuren 36
2.5.4.1 Gelelektrophorese 36
2.5.4.2 Kapillarelektrophorese 37
2.5.5 Sequenzierungen 37
2.6 Klonierungstechniken und -Strategien 37
2.6.1 Restriktionsverdau 38
2.6.2 Ligation 40
2.6.3 USER-Cloning 41
2.6.4 In-Fusion-HD Klonierung 42
2.6.5 StrataClone Klonierungs-System 42
2.6.6 Klonierungen in pJET2.1/blunt Vektor 43
2.7 Mikrobiologische Methoden 44
2.7.1 Plasmide 44
2.7.2 Bakterien- und Hefe-Stämme 45

2.7.3 Kulturmedien und Antibiotika ... 46
2.7.4 Transformation von *Escherichia coli* ... 47
2.7.5 Transformation von *Agrobacterium tumefaciens* ... 47
2.7.6 Transformation von *Saccharomyces cervisiae* ... 48
2.7.7 Transiente Transformation von *Nicotiana benthamiana* ... 48
2.7.8 Hefe-Expressionskulturen ... 48
2.7.9 Glycerinkulturen ... 49
2.8 *In silico* Techniken ... 49
2.8.1 Programme für die Bearbeitung von Sequenzierungen ... 49
2.8.2 Programme für Primerkonstruktion ... 50
2.8.3 Programme für Alignments und phylogenetische Berechnungen ... 50
2.8.4 Programme für die Untersuchung der *Helianthus* Genomdaten ... 50
2.8.5 Referenzen und Nomenklatur von Enzymprodukten ... 50
3 Ergebnisse ... 52
3.1 Identifizierung von Cytochrom P450 Kandidaten-Genen - Vorbemerkungen ... 52
3.1.1 Re-Evaluierung von Enzym Kandidaten ... 53
3.1.2 Selektion von Cytochrom P450 Kandidatensequenzen aus Transkriptom Datenbank ... 54
3.1.3 Aufklärung der offenen Leserahmen sowie 3´- und 5´-untranslatierter Regionen mittels RACE-PCR ... 55
3.1.4 Enzym-Kandidaten für heterologe Expression und ihre mögliche phylogenetische Beziehung ... 55
3.2 Enzymcharakterisierung in *Saccharomyces cervisiae* ... 58
3.2.1 Etablierung und Optimierung des Expressionssystems, sowie Klonierung der Substratvektoren ... 58
3.2.2 Costunolid wird von Kandidat M33 in 14-Hydroxy Costunolid umgewandelt ... 59
3.2.3 Expression von Kandidat M4 mit Germacren A Säure Substratvektor ... 61
3.2.4 Expression von Kandidat M4 mit 8β-Hydroxy-Germacren A Säure Substratvektor ... 62
3.2.5 Zusammenfassung der Ergebnisse Expression in Hefe ... 63
3.3 Rekonstruktion des STL Stoffwechselweges und Enzym-Charakterisierung in *Nicotiana benthamiana* ... 66
3.3.1 Etablierung des Stoffwechselweges zu Costunolid mit HaGAS1, HaGAO und LsCOS *in planta* ... 66
3.3.1.1 Grundlegende Schritte der Stoffwechsel Rekonstruktion: Expression von p19 und DXS ... 66
3.3.1.2 Expression von HaGAS1 ... 67
3.3.2 Einbau der ersten P450 Enzyme in den Stoffwechselweg: HaGAO und LsCOS ... 68
3.3.3 Umwandlung von Germacren A Säure in Costunolid: Vergleich von LsCOS und Kandidat M4 ... 71
3.3.4 Costunolid wird *in planta* von Kandidat M33 in 14-Hydroxy-Costunolid umgewandelt ... 72
3.3.5 HaG8H konvertiert *in planta* Germacren A Säure zu einem Sesquiterpenlacton ... 74

3.3.6 Zwei alternative Wege zu 8β-Hydroxy-Costunolid ... 76
3.3.7 Der Abgleich mit synthetischen Sesquiterpenlacton-Addukten ermöglicht die eindeutige Identifizierung der *in planta* entstanden Addukte ... 79
3.3.8 Zusammenfassung der Stoffwechsel Rekonstruktion in *Nicotiana benthamiana* ... 81
3.4 Expressionsmuster von Enzymen der Sesquiterpenlacton-Biosynthsese ... 83
3.5 Struktureller Vergleich der Cytochrom P450 Enzyme ... 85
3.6 Phylogenetische Einordnung der charakterisierten Cytochrom P450 Enzyme ... 87
3.7 Einordnung von Cytochrom P450 Enzymen und Terpensynthasen im Genom von *Helianthus annuus* ... 88
4 Diskussion ... 90
4.1 Suche nach neuen Cytochrom P450 Enzymen ... 90
4.2 Stoffwechsel-Rekonstruktion durch heterologe Expression ... 90
4.3 Nachweis der Enzymprodukte ... 91
4.4 Stoffwechsel-Rekonstruktion- Möglichkeiten der Optimierung ... 94
4.5 *Helianthus annuus* Germacren A Säure 8β-Hydroxylase: Lacton-Bildung bei der Expression in Tabak ... 95
4.6 Kandidat M4: Synthese von Costunolid ... 96
4.7 Kandidat M33: Eine Costunolid 14-Hydroxylase ... 97
4.8 Kandidat S2: Eine Eupatolid Synthase ... 98
4.9 Modell zur Stellung der neu charakterisierten Enzyme im STL-Metabolismus von *Helianthus annuus* ... 99
4.9.1 Position der Enzyme im Genom von *Helianthus annuus* ... 99
4.9.2 Sesquiterpenlacton-Metabolismus in inneren Geweben ... 100
4.9.3 Sesquiterpenlacton-Metabolismus in köpfchentragenden Drüsenhaaren ... 101
4.10 Einsatzmöglichkeiten der Enzymprodukte ... 104
4.11 Ausblick ... 104
5 Zusammenfassung ... 106
6 Literatur ... 110
7 Anhang ... 120
7.1 Sequenzinformationen ... 121
7.1.1 Bekannte Gene ... 121
7.1.2 Sequenzinformationen von Enzymkandidaten ... 122
7.2 Übersicht über Enzymprodukte, sowie Nebenprodukte und Zwischenprodukte ... 129
7.3 Zusatzinformationen zur Enzymcharakterisierung in Hefe ... 134
7.4 Zusatzinformationen zur Enzymcharakterisierung in *Nicotiana benthamiana* ... 135
7.5 Rohdaten LC-MS Extrakte *Nicotiana benthamiana* ... 137

7.6 Zusatzinformationen zur quantitativen PCR 147

Vorbemerkungen

(1)

Im Laufe der Arbeitstätigkeit wurde eine Publikation verfasst, die nicht Teil der eingereichten Dissertation ist:

Frey, M. & Spring, O., 2015. Molecular traits to elucidate the ancestry of *Helianthus* x *multiflorus*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 58, pp.51–58.

(2)

Die Datenerhebung im Bereich der gewebespezifischen Expression einzelner Enzyme der STL Biosynthese und Verteilung bestimmter Metabolite wurde durch parallel durchgeführte Arbeiten unterstützt, die von mir mit angeleitet und konzipiert wurden. Diese Bereiche sind in der vorliegenden Arbeit als solche kenntlich gemacht und entstammen der Masterarbeit von:

Schmauder, K., 2015. Genexpressions- und Metabolitmuster von Sesquiterpenlactonen in Keimlingen der Sonnenblume. *Masterarbeit, Institut für Botanik, Universität Hohenheim*.

(3)

Mit dem Dissertations-Projekt verbunden ist auch die von mir mit betreute Bachelorarbeit von

Lackus, N., 2013. Expressionsstudien zur Sesquiterpenlacton-Biosynthese in Sonnenblumen. *Bachelorarbeit, Institut für Botanik Universität Hohenheim.*

Ergebnisse daraus lieferten wichtige Anhaltspunkte für die Verteilung der Genexpression von Enzymen, aus dieser Arbeit sind aber keine Daten enthalten.

Abkürzungsverzeichnis

8-Epi	8-Epixanthatin
8β-OH-GAA	8β-Hydroxy-Germacren A Säure
AaCR	*Artemisia anuua* Cytochrom P450 Reduktase
ACN	Acetonitril
Amp	Ampicillin
AP	Adapter Primer
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaar(e)
Car	Carbenicillin
Cos	Costunolid
CV	Varianzkoeffizient
Cys	Cystein
DAD	Dioden Array Detektor
DCL	Dehydrocostuslacton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DH	Drüsenhaare
DMAPP	Dimethylallyl-Pyrophosphat
DXS	1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat-Synthase, *Coleus forskohlii*
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF 1α	Elongationsfaktor 1α
EIC	Extrahiertes Ionenchromatogramm
ESI	Elektrospray Ionisation
FPP	Farnesylpyrophosphat
GAA	Germacren A Säure
GGPPS	Geranylgeranyl Diphosphat Synthase, *Coleus forskohlii*
GSH	Glutathion
GSP	genspezifischer Primer
GST	Glutathion-S-Transferase
HaCS	*Helianthus annuus* Cadinen-Synthase
HaG8H	*Helianthus annuus* Germacren A Säure 8β-Hydroxylase
HaGAO	*Helianthus annuus* Germacren A Säure Oxidase
HaGAS1	*Helianthus annuus* Germacren A Synthase 1
HaGAS2	*Helianthus annuus* Germacren A Synthase 2
HaGAS3	*Helianthus annuus* Germacren A Synthase 3
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
IPP	Isopentenyl-Pyrophosphat
J	Kopplungskonstante (NMR)
Kan	Kanamycin
KDH	köpfchentragende Drüsenhaare

LB	lysogeny broth
LiAc	Lithiumacetat
LsCOS	*Lactuca sativa* Costunolid Synthase
LsGAS2	*Lactuca sativa* Germacren A Synthase 2
MEP	2C-Methyl-D-Erythrithol 4-Phosphat
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
ML	Maximum Likelihood
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MVA	Mevalonat
NaOH	Natriumhydroxid
NF-κB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NGSP	nested genspezifischer Primer
nt	Nucleotid
Ø	Durchmesser
p19	*Tomato bushy stunt virus* RNA silencing suppressor p19
P450	Cytochrom P 450 Enzym
PEG	Polyethylenglykol
PVDF	Polyvinylidendifluorid
PVP	Polyvinylpyrrolidon
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
qTOF	Quadrupole Time-of-Flight
RACE	rapid amplification of cDNA ends
Rif	Rifampicin
RPKM	*Reads per kilo base per million mapped reads*
RT-PCR	reverse Transkriptase PCR
SC	Synthetic Complete
SRS	Substrat-Erkennungsbereich
ssDNA	Einzelsträngige DNA
ST	Sesquiterpen
STL	Sesquiterpenlacton
TBE	Tris(hydroxymethyl)aminomethan-Borsäure-EDTA Puffer
TFA	Trifluoressigsäure
TMD	Transmembrandomäne
Tom	Tomentosin
Tp8878	*Tanacetum parthenium* Costunolid/ Parthenoild 3β-Hydroxylase
TpCOS	*Tanacetum parthenium* Costunolid Synthase
TpPTS	*Tanacetum parthenium* Parthenoild Synthase
TPS	Terpensynthase
Tricin	N-(Tri(hydroxymethyl)methyl)glycin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
u	Atomare Einheit
U	Units

USER	Uracil-spezifisches Exzisions-Reagenz
UTR	nicht translatierte Region
v	Volumen
w	Gewicht
YEP	*yeast extract peptone*
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactosid
µF	Mikrofarad

1 Einleitung

1.1 Terpene

Neben Alkaloiden und Phenylpropanoiden stellen die Terpenoide mit über 22.000 Verbindungen eine der größten Gruppen von Sekundärmetaboliten dar (Wink 2010). Entscheidend für das Verständnis der Synthese der Terpene war die als Isopren-Regel bezeichnete Entdeckung, dass die Biosynthese aller Terpene aus den selben elementaren C5-Körpern, den Isopren-Bausteinen, erfolgt (Ruzicka 1953). Die Terpene werden nach der Anzahl der Terpen-Einheiten eingeteilt, eine Terpen-Einheit (C10) besteht aus zwei Isopren-Einheiten (C5). Dementsprechend sind Monoterpene (C10) aus zwei, Sesquiterpene (C15) aus drei, Diterpene (C20) aus vier, Triterpene (C30) aus sechs, Tetraterpene (C40) aus acht und Polyterpene aus mehr als acht Isopren Einheiten aufgebaut (Pichersky & Raguso 2016). Die Vorläufer der Terpensynthese sind in allen Fällen die Verbindungen IPP (Isopentenyl-Pyrophosphat) und DMAPP (Dimethylallyl-Pyrophosphat), die aktivierten Formen des Isoprens (Pichersky & Raguso 2016).

Das Modell für die Synthese der Grundbausteine der Terpenbiosynthese IPP und DMAPP in Pflanzen ist im Laufe der Jahre immer wieder erweitert worden und lässt sich aktuell in drei metabolische Konstellationen zusammenfassen (Lipko & Swiezewska 2016): 1. Der im Cytosol lokalisierte MVA-Weg (Mevalonat-Weg) synthetisiert IPP und DMAPP für die Synthese von Tri- und bestimmten Polyterpenen, ausgehend von zwei Acetyl-CoA Einheiten über die Zwischenstufe Mevalonat (MVA) (Lipko & Swiezewska 2016). 2. Der in den Plastiden lokalisierte MEP-Weg (Methylerythritolphosphat-Weg) synthetisiert IPP und DMAPP für die Synthese von Mono- und Tetraterpenen, ausgehend von Pyruvat und D-Glycerinaldehyd 3-Phosphat über das Zwischenprodukt 2C-Methyl-D-Erythrithol 4-Phosphat (MEP) in den Plastiden (Eisenreich et al. 2001; Lipko & Swiezewska 2016). 3. IPP und DMAPP können für die Synthese von Sesqui-, Di- und bestimmten Polyterpenen durch beide Stoffwechselwege beigesteuert werden (Lipko & Swiezewska 2016). Es findet ein Austausch von IPP zwischen den beiden Stoffwechselwegen (*metabolic crosstalk*) über die plastidäre Membran hinweg statt (Bick & Lange 2003). Beispielsweise wird das Sesquiterpenoid Artemisinin aus einer IPP Einheit aus dem MEP-Weg sowie einer IPP- und einer DMAPP-Einheit aus dem MVA-Weg gebildet (Schramek et al. 2010).

1.2 Strukturmerkmale von Sesquiterpenen und Sesquiterpenlactonen

Die Sesquiterpene (ST) sind eine Stoffgruppe innerhalb der Terpene (Abb. 1A) mit C15 Grundgerüst, die sich alle vom Stoffwechsel-Intermediat Farnesylpyrophosphat (FPP) ableiten (Abb. 1B). Bis heute sind über 11.000 Sesquiterpen-Verbindungen beschrieben, davon über 5.000

Sesquiterpenlactone (Schmidt 2006). Anwendungsmöglichkeiten als Duftstoffe (Cankar et al. 2011), Biodiesel (Peralta-Yahya et al. 2011) oder im pharmazeutischen Bereich (siehe 1.4.3) machen Sesquiterpene zu interessanten Verbindungen für die biotechnologische Produktion und wirtschaftliche Nutzung.

Das einfachste, offenkettige, Kohlenstoff-Grundgerüst der Sesquiterpene ist das Farnesen. Aus diesem leiten sich eine Reihe mono- und bicyclischer Strukturen ab. Typische Strukturen sind beispielsweise die Germacran- (C10-Ring), Eudesman- (C6/C6-Ring), Eleman- (C6-Ring), Guaian- (C7/C5-Ring) und Xanthan- (C7-Ring) Grundgerüste (Abb. 1C; nach Seaman 1982). Bei Sesquiterpenlactonen ist an das Grundgerüst ein herterozyklischer C5 Ring, der γ-Lacton-Ring, kondensiert. Dieser kann, wie für das Germacran-Grundgerüst gezeigt, über die C6-C7, oder die C7-C8 Bindung an das Germacren-Grundgerüst kondensiert sein (Abb. 1C) (Seaman, 1982).

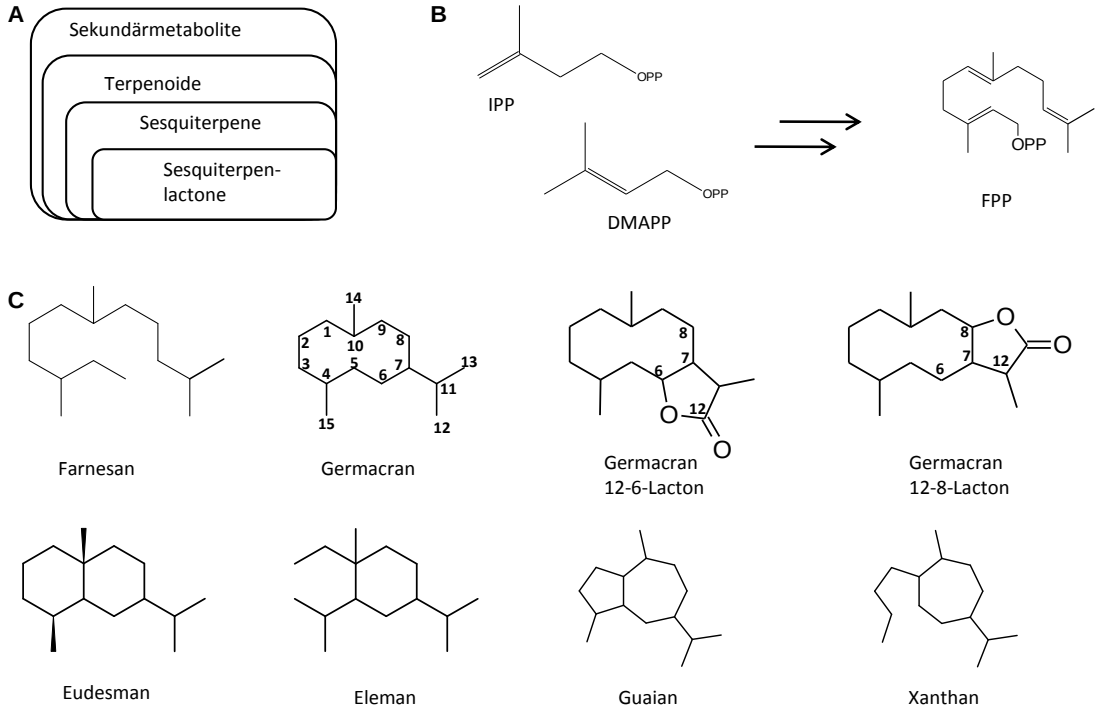


Abb. 1: Überblick Sesquiterpenlactone

A, Einordnung der Sesquiterpenlactone (STL) innerhalb der pflanzlichen Sekundärmetabolite; **B,** Vereinfachtes Schema zur Bildung von Farnesylpyrophosphat aus IPP und DMAPP; **C,** Kohlenstoff-Grundgerüste von Sesquiterpenen (Auswahl; Seaman 1982). Für das Germacran Grundgerüst sind die Nummerierung der Kohlenstoff Atome sowie zwei Möglichkeiten der Veresterung zum Sesquiterpenlacton gezeigt. Die C-C Doppelbindungen sind nicht dargestellt.

Um verschiedene Aspekte der Stereochemie der STL zu veranschaulichen, die für die vorliegende Arbeit von Bedeutung sind ist in (Abb. 2A) die Reaktion von Germacren A Säure über 6α-Hydroxy-Germacern A Säure zu Costunolid, dem einfachsten Sesquiterpenlacton, gezeigt (Ikezawa et al. 2011).

Die beiden Doppelbindungen im C-10 Ring lassen 4 stereochemisch unterschiedliche Ringfaltungen der Sesquiterpenlactone mit Cyclodeca-1(10),4(5)-dien-Skelett zu, die in der Gruppe der sogenannten Germacranolide zusammengefasst werden (Seaman 1982). Haben beide Doppelbindungen im C10-Ring eine trans(E)-Konfiguration, spricht man von einem Germacrolid, STL mit anderer Konfiguration bilden die sogenannten Heliangolide [1(10)E,4(5)Z], Melampolide [1(10)Z,4(5)E] und Cis-Cis-Germacradienolide [1(10)Z,4(5)Z] (Seaman 1982). Eine weitere Doppelbindung zwischen C11 und C13 bildet die exocyclische Methylengruppe (Seaman 1982). Costunolid entsteht durch die Einführung einer 6α-OH Gruppe und der nachfolgenden intramolekularen Esterbildung (Lactonisierung) zwischen der Säure-Gruppe am C12- und der Alkohol-Gruppe am C6-Atom (Ikezawa et al. 2011).

Da die Alkohol-Gruppe, die zur Lactonisierung beiträgt, in γ-Position relativ zur Säure-Gruppe steht, spricht man von einem γ-Lacton und da beim γ-Lacton-Ring des Costunolid die exocyclische Methylen-Gruppe in α-Position zur Lacton-Gruppe steht, wird die Bezeichnung der funktionellen Gruppe zu α-Methylen-γ-Lacton erweitert (Seaman, 1982).

Bei Costunolid handelt es sich um ein trans-Lacton, da die C7-C11 Bindung zur C6-OH Gruppe in trans-Stellung steht. Im Gegensatz dazu handelt es sich z.B. bei Inunolid (Abb. 2B) um ein C7-C8 cis-Lacton, da die Hydroxylierung der Germacren A Säure an C-8 erfolgte und die Säuregruppe mit der Hydroxylgruppe in derselben Ringebene liegen. Theoretisch möglich sind demnach vier Varianten (C6 oder C8, cis oder trans) der Ausbildung des γ-Lacton-Ringes (Rodriguez et al. 1976).

Seltener, aber auch für bestimmte Arten der Asteraceae beschrieben, ist die Ausbildung von STL mit einem sechsgliedrigen δ-Lacton-Ring (Phan Duc et al. 2016).

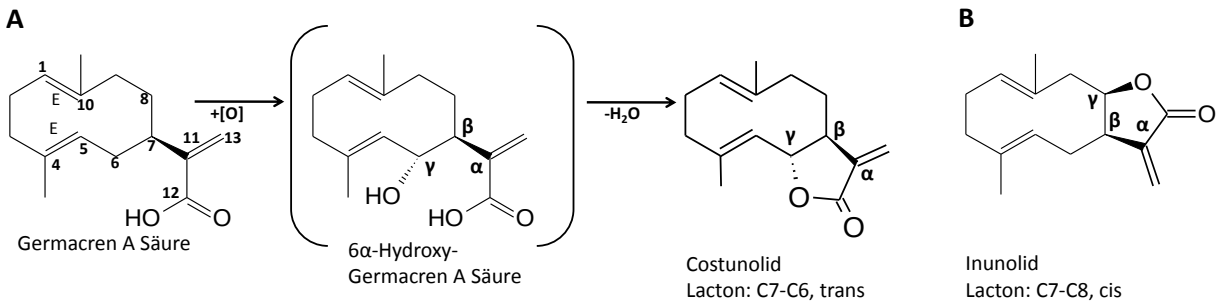


Abb. 2: Stereochemie der Sesquiterpenlactone

A, Reaktion von Germacren A Säure über das instabile Zwischenprodukt 6α-Hydroxy-Germacren A Säure zu Costunolid; **B,** über Hydroxylierung der Germacren A Säure an C-8 entstehen analog die 7,8-Lactone wie das Inunolid

Germacra-dien-olide können unter bestimmten Bedingungen Umlagerungsreaktionen durchlaufen, bei denen sich die Ringstruktur des Kohlenstoff-Skelettes ändert. Die Cope-Umlagerung ist eine Hitze-induzierte Umlagerung von 1,5-Dien Verbindungen (Cope & Hardy 1940). Germacren A wird durch die Cope Umlagerung in β-Elemen (Abb. 3A) umgewandelt (Weinheimer et al. 1970, Bowers et al. 1977). Ein saurer pH-Wert kann zur Umlagerung von Germacren A Säure zu α-, β- und γ-

Costus-Säure führen (De Kraker et al. 2001, Nguyen et al. 2010)). Dabei wandelt sich das Kohlenstoff-Grundgerüst von Germacran- zum Eudesman-Skelett.

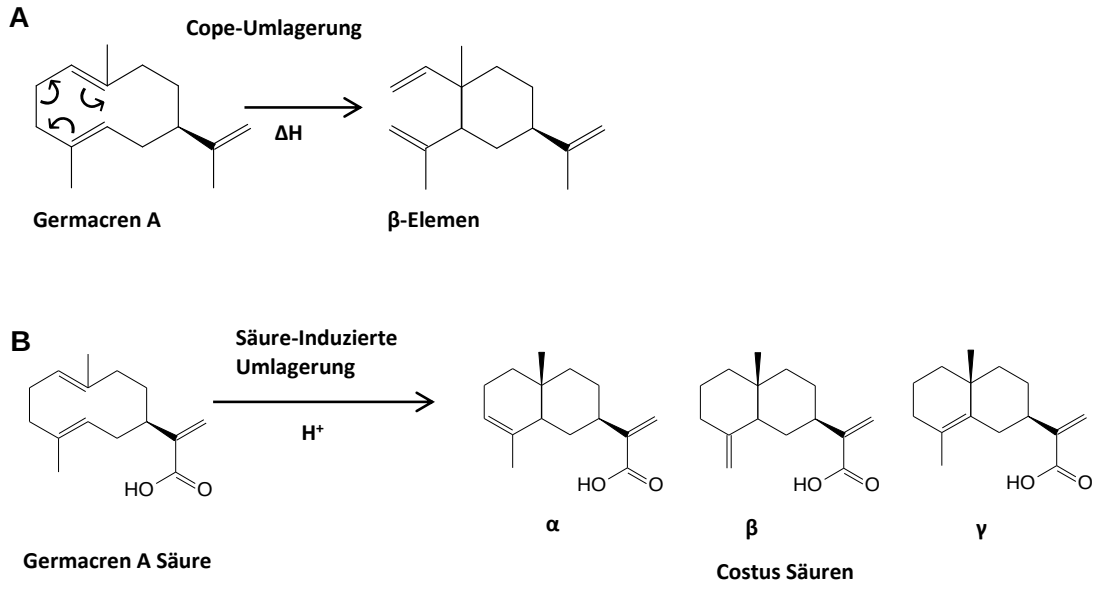


Abb. 3: Mögliche Umlagerungsreaktionen des Germacrenolid-Grundgerüstes

A, Hitze-induzierte Cope-Umlagerung von Germacren A zu β-Elemen; **B,** Säure-induzierte Umlagerung von Germacren A Säure zu α-, β- und γ-Costus-Säure

1.3 Die Verbreitung der Sesquiterpenlactone

STL wurden in einer Reihe von Pflanzenfamilien der Angiospermen, wie beispielsweise den Apiaceae, Aristolochiaceae, Magnoliaceae, Illiciaceae und den Asteraceae (Picman 1986; Rodriguez et al. 1976), nachgewiesen und kommen auch bei Lebermoosen (Knoche et al. 1969) und Pilzen vor (Magnusson & Thoren 1973). Der überwiegende Teil der bislang isolierten STL ist jedoch bei Asteraceen (Korbblütler) zu finden, wo sie aufgrund der weiten Verbreitung und strukturellen Vielfalt als ein Charakteristikum der Familie angesehen werden (Seaman 1982, Picman 1986). Die bioaktiven STL haben nicht nur zum evolutionären Erfolg der Asteraceae beigetragen, sondern erwiesen sich auch als nützliche Merkmale für chemosystematische Untersuchungen (Seaman 1982). STL werden häufig in spezialisierten sekretorischen Zellen produziert. Dabei kann es sich wie bei *Lactuca sativa*, um Milchsaft produzierende Zellen (Milchröhren) handeln (Bennett et al. 2002), oder um Drüsenhaare (DH) (Picman 1986).

1.4 Sesquiterpenlactone - Bioaktivität und pharmakologische Bedeutung

1.4.1 Funktionelle Gruppen und Reaktivität

Die für Sesquiterpenlactone typische α-Methylen-γ-Lacton Gruppe ermöglicht nucleophile Additionsreaktionen mit Thiol-Gruppen von Biomolekülen wie Cystein (Abb. 4A) (Kupchan et al. 1970). Dies ist eine spezielle Form der Michael-Addition (Michael 1887) mit einem ungesättigten Lacton, bei der es sich bei dem Nucleophil anstelle eines Enolates um die Thiol-Gruppe der Aminosäure Cystein handelt (Cavallito & Haskell 1945). Diese Rektion, in der englischen Literatur als "Michael-type addition" bezeichnet, wird im Folgenden vereinfacht Michael-Addition genannt. Die Lacton-Gruppe eines Sesquiterpenlactons (Abb. 4A) mit exocyclischer Methylengruppe beinhaltet eine ungesättigte Carbonyl-Gruppe (grau hinterlegt) die als Akzeptor für einen nucleophilen Angriff dient (Schmidt 1999). Der nucleophile Angriff geht von der Thiol-Gruppe des Cysteins aus (grau hinterlegt), wobei die Amino-Gruppe des Cysteins wahrscheinlich mit der Carbonyl-Gruppe des STL interagiert (Schmidt 1999). Dabei entsteht auf nicht-enzymatischen Wege ein über einen Thioether (grau hinterlegt) verknüpftes Sesquiterpenlacton-Cystein Addukt (Schmidt 1999). Für Cystein und Glutathion ist in der pflanzlichen Zelle sowohl eine nicht-enzymatische, als auch eine durch Glutathion-S-Transferase katalysierte enzymatische Reaktion möglich (Liu et al. 2011). In der vorliegenden Arbeit werden Addukte von STL an Cystein und Glutathion, wie für das Beispiel Costunolid gezeigt (Abb. 4B und 4C), vereinfacht dargestellt.

Das α-Methylen-γ-Lacton mit der exocyclischen Methylengruppe ist einer der Hauptgründe für die vielfältige Bioaktivität der STL (Rodriguez et al. 1976; Schmidt 1999). Allerdings wurden auch bioaktive STL ohne exocyclische Methylengruppe wie z.B. Artemisinin beschrieben, bei denen andere funktionelle Gruppen zur Bioaktivität beitragen. So erlaubt beispielsweise auch die Cyclopentenon-Gruppe von Helenalin als weitere α,β-ungesättigte Carbonyl-Verbindung ebenfalls eine Michael-Addition (Lyss et al. 1997; Schmidt 1997). Bei Artemisinin ist die Endoperoxid-Gruppe maßgeblich für die Bioaktivität verantwortlich (Fernández-Álvaro et al. 2016).

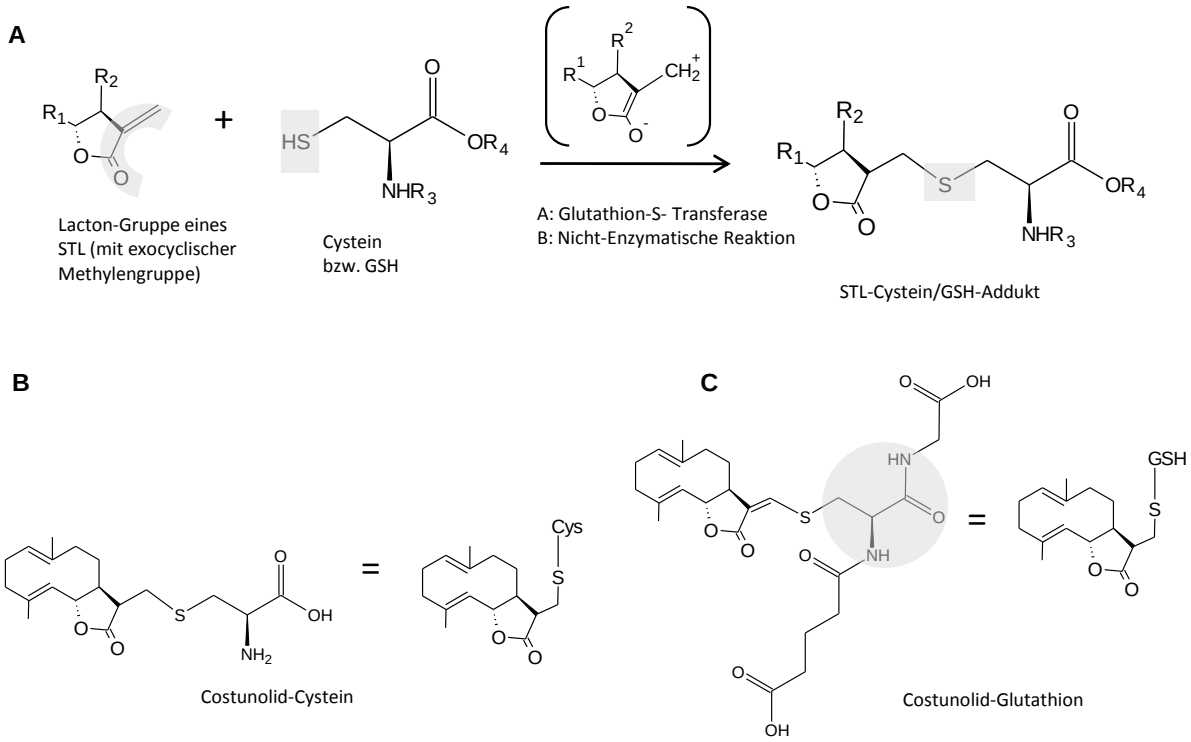


Abb. 4: Entstehung von Cystein- und Glutathion-Addukten

Sesquiterpenlactone mit exocyclischer Methylengruppe können Addukte mit Cystein und Glutathion bilden; A, Reaktionsschema für die Bildung eines STL-Cystein/GSH Adduktes B, Cystein-Addukte werden im Folgenden wie hier für Costunolid-Cystein gezeigt dargestellt; C, Glutathion ist ein Tripeptid mit Cystein in der mittleren Position (grau hinterlegt). Die Verknüpfung des Glutathion-Addukts ist analog zu der des Cystein-Addukts. Glutathion-Addukte werden im Folgenden wie hier für Costunolid-Glutathion gezeigt dargestellt.

1.4.2 Bioaktivität: Funktionen der Sesquiterpenlactone in der Natur

Die STL sind eine Substanzklasse von farblosen, bitter schmeckenden Substanzen, die uns im Alltag beispielsweise in Form des bitteren Geschmacks von Chicoree begegnen (Van Beek et al. 1990; De Kraker et al. 1998). STL weisen im Zusammenhang mit den bereits erläuterten funktionellen Gruppen eine enorme Bandbreite der Bioaktivität auf (Picman 1986; Schmidt 1999).

Pflanzen haben als sessile Organismen ein hochdifferenziertes Arsenal an chemischen Abwehrstoffen entwickelt, unter denen die STL bei Asteraceen eine zentrale Rolle einnehmen (Picman 1986). In Zusammenhang mit der Cytotoxizität der STL steht die vielfach beobachtete hemmende bzw. schädliche Wirkung auf Bakterien, Pilze, Protozoen und herbivore Insekten, die eine potentielle Gefahr für die Pflanzen darstellen (Picman 1986). Beispielsweise hemmen STL von *Helianthus* das Wachstum von *Homoeosoma electellum*, einem auf Sonnenblumen spezialisierten herbivoren Insekt (Rossiter et al. 1986). STL der Sonnenblume zeigten sich auch als wirksam bei der Abwehr von phytopathogenen Pilzen (Picman et al. 1990) und Bakterien (Spring et al. 1981). Die

genetische Unterdrückung der Expression von GAS1, einem der basalen Gene des STL-Stoffwechselweges, durch sogenanntes Silencing führte in *Taraxacum* zu einer verringerten Bildung von Taraxin-Säure-β-D-Glucopyranosylester und damit einhergehend einer reduzierten Fitness gegenüber herbivoren Insekten (Huber et al. 2016).

Auch im Wettkampf mit anderen Pflanzen spielen STL eine Rolle. So tragen sie beispielsweise zur allelopathischen Wirkung von *Parthenium hysterophorus* bei (Picman 1986). Für viele STL von *H. annuus* wurden ebenfalls allelopathische Effekte beobachtet (Macias et al. 1996; 2006; El Marsni et al. 2015). Die parasitische Pflanze *Orobranche cumana* macht sich die exsudierten STL seines Wirtes *H. annuus* für die Keiminduktion zunutze: Neben den Strigolactonen, die lange Zeit als typische Keimungs-Stimulanzien für parasitische Orobanchaceen angesehen wurden, konnte jüngst die Keimungsinduktion durch die vier STL Dehydrocostuslacton (DCL), Costunolid (Cos), 8-Epixanthatin (8-Epi) und Tomentosin (Tom) identifiziert werden (Joel et al. 2011; Raupp & Spring 2013).

STL spielen nicht nur bei der Interaktion zwischen Pflanzen eine wichtige Rolle, sondern auch bei physiologischen Prozessen innerhalb der Pflanze: so wurden bei *H. annuus* verschiedene physiologische Effekte von STL beschrieben, die im Zusammenhang mit Licht und Wachstum stehen. In den frühen 1960er wurde ein STL mit wachstumshemmender Wirkung aus Blättern von *H. tuberosus* extrahiert (Shibaoka 1961; Morimoto et al. 1966), ehe Spring et al. (1981; 1982) aus *H. annuus* STL identifizierten, die als Inhibitoren auf das Auxin-induzierte Elongationswachstum von *Avena* Koleoptilen wirkten. Diese Inhibitoren hatten keinen Einfluss auf das Säure-induzierte Streckungswachstum und die hemmende Wirkung konnte durch Zugabe von Dithiotreitol (DTT), einem SH-Gruppen Schutzreagenz, inaktiviert werden (Spring & Hager 1982). Daraus folgerten Spring & Hager (1982), dass die inhibitorische Wirkung der STL über die Interaktion mit dem Auxin-Signalweg vermittelt werden könnte, beispielsweise über Michel-Addition an eine Thiol-Gruppe eines beteiligten Proteins. Majdi et al. (2013) stellten eine durch das Auxin-Analog 2,4-D induzierte erhöhte Bildung von Costunolid (und Parthenolid) in *Tanacetum* fest. Yokotani-Tomita et al. (1997; 1999) beobachteten die durch das STL 8-Epixanthatin vermittelte, lichtinduzierte Krümmungsbewegung von Sonnenblumen-Hypokotylen. DCL und Derivate des DCL zeigten eine verstärkende Wirkung auf das Wurzelwachstum von *Phaseolus aureus* Keimlingen (Kalsi et al. 1979; Singh et al. 1992). Ueda et al. (2013) beobachteten eine hemmende Wirkung von DCL auf den polaren Auxin-Transport in *Raphanus sativus* Hypokotyl-Segmenten.

Joel et al. (2011) sowie Raupp & Spring (2013) schlussfolgerten aus den für DCL und 8-Epi beschriebenen Effekten, dass den STL in Sonnenblumen ähnliche Funktionen zukommen könnten wie den inzwischen als Phytohormonen angesehenen Strigolactonen in anderen Pflanzengruppen.

Die Bioaktivität der STL liegt im mikro- bis nanomolaren Bereich (Schmidt 1999). Es können hierbei zusammenfassend zwei "Einsatzgebiete" definiert werden. Wo STL die Funktion des Schutzes vor

Fraßfeinden und Pathogenen einnehmen, liegen sie sehr hoch konzentriert und in spezialisierten Kompartimenten wie den Cuticularblasen der Drüsenhaare vor, in denen sie für die Zellen der Pflanze selbst keine Gefahr darstellen (Spring & Bienert 1987). STL, die in inneren Geweben gefunden werden, und die möglicherweise physiologische Funktionen im Wachstum der Pflanze haben, sind in der Regel deutlich niedriger konzentriert (Yokotani-Tomita et al. 1997; 1999; Raupp & Spring 2013; Schmauder 2015).

1.4.3 Bioaktivität: Pharmakologisches Potential

ST und speziell STL besitzen hohes pharmakologisches Potential. Ihre Anwendung in der pharmazeutischen Industrie ist aber immer auch abhängig von ausreichender Verfügbarkeit (Chang & Keasling 2006). Daher ist eine Aufklärung der entsprechenden pflanzlichen Stoffwechselwege von großer Bedeutung, um biotechnologisch ressourcenschonend die notwendigen Mengen produzieren zu können (Nguyen et al. 2012). Auf der Suche nach neuen Wirkstoffen gegen Malaria, konnte in den 70er Jahren das STL Artemisinin aus *Artemisia annua* extrahiert werden (Nobelpreis 2015, siehe auch Tu (2016)). Artemisinin und davon abgeleitete Derivate sind bis heute die wichtigsten Wirkstoffe bei der Bekämpfung dieser Krankheit, die gerade in den tropischen Regionen Afrikas immer noch viele Todesopfer fordert (Tu 2016). Nachdem mit der Aufklärung des Stoffwechselwegs hin zu Artemisininsäure (Ro et al. 2006) und der Optimierung der Produktion in Hefekulturen auf bis zu 25 g/L Artemisininsäure (Paddon et al. 2013) Meilensteine der biotechnologischen Produktion des STL-basierenden Malaria-Medikaments erreicht wurden, rückt die potentielle Anwendung von biotechnologisch erzeugten STL in der Krebsbehandlung in den Fokus, wie das Beispiel von Thapsigargin zeigt (T. B. Andersen et al. 2015). Auch für die biotechnologische Produktion und Derivatisierung des potentiellen Anti-Tumor Wirkstoffes Parthenolid gibt es bereits vielversprechende Ansätze (Liu et al. 2014). Daneben gilt auch Artemisinin als potentieller Wirkstoff zur Behandlung verschiedener Formen von Krebs und alle drei Verbindungen (bzw. deren Derivate) befinden sich zur Zeit in klinischen Studien der Phasen I und II (Ghantous et al. 2010; Ren et al. 2016). Ein Mechanismus, der die antiinflammatorische und antikanzerogene Eigenschaft vieler STL definiert, ist die Interaktion der exocyclischen Methylen-Gruppe mit dem Transkriptions-Faktor NF-κB (Siedle et al. 2004). Die Bindung von STL, wie Parthenolid, an Cys38 der p65-Untereinheit inhibiert die DNA-Bindung bei NF-κB (García-Piñeres et al. 2001). Herausforderungen für eine Nutzung von STL sind in vielen Fällen eine zu hohe unspezifische Cytotoxizität (Schmidt 1999) und teilweise auch eine zu geringe Wasserlöslichkeit (Liu et al. 2014). Der hohen unspezifischen Toxizität konnte im Falle von Thapsigargin durch einen angehängten Molekülteil begegnet werden, der die zielgerichtete Akkumulation des Wirkstoffes im tumorösen Zielgewebe ermöglichte (T. B. Andersen et al. 2015). Im Falle von Parthenolid konnte die Wasserlöslichkeit durch Derivatisierung zu

Dimethylaminoparthenolid (DMAPT) verbessert werden (Guzman et al. 2007). Bestimmte STL haben auch Potential zur Anwendung gegen parasitische Krankheitserreger wie *Trypanosoma brucei rhodesiense* und *Schistosoma mansoni* (Julianti et al. 2011; Sass et al. 2014).

1.5 Die Sesquiterpenlactone von *Helianthus annuus*

Sesquiterpenlactone sind bei *H. annuus* in sehr hoher Konzentration in köpfchentragenden (biseriaten) Drüsenhaaren (KDH) zu finden (Spring et al. 1987; Spring & Bienert 1987; Göpfert et al. 2005). Neben den KDH existieren bei *H. annuus* noch zwei weitere Typen von Haaren: nicht-glanduläre Haare und lineare (uniseriate) Drüsenhaare (LDH), die Sesquiterpene und Flavonoide bilden (Spring et al. 1987; 1992; 2015). Aus KDH von *H. annuus* extrahierte STL haben ähnliche strukturelle Merkmale: In der überwiegenden Zahl der Fälle handelt es sich um Germacradien-6,12-olide mit einer 6,7-Lactongruppe in trans-Konfiguration und einer 8β-Hydroxy-Gruppe, die mit Angelin-Säure verestert ist (Abb. 5A) (Spring et al. 1989). Die KDH sind bei *H. annuus* an verschiedenen oberirdischen Organen lokalisiert, insbesondere an den Blättern und den Antheren-Anhängen der Röhrenblüten (Spring 2000). Das Kultivar *H. annuus* cv. HA300 wies eine besonders hohe Dichte an KDH in den Antheren-Anhängen auf, und zeigte ein weiteres STL, Haageanolid, das im Gegensatz zu allen anderen STL nicht an der 8β-, sondern an der 9β-Position hydroxyliert war (Abb. 5B) (Göpfert et al. 2005). Die Entwicklung der KDH schreitet im Blütenkorb parallel zur Entwicklung der Röhrenblüten voran, dabei durchlaufen die KDH zunächst eine prä-sekretorische Phase der Zelldifferenzierung ehe die sekretorische Phase mit der Produktion der STL und deren Transport aus dem Cytoplasma in die extrazelluläre Cuticularblase erfolgt (Göpfert et al. 2005). Eine ähnliche Differenzierung durchlaufen die KDH auf den sich entwickelnden Blättern in den ersten ca. fünf Tagen nach Beginn der Samenkeimung (Aschenbrenner et al. 2015). In ausdifferenzierten KDH bilden die obersten Zellen spezielle Strukturen der wandständigen Oberflächenvergrößerung zur Sekretion der STL und anderer Metabolite in die Cuticularblase aus (Amrehn et al. 2014).

Sesquiterpenlactone wurden auch für die inneren Gewebe der Sonnenblume beschrieben, allerdings mit anderer chemischer Struktur (Abb. 5B) und in deutlich geringerer Konzentration (Yokotani-Tomita et al. 1999; Joel et al. 2011; Raupp & Spring 2013). Keines der vier STL, die sowohl in Wurzel-Exsudaten (Raupp & Spring 2013) als auch in verschiedenen Geweben junger Keimlinge (Schmauder 2015) nachgewiesen wurden, konnte bisher in den KDH gefunden werden.

Die Biosynthese der STL aus FPP wird neben den Terpensynthasen insbesondere durch eine Reihe von oxidativen Reaktionen durch Cytochrom P450 Enzyme katalysiert. In Kapitel (1.6) werden die Funktionsweisen der P450 Enzyme und deren Rolle in Terpen-Biosynthesewegen beschrieben, in Kapitel (1.7) der STL Stoffwechselweg der Sonnenblume.

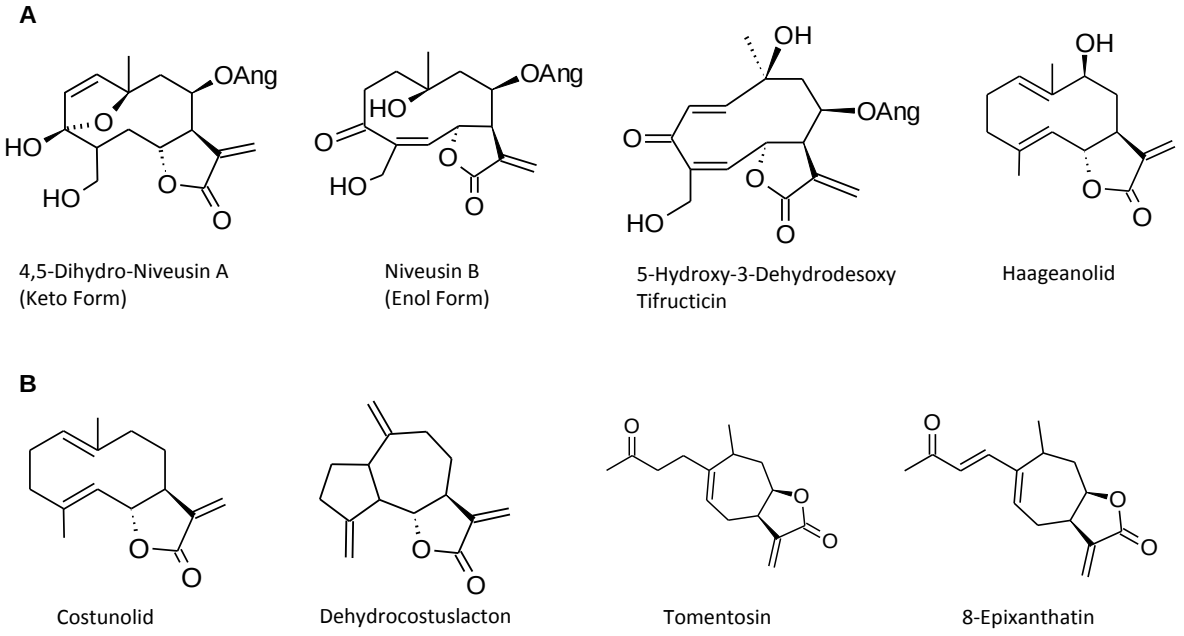


Abb. 5: Sesquiterpenlactone von *Helianthus annuus*

A, Typische Sesquiterpenlactone (STL) aus den köpfchentragenden Drüsenhaaren der Sonnenblume (Auswahl aus Göpfert et al. 2005); **B,** STL aus inneren Geweben der Sonnenblume (Raupp & Spring 2013).

1.6 Cytochrom P450 Enzyme und Terpenstoffwechsel

Die Biosynthese der meisten Sesquiterpenoide lässt sich in zwei Abschnitte einteilen: In einem ersten Abschnitt wird durch die Cyclisierungsreaktion einer Terpensynthase aus FPP ein Kohlenstoff Grundgerüst geformt (Chen et al. 2011).

In einem zweiten Abschnitt werden in einer Reihe von Reaktionsschritten das Grundskelett durch Oxidationsreaktinoen mit Sauerstoff modifiziert (Nguyen et al. 2012). Pateraki et al. (2015) schätzten, dass mindestens 89,5 % der in Pflanzen beschriebenen Sesquiterpenoide unter Beteiligung von P450 Enzymen gebildet werden, da sie mehr als die zwei Sauerstoff Atome enthielten, die theoretisch auch bei der Terpensynthase Reaktion eingebracht werden könnten. Für die Aufklärung von Sesquiterpenoid-Biosynthesewegen sind P450 Enzyme dementsprechend von zentraler Bedeutung.

Die (Cytochrom) P450 Enzyme, sind eine der größten Enzym-Superfamilien und kommen in allen drei Domänen des Lebens vor (Werck-Reichhart & Feyereisen 2000, Nelson 2009). Sie sind in der Lage vielfältige chemische Reaktionen zu katalysieren, und dementsprechend an vielen Stoffwechselwegen beteiligt (Werck-Reichhart & Feyereisen 2000). Der Name P450 bezeichnet ein **P**igment, das Licht einer Wellenlänge von **450** nm absorbieren kann (Omura & Sato 1964; Bak et al. 2011). Allen P450 Enzymen gemein ist eine Häm-Gruppe im katalytischen Zentrum, die über einen spezifischen Cystein-Rest an das Enzym gebunden ist (Bak et al. 2011). Bei den Reaktionen von Cytochrom P450 Enzymen wird das Substrat unter Verwendung von molekularem Sauerstoff oxidiert

(Bak et al. 2011). Eukaryotische Cytochrom P450 Enzyme haben immer eine Transmembrandomäne, die in der Regel in der Plasmamembran des ER lokalisiert ist, wobei die katalytische Domäne in das Cytosol hereinragt (Williams et al. 2000). Im ER verankerte pflanzliche Cytochrom P450 Enzyme sind auf eine Cytochrom P450 Reduktase als Mitspieler angewiesen, die bei der Interaktion mit den Reduktionsäquivalenten (NADPH) bei Oxidationsreaktionen vermittelt (Lamb & Waterman 2013). Die pflanzlichen P450 Enzyme haben neben der Transmembrandomäne eine Reihe struktureller Merkmale gemeinsam. Dazu gehören neben PPGP-, KETLR- und PERF-Motiv die sechs Substrat-Erkennungsregionen SRS1-SRS6 ((Gotoh 1992; Bak et al. 2011). Innerhalb der Cytochrom P450 Enzym (CYP) Superfamilie gibt es eine Reihe von Enzymfamilien, die nur bei Pflanzen vorkommen (Nelson 2006b). Eine der größten pflanzlichen P450 Enzym-Familien ist die Familie CYP71 (Nelson & Werck-Reichhart 2011). Jedem neu entdeckten P450 Enzym wird ein eindeutiger systematischer Name zugeordnet (Nelson 2006a). Zwei P450 Enzyme werden bei einer Aminosäure Identität von >40 % in dieselbe Familie, bei >55 % in dieselbe Unterfamilie eingeordnet, allerdings gibt es auch Ausnahmen von der Regel (Nelson 2006a). Das Enzym HaG8H hat die systematische Bezeichnung CYP71BL1 (Ikezawa et al. 2011), dies bedeutet, es handelt sich um das erste beschriebene Enzym in der Unterfamilie BL der Familie 71. Oft sind P450 Enzyme, die ähnliche oder subsequente Reaktionen katalysieren nahe miteinander verwandt (Bak et al. 2011). Einer der Hauptfaktoren der Diversifizierung von P450 Enzymen, insbesondere in der CYP71 Familie, ist die Bildung von Genduplikationen (Nelson & Werck-Reichhart 2011).

Bei der Synthese von STL in den Asteraceae sind Enzyme der Familie CYP71, speziell der Unterfamilien CYP71BL, CYP71AV, CYP71CA und CYP71CB beteiligt (Nguyen et al. 2010; Ikezawa et al. 2011; Liu 2013; Liu et al. 2014). Dabei können unter anderem Alkohol-, Epoxy-, Säure- und Estergruppen gebildet, sowie Änderungen des Kohlenstoff-Grundgerüstes induziert werden (Nguyen et al. 2010; Ikezawa et al. 2011; Liu 2013; Liu et al. 2014) (siehe auch Abb.5).

1.7 Der Sesquiterpenlacton Stoffwechselweg in der Sonnenblume

Der Sesquiterpenlacton Stoffwechselweg in den köpfchentragenden Drüsenhaaren von *H. annuus* wurde in den ersten Schritten aufgeklärt:

Der erste Schritt wird durch die Cyclisierungs-Reaktion einer Terpensynthase eingeleitet: Das Enzym Germacren A Synthase aus *H. annuus,* von dem die drei Isoenzyme HaGAS1, HaGAS2 und HaGAS3 (Göpfert et al. 2009; 2010) beschrieben wurden*,* wandelt Farnesyl-PP in Germacren A um (Abb. 6A).

Die weiteren Schritte des Syntheseweges sind oxidativer Natur und werden durch verschiedene P450 Enzyme katalysiert. Die *H. annuus* Germacren A Säure Oxidase (HaGAO) katalysiert die mehrstufige Oxidations-Reaktion von Germacren A zu Germacren A Säure (Göpfert 2008; Nguyen et

al. 2010). Die Lokalisation von HaGAO konnte *in situ* mithilfe von Antikörpern gegen HaGAO in den Zellen der KDH im sekretorischen Stadium gezeigt werden (Amrehn et al. 2016). Bereits die phylogenetisch älteste Unterfamilie der Asteraceae, die Barnadesioideae, die noch keine STL produzieren, besitzt orthologe Enzyme zu GAS und GAO (Nguyen et al. 2010; Nguyen et al. 2016). In der Kooperation der Arbeitsgruppen Spring (Hohenheim) und Ro (Calgary) wurde mit der *Helianthus annuus* Germacren A Säure 8β-Hydroxylase, auch als HaG8H oder HaGAAO bezeichnet, ein weiterer Schritt der STL Biosynthese der Sonnenblume aufgeklärt (Ikezawa et al. 2011). Eine Costunolid Synthase für *H. annuus* konnte in diesem Projekt nicht identifiziert werden, weshalb für die vollständige Synthese von Costunolid die Costunolid Synthase LsCOS aus *Lactuca sativa* eingesetzt wurde, die eine Hydroxylierung am C-6 Atom des Germacren A Säure katalysiert (Ikezawa et al. 2011). Weitere Costunolid-Synthasen (6α-Hydroxylasen) aus Asteraceen wurden inzwischen entdeckt und charakterisiert (Liu et al. 2011; Ramirez et al. 2013; Eljounaidi et al. 2014; Liu et al. 2014), allerdings noch von keiner weiteren Spezies des Tribus Heliantheae. Umgekehrt fanden sich bislang außerhalb der Heliantheae keine homologen Enzyme zu HaG8H (Ikezawa et al. 2011). Aus *Tanacetum parthenium* wurden eine Parthenoild-Synthase (TpPTS) und eine 3β-Hydroxylase beschrieben, die sowohl Costunolid als auch Parthenolid als Substrat nutzen können (Liu et al. 2014) (Abb. 6B). Ebenfalls in *T. parthenium* beschrieben wurde ein Cytochrom P450 Enzym, Kauniolid-Synthase (TpKS), welches Costunolid (Germacran-Gerüst) nach einem Hydroxylierungsschritt und der Abspaltung von Wasser unter Änderung des Kohlenstoff-Grundgerüstes in Kauniolid (Guaian-Gerüst) überführt (Liu 2013) (Abb. 6B).Die Sequenz dieses Enzyms war zum Zeitpunkt der vorliegenden Arbeit (Dezember 2016) noch nicht veröffentlicht. Liu (2013) gab eine Aminosäure-Identität von 48 % zu TpCOS an.

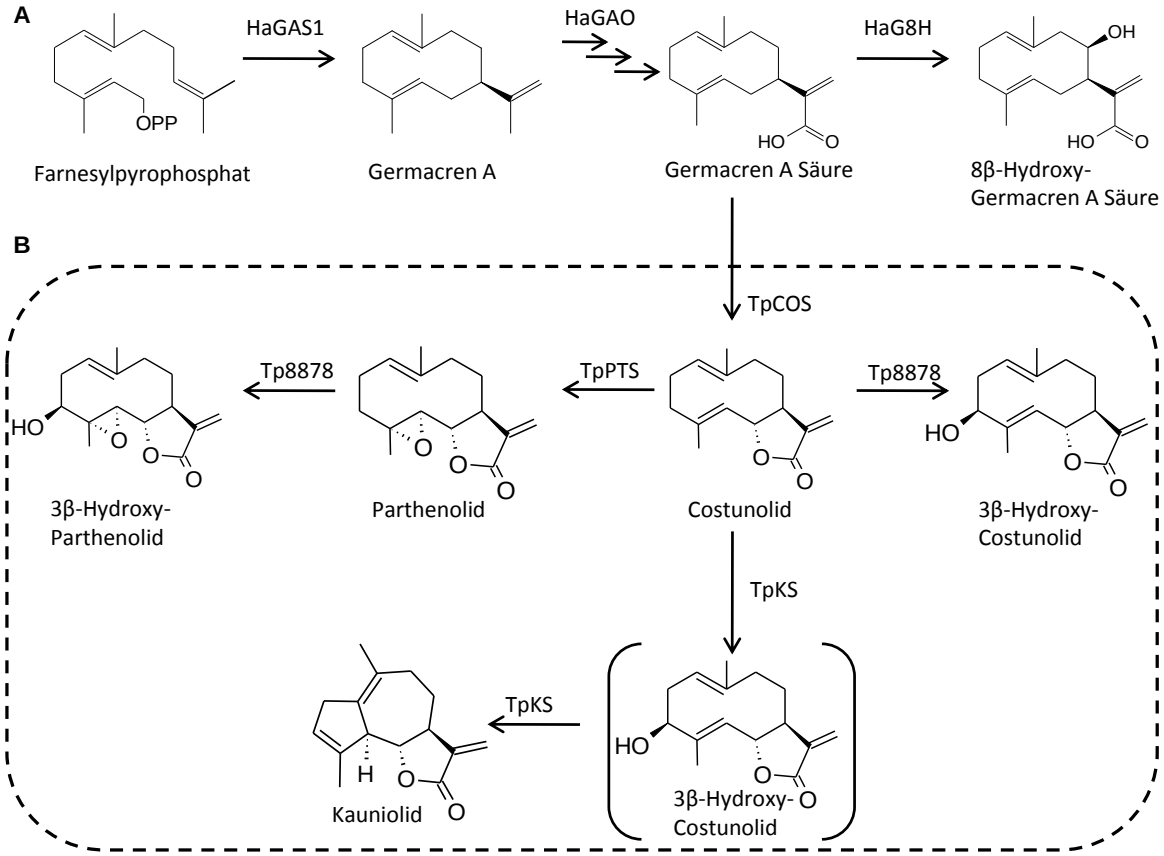


Abb. 6: Sesquiterpenlacton Stoffwechselweg

A, Bisher indentifizierter STL Biosyntheseweg in *H. annuus*; **B,** weiterführender Biosyntheseweg in *T. parthenium,* HaGAS1: *Helianthus annuus* Germacren A Synthase 1, HaGAO: *Helianthus annuus* Germacren A Oxidase, HaG8H: *Helianthus annuus* Germacren A Säure 8β-Hydroxylase, TpPTS: *Tanacetum parthenium* Parthenolid Synthase, Tp8878: *Tanacetum parthenium* Costunolid/Parthenolid 3β-Hydroxylase, TpKS: *Tanacetum parthenium* Kauniolid Synthase

1.8 Ziele der Arbeit

Das Hauptziel der Arbeit ist die weitere Aufklärung des STL Syntheseweges der Sonnenblume. Dabei sollen weitere Oxidationsreaktionen am STL Grundgerüst durch Cytochrom P450 Enzyme gefunden werden. Eine wichtige Frage dabei ist, wie in *H. annuus* das 6,7-cis Lacton zum Costunolid und das 8β-hydroxylierte Eupatolid (8β-Hydroxy-Costunolid) entstehen. Auch Enzyme, die für die Einführung weiterer Hydroxy-Gruppen im STL Grundgerüst verantwortlich sind, sollen gefunden werden. Es sollen neue Hinweise gefunden werden, wie es zur gewebespezifischen Verteilung der vorwiegend 8β-hydroxylierten Germacranolid-Derivate in den KDH und den strukturell unterschiedlichen STL in den anderen Geweben kommt. Kandidatengene für Cytochrom P450 Gene sollen ausfindig gemacht und durch *in vivo* Expression mit Hilfe von Stoffwechsel Rekonstruktionsansätzen mit verschiedenen potentiellen Substraten getestet werden. Neben der Expression in Hefe soll ein STL Stoffwechsel Rekonstruktionsansatz im Tabak-Expressionssystem mit *N. benthamiana* getestet werden. Ein besonderer Augenmerk soll dabei auf der komplexen Matrix

der zu erwarteten Nebenprodukte und den spezifischen Unterschieden der verwendeten Expressions-Systeme liegen. Die Charakterisierung neuer Cytochrom P450 Enzyme im STL Stoffwechselweg wird beispielsweise zukünftige Arbeiten zu den physiologischen Funktionen der STL und deren Regulierung ermöglichen, aber auch eine Erweiterung der Toolbox zur biotechnologischen Herstellung STL-basierter Wirkstoffe darstellen.

2 Material und Methoden

2.1 Pflanzenmaterial

2.1.1 Pflanzenmaterial aus *Helianthus annuus* Kultivar HA300

Für die Aufklärung des STL Biosyntheseweges und die Untersuchung entwicklungs- und gewebespezifischer Expressionsmuster von *Helianthus annuus* L. wurde das Kultivar HA300 gewählt. Das Kultivar HA300 weist eine überdurchschnittlich hohe Menge an köpfchentragenden Drüsenhaaren (KDH) in den Antherenanhängen auf (Göpfert et al. 2005). Aufgrund dessen wurden mit der Charakterisierung von HaGAS1, HaGAS2 (Göpfert et al. 2009), HaGAS3 (Gopfert et al. 2010), HaGAO (Nguyen et al. 2010), und HaG8H (Ikezawa et al. 2011), die ersten Schritte des Biosyntheseweges anhand von Genen aus dem cDNA-Pool von KDH dieses Kultivars aufgeklärt. Um eine große Menge an KDH gewinnen zu können und um die Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurden alle Versuche mit diesem Kultivar durchgeführt. *Helianthus annuus* L. cv. HA300 Saatgut wurde von Dr. Hahn (Landessaatzuchtanstalt, Uni Hohenheim, Außenstelle Eckartsweier) erhalten. Um Blütenmaterial und älteres Pflanzenmaterial zu sammeln, wurden die Pflanzen im Klimaschrank in Gartenerde mit NPK Dünger in 18 cm Töpfen bis zur Ausbildung der Blütenkörbe angezogen (12 Wochen, Licht/Dunkelheit: 14h/10h; Temperatur: 25°C). Die Präparation der Röhrenblüten sowie die Auswahl später präsekretorischer und früher sekretorischer Stadien erfolgte wie bei Göpfert (2008) definiert. Für jede RNA Extraktion wurden insgesamt ca. 5.000 KDH von ca. 100 Antherenröhren präpariert (siehe auch RNA Extraktion). Für die Untersuchung der Expressionsmuster in den ersten 24 h nach der Keiminduktion durch Wasserzugabe wurden HA300 Samen im Dunkeln für 0 h,6 h,12 h, und 24 h angekeimt (im Klimaschrank, abgedunkelt, unter Grünlicht geschält und direkt in flüssigem Stickstoff schockgefroren) um Beeinflussung durch Licht oder den Präparationsvorgang zu vermeiden. Es wurden je 5 Samen für die RNA-Extraktion in bereits in flüssigem Stickstoff vorgekühlten 2 ml Reaktionsgefäßen gesammelt.

Für die Untersuchung der Blattprimordienentwicklung wurden die Keimlinge bis zu 5 Tage im Klimaschrank in Petrischalen angezogen und Blattprimordien präpariert wie von Aschenbrenner et al. (2015) beschrieben. Bei der anschließenden Präparation wurden je 6 Keimlinge für die RNA Präparation in eiskaltem, frisch mit Mercaptoethanol versetzten RNA-Lysis Buffer (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) gesammelt. Für die Licht-Mikroskopie wurden jeweils 2 Keimlinge präpariert um zu prüfen, ob die Entwicklungsstadien der Blattprimordien auch für das Kultivar HA300 an die Entwicklung der Primordien gekoppelt ist, wie bei Aschenbrenner et al. (2015) für *das Helianthus annuus* Kultivar Giganteus beschrieben. Für die Untersuchung von Expressions- und Inhaltsstoff-

Mustern wurden von Schmauder (2015) HA300 Keimlinge in speziell präparierten Hydrokultur-Boxen im Klimaschrank angezogen. In mehrere Untersuchungen der STL-Expressionsmuster wurden cDNA Proben aus dieser Arbeit miteinbezogen.

2.1.2 *Nicotiana benthamiana*

Die Anzucht von *Nicotiana benthamiana* DOMIN. erfolgte wie von (Bach et al. 2014) beschrieben. *N. benthamiana* Samen (Tobacco Institute of Bergerac, Frankreich) wurden vier Wochen im Gewächshaus in 5,5 cm Töpfen in Gartenerde angezogen. Pflanzen wurden in der Anzuchts- und Inkubationsphase 3x wöchentlich gegossen, 1 x wöchentlich mit NPK Dünger versetzt und durch Zugabe von Larvizid gegen Insekten geschützt. Pflanzen mit 4-5 Blättern, die noch keine Blüten ausgebildet hatten, wurden für die Infiltrationsversuche verwendet. Eine Stunde vor der Infiltration wurden die Pflanzen zur Akklimatisierung aus dem Gewächshaus geholt. Ca. 10 min vor der Infiltration wurden die Pflanzen mit einem Zerstäuber mit Leitungswasser besprüht, um eine optimale Öffnung der Stomata für die Infiltration zu gewährleisten. Nach der Infiltration wurden die Pflanzen ins Gewächshaus zurückgebracht und 6 Tage bis zur Extraktion weiter wachsen gelassen (unter Beibehaltung des Gieß- und Düngeschemas).

2.2 Chemikalien

Alle Chemikalien, sofern nicht anders angegeben, wurden von den Firmen Carl Roth (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland), und Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) bezogen. Alle Lösungsmittel, die zur Extraktion von Proben für die Analyse mittels HPLC-DAD oder LC-MS verwendet wurden, hatten das Reinheitsniveau HPLC Gradient Grade. Lösungsmittel für Gaschromatographie hatten das Reinheitsniveau GC Grade. Bei allen molekularbiologischen Techniken wurde Wasser mit Molekularbiologie-Qualität (doppelt destilliert, DNA- und RNA-frei, autoklaviert, DEPC behandelt, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) eingesetzt, im Folgenden als $_{dd}H_2O$ (Mol. Biol. Qualität) bezeichnet.

2.2.1 Sesquiterpenlacton-Referenzsubstanzen

Enzymprodukte wurden in HPLC- und LC-MS Läufen mit einer Reihe von Referenzsubstanzen abgeglichen. Dies erfolgte entweder mit der Referenzsubstanz selbst, oder mit den synthetisch erzeugten Addukten der Referenzsubstanzen mit Cystein und Glutathion (siehe 2.2.2). Referenzsubstanzen wurden entweder käuflich erworben, oder aus Pflanzenextrakten bzw. Hefekulturen aufgearbeitet. Die aus Pflanzenextrakten aufgearbeiteten STL stammen aus einer

Metabolit-Sammlung des Instituts für Botanik der Universität Hohenheim und sind im Folgenden mit der entsprechenden internen Codierung und Referenz aufgeführt.

Tab. 1: STL-Referenz-Verbindungen

Substanz	Quelle	Codierung	Referenz
Costunolid [(a)]	Selleck Chemicals LLC Houston, TX, USA		
8β-Hydroxy-Costunolid [(a)]	Aufgereinigt aus Pflanzenmaterial	OS-11	(Whittemore et al. 1985)
9β-Hydroxy-Costunolid	Aufgereinigt aus Pflanzenmaterial	OS-271	(Göpfert et al. 2005)
14-Hydroxy-Costunolid [(a)]	Aufgereinigt aus Hefekulturen		Diese Arbeit
15-Hydroxy-Costunolid	Aufgereinigt aus Pflanzenmaterial	OS-215	(Spring et al. 2003)
8β,14-Dihydroxy-Costunolid	Aufgereinigt aus Pflanzenmaterial	OS-40	(Herz & Kumar 1981)

[(a)] Cystein- und Glutathion-Addukte dieser Verbindungen wurden hergestellt und mittels LC-MS mit Extrakten aus N. benthamiana abgeglichen.

2.2.2 Herstellung synthetischer STL Addukte

Die Verknüpfung von Cystein bzw. dem Cystein-Rest des Glutathion mit Sesquiterpenlactonen wird durch die Glutathion-S-Transferase (GST) begünstigt, läuft aber auch spontan bei Raumtemperatur ab (Liu et al. 2011). Die Herstellung synthetischer STL Addukte wurde im Vergleich zu Liu et al. (2011) in Mikro-Ansätzen von 20 µl Volumen und ohne den Einsatz von GST durchgeführt, um einen Adduktions-Assay auch mit wenig aufgereinigter Substanz zu ermöglichen. In einem 200 µl Reaktionsgefäß wurden 1,3 µl Cystein (150 mM in 100 mM MES, pH 6,5) oder Glutathion (150 mM in 100 mM MES, pH 6,5) mit 4 µl Costunolid (10 mM in Methanol) mit 14,7 µL MES Puffer (100mM, pH 6,5) gemischt. Der Ansatz wurde in einem Thermocycler 20 min bei 25 °C inkubiert und in Abständen von 5 min durchmischt. Im Anschluss wurden 64 µl $_{dd}H_2O$ und 76 µl ACN (HPLC Gradient Grade) zugegeben und der Reaktionsansatz in ein HPLC Glasgewindefläschchen mit Einsatz überführt. Der Ansatz wurde bis zur Analyse mittels HPLC und LC-MS bei -20°C gelagert. Zur Analyse mittels LC-MS (LC-MS System 3) wurden je 3 µl eingesetzt.

2.3 Naturstofftechniken

2.3.1 Extraktion von Sesquiterpenlactonen aus transformierten Tabakblättern

Die Extraktion transformierter *N. benthamiana* Blätter für LC-MS und GC-MS erfolgte in einem parallelen Extraktions-Ansatz. Pro infiltriertem Blatt wurden je zweimal zwei Blattscheiben mit einem Korkbohrer ausgestanzt (Ø = 30 mm). Je zwei Blattscheiben wurden in ein Gewindefläschchen überführt. Für die Extraktion der stark lipophilen Metabolite zur Analyse mittels GC-MS wurden je 1 ml Hexan, versetzt mit einem internen Standard (1µg/ml Eicosen), vorgelegt. Da aus Kunststoff-Reaktionsgefäßen und -Pipettenspitzen durch Hexan lipophile Komponenten ausgewaschen werden können, wurde für das Vorlegen des Hexans und den gesamten Lauf der Extraktion ausschließlich Glasmaterialien verwendet. Für die Extraktion von weniger lipophilen Metaboliten, wie den oxygenierten Sesquiterpen-Derivaten, wurde 1 ml HPLC-Grade Methanol vorgelegt. Die Proben mit in Methanol bzw. Hexan überschichteten Blattscheiben wurden stark geschüttelt (10 sec, „Vortex“), im Wärmeschrank inkubiert (50° C, 200 rpm,1 h) und mit einer Plattenzentrifuge abzentrifugiert (5 min, 2.500 g). Die Überstände wurden in ein neues Glasröhrchen dekantiert und bis zur Analyse bei -20°C aufbewahrt. Vor der Analyse mit LC-MS (qTOF) wurden, zur Entfernung von eventuell vorhandenen Partikeln, 200 µl Extrakt durch 0,2 µm PVDF Filter (DURAPORE, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) zentrifugiert (12.000 g, 4 min).

2.3.2 Extraktion von Sesquiterpenlactonen aus Hefe-Kulturen

2.3.2.1 Extraktion analytischer Hefekulturen

Die Extraktion der Hefe-Kulturen erfolgte mit Modifikationen nach einem bereits etablierten System durch Ausschüttlung mit Ethylacetat (Nguyen et al. 2010; Ikezawa et al. 2011; Liu et al. 2011), allerdings angepasst an den für die Hefekulturen etablierten Mikroansatz (2.7.8 und 3.2.1). Die Hefe-Kulturen wurden abzentrifugiert und die steril filtrierten (0,22 µM) Überstände dreimal mit 0,4 Volumen Ethylacetat extrahiert. Die 4 ml Hefekultur-Mikroansätze wurden in 15 ml Reaktionsgefäßen ausgeschüttelt, die Ethylacetat-Phase in einem 2 ml Reaktionsgefäß vereinigt und in der Vakuum-Zentrifuge zur Trockene eingeengt (V-HV Programm, 45 °C, 20 mbar, 2 h).

2.3.2.2 Extraktion präparativer Hefekulturen

Präparative Hefekulturen mit 0,5 l Volumen wurden im 0,5 l Scheidetrichter mit Ethylacetat ausgeschüttelt, die Ethylacetat Phase wurde im Anschluss in einem 1 l Rundkolben im Rotationsverdampfer (45 °C, 200 mbar,2 h) zur Trockene eingeengt. Die Extrakte wurden in 160 µl

50 % HPLC-Grade Methanol wieder aufgenommen, in HPLC Probengefäße mit Glaseinsätzen überführt und bis zur Messung bei -20°C gelagert.

2.3.3 Hochleistungsflüssigchromatographie

2.3.3.1 Analytische Hochleistungsflüssigchromatographie

Das Prominence HPLC System von Shimadzu (Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg) wird im Folgenden als „Shimadzu HPLC-System“ bezeichnet. Es wurde verwendet für die Analyse von Proben aus dem Hefe Mikro-Expressions-System, präparative Aufarbeitung mittels HPLC und die Vor-Analyse von synthetischen STL-Cystein und STL-Glutathion Addukten. Das System wurde mit der folgenden modularen Zusammensetzung verwendet: SIL20A-Autosampler, CBM-20A Kommunikationsmodul, LC-20AD Pumpen, DGU-20A3 Degaser sowie einem SPD-M10AVP Photodioden-Array Detektor (DAD) und dem Class VP Softwarepaket. Dieses System wurde durch eine Kromasil C18 Säule (100 18C, 25 cm x 4 mm x 5 µm Partikelgröße; MZ Analysetechnik, Mainz, Deutschland) ergänzt.

Um eine große Anzahl an Hefeklonen mit vielen Genkombinationen analysieren zu können, wurde ein Mikro-Hochdurchsatz Ansatz entwickelt (2.7.8). Im Vergleich zu vorangegangenen Arbeiten wurde hier das Kulturvolumen der analytischen Kulturen deutlich reduziert (ca. 1/10 im Vergleich zu (Nguyen et al. 2010; Ikezawa et al. 2011), gleichzeitig aber das in der Analytik eingesetzte Kulturäquivalent erhöht. Für die analytischen Läufe wurde jeweils ein Äquivalent eines halben Ansatzes (also 2 ml) in den Läufen eingesetzt. Für die Auftrennung der Extrakte aus den Hefekulturen wurde ein Acetonitril-Gradient mit einem auf pH 3 angesäuerten Laufmittelsystem verwendet (80 µl Injektionsvolumen, 18 min 40-100 B, 1 min 100 B, 4 min 40 B; A:$_{dd}H_2O$/0,01 % TFA B: ACN, 1 ml/min). Durch das Ansäuern des Systems wurde eine deutlichere Auflösung der Peaks von Metaboliten mit Carboxylgruppe erzielt. Die Verwendung von Acetonitril als Laufmittel gewährleistete eine geringe Hintergrundabsorption im für die Detektion von STL wichtigen Wellenlängen-Bereich von 200-250 nm.

2.3.3.2 Präparation mittels Hochleistungsflüssigchromatographie

Für die Präparation von Enzymprodukten mittels HPLC wurden 4 µl bis 6 µl des hochkonzentrierten Extraktes (siehe 2.3.2.2) pro Lauf eingesetzt (Äquivalent zu 13 ml - 20 ml Kulturvolumen). Beim Absammeln der Peaks wurde, wie bei Ikezawa et al. (2011) beschrieben, HEPES/NaOH-Puffer (pH 7,5) vorgelegt (hier: 1 M), so dass die Endkonzentration nach dem Absammeln des Peaks 50 mM HEPES betrug. Diese Vorgehensweise wurde von Ikezawa et al. (2011) verwendet, um Säure-induzierte Umlagerungsreaktionen des Enzymproduktes im Laufe der Aufarbeitung zu verhindern. Die gesammelten Peaks wurden vereinigt, 1:4 mit $_{dd}H_2O$ verdünnt und mit Ethylacetat ausgeschüttelt.

Die Ethylacetat-Phase wurde zur Trockene eingeengt und das Präzipitat der aufgereinigten Substanz für NMR Analysen in deuteriertem Chloroform wieder aufgenommen.

2.3.4 Flüssig-Chromatographie /Massenspektroskopie

Flüssig-Chromatographie / Massenspektroskopie (LC-MS) Analysen wurden an der Service Einheit des Life Science Centers der Universität Hohenheim von I. Klaiber -mit zwei unterschiedlichen Systemen („LC-MS-System 1“ und „LC-MS-System 2“)- sowie an der Universität Kopenhagen unter Anleitung von Dr. Frederico Cozzi („LC-MS-System 3“) durchgeführt.

2.3.4.1 LC-MS System 1

Der im Folgenden als „LC-MS-System 1“ bezeichnete Aufbau setzte sich wie folgt zusammen: Eine Agilent (Waldbronn, Deutschland) 1290 UHPLC mit HSS T3-Säule (1,8 µm Partikelgröße, 50 mm x 2,1 mm, Waters, Dublin, Irland) wurde in Kombination mit einem Quadrupol-Massenspektrometer (QTRAP 5500, LC-MS/MS System (AB Sciex Instruments, Darmstadt, Deutschland) eingesetzt. Die Parameter des Massenspektrometers waren: Q3-MS Elektrospray Ionisation mit positiver Ionisierung (ESI-pos) und einem Messbereich von 50-500 u oder MS^2 mit der entsprechenden Muttermasse mit 600 °C /5.500 V /N_2 (Heiztemperatur/ Ionenspray-Spannung/ Kollisionsgas). Ausgewählte Proben von Hefe-Extrakten und über HPLC aufgereinigte Metabolite aus Hefekulturen wurden mit LC-MS System 1 analysiert. Daten aus diesem Ansatz wurden mit NMR Ergebnissen zur Strukturaufklärung kombiniert.

2.3.4.2 LC-MS System 2

Der im Folgenden als „LC-MS-System 2“ bezeichnete Aufbau setzte sich wie folgt zusammen: Eine Agilent (Waldbronn, Deutschland) 1290 UHPLC mit Acquity CSHC18Säule (1,7 µm Partikelgröße, 150 mm x 2,1 mm (Waters, Dublin, Irland) wurde in Kombination mit einem Q Exactive Plus (Thermo Fisher Scientific) Massenspektrometer eingesetzt. Die Laufbedingungen wurden den entsprechenden Gradienten des Shimadzu HPLC Systems angepasst (3 µl Injektionsvolumen, Säulentemp.: 40 °C, 10 min 10-70 B, 5 min 70-90 B, 1 min 90-10 B, 1 min 10 B; A: $_{dd}H_2O$/0,1 % Ameisensäure B: ACN/0,1 % Ameisensäure; A/B: LC-MS-Grade; 0,3 ml/min).

Der Abgleich von Extrakten aus transformierten *N. benthamiana* Blättern mit synthetisch hergestellten STL-Addukten erfolgte mit LC-MS System 2.

2.3.4.3 LC-MS System 3

Der im Folgenden als „LC-MS-System 3“ bezeichnete Aufbau setzte sich wie folgt zusammen: DIONEX UltiMate 3.000 System mit Phenomenex C18 XB Säule (1,6 µm Partikelgröße, 100 mm x 2,1

mm (Thermo Fisher/Dionex, Germering, Deutschland). Die Analyse von Extrakten aus transformierten *N. benthamiana* Blättern sowie Referenzverbindungen erfolgte mit LC-MS System 3. Im Vergleich zu der Analyse von Hefekultur-Extrakten wurden für die Analyse von *N. benthamiana* Extrakten ein Lösungsmittel-Gradient mit deutlich hydrophileren Ausgangsbedingungen gewählt, um die zu erwartenden, polareren STL-Addukte optimal aufzutrennen (5 µl Injektionsvolumen, Autosampler-Temp.: 10°C, Säulentemp.: 40°C, 1 min 2 B, 20 min 2-100 B,4 min 100 B, 4 min 2 B; A:$_{dd}H_2O$ /0,05 % Ameisensäure B: ACN /0,1 % Ameisensäure; A/B: LC-MS-Grade; 0,3 ml/min). Mit einem Injektionsvolumen von 5 µl wurde das Äquivalent von 1% einer Blattscheibe analysiert. Zunächst wurde von jeder Genkombination nur ein biologisches Replikat mittels LC-MS analysiert, wurden neue Produktpeaks identifiziert wurden die beiden weiteren biologischen Replikate ebenfalls analysiert.

2.3.5 Kernspinresonanzspektroskopie

Kernresonanzspektroskopie (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, NMR) aufgereinigter Verbindungen wurde am Institut für Chemie (130) der Universität Hohenheim von Dr. J. Conrad durchgeführt. Durch präparative Aufreinigung mittels HPLC wurden >1 mg Substanz aufgereinigt und in 200 µl deuteriertem Chloroform gelöst. Die NMR Messungen wurden an einem 500 MHz Varian Unity Inova (Varian, Inc./Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) Spektrometer mit einem 3 mm ID PFG Probenkopf in 3 mm Standard NMR-Röhrchen bzw. 3 mm Shigemi NMR-Röhrchen durchgeführt. Die Spektren wurden auf das Lösungsmittelsignal von Chloroform referenziert ($\delta_{H/C}$ 7,27/77 ppm). Zur vollständigen Strukturaufklärung wurden neben ^{1}H-NMR und selektivem 1D TOCSY folgende 2D Spektren aufgenommen: gCOSY (gradient enhanced **Co**rrelation **S**pectroscop**y**), gHSQCAD (**g**radient enhanced adiabatic **H**eteronuclear **S**ingle Quantum **C**oherence), gc(risis)2hsqcse (2D Heteronuclear Single Quantum Coherence with bip and adiabatic 180° pulses, sensitivity enhancement and gradient coherence selection), gHMBCAD (gradient enhanced adiabatic Heteronuclear Multiple Bond Correlation), gc(risis)2hmbc (2D Heteronuclear Single Quantum Coherence with bip and adiabatic 180° pulses and gradient coherence selection), ROESY (Rotating-frame NOE Spectroscopy), NOESY (Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy), TOCSY (Total Correlated Spectroscopy), gHSQCTOCSY.

2.3.6 Gaschromatographie/Massenspektroskopie

Die mit Hexan aus transformierten *N. benthamiana* Pflanzen extrahierten hydrophoben Metabolite, sowie Referenz Substanzen wurden mit Hilfe von Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) analysiert. Insbesondere die Bildung und Metabolisierung von Germacren A wurde mit dieser Methode nachgewiesen. Der im Folgenden als „GC-MS“ bezeichnete

Aufbau setzte sich wie folgt zusammen: Ein GC-MS-QP2010 System (Shimadzu, Kyoto, JP) wurde eingesetzt in Verbindung mit einer Agilent HP5-ms UI Säule (20 m Länge, 0,18 µM Durchmesser, 0,18 µM Dicke, Agilent, Santa Clara, CA, USA). Zunächst wurde von jeder Genkombination nur ein biologisches Replikat mittels GC-MS analysiert, wurden neue Produktpeaks identifiziert wurden die beiden weiteren biologischen Replikate ebenfalls analysiert.

2.4 Isolierung von Nukleinsäuren

2.4.1 Isolation von genomischer DNA aus Pflanzenmaterial

Die Extraktion von genomischer DNA aus Pflanzenmaterial erfolgte wie bei Frey & Spring (2015) beschrieben nach einem von May & Ristaino (2004) modifizierten Protokoll mit Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion und Fällung durch Ethanol/Natrium-Acetat.

2.4.2 Isolation von Plasmid DNA aus *E. coli*

Plasmide aus *E. coli* wurden mit dem GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) extrahiert. Je Plasmid-Präparation wurden 4 ml Übernacht-Kultur in LB Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum angesetzt. Aus den abzentrifugierten Bakterien-Präzipitaten wurde nach Angaben des Herstellers die Plasmidextraktion durchgeführt. Für Plasmide, von denen größere Mengen für Klonierungen und Transformationen benötigt wurden, wurden analog dazu aus 50 ml ÜN-Kultur Plasmide mit Hilfe des GeneJET Plasmid Midiprep Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) extrahiert. Von aufgereinigten Plasmiden wurde im Anschluss photometrisch die Konzentration sowie die Reinheit anhand des 260/230 und 260/280 Quotienten bestimmt.

2.4.3 Isolation von DNA aus Agarosegelen

Aufgetrennte Banden der Produkte von PCRs und Restriktionsverdauen wurden auf dem UV Leuchttisch (mit Unterlage) mit Hilfe von Deckgläschen ausgeschnitten. Für jede Bande wurde dabei ein neues Deckgläschen verwendet, um eine Verschleppung von Probe zu Probe auszuschließen. Die Belichtungsdauer unter UV Licht wurde dabei auf ein Minimum reduziert um eventuelle Beschädigung der DNA durch das UV-Licht zu minimieren. Die Agarose-Gelstücke wurden in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und die DNA mit dem GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) extrahiert. Die Extraktion erfolgte nach Angaben des Herstellers, der Elutions-Schritt wurde aber, um eine möglichst hohe DNA Konzentration zu erhalten, wie folgt modifiziert: Es wurden nur 20 µl Elutionspuffer (statt 50 µl) verwendet. Dieser wurde auf 60°C vorgewärmt und das Säulchen mit Elutionspuffer vor der Zentrifugation 10 min bei 60°C inkubiert.

2.4.4 Isolation von Gesamt-RNA

Grundsätzlich wurden für die Extraktion von RNA, sowie alle nachfolgenden Versuche mit RNA (Vermessung und Verdünnung von isolierter RNA, DNase I Verdau, Synthese von cDNA und RACE-Ready-cDNA) die erforderlichen Vorsichtsmaßnahmen eingehalten, um eine Kontamination mit RNase zu unterbinden. Die Maßnahmen zur Vermeidung von RNase Kontamination umfassten die ausschließliche Verwendung von RNAse freien Reaktionsgefäßen und Filterspitzen, das Tragen von Handschuhen, die Arbeit unter der Sterilbank, die Verwendung von DEPC-behandeltem Wasser ($_{dd}H_2O$, Mol. Biol. Qualität) sowie die Dekontamination von Pipetten, sowie sonstigem Arbeitsmaterial und Arbeitsoberflächen mit RNase AWAY® (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D). Arbeiten mit isolierter RNA fanden immer unter Kühlung der Reaktionsgefäße durch Eis statt, die Lagerung der RNA erfolgte bei -70°C.

RNA aus köpfchentragenden Drüsenhaaren wurde mit dem Aurum™ Total RNA Mini Kit von BioRad (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D) extrahiert. Hierzu wurden mit Hilfe der Microsampling Methode (Spring 1989) aus ca. 100 Antherenanhängen köpfchentragende Drüsenhaare abgesammelt. Die Entwicklung köpfchentragender Drüsenhaare, wie auch die Entwicklung der Röhrenblüte selbst, schreitet kontinuierlich mit der Position der Röhrenblüten innerhalb des Blütenkorbes von innen nach außen voran (Göpfert et al. 2005). Somit konnten für die Präparation Röhrenblüten ausgewählt werden, die in den Antheren-Anhängen köpfchentragende Drüsenhaare im späten präsekretorischen und frühen sekretorischen Stadium trugen. Für die Präparation wurden 700 µl eiskalte RNA Lysis Solution, versetzt mit 2 % (w/v) PVP, in einem RNAse freiem 2 ml Reaktionsgefäß vorgelegt und die abgesammelten Drüsenhaare in dem auf Eis gelagerten Reaktionsgefäß gesammelt. Im Anschluss wurden zwei Stahlkugeln (Ø 4,5 mm, Umarex, Arnsberg, D) zugegeben und die Drüsenhaare in der Schüttelmühle (MM400, Retsch GmbH, Haan, D) für 2x 3 min bei 30 Hz aufgeschlossen. Der weitere Verlauf der Extraktion erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Die Extraktion von RNA aus anderen Geweben erfolgte mittels des Spectrum™ Plant Total RNA Kits (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Der Aufschluss in der Schüttelmühle erfolgte in Intervallen aus Behandlung in der Schüttelmühle und Schock-Frieren mit flüssigem Stickstoff, wie bei Schmauder (2015) beschrieben. Die Extraktion der RNA wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. In den Expressions-Studien verwendete RNA von Wurzeln und Kotyledonen junger Sonnenblumenkeimlinge wurde im Rahmen der Masterarbeit von Katharina Schmauder mit dieser Methode extrahiert (Schmauder 2015).

Ein Nachverdau mit DNAse I erfolgte bei RNA Proben, bei denen sich in einer Kontroll-PCR eine Kontamination mit genomischer DNA herausstelle. Die Behandlung erfolgte mit der PerfeCTa® DNase I (Quantabio, Beverly, MA, USA) nach Angaben des Herstellers.

2.4.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration sowie der Reinheitsgrad von Nukleinsäuren (RNA, DNA, cDNA) wurde photometrisch bestimmt (BioPhotometer, Eppendorf AG, Hamburg, D) in Kombination mit einem Einsatz für ein minimiertes Messvolumen von 4 µl (Implen GmbH, München, D). Zur Bestimmung des Reinheitsgrades wurde der Quotient der Absorptionen bei den Wellenlängen 260/280 (Verunreinigungen mit Proteinen) sowie 260/230 (Verunreinigungen mit Zuckern, Salzen und Phenolen) bestimmt. Bei Plasmiden konnte die Konzentration ebenfalls durch einen Abgleich der Bandenintensität mit den Banden des Größenstandards abgeleitet werden.

2.5 DNA Techniken

2.5.1 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide, im Folgenden als Primer bezeichnet, wurden von Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) bezogen. Für quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) wurden Oligonukleotide in HPLC-gereinigter Qualität verwendet. Primer wurden mit $_{dd}H_2O$ (Mol. Biol. Qualität, Carl Roth GmbH) auf eine Arbeitskonzentration von 25 µM für PCR Reaktionen und 10 µM für qPCR Reaktionen eingestellt.

2.5.1.1 Oligonukleotide für Klonierungen

Tab. 2: Primer für die Klonierung in den pESC-Ura Vektor

Oligonucleotid	Sequenz 5´-3´
M4_F_EcoRI	*GTCAAT*GAATTC**ATG**GAGCCTTTCACAATTTTCTTC
M4_R_SpeI	*GTCAAT*ACTAGT**CTA**ATTTGGTTCTGATACGGAGATAGG
M19_F_EcoRI	*GTCAAT*GAATTC**ATG**TCTTTCAACCTACAAGTTTTTGTCTTC
M19_R_SpeI	*GTCAAT*ACTAGT**CTA**CTCCCTAGGAGTTGCTTTGACAAG
M22A_F_EcoRI	*GTCAAT*GAATTC**ATG**TCTTTCACTTTGCAAATTGTTCTC
M22A_R_SpeI	*GTCAAT*ACTAGT**TTA**TTACTTATAAGAAGTTGCTGTAACAAGTATAGG
M22B_F_EcoRI	*GTCAAT*GAATTC**ATG**GGGAGATTTAGCAAGTCTATCAAT
M22B_R_ClaI	*GTCAAT*ATCGAT**TTA**AGCAATAGGAGTTGCTGAAACTAGTATAG
M23_F_EcoRI	*GTCAAT*GAATTC**ATG**GAAATCTTTTCATCTTCACAAACC
M23_R_ClaI	*GTCAAT*ATCGAT**CTA**GAATCGAGGGCTTGGCATAACC
M33_F_EcoRI	*GTCAAT*GAATTC**ATG**TCTTTCAACCTACAAGTTTTTCTC
M33_R_SpeI	*GTCAAT*ACTAGT**TCA**CATGGAGTCACCGAGAAA
C28_F_EcoRI	*GTCAAT*GAATTC**ATG**TCTTTCAACCTACAAGTT
C28_R_SpeI	*GTCAAT*ACTAGT**TTA**CTCCCTAGGAGTTGCTTTGAC
C100_F_EcoRI	*GTCAAT*GAATTC**ATG**TCTTTCAACTTGCAAGTTTTTCTCCTCTC
C100_R1_SpeI	*GTCAAT*ACTAGT**CTA**CTCACAAGGAGTTGCAACAACAC
S1_F_EcoRI	*GTCAAT*GAATTC**ATG**GAAATTTTTCCATCTTTCCA
S1_R_SpeI	*GTCAAT*ACTAGT**CTA**GACCCTAGGAGTAGCAACAACTAG
S2_F_EcoRI	*GTCAAT*GAATTC**ATG**GATTTCTTGACATACTTGCCA
S2_R_SpeI	*GTCAAT*ACTAGT**CTA**AGCTTGTGTATTGTGCTTGATGGG
S3_F_EcoRI	*GTCAAT*GAATTC**ATG**TCTTTGGACTTTCAAGTT
S3_R_SpeI	*GTCAAT*ACTAGT**TTA**CTCGCAAGGAGTTGGTATGAC

Fett gedruckt: Start- und Stopp-Codon, Unterstrichen: Restriktions-Schnittstellen, kursiv: Überhängende Basen zur Optimierung der Effizienz der Restriktionsenzyme

Tab. 3: Primer für die Klonierung in den LIFE33 Vektor

Oligonucleotid	Sequenz 5´-3´
HaGAS1_5'	GGCTTAAU**ATG**GCAGCAGTTGGAGCCAGTGCTACCC
HaGAS1_3'	GGTTTAAU**TTA**CATGGGTGAAGAACCAACAAACAAGAGAGT
C28_5'	GGCTTAAU**ATG**TCTTTCAACCTACAAGTTTTTCTCT
C28_3'	GGTTTAAU**TTA**CTCCCTAGGAGTTGCTTTGACAAGTATAGG
C100_5'	GGCTTAAU**ATG**TCTTTCAACTTGCAAGTTTTTCTCC
C100_3'	GGTTTAAU**TTA**CTCACAAGGAGTTGCAACAACACGTACTGG
S3_5'	GGCTTAAU**ATG**TCTTTGGACTTTCAAGTTTTTCTCT
S3_3'	GGTTTAAU**TTA**CTCGCAAGGAGTTGGTATGACAAGTATGGG
M4_5'	GGCTTAAU**ATG**GAGCCTTTCACAATTTTCTTCATCT
M4_3'	GGTTTAAU**TTA**ATTTGGTTCTGATACGGAGATAGGGACAAT
M19_5'	GGCTTAAU**ATG**TCTTTCAACCTACAAGTTTTTGTCT
M19_3'	GGTTTAAU**TTA**CTCCCTAGGAGTTGCTTTGACAAGTATAGG
M22A_5'	GGCTTAAU**ATG**TCTTTCACTTTGCAAATTGTTCTCT
M22A_3'	GGTTTAAU**TTA**CTTATAAGAAGTTGCTGTAACAAGTATAGG
M33_5'	GGCTTAAU**ATG**TCTTTCAACCTACAAGTTTTTCTCT
M33_3'	GGTTTAAU**TTA**CATGGAGTCACCGAGAAAAGGGGTTGCAGT
C28B_5'	GGCTTAAU**ATG**TCTTTCAACCTACAAGTTTTTCTCT
C28B_3'	GGTTTAAU**TTA**CTCCCTAGGAGTTGCTTTGACAAGTATAGG
HaGAO_5'	GGCTTAAU**ATG**GAAGTCTCCCTCACCACTTCCATTG
HaGAO_3'	GGTTTAAU**TTA**AAAACTTGGTACAAGCATCAACTCAGTCTT
HaG8H_5'	GGCTTAAU**ATG**GAGCTTTTCACAATCTTCTCCATTG
HaG8H_3'	GGTTTAAU**TTA**CTTTGACAGGGAGATAGGGACAATCTTTAA
LsCOS_5'	GGCTTAAU**ATG**GAGCCTCTCACCATCGTCTCCCTCG
LsCOS_3'	GGTTTAAU**TTA**GGACTTGAGGATCGGGACGATTTTCAACTG

Fett gedruckt: Start- und Stopp-Codon, Unterstrichen: USER Schnittstellen

2.5.1.2 Oligonukleotide für quantitative PCR

Für die Erstellung von Primern für die qPCR wurden folgende Parameter berücksichtigt: (1) Der GC-Gehalt sollte zwischen 50%-60% liegen; (2) eine Annealing-Temperatur im Bereich von mindestens 60°C; (3) eine Differenz der Annealing-Temperaturen der beiden Primer geringer als 1°C; (4) eine Amplikon-Größe von 60-200 bp; (5) keine Wiederholungen von mehr als drei G oder C Basen; (6) die Primer enden mit einer G oder C Base; (7) die Primer haben eine Länge von 18 bis 28 bp, (8) die Primer bilden keine Sekundärstrukturen aus; (9) die Primer sind spezifisch für das zu amplifizierende Gen; (10) die Primer sind HPLC gereinigt. Auch wenn nicht alle Parameter in jedem Primer umgesetzt werden konnten wurde so eine Optimierung des Primerdesigns gewährleistet. Die Kriterien (1) bis (8) wurden mit dem Programm PrimerSelect (LASERGENE, DNASTAR Inc., Madison, WI, USA) geprüft.

Tab. 4: Primer für quantitative PCR

Oligonucleotid	Sequenz 5´-3´	Referenz
HaAct_KF2	GCCGTGCTTTCTCTTTATGCCAG	(Schmauder, 2015)
HaAct_KR2	CGACCAGCGAGATCAAGACGAAG	(Schmauder, 2015)
HaEF_KF3	ACCAAATCAATGAGCCCAAGAGACC	(Schmauder, 2015)
HaEF_KR4	CATACCGGGCTTGATCACACCAG	(Schmauder, 2015)
HaTub_F2	TGCCGTTTCAGAGGTTTTCAGTCG	(Schmauder, 2015)
HaTub_R2	CGCCTTCTTCCATCCCTTCACC	(Schmauder, 2015)
GAO_qPCR_KA_F	CCGCCCCAAACGGAAGATACTC	(Aschenbrenner, unpub.
GAO_qPCR_KA_R	GATCCCGAATACTGGAAAGACGC	(Aschenbrenner, unpub.
GAAO_qPCR_F5	TACGTTAGGCGATGTTAGCGAAGACC	(Frey, unpub.)
GAAO_qPCR_R3	ACGTGGTCTACTTCTGTGTTCCCTCAA	(Frey, unpub.)
M33_qPCR_F6	TCGGCTACGACATCCCATCAGG	(Frey, unpub.)
M33_qPCR_R8	CCAAATGGTATGAACTCGAAATGAAAAC	(Frey, unpub.)
M4_qPCR_F8	GATACTTATAAATGCGTGGGCTTGTGC	(Frey, unpub.)
M4_qPCR_R6	GGCCCCAAACGGAAGGAACTC	(Frey, unpub.)

2.5.1.3 Oligonukleotide für Sequenzierungen und Kontroll-Reaktionen

Tab. 5: Primer für Sequenzierungen und Kontrollen

Name	Sequenz	Referenz, Anmerkung
T3	GCAATTAACCCTCACTAAAGG	[(a)] pSC-A Amp/Kan, Agilent
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	[(a)] pSC-A Amp/Kan, Agilent
pJet1.2_F	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC	[(a)] pJET1.2, ThermoFisher
pJet1.2_R	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG	[(a)] pJET1.2, ThermoFisher
Gal1-F	ATTACTTCTTATTCAAATGTA	[(a)] pESC-Plasmide, MCS2,Agilent
Gal1-R	AATATAAATAACGTTCTTAA	[(a)] pESC-Plasmide, MCS2, Agilent
Gal10-F	GGATATGTATATGGTGGTAATG	[(a)] pESC-Plasmide, MCS1,Agilent
Gal10-R	GACAACCTTGATTGGAGAC	[(a)] pESC-Plasmide, MCS1,Agilent
M13F	GTAAAACGACGGCCAGT	[(a)] pRACE Plasmid
M13R	GCGGATAACAATTTCACACAGG	[(a)] pRACE Plasmid
USERseq_F	AGAGGACGACCTGCAGGC	[(a)] pLIFE33-Plasmide, Dr. I. Pateraki
USERseq_R	GCATGGGTCGACGAGC	[(a)] pLIFE33-Plasmide, Dr. I. Pateraki
GAS1P2	TGGCTCTTCCATGGCTTCAGCG	[(a)] (Frey & Spring 2015)
GAS1 P1 RK	GCACTGCAGAGCCAGTGCGT	[(a)] (Frey & Spring 2015)
Oligo-$(dT)_{18}$	TTTTTTTTTTTTTTTTT	Synthese von cDNA
HaUbiq-F	CAAAACCCTAACCGGAAAGA	(Göpfert 2009), Housekeeper
HaUbiq-R	ACGAAGACGGAGGACGAG	(Göpfert 2009), Housekeeper
HexaUbiQ_F	CTGTTTCGCTTCGTCTCTTTCA	(Grasse 2015), Kontrolle cDNA
HexaUbiQ_F	CTGAGCCTGAGCACGATGA	(Grasse 2015), Kontrolle cDNA

[(a)] Primer auch für Sequenzierungen verwendet, MCS: *multiple cloning site*

2.5.1.4 Oligonukleotide für RACE PCR

Tab. 6: Primer für RACE PCR Experimente

Name	Sequenz	Amplifikat [(a)]	Anmerkung
M33_RACE_R2RK	GATTACGCCAAGCTTATGTTCCG GTTCCACTGCTCATTCCCCATG	450 bp	GSP, 3´RACE
M33_RACE_R2	GATTACGCCAAGCTTCATGGGG AATGAGCAGTGGAACCGGAACAT	1.100 bp	GSP, 5´RACE
M4_RACE_F4	GATTACGCCAAGCTTCCGGATC ACCGATCAACTTTAGGGAGATGACTAG	1.000 bp	GSP, 3´RACE
M4_RACE_F3	GATTACGCCAAGCGGAGACGT CTGCAAAGATCGAAAAATCCTTC	900 bp	NGSP, 3´RACE
M4_RACE_R3	GATTACGCCAAGCGAAGGATT TTTCGATCTTTGCAGACGTCTCC	640 bp	GSP, 5´RACE
M4_RACE_R4	GATTACGCCAAGCTTCTAGTCATC TCCCTAAAGTTGATCGGTGATCCGG	500 bp	NGSP, 5´RACE
M22_RACE_F3	GATTACGCCAAGCTTCAGGCCGTT TTCAAACATCGCCAGTAGAA	1.250 bp	GSP, 3´RACE
M22_RACE_F2	GATTACGCCAAGCTTTGCACCAT ACGGAGAGTATTGGAGGCAGGTG	1.200 bp	NGSP, 3´RACE
M22_RACE_R3	GATTACGCCAAGCTTGATCTTT CTCCATCACGACCAAATCAAACT	1.500 bp	GSP, 5´RACE
M22_RACE_R2	GATTACGCCAAGCTTGACCA CTCGTCTCGCTCATATCCAAGACAT	1.450 bp	NGSP, 5´RACE
M19_RACE_F4	GATTACGCCAAGCTTGTCTTCT ATTCTCTTCCTATAATTTTTGCCTTACATGTTTCG	1.500 bp	GSP, 3´RACE
M19_RACE_F3	GATTACGCCAAGCTTGGTAGTGT GCCGATAATTGTAGCCTCTTCCG	1.250 bp	NGSP, 3´RACE
M19_RACE_R3	GATTACGCCAAGCTTCGGAAGA GGCTACAATTATCGGCACACTACC	250 bp	GSP, 5´RACE

[(a)] erwartete Amplifikat-Größe, Unterstrichen: RACE Adapter-Sequenz

Die Primer für die RACE-PCR wurden ausschließlich für die Amplifikation von DNA von RACE-Ready cDNA als Matrize verwendet. In vielen, aber nicht allen Fällen wurde ein duales System aus genspezifischem Primer und einem entsprechenden internen (*nested*) genspezifischen Primer erstellt. Dies war erforderlich, um innerhalb des extrem großen Pools an Cytochrom P450 Transkripten die gewünschten Amplifikate mit maximaler Spezifität zu erhalten. Alle neu konstruierten Primer für die RACE-PCR mussten demzufolge folgende sechs Kriterien erfüllen: (1) Der genspezifische Anteil sollte 23-28 nt enthalten; (2) der GC Gehalt sollte zwischen 50-70 % liegen; (3) die Tm (ohne Adapter-Anteil) sollte über 65°C liegen; (4) die Primer durften nicht komplementär zum 3´-Ende des Universal Primer Mix sein; (5) die Primer mussten spezifisch für das gewünschte Gen sein; (6) die Adapter-Sequenz GATTACGCCAAGCTT musste am 5´-Ende der Primersequenz angefügt sein. Die Überprüfung der Kriterien wurde wie folgt vorgenommen: (1)-(3) Überprüfung mit Hilfe von PrimerSelect (LASERGENE Software Paket, DNASTAR Inc., Madison, WI, USA); (4)-(5) Abgleich der Sequenzen über blastn (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi, NCBI, Bethesda, MD, USA). Durch Alignments mit bereits bekannten Cytochrom P450 Enzymen konnte die relative Position des P450 Fragmentes in Relation des gesamten Transkriptes abgeschätzt werden. In Bezug auf eine angenommene durchschnittliche Größe eines P450 Enzyms der entsprechenden Unterfamilien von ca. 1.500 bp konnte die Größe des zu erwartenden RACE-PCR Amplifikates abgeschätzt werden.

2.5.2 Synthese von cDNA

Tab. 7: Reaktionsansatz für die Synthese von cDNA

Komponente (Spezifikationen, Herkunft)	Volumen	
RNA	11,5 µl	
Oligo-$(dT)_{18}$ Primer (100 µM/µl, Sigma Aldrich GmbH)	1 µl	
-------Inkubation in ThermoCycler, 5 min, 65°C--------		12,5 µl
Reaktionspuffer (5x, Thermo Fisher)	4 µl	
RiboLock RNase Inhibitor (40 U/µl, Thermo Fisher)		0,5 µl
dNTP Mix (10 mM, Thermo Fisher)	2 µl	
RevertAid Reverse Transkriptase (200 U/µl,Thermo Fisher)	1 µl	
-------Inkubation in ThermoCycler, 60 min, 42°C--------		20 µl
-------Inkubation in ThermoCycler, 10 min, 70°C--------		
Gesamt		20 µl

Die Synthese von cDNA erfolgte mit der RevertAid Reversen Transkriptase (Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) nach Angaben des Herstellers, mit einem vorangeschalteten Inkubationsschritt von RNA und Oligo-$(dT)_{18}$ Primer bei 65°C, um eine optimale Reaktion auch bei eventuell vorhandenen Sekundärstrukturen zu gewährleisten. Neu synthetisierte cDNA wurde

zunächst in einer Test-PCR mit Hexaubiquitin Primern getestet und im Anschluss bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

2.5.3 Synthese von RACE-Ready cDNA

Die Synthese von RACE Ready RNA wurde mit dem SMARTer RACE 5´/3´ Kit (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA, USA) durchgeführt. Für die RACE-Ready cDNA Synthese wurden folgende RNA eingesetzt:

1. RNA aus köpfchentragenden Drüsenhaaren von Antherenanhängen im späten präsekretorischen und frühen sekretorischen Stadium.2. RNA von Brakteen von 12 Wochen alter Sonnenblumen (Blütenkörbe bereits geöffnet). 3. Als Positivkontrolle der Reaktion wurde die im Kit mitgelieferte RNA aus dem Herzgewebe der Maus in den Versuchsansatz miteinbezogen.

Alle Vorsichtsmaßnahmen für die Arbeit mit isolierter RNA (siehe 2.4.4) wurden eingehalten. Die Herstellung der RACE Ready cDNA erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die synthetisierte 3´-und 5´-RACE Ready cDNA (20 µl) wurde mit Tricin-EDTA-Puffer auf 110 µl verdünnt. RACE Ready RNA wurde bei -20°C gelagert.

2.5.3.1 Standard PCR Programme

Für das Testen von Primern, die Kontrolle von cDNA, Kolonie PCRs und erste Tests der Expression von Cytochrom P450 Fragmenten wurden PCR Reaktionen mit der RedTaq Polymerase (Genaxon BioScience GmbH, Ulm, D) durchgeführt. Für die Klonierung in Hefe-Vektoren wurde mit Phusion Taq Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) amplifiziert. Hierbei wurden mit den in (Tab. 2) beschriebenen Primern und dem in (Tab. 8) beschriebenen Temperaturprogramm die entsprechenden Restriktionsschnittstellen angebracht, die Zusammenstellung des Reaktionsansatzes entsprach den Angaben des Herstellers.

Tab. 8: PCR Programm für das Anhängen der Restriktionsschnittstellen

Reaktionsschritt	Zeitdauer	Temperatur	
initiale Denaturierung	0:30 min	98°C	
Denaturierung	0:10 min	98°C	35 Zyklen
Annealing	0:15 min	60°C	
Elongation	1:20 min	72°C	
finale Elongation	2:00 min	72°C	

Wurden offene Leserahmen mit dem Ziel der Klonierung amplifiziert, so wurde immer eine Proofreading Polymerase verwendet. Für das USER Cloning in die USER-Kassette des Vektor pLIFE33

wurde PfuTurbo® Cx Hotstart DNA Polymerase (Stratagene, La Jolla, CA, USA) verwendet. Der Reaktionsansatz für die Amplifikation mit PfuTurbo® Cx Hotstart DNA Polymerase wurde entsprechend der Angaben des Herstellers gewählt, Primer für das USER-Cloning sind in (Tab. 3) und das Temperatur-Programm in (Tab. 9) zu finden. Als Matrize für die Amplifikation dienten die in pESC-Ura klonierten offenen Leserahmen für die Kandidatengene. Die Gene HaGAO, HaG8H und LsCOS wurden von pESC-Leu2d Vektoren und HaGAS1 von dem Vektor pET32::HaGAS1 (Göpfert et al. 2009) amplifiziert. Für die Amplifikation bei der RACE PCR wurde mit der SeqAmp Polymerase (Clontech Laboratories, Inc. (TaKaRa), Mountain View, CA, USA) ebenfalls eine Proofreading Polymerase verwendet.

Tab. 9: PCR Programm für das Anhängen der USER Schnittstelle

Reaktionsschritt	Zeitdauer	Temperatur	
initiale Denaturierung	2:00 min	95°C	
Denaturierung	0:30 min	95°C	35 Zyklen
Annealing	0:30 min	60°C	
Elongation	1:30 min	72°C	
finale Elongation	10:00 min	72°C	

2.5.3.2 RACE-PCR

Für alle RACE-PCR Experimente wurde die im Kit mitgelieferte SeqAmp Polymerase (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA, USA) verwendet. Anhand bekannter Fragmente von Cytochrom P450 Enzymen wurden genspezifische Primer (GSP) für die 3´- und 5´- RACE Reaktion konstruiert. Dabei wurden die Vorwärts-Primer für die 3´-RACE-PCR (GSP-F) möglichst weit im 5´-Bereich und die Rückwärts-Primer für die 5´-RACE PCR (GSP-R) möglichst weit im 3´ Bereich des Fragmentes platziert. Somit wurde ein möglichst großer überlappender Sequenzbereich gewährleistet, bei dem 5´- und 3´- RACE-PCR Produkte miteinander abgeglichen werden konnten. Für die meisten Ansätze wurden zusätzlich weiter innen liegende sogenannte *Nested Genspezifische Primer* (NGSP-F und NGSP-R) konstruiert. Die Sequenzen der GSP und NGSP, sowie die Vorgehensweise bei der Primerkonstruktion sind in Kapitel (2.5.1.4) beschrieben. Von einem bekannten Fragment eines Cytochrom P450 Enzym-Kandidaten (Abb. 7A) konnten so der komplette ORF, sowie 5´- und 3´- UTR Regionen aufgeklärt werden (Abb. 7B). Diese Gesamt-Sequenz konnte aus dem Abgleich der 5´-RACE- (Abb. 7C) und 3´-RACE- (Abb. 7D) -PCR-Produkte ermittelt werden.

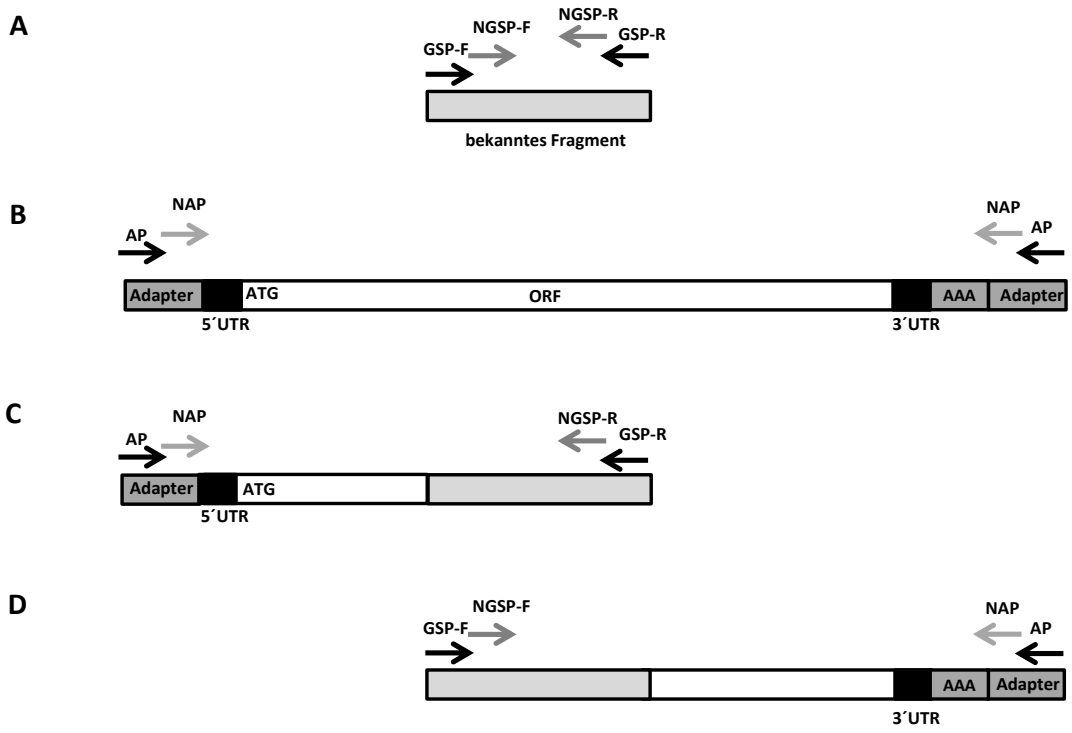


Abb. 7: Vorgehensweise RACE Experimente

A Bekannter Teil eines Gens; **B,** „Race-Ready cDNA" mit Adapter; **C,** 5´-RACE-PCR Produkt; **D,** 3´-RACE-PCR Produkt; AP: Adapter Primer, NAP: Nested Adapter Primer, GSP-F und GSP-R, Genspezifische Vorwärts- und Rückwärts-Primer, NGSP-F und NGSP-R Nested Genspezifische Vorwärts- und Rückwärts-Primer. Bei der cDNA Synthese werden an die 3´und 5´Enden der cDNA Adapter angehängt. In der 3´- und 5´-RACE-PCR werden Adapter Primer (AP) und Gen-Spezifische Primer (GSP) kombiniert (Modell modifiziert nach Darstellung Seite 9 der Anleitung des RACE Kits).

Die Reaktionsansätze für RACE-PCR mit der SeqAmp Polymerase sowie die Temperatur-Programme der RACE-PCR wurden, wie in den Angaben des Herstellers beschrieben, gewählt. Bei der RACE-PCR wurden zunächst eine PCR Reaktion mit einer bestimmten Zyklenzahl durchgeführt und ein kleiner Teil (5 µl/ 50 µl) auf einem Agarose-Gel analysiert. Zeigten sich hier noch keine Banden, konnte das PCR Produkt für weitere 5 Zyklen im Thermocycler weiter behandelt werden. Bei Nested PCR-Ansätzen wurden PCR Produkte zuvor 1:50 mit Tricin-EDTA Puffern verdünnt.

2.5.3.3 Kolonie-PCR

Kolonie-PCRs wurden bei Klonierungen routinemäßig durchgeführt um zu testen, ob Plasmide ein DNA Fragment der gewünschten Größe aufgenommen hatten. Nach der Ligation und Transformation wurden die Bakterien auf Selektionsmedium (LB Agar, mit 100 µg/ml Ampicillin) ausplattiert. Im Falle einer Klonierung in den pSC-A-Amp/Kan Vektor war eine Blau-Weiß Selektion möglich (LB Agar, mit 50 µg/ml Ampicillin und 0,04 % X-Gal). Bei einer Kolonie-PCR mit Bakterien-Kolonien wurden mit einer sterilen Pipettenspitze eine einzelne Kolonie abgenommen, in einem 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäß kurz in den vorgelegten Mastermix getaucht, im Mastermix hin- und her-gedreht und

im Anschluss auf einer "Masterplatte" (LB Agar, mit 100 µg/ml Ampicillin) ausgestrichen. Vor dem Start des Temperaturprogramms wurden die PCR Gefäße stark geschüttelt (Vortex) und kurz abzentrifugiert. Kolonie-PCR Produkte wurden im Anschluss auf einem Agarosegel aufgetrennt. Kolonie-PCRs zur Überprüfung von Hefe-Kulturen wurden nach einem ähnlichen Prinzip durchgeführt, allerdings wurden hier kleine Aliquots einer Hefe-Kultur abzentrifugiert und im Anschluss das Präzipitat mit 50 mM NaOH inkubiert (5 min, 100°C), um ein Aufbrechen der Zellen zu gewährleisten. Die auf diesem Wege aufgeschlossenen Zellen wurden abzentrifugiert und 1 µl des Überstandes in die Kolonie-PCR eingesetzt. Alle Kolonie-PCRs wurden mit dem RedTaq Mastermix (Genaxon BioScience GmbH, Ulm, D) durchgeführt. Die Kolonie-PCR Bedingungen wurden entsprechend der Anleitung des Herstellers gewählt. Entsprechend der Länge der erwarteten Insertionen in die jeweiligen Vektoren wurde mindestens 1 min Elongationszeit und bei einer Größe des Inserts von >1 kb eine Elongationszeit von 1 min/kb eingestellt (Tab. 10). Die Annealingtemperatur wurde auf 56°C eingestellt, diese Temperatur war für alle eingesetzten Standard-Primer geeignet. Je nach Vektor wurden unterschiedliche, die Insertionsstelle flankierende Primer verwendet (siehe Tab. 5). Dieselben Primer wurden bei der Sequenzierung der Inserts in den entsprechenden Plasmiden verwendet.

Tab. 10: PCR Programm Kolonie-PCR

Reaktionsschritt	Zeitdauer	Temperatur	
initiale Denaturierung	4:00 min	94°C	
Denaturierung	0:40 min	94°C	35 Zyklen
Annealing	0:40 min	56°C	
Elongation	1:00 min /kb	72°C	
finale Elongation	4:00 min	72°C	

2.5.3.4 Quantitative PCR

Die qPCR (quantitative Polymerase Kettenreaktion) wurde mit den in (Tab. 4 und Tab. 13) beschriebenen Primern zur Bestimmung der relativen Expression von am STL-Stoffwechsel beteiligten Enzyme durchgeführt. Die Reaktion wurde an einem C1000 Touch™ Thermal Cycler (Bio-Rad GmbH, München, D) mit den in (Tab. 11 bzw. Tab. 12) beschriebenen Reaktionsansätzen und Temperaturbedingungen durchgeführt und mit der mitgelieferten Software (CFX^{TM}-Manager, Version 3.0) analysiert.

Für jedes Primerpaar wurde die Amplifikationseffizienz anhand einer Verdünnungsreihe bestimmt. Die Stabilität der Housekeeper als M-Wert und Varianzkoeffizient CV wurde wie bei Schmauder (2015) beschrieben bestimmt. Die Stabilität der der Housekeeper Actin, α-Tubulin und Elongationsfaktor 1α (EF 1α) für Kotyledonen- und Wurzelgewebe junger Sonnenblumenkeimlinge,

sowie die Amplifikationseffizienz E für HaGAO, Actin, EF 1α und α-Tubulin wurden von Schmauder (2015) bestimmt. Ein optimaler Wert für die Referenzgen-Stabilität ergab sich hierbei für die Kombination aller drei Housekeeper (Schmauder 2015). Die Bestimmung der Amplifikationseffizienz der Primer für HaG8H, M4 und M33, sowie die Bestimmung von CV und M-Wert für Blatt-Primordien sind im Anhang wiedergegeben (S 19 und S20)

Tab. 11: Reaktionsansatz für qPCR

Komponente (Spezifikationen, Herkunft)	Volumen
SensiFAST SYBR NoRox Mix (2x, Bioline GmbH, Luckenwalde, D)	6,25 µl
$_{dd}H_2O$ (Mol. Biol. Qualität, Carl Roth GmbH)	4,25 µl
Primer 1 (10 µM)	0,5 µl
Primer 2 (10 µM)	0,5 µl
cDNA (2,5 ng/µl RNA-Äquivalent)	1 µl

Die Amplifikationseffizienz der Primer HaG8H, M4 und M33 wurden mit Verdünnungsreihen der entsprechenden Plasmide getestet. Um unspezifische Amplifikationen eines jeweils anderen, von der Sequenz her ähnlichen Kandidatengens zu verhindern, wurden M4 Primer gegen eine Verdünnungsreihe des HaG8H enthaltenden Plasmides getestet. Entsprechend wurden auch HaG8H gegen M4 und M33 Primer gegen C100 getestet.

Ein *Housekeeper* Gen sollte im Idealfall bei einer homogenen Probe einen CV-Wert unter 25 % bzw. 0,25 und einen M-Wert unter 0,5 haben (Hellemans et al. 2007). Diese Bedingungen wurden in den Blatt-Primordien von Actin und EF 1α erfüllt. Die besten Werte für die Stabilität ergaben sich hierbei für EF 1α, welches dementsprechend als Housekeeper-Gen für die Primordien gewählt wurde. Die Berechnung der relativen Expression für jede Probe ergab sich aus der ΔΔCt Methode unter Berücksichtigung der jeweiligen Amplifikationseffizienz (siehe Tab. 13) und mehrerer *Housekeeping* Gene (Pfaffl 2001). Für alle Proben wurden je drei biologische und drei technische Replikate des entsprechenden *Gene Of Interest* mit dem Mittelwert des Ergebnisses der *Housekeeper* verrechnet.

Tab. 12: Temperaturprogramm für qPCR

Reaktionsschritt	Zeitdauer	Temperatur	
Initiale Denaturierung	2:00 min	95°C	
Denaturierung	0:15 min	95°C	40 Zyklen
Annealing/ Elongation	0:15 min	60°C/ 64°C	
Schmelzkurve (in 0,5°C-Schritten)		65-95°C	

Tab. 13: In qPCR Experimenten amplifizierte Gene

Amplifiziertes Gen	Primerpaar	Amplifikat	Ta	E	R^2
HaGAO[(a)]	GAO_qPCR_KA_F GAO_qPCR_KA_R	85 bp	60°C	89,0 %	0,999
HaG8H	GAAO_qPCR_F5 GAAO_qPCR_R3	214 bp	64°C	91,2 %	0,997
M4	M4_qPCR_F8 M4_qPCR_R6	136 bp	64°C	95,9 %	0,998
M33	M4_qPCR_F6 M4_qPCR_R8	160 bp	64°C	95,9 %	0,999
Actin[(a)]	HaAct_KF2 HaAct_KR2	137 bp	60°C	89,8 %	0,999
EF 1α[(a)]	HaEF_KF3 HaEF_KR4	131 bp	60°C	93,8 %	0,998
α-Tubulin [(a)]	HaTub_F2 HaTub_R2	104 bp	60°C	84,8 %	0,985

[(a)] Validierung der Primer für HaGAO, sowie der Referenzgene Actin, Elongationsfaktor 1α (EF 1α), sowie α-Tubulin (aus Verdünnungsreihe von 1:2 bis 1:512) bei (Schmauder 2015), Ta: Annealingtemperatur in qPCR eingesetzt, E: Amplifikations-Effizienz, R^2: Bestimmtheitsmaß der Regressionsgerade, EF Elongationsfaktor, HaGAO *Helianthus annuus* Germacren A Oxidase, HaG8H *Helianthus annuus* Germacren A Säure 8β-Hydroxylase, Für die Accession Nr. der entsprechenden Gene siehe Anhang (S 1)

2.5.4 Auftrennung von Nukleinsäuren

Die Auftrennung von Nukleinsäuren erfolgte auf zwei unterschiedlichen Systemen: PCR Produkte der Kontroll-PCR für cDNA mit Hexaubiquitin Primern Produkten wurden mittels Kapillarelektrophorese durchgeführt. Die Auftrennung aller anderen PCR Produkte, sowie mittels Restriktionsverdau behandelter linearer DNA-Fragmente und Plasmiden erfolgte mittels Gelelektrophorese.

2.5.4.1 Gelelektrophorese

Für die Auftrennung von DNA in der Gelelektrophorese wurden Agarosegele mit 1,5 % Agarose (w/v) in TBE Puffer (pH 8,0, 89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA) verwendet. Die Agarose-Gele wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff HD-Green Plus versetzt (0,0025 % (v/v), INTAS GmbH, Göttingen, D). PCR-Produkte mit RedTaq-Mastermix sowie mit FastDigest Enzymen (Thermo Fisher)

verdaute Plasmide wurden nicht mit Ladepuffer versetzt, da bereits ein interner Ladepuffer beinhaltet war. Alle anderen PCR Produkte, Plasmide oder Produkte von Restriktionsverdauen wurden mit 6x Ladepuffer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) versetzt. Als Größenstandard wurde eine Spur mit 3,5 µl GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder beladen (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Die Auftrennung der DNA wurde in einer horizontalen Gelelektrophorese-Kammer (25 x 20 cm, MAXI-Kammer, PEQLAB GmbH (VWR), Erlangen, D) mit externer Spannungsquelle (PowerPac 300, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D) durchgeführt (30 min, 250 V). Die Sichtbarmachung der DNA unter UV Licht (312 nm) und die Dokumentation der DNA Banden wurde mit dem Geldokumantations-System GeliX Imager (INTAS GmbH, Göttingen, D) vorgenommen.

2.5.4.2 Kapillarelektrophorese

Die PCR Produkte zur Kontrolle der cDNA-Synthese mit Hexaubiquitin-Primern, sowie qPCR-Produkte, zur Überprüfung auf eventuell entstandene unspezifische Nebenprodukte wurden mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt. Die Kapillarelektrophorese wurde an einem Microchip Elektrophorese-System (MCE-202 MultiNA, Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg, D) mit einem 1000 bp Puffersystem und SYBR Gold als Floureszenzmarker nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.5.5 Sequenzierungen

Alle Sequenzierungen wurden von einem externen Anbieter (Macrogen Europe, Amsterdam, Niederlande) durchgeführt, dazu wurden nach Angaben des Anbieters 9 µl verdünntes PCR-Produkt oder Plasmid mit 1 µl Primer (25 µM) versetzt. PCR Produkte wurden mit den Primern mit denen sie generiert wurden sequenziert, Plasmide mit den die Insertionsstellen flankierenden Standard-Primern. Bei einer Größe >600 bp wurde grundsätzlich eine Sequenzierung mit Vorwärts- und Rückwärts-Primer durchgeführt und die Sequenzinformationen anschließend mit MegAlign zusammengefügt. Im Falle der Klonierung der Terpensynthase HaGAS1 in den Vektor pLIFE33 wurden aufgrund der Größe des Gens zusätzlich noch interne Primer für die Sequenzierung eingesetzt. Die Sequenzen der Primer für die Sequenzierung der in die jeweiligen Vektoren eingebrachten Konstrukte können (Tab. 5) entnommen werden.

2.6 Klonierungstechniken und -Strategien

In der vorliegenden Arbeit wurden grundsätzlich vier Klonierungsstrategien für unterschiedliche Zwecke angewandt:

Klonierungs-Strategie 1: Das Einbringen der offen Leserahmen (ORF) in den Hefe-Vektor pESC-Ura umfasste eine mehrstufige Klonierungs-Strategie: Zunächst wurden die ORF mittels PCR mit einer Proofreading Polymerase mit den entsprechenden Restriktions-Schnittstellen versehen. Die aufgereinigten PCR Produkte, wurden dann in den blunt-end Vektor pJet2.1 eingebracht. Dabei wurden mit EcoRI, SpeI und ClaI Restriktionsschnittstellen verwendet, die in dem Zwischenvektor nicht vorhanden waren. Die ORFs wurden dann aus dem Zwischenvektor herausgeschnitten und in den Hefe Vektor pESC-Ura ligiert.

Klonierungs- Strategie 2.: Für das Einbringen der offen Leserahmen der Cytochrom P450 Kandidatengene in den Agrobakterien-Vektor pLIFE33 wurde das USER^{TM} Cloning System verwendet.

Klonierungs-Strategie 3: Zur Sequenzierung von PCR-Produkten wurden die aufgereinigten amplifizierten Fragmente direkt mittels des StrataClone Klonierungssystem in den Vektor pSC-A-Amp/Kan eingebracht.

Klonierungs- Strategie 4: Zur Sequenzierung von RACE-PCR Produkten wurden die aufgereinigten Banden der PCR Produkte mittels InFusion HD Klonierung in pRACE Vektoren eingebracht.

2.6.1 Restriktionsverdau

Die für Restriktionsverdau eingesetzten Enzyme stammten von New England Biolabs (Ipswich, MA, USA) oder Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). Zwei der vier Klonierungs-Strategien beinhalteten den Einsatz von Restriktions-Enzymen.

Klonierungs-Strategie 1 hatte die Zielsetzung, die offenen Leserahmen von Cytochrom P450 Enzymen in den Hefe Expressionsvektor pESC-Ura einzubringen. Alle hier verwendeten Enzyme gehören zum Fast Digest System, das einen vollständigen Verdau in weniger als einer Stunde gewährleistet. Für eine einfache Reaktion von 20 µl Volumen wurden ca. 1 µg zu verdauende DNA kalkuliert. Für eine ausreichende Ausbeute für die weiteren Reaktionsschritte wurden 1,5-fache Ansätze kalkuliert. Alle klonierten Cytochrom P450 Enzyme außer M22B wurden mit der Enzymkombination EcoRI und SpeI kloniert. Da im offenen Leserahmen des Kandidaten-Gens M22B eine SpeI Schnittstelle vorliegt, wurde hier eine Kombination von EcoRI und ClaI verwendet. Die in der FastDigest Variante des Herstellers Thermo Fisher Scientific verwendeten Isoschizomere Bsu15I für ClaI und BcuI sind im Folgenden in Klammern angegeben.

Das Temperaturprogramm in (Tab. 15) wurde für den Restriktionsverdau verwendet. Im Anschluss an den 20-minütigen Verdau folgte eine 15-minütige Inaktivierungsphase. Da die Enzymvariante SpeI FD (BcuI) nicht thermisch inaktiviert werden kann, wurde im Anschluss an den Verdau eine Ethanol-Fällung der verdauten DNA durchgeführt, um vor der Auftrennung mittels Agarose-Gelelektrophorese Rückstände von aktivem Restriktionsenzym zu entfernen: Der 30 µl Ansatz wurde mit -20 °C kaltem Ethanol auf 200 µl aufgefüllt, invertiert, 30 min bei -20 °C inkubiert, und

abzentrifugiert (10 min, -5 °C, 20.000 g). Nach dem Entfernen des Überstandes wurde das Präzipitat 20 min in der Sterilbank getrocknet und in 10 µl FD Buffer (1x) wieder aufgenommen. Im Anschluss an die Reaktion wurde der Ansatz auf einem Agarose-Gel aufgetrennt.

Tab. 14: Reaktionsansatz für den Restriktionsverdau für die Klonierung in pESC-Ura

Komponente (Spezifikationen, Herkunft)	Volumen
FD Buffer Green (10x, Thermo Fisher Scientific)	3 µl
DNA (100 ng/µl, pJET2.1/blunt-Plasmid oder PCR Produkt)	15 µl
EcoRI FD (10 U/µl, Thermo Fisher Scientific)	1,5 µl
SpeI FD (Bsu15I) oder ClaI (BcuI) FD (10 U/µl, Thermo Fisher Scientific)	1,5 µl
$_{dd}H_2O$ (Mol. Biol. Qualität, Carl Roth GmbH)	9 µl
Gesamt	30 µl

Tab. 15: Temperaturprogramm für den Restriktionsverdau für die Klonierung in pESC-Ura

Zeitdauer	Temperatur
20 min	37°C
5 min	80°C
10 min	65°C

Tab. 16: Reaktionsansatz für den Restriktionsverdau für die Klonierung in pESC-Ura::CR

Komponente (Spezifikationen, Herkunft)	Volumen
CutSmart Buffer (10x, New England Biolabs)	7,5 µl
DNA (Plasmid oder PCR Produkt, 75 ng/µl)	20 µl
EcoRI HF (20 U/µl, New England Biolabs)	1,5 µl
SpeI HF (20 U/µl, New England Biolabs)	1,5 µl
$_{dd}H_2O$ (Mol. Biol. Qualität, Carl Roth GmbH)	44,5 µl
Gesamt	75 µl

Für das Einbringen von Cytochrom P450 Enzymen in den Vektor pESC-Ura::CR zur Schaffung eines dualen Expressions-Plasmides wurden Enzyme aus der High Fidelity Serie von New England Biolabs (Ipswich, MA, USA) verwendet, die den Angaben des Herstellers zufolge eine drastisch verringerte Star-Activity (d.h. die Wahrscheinlichkeit unspezifisch zu schneiden) aufweisen.

Der Reaktionsansatz wurde im Thermocycler (peqSTAR 96 Universal Gradient, PEQLAB GmbH (VWR), Erlangen, D) 20 min bei 37°C und 20 min bei 80°C inkubiert. Da das Isoschizomer SpeI HF Hitze-inaktivierbar ist, konnte auf eine Ethanol-Fällung verzichtet werden und der Ansatz im Anschluss an den Verdau direkt auf drei Taschen verteilt auf einem Agarose-Gel aufgetrennt werden.

Klonierungs-Strategie 2 mit der Zielsetzung die offenen Leserahmen von Cytochrom P450 Enzymen über USER Cloning in den Agrobakterien-Vektor pLIFE33 einzubringen erforderte einen anderen Ansatz für den Restriktionsverdau. Hier wurde durch Restriktionsverdau ein linearisierter Vektor hergestellt, der im Anschluss an die Reaktion in Aliquots bis zur Verwendung in der USER-Reaktion bei -20 °C eingefroren wurde.

Tab. 17: Reaktionsansatz für den Restriktionsverdau für die Linearisierung des Vektors pLIFE33

Komponente (Spezifikationen, Herkunft)	Volumen	
CutSmart Buffer (10x, New England Biolabs)	20 µl	
DNA (pLIFE33 Plasmid, 100 ng/µl)	100 µl	
PacI (10 U/µl, New England Biolabs)	7 µl	
$_{dd}H_2O$ (Mol. Biol. Qualität, Carl Roth GmbH)	73 µl	
-------Inkubation in ThermoCycler, ÜN, 37 °C--------		200 µl
PacI (10 U/µl, New England Biolabs)	2 µl	
Nt.Bbv.Cl (10 U/µl, New England Biolabs)	4 µl	
-------Inkubation in ThermoCycler, 1 h, 37 °C--------		206 µl
Natrium Acetat (3 M, pH 5.2, Carl Roth GmbH) (zur Fällung)	20 µl	
Ethanol (100%, eiskalt, Carl Roth GmbH) (zur Fällung)	500 µl	
Gesamt		726 µl

Der Ansatz zur Fällung des Restriktionsverdaues wurde kurz geschüttelt, inkubiert (30 min, -20°C) und abzentrifugiert (30 min, 4°C, 20.000 g). Anschließend wurde der Überstand abgenommen und das Präzipitat mit 70 % eiskaltem Ethanol gewaschen. Das gereinigte Präzipitat wurde 10 min unter der Sterilbank getrocknet und in 40 µl $_{dd}H_2O$ wieder aufgenommen. Je zwei Ansätze wurden zu einem 80 µl Aliquot vereinigt. Um zu gewährleisten, dass der Restriktionsverdau vollständig abgelaufen war, wurde ein 6 µl Aliquot des geschnittenen (linearisierten) Vektors mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und mit ungeschnittenem Vektor als Kontrolle verglichen. Mehrere 80 µl Aliquots der auf diese Weise linearisierten Vektoren wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.6.2 Ligation

Drei der vier beschriebenen Klonierungsstrategien beinhalten verschiedene Formen der Ligations-unabhängigen Klonierung. Für das Einbringen von ORFs von Cytochrom P450 Enzymen in den Hefe-Vektor pESC-Ura bzw. pESC-Ura::CR wurden an zwei Positionen des Arbeitsablaufes Ligationen mittels T4 Ligase durchgeführt, nämlich beim Einbringen von PCR Produkten in den Zwischenvektor pJET2.1/blunt, sowie beim Einbringen in den Zielvektor pESC-Ura. Für die Ligation von PCR Produkten in den Vektor pJET1.2/blunt wurde jeweils ein molares Verhältnis zwischen Insert und Vektor von 3:1

eingestellt. Hierbei handelte es sich um eine sogenannte blunt end Ligation, daraus ergab sich eine höhere Konzentration an eingesetzter Ligase.

Tab. 18: Reaktionsansatz für die "*blunt end*" Ligation

Komponente (Spezifikationen, Herkunft)	Volumen
T4 DNA Ligase Puffer (2x, Thermo Fisher Scientific)	7,5 µl
DNA (PCR Produkt)	(0,15 pmol) x µl
DNA (Plasmid pJET1.2/blunt, 0,05 pmol/µl)	1 µl
T4 DNA Ligase (1 U/µl, Thermo Fisher Scientific)	1 µl
$_{dd}H_2O$ (Mol. Biol. Qualität, Carl Roth GmbH)	Add 20 µl
Gesamt	20 µl

Für die Ligation von Cytochrom P450 ORFs in pESC-Ura Vektor wurde jeweils ein molares Verhältnis zwischen Insert und Vektor von 2:1 eingestellt, wobei 100 ng Vektor verwendet wurden. Bei einem Vektor von 6.600 bp und einem Insert von 1.500 bp ergibt sich daraus eine einzusetzende Menge von 45 ng Insert. Hierbei handelte es sich um eine sogenannte *sticky-end* Ligation. Ligations-Reaktionen (6 h, 22 °C; 8 h, 8 °C; 10 min, 65 °C) wurden im Thermocycler (peqSTAR 96 Universal Gradient, PEQLAB GmbH (VWR), Erlangen, D) durchgeführt.

Tab. 19: Reaktionsansatz für die "*sticky end*" Ligation

Komponente (Spezifikationen, Herkunft)	Volumen
T4 DNA Ligase Puffer (2x, Thermo Fisher Scientific)	7,5 µl
DNA (PCR Produkt)	45 ng
DNA (Plasmid pESC-Ura)	100 ng
T4 DNA Ligase (1 U/µl, Thermo Fisher Scientific)	0,2 µl
$_{dd}H_2O$ (Mol. Biol. Qualität, Carl Roth GmbH)	Add 20 µl
Gesamt	20 µl

2.6.3 USER-Cloning

Klonierungs-Strategie 2 mittels des USER™-Cloning Kits (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) wurde verwendet, um die ORFs mehrerer Cytochrom P450 Enzyme und von *H. annuus* Germacren Synthase 1 (HaGAS1) in den Agrobakterien-Vektor pLIFE33 einzubringen. Bei dem "Uracil-spezifischen Exzisions-Reagenz" bzw. USER™ genannten Verfahren, werden PCR Produkte durch spezielle Primer mit einem desoxy-Uracil enthaltenden Überhang versehen (Nour-Eldin et al. 2006; Bitinaite et al. 2007). Entscheidend ist hierbei die Verwendung der PfuTurbo® Cx Hotstart DNA Polymerase (Stratagene, La Jolla, CA, USA), die einzige Polymerase, die sowohl eine Proofreading Aktivität besitzt, als auch Uracil in der Matrizen-DNA toleriert (Nour-Eldin et al. 2006). Die

entsprechenden Gene wurden ausgehend von Vektorkonstrukten ohne Kanamycinresistenz in einer PCR mit PfuTurbo® Cx Hotstart DNA Polymerase (Stratagene, La Jolla, CA, USA) amplifiziert. Dabei wurden durch die verwendeten Primer die für die USER-Kassette im Zielvektor kompatiblen Uracil-haltigen Überhänge eingebracht. Die Primer für die Klonierung in pLIFE33 sind in (2.5.1.1) zusammengefasst. In der USER Reaktion wurden die PCR-Produkte in die geöffnete USER-Kassette des linearisierten Zielvektors pLIFE33 eingebracht. Da die Donor-Plasmide, also die Plasmide aus denen die Inserts amplifiziert und mit den USER Sequenzanängen versehen wurden keine Kanamycin-Resistenz enthielten, konnte das PCR Produkt ohne Gelextraktion direkt in die USER Reaktion eingesetzt werden. Der USER Reaktionsansatz wurde 20 min bei 37 °C und 20 min bei 25 °C inkubiert. Für die anschließende Hitzeschock-Transformation wurden je 25 µl kompetente Zellen (Giga Singles Competent Cells, Agilent, Santa Clara, CA, USA) mit 6 µl des USER Reaktionsproduktes transformiert. Die Transformation lief im Folgenden wie in Kapitel (2.7.4) beschrieben ab, mit Kanamycin als Selektionsmedium.

Tab. 20: USER Reaktionsansatz

Komponente (Spezifikationen, Herkunft)	Volumen
Vektor (pLIFE33, linearisiert mit PacI/Nt.Bbv.CI, 63 ng/µl)	2 µl
PCR Produkt	10 µl
USER Enzym (1 U/µl, New England Biolabs)	0,75 µl
Gesamt	12,75 µl

2.6.4 In-Fusion-HD Klonierung

Das *In Fusion HD Klonierungssystem* wurde zur Klonierung der für die Sequenzierung vorgesehenen RACE-PCR Produkte verwendet. Mittels *In-Fusion HD Klonierungssystem* (In-Fusion® Cloning Kit, Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA, USA) wurden die RACE-PCR Produkte in pRACE Vektoren eingebracht. Die Klonierung wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.6.5 StrataClone Klonierungs-System

Klonierungs-Strategie 3 wurde zur Klonierung und Sequenzierung von PCR Produkten verwendet. Alle PCR Produkte wurden mit Proofreading Polymerase amplifiziert (Phusion, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Die Klonierung mittels StrataClone Blunt PCR Cloning Kit (Agilent Santa Clara, CA, USA) in den *blunt-end* Vektor pSC-A Amp/Kan erfolgte nach Angaben des Herstellers, allerdings mit einem 1:3 verkleinerten Reaktionsvolumen.

2.6.6 Klonierungen in pJET2.1/blunt Vektor

Die Klonierung in den Zwischenvektor pJET2.1/blunt erfolgte mit Hilfe des CloneJET PCR Cloning Kits (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) nach Angaben des Herstellers.

2.7 Mikrobiologische Methoden

2.7.1 Plasmide

Durch die in Kapitel 2.6 beschriebenen Klonierungstechniken wurden Fragmente und ORFs von Cytochrom P450 Enzymen und Terpensynthasen in die Vektoren pSC-A Amp/Kan, pJET2.1/blunt, pRACE, pLIFE33 und pESC-Ura eingebracht. Die aus externen Quellen bezogenen Plasmide sind in (Tab. 21) aufgeführt.

Tab. 21: Übersicht der Vektoren aus externen Quellen

Plasmid	Quelle; Referenz
pSC-A Amp/Kan	Agilent (Santa Clara, CA, USA)
pJET2.1/blunt	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
pRACE	Clontech Laboratories, Inc. (Mountain View, CA, USA)
pLIFE33	Dr. I. Pateraki, PLEN, Uni Kopenhagen, DK; (Nour-Eldin et al. 2006)
pEAQ-HT-DEST1-USER::DXS, p19/DXS[a,b]	Dr. I. Pateraki, PLEN, Uni Kopenhagen, DK; (Luo et al. 2016)
pLIFE33::GGPPS	Dr. I. Pateraki, PLEN, Uni Kopenhagen, DK (Andersen-Ranberg et al. 2016)
pET32::HaGAS1, pET32::HaTPS1[b,c]	Dr. J. Göpfert, Uni Hohenheim; (Göpfert et al. 2009)
pESC-Ura	Agilent (Santa Clara, CA, USA)
pESC-Ura::CR	Dr. D.-K. Ro, Uni Calgary, CAN; (Ro et al. 2006)
pESC-Ura::CR/HaGAO	Dr. J. Göpfert, Uni Hohenheim; (Nguyen et al. 2010)
pESC-Ura::CR/HaG8H, pESC-Ura::CR/C12 [b]	Dr. D.-K. Ro, Uni Calgary, CAN; (Ikezawa et al. 2011)
pESC-Leu2d[d]	Dr. D.-K. Ro, Uni Calgary, CAN; (Ro et al. 2008) [c]
pESC-Leu2d::GAS/GAO/CR	Dr. D.-K. Ro, Uni Calgary, CAN; (Nguyen et al. 2010)
pESC-Leu2d::GAS/GAO/CR/HaG8H	Dr. D.-K. Ro, Uni Calgary, CAN; (Ikezawa et al. 2011)
pESC-Leu2d::GAS/GAO/CR/HaG8H$_{synth}$	Dr. D.-K. Ro, Uni Calgary, CAN; unpub.
pESC-Leu2d::GAS/GAO/CR/LsCOS	Dr. D.-K. Ro, Uni Calgary, CAN; (Ikezawa et al. 2011)

[a] Der Basisvektor pEAQ-HT-DEST1-USER enthält bereits das Gen p19, pEAQ-HT-DEST1-USER::DXS wird vereinfacht als p19/DXS bezeichnet, [b] Ursprüngliche Bezeichnung des Vektors, [c] pLIFE33: Ausgangsvektor: pCAMBIA1300u (Cambia, Canberra, Australien), erweitert mit USER-Cloning Kassette, pET32-Ausgangsvektor: Novagen (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland), [d] Leu2d: von Ro et al. (2008) modifizierter Vektor pESC-Leu von Agilent (Santa Clara, CA, USA)

2.7.2 Bakterien- und Hefe-Stämme

Für Klonierungen wurden zwei verschiedene Bakterien Stämme verwendet: Stellar™ Competent Cells für die Klonierung von RACE-PCR Produkten sowie StrataClone Competent Cells für alle anderen Klonierungen in *E. coli*. Für die transiente Transformation von und *in vivo* Expression in Tabak wurden Agrobakterien des Stammes AGL1 verwendet. Die *in vivo* Expressionsversuche in Hefe wurden im Stamm EPY300 durchgeführt, der für eine optimale Bereitstellung des Ausgangsproduktes für den STL-Stoffwechselweg, Farnesylpyrophosphat, entwickelt wurde (Ro et al. 2006).

Tab. 22: Verwendete Bakterien- und Hefe-Stämme

Stamm	Organismus, Genotyp	Zweck	Quelle; Referenz
Stellar™ Competent Cells	*Escherichia coli*, K12 *F–, endA1, supE44, thi-1, recA1, relA1, gyrA96, phoA, Φ80d lacZΔ M15, Δ (lacZYA - argF) U169, Δ (mrr - hsdRMS - mcrBC), ΔmcrA, λ–*	Klonierung	Clontech Laboratories, Inc. (Mountain View, CA, USA)
StrataClone Competent Cells	*Escherichia coli*, K12 *Streptomycin-Resistenz (Für detaillierte Informationen über den Genotyp siehe Herstellerangaben)*	Klonierung	Agilent (Santa Clara, CA, USA)
AGL1	*Agrobacterium tumefaciens* *Rifampicin- und Ampicillin- Resistent, AGL0 (C58 pTiBo542) recA::bla, T-Region deletiert Mop(+) Cb(R)*	*In vivo* Expression	Dr. I. Pateraki, PLEN, Uni, Kopenhagen; (Lazo et al. 1991)
EPY300	*Saccharomyces cervisiae* *S288C, MATα his3Δ1 leu2Δ0 P_{GAL1}–tHMG1::δ1 P_{GAL1}–upc2-1::δ2 erg9::P_{MET3}–ERG9::HIS3 P_{GAL1}–ERG20:: δ3 P_{GAL1}–tHMG1:: δ4*	*In vivo* Expression	Dr. D.-K. Ro, Uni Calgary, CAN; (Ro et al. 2006)

2.7.3 Kulturmedien und Antibiotika

Tab. 23: Kulturmedien

Medium	Zusammensetzung des Mediums		Varianten
LB	LB Medium (Lennox), (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D)	20 g/L	LB LB_{Amp} [(a)] LB_{Kan}
LB Agar	LB Agar (Luria/Miller), (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D)	20 g/L	LB Agar $LB_{X\text{-}Gal/Amp}$ [(b)] Agar LB_{Kan} Agar
SOC	Fertigmedium in 1 mL Aliquots (Clontech, Mountain View, CA, USA)		SOC
YEP	Bacto Yeast Extract Bacto Tryptone NaCl	10 g/L 10 g/L 5 g/L	YEP $YEP_{Rif/Kan/Car}$
YEP Agar	YEP, versetzt mit Agar	 20 g/L	YEP Agar $YEP_{Rif/Kan/Car}$ Agar
SC-HM	SC-Ade-Arg-Ura-Thr-Trp-Met-His-Leu (Multiple Dropout Medium, Formedium™, Norfolk, UK) Yeast Nitrogen Base (ohne Aminosäuren) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) Adenin Arginin Threonin Tryptophan Leucin [(c)] Uracil [(c)] (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D)	1,148 g/L 6,7 g/L 21 mg/L 85,6 mg/L 85,6 mg/L 85,6 mg/L 171,2 mg/L 85,6 mg/L	SC-HM SC-HML SC-HMU SC-HMLU
SC-HM Agar	SC-HM, versetzt mit Bacto Agar (Difco Inc., BD, Franklin Lakes, NJ, USA)	6 g/L	SC-HM Agar SC-HML Agar SC-HMU Agar SC-HMLU Agar

[(a)] Antibiotika Konzentrationen: 50 µg/ml Ampicillin (Amp), 50 µg/ml bzw. 100 µg/ml Kanamycin (Kan) für YEP bzw. LB Medium, 25 µg/ml Rifampicin (Rif), 50 µg/ml Carbenicillin (Car),[(b)] X-Gal 2 % (w/v) in DMF, davon 1 ml/ 500 ml Medium (c) SC-HM: ohne Histidin und Methionin, SC-HML: ohne Histidin, Methionin und Leucin, SC-HMU: ohne Histidin, Methionin und Uracil, SC-HMLU: ohne Histidin, Methionin, Leucin und Uracil

2.7.4 Transformation von *Escherichia coli*

Kompetente Zellen von *E. coli* der Stämme Stellar™ Competent Cells (Clontech Laboratories, Inc. (Mountain View, CA, USA) sowie StrataClone (Agilent, Santa Clara, CA, USA) wurden nach Angaben des Herstellers mit einem Hitzeschock-Protokoll transformiert. Kompetente Zellen wurden dabei auf Eis aufgetaut. Im Anschluss wurden 25 µl in einem 0,5 ml Reaktionsgefäß mit 1-2 µl des entsprechenden Vektorkonstruktes, bzw. Ligationsproduktes durch vorsichtiges Umrühren mit einer Pipettenspitze vermischt. Nach einer 20-minütigen Inkubation auf Eis wurde der Transformationsansatz einem Hitzeschock im Thermocycler (Eppendorf AG, Hamburg, D) unterzogen (45 sec, 42°C) und danach wieder für 2 min auf Eis gestellt. Die transformierten Zellen wurden im Anschluss mit 150 µl 37°C warmen LB-Medium, bzw. SOC-Medium (Stellar Comp. Cells) ohne Antibiotikum für 60°min im Schüttlelinkubator (Excella E24, New Brunswick Scientific Co. Inc., Edison, NJ, USA) inkubiert. Im Anschluss daran wurden 100 µl auf Agarplatten mit $LB_{X\text{-}Gal/Amp}$ Medium ausgestrichen, und ÜN im Wärmeschrank (Modell 3158, Forma Scientific, Inc., Marietta, OH, USA) bei 37°C inkubiert. Am Folgetag wurden die gewachsenen Kolonien analysiert. Im Falle einer Klonierung in den pSC-A Vektor konnte zunächst eine Blau-Weiß Selektion vorgenommen werden. In jedem Fall wurden mindestens fünf Kolonien in eine Kolonie-PCR eingesetzt.

2.7.5 Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

Kompetente *Agrobacterium tumefaciens* Zellen des Stammes AGL1 (Rifampicin- und Ampicillin-resistent) wurden mit einem Elektroporations-Verfahren transformiert. Elektroporations-Küvetten wurden auf Eis vorgekühlt, pLIFE33 Plasmide (Kanamycin-Resistenz) und kompetente *A .tumefaciens* Zellen auf Eis aufgetaut. 2 µl Plasmid wurde auf Eis mit 50 µl *A .tumefaciens* Zellen vermischt. Die gekühlte Elektroporations-Küvette (Wanddicke: 2 mM) wurde kurz abgetrocknet und in die Elektroporations-Apparatur eingesetzt, danach wurde der Transformations-Ansatz auf den Boden der Küvette transferiert. Direkt im Anschluss an die Behandlung im Elektroporator (400 Ω, 2,5 kV, 25 µF) wurde 1 ml YEP Medium (ohne Antibiotikum) zugegeben, und der Ansatz mit Hilfe einer sterilen Einmal-Pipette in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach einer Inkubationsphase von 2,5 h (28°C, 360 rpm) wurde der Transformationsansatz abzentrifugiert (3.000 g, 3 min), 800 µl entfernt und das Präzipitat in 200 µl wieder aufgenommen. Im Anschluss wurden 50 µl (1/4) des Transformationsansatzes mit Hilfe steriler Glaskugeln auf Selektionsplatten ($YEP_{Rif/Kan/Car}$ Agar) ausplattiert und 2 Tage im Brutschrank bei 28°C inkubiert.

2.7.6 Transformation von *Saccharomyces cervisiae*

Der *S. cervisiae* Stamm EPY300 wurde durch eine Kombination aus Hitzeschock-Verfahren und der Verwendung eines "Transformations-Mastermix" aus LiAc/ssDNA/PEG transformiert (Nguyen et al. 2012, modifiziert nach Gietz & Schiestl (2008)). Die Transformation wurden entsprechend dem Protokoll von Nguyen et al. (2012) durchgeführt, mit der Modifikation, dass 1 µg Plasmid für die Transformation verwendet wurde. Die Komponenten des Transformations-Mastermix (LiAc: Lithiumacetat, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D; ssDNA: salmon testes ssDNA; PEG: Polyethylenglycol 4000, beide Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) wurden für jede Transformation einzeln angesetzt.

2.7.7 Transiente Transformation von *Nicotiana benthamiana*

Die transiente Transformation von *N. benthamiana* Blättern erfolgte mit Modifikationen nach dem Protokoll von Bach et al. (2014). Zwei Tage vor der Transformation wurden, für jedes zu transformierende Gen, Kulturen von *A. tumefaciens* Stämmen, die das Plasmid mit dem entsprechenden Gen enthielten, angesetzt. Dabei wurden 10 ml $YEP_{Rif/Kan/Car}$ Medium mit einer sterilen Pipettenspitze mit mehreren Kolonien von einer Platte angeimpft. Nach 48 h wurden die Kulturen abzentrifugiert (4.000 g, 10 min, 16 °C), der Überstand verworfen und die Präzipitate in 20 ml sterilem Wasser wieder aufgenommen. Die Agrobakterien wurden in sterilem Wasser wieder resuspendiert, die optische Dichte gemessen, und die optische Dichte der Kultur auf OD=1 eingestellt. Für jede zu infiltrierende Pflanze wurden im Anschluss in einer Petrischale 10 ml einer Mischung der Agrobakterien-Suspensionen mit den gewünschten Genen erstellt. Bei zwei einzubringenden Konstrukten wurden die Bakteriensuspensionen 1:1 gemischt, bei 3 Konstrukten 1:1:1, etc.. Vier Wochen alte *N. benthamiana* Pflanzen, die noch vor der Ausbildung der Blüte standen, wurden für die Infiltrationsversuche verwendet. Die Agrobakterien-Suspension wurde mit Hilfe einer 1 ml Spritze in die Blattzwischenräume der Blätter infiltriert. Dabei wurden von jeder Pflanze mindestens drei Blätter vollständig infiltriert. Dabei wurde, wie bei Bach et al. (2014) beschrieben, jedes einzelne Blatt als biologisches Replikat behandelt (n=3). Nach der Infiltration wurden die Pflanzen ins Gewächshaus zurückgebracht und bis zur Extraktion der Blätter sechs Tage weiter wachsen gelassen.

2.7.8 Hefe-Expressionskulturen

Hefe-Expressionskulturen wurden wie bei Nguyen et al. (2012) beschrieben durchgeführt, allerdings mit mehreren Modifikationen. Für analytische Kulturen wurden lediglich 4 ml große Kulturen in 13 ml Kulturröhrchen angesetzt, statt 50 ml Kulturen in 250 ml Erlenmeyerkolben. Dieser Mikro-Expressions-Ansatz ermöglichte eine wesentlich größere Anzahl an Kulturen die parallel

angezogen und extrahiert werden konnten. Die Expressionskulturen wurden für 5 Tage bei 30 °C im Schüttelinkubator wachsen gelassen (Excella E24, New Brunswick Scientific Co. Inc., Edison, NJ, USA). Dabei wurden die Kulturen mit MOPS Puffer versetzt (0,1 M, pH 7,5), der sowohl die Säure-induzierte Umlagerung der zu erwartenden Germacrenolid-STL unterbinden kann, als auch eine bessere Ausbeute als HEPES Puffer bei Hefekulturen ermöglicht (Nguyen et al. 2010; Ikezawa et al. 2011; Liu et al. 2011). Die pH-Wert-Stabilität über den Wachstumszeitraum wurde geprüft, der pH-Wert war auch nach 5 Tagen noch im neutralen Bereich (>pH 6). Für jede Genkombinationen wurden zwei unabhängige Klone in analytischen Kulturen getestet. Konnten neue Produktpeaks detektiert werden wurde der Versuch ein zweites mal durch Animpfung von Glycerinstocks wiederholt und erneut die Enzymprodukte analysiert. Größere Kulturen zur Aufreinigung von Enzymprodukten für NMR-Analysen wurden in derselben Zusammensetzung, auf 500 ml skaliert in einem 2 l Erlenmeyer-Kolben angezogen.

2.7.9 Glycerinkulturen

Von transformierten und nicht-transformierten *E. coli* und *S. cervisiae* wurden ausgewählte Klone als Glycerinkulturen gelagert. Für Glycerinkulturen von *E. coli* wurden 500 µl einer Übernachtkultur in LB Medium mit 500 µl 50 % (v/v) sterilem Glycerin überschichtet, durch Invertieren vermischt, und bei -70°C gelagert. Analog dazu wurden auch für Glycerinkulturen von *S. cervisiae* ÜN-Kulturen mit 50 % (v/v) sterilem Glycerin versetzt. Bei *S. cervisiae* wurden, zur Aufrechterhaltung des Selektionsdrucks, für die ÜN-Kulturen die jeweils passenden Selektionsmedien gewählt, beispielsweise wurde ein untransformierter Stamm von EPY300 in SC-HM Medium gelagert, ein mit einem Leu2d Vektor transformierter Stamm in SC-HML Medium.

2.8 *In silico* Techniken

2.8.1 Programme für die Bearbeitung von Sequenzierungen

Für die Arbeit mit Sequenzierungen wurden die Programme BioEdit (Version 7.2.5, Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, USA (Hall 1999) und SeqMan (LASERGENE, DNASTAR Inc., Madison, WI, USA) verwendet. Die Informationen aus der Sequenzierung von Vorwärts- und Rückwärts-Primer wurden durch ein Alignment mit SeqMan zu einem durchgängigen Contig zusammengeführt und die Qualität der Sequenzierung überprüft. Alignments verschiedener aus Sequenzierungen erhaltener Contigs wurden mit SeqMan und BioEdit erstellt.

2.8.2 Programme für Primerkonstruktion

Für die Primerkonstruktion wurde das Programm PrimerSelect (LASERGENE, DNASTAR Inc., Madison, WI, USA) verwendet. Primer wurden auf die Bildung von Sekundärstrukturen sowie auf die Differenz der Schmelztemperatur (PrimerSelect) überprüft. Die Primer-Spezifität wurde mit Hilfe von blastn (NCBI, Bethesda, MD, USA; http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) überprüft. Für die Erstellung von qPCR-Primern sowie RACE-Primern mussten weitere Parameter berücksichtigt werden (siehe Kapitel 2.5.1.2 und 2.5.1.4).

2.8.3 Programme für Alignments und phylogenetische Berechnungen

Für phylogenetische Berechnungen wurden zunächst Alignments mit dem ClustalW Algorithmus (Thompson et al. 1994) mit Hilfe von BioEdit, Version 7.2.5 (Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, USA) erstellt. Die Datensätze wurden in einem zweiten Schritt in MEGA6 (Tamura et al. 2013) importiert. Phylogenetische Berechnungen zur ersten Einordnung von putativen Nukleotid-Sequenzen wurden mit der Neighbor Joining Methode durchgeführt. Zur Einordnung der kompletten offenen Leserahmen der Kandidaten P450 Enzyme in bereits bekannte Enzymfamilien wurden zunächst die Nukleotid-Sequenzen in Aminosäure-Sequenzen transferiert, ein Aminosäure-Alignment erstellt, und im Anschluss mit der Maximum Likelihood Methode eine Phylogenie erstellt (1000 Bootstraps, Aminosäure-Substitutions-Modell: Poisson).

2.8.4 Programme für die Untersuchung der *Helianthus* Genomdaten

Von der Universität Vancouver wurde ein Zugang zu Datensätzen des Compositae Genome Project gewährt. Zum Abgleich von Sequenzdaten von lokal gespeicherten Datensätzen der (zu diesem Zeitpunkt unvollständigen) Genomdatenbank von *H. annuus* und zur Suche wurde das Programm StandaloneBlast verwendet. StandaloneBlast wurde über die Kommandozeilenfunktion von Cygwin (https://cygwin.com) bedient. Ein PERL-Script für die Extraktion einzelner *.fasta*-Dateien aus der Genomdatenbank wurde von Dr. C. Grassa, Uni Vancouver bereitgestellt. Zu einem späteren Zeitpunkt in der Arbeit war es möglich das vom Compositae Genome Project inzwischen vollständig veröffentlichte Genom von *H. annuus* zu verwenden um eine exaktere Zuordnung der Enzyme und Enzym-Kandidaten im Genom von *Helianthus* vorzunehmen (*www.sunflowergenome.org*). Für die Suche in der Transkriptom-Datenbank Heliagene (© INRA, Toulouse, Frankreich) wurde die Internet-Seite *www.heliagene.org* verwendet.

2.8.5 Referenzen und Nomenklatur von Enzymprodukten

Viele Sesquiterpen-Derivate werden unter einer Reihe unterschiedlicher Trivialnamen geführt. Für die Suche nach Referenzen zu den Enzymprodukten sowie deren Nomenklatur wurden das

Programm SciFinder® (http://www.cas.org/products/scifinder) des Chemical Abstract Service, sowie das Review von Seaman (1982) verwendet. Alternative Trivialnamen von chemischen Verbindungen sind im Anhang vermerkt (S 6).

3 Ergebnisse

3.1 Identifizierung von Cytochrom P450 Kandidaten-Genen - Vorbemerkungen

Zur Auffindung von Enzymkandidaten für Synthese-Schritte im Sesquiterpenlacton Biosyntheseweg wurde in der Vergangenheit von den Arbeitsgruppen Spring (Hohenheim) und Ro (Calgary) eine cDNA Datenbank von KDH aus den Antherenanhängen der Sonnenblume erstellt (Göpfert et al. 2009) und daraus zwölf Kandidaten P450 Gene extrahiert. Innerhalb dieser zwölf Enzym-Kandidaten konnten die *Helianthus annuus* Germacren A Oxidase (HaGAO) sowie die *Helianthus annuus* Germacren A Säure 8β-Hydroxylase (HaG8H) charakterisiert werden (Nguyen et al. 2010, Ikezawa et al. 2011). Dabei wurde keine Costunolid Synthase der Sonnenblume gefunden, allerdings konnte Costunolid durch Kombination von GAO mit einer Costunolid Synthase aus *Lactuca sativa* im Hefe-System synthetisiert werden.

Es wurde folglich die Hypothese aufgestellt, dass bei *H. annuus* bzw. dem gesamten Tribus Heliantheae kein homologes Gen zu LsCOS zu finden sei und dass HaG8H evolutiv aus einer Costunolid Synthase hervorgegangen sei (Ikezawa et al. 2011). Dementsprechend wurde für die Synthese vermutet, dass der Weg zu Costunolid Derivaten von einer strukturell anderen Costunolid Synthase vervollständigt werden würde, oder aber ein völlig anderer Syntheseweg hin zu Costunolid existieren könnte (Ikezawa et al. 2011). In den KDH konnten zwar eine Vielzahl an Costunolid-Derivaten detektiert werden, allerdings kein freies Costunolid. Alle Costunolid Derivate in KDH haben eine 8β-Hydroxylierung, mit Ausnahme von Haageanolid (9β-Hydroxylierung). Bei der Suche nach Keimungs-Induktoren für *Orobranche cumana* fanden Raupp & Spring (2013) vier keimungsstimulierende STL in den Wurzel-Exsudaten der Sonnenblume, darunter Costunolid. Dementsprechend muss, wenn auch nicht zwingend in den KDH lokalisiert, eine Synthase für Costunolid (ohne 8β-Hydroxylierung) in der Sonnenblume bestehen. Um die weitere Aufklärung des Stoffwechselweges voranzutreiben, wurde nun ein mehrgleisiger Ansatz entwickelt:

1. Re-Evaluierung der bereits bei Ikezawa et al (2011) beschriebenen, aber nicht abschließend charakterisierten Enzymkandidaten.

2. Suche nach Cytochrom P450 Fragmenten von neuen Enzymkandidaten in einer Transkriptomdatenbank und Aufklärung des offenen Leserahmens.

Die auf diesem Wege erhaltenen offenen Leserahmen sollten danach in Expressions-Vektoren für die *in vivo* Expression in Hefe und Tabak kloniert werden.

3.1.1 Re-Evaluierung von Enzym Kandidaten

In einem ersten Schritt wurden die bereits bei Ikezawa et al. (2011) beschriebenen Enzymkandidaten funktional neu getestet. Western Blot Experimente bei Ikezawa et al. (2011) hatten keine Bande für die Kandidaten C100 und S2 gezeigt. Die Enzyme konnten also möglicherweise nicht optimal exprimiert gewesen sein. Dementsprechend wurde nun auf den Einsatz von His-Tag und FLAG-Tag verzichtet, um zu verhindern, dass es aufgrund der Tags zu Fehlfaltung oder Fehlfunktion des Proteins *in vivo* kommen konnte. Da nachfolgende Schritte in einem Stoffwechselweg oft von strukturell ähnlichen Enzymen katalysiert werden, wurden die Expressionsansätze nicht nur mit dem Substratvektor für Germacren A Säure, sondern auch für 8β-Hydroxy-Germacren A Säure und Costunolid getestet. So konnten, auch wenn ein Zwischenschritt der Synthese nicht aufgeklärt werden kann, Kandidatengene mit einem Substrat getestet werden, das weiter hinten im Stoffwechselweg positioniert ist. Letztendlich wäre es auch möglich, dass bestimmte P450 Enzyme aus *H. annuus* nicht in Hefezellen, sondern nur in Pflanzenzellen katalytisch aktiv sind. Deshalb wurde zusätzlich eine Charakterisierung in Tabak angeschlossen.

Von den ursprünglich zwölf P450 Enzym Kandidaten aus der Arbeit von Ikezawa et al. (2011) verblieben nach der Charakterisierung der Enzyme HaGAO und HaG8H (Abb. 8, Filter I) sowie den nicht zur Familie CYP71 befindlichen Enzyme gehörenden Kandidaten (Filter II) noch fünf: S1, S2, S3, C28 und C100. Die offenen Leserahmen dieser Kandidatengene wurden erneut aus KDH amplifiziert und kloniert. Bei der Sequenzierung mehrerer Klone von C28 wurde ein weiteres Cytochrom P450 Enzym mit hoher Ähnlichkeit zu C28 gefunden. Dieses wurde C28B genannt.

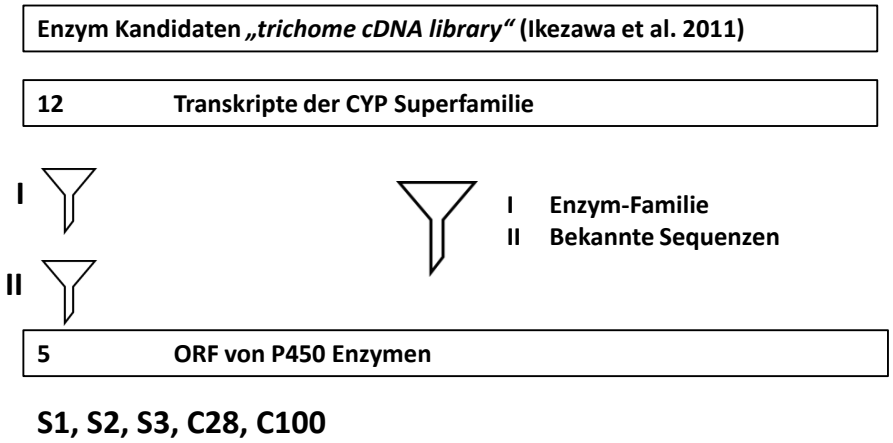


Abb. 8: Re-Evaluierung von Kandidaten aus Trichom cDNA aus (Ikezawa et al. 2011)

3.1.2 Selektion von Cytochrom P450 Kandidatensequenzen aus Transkriptom Datenbank

Um weitere Kandidaten für den STL Syntheseweg aufzuspüren, wurde die Transkriptom Datenbank Heliagene (©INRA, Toulouse, Frankreich) des Compositae Genome Project herangezogen. Da elf von zwölf der bei Ikezawa et al. (2011) identifizierten Enzyme ein einheitliches Expressionsmuster in der Transkriptom Datenbank aufwiesen, welches mit einer Expression in Drüsenhaaren korrelierte, wurden aus der Transkriptom Datenbank weitere Kandidaten nach Ähnlichkeit zu Enzymen der CYP71 Enzym-Familie herausgefiltert (Abb. 9, Filter I: RPKM Blätter/*leaves*>6, RPKM andere Gewebe <1). Anschließend wurden Cytochrom P450 Enzyme der Familie CYP71 (Abb. 9, Filter II) und bereits bekannte Sequenzen (Kandidaten aus 3.1.1) aussortiert (Abb. 9, Filter III). Für die auf diesem Weg erhaltenen P450 Sequenzen wurden Primer konstruiert und auf Expression in Drüsenhaaren geprüft (Abb. 9, Filter IV). Der Abgleich mit der zu diesem Zeitpunkt vorliegenden (bzw. von der Universität Vancouver zur Verfügung gestellten) Version der Genomdatenbank von *H. annuus* zeigte, dass drei der Kandidatensequenzen verschiedene Teile desselben offenen Leserahmens darstellten (zusammengefasst als "M33") (Abb. 9, Filter V).

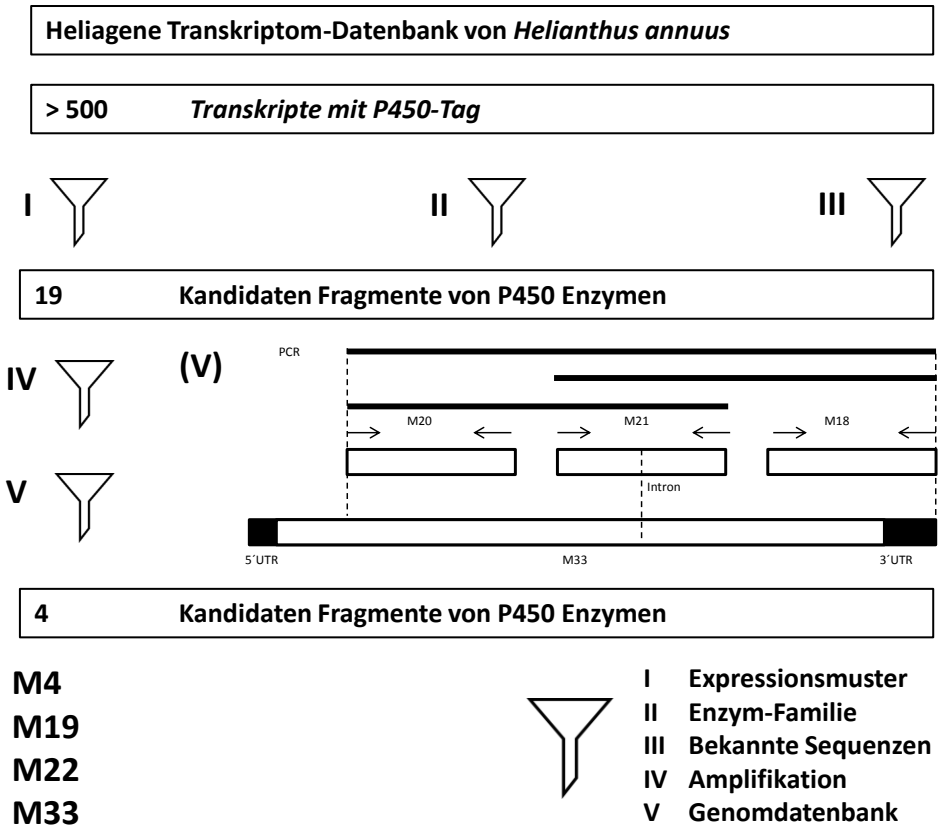


Abb. 9: Extraktion von Kandidatensequenzen aus der Sonnenblumen Transkriptom-Datenbank Heliagene

Von den vier in Drüsenharen exprimierten P450 Fragmenten wurden der offene Leserahmen durch 3´- und 5´- RACE aufgeklärt. Bei Sequenz M22 wurden zwei zueinander relativ ähnliche offene

Leserahmen erhalten, die dementsprechend M22A und M22B genannt wurden. Eine weitere, aber für die meisten Kandidaten nicht weiter verfolgte Strategie war es, nach Sequenzen zu suchen, die eine möglichst hohe Ähnlichkeit zu bekannten Costunolid Synthasen, aber nicht das zu köpfchentragenden Drüsenhaaren passende Expressions-Muster hatten. Dabei ergab eine Blast Suche gegen EST Datenbanden von *H. annuus* und die Sonnenblumen-Genomdatenbank den Kandidaten M1. Die Suche in der Heliagene Transkriptom-Datenbank erbrachte 12 weitere Kandidaten M2-M13. Von diesen Sequenzen wurden nur M1 und M4 weiterverfolgt, wobei M1 aus Wurzel cDNA amplifiziert wurde (Costunolid wurde in Wurzel-Exsudaten nachgewiesen) und M4 in cDNA von Hochblättern (Brakteen) der Sonnenblume vorkam.

3.1.3 Aufklärung der offenen Leserahmen sowie 3´- und 5´-untranslatierter Regionen mittels RACE-PCR

Bei den Genen M4, M19 und M22 wurden 5´und 3´RACE durchgeführt um den kompletten offenen Leserahmen zu ermitteln. Bei M33 genügten 5´RACE Experimente, da die 3´Seite des offenen Leserahmens und die 3´UTR bereits bekannt waren. Wie in (2.5.1.4) beschrieben, wurden anhand der bekannten Fragmente RACE und Nested-RACE Primer konstruiert mit einem möglichst großen Überlappungsbereich von 5´-und 3´-RACE Amplifikat. Um eine möglichst hohe Spezifität zu gewährleisten, wurden Nested-RACE-PCR Ansätze durchgeführt. Dies führte zur Aufklärung der offenen Leserahmen sowie der 3´-und 5´-UTR Regionen der Kandidaten M4, M19, und M33. Bei M22 wurden durch die RACE Experimente zwei untereinander relativ ähnliche offene Leserahmen gefunden: M22A und M22B. Um die über RACE aufgeklärten Sequenzen in die Hefe und Tabak Expressionsvektoren zu klonieren, wurden die offenen Leserahmen mit geeigneten Primern amplifiziert, in pJET-Vektoren kloniert und mehrere Klone sequenziert. Alle Kandidaten wurden aus der cDNA köpfchentragender Drüsenhaaren amplifiziert, außer M1 (Wurzel) und M4 (Brakteen). Die Nukleotid-Sequenzen und die daraus resultierenden Aminosäure-Sequenzen der Kandidaten-Gene sind im Anhang aufgeführt (Kapitel 7.1.2).

3.1.4 Enzym-Kandidaten für heterologe Expression und ihre mögliche phylogenetische Beziehung

Zu den erwähnten 11 Kandidaten (S1, S2, S3, C28, C100, C28B, M4, M19, M22A, M22B und M33) für die heterologe Expression und phylogenetische Betrachtung kam noch ein zwölfter Kandidat M1 hinzu, der mit Hilfe von Daten der Genom-Datenbank aus Wurzel cDNA amplifiziert werden konnte. M1 war aufgrund der Sequenzähnlichkeit zu bekannten Costunolid Synthasen bei gleichzeitig relativ großen Unterschieden zu HaG8H als potentielle Costunolid-Synthase in Betracht gezogen worden. Einige theoretisch mögliche Expressionsansätze wurden nicht durchgeführt, teilweise aus

technischen Gründen, wie beispielsweise Problemen bei der Klonierung (in Hefe: M1 mit dem HaG8H und LsCOS Substratvektor und S1; in Tabak: S1 und S3).

Eine Ähnlichkeitsanalyse mit der Maximum Likelihood Methode auf Basis der Aminosäuresequenzen wurde für alle 12 Kandidaten und unter Einbeziehung der Sequenzen bekannter Costunolid-Synthasen aus *Lactuca sativa* (LsCOS) und *Tanacetum parthenium* (TpCOS) durchgeführt (Abb. 10).

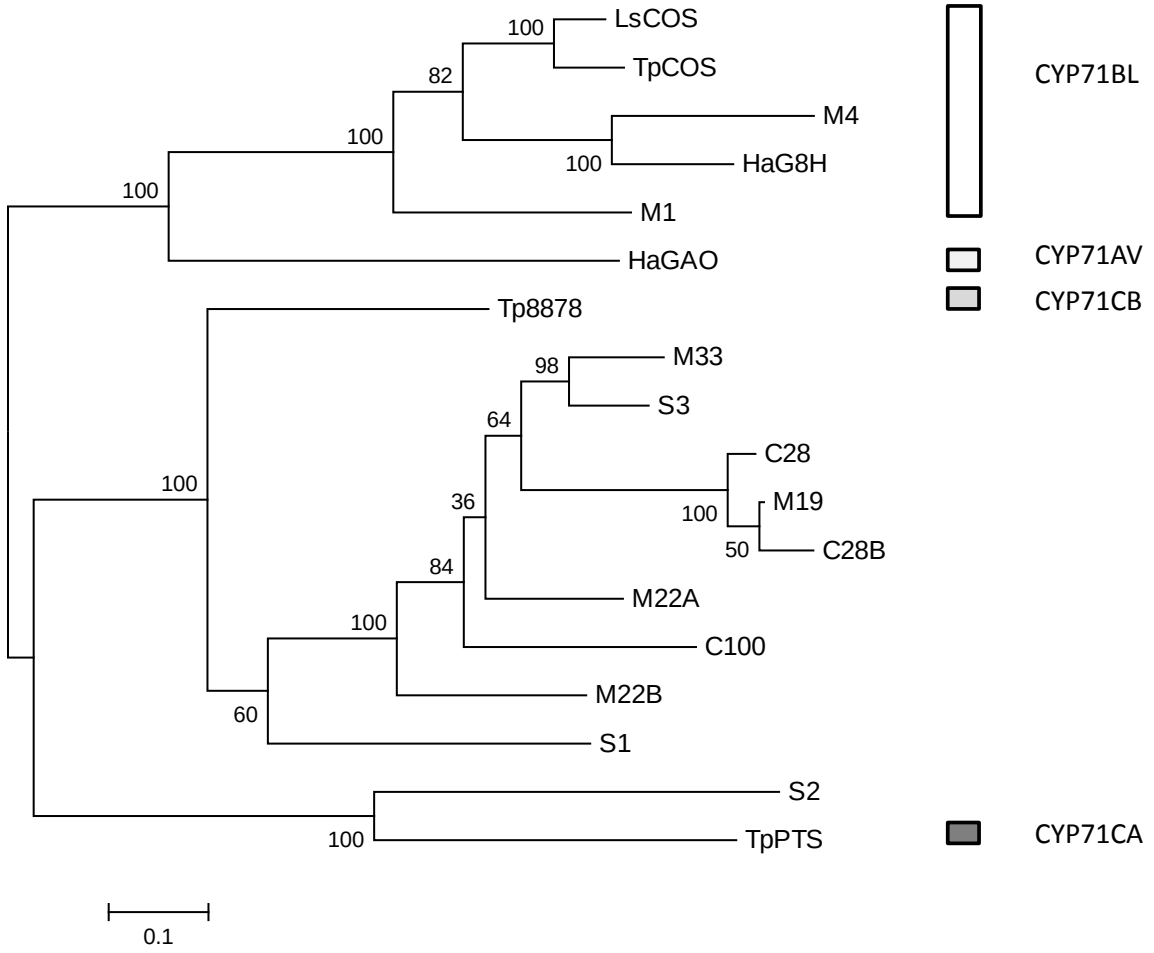


Abb. 10: Phylogenie zur Einordnung der Enzym-Kandidaten

Phylogenetische Einordnung der in der vorliegenden Arbeiten getesteten Cytochrom P450 Kandidaten und einiger aus der Literatur bekannter Gene des STL Stoffwechsels. Die Einordnung in den entsprechenden Cytochrom P450 Unterfamilien ist auf der rechten Seite angegeben. LsCOS *Lactuca sativa* Costunolid Synthase, TpCOS *Tanacetum parthenium* Costunolid Synthase, HaG8H *Helianthus annuus* Germacren A Säure 8β-Hydroxylase, HaGAO *Helianthus annuus* Germacren A Oxidase, Tp8878 3β-Oxidase von *Tanacetum parthenium* (hydroxyliert Costunolid und Parthenolid) TpPTS: *Tanacetum parthenium* Parthenolid-Synthase. Phylogenie anhand der abgeleiteten Aminosäure-Sequenzen, Methode: Maximum Likelihood, 1000 Bootstraps, Aminosäure-Substitutions-Modell: Poisson. Die Zahlen an den Verzweigungen stellen *Boostrap*-Werte dar.

Einbezogen wurden außerdem die bekannten P450 Sequenzen HaG8H, HaGAO, Tp8878 und TpPTS, deren Beteiligung in der STL Biosynthese nachgewiesen ist. In dieser Analyse zeigten M1 und M4 große Ähnlichkeit zum Cluster der bekannten Costunolid-Synthasen. S2 zeigte Nähe zur Parthenolid-Synthase TpPTS, während die übrigen Kandidaten S1, S3, C28, C100, C28B, M19, M22A, M22B und

M33 eine gemeinsame Schwestergruppe zu Tp8878, der Costunolid/Parthenoild 3β-Hydroxylase von *Tanacetum* bildeten.

3.2 Enzymcharakterisierung in *Saccharomyces cervisiae*

3.2.1 Etablierung und Optimierung des Expressionssystems, sowie Klonierung der Substratvektoren

In dem Hefe-Expressionssytem sollten zehn Cytochrom P450 Kandidaten aus (3.1.) an drei unterschiedlichen Positionen im Stoffwechselweg getestet werden. Dafür wurden zwei Vektorsysteme kombiniert: Ein Substrat-Vektor, der alle Gene für den Stoffwechselweg ausgehend von Farnesylpyrophosphat kodiert, sowie ein Kandidaten-Vektor, der das jeweilige Kandidaten-Gen kodiert. Unter der Berücksichtigung von biologischen Wiederholungen und Kontrollen ergab sich daraus eine hohe Zahl an zu testenden Kulturansätzen. In einem ersten Schritt wurde der Hefe-Stamm EPY300 mit den folgenden vier -auf dem Ausgangs-Vektor Leu2d basierenden- Substrat-Vektoren transformiert: (1) Leu2d::GAS/GAO/CR, für die Produktion von Germacren A Säure als Substrat. (2) Leu2d::GAS/GAO/CR/LsCOS, für die Produktion von Costunolid als Substrat. (3) Leu2d::GAS/GAO/CR/HaG8H, für die Produktion von 8β-Hydroxy-Germacren A Säure als Substrat. (4) Leu2d::GAS/GAO/CR/HaG8H$_{synth}$, für die Produktion von 8β-Hydroxy-Germacren A Säure als Substrat mit Codon-optimierter HaG8H. Die Laufzeiten und der Nachweis der erwarteten Endprodukte der Substratvektoren mittels LC-MS sind in (Tab. 24) zusammengefasst. Die Peaks aus dem Hefesystem wurden mit römischen Zahlen nummeriert, siehe auch Peak-Übersicht im Anhang (S 7).

Tab. 24: Produkte der Substratvektoren- Retentionszeiten und Nachweis

Substratvektor	Produkt	RT(min)	Nachweis
Leu2d:GAS/GAO/CR	Germacren A Säure	9,35	**Peak I**, Peak an HPLC aufgereinigt, Analyse mit LC-MS$^{2\,(a)}$
Leu2d:GAS/GAO/CR/LsCOS	Costunolid	15,61	**Peak II**, Abgleich mit Referenz-Substanz, Peak an HPLC aufgereinigt, Analyse mit LC-MS^2
Leu2d:GAS/GAO/CR/HaG8H	8β-Hydroxy-Germacren A Säure	11,50	**Peak III**, Peak an HPLC aufgereinigt, Analyse mit LC-MS^2

(a) LC-MS Lauf des aufgereinigten Peaks zeigt zweiten Peak mit der Masse $[M+H]^+$=235, wahrscheinlich ein im Aufarbeitungsprozess entstandenes, Säure-induziertes Umlagerungsprodukt, RT: Retentionszeit

Für die Produktion der Substrate Germacren A und Costunolid wurde jeweils die Substrat-Produktion fünf verschiedener Klone verglichen. Für die Produktion von 8β-Hydroxy-Germacren A Säure wurden jeweils drei Klone mit nativer und drei Klone mit Codon-optimierter HaG8H verglichen (Anhang, S 8 und S 9). Es wurde jeweils der Klon mit der besten Substratproduktion für eine weitere

Klonierung mit dem Kandidatenvektor pESC-Ura eingesetzt. Im Vergleich der Vektoren von nativer und Codon-optimierter HaG8H waren keine Verbesserung in der Produktion von 8β-OH-GAA zu erkennen, aber das Verhältnis von 8β-OH-GAA zu GAA war für die Codon-optimierte Variante verbessert. Aufgrund dessen wurde in den Versuchen mit HaG8H die Codon-optimierte Variante verwendet. Die Klone mit der jeweils besten Produktion von Substrat für GAA, 8β-OH-GAA und Costunolid wurden im Anschluss mit den zehn Kandidaten Genen transformiert.

3.2.2 Costunolid wird von Kandidat M33 in 14-Hydroxy Costunolid umgewandelt

EPY300 Hefe-Kulturen mit der Genkombination [Leu2d::GAS/GAO/CR/LsCOS||Ura::M33] zeigten im Vergleich zur Kontrolle [Leu2d::GAS/GAO/CR/LsCOS||Ura::leer] bei 5,5 min einen neuen Peak (Peak **IV**, Abb. 11A).

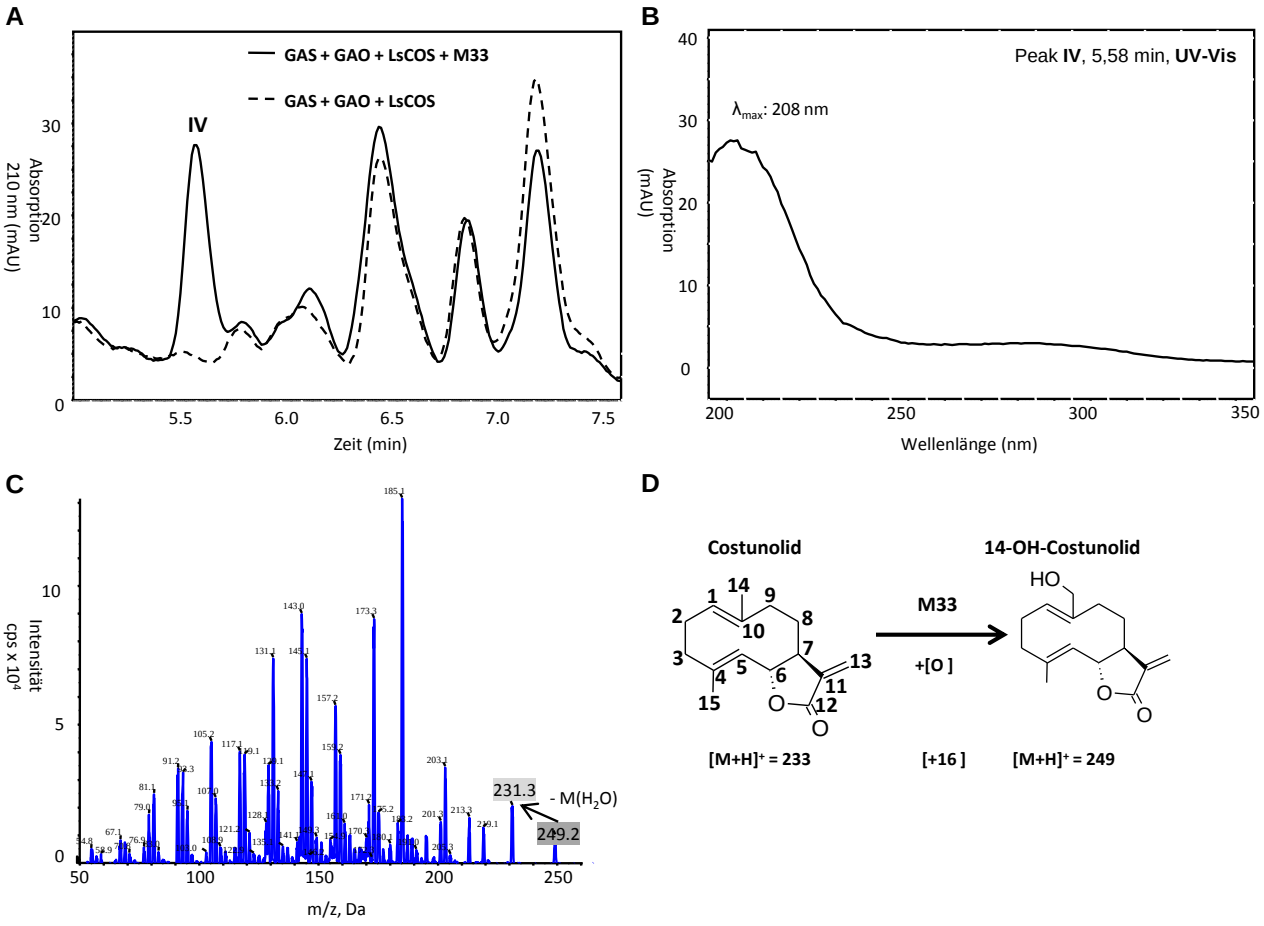


Abb. 11: Costunolid wird in Hefe von Kandidat M33 in 14-Hydroxy Costunolid umgewandelt

Vergleich des Hefe-Stammes [EPY300::Leu2d::GAS/CR/GAO/**LsCOS**||Ura::**M33**] mit dem Kontroll-Stamm [EPY300::Leu2d::GAS/CR/GAO/**LsCOS**||Ura::**leer**]; **A,** DAD-Chromatogramm, mit Peak **IV** bei 5,58 min; **B,** UV-Vis Spektrum Peak **IV**; **C,** MS^2 Spektrum Peak a; **D,** Reaktionsschema für die Entstehung von 14-Hydroxy-Costunolid (Peak **IV**)

Dieser hatte ein Sesquiterpenlacton-typisches Absorptionsspektrum mit einem Maximum bei 208 nm (Abb. 11B) und konnte bei keiner anderen getesteten Genkombinationen detektiert werden. Im Vergleich zum putativen Substrat Costunolid (RT: 15,5 min) war der Peak sehr stark in den hydrophilen Bereich verschoben (ΔRT: -10,0 min), was eine oxidative Veränderung vermuten ließ. Andere Hydroxy-Costunolid-Derivate aus natürlichen Pflanzenextrakten zeigten im selben Analysesystem ähnliche, nicht aber die identische Laufzeitverschiebung (8β-OH-Costunolid: 9,4 min, 9β-OH-Costunolid: 9,4 min, 15-OH-Costunolid: 7,5 min, 8β,14-OH-Costunolid: 4,5 min).

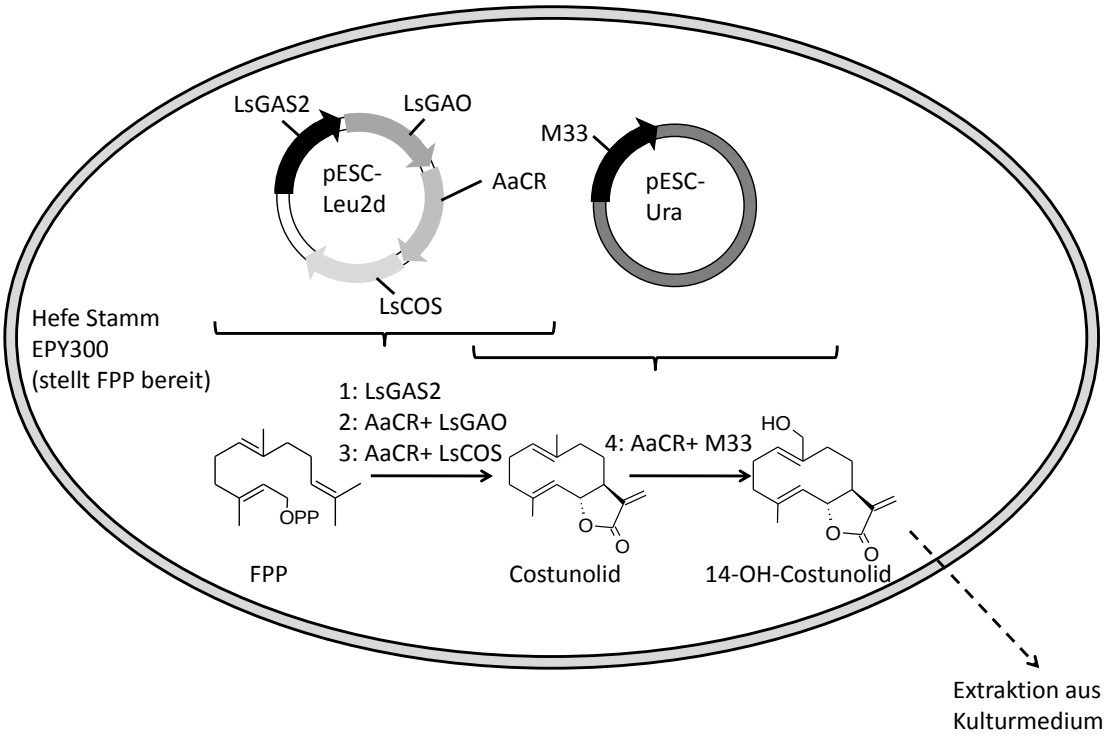


Abb. 12: Schema für die Koexpression zur Bildung von 14-Hydroxy-Costunolid in Hefe

Das Schema zeigt die Koexpression von fünf Genen zur Stoffwechselrekonstruktion im Hefe Stamm EPY300. EPY300 produziert Farnesylpyrophosphat (FPP), das in einer dreistufigen Reaktion zu Costunolid umgewandelt wird. Die vier hierfür benötigten Gene sind auf dem Vektor Leu2d kodiert. Schritt 1: Cyclisierung durch *Lactuca sativa* Germacren A Synthase 2 (LsGAS2), Schritt 2: Oxidation durch *Lactuca sativa* Germacren A Oxidase (LsGAO) und *Artemisia annua* Cytochrom P450 Reduktase (AaCR), Schritt 3: Oxidation durch *Lactuca sativa* Costunolid Synthase (LsCOS) und AaCR. Costunolid wird anschließend durch Cytochrom P450 Enzym-Kandidat M33 (auf pESC-Ura kodiert) und AaCR (auf pESC-Leu2d kodiert) zu 14-Hydroxy-Costunolid umgewandelt. Das aus den Hefezellen ausgeschleuste Endprodukt der Reaktion, konnte aus dem Kulturmedium extrahiert werden. (Darstellung der Vektoren vereinfacht. Die relative Größe und Positionierung der auf pESC-Leu2d kodierten Gene kann aus (Ikezawa et al. 2011) entnommen werden)

Die Substanz aus Peak **IV** wurde aus einem HPLC-Lauf aufgereinigt und mittels LC-MS analysiert. Im LC-MS Lauf zeigte sich ein einzelner Peak mit der Masse $[M+H]^+$=249 (Abb. 11C). Dies einspricht der Masse von Costunolid, erhöht um die Masse von Sauerstoff: 249 (Peak **IV**) = 233 $[M+H]^+$(Costunolid)

+ 16 [M](Sauerstoff). Der postulierte Einbau einer Hydroxy-Gruppe wurde im MS^2 Spektrum durch ein Fragmention bei 231 gestützt (Wasser-Abgang, M(H_2O) =249-231 =18). Es wurden schließlich ca. 1 mg aufgereinigte Substanz mittels NMR analysiert (Tab. 25) und aus der Signallage die Struktur von Substanz **IV** als 14-Hydroxy-Costunolid ermittelt. Das Enzym M33 wandelt demzufolge *in vivo* in Hefe Costunolid in 14-Hydroxy-Costunolid um (Abb. 11D). Die Koexpression der fünf Enzyme für die Synthese ausgehend von Farnesylpyrophosphat (FPP) bis hin zu 14-Hydroxy-Costunolid ist in Abb. 12 dargestellt.

3.2.3 Expression von Kandidat M4 mit Germacren A Säure Substratvektor

Bei der Expression von M4 in Kombination mit dem Germacren A Säure Substratvektor konnte im Vergleich zur Kontrolle eine neue Verbindung detektiert werden. In Kultur-Extrakten des Ansatzes [Leu2d::GAS/GAO/CR||Ura::M4], ließen sich im Vergleich zum Ansatz [Leu2d::GAS/GAO/CR||Ura::leer] zwei Veränderungen im Chromatogramm erkennen: Der Peak von Germacren A Säure (Peak **I**, 9,35 min) war nicht mehr detektierbar, dafür war ein neuer Peak zu erkennen mit einem sehr deutlichen UV-Signal bei 210 nm (Peak **V**, 10,19 min) und einem Schulterpeak bei ca. 10,3 min (Abb. 13A). Das UV-Vis Spektrum zeigte ein Maximum bei 204 nm (Abb. 13B). Der aufgereinigte Peak zeigte im LC-MS Lauf zwei Substanzpeaks, die sich nicht weiter auftrennen ließen: Der Peak mit der höheren Intensität hatte eine Masse von $[M+H]^+$=235, überlagert von einem Peak mit geringerer Intensität und der Masse von $[M+H]^+$=237. NMR Analysen der aus 0,5 l Hefe-Kultur aufgereinigten Substanz führten zur Identifizierung von Farnesyl-(Z,Z)-δ-Lacton. Die NMR Daten erlaubten die Bestimmung der Stereochemie der Doppelbindungen (Δ 2,6). Nicht eindeutig aus den NMR Daten konnte beantwortet werden, ob es sich bei der Verbindung um die offenkettige 5-Hydroxy-Carbonsäure oder das entsprechende Lacton handelte. Das aus der Massenspektroskopie ermittelte Signal von $[M+H]^+$=235 passt jedoch zu der lactonisierten Variante, während im Fall der offenkettigen 5-Hydroxy-Carbonsäure das Signal $[M+H]^+$=252 hätte auftreten müssen. Die Identität der zweiten Substanz, die mit Peak b überlagerte konnte nicht aufgeklärt werden.

Farnesyl-(Z,Z)-δ-Lacton entstand nur dann, wenn der Enzym-Kandidat M4 zusammen mit dem Substrat-Vektor mit GAS, GAO, und CR exprimiert wurde. Germacren A Säure selbst war dann nicht nachweisbar. Die Koexpression von M4 mit CR in pESC-Ura ohne Substratvektor im Ansatz [Ura::M4/CR] führte zu keinem Produkt (Daten nicht gezeigt). Die Entstehung von Farnesyl-(Z,Z)-δ-Lacton lässt sich jedoch vorerst keinem plausiblen Reaktionsmechanismus zuordnen.

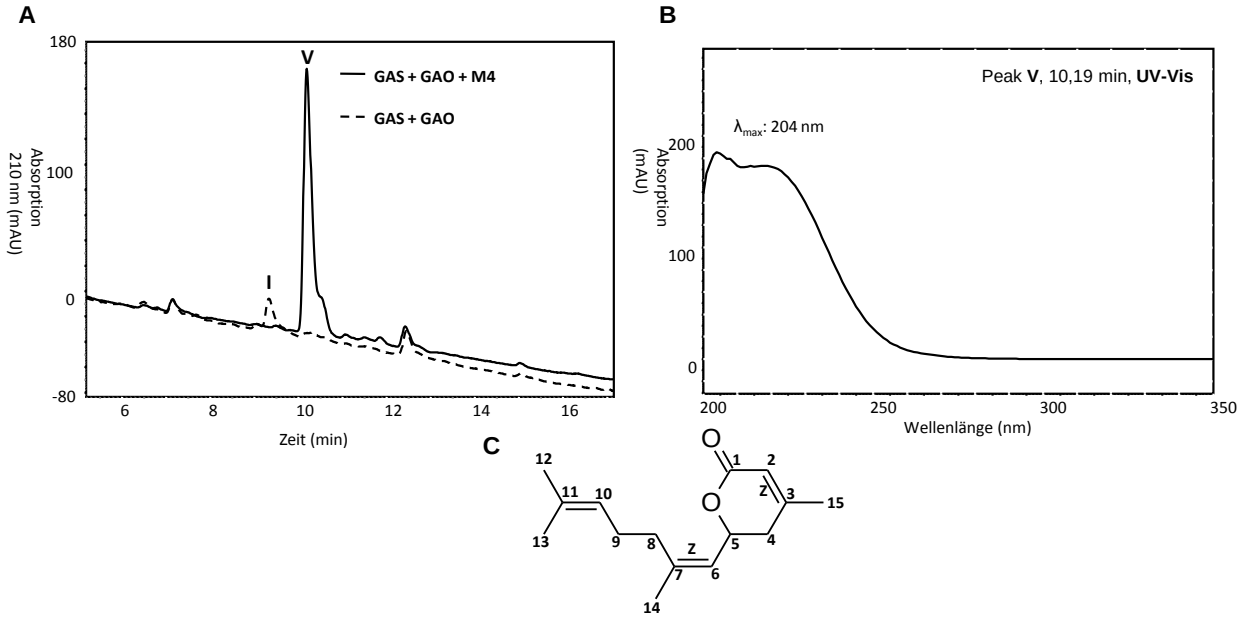


Abb. 13: Die Expression von Kandidat M4 mit dem Germacren A Säure Substratvektor führt in Hefe zur Bildung eines Farnesyl-δ-Lactons

A, Der Hefe-Stamm [EPY300::Leu2d::GAS/CR/**GAO**||Ura::**M4**] bildet im Vergleich zum Kontroll-Stamm [EPY300::Leu2d::GAS/CR/**GAO**||Ura::**leer**] den Peak **V** (10,19 min im Chromatogramm); **B,** UV-Vis Spektrum Peak **V**; **C,** Strukturvorschlag für Farnesyl-δ-Lacton (Peak **V**), Peak **I**: Germacren A Säure

3.2.4 Expression von Kandidat M4 mit 8β-Hydroxy-Germacren A Säure Substratvektor

Die Expression von M4 in Kombination mit dem Substratvektor für 8β-Hydroxy-Germacren A Säure führte, wie auch bei der Expression mit dem Germacren A Säure Substratvektor, zur Bildung des Farnesyl-δ-Lactons. Das Farnesyl-δ-Lacton Produkt entsteht demnach auch dann, wenn LsCOS (nicht gezeigt) oder HaG8H zusätzlich in das System eingeführt werden. Der Ansatz [Leu2d::GAS/GAO/CR/HaG8H||Ura::M4] zeigte aber im Vergleich zur Negativ-Kontrolle [Leu2d::GAS/GAO/CR/HaG8H||Ura::leer] einen weiteren Peak, der mit 15,5 min eine Retentionszeit wie Costunolid hatte (Abb. 14A, Peak **II**). Da der Peak ein schwaches Signal und kein eindeutiges UV-Vis Spektrum lieferte, wurde er aus einer größeren Hefe-Kultur aufgereinigt und separat in einem HPLC-Lauf mit einer Costunolid-Referenz (1 mM) verglichen (Abb. 14B). Die Retentionszeiten des aufgereinigten Peaks und von Costunolid waren identisch. Auch die UV-Vis Spektren wiesen eine sehr hohe Übereinstimmung auf (Abb. 14C). Der Vergleich der MS^2 Daten aus dem Produktpeaks bei 15,5 min mit der käuflich erworbenen Costunolid-Referenz zeigt weitestgehende Übereinstimmungen (Abb. 14D und 14E). Mit ca. 1 mg der aufgereinigten Substanz wurden NMR-Messungen durchgeführt, die den eindeutigen Nachweis der Identität von Peak **II** erbrachten. Costunolid entstand, wie bereits gezeigt, in allen Kulturen mit dem Substratvektor für Costunolid. In keiner der anderen Genkombinationen mit den Substratvektoren für Germacren A Säure und 8β-Hydroxy-

Germacren A Säure konnte Costunolid als Produkt nachgewiesen werden. Ein möglicher Reaktionsmechanismus wäre, dass HaG8H und M4 gemeinsam die Reaktion von Germacren A Säure zu Costunolid in Hefe synthetisieren, ohne dass HaG8H dabei katalytische Aktivität zeigt (Abb. 14F).

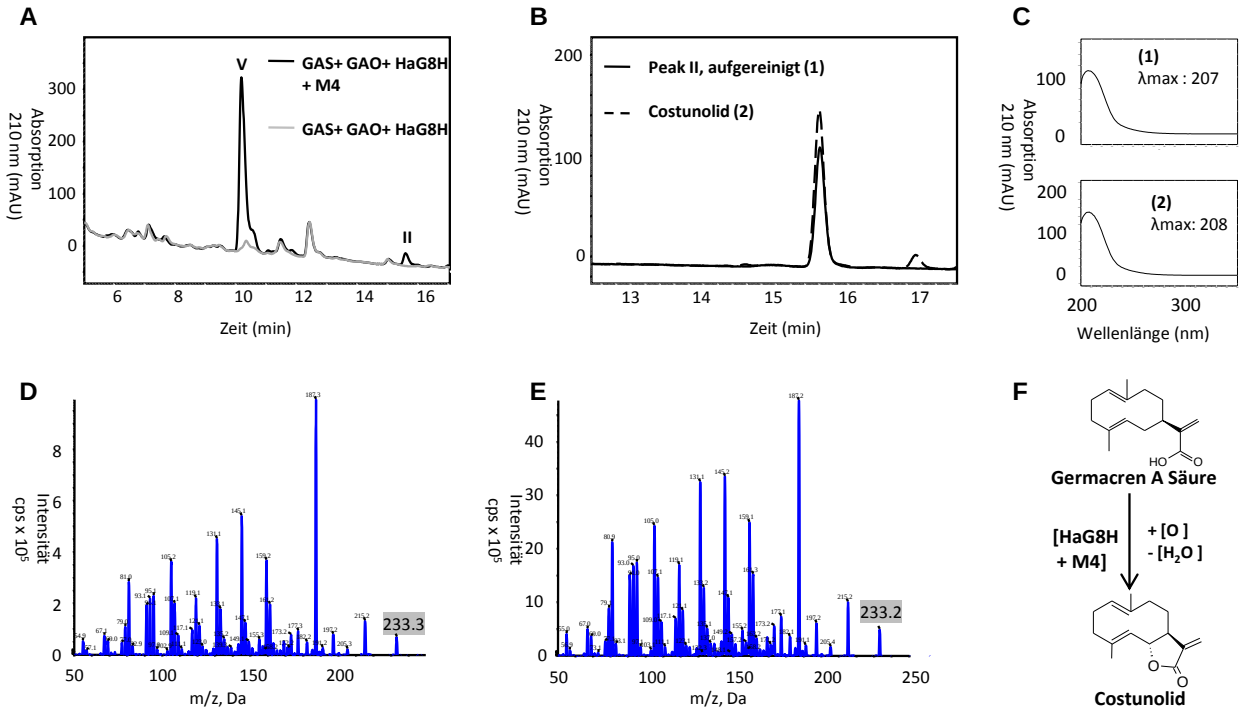


Abb. 14: Die Expression von Kandidat M4 zusammen mit HaG8H führt in Hefe zur Bildung von Costunolid

A, Chromatographischer Vergleich des Extraktes aus Hefe Stamm [EPY300::Leu2d::GAS/CR/GAO/ **HaG8H**||Ura::**M4**] mit dem Kontroll-Stamm [EPY300::Leu2d::GAS/CR/GAO/**HaG8H**||Ura::**leer**] Peak **V**: putatives Enzymprodukt von M4, Peak **III**: Enzymprodukt von HaG8H und M4 bei 15,61 min; **B,** DAD-Chromatogramm, Peak **II** aufgereinigt, im Vergleich mit Costunolid Standard; **C** UV-Vis Spektrum Peak **II** und Costunolid; **D,** (+) MS^2 Spektrum von Peak **II**; **E,** (+) MS^2 Spektrum von Costunolid; **F,** Reaktionsschema zur Entstehung von Costunolid in Hefe mit HaG8H und M4 (nicht in Diagramm und Schema eingezeichnet: 8β-Hydroxy-Germacren A Säure, 11,50 min)

3.2.5 Zusammenfassung der Ergebnisse Expression in Hefe

Die Expressionsversuche in Hefe zeigten zunächst, dass sich eine Vielzahl an Enzymkombinationen gleichzeitig durch die Verwendung eines Mikro-Expressions Ansatzes testen lässt. Es konnten in Ansätzen mit den Kandidaten M33 und M4 neue Verbindungen in den Expressionskulturen charakterisiert werden. Die Identität der neuen Produkte wurde durch ausführliche ein- und zweidimensionale NMR Spektren bestätigt, die wichtigsten Daten sind in (Tab. 25) zusammengefasst. Die Ergebnisse der Enzymcharakterisierung sind in (Tab. 26) zusammengefasst. Alle anderen getesteten Kandidaten-Gene zeigten mit allen drei Substrat-Vektoren keine neuen Enzymprodukte.

Tab. 25: NMR Daten der in Hefe entstandenen Enzymprodukte

	Costunolid (Peak III)	14-OH-Costunolid (Peak IV)	Farnesyl-δ-Lacton (Peak V)	
	^{1}H	^{1}H	^{1}H	^{13}C
Position	(δ, mult; J [Hz])	(δ, mult; J [Hz])	(δ, mult; J [Hz])	
1	4,86 bdd; (4,0; 10,5)	5,01 dd; (4,0; 11,2)	-	169,84
2a	{1,6-2,50}	{2,07-2,40}	5,78; bs	117,12
2b		{2,07-2,40}		
3a	{1,6-2,50}	{2,07-2,40}	-	159,1
3b		{2,07-2,40}		
4	-	-	2,44; dd; J=7,6; 13,6 2,31; dd; J=5,6; 13,6	49,03
5	4,75bd; (9,8)	4,81 d; (9,8)	4,62; ddd; J=5,5; 8,2; 8,7	66,6
6	4,58 dd; 8,6; 9,6	4,55 dd (8,6; 9,8)	5,20, bd; J=8,7	126,7
7	2,58 m	2,59 m	-	139,6
8a	{1,6-2,50}	2,02 m	2,03; bq; J=6,4	39,97
8b		1,73 m		
9a	{1,6-2,50}	2,92 ddd; (6,1; 13,4)	2,10; m	26,31
9b		2,12 ddd; (5,7; 13,9)		
10	-	-	5,08; bt; J=7,3	123,71
11	-	-	-	131,90
12	-	-	1,61; bs	17,70
13a	6,277 d; (3,5)	6,28 d; (3,6)	1,69; bs	25,63
13b	5,53 d; (3,2)	5,54 d; (3,2)		
14a	1,43 s	4,23 d; (11,9)	1,70; bd; ; J=1,0	16,65
14b		3,79 d; (11,9)		
15	1,71 s	1,61 bs (1,3)	2,23; bd	19,60

s: Singulett; bs: Breites Singulett; d: Duplett; dd: Duplett von Duplett; ddd: Duplett von Duplett von Duplett; bdd: Breites Duplett von Duplett; t: Triplett; bt: Breites Triplett; q: Quartett; bq: Breites Quartett; m: Multiplett; (Für die Nummerierung der Kohlenstoff-Atome in Farnesyl δ-Lacton siehe Abb. 13)

Es konnte in Hefe eine Costunolid 14-Hydroxylase charakterisiert werden, deren Produkt sich durch eine deutlich stärkere Hydrophilie auszeichnete, als andere getestete Hydroxy-Costunolid Derivate. Die Expression von Enzymkandidat M4 im Hefe-Stamm EPY300 mit dem Germacren A Säure Substratvektor führte zu einem bisher noch unbekannten neuen Produkt, dem Farnesyl-δ-Lacton. Bei gleichzeitiger Expression von HaG8H synthetisiert M4 neben dem Farnesyl-δ-Lacton zusätzlich Costunolid. Um die Ergebnisse aus dem Hefe-Expressions-System abzusichern und zu ergänzen

wurde im Anschluss daran mit der Expression in *N. benthamiana* ein zweites System der Enzymcharakterisierung etabliert.

Tab. 26: Enzymprodukte der Expression in Hefe

Enzyme [(a)]	Produkt	Reaktionsmechanismus
HaG8H	8β-Hydroxy-Germacren A Säure	Hydroxylierung von Germacren A an Position 8β, ohne subsequente Lacton-Bildung. (Ikezawa et al. 2011)
LsCOS	Costunolid	Hydroxylierung von Germacren A an Position 6α, mit subsequenter γ-Lacton-Bildung. (Ikezawa et al. 2011)
M4	Farnesyl-δ-Lacton	Mechanismus unklar.
HaG8H+M4	Costunolid	Mechanismus unklar.
LsCOS+M33	14-Hydroxy-Costunolid	Hydroxylierung von Costunolid zu 14-Hydroxy-Costunolid.

[(a)] In Kombination mit der Enzymkombination [GAS + GAO + CR], bzw. aufbauend auf Germacren A Säure.

3.3 Rekonstruktion des STL Stoffwechselweges und Enzym-Charakterisierung in *Nicotiana benthamiana*

Das Expressionssytem in Hefe war von der Arbeitsgruppe D.-K. Ro entwickelt worden und erlaubte mit entsprechenden Vektoren die Herstellung der Substrate Germacren A Säure (GA), 8β-Hydroxy-Germacren A Säure (8β-OH-GAA) und Costunolid (COS) für die zu testenden Cytochrom P450 Enzyme (siehe Kapitel 3.2.1) (Nguyen et al. 2010; Ikezawa et al.2011). Mit der Expression in *N. benthamiana* sollte alternativ dazu ein heterologes System geschaffen werden, das so nahe wie möglich an der natürlichen Situation der pflanzlichen P450 Enzyme orientiert ist: Erstens wurde durch die Expression in pflanzlichen Zellen ein natives System der Proteinsynthese und posttranslationalen Modifikation eingestellt. Dies war umso mehr erforderlich, als dass eine Reihe von P450 Kandidatengenen nicht optimal in Hefe exprimiert wurden (Western Blot zeigte fehlende Expression von C100 und S2 bei Ikezawa et al. (2011)). Zweitens bietet die Pflanzenzelle von *N. benthamiana* die natürlichere Umgebung für das aktive Enzym in Bezug auf die subzelluläre Kompartimentierung (Bach et al. 2014). Drittens sollten hier, auch für die Produktion der Substrate, die natürlicherweise in *Helianthus* vorhandenen Homologe der Enzyme GAS1, GAO und HaG8H verwendet werden, bzw. in Falle von LsCOS das entsprechende Homolog von *Lactuca sativa* als „Positivkontrolle“. Die erfolgreiche Expression von GAS, GAO und COS im *N. benthamiana* System konnte zwar bereits für die homologen Enzyme von *Tanacetum parthenium* gezeigt werden (Liu et al. 2011), allerdings noch nicht für die Enzym-Homologe HaGAS1, HaGAO, HaG8H und LsCOS. Deswegen war es erforderlich zuerst einzeln die Expression von HaGAS1, HaGAO, HaG8H und LsCOS zu testen, anstatt direkt mit dem Testen der Enzymkandidaten in den späteren Schritten des Stoffwechselweges zu beginnen. Um das *in planta* Expressionssytem zu etablieren, wurde demnach ein Schritt-für-Schritt Ansatz gewählt, bei dem jede Erweiterung des Stoffwechselweges um ein weiteres Enzym einzeln evaluiert wurde. Ebenfalls geprüft wurden zwei unterschiedliche Genkombinationen, um eine Optimierung des Stoffwechselweges zu gewährleisten (Stoffwechsel-Optimierung, bzw. „pathway boosting“).

3.3.1 Etablierung des Stoffwechselweges zu Costunolid mit HaGAS1, HaGAO und LsCOS *in planta*

3.3.1.1 Grundlegende Schritte der Stoffwechsel Rekonstruktion: Expression von p19 und DXS

Zur Etablierung des Expressionssystems wurden *N. benthamiana* Blätter zunächst mit dem Vektor pEAQ-HT-DEST1-USER::DXS bzw. p19/DXS transient transformiert. Um eine transiente Expression über den gesamten Zeitraum von der Infiltration bis zur Extraktion (in diesem Fall 6 Tage) zu erlauben, unterdrückt das auf dem Vektor kodierte Gen p19 die PTGS Reaktion („post-transcriptional gene silencing“) (Bach et al. 2014). Der Einbau von DXS (1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat-Synthase) unter dem 35S Promotor soll über die verstärkte Bildung des Intermediates 1-Desoxy-D-Xylulose-5-

Phosphat letztlich die Produktion von FPP, dem Ausgangsprodukt der STL-Synthese, erhöhen. Dieser erste Schritt der Stoffwechsel-Optimierung wurde in allen infiltrierten Pflanzen eingesetzt. Bei der Etablierung eines komplexen Stoffwechsel-Rekonstruktions Ansatzes darf nicht vernachlässigt werden, dass jede einzelne Transformation einen Einfluss auf das Stoffwechsel-System der Zellen haben kann. Aufgrund dessen wurden die Metabolit-Muster des Wildtypes (keine Infiltration) anhand von GC-MS und LC-MS Läufen mit dem Transformationsansatz mit dem Vektor p19/DXS verglichen (Tab. 27).

3.3.1.2 Expression von HaGAS1

Der Einbau der Germacren A Synthase 1 (HaGAS1) führte zur Bildung von Germacren A, welches in Form von β-Elemen mit Hilfe von GC-MS^2 nachgewiesen werden konnte. GC-MS Läufe von Extrakten der Ansätze [p19/DXS + HaGAS1] zeigten dies in Form eines neuen Peak bei 8,00 min und einer Masse von [M] = 204, der im Kontroll-Ansatz [p19/DXS] nicht nachzuweisen war (Peak **a**, Abb. 15A). Der Abgleich der MS^2 Daten mit der Wiley Massenspektrum-Datenbank (WileyRegistry™, Version 8) ergab eine Übereinstimmung mit β-Elemen (Score: 93%) (Abb. 15B und 15C). Der β-Elemen Peak konnte in allen biologischen Replikaten aller negativ Kontrollen - [Wildtyp], [p19/DXS], [p19/DXS + GGPPS]- nicht nachgewiesen werden (Tab. 27). Die Cope-Umlagerung (siehe auch Einleitung, Abb. 3) ist speziell bei der Analyse von Germacren A und dessen Derivaten mittels Gaschromatographie ausführlich in der Literatur beschrieben (De Kraker et al. 2002; Göpfert et al. 2009; Liu et al. 2011; T. Andersen et al. 2015). Germacren A konnte somit indirekt über das Cope-Umlagerungsprodukt β-Elemen nachgewiesen werden. In einem weiteren Experiment wurde gezeigt, dass die zusätzliche Einführung des im Stoffwechselweg (Abb. 15D) nachfolgenden Cytochrom P450 Enzyms HaGAO in die Transformation die Anreicherung von Germacren A verhindert (Abb. 15A). Dies ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf eine komplette Umsetzung von Germacren A durch HaGAO zurückzuführen. Produkte von HaGAO konnten allerdings nicht eindeutig mit GC-MS identifiziert werden, da sie aufgrund der Oxidation an Flüchtigkeit einbüßen und eine modifizierte Analysetechnik erfordern.

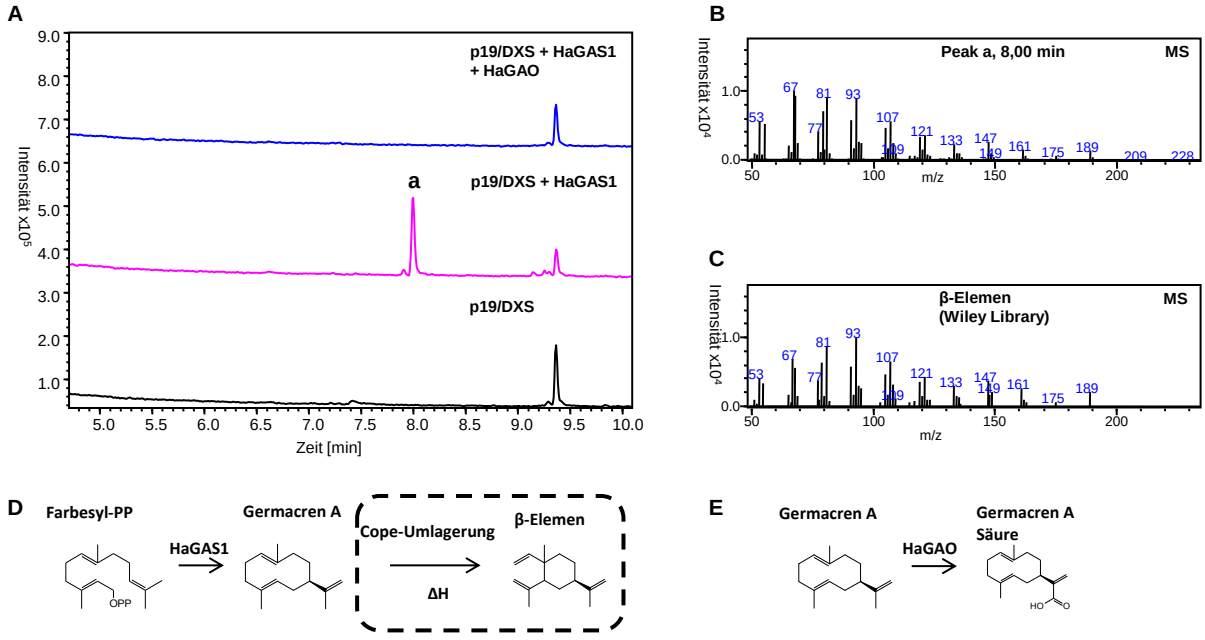


Abb. 15: *In planta* Expression von HaGAS1

Vergleich von Extrakten transformierter *N. benthamiana* Blätter [p19/DXS], [p19/DXS + HaGAS1] und [p19/DXS + HaGAS1 + HaGAO]; **A,** GC-MS Chromatogramme; **B,** Massenspektrum von Peak **a**; **C,** Massenspektrum von β-Elemen aus Wiley Datenbank; **D,** Schema, Umwandlung von Farnesylpyrophosphat (Farnesyl-PP) zu Germacren A sowie Umlagerung zu β-Elemen; **E,** Schema, Folgereaktion von Germacren A zu Germacren A Säure durch HaGAO

3.3.2 Einbau der ersten P450 Enzyme in den Stoffwechselweg: HaGAO und LsCOS

Im nächsten Schritt sollte die Expression der *Helianthus annuus* Germacren A Oxidase (HaGAO) und der *Lactuca sativa* Costunolid Synthase (LsCOS) erfolgen. Wie in (3.3.1.2) gezeigt, war Germacren A nach dem Einfügen des ersten Cytochrom P450 Enzyms HaGAO nicht mehr nachweisbar. Auch bei der Genkombination [p19/DXS + HaGAS1 + HaGAO + LsCOS] (nicht gezeigt) konnte kein Germacren A mehr in den GC-MS-Läufen detektiert werden. Dies spricht dafür, dass bereits bei dem Einbau von HaGAO alles verfügbare Germacren A in eine neue Verbindung umgewandelt wurde. Der Vergleich der LC-MS Läufe der Genkombinationen [p19/DXS + HaGAS1] und [p19/DXS + HaGAS1+ HaGAO] zeigte keine eindeutigen neuen Peaks nach dem Einbringen von HaGAO. Wurde jedoch zusätzlich LsCOS exprimiert, zeigte sich ein neuer Peak bei 9,0 min (Abb. 16A, Peak **f**). Dieser Peak hatte eine Masse von $[M+H]^+$=354, das UV-Vis Absorptions-Spektrum zeigte ein Maximum von 222 nm (Abb. 16B).

Wie bei Liu et al. (2011) beschrieben, lässt sich Peak **f** durch die Additions-Reaktion von Costunolid, dem Enzymprodukts von LsCOS, und Cystein erklären (Abb. 16F). Die Gesamtmasse von $[M+H]^+$=354 ergibt sich aus der Summe der Massen von Costunolid $[M+H]^+$=233 und Cystein

[M]=121. Die Identität von Peak **f** mit Costunolid-Cystein wurde in einem separaten Experiment durch *in vitro* Reaktion von Costunolid mit L-Cystein verifiziert (siehe Kapitel 3.3.7).

Um mögliche Produkte von HaGAO herauszuarbeiten, wurde das extrahierte Ionenchromatogramm (EIC) für die Masse von Germacren A Säure ($C_{15}H_{22}O_2$)$[M+H]^+$=235 der drei Läufe verglichen. Dabei zeigten sich bei der Genkombination [p19/DXS + HaGAS1+ HaGAO] im Vergleich zur Kombination ohne HaGAO vier neue Peaks **b, c, d, e** (Abb. 16C) mit den Retentionszeiten 8,9, 9,2, 9,7 und 10,44 min. Peak **e** zeigte die höchste Intensität. Diese Peaks waren nicht mehr detektierbar, sobald das nächste Cytochrom P450 Enzym LsCOS in das System eingefügt wurde.

Es handelt sich bei Peak **b-e** mit hoher Wahrscheinlichkeit um Germacren A Säure und deren Umlagerungsprodukte (α-, β-, γ-Costus Säure) (Abb. 16D), die auch in ungepuffertem Kultur-Medium entstehen können, wie von Nguyen et al. (2010) gezeigt.

Um das mit Peak **f** bezeichnete Enzymprodukt von LsCOS weiter abzusichern, wurde das EIC der Masse $[M+H]^+$=354 der Genkombinationen [p19/DXS + HaGAS1], [p19/DXS + HaGAS1 + HaGAO] und [p19/DXS + HaGAS1 + HaGAO + LsCOS] analysiert. Hier ließ sich erkennen, dass keine weiteren Peaks mit entsprechender Masse innerhalb des LC-MS Laufs vorhanden waren und dass Peak **f** in Abwesenheit von LsCOS nicht auftrat (Abb. 16E).

Somit konnte für die bereits in Hefe charakterisierten Cytochrom P450 Enzyme HaGAO und LsCOS eine Bestätigung der Enzymfunktion im *N. benthamiana* System gezeigt werden. Weiterhin war mit LsCOS eine Positivkontrolle für die Charakterisierung einer potentiellen Costunolid Synthase von *H. annuus* etabliert und der Weg bereitet, um Enzymkandidaten *in planta* mit dem Substrat Costunolid zu testen.

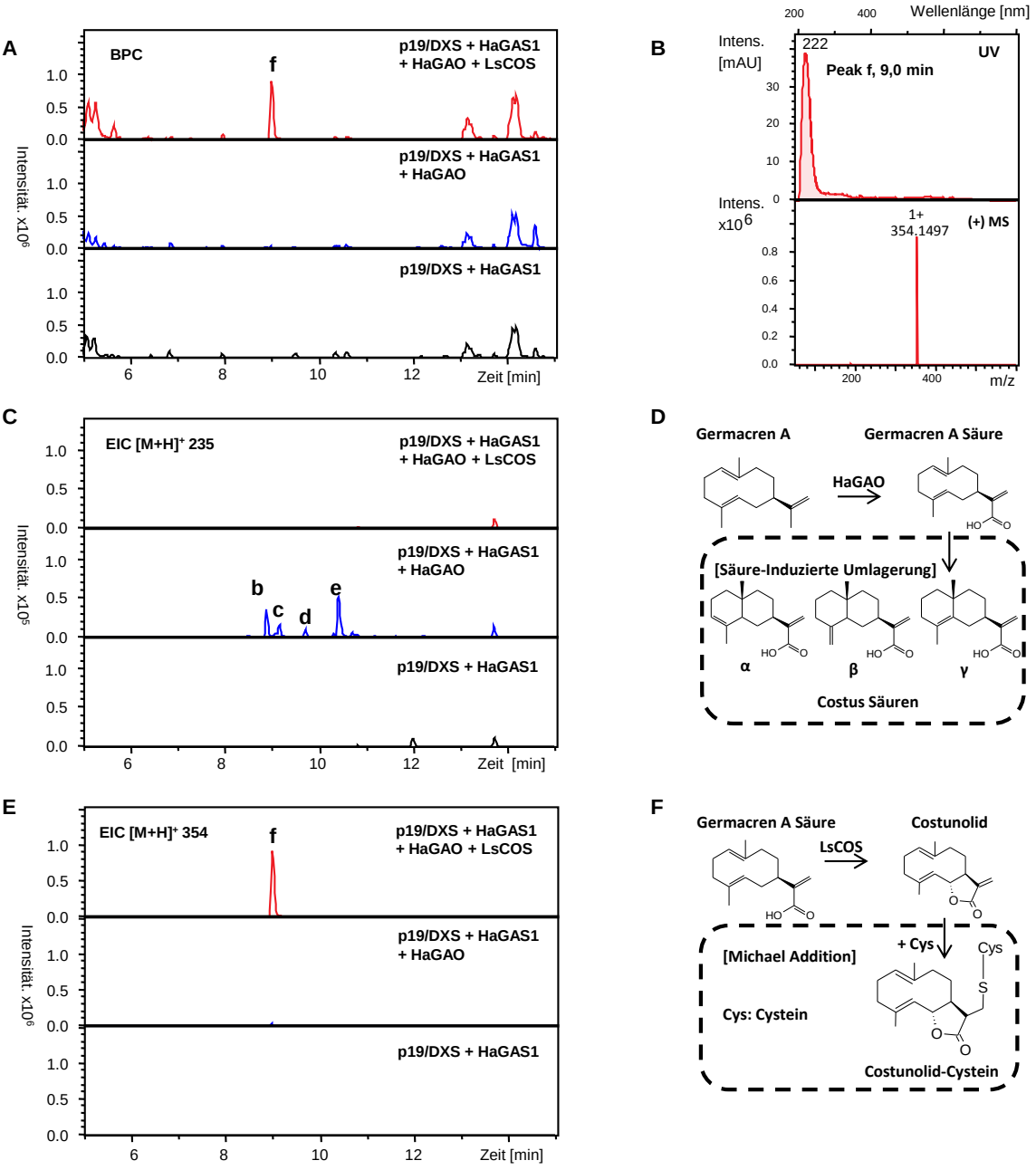


Abb. 16: Expression von HaGAO und LsCOS *in planta*

Vergleich von Extrakten transformierter Tabak Blätter mit den Vektoren [p19/DXS + HaGAS1], [p19/DXS + HaGAS1 + HaGAO] und [p19/DXS + HaGAS1 + HaGAO + LsCOS]; **A,** LC-MS Chromatogramme; **B,** Absorptions-Spektrum und Massenspektrum von Peak **f**; **C,** EIC $C_{15}H_{22}O_2$ bzw. $[M+H]^+$=235; **D,** Umwandlung von Germacren A zu Germacren A Säure durch HaGAO und mögliche Umlagerungsprodukte; **E,** EIC $C_{18}H_{27}NO_4S$ bzw. $[M+H]^+$=354; **F,** Umwandlung von Germacren A Säure zu Costunolid durch LsCOS und Additionsreaktion zu Costunolid-Cystein (Peak **f**)**;** BPC: base peak count, EIC: Extrahiertes Ionenchromatogramm bzw. *extracted ion chromatogram*

3.3.3 Umwandlung von Germacren A Säure in Costunolid: Vergleich von LsCOS und Kandidat M4

Bei der Suche nach einem Cytochrom P450 Enzym von *Helianthus*, das in der Lage sein würde Germacren A Säure in Costunolid zu überführen, standen nun die Ansätze [p19/DXS + HaGAS1 + HaGAO] als Negativkontrolle und [p19/DXS + HaGAS1 + HaGAO + LsCOS] als Positivkontrolle zur Verfügung. Die insgesamt zehn Kandidaten-Gene wurden in Kombination mit [p19/DXS + HaGAS1 + HaGAO] exprimiert, bzw. *in vivo* mit Germacren A Säure als Substrat getestet.

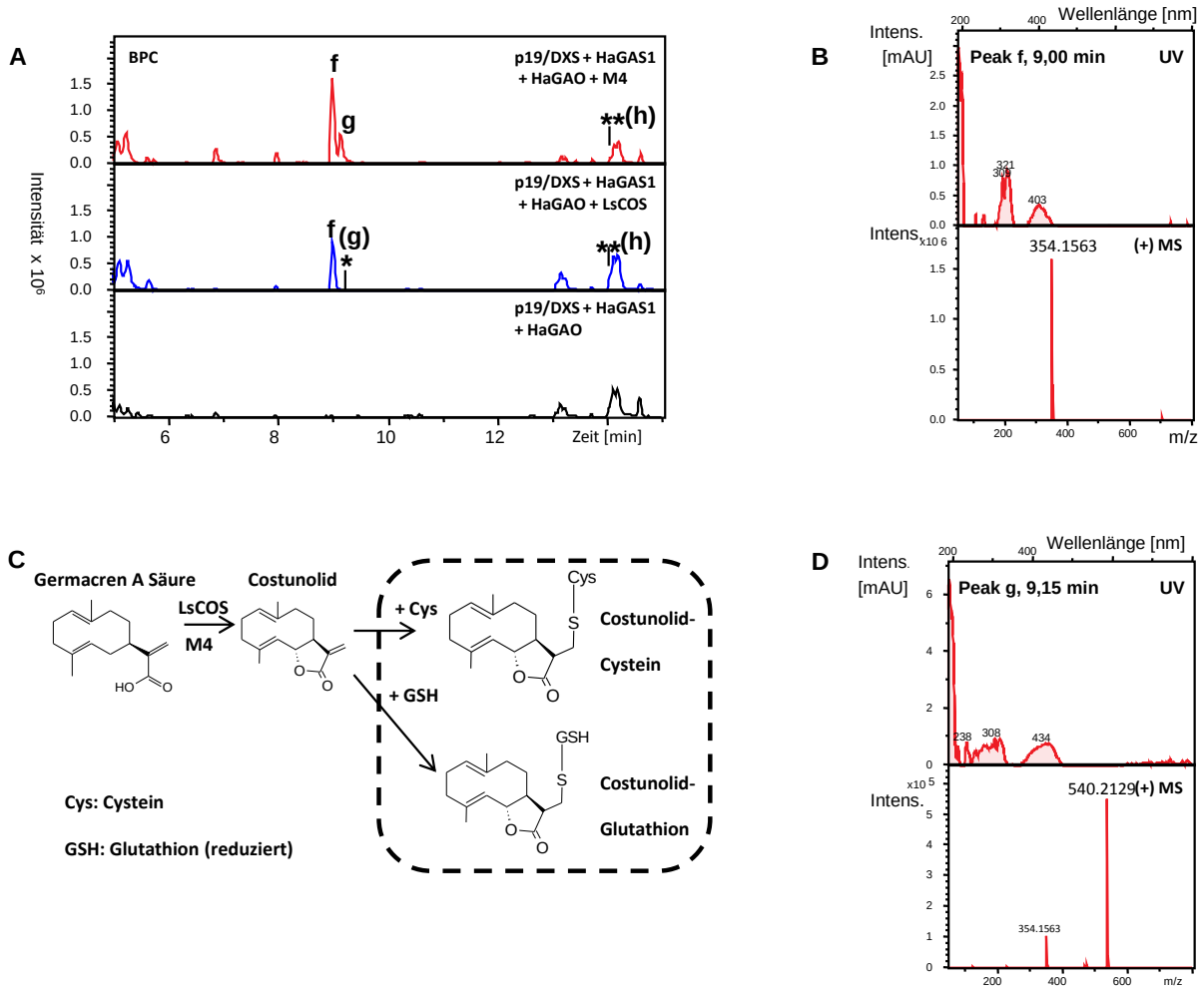


Abb. 17: Vergleich der Expression von LsCOS und M4 *in planta*

Vergleich von Extrakten aus *N. benthamiana* Blättern mit den Vektoren [p19/DXS + HaGAS1 + HaGAO], [p19/DXS + HaGAS1 + HaGAO+ LsCOS] und [p19/DXS + HaGAS1 + HaGAO + M4]; **A,** LC-MS Chromatogramme; **B,** UV und (+) MS Spektrum von Peak **f**; **C,** Umwandlung von Germacren A Säure zu Costunolid durch LsCOS bzw. M4 und Additions-Reaktion zu Costunolid-Glutathion (Peak **g**); **D,** UV und (+) MS Spektrum von Peak **g;** Peak **f**: Costunolid-Cystein, Peak **g**: Costunolid-Glutathion, (*****) EIC zeigt das Vorhandensein von Costunolid-Glutathion, (******) EIC zeigt das Vorhandensein von freiem Costunolid (Spuren, Peak **h**); BPC: *base peak count*, EIC: Extrahiertes Ionenchromatogramm bzw. *extracted ion chromatogram*

Während bei neun der Kandidaten keine Umsetzung von Germacren A Säure zu einem neuen Produkt detektiert werden konnte zeigte der Transformationsansatz [p19/DXS + HaGAS1 + HaGAO + M4] im *N. benthamiana* System die Bildung von Costunolid indirekt über das Derivat Costunolid-Cystein (Abb. 17A und 17B, Peak **f**, 9,00 min). Die Produktion von Costunolid-Cystein von war im Vergleich zu LsCOS leicht erhöht. Ein weiterer Peak mit einer Masse von $[M+H]^+$=540 war ebenfalls zu beobachten (Abb. 17A und 17D, Peak **g**, 9,15 min). Dieser Peak wurde anhand seiner Masse als Costunolid-Glutathion identifiziert (Abb. 17C).

Die von LsCOS produzierte Menge an Costunolid-Glutathion war so gering, dass sie von der Schulter des Costunolid-Cystein Peaks überdeckt wurde (Abb. 17A, (*)) und nur über ein extrahiertes Ionenchromatogramm (EIC) detektiert werden konnte. Mit dieser Technik konnte auch freies Costunolid ($C_{15}H_{20}O_2$)$[M+H]^+$=233; bei Retentionszeit 14,18 min) in Spuren für die Transformationsansätze mit M4 bzw. LsCOS nachgewiesen werden (Abb. 17A, (**) **h**).

Die Identitäten der Enzymprodukte Costunolid-Cystein sowie Costunolid-Glutathion der Ansätze [p19/DXS + HaGAS1 + HaGAO + LsCOS] und [p19/DXS + HaGAS1 + HaGAO + M4] wurde in einem separaten Experiment verifiziert (siehe Kapitel 3.3.7).

3.3.4 Costunolid wird *in planta* von Kandidat M33 in 14-Hydroxy-Costunolid umgewandelt

Nach der Etablierung des Stoffwechselweges zu Costunolid *in planta* wurden Cytochrom P450 Kandidaten-Gene auf die *in vivo* Umsetzung von Costunolid in *N. benthamiana* getestet. Hiermit wurde der Ansatz der Genkombinatorik auf einer im Stoffwechselweg weiter nach hinten verschobenen Ebene getestet. Dem Ansatz [p19/DXS + HaGAS1 + HaGAO + LsCOS] mit Costunolid als Endprodukt, wurden die zehn beschriebenen Cytochrom P450 Kandidaten Enzyme hinzugefügt. Somit wurden Tabak-Blätter mit insgesamt sechs Genen (kodiert auf fünf Vektoren) gleichzeitig transient transformiert. Neun von zehn Kandidaten zeigten in den LC-MS Läufen keine Unterschiede zur Negativ-Kontrolle, d.h. sie waren nicht in der Lage, Costunolid als Substrat zu nutzen. Beim Ansatz [p19/DXS + HaGAS1 + HaGAO + LsCOS + M33] waren zwei neue Peaks zu erkennen (Abb. 18A, Peak **i**, 6,29 min, Peak **k**, 6,68 min). Peak **i** hatte eine Masse von $[M+H]^+$=370, was der Masse von Costunolid-Cystein ($C_{18}H_{27}NO_4S$)$[M+H]^+$=354, erhöht um die Masse von Sauerstoff (O) [M]=16, entspricht (Abb. 18B). Peak k hatte eine Masse von $[M+H]^+$=556, was der Masse von Costunolid-Glutathion ($C_{25}H_{37}N_3O_8S$)$[M+H]^+$=540 erhöht um die Masse von Sauerstoff (O) [M]=16 entspricht (Abb. 18D). Peak **i** und Peak **k** stellen also die Cystein- und Glutathion-Addukte eines von Kandidat M33 hydroxylierten Costunolid Derivats dar. Die Expression in Hefe hatte bereits die Konvertierung von Costunolid zu 14-Hydroxy-Costunolid durch Kandidat M33 gezeigt. Die Identitäten der Enzymprodukte 14-Hydroxy-Costunolid-Cystein (14-OH-Cos-Cys) sowie 14-Hydroxy-Costunolid-Glutathion (14-OH-Cos-GSH) aus Tabak wurde in einem separaten Experiment verifiziert (siehe

Kapitel 3.3.7). Wie bei Costunolid-Cystein und Costunolid-Glutathion bilden 14-Hydroxy-Costunolid-Cystein und 14-Hydroxy-Costunolid-Glutathion ein Peak-Tandem, bei dem jeweils das Glutathion-Addukt ein schwächeres Signal mit einer leicht erhöhten Retentionszeit ergab, hier mit einer Differenz zwischen Peak **i** (14-OH-Cos-Cys) und Peak **k** (14-OH-Cos-GSH) von Δ(RT)=0,39 min. Während freies Costunolid *in planta* noch in Spuren nachweisbar war, konnte freies 14-OH-Costunolid, wie im Reaktionsschema (Abb. 18C) postuliert, nicht nachgewiesen werden. Aus Hefekulturen aufgereinigtes 14-OH-Costunolid wurde als Referenz in der LC-MS getestet, und zeigte eine Retentionszeit von 9,2 min sowie eine Masse von ($C_{15}H_{20}O_3$)$[M+H]^+$=249.

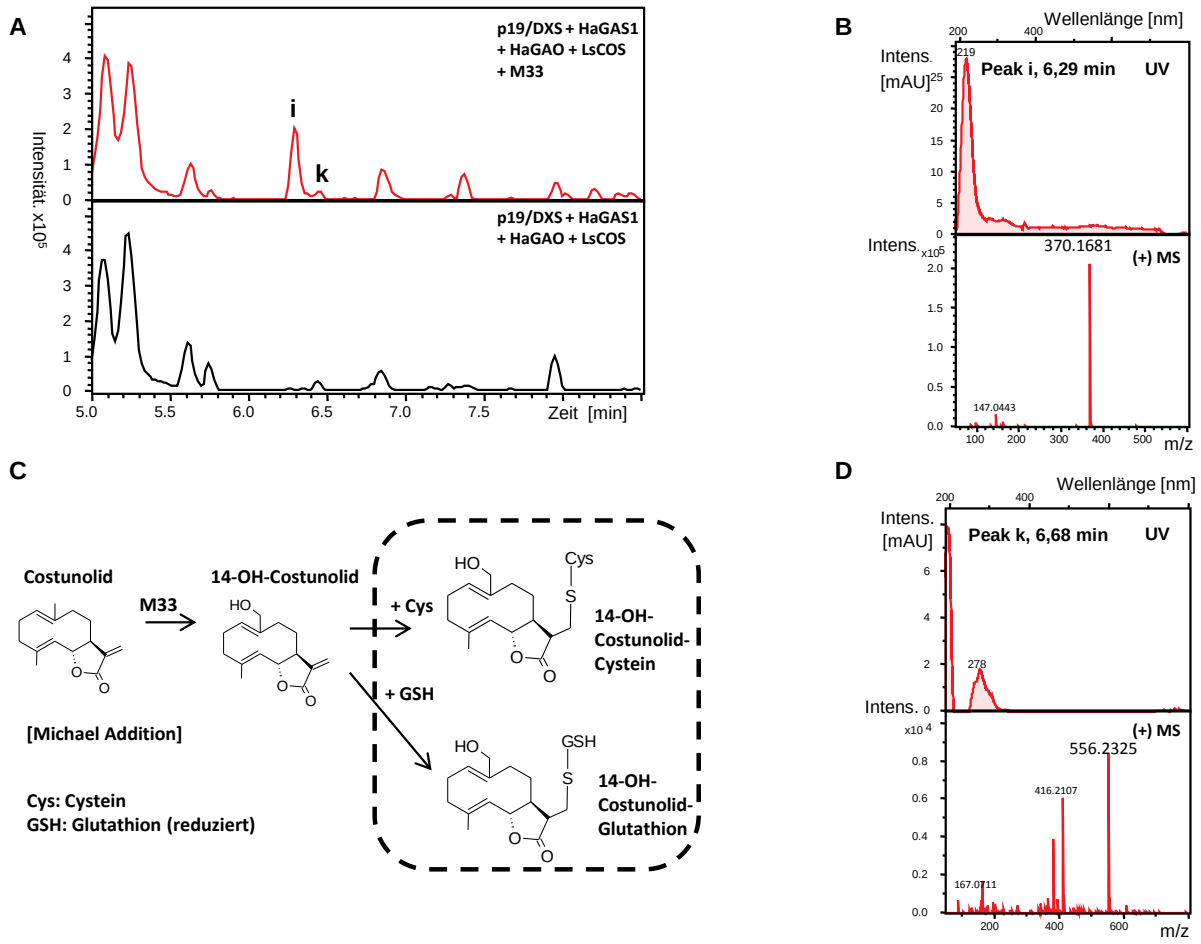


Abb. 18: M33 katalysiert die 14-Hydroxylierung von Costunolid *in planta*

Vergleich von Extrakten aus *N. benthamiana* Blättern mit den Vektoren [p19/DXS + HaGAS1 + HaGAO + LsCOS] bzw. [p19/DXS + HaGAS1 + HaGAO + LsCOS + M33]; **A,** LC-MS Chromatogramme; **B,** UV und (+) MS Spektrum von Peak **i**; **C,** Umwandlung von Costunolid zu 14-Hydroxy-Costunolid durch M33 und Additions-Reaktion zu Costunolid-Cystein und Costunolid-Glutathion; **D,** UV und (+) MS Spektrum von Peak **k;** Peak **i**: 14-OH-Costunolid-Cystein, Peak **k**: 14-OH-Costunolid-Glutathion; BPC: *base peak count*, EIC: Extrahiertes Ionenchromatogramm bzw. *extracted ion chromatogram*

3.3.5 HaG8H konvertiert *in planta* Germacren A Säure zu einem Sesquiterpenlacton

Der Vergleich von LC-MS Läufen der Ansätze [p19/DXS + HaGAS1 + HaGAO] und [p19/DXS + HaGAS1 + HaGAO + HaG8H] zeigte zwei neue Peaks bei 9,25 und 9,42 min (Abb. 19A). Peak **l** zeigte ein Absorptionsmaximum bei 222 nm und einen Massenpeak (Abb. 19B) bei $[M+H]^+$=354, was der Masse von Costunolid-Cystein entspricht (siehe Abb. 16A, Peak **l**), allerdings betrug die Differenz der Laufzeit von Peak **f** zum Peak von Costunolid-Cystein Δ(RT)=0,25 min. Analog dazu hatte Peak **n** (Abb. 19D) mit $[M+H]^+$=540 die Masse von Costunolid-Glutathion, wies aber zu dieser Substanz eine Differenz der Laufzeit von Δ(RT)=0,27 min auf. Es musste sich also um Addukte eines neuen Enzymproduktes handeln, welches eine α-Methylen-γ-Lacton Gruppe besaß, sonst wäre die Michael-Addition nicht möglich gewesen. Da HaG8H im Hefe-Expressions-System die Reaktion von Germacren A Säure in 8β-Hydroxy-Germacren A Säure katalysiert, wäre folgendes Erklärungsmodell naheliegend: In der Pflanzenzelle läuft die Hydroxylierung an der 8β Position durch HaG8H analog zum Hefe-Expressions-System ab. Im Anschluss folgt eine 7,8-Lacton-Bildung zum Inunolid (Inu). In der nachfolgenden Additions-Reaktion wird Inunolid in Inunolid-Cystein (Inu-Cys) und Inunolid-Glutathion (Inu-GSH) umgewandelt (Schema Abb. 19E). Ergänzend zum LC-MS Lauf von [p19/DXS + HaGAS1 + HaGAO + HaG8H] wurden die EIC ($C_{18}H_{27}NO_4S$) $[M+H]^+$=354, sowie EIC ($C_{25}H_{37}N_3O_8S$) $[M+H]^+$=540 mit eingefügt (hier mit unterschiedlicher Skalierung) (Abb. 19C). Diese zeigen jeweils neben dem Hauptpeak noch einen breiten Nebenpeak für das putative Cystein-Addukt (Peak **m**) und Glutathion-Addukt (Peak **o**), bei dem möglicherweise mehrere Substanzen überlagern. Da, analog zur Situation von HaGAO, auch für HaG8H Säure-induzierte Umlagerungsprodukte beschrieben sind (Ikezawa et al. 2011), könnten so die Lactone und deren Derivate der 8β-Hydroxy-Costus-Säuren der Grund für die entsprechenden Nebenprodukte sein. Eine ausführliche Beschreibung dieser möglichen Nebenprodukte und deren Entstehung ist im Anhang eingefügt (Anhang, S 10). Nicht detektiert werden konnte 8β-Hydroxy-Germacren A Säure bzw. eine der 8β-Hydroxy-Costus-Säuren (EIC $[M+H]^+$=252). Mit Hilfe des EIC $[M+H]^+$=233 wurde bei [p19/DXS + HaGAS1 + HaGAO + HaG8H] ein Peak gefunden, der mit 14,45 min eine Verschiebung der Retentionszeit um Δ(RT)=0,27 min zu Costunolid hatte. Diese ebenfalls nur in Spuren nachweisbare Substanz könnte dem Erklärungsmodell entsprechend das freie Inunolid darstellen. Für eine abschließende Beweisführung würde entweder Inunolid als Referenz-Substanz benötigt, oder eine größere Zahl an *N. benthamiana* Blättern müsste transformiert und die Enzymprodukte für NMR Analysen aufgereinigt werden.

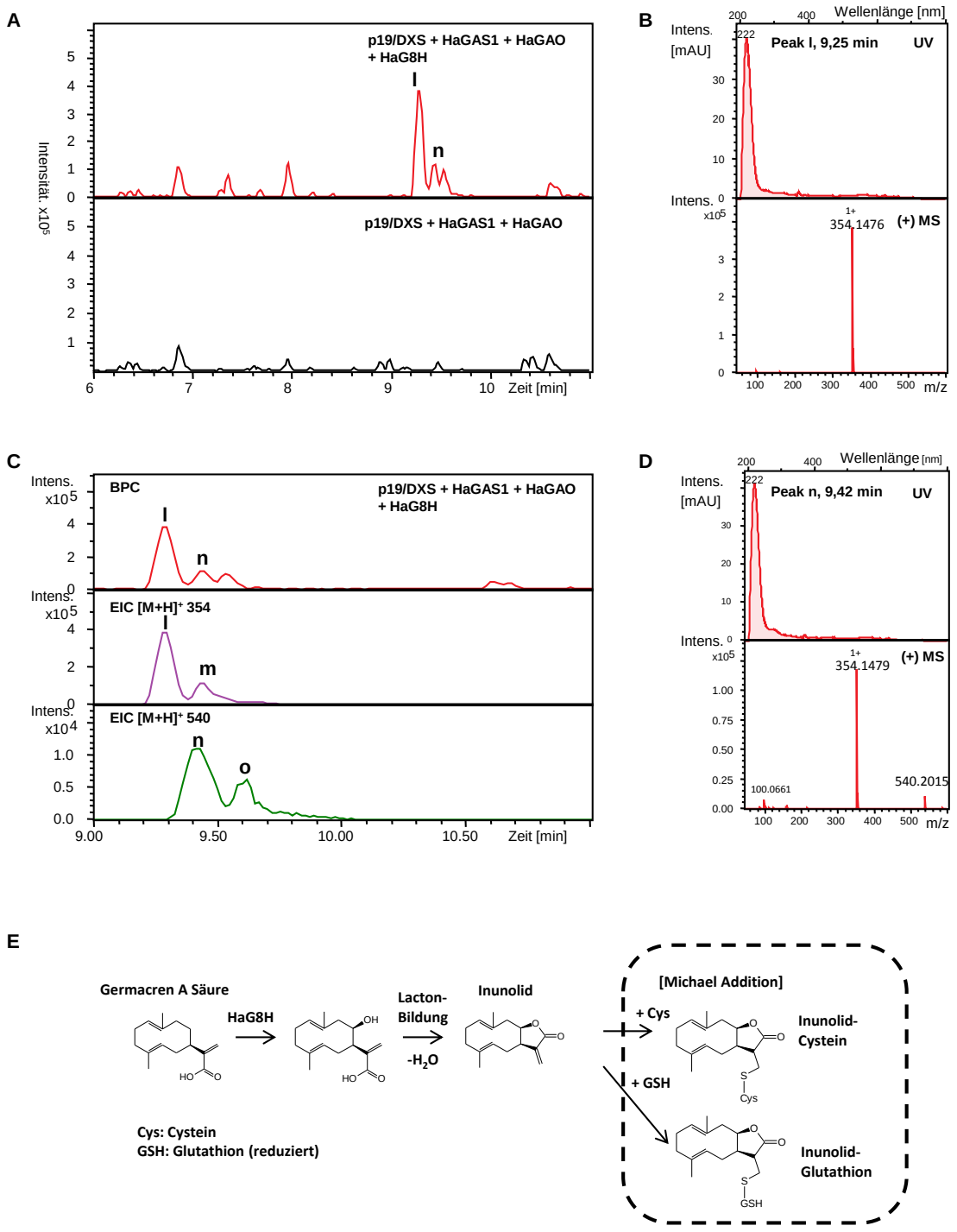


Abb. 19: HaG8H konvertiert *in planta* Germacren A Säure zu einem Sesquiterpenlacton

Vergleich von Extrakten aus *N. benthamiana* Blättern mit den Vektoren [p19/DXS + HaGAS1 + HaGAO] und [p19/DXS + HaGAS1 + HaGAO + HaG8H]; **A,** LC-MS Chromatogramme; **B,** UV und (+) MS Spektrum von Peak **l**; **C,** EIC ($C_{18}H_{27}NO_4S$) $[M+H]^+$=354, EIC ($C_{25}H_{37}N_3O_8S$) $[M+H]^+$=540; **D,** UV und (+) MS Spektrum von Peak **n**; **E,** Schema, postulierte Umwandlung von Germacren A Säure zu 8β-Hydroxy-Germacren A Säure durch HaG8H, gefolgt durch 8β-Lacton-Bildung zu Inunolid und Additions-Reaktion zu Inunolid-Cystein und Inunolid-Glutathion

3.3.6 Zwei alternative Wege zu 8β-Hydroxy-Costunolid

Im nächsten Versuchsschritt sollte getestet werden, ob einer oder mehrere Cytochrom P450 Kandidaten *in vivo* im Tabak System in der Lage sind, 8β-OH-GAA bzw. Inunolid als Substrat zu nutzen. Alle Kandidaten wurden in das System [p19/DXS + HaGAS1 + HaGAO + HaG8H] eingebracht, bei acht von zehn Kandidatengenen konnten keine neuen Produkte detektiert werden. Die Einführung der Gene M4 und S2 durch die Genkombinationen [p19/DXS + HaGAS1 + HaGAO + HaG8H + M4] sowie Genkombinationen [p19/DXS + HaGAS1 + HaGAO + HaG8H + S2] führte zu einer Vielzahl neuer Peaks (Abb. 20A). Besonders im Falle von S2 wurde anhand der MS Spektren deutlich, dass hier bei vielen der neuen Peaks eine Überlagerung mehrerer Produkte stattgefunden haben musste. Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden im Folgenden zunächst die bereits aus vorangegangenen Kapiteln erläuterten Produktpeaks diskutiert, und anschließend die in dieser Kombination neuen Produktpeaks anhand der EICs analysiert.

Zunächst fiel auf, dass durch die Einführung der Enzyme S2 und M4 die Peaks von Inunolid-Cystein (Abb. 20, A, Peak **l**, Inu-Cys, 9,25 min) sowie Inunolid-Glutathion (Abb. 20A, Peak **n**, Inu-GSH, 9,42 min) deutlich geringere Intensität aufwiesen. Im Fall von M4 ließen sich die bereits beschriebenen Produkte Costunolid-Cystein (Cos-Cys, 9,00 min, aus BPC, Peak **f**) und Costunolid-Glutathion (Cos-GSH, 9,15 min, aus EIC, Peak **g**, hier nicht gezeigt) nachweisen. In der Konkurrenzreaktion um das Substrat Germacren A Säure scheint also bevorzugt die für das Enzym M4 bereits gezeigte 6α-Hydroxylierung und Lacton-Bildung abzulaufen, während die von HaG8H induzierte 8β-Hydroxylierung und Lacton-Bildung untergeordnet bleibt.

Das Extrahierte Ionen-Chromatogram für Hydroxy-Costunolid-Cystein ($C_{18}H_{27}NO_5S$)$[M+H]^+$=370 zeigt bei [p19/DXS + HaGAS1 + HaGAO + HaG8H + M4] und [p19/DXS + HaGAS1 + HaGAO + HaG8H + S2] einen Peak mit der Laufzeit 8,32 min (Abb. 20B und 20D, Peak **p**). Das Extrahierte Ionen-Chromatogram für Hydroxy-Costunolid-Glutathion ($C_{25}H_{37}N_3O_9S$) $[M+H]^+$=556 zeigt hierbei einen Peak mit der Laufzeit 8,34 min (Abb. 20C und 20E, Peak **t**).

Der Vergleich mit synthetisch produziertem Verbindungen (siehe Kapitel 3.3.7) zeigte, dass es sich bei diesen Verbindungen wahrscheinlich um 8β-Hydroxy-Costunolid-Cystein (8β-OH-Cos-Cys) und 8β-Hydroxy-Costunolid-Glutathion (8β-OH-Cos-GSH) handelt. Das Peak-Tandem (**p/t**) hat eine Differenz der Retentionszeit von Δ(RT)=0,12 min. Freies 8β-Hydroxy-Costunolid (8β-OH-Cos) war in keiner der analysierten Proben nachweisbar.

Bei der Genkombination [p19/DXS + HaGAS1 + HaGAO + HaG8H + S2] konnten in beiden EICs jeweils drei weitere Peaks ausgemacht werden (Abb. 20D und 20E). Dies könnte auf Nebenprodukte mit der Masse von Hydroxy-Costunolid hinweisen, die jeweils als ein Tandem aus zwei Peaks der jeweiligen Cystein- und Glutathion Addukte detektiert wurden. Somit lassen sich folgende drei Peak-Tandems definieren:

1. Peak-Tandem (**q/u**): Peak **q** $[M+H]^+$=370, Rt=7,52 und Peak **u** $[M+H]^+$=556, Rt=7,64, Δ(RT)=0,12 min.

2. Peak-Tandem (**r/v**): Peak **r** $[M+H]^+$=370, Rt=7,94 und Peak **v** $[M+H]^+$=556; Rt=8,08,Δ(RT)=0,14 min.

3. Peak-Tandem (**s/w**): Peak **s** $[M+H]^+$=370, Rt=8,08 und Peak **w** $[M+H]^+$=556; Rt=8,22,Δ(RT)=0,14 min.

Die drei Nebenprodukte der Synthese von 8β-OH-COS aus GAA durch HaG8H und S2 könnten aus den im vorigen Kapitel beschriebenen 8β-Hydroxy-Costus Säuren hervorgegangen sein. Eine ausführliche Beschreibung dieser möglichen Nebenprodukte und deren Entstehung ist im Anhang eingefügt (Anhang, S 11).

Daraus ergibt sich folgendes Modell für die Synthese von 8β-OH-Costunolid über zwei alternative Varianten: In Variante 1 (Abb. 20F) wandeln HaG8H und S2 Germacren A Säure (GAA) in 8β-OH-Costunolid um. Dabei wird GAA zunächst von HaG8H in 8β-OH-GAA umgewandelt. Bevor die Bindung zur 8-Position hin, also zu Inunolid, erfolgen kann wird 8β-OH-GAA von S2 zu 6α,8β-Dihydroxy-Germacren A Säure (6α,8β-OH-GAA) hydroxyliert, die dann autonom zu 8β-OH-Costunolid weiterreagiert. Aus 8β-OH-Costunolid entsteht das Produkt-Tandem der Addukte 8β-OH-Cos-Cys und 8β-OH-Cos-GSH. Da der Syntheseweg über 8β-OH-GAA läuft, entstehen die im Anhang beschriebenen Nebenprodukte.

In Variante 2 (Abb. 20G) wandeln HaG8H und M4 Germacren A Säure (GAA) ebenfalls in 8β-OH-Costunolid um, allerdings ohne die Bildung von Nebenprodukten. In einem ersten Schritt hydroxyliert M4 GAA an C-6, worauf spontan die Lactonisierung zu Costunolid erfolgt. Danach erfolgt die 8β-Hydroxylierung von Costunolid zu 8β-OH-Costunolid durch HaG8H. Die Abwesenheit von Nebenprodukten ergibt sich daraus, dass der Syntheseweg statt über 8β-OH-GAA über Costunolid läuft, von dem keine Säure-induzierten Umlagerungsprodukte beschrieben sind.

Eine Bestätigung dieser postulierten Produkte konnte durch den Abgleich mit den synthetischen Addukten geliefert werden (siehe 3.3.7): 8β-Hydroxy-Costunolid-Cystein wurde abgeglichen mit Peak **p**, sowie 8β-Hydroxy-Costunolid-Glutathion mit Peak **t.**

Für die postulierten Nebenprodukte der Peak-Tandems (**q/u**), (**r/v**) und (**s/w**) ist ein Nachweis über NMR noch erforderlich.

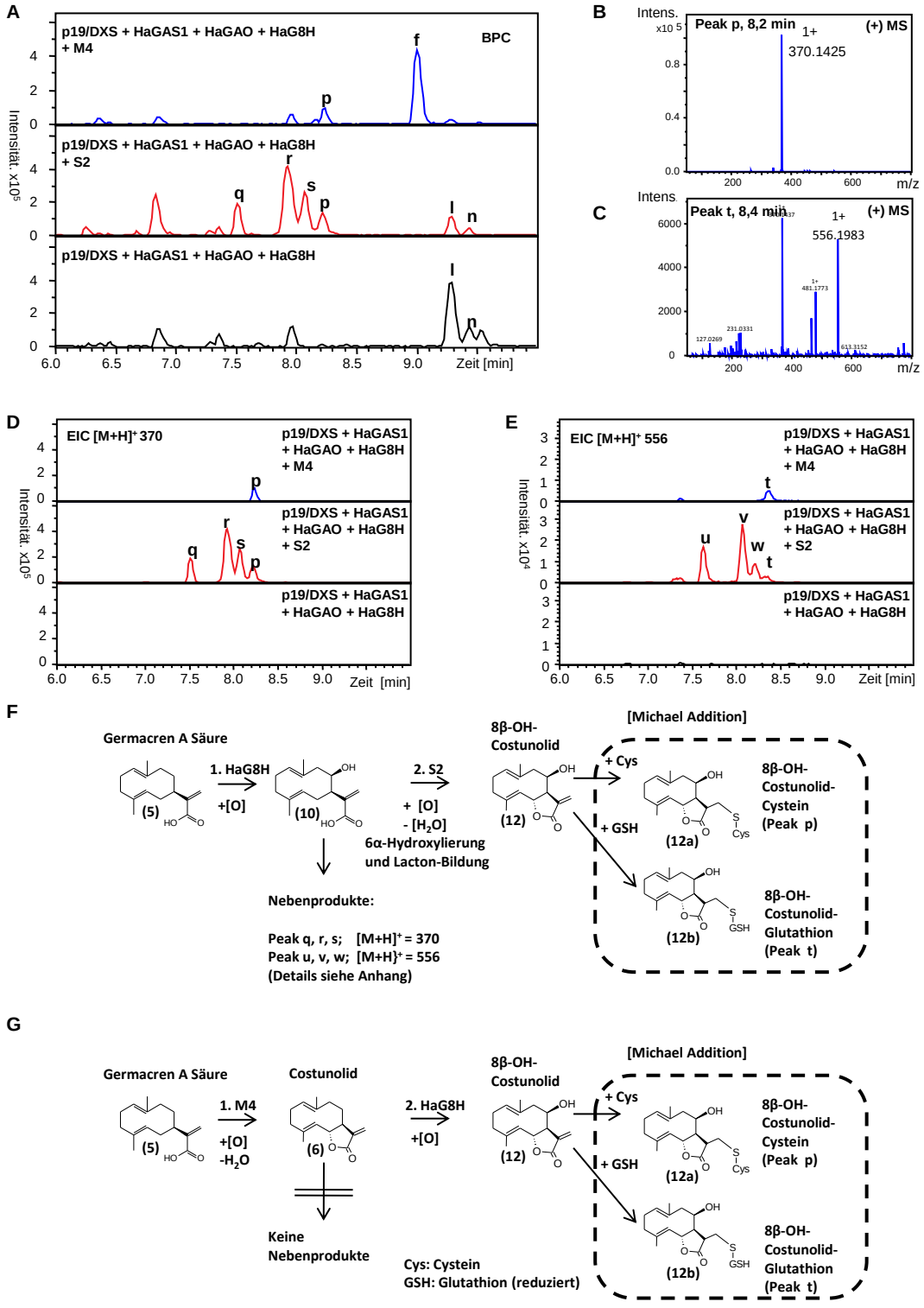


Abb. 20: Zwei alternative Wege zu 8β-Hydroxy-Costunolid

Vergleich von Extrakten aus *N. benthamiana* Blättern mit den Vektoren [p19/DXS + HaGAS1 + HaGAO + HaG8H], [p19/DXS + HaGAS1 + HaGAO + HaG8H + S2] und [p19/DXS + HaGAS1 + HaGAO + HaG8H + M4]; **A,** LC-MS Chromatogramme; **B,** UV und (+) MS Spektrum von Peak **p**; **C,** UV und (+) MS Spektrum von Peak **t**; **D,** EIC ($C_{18}H_{27}NO_5S$) $[M+H]^+$=370; **E,** EIC ($C_{25}H_{37}N_3O_9S$) $[M+H]^+$=556; **F,** Schema, Umwandlung von Germacren A Säure zu 8β-Hydroxy-Costunolid durch HaG8H und S2; **G,** Schema, Umwandlung von Germacren A Säure zu 8β-Hydroxy-Costunolid durch HaG8H und M4

3.3.7 Der Abgleich mit synthetischen Sesquiterpenlacton-Addukten ermöglicht die eindeutige Identifizierung der *in planta* entstanden Addukte

Wie bereits für die Expression von Sesquiterpenlactonen mit α-Methylen-γ-Lacton Gruppe im *N. benthamiana* System beschrieben (Liu et al. 2011; 2014), liegen die *in planta* erzeugten Sesquiterpenlacton (STL) Derivate zum größten Teil in Form von Cystein und Glutathion Addukten vor. In der vorliegenden Arbeit lagen weniger als 1 % der im *N. benthamiana* System detektierten STL Produkte in der underivatisierten Form vor.

Für die Verifizierung der jeweils postulierten Cystein- und Glutathion-Addukte durch den Abgleich mit Referenz-Verbindungen ergab sich die Notwendigkeit, synthetische STL-Cystein und STL-Glutathion Addukte zu erstellen. In einer nicht-enzymatischen Reaktion wurden die sechs STL-Addukte Costunolid-Cystein (Cos-Cys), Costunolid-Glutathion (Cos-GSH), 8β-Hydroxy-Costunolid-Cystein (8β-OH-Cos-Cys), 8β-Hydroxy-Costunolid-Glutathion (8β-OH-Cos-GSH), 14-Hydroxy-Costunolid-Cystein (14-OH-Cos-Cys), sowie 14-Hydroxy-Costunolid-Glutathion (14-OH-Cos-GSH) durch Inkubation der freien STL Verbindungen mit der Aminosäure bzw. dem Peptid synthetisiert (siehe Methoden, 2.2.2). Diese sechs Derivate wurden in einem separaten, hochpräzisen LC-MS System an der Service Einheit des Life Science Centers der Uni Hohenheim von Fr. Iris Klaiber hinsichtlich Laufzeit und exakter Masse mit den Extrakten der transformierten *N. benthamiana* Blätter verglichen. Der Abgleich mit den beiden synthetischen Costunolid-Addukten ist exemplarisch in (Abb. 21) dargestellt, der Abgleich mit den anderen Derivaten, sowie der Vergleich der Massen Spektren findet sich im Anhang. Bei den transformierten *N. benthamiana* Ansätzen [p19/DXS + HaGAS1 + HaGAO +LsCOS] sowie [p19/DXS + HaGAS1 + HaGAO + M4] wurden die beiden Costunolid-Addukte Costunolid-Cystein und Costunolid-Glutathion postuliert. Der Ansatz [p19/DXS + HaGAS1 + HaGAO + M4] wurde daher mit synthetischem Costunolid-Cystein und synthetischem Costunolid-Glutathion verglichen (Abb. 21, sowie Anhang, S 13, S 14). Das EIC für Costunolid-Cystein ($C_{18}H_{27}NO_4S$)$[M+H]^+$=354 zeigte in diesem LC-MS System einen Peak [p19/DXS + HaGAS1 + HaGAO + M4], der in Retentionszeit und exakter Masse mit der Referenzsubstanz eine sehr hohe Übereinstimmung aufweist: (Δ(RT)=0,04 min, Abweichung Masse: - 2,1 ppm) (Anhang, S 13). Alle weiteren untersuchten STL-Addukte weisen eine noch exaktere Übereinstimmung in Retentionszeit und Masse auf. Für Costunolid-Glutathion (EIC) ($C_{25}H_{37}N_3O_8S$) wurde eine Retentionszeit-Differenz von Δ(RT)=0,002 min und Abweichung der gemessenen exakten Masse von -0,6 ppm gemessen. Auch die Übereinstimmungen der Fragmentierungsmuster der MS^2-Spektren stützen den Nachweis von Costunolid-Cystein und Costunolid-Glutathion.

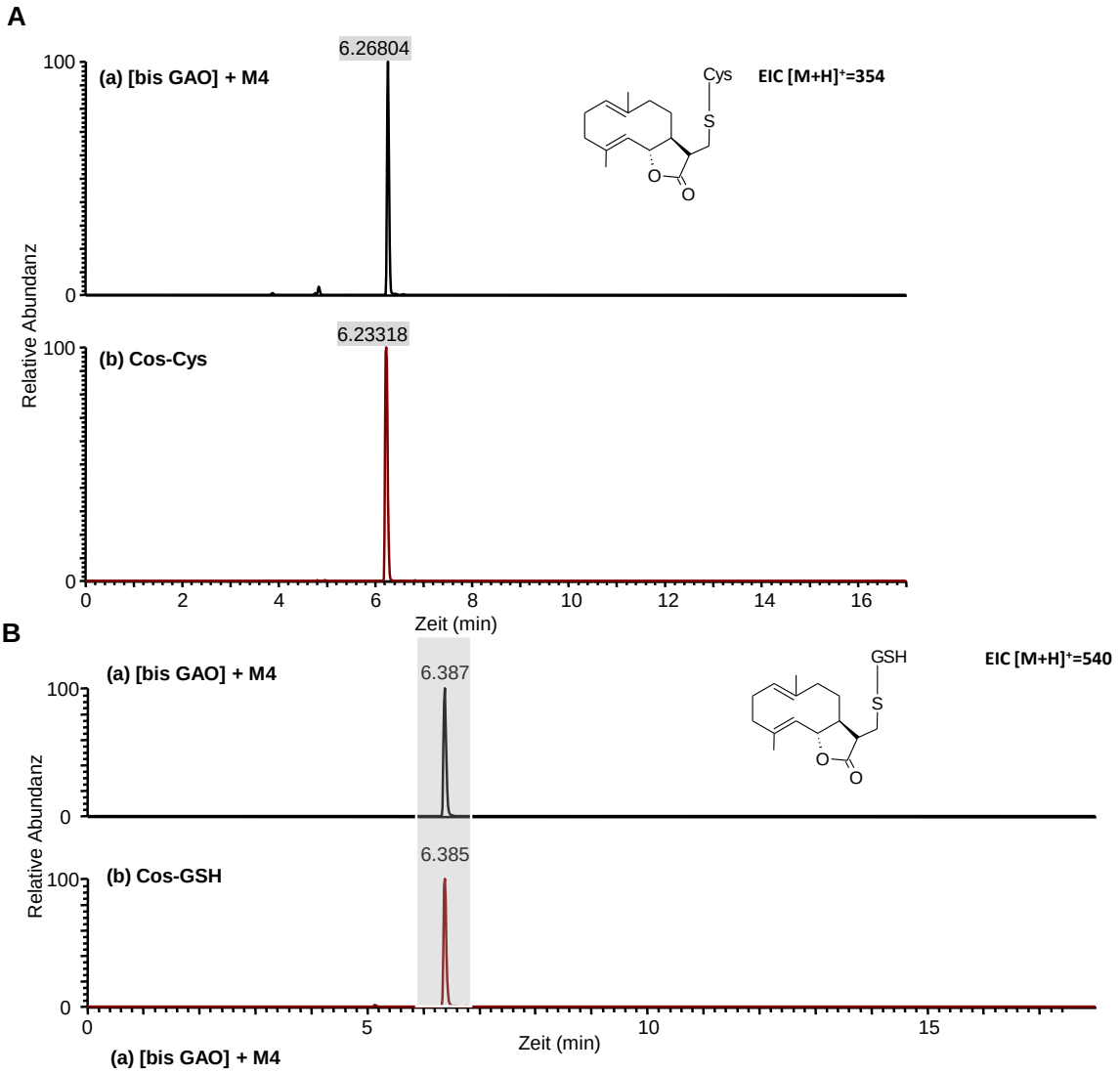


Abb. 21: Abgleich mit Costunolid-Cystein und Costunolid-Glutathion

Vergleich von Extrakten aus *N. benthamiana* Blättern und synthetischem Costunolid-Addukten; **A,** EIC ($C_{18}H_{27}NO_4S$) $[M+H]^+$=354,Vergleich von (a) [p19/DXS + HaGAS1 + HaGAO + M4] mit (b) synthetischem Costunolid-Cystein; **B,** EIC ($C_{25}H_{37}N_3O_8S$) $[M+H]^+$=540, Vergleich von (a) [p19/DXS + HaGAS1 + HaGAO + M4] mit (b) synthetischem Costunolid-Glutathion, Massenspektren: siehe Anhang

Die postulierten STL-Addukte des Ansatzes [p19/DXS + HaGAS1 + HaGAO + LsCOS + M33] 14-OH-Cos-Cys (3,93 min, Δ(RT) <0,01 min, Abw. Masse: -0,5 ppm) und 14-OH-Cos-GSH (4,20 min, Δ(RT) < 0,01 min, Abw. Masse: 0,4 ppm) konnten eindeutig zugeordnet werden (Anhang, S 15 und S 16). Weitere in EIC=370 und EIC=556 detektierte Peaks zwischen 5,5 min und 6,0 min konnten anhand der relativen Retentionszeit ausgeschlossen werden und stellen wahrscheinlich noch unbekannte Umlagerungsprodukte dar (Anhang, S 15 und S 16).

Synthetisches 8β-OH-Cos-Cys und 8β-OH-Cos-GSH wurde im Abgleich mit zwei metabolischen Systemen verwendet: Das im Ansatz [p19/DXS + HaGAS1 + HaGAO + HaG8H + M4] entstandene Peak-Tandem aus 8β-OH-Cos-Cys (5,58 min, Δ(RT) < 0,01 min, Abw. Masse: - 1,1 ppm) und β-OH-Cos-GSH (5,64 min, Δ(RT) = 0,01 min, Abw. Masse: -0,7 ppm) konnte den entsprechenden Referenz-Substanzen zugeordnet werden. Auch im Falle von [p19/DXS + HaGAS1 + HaGAO + HaG8H + S2] konnte in der Gruppe aus vier Peaks in den EICs jeweils der Peak mit der höchsten Retentionszeit 8β-OH-Cos-Cys (5,56 min, Δ(RT) = -0,02 min, Abw. Masse: -0,2 ppm) und 8β-OH-Cos-GSH zugeordnet (5,64 min, Δ(RT) < 0,01 min, Abw. Masse: 0,0 ppm) werden (Anhang, S 17 und S 18)

Da die postulierten Nebenprodukte der *in planta* Umsetzung von Germacren A Säure mit HaG8H und S2 (Anhang S 11, Verbindungen 12d, 12e, 12f) nicht als Reinsubstanz zur Verfügung standen, war hier kein Nachweis über synthetische Cystein- und Glutathion-Addukte möglich.

3.3.8 Zusammenfassung der Stoffwechsel Rekonstruktion in *Nicotiana benthamiana*

Die Expression von HaGAS1 führte zur Bildung von Germacren A. Die zusätzliche Expression von HaGAO führte zur Bildung von Germacren A Säure sowie deren Umlagerungsprodukte α-, β-, γ-Costus-Säure. Sowohl LsCOS, als auch Kandidat M4 konnten Germacren A Säure in Costunolid überführen. Costunolid wurde von Kandidat M33 in 14-OH-Costunolid überführt. Die Expression von *Helianthus annuus* Germacren A Säure 8β-Hydroxylase (HaG8H) in Abwesenheit von M4 und S2 führte *in planta* zur Bildung von Inunolid (Inu) aus Germacren A Säure, während in Kombination mit M4 bzw. S2 zusätzlich 8β-OH-Costunolid entstand. Die Identität von Inunolid muss noch durch NMR Studien abschließend bestätigt werden. Die Ergebnisse der Verteilung der Produkte und der "Wanderung" der Metabolite durch die nachfolgenden Stufen des Stoffwechselweges sind in (Tab. 27) zusammengefasst. Die zugrundeliegenden Daten sind im (Anhang 7.5) dargestellt. Im *N. benthamiana* System waren teilweise quantitativ relativ starke Schwankungen der Produktmenge innerhalb der biologischen Wiederholungen zu beobachten (Anhang 7.5). Die STL lagen zu weniger als 1 % als freie Verbindungen vor. Hydroxylierte Sesquiterpenlactone waren in der freien Form nicht nachweisbar. Innerhalb der derivatisierten STL war für alle detektierten Verbindungen deutlich mehr Cystein-Addukt (77-97 %) als Glutathion-Addukt (3-23 %) nachweisbar. Im Rahmen der Expressionsversuche wurden neben den Kontrollgruppen "Wildtyp" und [p19/DXS] zahlreiche weitere Kontroll-Ansätze durchgeführt (S 12).

Tab. 27: In Extrakten von transient transformierten *N. benthamiana* Blättern nachgewiesene Metabolite – Stoffwechsel Rekonstruktion

Metabolite	In *N. benthamiana* [a] exprimierte Gene									
	Wildtyp	p19/DXS	p19/DXS+HaGAS1	p19/DXS+HaGAS1+**HaGAO**	p19/DXS+HaGAS1+HaGAO+**LsCOS**	p19/DXS+HaGAS1+HaGAO+**M4**	p19/DXS+HaGAS1+HaGAO+**LsCOS+M33**	p19/DXS+HaGAS1+HaGAO+**HaG8H**	p19/DXS+HaGAS1+HaGAO+**HaG8H+S2**	p19/DXS+HaGAS1+HaGAO+**HaG8H+M4**
Germacren A [b]	- [c]	-	**+++** [d]	-	-	-	-	-	-	-
Germacren A Säure	-	-	-	**++** [e]	-	-	-	-	-	-
8β-OH-Germacren A Säure	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Costunolid	-	-	-	-	**(+)**	**(+)**	**(+)**	-	-	**(*)**
Costunolid-Cystein	-	-	-	-	**+++**	**+++**	**+++**	-	-	**+++**
Costunolid-GSH	-	-	-	-	**++**	**+++**	**++**	-	-	**++**
8β-OH-Costunolid	-	-	-	-	-	-	-	-	**(*)**	**(*)**
8β-OH-Costunolid-Cystein	-	-	-	-	-	-	-	-	**++** [e]	**++**
8β-OH-Costunolid-GSH	-	-	-	-	-	-	-	-	**+** [e]	**+**
14-OH-Costunolid	-	-	-	-	-	-	**(*)**	-	-	-
14-OH-Costunolid-Cystein	-	-	-	-	-	-	**+++**	-	-	-
14-OH-Costunolid-GSH	-	-	-	-	-	-	**+**	-	-	-
Inunolid	-	-	-	-	-	-	-	**(+)**	**(*)**	**(*)**
Inunolid-Cystein	-	-	-	-	-	-	-	**+++**	**++** [e]	**++**
Inunolid-GSH	-	-	-	-	-	-	-	**+++**	**+** [e]	**+**

[a] HaGAS1: *Helianthus annuus* Germacren A Synthase 1, HaGAO: *Helianthus annuus* Germacren A Oxidase, LsCOS: *Lactuca sativa* Costunolid Synthase, HaG8H: *Helianthus annuus* Germacren A Säure 8β-Hydroxylase

[b] Germacren A wurde mittels GC-MS nachgewiesen, andere Metabolite mit LC-MS

[c] **-** : nicht durch GC-MS oder LC-MS detektiert. (*) Nicht detektiertes postuliertes Ausgangsprodukt von detektieren Addukten.

[d] **+** : Metabolite wurden nachgewiesen durch GC-MS oder LC-MS, **+** bis **+++** relative Menge der nachgewiesenen Metabolite, **(+)** Spuren detektiert

[e] Es wurden zusätzlich zu den Produktpeaks noch Peaks putativer Umlagerungsprodukte detektiert. Ein eindeutige Zuordnung konnte aufgrund fehlender Referenz-Substanzen nicht erfolgen.

3.4 Expressionsmuster von Enzymen der Sesquiterpenlacton-Biosynthsese

Im Rahmen der Methodenetablierung konnte mit dem Elongationsfaktor 1α ein Referenzgen mit sehr hoher Expressionskonstanz für die Analyse der jungen Primordien-Stadien gefunden werden (siehe auch 2.5.3.4, und Anhang S20) .Die Expressionsmuster der an der STL Biosynthese beteiligten Enzyme (HaGAO, HaG8H, M4, M33) in der Entwicklung junger Sonnenblumen-Keimlinge zeigten einen deutlich unterschiedlichen Verlauf in verschiedenen Geweben. Die relative, auf Referenzgene normalisierte Expression (RNE, ΔΔCq) zeigte in Kotyledonen und Wurzeln (Daten für Referenzgene und HaGAO aus MSc Arbeit Schmauder 2015) kaum Veränderungen im Vergleich zum Ausgangs-Stadium (48h) (Abb. 22). In diesen Geweben sind keine Drüsenhaare vorhanden. Es konnte zwar eine Expression der Gene nachgewiesen werden, aber insgesamt auf sehr niedrigem Niveau und ohne signifikanten Unterschiede im Hinblick auf Entwicklungsstadien. Eine Zeitreihe von im Dunkeln gekeimten Samen (0 h, 6 h , 12 h, 24 h, nicht dargestellt) zeigte, dass die Expression von HaGAO und HaG8H höher war als in Wurzeln und Kotyledonen. Die Expression der STL Synthesegene und der Enzym-Kandidaten verblieb bei den Blatt-Primordien zwischen dem ersten und dritten Tag nach der Keimung auf niedrigem Niveau und nahm dann am vierten und fünften Tag drastisch zu. Die Zunahme aller 4 getesteten Gene korrelierte mit der Ausbildung der mit STL gefüllten Cuticularblase bei den köpfchentragenden Drüsenhaaren, wenngleich es deutliche Unterschiede in der Intensität gab. Ebenfalls untersucht wurde die Expression in Hochblättern bzw. Brakteen aus denen Kandiadt M4 isoliert wurde. M4 zeigte hier auch tatsächlich gesteigerte Expressions Werte (nicht dargestellt). Das Expressionsmuster von S2 wurde noch nicht getestet.

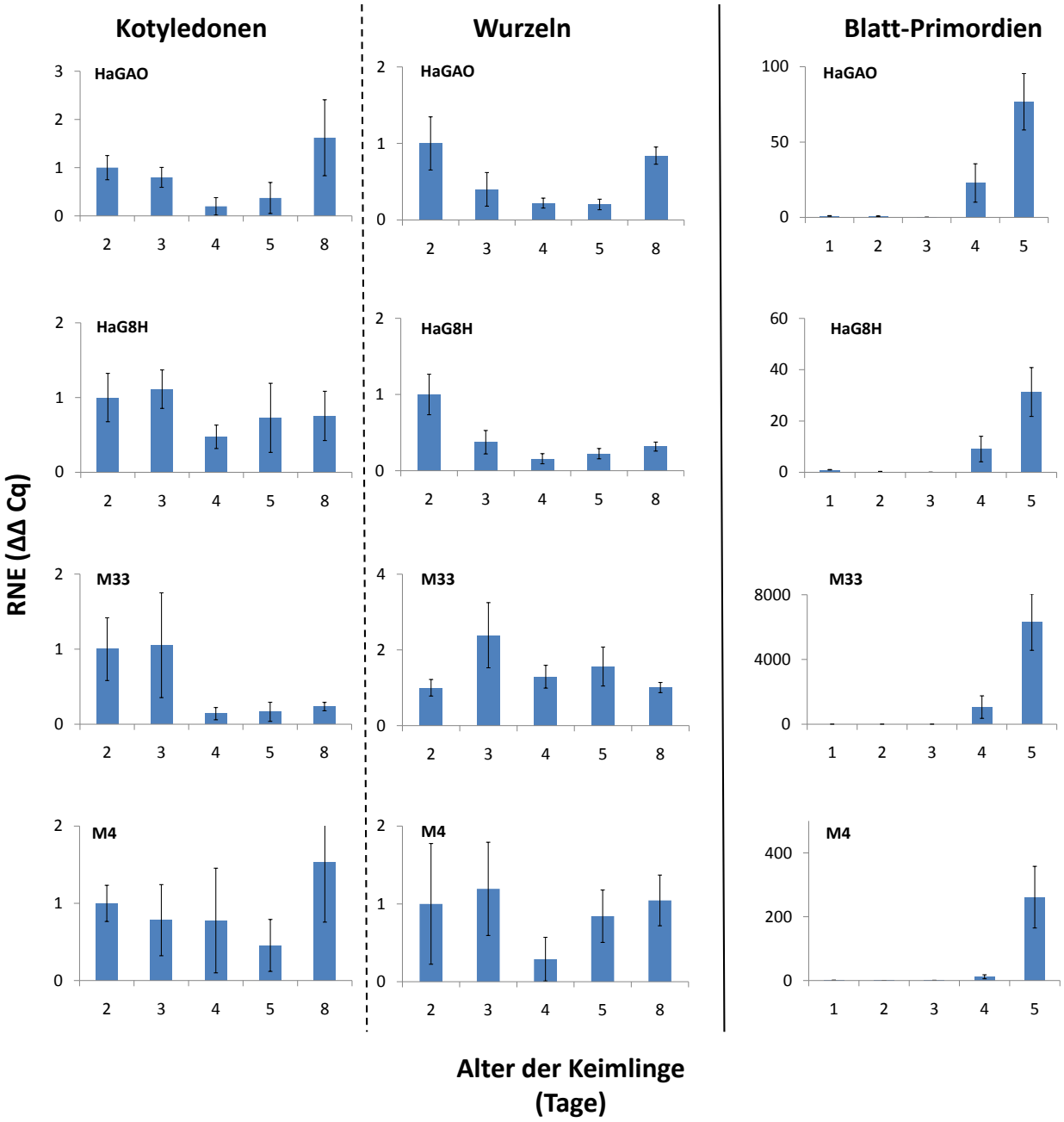
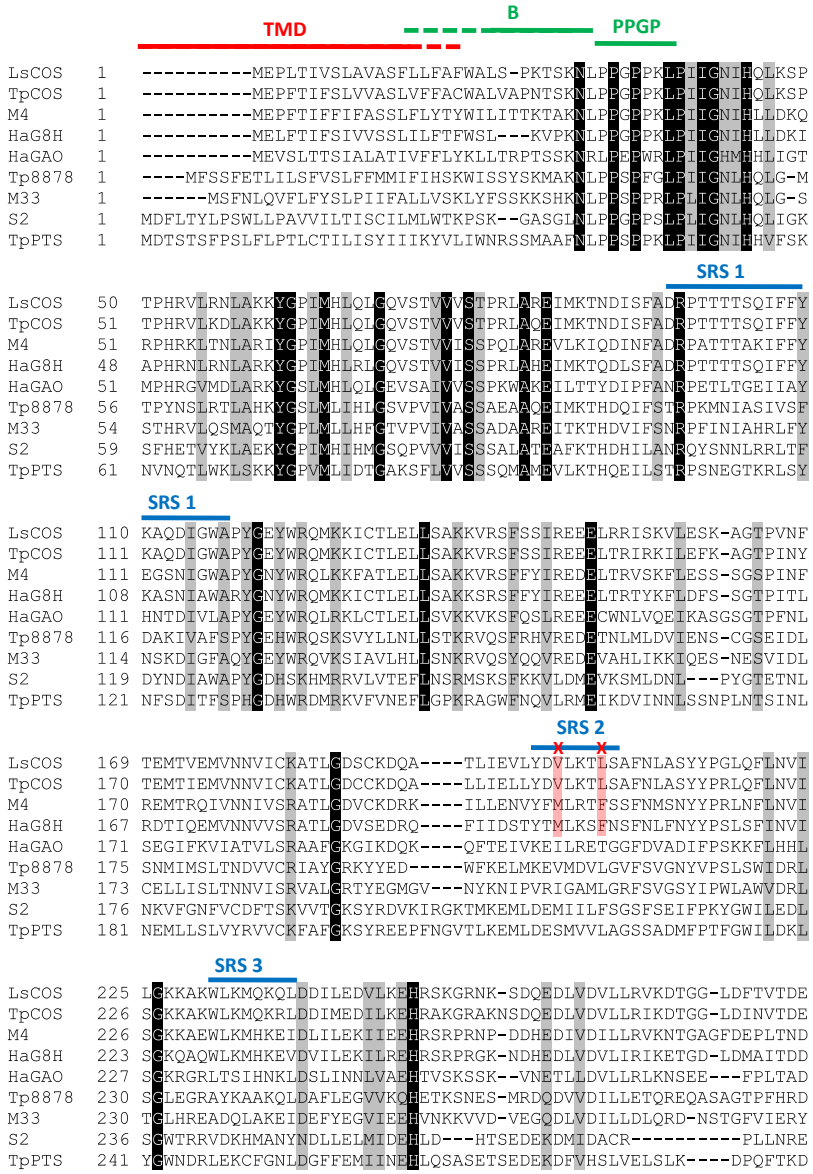


Abb. 22: Expression von Sesquiterpenlacton Enzymen in der Entwicklung von Keimlingen

Die relative, normalisierte Expression (RNE, bzw. ΔΔCq; bezogen auf Referenzgen EF1α) ausgewählter Gene des STL Stoffwechsels sowie der Kandidatengene M4 und M33. Bei Wurzeln und Kotyledonen wurde cDNA von *Helianthus annuus* cv. HA300 Keimlingen im Alter von 2 d bis 8 d verwendet. cDNA Templates von Wurzel- und Kotyledonen Stadien sowie Werte für Expression von HaGAO, HaAct und HaTub in Wurzeln und Kotyledonen nach Schmauder (2015). Blatt-Primordien Proben wurden aus einer separaten Anzucht extrahiert. Relative Expression in Bezug auf das jeweils jüngste Stadium ist gezeigt (1d für Primordien und 2d für Kotyledonen, Wurzeln) HaGAO: *Helianthus annuus* Germacren A Oxidase, HaG8H *Helianthus annuus* Germacren A Säure 8β-Hydroxylase, Fehlerbalken: Standardfehler

3.5 Struktureller Vergleich der Cytochrom P450 Enzyme

Im Aminosäure-Alignment zeigten sich die für Cytochrom P450 Enzyme typischen konservierten Sequenzmotive sowie die Transmembrandomäne (TMD) (Abb. 23). Die Zuordnung der sechs Substrat-Erkennungsdomänen (SRS) erfolgte im Alignment entsprechend den Angaben von Ikezawa et al. (2011), bzw. Gotoh (1992). Mit roten Kreuzen markiert und rot unterlegt sind die in bei Ikezawa et al. (2011) definierten, zwischen LsCOS und HaG8H variablen Aminosäuren, die bei der Homologie-Modellierung innerhalb eines Radius von 5 Å vom Substrat positioniert wurden. Die Markierung wurde für die in derselben Unterfamilie befindlichen Enzyme M4 und TpCOS übernommen. Innerhalb der Substrat-Erkennungsregionen wies M4 höhere Ähnlichkeit zu HaG8H als zu den bekannten Costunolid-Synthasen auf.



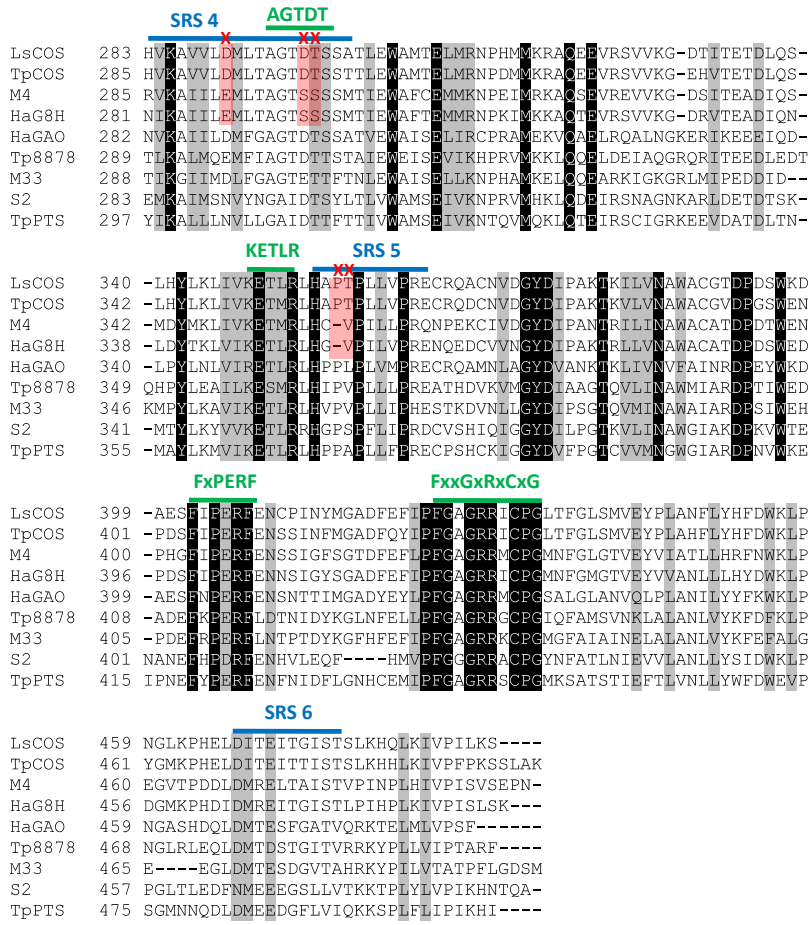


Abb. 23 Aminosäure Alignment der am Sesquiterpenlacton Stoffwechselweg beteiligten P450 Enzyme

Aminosäuresequenzen bekannter und neu charakterisierter Enzyme mit Markierung bestimmter Strukturelemente: rot, Transmembrandomäne (TMD); grün, Cluster basischer Aminosäuren (B); Prolin-reiches PPGP Motiv; AGTDT (Sauerstoff-Bindung); KETLR, FxPERF, FxxGxRxCxG (Häm-Bindedomäne); SRS1-SRS6 Substrat-Erkennungsdomänen (*substrate recognition sites*). Rote Kreuze und rot unterlegte Aminosäuren: Aminosäuren, die bei LsCOS und HaG8H am nächsten am Substrat lokalisiert sind (Ikezawa et al. 2011). LsCOS *Lactuca sativa* Costunolid Synthase, TpCOS *Tanacetum parthenium* Costunolid Synthase, HaG8H *Helianthus annuus* Germacren A Säure 8β-Hydroxylase, HaGAO *Helianthus annuus* Germacren A Oxidase, Tp8878 3β-Oxidase von *Tanacetum parthenium* (hydroxyliert Costunolid und Parthenolid) TpPTS: *Tanacetum parthenium* Parthenolid-Synthase.

3.6 Phylogenetische Einordnung der charakterisierten Cytochrom P450 Enzyme

Die drei Enzym Kandidaten, bei denen die Bildung neuer Produkte festgestellt werden konnte, ließen sich im Kontext der Verwandtschaft zu anderen Enzymen aus dem STL-Stoffwechselweg in verschiedene Cytochrom P450 Enzymfamilien einordnen (Abb. 24). Der Enzym-Kandidat M4, bei dem eine Bildung von Costunolid beobachtet werden konnte, ist aufgrund von Sequenzähnlichkeit in der Unterfamilie CYP71BL einzuordnen, und hatte größere Sequenz-Übereinstimmungen mit HaG8H als mit bekannten Costunolid Synthasen anderer Pflanzen. Kandidat M33, eine Costunolid 14-Hydroxylase hatte 53 % Aminosäure Übereinstimmung mit Tp8878, der Costunolid/Parthenolid 3β-Hydroxylase von *Tanacetum*. Enzym Kandidat S2 hatte 47 % Aminosäure Übereinstimmung mit der Parthenolid-Synthase von *Tanacetum*. Die Übereinstimmung von 55 % die für die Einordnung in eine Unterfamilie definiert ist, wurde in beiden Fällen nicht erreicht.

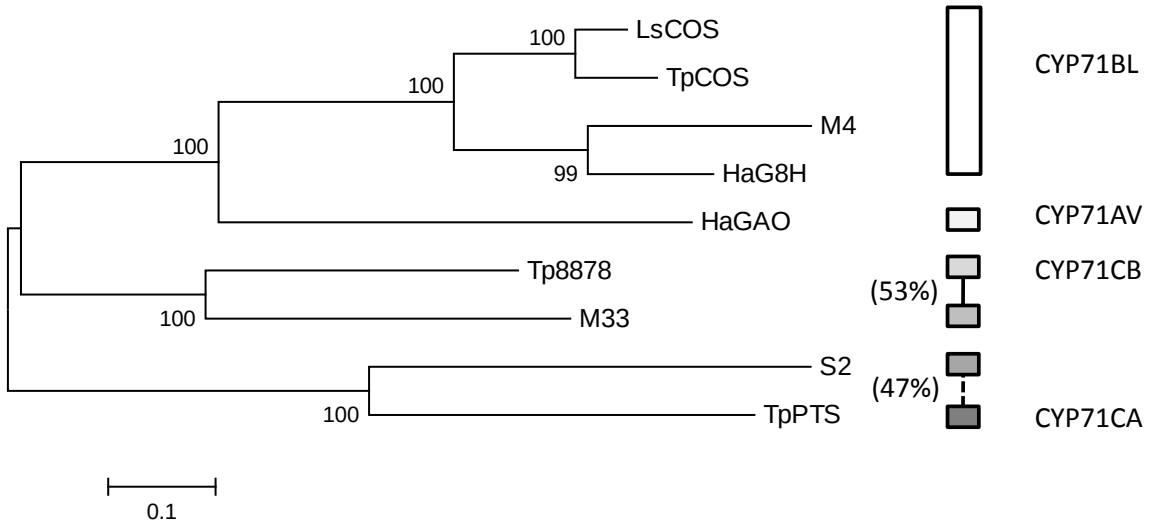


Abb. 24: Phylogenie zur Einordnung neuer Enzyme

Phylogenetische Einordnung der in der vorliegenden Arbeiten charakterisierten, sowie ausgewählter aus dem STL Stoffwechselweg charakterisierter Cytochrom P450 Enzyme mit Bootstrap Werten. Die Einordnung in den entsprechenden Cytochrom P450 Unterfamilien ist auf der rechten Seite angegeben. In den Fällen von S2 und M33 ist der prozentuale Wert der Aminosäure Identität angegeben. LsCOS *Lactuca sativa* Costunolid Synthase, TpCOS *Tanacetum parthenium* Costunolid Synthase, HaG8H *Helianthus annuus* Germacren A Säure 8β-Hydroxylase, HaGAO *Helianthus annuus* Germacren A Oxidase, Tp8878 3β-Oxidase von *Tanacetum parthenium* (hydroxyliert Costunolid und Parthenolid) TpPTS: *Tanacetum parthenium* Parthenolid-Synthase. Phylogenie anhand der abgeleiteten Aminosäure-Sequenzen, Methode: Maximum Likelihood, 1000 Bootstraps, Aminosäure-Substitutions-Modell: Poisson. Die Zahlen an den Verzweigungen stellen *Boostrap*-Werte dar.

3.7 Einordnung von Cytochrom P450 Enzymen und Terpensynthasen im Genom von *Helianthus annuus*

Die am STL Stoffwechselweg beteiligten Enzyme, sowie uncharakterisierte Cytochrom P450 Enzym Kandidaten wurden nach Abschluss der Charakterisierungsversuche (Stand September 2016) mit dem zwischenzeitlich vom Compositae Genome Project unter www.sunflowergenome.org veröffentlichten Genom des Sonnenblumen-Kultivars HA412 über BLAST Suchläufe abgeglichen. In einigen Fällen konnte keine komplette, aber dennoch sehr hohe Übereinstimmung gefunden werden, wahrscheinlich aufgrund von Unterschieden zu dem in dieser Arbeit bearbeiteten Kultivar HA300 oder posttranskriptionalen Modifikationen. Bei den Genen, die zugeordnet werden konnten, ist die Position auf dem jeweiligen Chromosom der Sonnenblume in Abb. 23 angezeigt. Allgemein sind die STL-Biosynthesegene relativ gleichmäßig über das Genom verteilt. HaGAS1 und HaGAO liegen scheinbar in zwei identischen Kopien vor. Es zeigte sich eine Region im Chromosom 5, in der sich fünf der Kandidatengene befinden (Abstände: M33/C100: 15 Mio. bp, C100/S3: 0,2 Mio. bp, S3/C28B: 12 Mio. bp; C28B/C28: 0,1 Mio. bp).

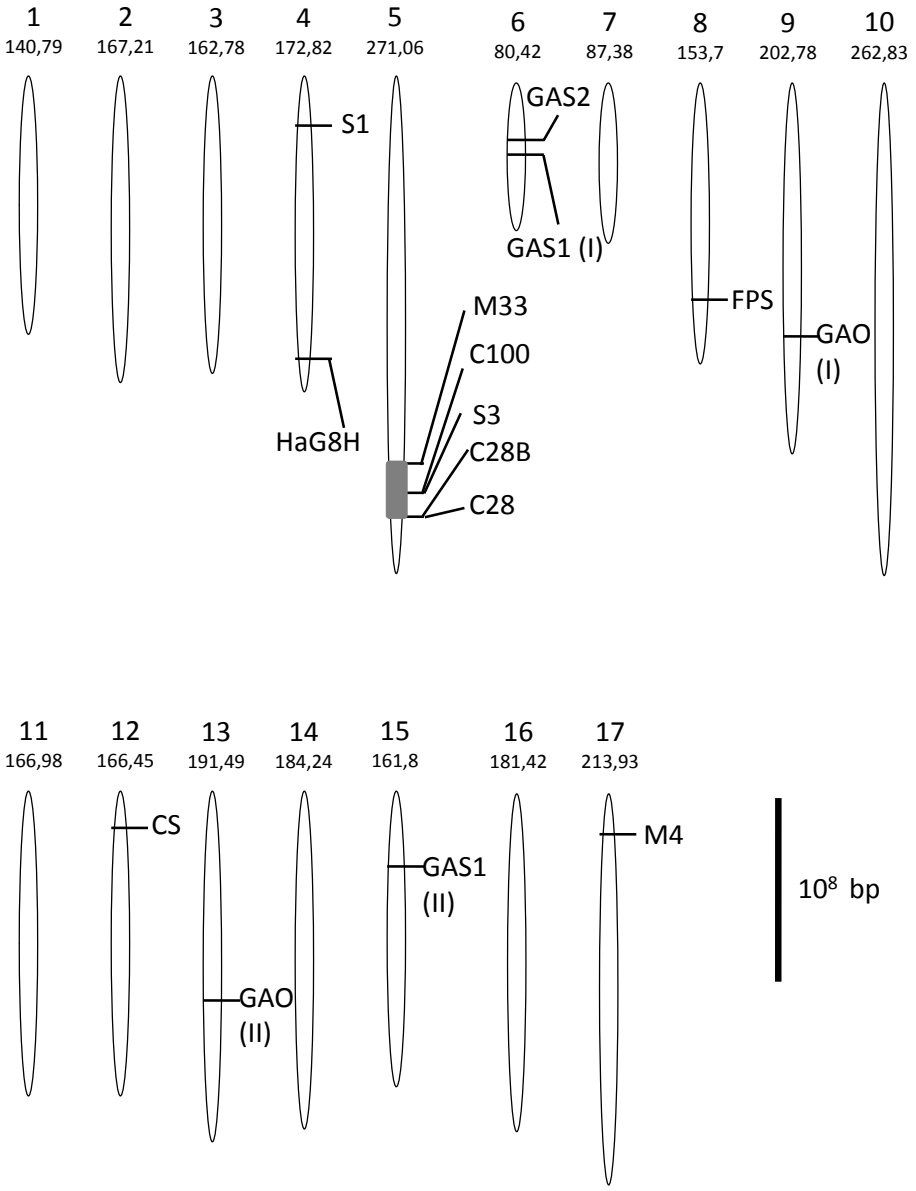


Abb. 25: Verteilung ausgewählter Enzyme und Kandidaten über das Genom von *Helianthus annuus*

Die 17 Chromosomen des Genoms von *H. annuus* sowie die Zuordnung ausgewählter Enzyme und Enzym-Kandidaten. Unter der Nummer des Chromosoms ist die Größe (in 10^6 bp) angegeben. Grau hinterlegt ist eine Region auf Chromosom 5, in der mehrere Enzymkandidaten in relativer Nähe positioniert sind. Wenn ein Gen in mehreren Kopien im Genom vorliegt, ist dies mit römischen Ziffern (I-II) dargestellt. Angaben über die Größe der Chromosomen und Sequenzabgleich aus (www.sunflowergenome.org, "HA412 *bronze assembly*"). Terpensynthasen, auf Chromosom zugeordnet: FPS (Farnesylpyrophosphat-Synthase), GAS1 (Germacren A Synthase 1), GAS2 (Germacren A Synthase 2), CS (Cadinen Synthase), Cytochrom P450 Enzyme und Enzymkandidaten, auf Chromosom zugeordnet: GAO (Germacren A Synthase), HaG8H (Germacren A Säure 8β-Hydroxylase), Enzymkandidaten S1, S3, C28, C100, C28B, M4, M33. Nicht eindeutig auf einem Chromosom zugeordnet werden konnten: HaGAS3 (Germacren A Synthase 3), Bisabolen Synthasen K7 und K11, Cytochrom P450 Kandidaten S2, M19, M22A, M22B.

4 Diskussion

4.1 Suche nach neuen Cytochrom P450 Enzymen

Bei der Suche nach neuen Cytochrom P450 Enzymen wurden zum Teil Kandidaten aus einer vorangegangenen Arbeit (Ikezawa et al. 2011) re-evaluiert, zum Teil wurden Genfragmente von P450 Enzymen aus einer öffentlich zugänglichen Sonnenblumen Transkriptom-Datenbank (Heliagene) herausgefiltert und über RACE Experimente die offenen Leserahmen von Cytochrom P450 Enzymen ermittelt. Zur weitergehenden Aufklärung von STL-Stoffwechselwegen in verschiedenen Geweben der Sonnenblume werden in der Zukunft vergleichende Transkriptom Analysen verschiedener Gewebestadien und Behandlungstypen einen wichtigen Beitrag leisten können. Bei der Auswahl von P450 Kandidatengenen hat sich eine phylogenetische Einordnung zur Abschätzung der Enzymfunktion, sowie die Begrenzung der Enzymkandidaten auf P450 Enzyme der CYP71 Familie als zielführend erwiesen.

4.2 Stoffwechsel-Rekonstruktion durch heterologe Expression

Bei der Aufklärung neuer Enzyme entwickelt sich ein stetig wachsender Pool an *in vitro* und *in vivo* Systemen, die verschiedene Vor- und Nachteile mit sich bringen. Die Expression von Sesquiterpen-Synthasen in *E. coli* wird oft zur Überexpression und Aufreinigung der Enzyme für *in vitro* Charakterisierungen verwendet (Göpfert et al. 2009; Pickel et al. 2012; Kwon et al. 2014). Die Expression pflanzlicher Cytochrom P450 Enzyme in *E. coli* ist in der überwiegenden Zahl der Fälle problematisch, kann aber unter anderem durch Modifikationen des Enzyms, wie Codon-Optimierung und Manipulation der Transmembrandomäne, verbessert werden (Chang et al. 2007). Yu et al.(2011) führten eine suboptimale Umsetzung von α-Humulen durch CYP71BA1 in *E. coli* auf einen unzureichenden Transfer des hydrophoben Substrates zu dem Enzym zurück. *E. coli* ist daher als System für die Aufklärung eines Stoffwechselweges mit mehreren P450 Enzymen, die möglichst nativ exprimiert werden sollten, eher ungeeignet. Für die spätere Etablierung einer effizienten Produktions-Plattform eines gewünschten hochwertigen Produktes mit Hilfe bereits charakterisierter Enzyme kann der Transfer in das *E. coli* System aber durchaus sinnvoll sein, wie das Beispiel von Chang et al. (2007) zeigt.

Ein hervorragendes Expressions-System für die Rekonstruktion eines pflanzlichen Stoffwechselweges mit Terpensynthasen und P450 Enzymen ist die Expression in Hefe (Pateraki et al. 2015). Die Expression in Hefe ermöglicht sowohl einfache Transformation, Expression und Hochskalierung, und gewährleistet zugleich die Lokalisation des P450 Enzyms in der Membran des ER (Pateraki et al. 2015). Die Rekonstruktion komplexer Terpenoid-Stoffwechselwege mit dem Einbau

von bis zu 21 Genen konnte in Hefe bereits realisiert werden (Brown et al. 2015). Ro et al. (2006) entwickelten mit EPY300 einen für die Produktion von Sesquiterpen-Derivaten optimierten Hefe-Stamm. EPY300 produziert, induziert durch die Zugabe von Galaktose, hohe Mengen an FPP als Ausgangssubstrat für nachgeschaltete Reaktionen (Ro et al. 2006). Dieses System wurde für die vorliegende Arbeit übernommen und für das effiziente Testen der zahlreichen Enzymkombinationen durch einen Mikro-Expressionsansatz modifiziert (die dabei involvierten Stoffwechsel-Optimierungen werden in Kapitel (4.4) diskutiert). Für die Aufklärung der STL Stoffwechselwege verschiedener Asteraceae war die *in vivo* Expression in Hefe bislang die Standardmethode (Ro et al. 2006; Ikezawa et al. 2011; Liu et al. 2011; Eljounaidi et al. 2014; Liu et al. 2014).

In den letzten Jahren wurden eine Reihe weiterer Expressions-Systeme für Expressionsstudien von Terpenoid-Stoffwechselwegen oder die Hochskalierung der Metabolite entwickelt. Cytochrom P450 Enzyme wurden in Cyanobakterien exprimiert um so direkt die energiereichen Elektronen aus der Photosynthese zu nutzen (Englund et al. 2015; Wlodarczyk et al. 2016). Ein neues Transformations-System erlaubt des weiteren die Expression von Sesquiterpen Stoffwechselgenen in dem Moos *Physcomitrella patens* (King et al. 2016). Fuentes et al. (2016) transformierten *Nicotiana tabacum* (Kultur-Tabak) mit den Genen des Artemisininsäure Syntheseweges. Der Stoffwechselweg wurde dabei dauerhaft in das Chloroplastengenom eingebracht, interessanterweise trat hier nicht die glycosylierte Version von Artemisininsäure, wie bei der Expression in *N. benthamiana,* auf (siehe 4.3).

Die Expression in *N. benthamiana* hat den Vorteil, dass ohne hohen Aufwand Synthesewege mit vielen beteiligten Enzymen getestet werden können. Beispielsweise berichtete Liu (2013) von der gleichzeitigen funktionellen Expression von 15 Genen in *N. benthamiana*. Des weiteren *bietet N. benthamiana* eine natürlichere zelluläre Umgebung für pflanzliche Enzyme im Vergleich zum Hefe Expressions-System (Bach et al. 2014). Das System sollte daher in der vorliegenden Arbeit parallel zum Hefesystem eingesetzt werden.

4.3 Nachweis der Enzymprodukte

Eine der Herausforderungen bei der Rekonstruktion von langen Stoffwechselwegen mit vielen Nebenprodukten ist der Nachweis der entstandenen Enzymprodukte, da sie einen hohen analytischen Aufwand mit sich bringt. In der vorliegenden Arbeit wurden im Wesentlichen drei Nachweisstrategien verfolgt, deren Anwendung und Limitierungen nachfolgend diskutiert wird. Eine Auflistung der detektierten Verbindungen und deren Zuordnung ist im Anhang (S 2und S 4) zu finden.

Kategorie 1: Spektroskopische Strukturaufklärung

Eine Strukturaufklärung mittels MS^2-Spekreoskopie verknüpft mit NMR-Spektroskopie, ist der sicherste, aber auch aufwändigste Nachweis, da er Milligramm-Mengen an Reinsubstanz erfordert. Die Aufreinigung des Enzymproduktes zur Strukturaufklärung setzt ein breites Repertoire an Trenntechniken von der Dünnschichtchromatographie (DC) und Säulenchromatographie (Costus-Säuren bzw. Germacren A Säure bei Nguyen et al. (2010)) bis zur HPLC (8β-Hydroxy-Germacren A Säure bei Ikezawa et al. (2011)) voraus. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Substanzreinigung nach Detektion der Zielsubstanzen in analytischen HPLC-Läufen durch Fraktionierung aus zahlreichen Läufen im selben Trennsystem. Dies war zeitsparender als ein Upscaling auf präparative Säulendimensionen. Zur Vermeidung einer Säure-induzierten Umlagerung der Produkte während des Aufreinigungsprozesses erwiesen sich die in (2.3.3.2.) beschriebenen Vorsichtsmaßnahmen als geeignet.

Kategorie 2: Abgleich mit Referenz-Substanzen

Eine weitere Möglichkeit zur Substanzidentifikation ist der Abgleich mit Referenzsubstanzen, der jedoch durch deren Verfügbarkeit limitiert ist. Da es sich bei Enzymprodukten oft um Intermediate eines vielstufigen Stoffwechselweges handelt, ist es schwer, diese aus einer natürlichen Pflanzenquelle zu gewinnen. Nur im Falle von Costunolid war eine kommerziell verfügbare Referenz-Substanz vorhanden. Die Entstehung von Costunolid in der Kombination von HaGAO, HaG8H und Kandidat M4 im Hefe-Expressions-System konnte somit neben der spektroskopischen Identifikation (MS^2,NMR) auch über den Abgleich mit einer Referenz-Substanz abgesichert werden. Verschiedene hydroxylierte Varianten von Sesquiterpenlactonen lagen in Form von aufgereinigten Referenzsubstanzen aus Pflanzenmaterial vor. Für den Abgleich von *in planta* entstandenen Cystein- und Glutathion-Addukten von Costunolid, 8β-Hydroxy-Costunolid und 14-Hydroxy-Costunolid konnten synthetische Addukte als Referenz selbst hergestellt werden. Die einzige über GC-MS nachgewiesene Substanz Germacren A (bzw. β-Elemen) konnte über einen Abgleich des MS^2-Musters mit einer Datenbank abgesichert werden.

Kategorie 3: Massenspektren, Laufzeiten und Kombinatorik der Enzyme

Insbesondere bei den Ansätzen der *in planta* Expressionsstudien ergab sich eine enorme Anzahl an Enzym- und Umlagerungsprodukten. Die Anwesenheit/Abwesenheit von Substanzpeaks in bestimmten Enzymkombinationen gepaart mit der HPLC-Laufzeit und Masse ließen die Annahme bestimmter Produkte zu. Dennoch, auch wenn die vorgeschlagenen Verbindungen sich logisch in das Stoffwechselschema einfügen, kann die Aufklärung dieser Verbindungen noch nicht als gesichert angesehen werden. Aufgrund fehlender Verfügbarkeit von Referenzsubstanzen und deutlicher

Unterschiede in mikrobiellen Expressions-Systemen müssen in einigen Fällen (z.B. bei Inunolid) künftige Experimente mit einer größeren Zahl transformierter *N. benthamiana* Pflanzen durchgeführt werden, um ausreichende Mengen an Enzymprodukten für eine vollständige Strukturaufklärung mittels NMR zu erhalten. Weitere Modifikationen des Stoffwechselweges *in planta* wie in (4.4) diskutiert, könnten die Ausbeute an Enzymprodukten erhöhen und die Aufarbeitung einer ausreichenden Menge an Enzymprodukt erleichtern. Andersen-Ranberg et al. (2016) extrahierten die Blätter von über 30 Vakuum infiltrierten *N. benthamiana* Pflanzen, um eine für NMR-Analysen ausreichende Produktmenge zu erreichen. Da es sich im Projekt von Andersen-Ranberg et al. (2016) um einen kürzeren Stoffwechselweg mit nur zwei Enzymen handelte, sollten hier deutlich mehr Pflanzen eingeplant werden.

Umlagerungs- und Nebenprodukte

Verschiedene Prozesse können in den heterologen Expressions-Systemen zu Umlagerungs-Reaktionen und Nebenprodukten führen. In der vorliegenden Arbeit wurden die entsprechenden Umlagerungsreaktionen in sechs Kategorien (**a**-**f**) eingeteilt: Im Tabak-Expressions-System beobachtet wurden die Addition von Cystein (**a**) und Glutation (GST) (**b**). Hitze-induzierte Cope-Umlagerungsreaktionen (**c**) wurden bei der GC-MS Analyse von Germacren A beobachtet. Säure-induzierte Umlagerung in Costus-Säure-Derivate mit α-(**d**) β- (**e**), oder γ-Konfiguration (**f**) (Siehe Abb. 3, Abb. 4), wie für die Expression in ungepufferten Hefekulturen beschrieben (Nguyen et al. 2010; Ikezawa et al. 2011) wurden hier auch im Tabak-Expressions-System beobachtet. Aus der Kombination von Säure-induzierter Umlagerung und Additionsreaktion ergeben sich beispielsweise für 8β-Hydroxy-Costunolid (**12**) im Tabak Expressions-System sechs Derivate: Säure-Induzierte Umlagerung des Cystein Adduktes in der α-**(12a**-**d**) β- (**12a**-**e**), oder γ-Konfiguration (**12a**-**f**), bzw. des Glutathion Adduktes (**12b**-**d**), (**12b**-**e**), (**12b**-**f**). Es liegen keine Referenzsubstanzen dieser Umlagerungsprodukte vor; nur eine Aufreinigung der Substanzen aus transformierten Tabak-Blättern für eine Strukturaufklärung mittels NMR kann die endgültige Bestätigung für die strukturelle Zuordnung der Produktpeaks liefern. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen die von Liu et al. (2011; 2014) beobachtete Addition von Glutathion bzw. Cystein an STL des α-Methylen-γ-Lacton-Typs. Liu et al. (2011) definierten die STL-Cystein-Addukte (**a**) als Abbauprodukte der STL-Glutathion-Addukte (**b**) und postulierten eine enzymatische Reaktion über die Glutathion-S-Transferase mit anschließendem Transport der Addukte in die Vakuole, obgleich die Additionsreaktion auch spontan ablaufen kann. Dieser Effekt ist wahrscheinlich auch deshalb nicht im Hefe Expressions-System aufgetreten, da in diesem System die STL aus der Hefezelle in das Kultur-Medium ausgeschieden werden. In der Sonnenblume liegen die STL entweder in sehr geringen Konzentrationen im Gewebe

vor oder werden effektiv nach der Bildung in die Cuticularblase sekretiert, weswegen wahrscheinlich noch keine STL-GSH Addukte in *Helianthus* gefunden wurden.

Eine weitere Möglichkeit der Bildung von Nebenprodukten in Form der Einlagerung von Wasser nach der Säure-induzierten Umlagerung, wie von Nguyen et al. (2011) für die Entstehung von Ilicic Säure beschrieben, konnte im Verlauf dieser Arbeit nicht beobachtet werden. Nicht nur Sesquiterpene des Germacradien-Typs zeigen Säure-induzierte Umlagerungsreaktionen, auch bei Kunzeaol, dem Hauptprodukt von TgTPS2 von *Thapsia garganica* bilden sich in ungepufferten Hefekulturen mehrere Umlagerungsprodukte (Pickel et al. 2012).

Bei der *in planta* Stoffwechsel-Rekonstruktion von Artemisinin-Säure, einem Sesquiterpen ohne α-Methylen-γ-Lacton-Gruppe konnten van Herpen et al. (2010) Artemisininsäure-12-β-Diglucosid detektieren, welche sie auf endogene Glycosyl-Transferasen von *N. benthamiana* zurückführten. Es scheinen also bei *N. benthamiana* verschiedene Entgiftungs-Strategien zu existieren, die die pflanzliche Zelle vor der Schädigung mit den künstlich eingebrachten Metaboliten schützen. Germacren A Säure ist strukturell ähnlich zu Artemisininsäure, Nguyen et al. (2010) zeigten die Umsetzung von Amorphadien zu Artemisininsäure durch HaGAO. Es wäre sinnvoll in zukünftigen *in planta* Studien zu testen, ob auch Germacren A Säure und Costus Säuren über diesen Mechanismus glycosyliert werden.

4.4 Stoffwechsel-Rekonstruktion- Möglichkeiten der Optimierung

Ro et al. (2006) erzeugten mit EPY300 einen Hefe-Stamm, bei dem, induziert durch die Zugabe von Galaktose, der metabolische Fluss zur verstärkten Produktion von FPP gelenkt wird. Dies wurde durch eine Reihe von Modifikationen im Mevalonat-Weg erreicht, der in Hefe IPP und DMAPP für die Produktion von Terpenverbindungen bereitstellt. Unter anderem wurden zwei Kopien einer modifizierten 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase (HMGR) unter einem Galaktose-induzierbaren Promotor eingeführt (Ro et al. 2006). Im Gegensatz zu Hefezellen steuern in pflanzlichen Zellen allerdings sowohl der MVA- als auch der MEP-Weg Isopren-Einheiten für den Sesquiterpen-Metabolismus bei (Eisenreich et al. 2001, Schramek et al. 2010; Lipko & Swiezewska 2016). In der vorliegenden Arbeit wurde bei der Stoffwechselrekonstruktion in Tabak der plastidäre MEP-Weg durch Überexpression von DXS verstärkt. Liu et al. (2014) erzielten eine vierfache Ausbeute an Costunolid durch Verstärkung des MVA-Weges durch Überexpression von AtHMGR. Eine äußerst spannende Frage für zukünftige Versuche ist, ob eine Kombination der Überexpression von Enzymen sowohl des plastidären MEP-Weges, als auch des mitochondrialen MVA-Weges zu einer weiter gesteigerten Produktbildung bei der Stoffwechselrekonstruktion von Sesquiterpenen im Tabak System führen kann. Durch Überexpression der GGPPS (Geranylgeranyl Diphosphat Synthase) kann die Ausbeute von Sesquiterpenlactonen im Tabak-Expressionssystem verstärkt werden (Dr. I.

Pateraki, Prof. H.T. Simonsen, pers. Information). Der Einbau von GGPPS zeigte im vorliegenden Fall aber keine Steigerung der Ausbeute (Daten nicht gezeigt). In zukünftigen Arbeiten sollte zudem die Expression der Paraloge HaGAS2 und HaGAS3 in Tabak getestet werden um zu herauszufinden, welches Enzym in der "natürlichen" Umgebung der pflanzlichen Zelle die höchste Produktion von Germacren A Säure liefert. Sinnvoll könnte es sein HaGAS1-3 mit einer mitochondrialen Signalsequenz zu fusionieren, dies führte bei Liu et al. (2011) zu einer 15-fachen Steigerung der Produktion von Germacren A durch TpGAS. Eine weitere Möglichkeit zur Verbesserung der Expression eines Sesquiterpen Stoffwechselweges in *N. benthamiana* wäre durch RNAi silencing den metabolischen Fluss durch konkurrierende Stoffwechselwege zu unterbinden (Cankar et al. 2015).

4.5 *Helianthus annuus* Germacren A Säure 8β-Hydroxylase: Lacton-Bildung bei der Expression in Tabak

Das Enzym HaG8H setzt in Hefe Germacren A Säure in 8β-Hydroxy-Germacren A Säure um (Ikezawa et al. 2011). Während in der Hefe-Kultur im Anschluss an die 6α-Hydroxylierung von Germacren A Säure durch LsCOS eine spontane Cyclisierung zum 6,7 trans-Lacton erfolgt, findet im Anschluss an die 8β-Hydroxylierung keine spontane Cyclisierung zum 7,8-cis Lacton statt (Ikezawa et al. 2011). Bei der Expression von HaG8H in *N. benthamiana* entsteht dagegen ein Lacton mit derselben Masse und ähnlicher Laufzeit wie Costunolid. Da es sich, wie die Thiol-Addukte zeigen, um ein reaktives α-Methylen-γ-Lacton handelt und HaG8H die 8β-Position hydroxyliert, bleibt als einzige logische Erklärung, dass sich das 7,8-cis Lacton zum Inunolid ausgebildet haben muss. In Kombination mit M4 bildet HaG8H in *N. benthamiana* 8β-Hydroxy-Costunolid, dies spricht dafür, dass die 6α-Cyclisierung stattfindet bevor sich der Ring zum 7,8-cis Lacton schließen kann. Eine mögliche Erklärung, weshalb die cis-Lactonisierung im Tabak, nicht aber im Hefe-System erfolgt könnte sein, dass neu entstandene Metabolite in Hefen relativ schnell aus der Zelle ins Kulturmedium abgegeben werden. Ein Enzym, das mehrere subsequente Reaktionen katalysiert könnte die Reaktion in der Hefezelle demzufolge nicht zu Ende ausführen, während die Reaktion in der Tabak-Zelle über ausreichend Zeit verfügt. Eine andere Erklärung wäre, dass ein sowohl in *H. annuus,* als auch in *N. benthamiana* vorhandenes pflanzliches Enzym, das in Hefe nicht existiert, die Cyclisierungs-Reaktion ausführt.

Inunolid wurde mit seiner exakten Stereochemie erstmals in einem Extrakt von *Inula* von Bohlmann et al. (1978) beschrieben. Entsprechend der etablierten Schemata für die Biosynthese von Xanthanoliden (Rodriguez et al. 1976; Seaman 1982) müsste die Synthese von Xanthanoliden wie 8-Epixanthatin und Tomentosin (mit 7,8-cis-Lacton Gruppe) über das Zwischenprodukt Inunolid laufen. Dies würde auch die Expression von HaG8H in Geweben außerhalb der KDH erklären, in denen keine

8β-hydroxylierten und mit einer Seitenkette veresterten Germacranolide vorkommen. Entsprechend der für 8β-Hydroxy-Germacren A Säure im Hefe-Expressions-System postulierten drei Nebenprodukte 8β-Hydroxy-α-Costus-Säure, 8β-Hydroxy-β-Costus-Säure und 8β-Hydroxy-γ-Costus-Säure wurden *in planta* als Nebenprodukte die entsprechenden 7,8-cis-Lactone (Eudesman-12,8-olide) postuliert. Das Lacton der 8β-Hydroxy-β-Costus-Säure wird als Isoalantolacton bezeichnet (Seaman 1982).

4.6 Kandidat M4: Synthese von Costunolid

Bei der Expression von Kandidat M4 mit dem Substrat-Vektor mit GAS und GAO entstehen in den beiden Expressionssystemen höchst unterschiedliche Produkte. In Hefe bildet sich Farnesyl-δ-Lacton, ohne das bisher hierfür ein Reaktionsmechanismus erklärbar ist. Eine entsprechende Verbindung konnte in der Datenbank des Chemical Abstracts Service (CAS) nicht gefunden werden, allerdings ist das Stereoisomer beschrieben als Zwischenprodukt bei der chemischen Synthese von Sesterterpenen (Hubert et al. 2015). Im Tabaksystem führt M4 zusammen mit GAS und GAO zu Costunolid und erweist sich damit als 6α-Hydroxylase, wie LsCOS oder TpCOS. Reines Costunolid, konnte zwar nicht in den KDH von *H. annuus* nachgewiesen werden, wo 8β-Hydroxyderivate der Germacrolide vorherrschen, aber in verschiedenen inneren Geweben der Sonnenblume und in Wurzelexsudaten. Die Rolle von M4 als 6α-Hydroxylase wird also durch die Expressionsstudien im pflanzlichen System untermauert. Auch für die Entstehung von Costunolid im Hefe Expressions-System bei der Koexpression von GAO, HaG8H und M4 ist der Reaktionsmechanismus unklar. Dabei zeigte M4 im Tabak-Expressions-System eine leicht erhöhte Produktion von Costunolid im Vergleich zu LsCOS.

In Bezug auf die Aminosäuresequenz weist M4 eine höhere Ähnlichkeit zu HaG8H als zu den Costunolid Synthasen von *Tanacetum parthenium*, *Lactuca sativa* und *Cynara cardunculus* auf. Einer der wichtigsten Bereiche für die Substrat-Spezifität bei Cytochrom P450 Enzymen ist die SRS 5 Region, insbesondere die fünfte Position nach dem KETLR bzw. ExxR Motiv, die sehr nahe am katalytischen Zentrum liegt (Seifert & Pleiss 2009). Die bereits beschriebenen Costunolid Synthasen haben in den SRS-Regionen an Pos 4 und 5 die Aminosäuren Prolin und Valin, während HaG8H und M4 hier eine freie Position und Valin haben. Bei weiteren Aminosäurepositionen, die nach Ikezawa et al. (2011) in der direkten Nähe des Substrates befindlich sind, gibt es ebenfalls Unterschiede zwischen M4 und den anderen Costunolid Synthasen. Auch in der CYP71AJ Unterfamilie scheint der Wegfall des ansonsten konservierten Prolin-Restes an der Pos 4 in Kombination mit einem AS Austausch an Pos. 5 nach dem ExxR Motiv im Zusammenhang mit einer geänderten Enzymfunktion zu stehen (Dueholm et al. 2015). Da Kandidat M4 in den zentralen Bereichen der Substrat-Erkennung signifikant von den bereits beschriebenen Costunolid Synthasen abweicht, handelt es sich möglicherweise um einen neuen, unterschiedlichen Mechanismus der Substratbindung.

Das Gen von M4 wurde entsprechend dem Verteilungsmuster in der Transkriptom Datenbank aus Brakteen cDNA isoliert. Eine Expression in Blattprimordien konnte allerdings auch gezeigt werden. Primer für die Untersuchung der Expression von M4 wurden in einer Konzentrationsreihe gegen das auf einem Vektor codierte Gen HaG8H getestet, um auszuschließen, dass das vergleichsweise ähnliche Gen bei einer Expression-Studie mitamplifiziert würde (Ergebnisse nicht gezeigt). Die Produktion von Costunolid durch M4 wurde in Hefe (in Kombination mit HaG8H) und in Tabak gezeigt. Es sind hierbei allerdings noch Fragen offen: Eine wichtige Frage ist, warum diese Reaktion abläuft, obwohl der Aminosäure-Vergleich auf das gesamte Protein und die Aminosäuren im katalytischen Zentrum bezogen so unterschiedlich zu den bereits beschriebenen Costunolid Synthasen sind. Die andere wichtige Frage ist, wie die Reaktionsmechanismen in den Hefe-Expressionskulturen verlaufen. Möglicherweise können diese Fragen mit Hilfe von *in vitro* Assays mit unterschiedlichen Substraten getestet werden.

4.7 Kandidat M33: Eine Costunolid 14-Hydroxylase

14-Hydroxy-Costunolid wurde von dem Enzym M33 aus Costunolid gebildet, sowohl in Hefe als auch in Tabak. M33 weist eine Aminosäure-Identität von 53% zu Tp8878, der Parthenolid/Costunolid 3β-Hydroxylase von *Tanacetum* auf. Auch wenn die Schwelle von 55 % für die Einteilung in dieselbe Unterfamilie nicht erreicht wurde, wäre es sinnvoll, aufgrund der sehr ähnlichen Substrate und katalysierten Reaktionen eine Einteilung in dieselbe Unterfamilie CYP71CB vorzunehmen. Analog zu HaG8H wird für Kandidat M33 der Name ***H**elianthus **a**nnuus* **C**ostunolid **14**-**H**ydroxylase, ***Ha*C14H** vorgeschlagen. *Ha*C14H liegt im Genom in relativer Nähe zu mehreren P450 Kandidaten mit ähnlicher Sequenz auf dem Chromosom vor (siehe 0). Die Expression von M33 wird im Laufe der Blattprimordien-Entwicklung hochreguliert und wies die höchsten Werte der untersuchten Gene auf. 14-OH-Costunolid wurde bisher bei der Asteraceae *Clibadium surinamense,* aber noch nicht bei der Gattu*ng Helianthus* nachgewiesen (Seaman 1982). Bemerkenswert ist, dass für das untersuchte Kultivar *Helianthus annuus* cv. HA300 noch keine Costunolid-Derivate mit 14-Hydroxy-Gruppe identifiziert wurden. Allerdings wurde 8β,14-OH-Costunolid (Desacetylovatifolin) bei mehreren Sonnenblumen-Arten nachgewiesen (Herz & Kumar 1981; Gershenzon et al. 1984; Whittemore et al. 1985; Yuan et al. 2013). Darüberhinaus wurde ein zu Desacetylovatifolin strukturell ähnliches Melampolid mit einer Aldehyd-Gruppe an der C14 Position bei *H. annuus* und *H. maximiliani* identifiziert (Stewart & Mabry 1985; Casas et al. 2005). Alle bei verschiedenen *Helianthus* Arten identifizierten STL Derivate des 8β,14-OH-Costunolid Typs wiesen weder weitere Hydroxylierungen des Grundgerüstes noch eine Veresterung der 8β-Hydroxy-Gruppe mit Angelinsäure auf. Die Bildung von 8β,14-OH-Costunolid kann also möglicherweise nur dann stattfinden wenn keine alternativen

Synthesewege eingeschlagen werden, die die Ausbildung der 14-Hydroxylierung verhindern. Vor dem Hintergrund der häufigen inter-spezifischen Hybridisierungen in der Gattung *Helianthus* kann es sein, dass sich je nach der Neukombination des beteiligten P450 Genpools metabolische Routen der STL Biosynthese zusammen mit dem STL Inhaltsstoff-Muster ändern (Buschmann & Spring 1995).

Bei 14-OH-Costunolid stellt die Hydroxy-Gruppe am C-14 Atom in Verbindung mit der Doppelbindung an Position C1(10) eine α,β-ungesättigte Alkohol-Gruppe dar. Ähnlich wie der Cyclopentenon-Ring und α,β-ungesättigte Carboxygruppen können auch α,β-ungesättigte Alkohol-Gruppen die Bioaktivität von STL erhöhen (Seaman 1982). Interessant für weitere Experimente wäre die Koexpression des Syntheseweges *in planta* mit GAS/GAO/M4/S2, um möglicherweise auch 8β,14-OH-Costunolid auf biotechnologischem Wege darstellen zu können. Für zukünftige Experimente wäre es sinnvoll, neben Costunolid auch Parthenolid als Substrat zu testen um zu prüfen, ob es eine ähnliche Flexibilität in Bezug auf das Substrat gibt, wie bei dem strukturell verwandten Enzym Tp8878. Dies könnte sowohl in einem *in vitro* Assay mit Parthenolid als Substrat oder durch Erweiterung der Stoffwechsel-Rekonstruktions Ansätze in Hefe und Tabak mit der Parthenolid-Synthase getestet werden. Das Testen verschiedener Substrate für HaC14H wäre auch insofern sinnvoll, dass die Toleranz verschiedener Substrate bei P450 Enzymen von Sesquiterpenoid-Stoffwechselwegen weit verbreitet ist (Ralston et al. 2001; Takahashi et al. 2007; Nguyen et al. 2010; Cankar et al. 2011; Liu et al. 2014). Das P450 Enzym CYP720B4 katalysiert sogar bei acht verschiedenen Substraten drei nachfolgende Oxidationsreaktionen im Diterpen Metabolismus von *Picea sitchensis* (Hamberger et al. 2011).

4.8 Kandidat S2: Eine Eupatolid Synthase

Die Expression von Kandidat S2 mit FLAG-Tag im Hefe-System war bei Ikezawa et al. (2011) nicht erfolgreich. Versuche der nativen Expression des Proteins in Hefe ohne Tag lieferten bei keinem der drei bereitgestellten Substrate Germacren A Säure, 8β-Hydroxy-Germacren A Säure und Costunolid ein neues Produkt. Bei der Expression im *N. benthamiana* System ergaben sich jedoch vier neue Produkte im Ansatz [HaGAS1+HaGAO+HaG8H+S2] im Vergleich zur Kontrolle. Eines der Produkte konnte über den Vergleich von Laufzeit und Masse als 8β-Hydroxy-Costunolid identifiziert werden. Ein bemerkenswertes Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist, dass die Biosynthese von 8ß-Hydroxy-Costunolid bzw. Eupatolid, über zwei alternative biosynthetische Routen realisiert werden konnte. Während bei der Synthese von [HaGAS1+HaGAO+HaG8H+M4] keine Nebenprodukte auftraten, konnten bei der Route über S2 drei Nebenprodukte als Peak-Tandems der Cys- und GSH-Addukte ermittelt werden. Als Nebenprodukte postuliert werden 8β-Hydroxy-α-Cyclocostunolid, 8β-Hydroxy-β-Cyclocostunolid und 8β-Hydroxy-γ-Cyclocostunolid. Der Entstehungsmechanismus und die Strukturformeln sind im Anhang (S 4, S 5, S 11.) aufgeführt. Die höchste Ähnlichkeit wies S2 zur

Parthenolid Synthase von *T. parthenium* mit einer Aminosäure Identität von 47 % auf. Die Substrate und Reaktionen von S2 und HaTPS sind unterschiedlich, auch wenn in beiden Fällen ein hydroxyliertes Derivat der Germacren A Säure weiter oxydiert wird. Ausgrunddessen wird vorgeschlagen S2 in eine eigene CYP71-Unterfamilie einzugruppieren und als ***H**elianthus **a**nnuus* **E**upatolid-**S**ynthase zu bezeichnen. Eupatolid stellt höchstwahrscheinlich eine Zwischenstufe bei der Synthese der meisten STL in den KDH dar, da die meisten STL in KDH ein Germacrenolid-Grundgerüst mit 6-7-trans-Lacton und 8β-Hydroxylierung aufweisen. Während viele potentielle Derivate des Eupatolides in den KDH von *H. annuus* direkt nachgewiesen werden konnten, wurde Eupatolid selbst noch nicht in *H. annuus* nachgewiesen, findet sich aber in der Schwesterart *H. argophyllus* (Watanabe et al. 1982) und in verschiedenen Gattungen des Tribus Heliantheae, wie z.B. *Eupatorium* und *Inula* (Seaman 1982).

Um doch noch eine Expression im Hefe-System zu ermöglichen, könnte der Ansatz der Codon-Optimierung getestet werden, allerdings wurden zwischen nativer und Codon-optimierter HaG8H keine deutlichen Unterschiede festgestellt. Eine weitere, vielversprechendere Methode wäre möglicherweise der Austausch der Transmembrandomäne. Das Ersetzten der TMD des P450 Enzym LovA von *Aspergillus terreus* in Hefe-System mit der TMD von LsGAO führte zur funktionellen Expression des Enzyms (nachgewiesen über Western Blot) (Barriuso et al. 2011). Auch das Einbringen einer Hefe-Kozak-Sequenz im Bereich des Start-Codons könnte die Expression der P450 Enzyme in Hefe verbessern (Hamann & Møller 2007). Expressionsstudien zu S2 waren aus zeitlichen Gründen nicht mehr möglich. Zukünftige Experimente werden zeigen, ob sich das Expressionsmuster mit dem von im Biosyntheseweg vorangeschalteten Enzymen deckt.

4.9 Modell zur Stellung der neu charakterisierten Enzyme im STL-Metabolismus von *Helianthus annuus*

4.9.1 Position der Enzyme im Genom von *Helianthus annuus*

Die Gene für Terpensynthasen und P450 Enzyme des STL Metabolismus von *H. annuus*, die lokalisiert werden konnten, lagen relativ gleichmäßig über die verschiedenen Kopplungsgruppen verteilt vor. Für die basalen Gene des STL-Syntheseweges HaGAS1 und HaGAO konnten jeweils zwei Kopien an unterschiedlichen Stellen des Genoms gefunden werden. Eine Reihe von Terpen-Biosynthesewegen verschiedener Pflanzenarten liegt als Cluster im Genom vor, dabei werden TPS und P450 Enzyme bei einem Abstand unter 50 kb als auf dem Chromosom benachbart definiert (Boutanaev et al. 2015). Beispielsweise liegen die Gene für einen Diterpenoid Stoffwechselweg von *Ricinus communis* innerhalb eines Cluster-Bereiches von 80 kb vor, mit mehreren P450 Enzymen, die

untereinander hohe Sequenzähnlichkeiten besitzen und ähnliche Expressionsmuster aufweisen (King et al. 2014). Es ließen sich bei den untersuchten Sequenzen keine Gen-Cluster im engeren Sinne, also direkt benachbarte Gene in einer funktionellen Einheit, definieren. Es zeigte sich aber eine Region im Chromosom 5, in der sich fünf der Kandidatengene befinden, die alle in Drüsenhaaren exprimiert wurden und sich phylogenetisch in der Unterfamilie CYP71CB mit den Costunolid Hydroxylasen von *Helianthus* und *Tanacetum* zusammenfassen lassen. Die Abstände zwischen den untersuchten P450 Sequenzen lagen in diesem Bereich zwischen ca. 200 kb und ca. 15.000 kb. Auch wenn die Abstände in dieser Region vergleichsweise groß sind, wäre es plausibel, die P450 Enzyme in dieser chromosomalen Region in künftigen Studien hinsichtlich ihrer Rolle für die Bildung der mehrfach substituierten STL der KDH zu testen (Abb. 26, Schritt E). Eine aufeinander abgestimmte Expression von am STL-Syntheseweg beteiligten Enzymen könnte über gemeinsame Promotorelemente gesteuert werden. Die vorliegenden Genomdaten können für eine vergleichende Analyse der Promotorregionen auf gemeinsame regulatorische Elemente genutzt werden. Es könnten in weiteren Versuchen, vergleichbar zu den Arbeiten von Zhu et al (2014) und Liu et al. (2016), innerhalb der Promotorregionen der an STL Biosynthesewegen beteiligten Enzyme regulatorische Elemente identifiziert werden, die eine koordinierte Trichom-spezifische, Licht- oder Phytohormon-induzierte Expression ermöglichen. Spyropoulou et al. (2014a; 2014b) konnten für die Trichom-spezifische Expression verantwortliche Promotorelemente von Terpensynthasen, sowie entsprechende Transkriptionsfaktoren identifizieren. Bei *H. annuus* könnte die Expression homologer Trichom-spezifischer Transkriptionsfaktoren untersucht werden.

4.9.2 Sesquiterpenlacton-Metabolismus in inneren Geweben

Die Verteilung der vier Sesquiterpenlactone 8-Epixanthatin, Tomentosin, Dehydrocostuslacton und Costunolid in den ersten fünf Tagen der Keimlings-Entwicklung von *H. annuus* wurden parallel zur vorliegenden Arbeit von Schmauder (2015) untersucht. Dabei kommt Costunolid vor allem in jungen Kotyledonen und Wurzeln vor, während die drei anderen STL eher eine gewebespezifische als eine zeitliche Verteilung aufweisen, wobei DCL vorwiegend in Wurzeln, 8-Epi in Kotyledonen und Tom im Hypokotyl nachgewiesen wurde (Abb. 26, blau markiert) (Schmauder 2015). Die Bildung von Costunolid würde die Expression von M4 ohne die gleichzeitige Expression von HaG8H erfordern. Dagegen müssten für die Ausbildung von 8-Epi und Tom zunächst das 7-8 cis Lacton ausgebildet werden. Versuche bei der Expression in *N. benthamiana* zeigten, dass die Expression von HaG8H in Abwesenheit von M4 und S2 zur Bildung eines Lactons, wahrscheinlich Inunolid, führt. In der Dissertation von Liu (2013) wurde ein P450 Enzym von *T. parthenium* gefunden, das Costunolid in das Guaianolid-STL Kauniolid umwandeln kann. Ein ähnlicher P450-katalysierter Schritt könnte sowohl für Costunolid, als auch für Inunolid zur Umlagerung des STL Grundgerüstes führen. Costunolid könnte

somit in zwei Reaktionsschritten (Abb. 26, Schritte **A** und **C**) über Kauniolid in Dehydrocostuslacton umgewandelt werden, Inunolid in mehreren Reaktionsschritten (Abb. 26 Schritte **A** und **B**), wie von Seaman (1982) vorgeschlagen, über das Guianolid- in das Xanthanolid-Grundgerüstüberführt werden. Dieser metabolische Weg würde zu 8-Epixanthatin führen. Ein weiteres Enzym (Abb. 26, Schritt **D**) könnte in den Kotyledonen zur Umwandlung von 8-Epixanthatin in Tomentosin führen. Auf der Suche nach Enzymen für die Xanthanolid-Synthese in der relativ nahe verwandten Art *Xanthium strumarium* charakterisierten Li et al. (2016a) die Terpensynthase XsTPS2, die FPP in Guaia-4,6-dien konvertieren konnte. Aufgrund eines Vergleiches der Expressionsmuster von XsTPS2 mit der *X. strumarium* Germacren A Synthase XsTPS3, schlossen Li et al. (2016a) allerdings, dass bei *Xanthium* die Synthese hin zum Xanthanolid wahrscheinlich über Germacren A verläuft.

4.9.3 Sesquiterpenlacton-Metabolismus in köpfchentragenden Drüsenhaaren

Nachdem der Weg der STL Biosynthese in den KDH von FPP über Germacren A bis hin zu Germacren A Säure bzw. 8β-Hydroxy-Germacren A Säure aufgeklärt wurde (Göpfert et al. 2009; Nguyen et al. 2010; Ikezawa et al. 2011), stellte sich die Frage, wie der Syntheseweg in den KDH weiter verläuft. Die meisten in KDH von *H. annuus* detektierten Sesquiterpen-Verbindungen sind die Endprodukte einer Reihe von Reaktionen, die noch nicht vollständig aufgeklärt sind. Sie haben eine 8β-Hydroxy-Germacra-dien-12,6-olid Grundstruktur, wobei die 8β-Hydroxy-Gruppe mit Angelinsäure verestert ist. Eine Ausnahme bildet das in den KDH von *H. annuus* cv. HA300 nachgewiesene 9β-Hydroxy-Costunolid (=Haageanolid)(Göpfert et al. 2005). Es konnten keine modifizierten Haageanolid-Derivate bei *H. annuus* gefunden werden, was dafür sprechen würde, dass es sich hierbei um eine "Sackgasse" des Stoffwechselweges handelt. Man kann demzufolge davon ausgehen, dass die Synthese der meisten STL in den KDH über 8β-Hydroxy-Costunolid (Eupatolid) läuft. Bei den *in planta* Expressions-Studien zeigte sich eine Bildung von 8β-Hydroxy-Costunolid bei der Enzymkombination von HaG8H mit M4 oder S2. Geht man davon aus, dass die Situation in Zellen von *H. annuus* vergleichbar mit denen von *N. benthamiana* ist, wird der Weg über 8β-Hydroxy-Costunolid dann eingeschlagen, wenn HaG8H in bestimmten Zellen bzw. Geweben gelichzeitig mit M4 oder S2 exprimiert wird. In Abwesenheit dieser beiden Enzyme würde in der entsprechenden Zelle die Reaktion der Ausbildung eines 7-8 cis-Lactons zum Inunolid ablaufen.

Im Syntheseweg der STL in den KDH werden ausgehend von 8β-Hydroxy-Costunolid eine Reihe von Hydroxy-, Epoxy- und Ketongruppen eingeführt (Abb. 26, Schritt E). Aus *H. annuus* Blättern bzw. köpfchentragenden Drüsenhaaren aufgereinigte STL des Germacrenolid-Typs können an den C1-C4, C8-C10 und C15 Positionen hydroxyliert sein (Spring et al. 1989; Casas et al. 2005; Göpfert et al. 2005; Macias et al. 2006). Die meisten dieser oxidativen Reaktionen werden von weiteren Cytochrom

P450 Enzymen durchgeführt. Gute Enzym-Kandidaten für diese Reaktion wären die Enzyme der CYP71CB-ähnlichen Unterfamilie, da das Enzym Tp8878 (CYP71CB1) neben Costunolid mit Parthenolid eine oxygenierte Variante von Costunolid als Substrat verwenden kann (Liu et al. 2014). Bestimmte Reaktionsschritte erfordern allerdings die Beteiligung weiterer Enzymtypen. Ketogruppen könnten durch Reduktion von zuvor eingeführten Hydroxy-Gruppen durch eine Alkohol Dehydrogenase erzeugt werden, wie von Okamoto et al. (2011) für das Sesquiterpenoid 8-Hydroxy-α-Humulen beschrieben. Die Veresterung mit Angelinsäure könnte durch eine BAHD Acyltransferase katalysiert werden, wie von King et al. (2014) für die Diterpenoid-Ester-Synthese bei der Bildung von Ingenol-Angelat vorgeschlagen.

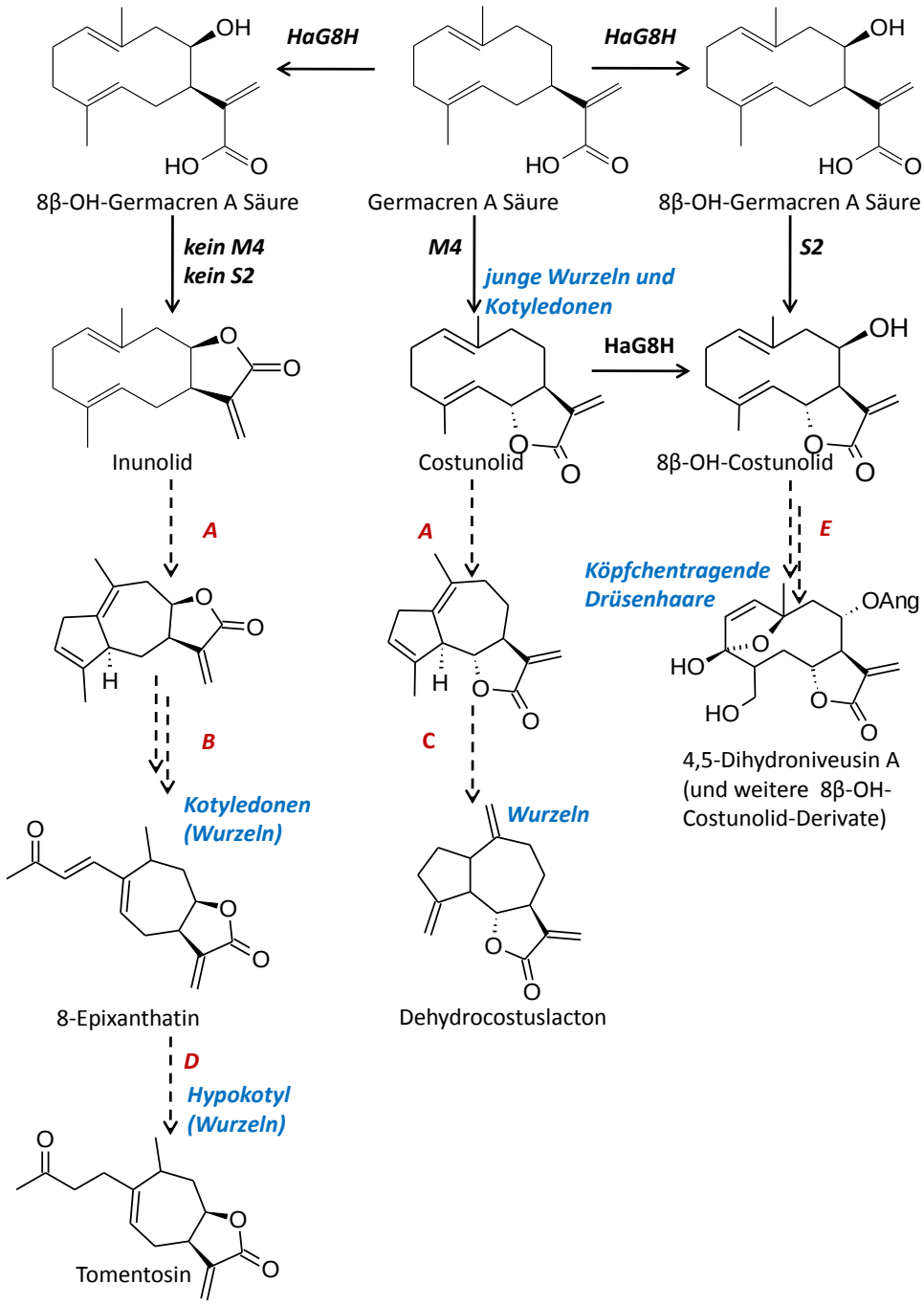


Abb. 26: Mögliche gewebespezifische Synthesewege für unterschiedliche Sesquiterpenlactone in *Helianthus annuus*

Fettgedruckt und kursiv: P450 Enzyme, bei denen in der vorliegenden Arbeit neue enzymatische Aktivität charakterisiert werden konnte, HaG8H, Enzymkandidaten M4 und S2, Fettgedruckt, kursiv, rot: A-E Vorgeschlagene Biosyntheserouten zur Ausbildung der STL in den unterschiedlichen Geweben. Blau markiert: Gewebespezifische Verteilung der inneren STL 8-Epixanthatin, Tomentosin, Dehydrocostuslacton und Costunolid, ermittelt von Schmauder (2015) sowie Lokalisation der 8β-Hydroxy-Costunolid-Derivate aus (Göpfert et al. 2005)

4.10 Einsatzmöglichkeiten der Enzymprodukte

Costunolid wurde in einer Vielzahl von Studien auf pharmakologische Wirkungen untersucht. Im Review von Janecka et al. (2012) ist eine Auswahl an Studien zum antikanzerogenen Potential von Costunolid herausgearbeitet. In einer Studie von Scarponi et al. (2014) wurde gezeigt, dass Costunolid inflammatorische und proliferative Prozesse in Keratinocyten hemmt. Die Wirkung von Costunolid wird dabei laut Scarponi et al. (2014) auch über die Senkung des zellulären GSH-Spiegels durch die Michael-Addition von Costunolid an GSH erreicht.

Tyagi et al. (2016) modifizierten das bakterielle Enzym CYP71A1, die entstehenden Varianten II-C5 und XII hydroxyierten Parthenolid an der 14- und 9β-Position und ermöglichten die Einführung von Seitengruppen zur Verbesserung der antikanzerogenen Wirksamkeit und der Wasserlöslichkeit. Auch M33/*Ha*14CH könnte in diesem Bereich eingesetzt werden, wenn Parthenolid vom Enzym als Substrat akzeptiert wird. Durch eine enzymatische Reaktion oder chemische Oxidation könnte 14-Hydroxy-Costunolid in Taraxin-Säure überführt werden, von dem das Potential als Therapeutikum gegen Leukämie-Stammzellen gezeigt wurde (Choi et al. 2002). Yuan et al. (2013) stellten eine cytotoxische Wirkung von 8β,14-OH-Costunolid bei drei verschiedenen getesteten Krebszell-Linien fest, allerdings zeigten andere getestete STL noch stärkere Effekte. Eupatolid hemmt PDGF (*platelet-derived growth factor*) induziertes Wachstum von RASMC-Zellen (Glatte Aorta-Muskelzellen der Ratte) und könnte für die Behandlung vaskulärer Erkrankungen eingesetzt werden (Kim et al. 2013). Eupatolid wirkt anti-inflammatorisch über die für STL typische Interaktion mit NF-κB (Lee et al. 2010). Eupatolid konnte nur bei der Expression in *N. benthamiana* gebildet werden und war nur als Cystein- und Glutathion-Addukt nachweisbar. Liu et al. (2014) konnten aber zeigen, dass die Cystein- und Glutathion-Addukte von Parthenolid trotz der fehlenden exocyclischen Methylen-Gruppe noch über restliche biologische Aktivität verfügten.

4.11 Ausblick

Das in (Kapitel 4.9) erläuterte Modell könnte erklären, warum (1) In KDH nur STL mit 8β-Hydroxy-Germacrenolid Grundgerüst vorkommen, dieses Grundgerüst aber nicht in den inneren Geweben bei der Keimlingsentwicklung zu finden ist. (2) HaG8H nicht nur in KDH exprimiert wird, sondern auch in unterschiedlichen Geweben und Organen der Pflanze. (3) Nicht-substituiertes Costunolid in inneren Geweben, nicht aber in KDH nachweisbar ist. (4) 8-Epixanthatin, Tomentosin und Dehydrocostuslacton nicht in den KDH nachgewiesen werden konnten.

Ein vergleichendes Transkriptom früher und sekretorischer Stadien um weitere Enzym-Kandidaten zu finden, sowie das Testen bereits ermittelter P450-Kandidaten in späteren Schritten des Stoffwechsel (also nach 8β-Hydroxy-Costunolid) können helfen, den weiteren Biosyntheseweg in den

KDH aufzuklären. Eine Aufklärung des Syntheseweges hin zu 8-Epixanthatin könnte durch ein vergleichendes Transkriptom von belichteten und unbelichteten Keimlingen erreicht werden. Eine Aufklärung der an der Synthese von 8-Epixanthatin, Tomentosin und Dehydrocostuslacton beteiligten Enzyme würde einen wichtigen Schritt liefern, um die physiologische Rolle dieser Metabolite, die erst in Ansätzen erforscht wurde, aufzuklären. Li et al. (2016b) identifizierten Kandidatengene für die Xanthanolid Synthese in *Xanthium*, dies könnte Impulse für die Aufklärung des Syntheseweges der Xanthanolide 8-Epixanthatin und Tomentosin in *H. annuus* liefern. Weitere Untersuchungen zu Licht-Induzierbarkeit und der gewebespezifischen Verteilung dieser „inneren“ STL sowie immunohistochemische Untersuchungen mit anti-HaGAO Antikörpern (Amrehn et al. 2016) und Genexpressionsstudien werden notwendig sein, um physiologische Funktionen der STL in *H. annuus* weiter aufzuklären. Ebenfalls möglich wäre der gewebespezifische Nachweis von Terpensynthasen und Cytochrom P450 Enzymen durch *in situ* Hybridisierung (Frey et al. 1995).

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnten der Aufklärung des Biosyntheseweges des Sesquiterpen-Metabolismus der Sonnenblume (*Helianthus annuus*) entscheidende Schritte hinzugefügt werden. Hierzu wurden zunächst aus einer Transkriptom Datenbank Kandidaten Sequenzen anhand von Expressions-Mustern und Ähnlichkeit zu bekannten, an STL-Stoffwechselwegen beteiligten P450-Enzymen gesucht. Mithilfe von 3´- und 5´-RACE-PCR wurden die offenen Leserahmen der Kandidaten aufgeklärt. Die anhand dieses Verfahrens ausgewählten, sowie weitere bereits beschriebene P450 Kandidaten Sequenzen wurden in Hefe-Vektoren transformiert und in Kombination mit verschiedenen Substrat-Vektoren exprimiert. Ein Hochdurchsatz Mikro-Ansatz wurde entwickelt, der die Expression und Analyse vieler Hefe Stämme im selben Zeitraum ermöglichte. Für die transiente Expression in N*. benthamiana* wurden die entsprechenden Gene bekannter und putativer Enzyme über Agrobakterien-Transformation in Tabak-Pflanzen eingebracht. Beim *in planta* Expressions-System wurde der komplette STL Stoffwechselweg der Sonnenblume bis zum Costunolid *de novo* in einem Schritt-für-Schritt Ansatz rekonstruiert. Die bereits bekannte Additionsreaktion von α-Methylen-γ-Lacton STL mit der Thiol-Gruppe von Cystein und Glutathion konnte bei allen untersuchten STL beobachtet werden. Als Referenz wurden STL-Addukte chemisch synthetisiert und mit den *in planta* erzeugten Produkten abgeglichen. Die Charakterisierung von Enzymen erfolgte somit in zwei unterschiedlichen *in vivo* Expressions-Systemen in Hefe (*Saccharomyces cervisiae*) und Tabak (*Nicotiana benthamiana*). Für den vorliegenden Stoffwechselweg wurden eine Reihe Unterschiede und Charakteristika der beiden Expressionssysteme herausgearbeitet. Kandidat M4 zeigte in Hefe ein unerwartetes Produkt (Farnesyl-δ-Lacton) und führte in Kombination mit HaG8H zur Produktion von Costunolid. Im pflanzlichen Expessions-System wurde Germacren A Säure von M4 auch in Abwesenheit von HaG8H zu Costunolid überführt. In beiden Fällen trug Kandidat M4 zur Synthese von Costunolid bei, und kann somit als *Helianthus annuus* Costunolid Synthase (HaCOS) bezeichnet werden, allerdings sollte der zu Grunde liegende Reaktionsmechanismus noch weiter aufgeklärt werden.

Die ***H****elianthus* ***a****nnuus* **C**ostunolid **14-H**ydroxylase **HaC14H** (Kandidat M33) wurde in Hefe und Tabak charakterisiert, eine Einteilung in die Unterfamilie CYP71CB, zusammen mit TP8878, der *Tanacetum parthenium* Costunolid/Parthenoild 3β-Hydroxylase wird vorgeschlagen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass *in planta* das Hauptprodukt der HaG8H höchstwahrscheinlich als Inunolid vorliegt, was den Biosyntheseweg hin zu 8-Epixanthatin und Tomentosin einleiten würde. Ein weiteres Enzym, Kandidat S2 aus der Arbeit von Ikezawa et al. (2011), konnte *in planta*, nicht aber in Hefe, 8β-Hydroxy-Germacren A Säure in 8β-Hydroxy-Costunolid/Eupatolid und mehrere Nebenprodukte umsetzen, dementsprechend wurde der Name ***H****elianthus* ***a****nnuus* **E**upatolid

Synthase, **HaES** vorgeschlagen. HaES besitzt 47 % Aminosäure Identität zur Parthenolid-Synthase von *T. parthenium* TpPTS, es wird eine Einteilung in eine eigene CYP71 Unterfamilie vorgeschlagen. Zwei alternative metabolische Routen führten bei der Expression *in planta* zur Bildung von 8β-Hydroxy-Costunolid, die zugrundeliegenden Mechanismen wurden diskutiert. Analysen der Expressionsmuster der am STL-Biosyntheseweg beteiligten Enzyme zeigen, dass die Gene auf den STL Synthesewegen auch in den inneren Geweben exprimiert sind und deren Expression in Blattprimordien parallel zur KDH Entwicklung und STL Produktion koordiniert hochreguliert wird. HaC14H lag in einer Region des Genoms in der Nähe einer Reihe weiterer P450 Enzymkandidaten, die sich in dieselbe Unterfamilie eingruppieren lassen und ebenfalls in den KDH exprimiert sind, weshalb eine Beteiligung von P450 Enzymen aus dieser Gruppe an weiteren Reaktionsschritten hin zu den komlpexeren STL der KDH plausibel wäre.

Summary

In the present work additional steps towards the elucidation of the biosynthetic pathway of *H. annuus* sesquiterpene lactones (STL) were achieved. Firstly candidate sequences were retrieved from a transcriptome database by filtering according to expression pattern and similarity to P450 enzymes known to participate in STL biosynthetic pathways. Open reading frames (ORFs) were obtained using 3´-and 5´-RACE-PCR. Previously described and newly identified candidate genes were then transformed in yeast vectors and expressed in combination with different substrate vectors. A high throughput micro approach was developed that allowed the expression and analysis of many yeast strains at the same time. For the transient expression in *N. benthamiana* the genes of known and putative enzymes were introduced via *Agrobacterium* mediated transformation. Using the *in planta* expression system the complete STL pathway of sunflower to costunolide was reconstructed *de novo* in a step-by-step approach. Previously described Michael-addition reactions of α-methylene-γ-lactone type STL to the thiol group of cysteine or glutathione in tobacco expression systems could be observed for all STL investigated. Chemically synthesized STL adducts were used as reference for the identification of *in planta* produced STL adducts. Enzyme characterization was conducted in two different *in vivo* expression systems, in yeast (*Saccharomyces cervisiae*) and tobacco (N*icotiana benthamiana*). For the investigated biosynthetic pathway, differences between these two expression systems were discussed. Candidate gene M4 showed an unexpected product in yeast (farnesyl-δ-lactone) and led in combination with HaG8H to the production of costunolide. In the plant expression system, germacrene A acid was converted to costunolide by M4 in the absence of HaG8H. In both cases, M4 was involved in the synthesis of costunolide and should therefore be assigned *Helianthus annuus* costunolide synthase the underlying reaction mechanism should however be investigated more thoroughly.

H*elianthus* ***a****nnuus* **c**ostunolide **14**-**h**ydroxylase **HaC14H** (candidate M33) was characterized in yeast and tobacco. A classification into subfamily CYP71CB, together with Tp8878 the *Tanacetum parthenium* costunolide/parthenolide 3β-hydroxylase is proposed. It was shown that *in planta* the main product of HaG8H exists most likely as inunolide, which would be the entry point for the biosynthesis of 8-epixanthatine and tomentosine. Candidate S2 from Ikezawa et al. (2011) was found to convert 8β-hydroxy-germacrene A acid to 8β-hydroxy-costunolide (eupatolide) in tobacco, but not in yeast, producing several byproducts. The name ***H****elianthus* ***a****nnuus* **e**upatolide **s**ynthase **HaES** is proposed accordingly. HaES has 47 % amino acid identity to the parthenolide synthase from *T. parthenium* (TpPTS). A classification into a new CYP71 subfamily is proposed. Two alternative metabolic routes led to 8β-hydroxy-costunolide in the expression studies in tobacco, the underlying mechanisms are discussed. Enzymes involved in STL biosynthesis were expressed in inner tissues of

young *Helianthus annuus* plants; the induction of expression of STL biosynthesis enzymes in leaf primordia correlates with the development of capitate glandular trichomes (CGT) and STL synthesis. HaC14H was found in a chromosomal region in proximity to several P450 enzyme candidates, that share the same subfamily and the expression in capitate glandular trichomes (CGT). Therefore involvement of these enzymes in later steps of the biosynthesis of the elaborate STL structures found in CGT is likely.

6 Literatur

Amrehn, E., Heller, A. & Spring, O., 2014. Capitate glandular trichomes of *Helianthus annuus* (Asteraceae): Ultrastructure and cytological development. *Protoplasma*, 251(1), pp.161–167.

Amrehn, E. et al., 2016. Localization of sesquiterpene lactone biosynthesis in cells of capitate glandular trichomes of *Helianthus annuus* (Asteraceae). *Protoplasma*. 253(2):447-55.

Andersen, T., Cozzi, F. & Simonsen, H., 2015. Optimization of Biochemical Screening Methods for Volatile and Unstable Sesquiterpenoids Using HS-SPME-GC-MS. *Chromatography*, 2(2), pp.277–292.

Andersen, T.B. et al., 2015. Thapsigargin-From Thapsia L. to Mipsagargin. *Molecules*, 20(4), pp.6113–6127.

Andersen-Ranberg, J. et al., 2016. Expanding the landscape of diterpene structural diversity through stereochemically controlled combinatorial biosynthesis. *Angewandte Chemie - International Edition*, 55(6), pp.2142–2146.

Aschenbrenner, A.K. et al., 2015. Trichome differentiation on leaf primordia of *Helianthus annuus* (Asteraceae): morphology, gene expression and metabolite profile. *Planta*, 241(4), pp.837–846.

Bach, S.S. et al., 2014. High-throughput testing of terpenoid biosynthesis candidate genes using transient expression in *Nicotiana benthamiana*. *Methods in Molecular Biology*, 1153, pp.245–255.

Bak, S. et al., 2011. Cytochromes P450. *The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists*, 9, pp.1–56.

Barriuso, J. et al., 2011. Double oxidation of the cyclic nonaketide dihydromonacolin L to monacolin J by a single cytochrome P450 monooxygenase, LovA. *Journal of the American Chemical Society*, 133(21), pp.8078–8081.

Van Beek, T.A. et al., 1990. Bitter Sesquiterpene Lactones from Chicory Roots. *J. Agric. Food Chem*, 38, pp.1035–1038.

Bennett, M.H. et al., 2002. Cloning and expression of sesquiterpene synthase genes from lettuce (Lactuca sativa L.). *Phytochemistry*, 60(3), pp.255–261.

Bick, J.A. & Lange, B.M., 2003. Metabolic cross talk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis: unidirectional transport of intermediates across the chloroplast envelope membrane. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 415(2), pp.146–154.

Bitinaite, J. et al., 2007. USER friendly DNA engineering and cloning method by uracil excision. *Nucleic Acids Research*, 35(6), pp.1992–2002.

Bohlmann, F. et al., 1978. New sesquiterpene lactones from Inula species. *Phytochemistry*, 17(7), pp.1165–1172.

Boutanaev, A.M. et al., 2015. Investigation of terpene diversification across multiple sequenced plant genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(1), pp.E81–E88.

Bowers, W.S. et al., 1977. Sesquiterpene Progenitor , Germacrene A : An Alarm Pheromone in Aphids Published by : American Association for the Advancement of Science Stable. *Science*, 196(4290),

pp.680–681.

Brown, S. et al., 2015. De novo production of the plant-derived alkaloid strictosidine in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(11), pp.3205–10.

Buschmann, H. & Spring, O., 1995. Sesquiterpene Lactones as a Result of Interspecific Hybridization in Helianthus Species. *Phytochemistry*, 39(2), pp.367–371.

Cankar, K. et al., 2011. A chicory cytochrome P450 mono-oxygenase CYP71AV8 for the oxidation of (+)-valencene. *FEBS Letters*, 585(1), pp.178–182.

Cankar, K. et al., 2015. (+)-Valencene production in *Nicotiana benthamiana* is increased by down-regulation of competing pathways. *Biotechnology Journal*, 10(1), pp.180–189.

Casas, L. et al., 2005. Effect of the pre-treatment of the samples on the natural substances extraction from *Helianthus annuus* L. using supercritical carbon dioxide. *Talanta*, 67(1), pp.175–181.

Cavallito, C.J. & Haskell, T.H., 1945. The Mechanism of Action of Antibiotics. The Reaction of Unsaturated Lactones with Cysteine and Related Compounds. *Journal of the American Chemical Society*, 67(11), p.1991.

Chang, M.C.Y. & Keasling, J.D., 2006. Production of isoprenoid pharmaceuticals by engineered microbes. *Nature chemical biology*, 2(12), pp.674–81

Chang, M.C.Y. et al., 2007. Engineering *Escherichia coli* for production of functionalized terpenoids using plant P450s. *Nature chemical biology*, 3(5), pp.274–7.

Chen, F. et al., 2011. The family of terpene synthases in plants: A mid-size family of genes for specialized metabolism that is highly diversified throughout the kingdom. *Plant Journal*, 66(1), pp.212–229.

Choi, J.-H. et al., 2002. Taraxinic acid, a hydrolysate of sesquiterpene lactone glycoside from the *Taraxacum coreanum* NAKAI, induces the differentiation of human acute promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 25(11), pp.1446–1450.

Cope, A.C. & Hardy, E.M., 1940. The Introduction of Substituted Vinyl Groups. V. A Rearrangement Involving the Migration of an Allyl Group in a Three-Carbon System'. *Journal of the American Chemical Society*, 62(4), pp.441–444.

Dueholm, B. et al., 2015. Evolution of substrate recognition sites (SRSs) in cytochromes P450 from Apiaceae exemplified by the CYP71AJ subfamily. *BMC evolutionary biology*, 15, p.122.

Eisenreich, W., Rohdich, F. & Bacher, A., 2001. Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids. *Trends in Plant Science*, 6(2), pp.78–84.

Eljounaidi, K. et al., 2014. Cytochrome P450s from *Cynara cardunculus* L. CYP71AV9 and CYP71BL5, catalyze distinct hydroxylations in the sesquiterpene lactone biosynthetic pathway. *Plant Science*, 223, pp.59–68.

Englund, E. et al., 2015. Metabolic Engineering of *Synechocystis* sp. PCC 6803 for Production of the Plant Diterpenoid Manoyl Oxide. *ACS Synthetic Biology*, 4(12), pp.1270–1278.

Fernández-Álvaro, E. et al., 2016. Antimalarial Chemotherapy: Natural Product Inspired Development of Preclinical and Clinical Candidates with Diverse Mechanisms of Action. *Journal of Medicinal Chemistry*, 59(12), pp.5587–5603.

Frey, M. et al., 1995. Expression of a cytochrome P450 gene family in maize. *Molecular & general genetics : MGG*, 246(1), pp.100–9.

Frey, M. & Spring, O., 2015. Molecular traits to elucidate the ancestry of *Helianthus* x *multiflorus. Biochemical Systematics and Ecology*, 58, pp.51–58.

Fuentes, P. et al., 2016. A new synthetic biology approach allows transfer of an entire metabolic pathway from a medicinal plant to a biomass crop. *eLife*, 5(JUN2016). e13664

García-Piñeres, A.J. et al., 2001. Cysteine 38 in p65/NF-κB Plays a Crucial Role in DNA Binding Inhibition by Sesquiterpene Lactones. *Journal of Biological Chemistry*. J. Biol. Chem.276,pp. 39713–39720

Gershenzon, J. et al., 1984. Germacranolides from *Helianthus californicus*. *Phytochemistry*, 23(11). pp. 2561-2571

Ghantous, A. et al., 2010. What made sesquiterpene lactones reach cancer clinical trials? *Drug Discovery Today*, 15(15–16), pp.668–678.

Gietz, R.D. & Schiestl, R.H., 2008. High-efficiency yeast transformation using the LiAc / SS carrier DNA / PEG method. *Nature Protocols*, 2(1), pp.31–35.

Göpfert, J.C. et al., 2005. Cytological development and sesquiterpene lactone secretion in capitate glandular trichomes of sunflower. *Plant Biology*, 7(2), pp.148–155.

Göpfert, J.C., 2008. Molekulare und entwicklungsbiologische Charakterisierung von Schlüsselenzymen der Naturstoffbiosynthese in Drüsenhaaren der Sonnenblume. *Dissertation, Institut für Botanik, Universität Hohenheim*.

Göpfert, J.C. et al., 2009. Identification, functional characterization and developmental regulation of sesquiterpene synthases from sunflower capitate glandular trichomes. *BMC plant biology*, 9(1), p.86.

Gopfert, J.C., Bulow, A.K. & Spring, O., 2010. Identification and functional characterization of a new sunflower germacrene A synthase (HaGAS3). *Nat Prod Commun*, 5, pp.709–715.

Gotoh, O., 1992. Substrate recognition sites in cytochrome P450 family 2 (CYP2) proteins inferred from comparative analyses of amino acid and coding nucleotide sequences. *Journal of Biological Chemistry*, 267(1), pp.83–90.

Grasse, W., 2015. Verbreitung, Diversität und Übertragung des Mykovirus PhV und seine Auswirkung auf Plasmopara halstedii, den Falschen Mehltauerreger der Sonnenblume. *Dissertation, Institut für Botanik, Universität Hohenheim*.

Guzman, M.L. et al., 2007. An orally bioavailable parthenolide analog selectively eradicates acute myelogenous leukemia stem and progenitor cells. *Blood*, 110(13). pp. 4427-4435

Hall, T., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, pp.95–98.

Hamann, T. & Møller, B.L., 2007. Improved cloning and expression of cytochrome P450s and cytochrome P450 reductase in yeast. *Protein Expression and Purification*, 56(1), pp.121–127.

Hamberger, B. et al., 2011. Evolution of diterpene metabolism: Sitka spruce CYP720B4 catalyzes multiple oxidations in resin acid biosynthesis of conifer defense against insects. *Plant Physiology*, 157(4). pp. 1677-1695

Hellemans, J. et al., 2007. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome biology*, 8(2), p.R19.

Van Herpen, T.W.J.M. et al., 2010. *Nicotiana benthamiana* as a production platform for artemisinin precursors. *PLoS ONE*, 5(12). e14222

Herz, W. & Kumar, N., 1981. Sesquiterpene lactones from *Helianthus grosseserratus*. *Phytochemistry*, 20(1), pp.99–104.

Huber, M. et al., 2016. A Latex Metabolite Benefits Plant Fitness under Root Herbivore Attack. *PLoS Biology*, 14(1). e1002332

Hubert, J.G., Furkert, D.P. & Brimble, M.A., 2015. Synthesis of the spirocyclic framework of sesterterpenoid natural products. *Journal of Organic Chemistry*, 80(5), pp.2715–2723.

Ikezawa, N. et al., 2011. Lettuce costunolide synthase (CYP71BL2) and its homolog (CYP71BL1) from sunflower catalyze distinct regio- and stereoselective hydroxylations in sesquiterpene lactone metabolism. *Journal of Biological Chemistry*. 286(24), pp. 21601-11

Janecka, A. et al., 2012. Natural and synthetic α-methylenelactones and α- methylenelactams with anticancer potential. *Drug Discovery Today*, 17(11–12), pp.561–572.

Joel, D.M. et al., 2011. Dehydrocostus lactone is exuded from sunflower roots and stimulates germination of the root parasite *Orobanche cumana*. *Phytochemistry*, 72(7). pp. 624-634

Julianti, T. et al., 2011. Antitrypanosomal sesquiterpene lactones from *Saussurea costus*. *Fitoterapia*, 82(7), pp.955–959.

Kalsi, P.S., Kaur, P. & Chhabra, B.R., 1979. Plant growth activity of epoxides from dehydrocostus lactone. *Phytochemistry*, 18(11). pp. 1877-1878

Kim, N. et al., 2013. Eupatolide inhibits PDGF-induced proliferation and migration of aortic smooth muscle cells through ROS-dependent heme oxygenase-1 induction. *Phytotherapy Research*, 27(11). pp. 1700-1707

King, A.J. et al., 2014. Production of bioactive diterpenoids in the Euphorbiaceae depends on evolutionarily conserved gene clusters. *Plant Cell*, 26(8). pp. 3286-3298

King, B.C. et al., 2016. In vivo assembly of DNA-fragments in the moss, *Physcomitrella patens*. *Scientific reports*, 6(April), p.25030.

Knoche, H. et al., 1969. Allergenic component of a liverwort: sesquiterpene lactone. *Section Title: Plant Biochemistry*, 166(3902), pp.239–240.

De Kraker, J.-W. et al., 1998. (+)-Germacrene A biosynthesis . The committed step in the biosynthesis of bitter sesquiterpene lactones in chicory. *Plant physiology*, 117(4), pp.1381–92.

De Kraker, J.W. et al., 2001. Germacrenes from fresh costus roots. *Phytochemistry*, 58(3), pp.481–487.

De Kraker, J.-W. et al., 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), pp.257–268.

Kupchan, S.M. et al., 1970. Reactions of alpha methylene lactone tumor inhibitors with model biological nucelophiles. *Science*, 168(3929), pp.376–378.

Kwon, M. et al., 2014. Molecular cloning and characterization of drimenol synthase from valerian plant (*Valeriana officinalis*). *FEBS Letters*, 588(24), pp.4597–4603.

Lamb, D.C. & Waterman, M.R., 2013. Unusual properties of the cytochrome P450 superfamily. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 368(1612).

Lazo, G.R., Stein, P.A. & Ludwig, R.A., 1991. A DNA transformation-competent Arabidopsis genomic library in Agrobacterium. *Biotechnology*, 9, pp.963–967.

Lee, J. et al., 2010. Eupatolide inhibits lipopolysaccharide-induced COX-2 and iNOS expression in RAW264.7 cells by inducing proteasomal degradation of TRAF6. *European Journal of Pharmacology*, 636(1), pp.173–180.

Li, Y., Chen, F., et al., 2016a. Identification and functional characterization of Sesquiterpene Synthases from *Xanthium strumarium*. *Plant and Cell Physiology*, 57(3), pp.630–641.

Li, Y., Gou, J., et al., 2016b. Comparative Transcriptome Analysis Identifies Putative Genes Involved in the Biosynthesis of Xanthanolides in *Xanthium strumarium* L. *Frontiers in Plant Science*, 7(August), pp.1–11.

Lipko, A. & Swiezewska, E., 2016. Isoprenoid generating systems in plants - A handy toolbox how to assess contribution of the mevalonate and methylerythritol phosphate pathways to the biosynthetic process. *Progress in Lipid Research*, 63, pp.70–92.

Liu, M. et al., 2016. Characterization of a trichome-specific promoter of the aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1) gene in *Artemisia annua*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 126(3). pp. 469-480

Liu, Q. et al., 2011. Reconstitution of the costunolide biosynthetic pathway in yeast and *Nicotiana benthamiana*. *PLoS ONE*, 6(8). e23255

Liu, Q., 2013. Elucidation of the sesquiterpene lactone biosynthetic pathway in feverfew (*Tanacetum parthenium*). *Dissertation, Wageningen University*.

Liu, Q. et al., 2014. Elucidation and in planta reconstitution of the parthenolide biosynthetic pathway. *Metabolic Engineering*, 23, pp.145–153.

Luo, D. et al., 2016. Oxidation and cyclization of casbene in the biosynthesis of *Euphorbia* factors from mature seeds of *Euphorbia lathyris* L. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, p.201607504.

Lyss, G. et al., 1997. Helenalin, an anti-inflammatory sesquiterpene lactone from Arnica, selectively inhibits transcription factor NF-κB. *Biological Chemistry*, 378(9). pp. 951-961

Macias, F.A. et al., 1996. Potential allelopathic sesquiterpene lactones from sunflower leaves. *Phytochemistry*, 43(6), pp.1205–1215.

Macias, F.A. et al., 2006. Sesquiterpene lactones as allelochemicals. *Journal of Natural Products*, 69(5), pp.795–800.

Magnusson, G. & Thoren, S., 1973. Fungal extractives. III. Two sesquiterpene lactones from *Lactarius*. *Section Title: Terpenoids*, 27(5), pp.1573–1578.

Majdi, M., Charnikhova, T. & Bouwmeester, H., 2013. Genetical, developmental and spatial factors influencing parthenolide and its precursor costunolide in feverfew (*Tanacetum parthenium* L. Schulz Bip.). *Industrial Crops and Products*, 47, pp.270–276.

El Marsni, Z. et al., 2015. Isolation of Bioactive Compounds from Sunflower Leaves (*Helianthus*

annuus L.) Extracted with Supercritical Carbon Dioxide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(28), pp.6410–6421.

May, K.J. & Ristaino, J.B., 2004. Identity of the mtDNA haplotype(s) of *Phytophthora infestans* in historical specimens from the Irish potato famine. *Mycological research*, 108(Pt 5), pp.471–479.

Michael, A., 1887. Ueber die Addition von Natriumacetessig- und Natriummalonsaureathern zu den Aethern ungesattigter Sauren. *Journal für Praktische Chemie*, 35, pp.349–356.

Morimoto, H., Sanno, Y. & Oshio, H., 1966. Chemical studies on Heliangine. *Tetrahedron*, 22(9), pp.3173–3179.

Nelson, D.R., 2006a. Cytochrome P450 nomenclature, 2004. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 320, pp. 1-10

Nelson, D.R., 2006b. Plant cytochrome P450s from moss to poplar. *Phytochemistry Reviews*, 5(2–3). pp. 193-204

Nelson, D.R., 2009. The cytochrome P450 homepage. *Human Genomics*, 4(1). pp. 59-65

Nelson, D. & Werck-Reichhart, D., 2011. A P450-centric view of plant evolution. *Plant Journal*, 66(1), pp.194–211.

Nguyen, D.T. et al., 2010. Biochemical conservation and evolution of germacrene A oxidase in Asteraceae. *Journal of Biological Chemistry*, 285(22), pp.16588–16598.

Nguyen, T.D., MacNevin, G. & Ro, D.K., 2012. *De novo synthesis of high-value plant sesquiterpenoids in yeast.* Methods Enzymol. 2012;517. pp. 261–278

Nguyen, T.-D. et al., 2016. Discovery of germacrene A synthases in Barnadesia spinosa: The first committed step in sesquiterpene lactone biosynthesis in the basal member of the Asteraceae. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 479(4). pp. 622-627

Nour-Eldin, H.H. et al., 2006. Advancing uracil-excision based cloning towards an ideal technique for cloning PCR fragments. *Nucleic Acids Research*, 34(18). e122

Okamoto, S. et al., 2011. A short-chain dehydrogenase involved in terpene metabolism from *Zingiber zerumbet*. *FEBS Journal*, 278(16). pp. 2892-2900

Omura, T. & Sato, R., 1964. The Carbon Monoxide-biding pigment of Liver Microsomes. *The Journal of Biological Chemistry*, 239(7), pp.2370–2378.

Paddon, C.J. et al., 2013. High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin. *Nature*, 496(7446), pp.528–32.

Pateraki, I., Heskes, A.M. & Hamberger, B., 2015. Cytochromes p450 for terpene functionalisation and metabolic engineering. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 148, pp.107–139.

Peralta-Yahya, P.P. et al., 2011. Identification and microbial production of a terpene-based advanced biofuel. *Nature Communications*, 2(May), p.483.

Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29(9), p.e45.

Phan Duc, T. et al., 2016. New wedelolides, (9R)-eudesman-9,12-olide δ-lactones, from *Wedelia*

trilobata. *Phytochemistry Letters*. 17, pp. 304-309

Pichersky, E. & Raguso, R.A., 2016. Why do plants produce so many terpenoid compounds? *New Phytologist*. (in press)

Pickel, B. et al., 2012. Identification and characterization of a kunzeaol synthase from Thapsia garganica: implications for the biosynthesis of the pharmaceutical thapsigargin. *The Biochemical journal*, 448(2), pp.261–71.

Picman, A.K., 1986. Biological Activities of Sesquiterpene Lactones. *Biochemical Systematics and Ecology*, 14(3), pp.255–281.

Picman, A.K., Schneider, E.F. & Gershenzon, J., 1990. Antifungal activities of sunflower terpenoids. *Biochemical Systematics and Ecology*, 18(5). pp. 325-328

Ralston, L. et al., 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), pp.222–235.

Ramirez, A.M. et al., 2013. Biosynthesis of Sesquiterpene Lactones in Pyrethrum (*Tanacetum cinerariifolium*). *PLoS ONE*, 8(5). pp. e65030

Raupp, F.M. & Spring, O., 2013. New sesquiterpene lactones from sunflower root exudate as germination stimulants for *Orobanche cumana*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(44), pp.10481–10487.

Ren, Y., Yu, J. & Douglas Kinghorn, A., 2016. Development of anticancer agents from plant-derived sesquiterpene lactones. *Current Medicinal Chemistry*, 23(23). pp. 2397-2420

Ro, D. et al., 2006. Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. *Nature*, 440(April), pp.3–6.

Ro, D.-K. et al., 2008. Induction of multiple pleiotropic drug resistance genes in yeast engineered to produce an increased level of anti-malarial drug precursor, artemisinic acid. *BMC biotechnology*, 8, p.83.

Rodriguez, E., Towers, G.H.N.H.N. & Mitchell, J.C.C., 1976. Biological activities of sesquiterpene lactones. *Phytochemistry*, 15(11), pp.1573–1580.

Rossiter, M., Gershenzon, J. & Mabry, T.J., 1986. Behavioral and growth responses of specialist herbivore, *Homoeosoma electellum*, to major terpenoid of its host, *Helianthus* SPP. *Journal of Chemical Ecology*, 12(6).pp. 1505-1521

Ruzicka, L., 1953. The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds. *Experientia*, 9(10), pp.357–367.

Sass, D.C. et al., 2014. Structurally modified natural sesquiterpene lactones constitute effective and less toxic schistosomicidal compounds. *Organic & biomolecular chemistry*, 12(40), pp.7957–7964.

Scarponi, C. et al., 2014. Inhibition of inflammatory and proliferative responses of human keratinocytes exposed to the sesquiterpene lactones dehydrocostuslactone and costunolide. *PLoS ONE*, 9(9). e107904

Schmauder, K., 2015. Genexpressions- und Metabolitmuster von Sesquiterpenlactonen in Keimlingen der Sonnenblume. *Masterarbeit, Institut für Botanik, Universität Hohenheim*.

Schmidt, T.J., 1997. Helenanolide-type sesquiterpene lactones - III. Rates and stereochemistry in the reaction of helenalin and related helenanolides with sulfhydryl containing biomolecules. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 5(4). pp. 645-653

Schmidt, T.J., 1999. Toxic activities of sesquiterpene lactones: Structural and biochemical aspects. *Current Organic Chemistry*, 3(6). pp. 577-608

Schmidt, T.J., 2006. Structure-activity relationships of sesquiterpene lactones. *Studies in Natural Products Chemistry*.33(M) pp.309-392

Schramek, N. et al., 2010. Artemisinin biosynthesis in growing plants of Artemisia annua. A 13CO2 study. *Phytochemistry*, 71(2–3), pp.179–187.

Seaman, F.C., 1982. Sesquiterpene lactones as taxonomic characters in the asteraceae. *The Botanical Review*, 48(2), pp.121–594.

Seifert, A. & Pleiss, J., 2009. Identification of selectivity-determining residues in cytochrome P450 monooxygenases: A systematic analysis of the substrate recognition site 5. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 74(4). pp. 1028-1035

Shibaoka, H., 1961. Studies on the mechanism of growth inhibiting effect of light. *Plant and Cell Physiology*, 2(2). pp. 175-197

Siedle, B. et al., 2004. Quantitative structure-activity relationship of sesquiterpene lactones as inhibitors of the transcription factor NF-κB. *Journal of Medicinal Chemistry*, 47(24). pp. 6042-6054

Singh, I.P. et al., 1992. A biologically active guaianolide from Saussurea lappa. *Phytochemistry*, 31(7). pp. 2529-2531

Spring, O., Albert, K. & Gradmann, W., 1981. Annuithrin, a new biologically active germacranolide from *Helianthus annuus*. *Phytochemistry*, 20(8), pp.1883–1885.

Spring, O. & Hager, A., 1982. Inhibition of elongation growth by two sesquiterpene lactones isolated from *Helianthus annuus* L. - Possible molecular mechanism. *Planta*, 156(5). pp. 433-440

Spring, O., Albert, K. & Hager, A., 1982. Three biologically active heliangolides from Helianthus annuus. *Phytochemistry*, 21(10). pp. 2551-2553

Spring, O. & Bienert, U., 1987. Capitate Glandular Hairs from Sunflower Leaves: Development, Distribution and Sesquiterpene Lactone Content. *Journal of Plant Physiology*, 130(4–5), pp.441–448.

Spring, O., Bienert, U. & Klemt, V., 1987. Sesquiterpene Lactones in Glandular Trichomes of Sunflower Leaves. *Journal of Plant Physiology*, 130(4–5), pp.433–439.

Spring, O., 1989. Microsampling: an alternative approach using sesquiterpene lactones for systematics. *Biochemical Systematics and Ecology*, 17(7–8), pp.509–517.

Spring, O., Benz, T. & Ilg, M., 1989. Sesquiterpene lactones of the capitate glandular trichomes of *Helianthus annuus*. *Phytochemistry*, 28(3), pp.745–749.

Spring, O., Rodon, U. & Macias, F.A., 1992. Sesquiterpenes from Noncapitate Glandular Trichomes of *Helianthus annuus*. *Phytochemistry*, 31(5), pp.1541–1544.

Spring, O., 2000. Chemotaxonomy based on metabolites from glandular trichomes. *Advances in*

Botanical Research, 31, pp.153–174.

Spring, O. et al., 2003. Sesquiterpene lactones from glandular trichomes of *Viguiera radula* (Heliantheae; Asteraceae). *Phytochemistry*, 62(8), pp.1185–1189.

Spring, O. et al., 2015. The nonvolatile metabolome of sunflower linear glandular trichomes. *Phytochemistry*, 119, pp.83–89.

Spyropoulou, E.A., Haring, M.A. & Schuurink, R.C., 2014a. Expression of Terpenoids 1, a glandular trichome-specific transcription factor from tomato that activates the terpene synthase 5 promoter. *Plant Molecular Biology*, 84(3). pp. 345-357

Spyropoulou, E.A., Haring, M.A. & Schuurink, R.C., 2014b. RNA sequencing on Solanum lycopersicum trichomes identifies transcription factors that activate terpene synthase promoters. *BMC Genomics*, 15(1). Art. Nr. 402

Stewart, E. & Mabry, T.J., 1985. Further sesquiterpene lactones from *Helianthus maximiliani*. *Phytochemistry*, 24(11). pp. 2733-2734

Takahashi, S. et al., 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). pp. 31744-31754

Tamura, K. et al., 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), pp.2725–2729.

Thompson, J.D., Higgins, D.G. & Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22), pp.4673–4680.

Tu, Y., 2016. Artemisinin - A Gift from Traditional Chinese Medicine to the World (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie - International Edition*, 55(35), pp.10210–10226.

Tyagi, V. et al., 2016. Chemoenzymatic synthesis and antileukemic activity of novel C9- and C14-functionalized parthenolide analogs. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. pp. 3876-3886

Ueda, J. et al., 2013. Identification of dehydrocostus lactone and 4-hydroxy-β-thujone as auxin polar transport inhibitors. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35(7). pp. 2251-2258

Vandesompele, J. et al., 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology*, 3(7), p.RESEARCH0034.

Watanabe, K. et al., 1982. Sesquiterpene lactones and diterpenoids from *Helianthus argophyllus. Phytochemistry*, 21(3), pp.709–713.

Weinheimer, A.J. et al., 1970. Isolation of the elusive (−)-germacrene-a from the gorgonian, eunicea mammosa chemistry of coelenterates. XVIII. *Tetrahedron Letters*, 11(7), pp.497–500.

Werck-Reichhart, D. & Feyereisen, R., 2000. Cytochromes P450: a success story. *Genome biology*, 1(6). REVIEWS3003

Whittemore, A., Gershenzon, J. & J. Mabry, T., 1985. Sesquiterpene lactones from *Helianthus niveus* subsp. niveus. *Phytochemistry*, 24(4). pp. 783-785

Williams, P. a et al., 2000. Mammalian microsomal cytochrome P450 monooxygenase: structural adaptations for membrane binding and functional diversity. *Molecular cell*, 5(1), pp.121–131.

Wink, M., 2010. Introduction: Biochemistry, Physiology and Ecological Functions of Secondary Metabolites. *Biochemistry of Plant Secondary Metabolism: Second Edition*, 40, pp.1–19.

Wlodarczyk, A. et al., 2016. Metabolic engineering of light-driven cytochrome P450 dependent pathways into *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Metabolic Engineering*, 33. pp. 1-11

Yokotani-Tomita, K. et al., 1997. Light-induced auxin-inhibiting substance from sunflower seedlings. *Phytochemistry*, 46(3), pp.503–506.

Yokotani-Tomita, K. et al., 1999. 8-epixanthatin, a light-induced growth inhibitor, mediates the phototropic curvature in sunflower (*Helianthus annuus*) hypocotyls. *Physiologia Plantarum*, 106(3), pp.326–330.

Yu, F. et al., 2011. Zingiber zerumbet CYP71BA1 catalyzes the conversion of α-humulene to 8-hydroxy-α-humulene in zerumbone biosynthesis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(6). pp. 1033-1040

Yuan, X. et al., 2013. Cytotoxic constituents from the leaves of Jerusalem artichoke (Helianthus tuberosus L.) and their structure-activity relationships. *Phytochemistry Letters*, 6(1), pp.21–25.

Zhu, M. et al., 2014. Characterization of the Promoter of Artemisia annua Amorpha-4,11-diene Synthase (ADS) Gene Using Homologous and Heterologous Expression as well as Deletion Analysis. *Plant Molecular Biology Reporter*, 32(2). pp. 406-418

7 Anhang

7.1 Sequenzinformationen

7.1.1 Bekannte Gene

S 1: Liste in der Arbeit verwendeter, bereits veröffentlichter Gene

Name	Organismus	Accession Nr.	Einsatzbereich
HaEF1α	*Helianthus annuus*	AY094064	Referenzgene qPCR
HaTub	*Helianthus annuus*	AF401481	
HaAct	*Helianthus annuus*	AF282624	
HaFPS	*Helianthus annuus*	JX424564	Lokalisation im Genom
HaGAS2	*Helianthus annuus*	EU327785	
HaCS	*Helianthus annuus*	EU443250	
AaCR	*Artemisia annua*	DQ984181	Stoffwechsel-Rekonstruktion in
LsGAS2	*Lactuca sativa*	AF489965	Hefe
LsGAO	*Lactuca sativa*	GU198171	
HaGAS1	*Helianthus annuus*	DQ016667	Stoffwechsel Rekonstruktion in
HaGAO	*Helianthus annuus*	GU256646	Tabak
DXS	*Coleus forskohlii*	KP889115	
GGPPS	*Coleus forskohlii*	KP889116	
LsCOS	*Lactuca sativa*	HQ439599	Stoffwechsel Rekonstruktion in
HaG8H	*Helianthus annuus*	HQ439590	Tabak und Hefe
S1	*Helianthus annuus*	HQ439594	Re-evaluierte Enzym-
S2	*Helianthus annuus*	HQ439596	Kandidaten aus Ikezawa et al.
S3	*Helianthus annuus*	HQ439598	(2011)
C28	*Helianthus annuus*	HQ439593	
C100	*Helianthus annuus*	HQ439592	
TpCOS	*Tanacetum parthenium*	KC964545	Phylogenetische Einordnung
TpPTS	*Tanacetum parthenium*	KC954155	
Tp8878	*Tanacetum parthenium*	KC954153	

Anmerkung: Nicht explizit aufgeführt sind in Vektoren enthaltene regulatorische Gene wie p19, oder Gene zur Vermittlung von Antibiotika-Resistenzen. HaEF1α: *Helianthus annuus* Elongationsfaktor 1α, HaTub: *Helianthus annuus* α-Tubulin, HaAct: *Helianthus annuus* Actin, HaFPS: *Helianthus annuus* Farnesylpyrophosphat-Synthase, HaGAS1: *Helianthus annuus* Germacren A Synthase 1, HaGAS2: *Helianthus annuus* Germacren A Synthase 2, HaCS: *Helianthus annuus* Cadinen Synthase, AaCR: *Artemisia anuua* Cytochrom P450 Reduktase, LsGAS2: *Lactuca sativa* Germacren A Synthase 2, LsGAO: *Lactuca sativa* Germacren A Oxidase, HaGAO: *Helianthus annuus* Germacren A Oxidase, HaG8H: *Helianthus annuus* Germacren A Säure 8β-Hydroxylase, LsCOS: *Lactuca sativa* Costunolid Synthase, TpCOS: *Tanacetum parthenium* Costunolid Synthase, TpPTS: *Tanacetum parthenium* Parthenoild Synthase, Tp8878: *Tanacetum parthenium* Costunolid/Parthenoild 3β-Hydroxylase, DXS: *Coleus forskohlii* 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat-Synthase, GGPPS: *Coleus forskohlii* Geranylgeranyl Diphosphat Synthase.

7.1.2 Sequenzinformationen von Enzymkandidaten

Start- und Stopp-Codon sind jeweils fettgedruckt. Die Nucleotidsequenz der cDNA, sowie des entsprechenden Proteins sind angegeben.

M1

cDNA, 1497 bp

ATGGAACCTCTTATCATTTTCACCCTCATCGCATGTTCACTAGTTTTCTTATTCACGGCCTATTGGGCACTCTTAA
ATTTCAAGACAACAAAAAACTTGCCACCAGGACCACCAAAACTTCCAATAATTGGAAACATACACCAACTCAGA
GGTGGAGTACCACATCGAGTGCTTAGAAGCTTGGCCAGAAAATATGGCCCCATCATGTATCTACAGCTCGGAC
AAGTGCCAACAGTCGTTATCTCCACACCAAAACTAGCTCAAGAGATTTTCAAGACAAACGATGTCGTCTTTTCT
GACAGACCCACTACCATAGCATCCCAAATATTGTTTTATAAAGCTCAAGACATTGCATGGGCTCCTTACGGGAG
TTACTGGAGACAGATGAGAAAGATTTGTACGTTGGAGCTTCTTAGCGTCAAGAGAGTCCGATCGTATAGCTTT
ATTCGAGACGAAGAAATCATGCATATGCGTAAATCACTCAAATCATCAGCAGGAAGACCTTTGGTATTAAGGG
ATGTTCTGGTACAGCTGGTGAATGATGTGATTTGCAGGGCTACGGTTGGAGATATCTGCAAAGACCGATCCAC
ACTTATAGATGTACTATTTGATATTATGAGAGCTGTGACTTCGTTCAATATGGCATCAAATTTCCCTAGACTGCA
ATTCCTTAATGTTATTTCGGGGAAGCAAGCTAAGTGGTTGAAGAGGCAGAAACAGCTTGATATTATCTTGGAA
GACATCTTGGAGGACCACAAAAATAATAGACGAAGAGGTGACAATGACCAAGAAGATCTAGTTGATGTTCTAC
TAAGGATTAAAGAGAAGGGTGATCTGGATCAGCCCATCACAAACGACAACATCAAAGGCGTCATTCTGGACAT
GCTAATAGGTGGAACCAGTACCTCTTCAATGACACTTGAATGGGCGATGGTCGAACTAATGAGGAAGCCGGA
GATCATGAGGAAAGCGCAAGCGGAAGTAAGAGCAACAGCGAAGGGAAATACTATTGCAGACACTGACATTCA
AAATATGCATTACTTGAAGATGATTATAAAGGAAACATTTAGGCTACATGGTCCTCCAATTTTGGTTCCTAGAG
TAAGCAGGAAGGATTGTATGGTTGACAGATATAACATTCCAGTAAACACCAGGATACTTATAAATGCATGGGC
ATGCGGAACGGATCCCGACAGTTGGGAGAATCCTGATAGCTTTGTGCCGGAGAGATTTGAAAACAGTTCGATC
AGTTACATGGGTTCCGACTTTGAGCTCCTTCCATTTGGAGGTGGCAGGAGAATATGCCCTGGTATTGCTTTCGG
AGTTGGTATAATTGAAAATGCACTTGCTAATTTGTTGTTTCATTTCGACTGGGAGCTTCCAAATGGATTGAAAC
CCCATGAGATTGATATGACAGAAGCTATTGTGCTTTCCAATTTACCTAAAATTCCCTTGCAGGTTGTCCCTATCC
CTTTCTCGCAAGAAAAAATAAAA**TAG**

Protein, 499 AS

MEPLIIFTLIACSLVFLFTAYWALLNFKTTKNLPPGPPKLPIIGNIHQLRGGVPHRVLRSLARKYGPIMYLQLGQVPTVV
ISTPKLAQEIFKTNDVVFSDRPTTIASQILFYKAQDIAWAPYGSYWRQMRKICTLELLSVKRVRSYSFIRDEEIMHMRK
SLKSSAGRPLVLRDVLVQLVNDVICRATVGDICKDRSTLIDVLFDIMRAVTSFNMASNFPRLQFLNVISGKQAKWLK
RQKQLDIILEDILEDHKNNRRRGDNDQEDLVDVLLRIKEKGDLDQPITNDNIKGVILDMLIGGTSTSSMTLEWAMVE
LMRKPEIMRKAQAEVRRATAKGNTIADTDIQNMHYLKMIIKETFRLHGPPILVPRVSRKDCMVDRYNIPVNTRILINA
WACGTDPDSWENPDSFVPERFENSSISYMGSDFELLPFGGGRRICPGIAFGVGIIENALANLLFHFDWELPNGLKPH
EIDMTEAIVLSNLPKIPLQVVPIPFSQEKIK

M4

cDNA, 1485 bp

ATGGAGCCTTTCACAATTTTCTTCATCTTTGCTTCTTCCCTATTTCTCTACACATATTGGATACTCATAACCACCAA
GACAGCAAAAAACCTCCCACCAGGGCCCCCAAAGCTCCCCATTATAGGAAACATACACCTACTCGATAAACAA
AGACCACACCGAAAACTTACAAACTTGGCCCGAATATATGGTCCCATTATGCATTTACAACTCGGGCAAGTGTC
TACCGTCGTCATATCCTCACCGCAATTAGCCCGTGAGGTGTTGAAGATACAAGATATCAACTTTGCTGACAGAC
CTGCAACCACAACTGCTAAAATATTTTTTTATGAAGGTTCAAACATAGGATGGGCACCTTATGGGAACTATTGG
AGACAACTAAAGAAGTTTGCTACTTTAGAACTCCTTAGTGCCAAAAAGGTCCGATCATTTTTCTATATTCGAGA
GGACGAGCTTACTCGTGTGTCTAAATTTCTTGAATCTTCTTCCGGATCACCGATCAACTTTAGGGAGATGACTA
GACAGATAGTCAATAACATAGTTAGCAGGGCTACGTTAGGAGACGTCTGCAAAGATCGAAAAATCCTTCTAGA
AAATGTATATTTCATGTTGAGAACATTCAGTTCTTTTAACATGTCAAATTATTACCCTCGTTTGAATTTCCTCAAT
GTCATTTCTGGAAAGAAAGCTGAATGGTTGAAGATGCACAAAGAGATTGATTTGATCTTGGAAAAGATCATAG
AGGAACACAGAAGTAGACCACGTAACCCGGATGATCATGAAGATATAGTTGATATTCTACTACGAGTGAAGAA
TACCGGTGCTGGTTTTGATGAGCCCCTCACTAATGATCGTGTCAAAGCAATCATTCTAGAAATGTTAACGGCTG
GGACAAGTTCGTCTTCGATGACAATTGAATGGGCATTTTGTGAAATGATGAAGAACCCGGAGATAATGAGGA
AAGCGCAATCCGAAGTGAGGGAAGTGGTGAAGGGAGATTCGATCACGGAGGCCGACATACAAAGTATGGAT
TACATGAAGTTGATAGTAAAGGAAACAATGAGGTTACATTGTGTGCCTATTTTGCTTCCTAGACAGAACCCTGA
GAAGTGTATTGTAGACGGGTATGATATTCCTGCCAACACAAGGATACTTATAAATGCGTGGGCTTGTGCAACA
GATCCCGACACTTGGGAAAATCCTCACGGGTTCATACCAGAAAGATTTGAAAATAGTTCCATCGGTTTTTCGGG
TACTGACTTCGAGTTCCTTCCGTTTGGGGCCGGCAGGAGAATGTGCCCCGGTATGAACTTTGGGCTTGGTACG
GTTGAATATGTTATTGCTACTTTGTTGCATCGTTTCAACTGGAAGCTTCCTGAGGGAGTAACACCTGATGATCT
GGATATGAGAGAGCTTACTGCAATATCTACAGTGCCTATAAATCCCTTACATATTGTCCCTATCTCCGTATCAGA
ACCAAAT**TAG**

Protein, 494 AS

MEPFTIFFIFASSLFLYTYWILITTKTAKNLPPGPPKLPIIGNIHLLDKQRPHRKLTNLARIYGPIMHLQLGQVSTVVISSP
QLAREVLKIQDINFADRPATTTAKIFFYEGSNIGWAPYGNYWRQLKKFATLELLSAKKVRSFFYIREDELTRVSKFLESS
SGSPINFREMTRQIVNNIVSRATLGDVCKDRKILLENVYFMLRTFSSFNMSNYYPRLNFLNVISGKKAEWLKMHKEI
DLILEKIIEEHRSRPRNPDDHEDIVDILLRVKNTGAGFDEPLTNDRVKAIILEMLTAGTSSSSMTIEWAFCEMMKNPEI
MRKAQSEVREVVKGDSITEADIQSMDYMKLIVKETMRLHCVPILLPRQNPEKCIVDGYDIPANTRILINAWACATDP
DTWENPHGFIPERFENSSIGFSGTDFEFLPFGAGRRMCPGMNFGLGTVEYVIATLLHRFNWKLPEGVTPDDLDMR
ELTAISTVPINPLHIVPISVSEPN

C28B

cDNA, 1476 bp

ATGTCTTTCAACCTACAAGTTTTTCTCTTTTATTCTCTTCCTATAATTTTTGCCTTACTTGTTTCGAAATTATATTTT
TCATCCATAAAATCCCATAAAAACCTACCTCCATCTCCTCCAAGGTTACCATTAATAGGAAACCTTCACCAATTA
GGCGCGGGCATACACCGTGTCCTTCAATCCATGGCTAAGACTTATGGTCCACTCATCTTGCTTCACTTTGGTACT
GTGCCGGTAATTGTAGCCTCTTCCGTTGATGCAGCTAGAGAGATTATGAAAACCCATGATATAACATTTGCAAA
TAGGCCGTATTTAAGCACCATTAGTAAACTTTCTTATGACGGAAAAGATATAGCCTTTTCCAAATATGGAGAGC
AGTGGAGGCAACTCAAAAGTATTTCTGTACTCCATCTTTTAAGCAACAAAAGGGTTCAGTCGTACCGAAAAGT
GAGGGAGGATGAGGTGGCGAGTATGATAAAAAAGATTCAAGGAACCAATGAATCCGTTTTTAATTTGAGTGA
GTTCGTTGCTACCCTTACACATAATGTGATCTCTAGGGCAGCTTTGGGAAAGATATATGAAGGGATGGAGCTT
AAGCATTTGCTAGACCGGACTTTAGATTTGATGGGACGCTTTTGTTTTGCGAGCGTTTTTCCTTCGTTAGCATGG
ATGGATAGATTTACCGGATTAGAACGAGAAATTGAAAAACTTGTTAAAGATGTTGATGAGTTTTATGACGTTG
TAATTGACGAACATGTAAACAAGAAAGAGGGTGATGCTGAAGGCCAAGATCTTCTTGATATTTTATTAGAAAT
TCAAAAAGACAACTCGACGGGGTTTCATCTCGAGAAAAAGATGATTAAAGCTCTCATCTTGGAGGTGTTTAAT
GGTGGCACCGATACCACATCCACTAGCCTCGACTGGGCGATTGGCGAGCTACTACAAAACCCACATACAATGA
AAAAATTGCAACAAGAGGCACACACAGTAGGACAAGGAAGAGAAATGATCACCGAAGACGACTTAGACAATA
TGCCCTATCTAAAAGCCGTCCTCAAAGAAGCCCTACGATTACACGTTCCAGCTCCATTGCTTGTTCCCCGTGAAT
CAACAAAAGACGTTAAACTACTCGGCTACGACATCCCATCAGGTTCGCAAGTGATGATTAACGCATGGGCGAT
AGCAAGAGATCCTTTAATATGGGAAGAACCTGAAGAGTTTAGACCAGAGAGGTTCTTGAACACCGCTACTGAT
TATAAAGGTTTTCATTTCGAGTTTATACCATTTGGTGCTGGAAGACGAGGGTGTCCTGGTATTAGTTTTGCAAT
GATTATTAACGAAATTGTGTTGGCAAATTTGGTGTACAAGTTTGGATTTTCATTGTTGGGGAACGAGCCTATAG
ACATGACTGAGAGTGATGGTTTAACCGTTCATAGGAAGTTTCCTATACTTGTCAAAGCAACTCCTAGGGAG**TA
A**

Protein, 491 AS

MSFNLQVFLFYSLPIIFALLVSKLYFSSIKSHKNLPPSPPRLPLIGNLHQLGAGIHRVLQSMAKTYGPLILLHFGTVPVIV
ASSVDAAREIMKTHDITFANRPYLSTISKLSYDGKDIAFSKYGEQWRQLKSISVLHLLSNKRVQSYRKVREDEVASMIK
KIQGTNESVFNLSEFVATLTHNVISRAALGKIYEGMELKHLLDRTLDLMGRFCFASVFPSLAWMDRFTGLEREIEKLV
KDVDEFYDVVIDEHVNKKEGDAEGQDLLDILLEIQKDNSTGFHLEKKMIKALILEVFNGGTDTTSTSLDWAIGELLQN
PHTMKKLQQEAHTVGQGREMITEDDLDNMPYLKAVLKEALRLHVPAPLLVPRESTKDVKLLGYDIPSGSQVMINA
WAIARDPLIWEEPEEFRPERFLNTATDYKGFHFEFIPFGAGRRGCPGISFAMIINEIVLANLVYKFGFSLLGNEPIDMT
ESDGLTVHRKFPILVKATPRE

M19

cDNA, 1476 bp

ATGTCTTTCAACCTACAAGTTTTTGTCTTTTATTCTCTTCCTATAATCTTTGCCTTACTTGTTTGGAAATTATATTTT
TCTTCCAAAAAATCCCATAAAAACCTACCTCCATCTCCACCAAGGTTACCATTAATAGGAAACCTTCACCAATTA
GGCGTGGGCATGCACCGTGTCCTTCAATCCATGGCTAAGACTTATGGTCCACTCGTATTGGTTCACTTTGGTAC
TGTGCCGATAATTGTAGCCTCTTCGGTTGATGCAGCTAGAGAGATTATGAAAACCCATGATATAACATTTGCAA
ATAGGCCGTATTTAAGCACCATTAGTAAACTTTCTTATGACGGAAAAGATATAGCCTTTTCCAAATATGGAGAG
CAGTGGAGGCAACTCAAAAGTATTTCTGTACTCCATCTTTTAAGCAACAAAAGGGTTCAGTCGTACCGAAAAGT
GAGGGAGGATGAGGTGGCGAGTATGATAAAAAAGATTCAAGGAACCAATGAATCCGTTTTTAATTTGAGTGA
GTTCGTTGCTACCCTTACACATAATGTGATCTCTAGGGCAGCTTTGGGAAAGATATATGAAGGGATGGAGCTT
AAGCATTTGCTAGACCGGACTTTAGATTTGATGGGACGCTTTCGTTTTGCGAGCGTTTTTCCTTCGTTAGCATG
GATGGATAGATTTACCGGATTAGAACGAGAAATTGAAAAACTTGTTAAAGATGTTGATGAGTTTTATGACGTT
GTAATTGACGAACATGTAAACAAGAAAGAGGGTGATGCTGAAGGCCAAGATCTTCTTGATATTTTATTAGAAA
TTCAAAAAGACAACTCGACGGGGTTTCATCTCGAGAAAAAGATGATTAAAGCTCTCATCTTGGAGGTGTTTAAT
GGTGGCACCGATACCACATCCACTAGCCTCGACTGGGCGATTGCCGAGCTACTACGAAACCCACGTGCAATGA
AAAAATTGCAACAAGAGGCACACACAGTGGGACAAGGAAGAGAAATGATCACCGAAGACGACTTAGGCAAT
ATGCCCTATCTAAAAGCCGTCCTCAAAGAAACCCTACGATTACACGTTCCAGCTCCATTGCTTGTTCCCCGTGAA
TCAACAAAAGACGTTAAACTACTCGGCTACGACATCCCATTAGGTTCGCAAGTGATGATTAACGCATGGGCGA
TAGCAAGAGATCCTTTAATATGGGAAGAATCTGAAGAGTTCAAACCAGAGAGGTTCTTGAACAACAAAATGGA
TTATAAAGGTTTCGATTTCGAGTATACACCATTTGGTGCTGGAAGACGAGGGTGTCCTGCTATTAATTTTGCAA
TGATTATTAACGAAATTGTGTTGGCAAATTTGGTGTATAAGTTTGAATTTTCATTGCCGGGGAACGAGCCTGTA
GACATGACTGAGAGTGATGGTTTAACCGTTCATAGGAAGTTTCCTATACTTGTCAAAGCAACTCCTAGGGAG**T**
AG

Protein, 491 AS

MSFNLQVFVFYSLPIIFALLVWKLYFSSKKSHKNLPPSPPRLPLIGNLHQLGVGMHRVLQSMAKTYGPLVLVHFGTVP
IIVASSVDAAREIMKTHDITFANRPYLSTISKLSYDGKDIAFSKYGEQWRQLKSISVLHLLSNKRVQSYRKVREDEVAS
MIKKIQGTNESVFNLSEFVATLTHNVISRAALGKIYEGMELKHLLDRTLDLMGRFRFASVFPSLAWMDRFTGLEREIE
KLVKDVDEFYDVVIDEHVNKKEGDAEGQDLLDILLEIQKDNSTGFHLEKKMIKALILEVFNGGTDTTSTSLDWAIAELL
RNPRAMKKLQQEAHTVGQGREMITEDDLGNMPYLKAVLKETLRLHVPAPLLVPRESTKDVKLLGYDIPLGSQVMIN
AWAIARDPLIWEESEEFKPERFLNNKMDYKGFDFEYTPFGAGRRGCPAINFAMIINEIVLANLVYKFEFSLPGNEPVD
MTESDGLTVHRKFPILVKATPRE

M22A

cDNA, 1476 bp

ATGTCTTTCACTTTGCAAATTGTTCTCTTTTCTTCTCTTCCTTTGTTTCTTATCTGTCTTACATGGAAATTATATTTT
TCTTCTTCAAAATCTCATAAAAACCTACCGCCATCTCCACCAAAGTTACCACTCATAGGAAACCTTCACCAATTA
GGCTCAAGCCCTCATCGTGCCCTTCAATCCATGGCTCAGACCTATGGCTCACTCATGTTGCTTCATTTCGGAACT
GTTCCAGTTATTGTAGCTTCTTCTGTTGATGCAGCCAGAGAGATTATGAAAACCCATGATATAATATTTTCAAAC
AGGCCGTTTTCAAACATCGCCAGTAGAATTTTTTATGGCTCTAAAGATATAGCTTTTGCACCATACGGAGAGTA
TTGGAGGCAGGTGAAAAGCATTTCTATACTCCATCTTTTTAGCAACAAGAGGGTTGAGTCATTTCGACAAGTGA
GAGAGGACGAGGTAGCTCGTATGATCGAAAAAATTCAAAAAGCCAATAATTCTGTTGTTGATTTAAGCGAGTT
ACTTGTTTCACTTACAAATAACGTCGTCTCCAGGGTCGCTTTGGGGAGGACATATGAAGGGATGGAGGTTAAG
AACATGCTAGACCGGATGGTGCAATTAATGGCAGGATTTTCTATGGGAAATTATATTCCGTCGCTAGAGTGGG
TGGATCGATTGAGTGGATTACATCGAAAAGCTGATGACCTTGCTAAAGAAATTGATGAGTTTTGTGAGGGTGT
TGTCGAAGCGCATTTAAATAAGAAGGATTTTGGTGTCGAAGGACAAGATCTTGTTGATGTCTTATTAGAAATTC
AAAGAGACAACTCGACGGGTTTTCGTCTTGAAAGACATATGATCAAGGCTATTATCTTGGACATATTTAGTGGT
GGCACTGATACCACATCCACCACCCTACAATGGGCAATTACCGAGCTATTAAGAAACCCACGTGCAATGAAAG
AATTGCAACAAGAGGCACGCGAAATAGGACAAGGAAGATCACTGATACCCGAAGAAGATTTAGATAAAATGC
CCTACCTAAAGGCGGTCATCAAAGAAGCCTTCCGTCTACACATTCCAGCCCCACTACTTGTTCCTCGTGAATCAA
CAAAAGATGTTAAGCTACTCGGATATGACATCGCATCAGGTACACAAGTGGTGGTTAACGCATGGGCAATAGC
AAGAGATCCTTCGGTATGGGAAGAACCTGAGGAGTTTAGACCAGAAAGATTCTTGAACAACCCTATTGATTAT
AAAGGTTTTCATTTCGAGTTGATACCCTTTGGTGCTGGACGAAGAGGGTGCCCTGGTATTAATTTTGCAACGGT
TATTAATGAACTTGCTTTGGCAAATTTAGTGTATAAATTTGATTTTGCGTTGTCGGGTGAAAAGGCTTTCGACAT
GACCGAGAGCTATGGTATTACCGTTCATAGGAAGTATCCTATACTTGTTACAGCAACTTCTTATAAG**TAA**

Protein, 491 AS

MSFTLQIVLFSSLPLFLICLTWKLYFSSSKSHKNLPPSPPKLPLIGNLHQLGSSPHRALQSMAQTYGSLMLLHFGTVPVI
VASSVDAAREIMKTHDIIFSNRPFSNIASRIFYGSKDIAFAPYGEYWRQVKSISILHLFSNKRVESFRQVREDEVARMIE
KIQKANNSVVDLSELLVSLTNNVVSRVALGRTYEGMEVKNMLDRMVQLMAGFSMGNYIPSLEWVDRLSGLHRKA
DDLAKEIDEFCEGVVEAHLNKKDFGVEGQDLVDVLLEIQRDNSTGFRLERHMIKAIILDIFSGGTDTTSTTLQWAITEL
LRNPRAMKELQQEAREIGQGRSLIPEEDLDKMPYLKAVIKEAFRLHIPAPLLVPRESTKDVKLLGYDIASGTQVVVNA
WAIARDPSVWEEPEEFRPERFLNNPIDYKGFHFELIPFGAGRRGCPGINFATVINELALANLVYKFDFALSGEKAFDM
TESYGITVHRKYPILVTATSYK

M22B

cDNA, 1506 bp

ATGGGGAGATTTAGCAAGTCTATCAATATGTCTTTCACCTTGCAAGTTTTTATCTTCTCTTCTCTTCCTTTCATTAT
TGCCTTATTTCTTTTGAAATCATATCTTTCTTCTTCAAATTCCCACAAAAACCTTCCACCATCTCCACGAAAACTAC
CGTTAATTGGAAACCTTCACCAACTAGGCTCGAGCCCGCATCGTGCCTTTCATGCCATGGCTCAGACTTATGGT
CCACTCATGTTGATTCGCCTTGGTAGCATACCAGTACTTGTAGTCTCCACTGTTGATGCAGCTCGAGAAGTTAT
GAAAACTCATGATTTAGTATTTTCAAATAGGCCGAATTTAAGCATCCCTAGTAGACTTTTTTATGATTCCAAAGA
TATGGCTTTTGCACCATATGGAGAGTATTGGAGGCAGATAAAGAGCATTGCAGTGATACATCTTTTAAGCAAC
AAAAGGGTTCAGTCATATCGACACGTGAGAGAGGAGGAAATGTCCCTTATGATGGAGAAGATTCAAAAATCT
GATGAATCGGTTGTTAATATAAGCGAGTTACTTATTTCACTTACAAATAACGTAATATGTAGGGTGGCTTTGGG
TAGGAGGTATGATGGGAGGAAGTTTAACAACTTGTTAAAAAGCGCTTTAGAGTTATTAGGATGTTTTAGTGTC
GGGGCTTATATTCCGTCTCTAAGGTGGGTCGATCAACTAAGTGGATTAGAGCGAAGAGTTGATAAAGTTGCTA
AAGAATTTGATGAATTTTTAGAGGGTGTTCTAGAAGAACATGTAAACAAGAACCGGGTTGATGTTAAATGCGA
AGATCTTGTTGATGTTTTATTAGAAATTCAAAGAGATAACATGACCGGTTTTCCCCTTGAGGATGATATGATTA
AGGCTCTCATATTGGACATATTTATGGCTGGAACTGATACTACTTTCACAAGCCTAGAGTGGACACTCTGCGAG
CTATTAAGACACCCACAAGCAATGAAAGAACTGCAACAAGAAGCACTAAAAATAGGCCAAGGAAGATCAATG
ATTACCGAAGACCAACTAGAAAAAATGGTCTACCTAAAAGCAGTTCTTAAAGAAACCCTACGACTACACACTCC
AATTCCACTACTTGTTCCTCGTGAATCAACACAAGACGTCGAACTACTCGGCTATGACATCCCATCCGGCACAC
AAGTTATCATCAATGCATGGGCGATATCAAGAGACCCTTCAAAGTGGGAAGCGTCCGAGGAGTTTAGACCAG
AGAGATTCTTGAACAATCCTATCGACTATAAAGGGTTTCATTTCGAGTTGATACCATTCGGTGCTGGACGAAGA
GGGTGTCCAGCTATTCAATTTGCAATGATTATTAATCAACTTGTTTTGGCTAATTTGGTGTATAAGTTTGATTTG
GTCGTGATGGAGAAAGATCATGTCTTGGATATGAGCGAGACGAGTGGTCTTACTGTTCATAAGAAGCGTCCTA
TACTAGTTTCAGCAACTCCTATTGCT**TAA**

Protein, 501 AS

MGRFSKSINMSFTLQVFIFSSLPFIIALFLLKSYLSSSNSHKNLPPSPRKLPLIGNLHQLGSSPHRAFHAMAQTYGPLML
IRLGSIPVLVVSTVDAAREVMKTHDLVFSNRPNLSIPSRLFYDSKDMAFAPYGEYWRQIKSIAVIHLLSNKRVQSYRH
VREEEMSLMMEKIQKSDESVVNISELLISLTNNVICRVALGRRYDGRKFNNLLKSALELLGCFSVGAYIPSLRWVDQL
SGLERRVDKVAKEFDEFLEGVLEEHVNKNRVDVKCEDLVDVLLEIQRDNMTGFPLEDDMIKALILDIFMAGTDTTFT
SLEWTLCELLRHPQAMKELQQEALKIGQGRSMITEDQLEKMVYLKAVLKETLRLHTPIPLLVPRESTQDVELLGYDIP
SGTQVIINAWAISRDPSKWEASEEFRPERFLNNPIDYKGFHFELIPFGAGRRGCPAIQFAMIINQLVLANLVYKFDLV
VMEKDHVLDMSETSGLTVHKKRPILVSATPIA

M33

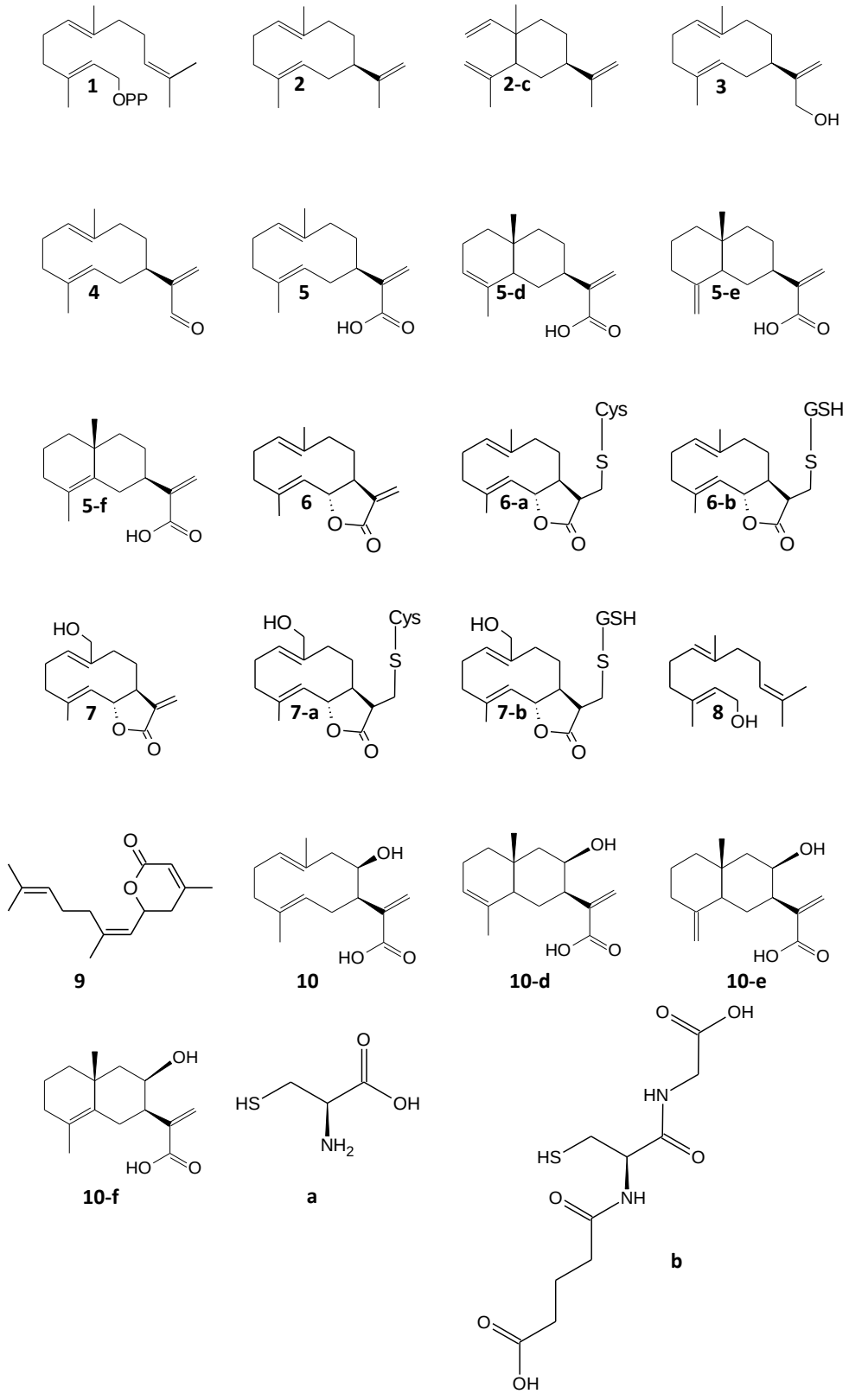
cDNA, 1491 bp

ATGTCTTTCAACCTACAAGTTTTTCTCTTTTATTCTCTTCCTATAATTTTTGCTTTACTTGTTTCGAAATTATATTTT
TCTTCCAAAAAATCCCATAAAAACTTACCTCCATCTCCACCAAGGTTACCATTAATAGGAAACCTTCACCAATTA
GGCTCAAGTACACACCGTGTCCTCCAATCCATGGCTCAGACCTATGGTCCCCTCATGTTGCTTCACTTTGGTACC
GTACCAGTAATTGTAGCCTCTTCTGCTGATGCGGCTAGAGAGATTACGAAAACCCATGATGTAATATTTTCAAA
TAGACCATTCATAAACATCGCTCATAGACTTTTTTATAACTCAAAAGATATAGGTTTTGCTCAATATGGAGAGTA
TTGGAGGCAGGTGAAAAGCATTGCCGTCCTCCATCTTTTAAGCAACAAAAGGGTTCAGTCATATCAACAAGTG
AGAGAGGACGAGGTGGCCCACTTGATCAAGAAGATTCAAGAATCCAATGAATCCGTTATTGATTTGTGTGAAT
TGCTTATTTCACTTACAAATAACGTAATTAGTAGGGTGGCTCTAGGAAGGACATATGAAGGGATGGGGGTTAA
TTACAAAAACATCCCAGTCCGGATTGGGGCGATGTTAGGACGCTTTTCTGTTGGTAGTTATATTCCATGGCTAG
CGTGGGTAGATAGACTGACTGGGTTACATCGAGAAGCTGATCAACTTGCTAAGGAAATTGATGAGTTTTATGA
GGGTGTCATTGAGGAGCATGTGAACAAGAAAGTGGTTGATGTGGAAGGCCAAGATCTTGTTGATATCTTATTA
GACCTTCAAAGAGATAACTCGACAGGTTTTGTTATTGAAAGATACACAATCAAGGGTATCATCATGGACTTATT
TGGTGCTGGCACTGAAACCACATTCACCAACCTAGAGTGGGCAATTAGTGAGCTCCTAAAAAACCCCCATGCA
ATGAAAGAACTGCAACAAGAGGCACGCAAAATAGGCAAAGGAAGATTAATGATCCCAGAAGACGACATAGAC
AAAATGCCATACCTAAAAGCTGTCATCAAAGAAACTCTACGACTACATGTTCCGGTTCCACTGCTCATTCCCCAT
GAATCAACGAAAGACGTCAACCTACTCGGCTACGACATCCCATCAGGTACACAAGTAATGATTAACGCATGGG
CGATAGCAAGAGATCCGTCAATATGGGAACATCCTGACGAGTTTAGACCAGAGAGGTTCTTGAACACCCCTAC
GGATTATAAAGGTTTTCATTTCGAGTTCATACCATTTGGTGCTGGAAGACGCAAGTGTCCTGGTATGGGTTTTG
CAATAGCTATTAACGAGCTTGCTTTGGCAAATTTAGTCTACAAGTTTGAATTTGCATTGGGTGAAGAGGGTTTG
GACATGACCGAGAGTGACGGTGTGACCGCTCATAGGAAGTATCCTATACTTGTAACTGCAACCCCTTTTCTCGG
TGACTCCATG**TGA**

Protein, 496 AS

MSFNLQVFLFYSLPIIFALLVSKLYFSSKKSHKNLPPSPPRLPLIGNLHQLGSSTHRVLQSMAQTYGPLMLLHFGTVPVI
VASSADAAREITKTHDVIFSNRPFINIAHRLFYNSKDIGFAQYGEYWRQVKSIAVLHLLSNKRVQSYQQVREDEVAHL
IKKIQESNESVIDLCELLISLTNNVISRVALGRTYEGMGVNYKNIPVRIGAMLGRFSVGSYIPWLAWVDRLTGLHREA
DQLAKEIDEFYEGVIEEHVNKKVVDVEGQDLVDILLDLQRDNSTGFVIERYTIKGIIMDLFGAGTETTFTNLEWAISEL
LKNPHAMKELQQEARKIGKGRLMIPEDDIDKMPYLKAVIKETLRLHVPVPLLIPHESTKDVNLLGYDIPSGTQVMINA
WAIARDPSIWEHPDEFRPERFLNTPTDYKGFHFEFIPFGAGRRKCPGMGFAIAINELALANLVYKFEFALGEEGLDM
TESDGVTAHRKYPILVTATPFLGDSM

7.2 Übersicht über Enzymprodukte, sowie Nebenprodukte und Zwischenprodukte

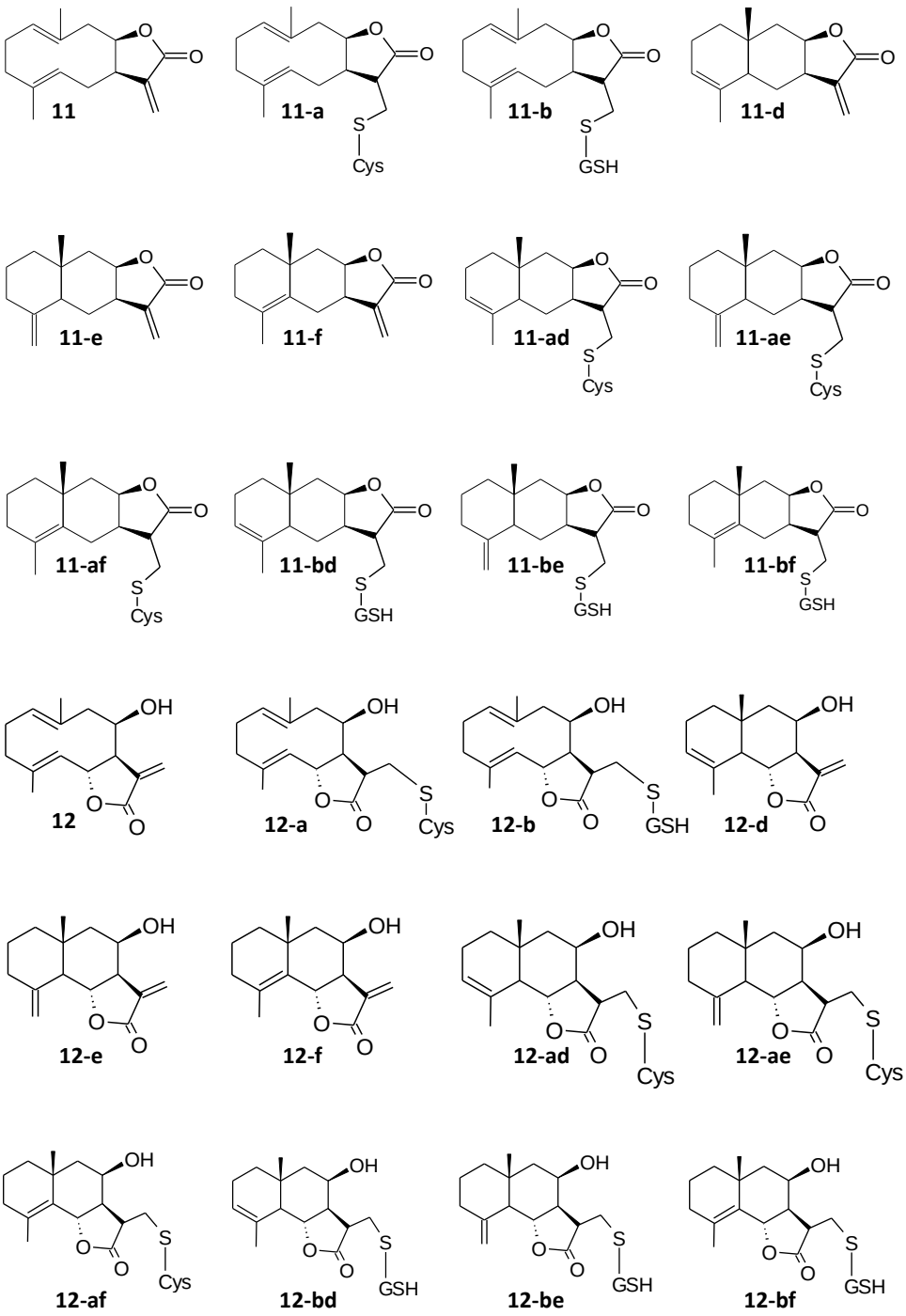


S 2: Enzymprdukte, Teil 1

S 3: Nachweis der Enzymprodukte, Teil 1

Nr.	Bezeichnung	M	Peak		Nachweis
			N.t.	*S.c.*	*N.t./S.c.*
1	Farnesyl-PP	382	-	-	-/-
2	Germacren A	204	-	-	Über 2c/-
2-c	β-Elemen	204	**a**	-	MS^2; Abgleich Spektrum/-
3	Germacren A Alkohol	220	-	-	-/-
4	Germacren A Aldehyd	218	-	-	-/-
5	Germacren A Säure	234	**b-e**	**I**	MS/ MS^2
5-d	α-Costus-Säure	234	**b-e**	-	MS/-
5-e	β-Costus-Säure	234	**b-e**	-	MS/-
5-f	γ-Costus-Säure	234	**b-e**	-	MS/-
6	Costunolid	232	**h**	**II**	MS/ NMR, MS^2, Ref. Subst.
6-a	Costunolid-Cystein	353	**f**	-	MS^2, Ref. Subst. Synth./-
6-b	Costunolid-GSH	539	**g**	-	MS, Ref. Subst. Synth./-
7	14-Hydroxy-Costunolid	248	-	**IV**	NMR, MS^2/-
7-a	14-Hydroxy-Costunolid-Cystein	369	**i**	-	MS^2, Ref. Subst. Synth./-
7-b	14-Hydroxy-Costunolid-GSH	555	**k**	-	MS, Ref. Subst. Synth./-
8	Farnesol	222	-	-	-/-
9	Farnesyl-δ-Lacton	234	-	**V**	-/NMR, MS^2
10	8β-Hydroxy-Germacren A Säure	250	-	**III**	-/MS^2
10-d	8β-Hydroxy-α-Costus-Säure	250	-	-	-/-
10-e	8β-Hydroxy-β-Costus-Säure	250	-	-	-/-
10-f	8β-Hydroxy-γ-Costus-Säure	250	-	-	-/-
a	Cystein	121	-	-	-/-
b	Glutathion (GSH)	307	-	-	-/-

N. t: *Nicotiana benthamiana, S. c.*: *Saccharomyces cervisiae*



S 4: Enzymprdukte, Teil 2

S 5: Nachweis der Enzymprodukte, Teil 2

Nr.	Bezeichnung	M	Peak		Nachweis
			N.t.	*S.c.*	*N.t.*
11	Inunolid	232	*****	-	MS
11-a	Inunolid-Cystein	353	**l**	-	MS
11-b	Inunolid-GSH	539	**n**	-	MS
11-d	α-Isoalantolacton	232	**-**	-	-
11-e	β-Isoalantolacton	232	**-**	-	-
11-f	γ-Isoalantolacton	232	**-**	-	-
11-ad	α-Isoalantolacton-Cystein	353	**m****	-	MS
11-ae	β-Isoalantolacton-Cystein	353	**m****	-	MS
11-af	γ-Isoalantolacton-Cystein	353	**m****	-	MS
11-bd	α-Isoalantolacton-GSH	539	**n****	-	MS
11-be	β-Isoalantolacton-GSH	539	**n****	-	MS
11-bf	γ-Isoalantolacton-GSH	539	**n****	-	MS
12	8β-Hydroxy-Costunolid	248	**-**	-	-
12-a	8β-Hydroxy-Costunolid-Cystein	369	**p**	-	MS^2, Ref. Subst. Synth.
12-b	8β-Hydroxy-Costunolid-GSH	555	**t**	-	MS, Ref. Subst. Synth.
12-d	8β-Hydroxy-α-Cyclocostunolid	248	**-**	-	-
12-e	8β-Hydroxy-β-Cyclocostunolid	248	**-**	-	-
12-f	8β-Hydroxy-γ-Cyclocostunolid	248	**-**		-
12-ad	8β-Hydroxy-α-Cyclocostunolid-Cystein	369	**q-s**	-	MS^2
12-ae	8β-Hydroxy-β-Cyclocostunolid-Cystein	369	**q-s**	-	MS^2
12-af	8β-Hydroxy-γ-Cyclocostunolid-Cystein	369	**q-s**	-	MS^2
12-bd	8β-Hydroxy-α-Cyclocostunolid-GSH	555	**u-w**	-	MS
12-be	8β-Hydroxy-β-Cyclocostunolid-GSH	555	**u-w**	-	MS
12-bf	8β-Hydroxy-γ-Cyclocostunolid-GSH	555	**u-w**	-	MS

N. t: *Nicotiana benthamiana*, *S. c.*: *Saccharomyces cervisiae;* (*) In Spuren nachgewiesen, kein Peak zugeordnet, (**) breiter Peak

S 6: Alternative Bezeichnungen der Metabolite

Verbindung	Alternative Bezeichnung
8β-Hydroxy-Costunolid	Eupatolid
9β-Hydroxy-Costunolid	Haageanolid
8β,14-Dihydroxy-Costunolid	Desacetylovatifolin
γ-Cyclocostunolid	Arbusculin B
β-Isoalantolacton	Isoalantolacton
γ-Isoalantolacton	1-Deoxyivangustin

S 7: Übersicht über gemessene Peaks

Peak	Produkt	System	M	Rt (min)	Nr. in Schema
I	Germacren A Säure	Hefe, HPLC	234	9,35	5
II	Costunolid	Hefe, HPLC	232	15,61	6
III	8β-Hydroxy-Germacren A Säure	Hefe, HPLC	250	11,50	10
IV	14-Hydroxy-Costunolid	Hefe, HPLC	248	5,55	7
V	Farnesyl-δ-Lacton	Hefe, HPLC	234	10,19	9
a	β-Elemen	Tabak, GC-MS	204	8,00	2c
b	[GAO Produkt]	Tabak, LC-MS	234	8,9	5, 5d-5f
c	[GAO Produkt]	Tabak, LC-MS	234	9,2	5, 5d-5f
d	[GAO Produkt]	Tabak, LC-MS	234	9,7	5, 5d-5f
e	[GAO Produkt]	Tabak, LC-MS	234	10,44	6a
f	Costunolid-Cystein	Tabak, LC-MS	353	9,00	6a
g	Costunolid-GSH	Tabak, LC-MS	353	9,15	6b
h	Costunolid	Tabak, LC-MS	232	14,18	6
i	14-Hydroxy-Costunolid-Cystein	Tabak, LC-MS	369	6,29	7a
k	14-Hydroxy-Costunolid-GSH	Tabak, LC-MS	555	6,68	7b
l	Inunolid-Cystein	Tabak, LC-MS	353	9,25	11a
m	[Nebenprodukte HaG8H]	Tabak, LC-MS	353	9,43	11a-d
n	Inunolid-GSH	Tabak, LC-MS	539	9,42	11b
o	[Nebenprodukte HaG8H]	Tabak, LC-MS	539	9,60	11b-d
p	8β-Hydroxy-Costunolid-Cystein	Tabak, LC-MS	369	8,32	12a
q	[Nebenprodukt HaG8H+S2]	Tabak, LC-MS	369	7,52	12a-d,e,f
r	[Nebenprodukt HaG8H+S2]	Tabak, LC-MS	369	7,94	12a-d,e,f
s	[Nebenprodukt HaG8H+S2]	Tabak, LC-MS	369	8,08	12a-d,e,f
t	8β-Hydroxy-Costunolid-GSH	Tabak, LC-MS	555	8,34	12b
u	[Nebenprodukt HaG8H+S2]	Tabak, LC-MS	555	7,64	12b-d,e,f
v	[Nebenprodukt HaG8H+S2]	Tabak, LC-MS	555	8,08	12b-d,e,f
w	[Nebenprodukt HaG8H+S2]	Tabak, LC-MS	555	8,22	12b-d,e,f

7.3 Zusatzinformationen zur Enzymcharakterisierung in Hefe

S 8: Optimierung der Produktion von Germacren A Säure und 8β-Hydroxy-Germacren A Säure

Genkombination	Klon#	GAA [FE/ml x10^6]	8β-OH-GAA [FE/ml x10^6]	Verhältnis 8β-OH-GAA/GAA
GAS/GAO/CR	1	2,0	-	-
	2	0,0	-	-
	3	2,6	-	-
	4 (*)	4,0	-	-
	5	3,0	-	-
GAS/GAO/CR/HaG8H	1	1,1	4,0	3,6
	2	0,7	1,8	2,5
	3	0,3	0,7	2,7
GAS/GAO/CR/HaG8H$_{synth}$	1 (*)	0,2	3,6	17,7
	2	0,1	1,8	24,8
	3	0,2	2,9	13,3

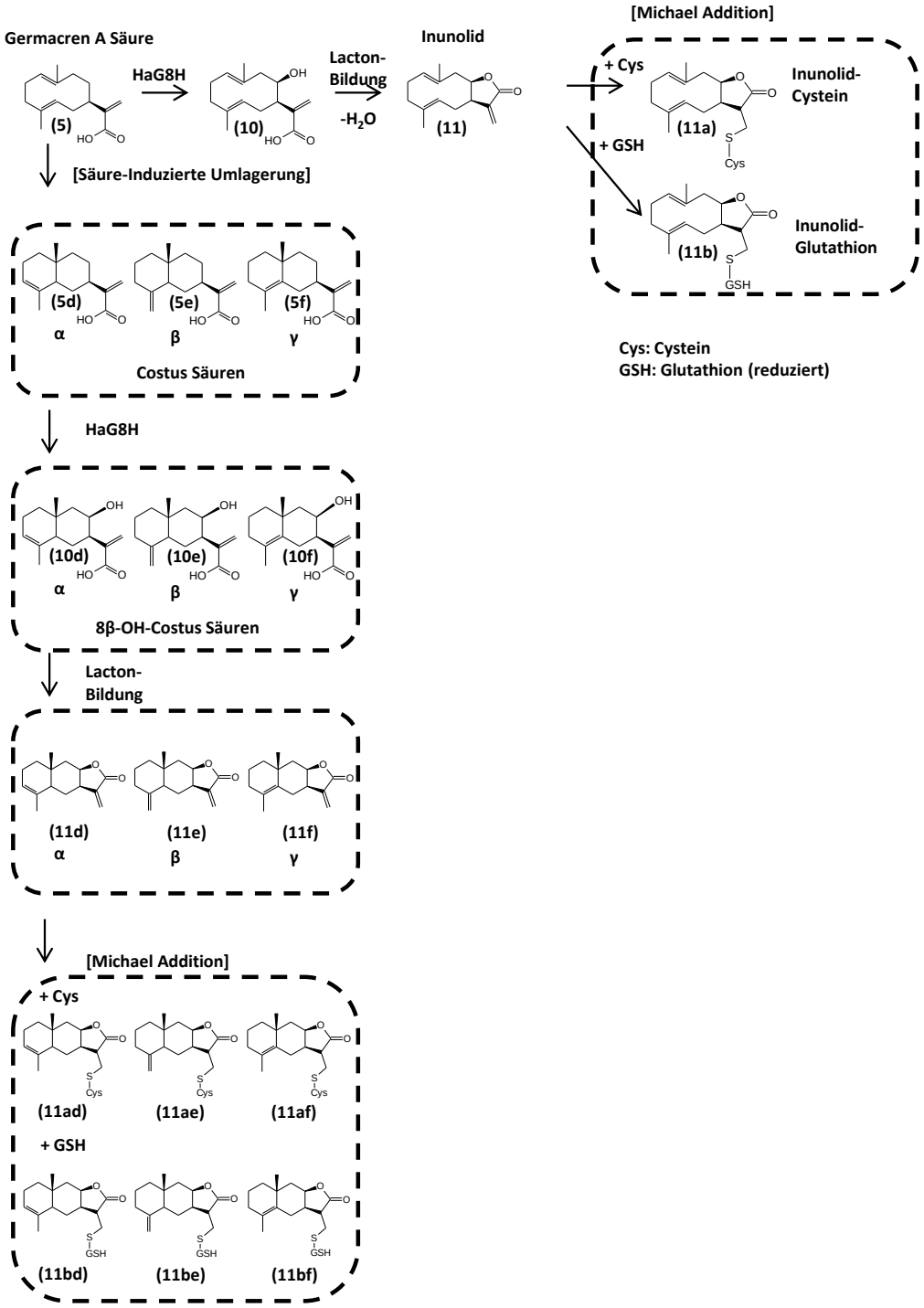
FE: Flächeneinheiten in [mAU*s], GAA: Germacren A Säure, 8β-OH-GAA, 8β-OH-Germacren A Säure, (*): Für subsequente Transformation mit Kandidaten-Vektoren ausgewählter Klon.

S 9: Optimierung der Produktion für Costunolid

Genkombination	Klon #	GAA [FE/ml x10^6]	Costunolid [FE/ml x10^6]	[µg/ml]	Verhältnis. Costunolid/GAA
GAS/GAO/CR/LsCOS	1	1,1	5,9	2,55	5,5
	2	1,1	6,9	2,96	6,3
	3 (*)	1,6	8,2	3,53	5,2
	4	0,8	4,1	1,77	5,2
	5	0,6	3,0	1,28	5,4

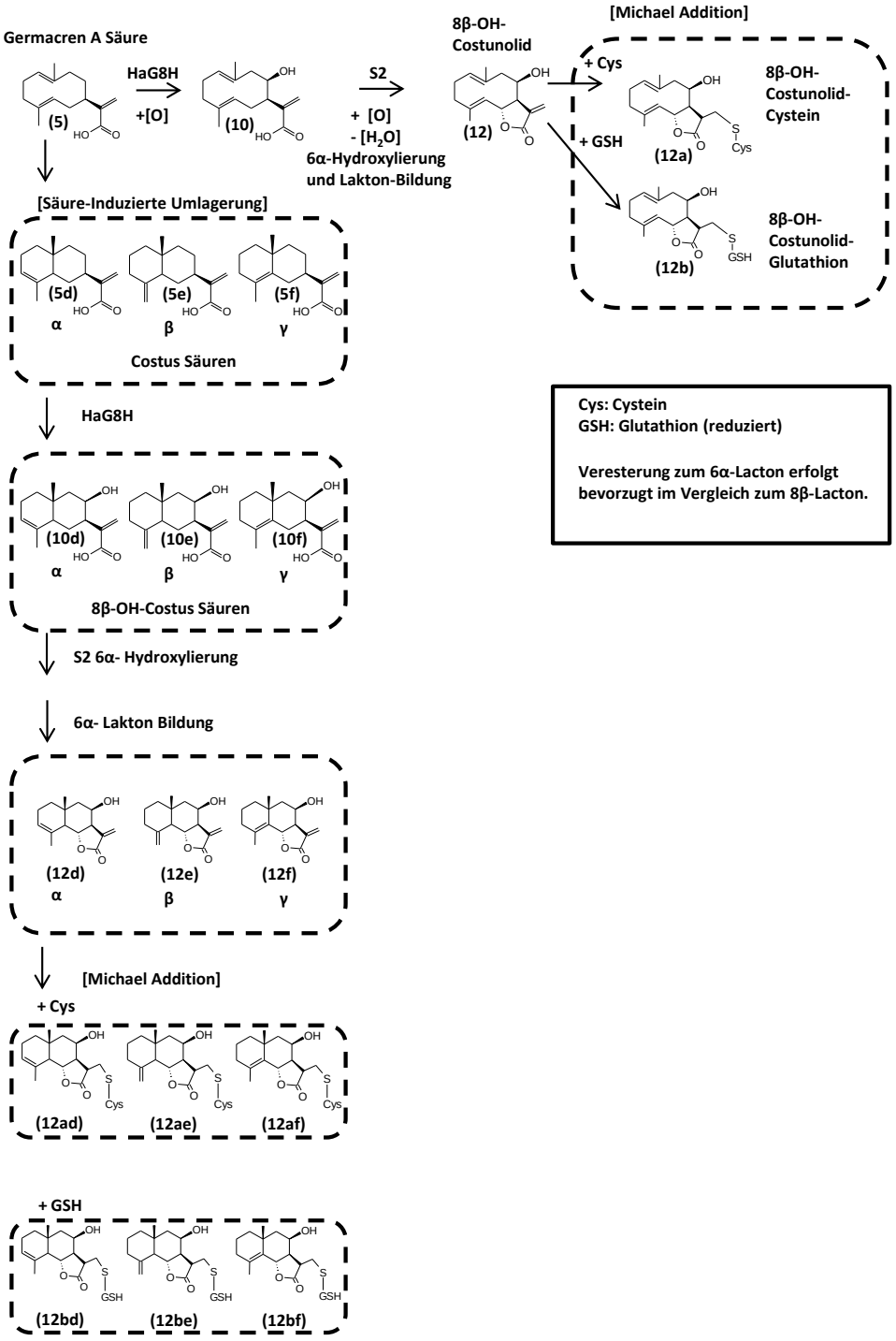
FE: Flächeneinheiten in [mAU*s], GAA: Germacren A Säure, 8β-OH-GAA, 8β-OH-Germacren A Säure. (*): Für subsequente Transformation mit Kandidaten-Vektoren ausgewählter Klon.

7.4 Zusatzinformationen zur Enzymcharakterisierung in *Nicotiana benthamiana*



S 10: Postulierte Nebenprodukte HaG8H *in planta*

Germacren A Säure (5) wird durch HaG8H in 8β-OH-Germacren A Säure (10) umgewandelt. Lacton-Bildung von 8β-OH-Germacren A Säure (10) führt zu Inunolid (Inu) (11), dieses wird zu Inunolid-Cystein (11a) oder Inunolid-Glutathion (11b) umgewandelt. Durch Säure-induzierte Umlagerung können aus (5) die Costus-Säuren entstehen (5d, 5e, 5f). Analog dazu können aus 8β-OH-Germacren A Säure (10) die 8β-OH-Costus-Säuren entstehen (10d, 10e, 10f). 8β-Lactonisierung führt zu (11d, 11e, 11f). Daraus entstehen die Cystein-Addukte (11ad, 11ae, 11af) und die Glutathion-Addukte (11bd, 11be, 11bf).



S 11: Postulierte Nebenprodukte [HaG8H + S2] *in planta*

Germacren A Säure (5) wird von HaG8H in 8β-OH-Germacren A Säure (8β-OH-GAA, 10) umgewandelt. Lacton-Bildung zum 6α-Lacton erfolgt bevorzugt zum 8β-Lacton. 6α-Hydroxylierung und Lactonisierung von 8β-OH-GAA (10) zu 8β-OH-Costunolid (12). Aus (12) entsteht das Cystein-Addukt (12a) und das Glutathion-Addukt (12b). Entstehung von 8β-OH-Costus-Säuren (10d, 10e, 10f) wie in (S 10). 6α-Lactonisierung zu (12d, 12e, 12f). Aus (12d, 12e, 12f) entstehen die Cystein-Addukte (12ad, 12ae, 12af) und die Glutathion-Addukte (12bd, 12be, 12bf).

7.5 Rohdaten LC-MS Extrakte *Nicotiana benthamiana*

Peakhöhe, Intensität

2

	Nachweis	Wt	p19/DXS	p19/DXS + GAS	p19/DXS+ GAS+GAO	p19/DXS+GAS+GAO+LsCOS	p19/DXS + GAS+GAO+M4	p19/DXS + GAS+GAO+LsCOS+ M33	p19/DXS + GAS+GAO+HaG8H	p19/DXS + GAS+GAO+HaG8H+S2	p19/DXS + GAS+GAO+HaG8H+M4
Germacren A	MS^2 (Abgl.	0	0	++	0	0	0	0	0	0	0
		0	0	+++	0	0	0	0	0	0	0
		0	0	++	0	0	0	0	0	0	0
		0	**0**	**++**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**

5

	Nachweis	Wt	p19/DXS	p19/DXS + GAS	p19/DXS+ GAS+GAO	p19/DXS+GAS+GAO+LsCOS	p19/DXS + GAS+GAO+M4	p19/DXS + GAS+GAO+LsCOS+ M33	p19/DXS + GAS+GAO+HaG8H	p19/DXS + GAS+GAO+HaG8H+S2	p19/DXS + GAS+GAO+HaG8H+M4
Germacren A Säure	EIC	0	0	0	52580	0	1632	0	978	0	0
		0	0	0	88177	0	1183	0	841	0	0
		0	239	0	363	0	3137	0	0	0	0
		0	**80**	**0**	**47040**	**0**	**1984**	**0**	**910**	**0**	**0**
Stabw.		**0**	**138**	**0**	**44168**	**0**	**1023**	**0**	**97**	**0**	**0**

6

	Nachweis	Wt	p19/DXS	p19/DXS + GAS	p19/DXS+ GAS+GAO	p19/DXS+GAS+GAO+LsCOS	p19/DXS + GAS+GAO+M4	p19/DXS + GAS+GAO+LsCOS+ M33	p19/DXS + GAS+GAO+HaG8H	p19/DXS + GAS+GAO+HaG8H+S2	p19/DXS + GAS+GAO+HaG8H+M4
Costunolid	EIC+RC	0	0	0	0	600	535	300	0	0	0
		0	0	0	0	700	703	500	0	0	0
		0	0	0	0	300	1683	0	0	0	0
		0	**0**	**0**	**0**	**533**	**974**	**267**	**0**	**0**	**0**
Stabw.		**0**	**0**	**0**	**0**	**208**	**620**	**252**	**0**	**0**	**0**
Costunolid-Cystein	EIC+RC (sy	317	0	0	42245	909010	1604236	976210	0	0	35098
		0	0	0	0	1480348	1716751	2031313	0	254	558216
		0	0	0	0	424549	3283465	2124050	0	0	431243
		106	**0**	**0**	**14082**	**937969**	**2201484**	**1710524**	**0**	**85**	**341519**
Stabw.		**183**	**0**	**0**	**24390**	**528495**	**938710**	**637623**	**0**	**147**	**272857**
Costunolid-GSH	EIC	0	0	0	9632	18750	556690	78120	0	0	1303
		0	0	0	0	199651	531280	93262	0	0	28070
		0	0	0	276	17602	728749	232070	0	0	15690
		0	**0**	**0**	**3303**	**78668**	**605573**	**134484**	**0**	**0**	**15021**
Stabw.		**0**	**0**	**0**	**5483**	**104776**	**107427**	**84850**	**0**	**0**	**13396**

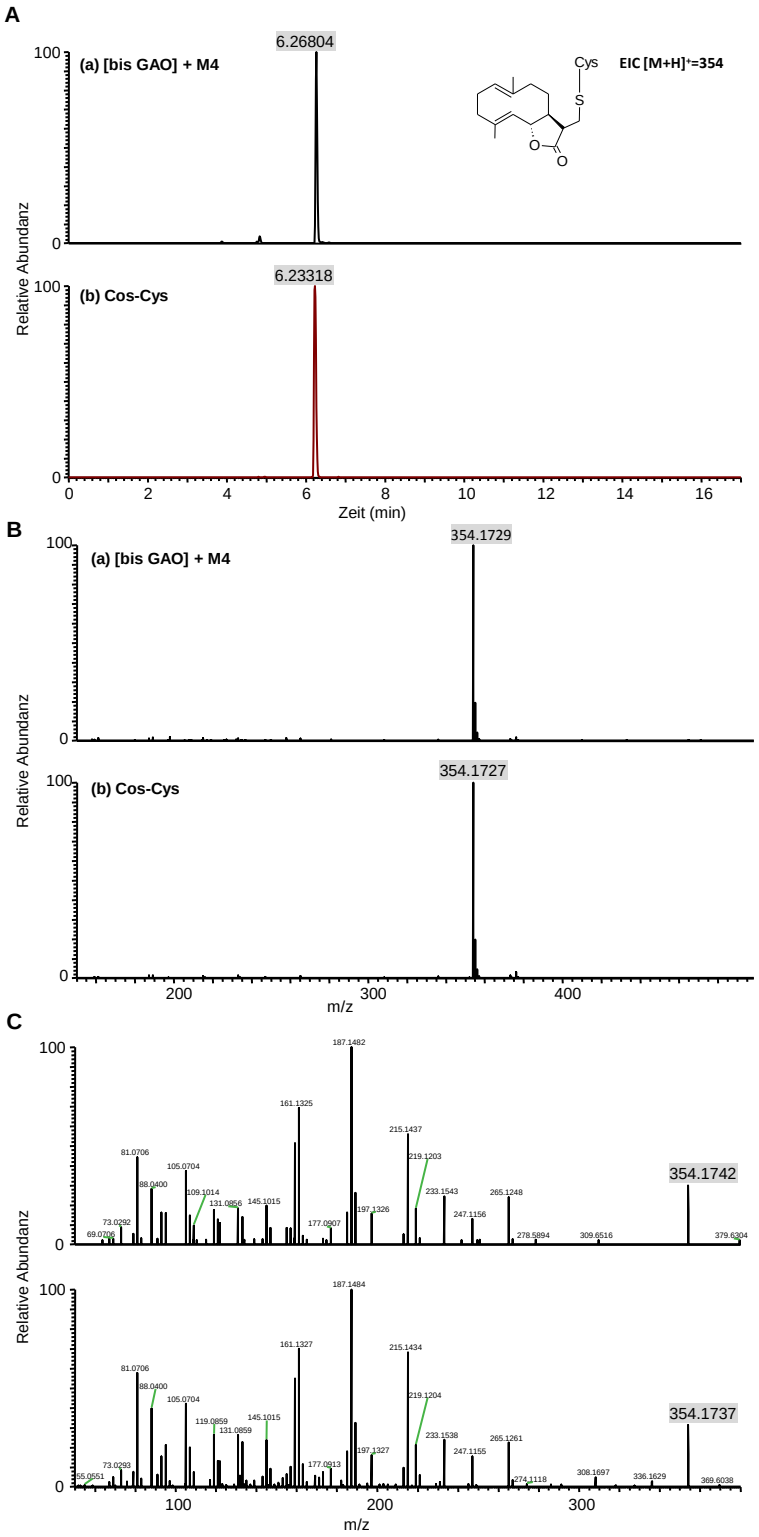
7	Nachweis	Wt	p19/DXS	p19/DXS + GAS	p19/DXS+ GAS+GAO	p19/DXS+GAS+GAO+LsCOS	p19/DXS + GAS+GAO+M4	p19/DXS + GAS+GAO+LsCOS+ M33	p19/DXS + GAS+GAO+HaG8H	p19/DXS + GAS+GAO+HaG8H+S2	p19/DXS + GAS+GAO+HaG8H+M4
14-OH-Costunolid	EIC+RC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		0	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**
Stabw.		**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**
14-OH-Costunolid-Cystein	EIC+RC (sy	0	0	0	0	523	0	58147	1436	1708	0
		0	0	0	0	759	0	243973	1640	0	0
		0	0	0	0	470	0	205555	0	0	0
		0	**0**	**0**	**0**	**470**	**0**	**169225**	**718**	**#DIV/0!**	**0**
Stabw.		**0**	**#DIV/0!**	**0**	**0**	**#DIV/0!**	**0**	**98096**	**1015**	**#DIV/0!**	**0**
14-OH-Costunolid-GSH	EIC	0	0	0	0	0	343	2686	0	0	0
		0	0	0	0	0	0	3695	0	0	0
		0	0	0	472	0	0	8463	0	0	0
		0	**0**	**0**	**0**	**0**	**114**	**4948**	**0**	**0**	**0**
Stabw.		**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**198**	**3086**	**0**	**0**	**0**

11	Nachweis	Wt	p19/DXS	p19/DXS + GAS	p19/DXS + GAS+GAO	p19/DXS + GAS+GAO+LsCOS	p19/DXS + GAS+GAO+M4	p19/DXS + GAS+GAO+LsCOS+ M33	p19/DXS + GAS+GAO+HaG8H	p19/DXS + GAS+GAO+HaG8H+S2	p19/DXS + GAS+GAO+HaG8H+M4
Inunolid	EIC (MS^2)	0	0	0	0	0	0	0	1675	1336	0
		0	0	0	0	0	0	0	3556	1121	639
		0	0	278	0	0	0	0	0	1629	312
		0	**0**	**93**	**0**	**0**	**0**	**0**	**1744**	**1629**	**317**
Stabw.		**0**	**0**	**161**	**0**	**0**	**0**	**0**	**1779**	**#DIV/0!**	**320**
Inunolid-Cystein	EIC (MS^2)	0	0	0	0	0	0	0	381510	118437	1985
		0	0	0	0	0	0	0	581004	7785	58112
		0	0	0	0	0	0	0	3580	93754	36569
		0	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**322031**	**73325**	**32222**
Stabw.		**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**293271**	**58086**	**28315**
Inunolid-GSH	EIC (MS^2)	0	477	0	0	0	0	0	11045	1868	354
		0	266	0	335	0	0	0	17125	386	3656
		0	275	0	0	0	0	0	405	1934	2120
		0	**339**	**0**	**168**	**0**	**0**	**0**	**9525**	**1396**	**2043**
Stabw.		**0**	**119**	**0**	**237**	**0**	**0**	**0**	**8463**	**875**	**1652**

12	Nachweis	Wt	p19/DXS	p19/DXS + GAS	p19/DXS + GAS + SlGAO	p19/DXS + GAS + SlGAO + LsCOS	p19/DXS + GAS + SlGAO + M4	p19/DXS + GAS + SlGAO + LsCOS + M33	p19/DXS + GAS + SlGAO + HaG8H	p19/DXS + GAS + SlGAO + HaG8H + S2	p19/DXS + GAS + SlGAO + HaG8H + M4
8β-OH-COS	EIC+RC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		0	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**
Stabw.		**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**
8β-OH-COS-Cys	EIC+RC (sy	0	0	0	0	0	0	0	0	137559	3430
		0	0	0	0	0	0	0	0	990	91220
		0	0	0	0	0	0	0	0	32726	101926
		0	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**57092**	**65525**
Stabw.		**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**71471**	**54042**
8β-OH-COS-GSH	EIC	0	0	0	438	0	0	0	428	2934	522
		0	0	0	0	0	0	0	527	0	5986
		0	0	0	0	0	0	0	0	1229	5104
		0	**0**	**0**	**146**	**0**	**0**	**0**	**318**	**1388**	**3871**
Stabw.		**0**	**0**	**0**	**253**	**0**	**0**	**0**	**280**	**1473**	**2933**

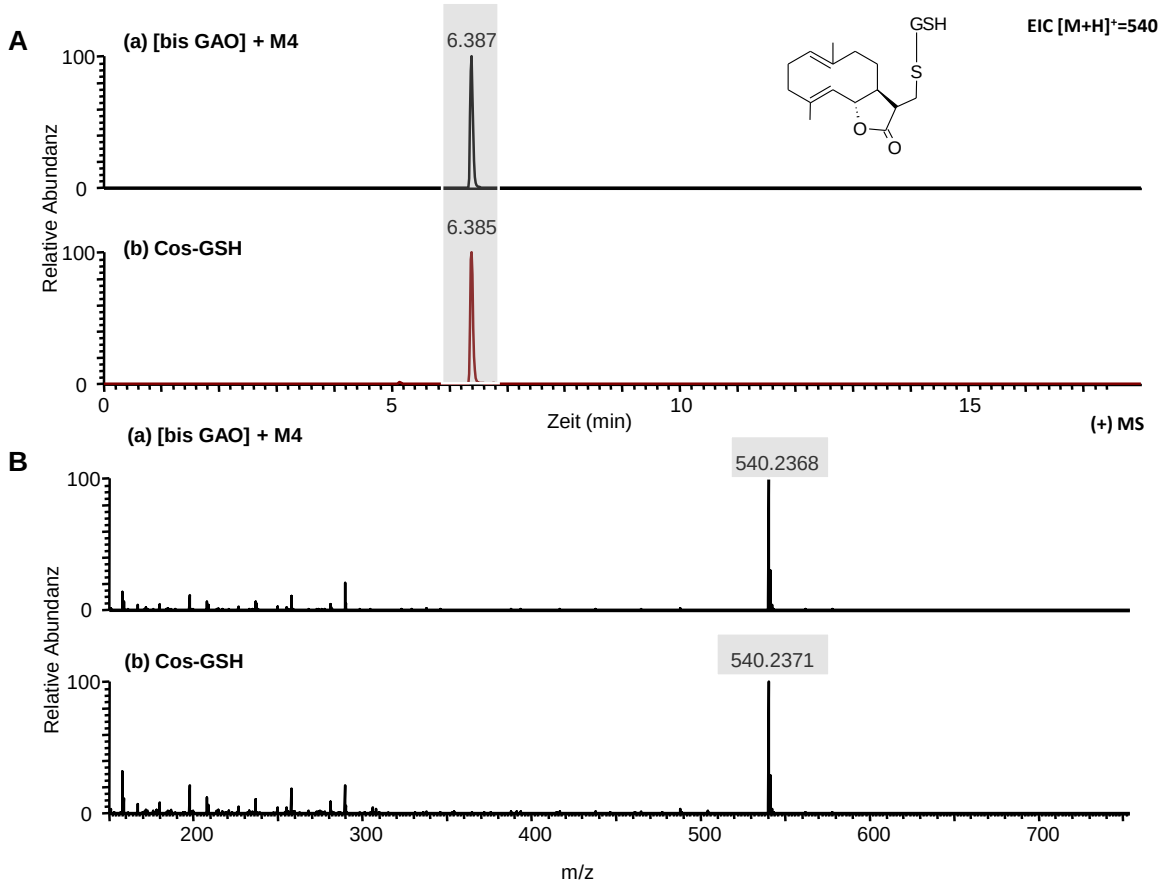
S 12: Zusammenfassung von Kontroll-Experimenten mit transient transformierten *Nicotiana benthamiana*

#	Kontroll-Ansatz	n		Ergebnis
1	p19/DXS+M4	3	GC/ LC	Das Chromatogramm entsprach [p19/DXS], M4 greift also nicht an dieser Stelle im Stoffwechselweg ein.
2	p19/DXS+HaGAS1 +M4	3	GC/ LC	Das Chromatogramm entsprach [p19/DXS,+ HaGAS1], M4 greift also nicht an dieser Stelle im Stoffwechselweg ein.
3	p19/DXS+HaGAS1 +HaGAO+LsCOS +M4	1	LC	Das Chromatogramm entsprach [p19/DXS+HaGAS1+HaGAO+LsCOS], es entstanden keine weiteren Produkte durch die Interaktion von LsCOS und M4.
4	p19/DXS +HaGAS1+HaGAO +M33	1	LC	Das Chromatogramm entsprach [p19/DXS+HaGAS1 +HaGAO], M33 konnte also Germacren A nicht als Substrat nutzen.
5	p19/DXS +HaGAS1+HaGAO +HaG8H+M33	3	LC	Das Chromatogramm entsprach [p19/DXS+HaGAS1 +HaGAO+HaG8H], M33 konnte also 8β-OH-Germacren A Säure nicht als Substrat nutzen.
6	p19/DXS +HaGAS1+HaGAO +S2	1	LC	Das Chromatogramm entsprach [p19/DXS+HaGAS1 +HaGAO], S2 konnte also Germacren A Säure nicht als Substrat nutzen.
7	p19/DXS +HaGAS1+HaGAO +LsCOS+S2	1	LC	Das Chromatogramm entsprach [p19/DXS+HaGAS1+ HaGAO+LsCOS], S2 konnte also Costunolid nicht als Substrat nutzen.
8	p19/DXS +GGPPS	3	GC	GGPPS verringert die Germacren A Produktion, GGPPS ist also nicht für "pathway-boosting" geeignet.
9	p19/DXS +GGPPS +HaGAS1	3	GC	GGPPS verringert die Germacren A Produktion, GGPPS ist also nicht für "pathway-boosting" geeignet.



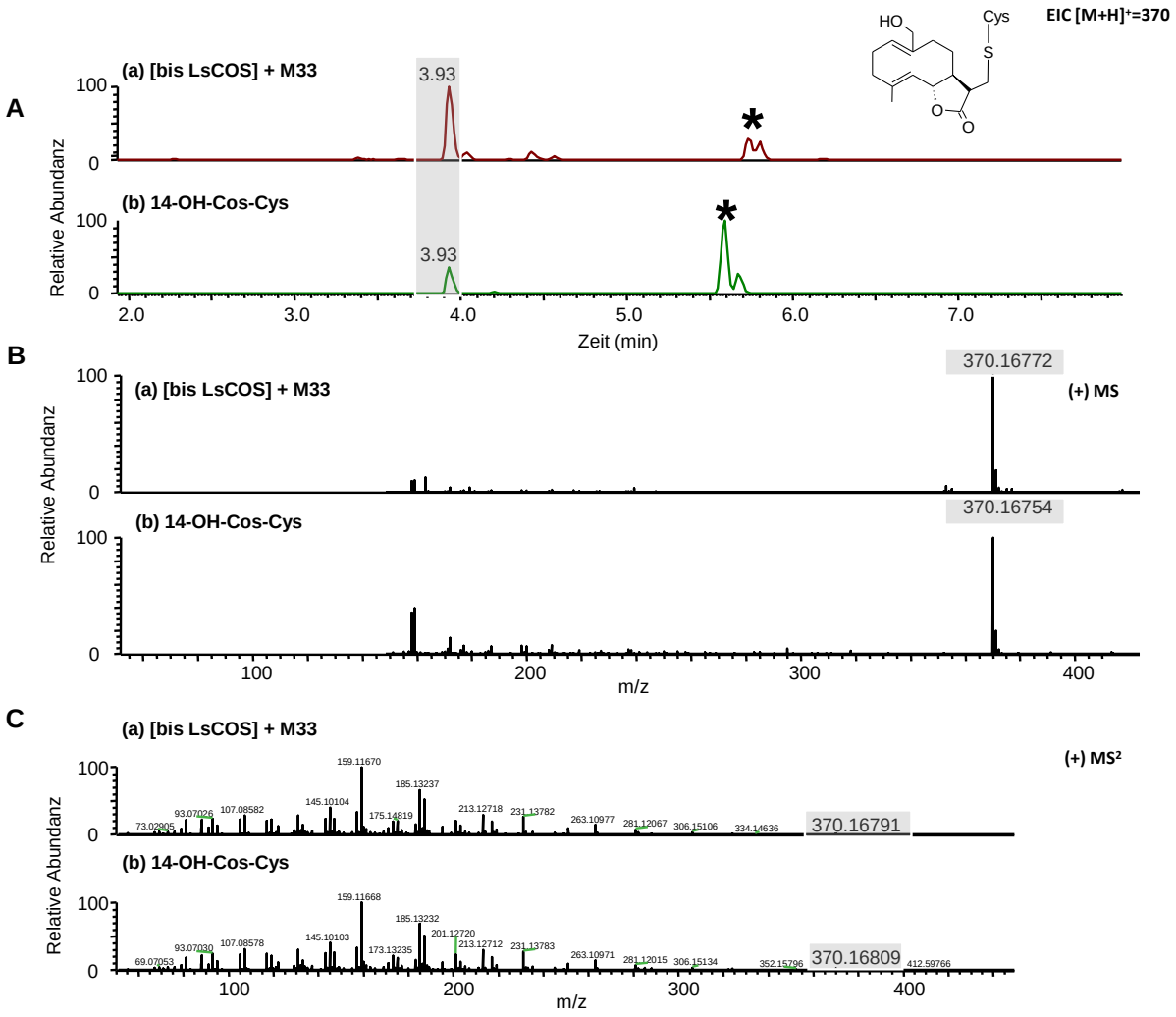
S 13: Abgleich mit synthetischem Costunolid-Cystein inklusive der LC-MS Daten

Vergleich von Extrakten aus *N. benthamiana* Blättern [p19/DXS + HaGAS1 + HaGAO + M4] und synthetischem Costunolid-Cystein; **A,** ($C_{18}H_{27}NO_4S$) $[M+H]^+$=354: **B,** (+) MS-Spektren bei 6,26 min bzw. 6,23 min; **B,** (+) MS^2-Spektren bei 6,26 min bzw. 6,23 min



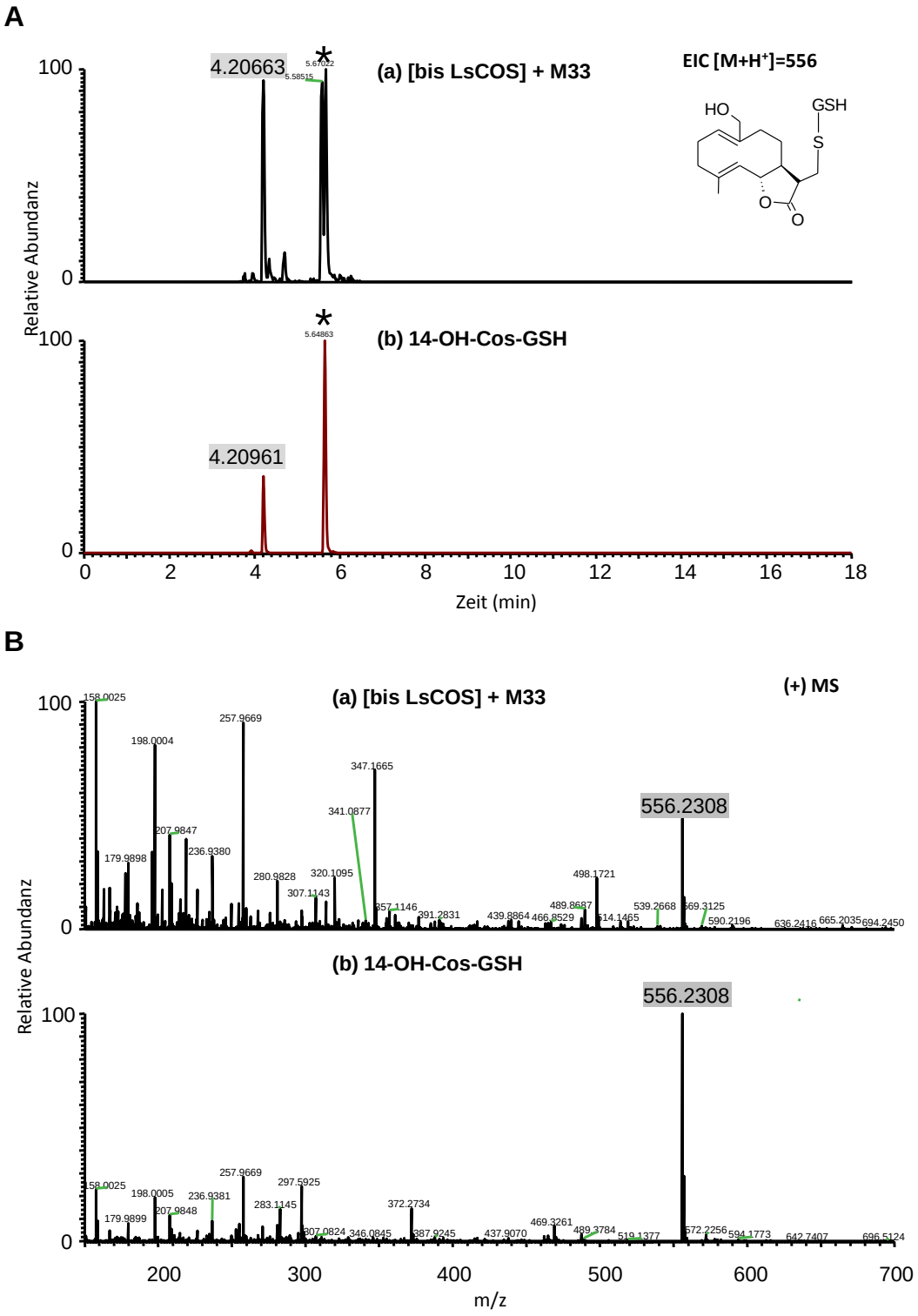
S 14: Abgleich mit synthetischem Costunolid-Glutathion inklusive der LC-MS Daten

Vergleich von Extrakten aus *N. benthamiana* Blättern [p19/DXS + HaGAS1 + HaGAO + M4] und synthetischem Costunolid-Glutathion; **A,** EIC ($C_{25}H_{37}N_3O_8S$) $[M+H]^+$=540; **B,** (+) MS-Spektren bei 6,387 min bzw. 6,385 min.



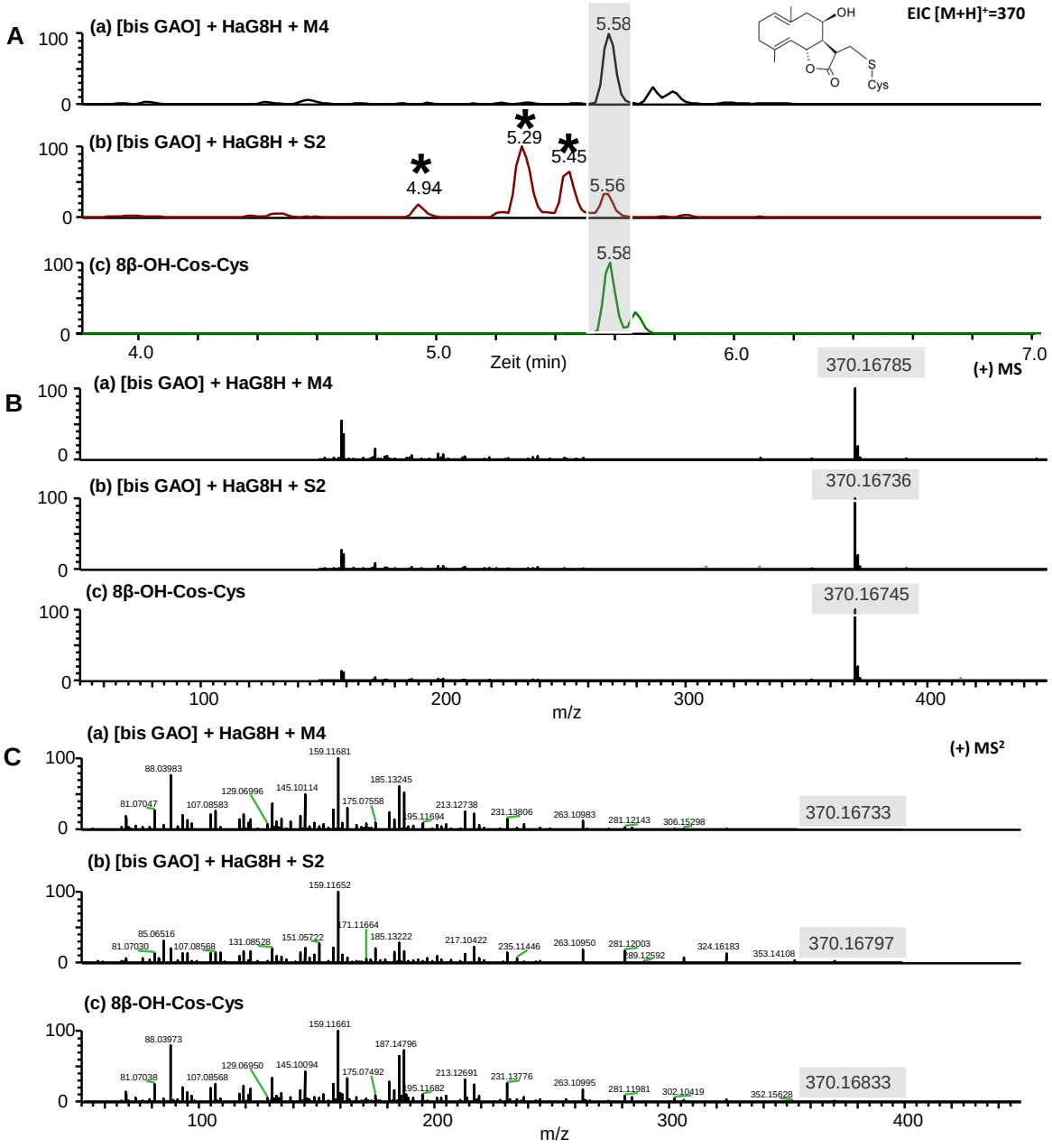
S 15: Abgleich mit synthetischem 14-Hydroxy-Costunolid-Cystein inklusive der LC-MS Daten

Vergleich von Extrakten aus *N. benthamiana* Blättern [p19/DXS + HaGAS1 + HaGAO + LsCOS + M33] und synthetischem 14-OH-Costunolid-Cystein; **A,** ($C_{18}H_{27}NO_5S$) $[M+H]^+$=370; **B,** (+) MS-Spektren bei 3,93 min; **C,** (+) MS^2-Spektren bei 3,93 min (*) mögliche Umlagerungsprodukte



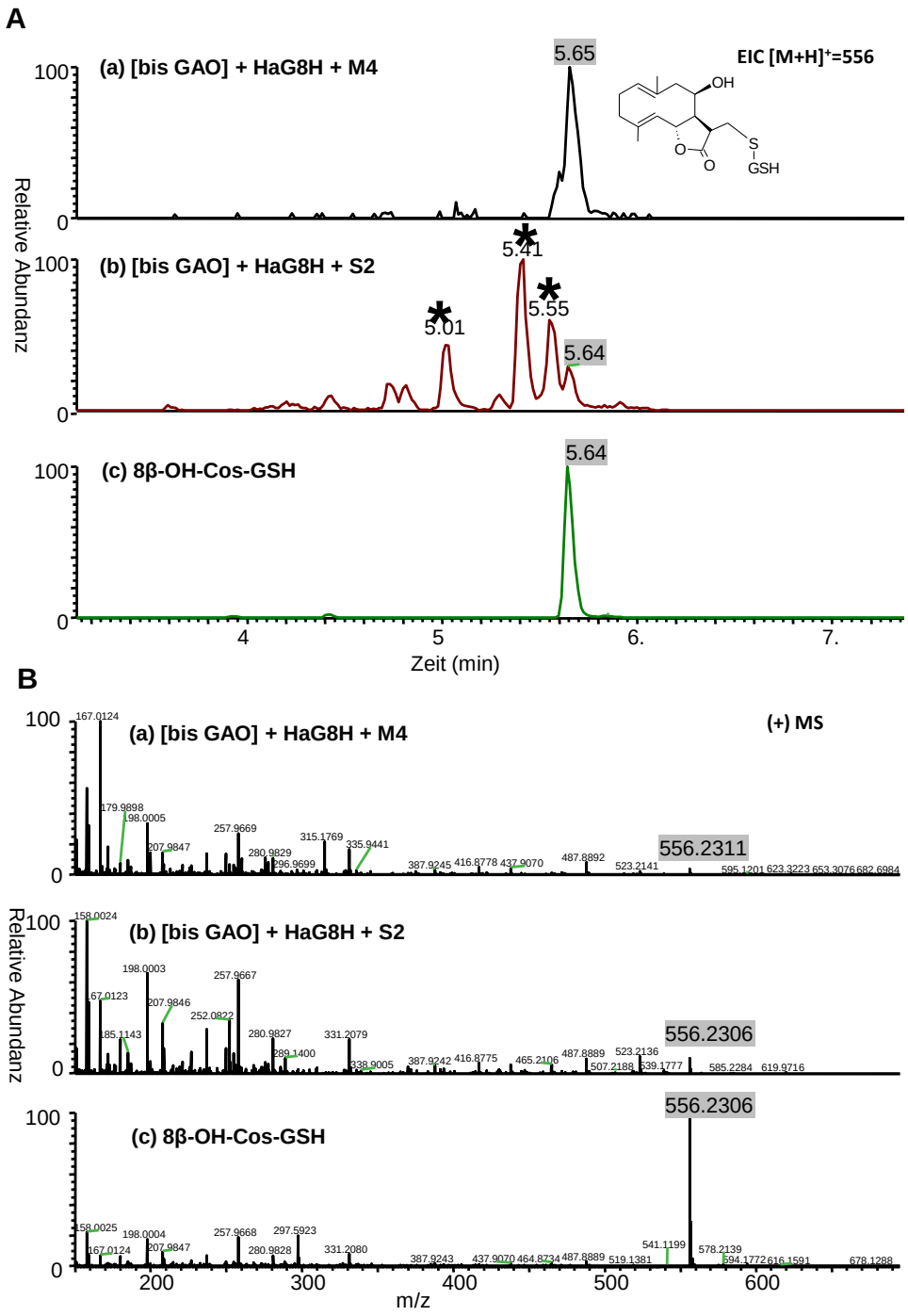
S 16: Abgleich mit synthetischem 14-Hydroxy-Costunolid-Glutathion inklusive der LC-MS Daten

Vergleich von Extrakten aus *N. benthamiana* Blättern [p19/DXS + HaGAS1 + HaGAO + LsCOS + M33] und synthetischem 14-OH-Costunolid-Glutathion; **A,** EIC ($C_{25}H_{37}N_3O_9S$) $[M+H]^+$=556; **B,** (+) MS-Spektren bei 4,20 min



S 17: Abgleich mit synthetischem 8β-Hydroxy-Costunolid-Cystein inklusive der LC-MS Daten

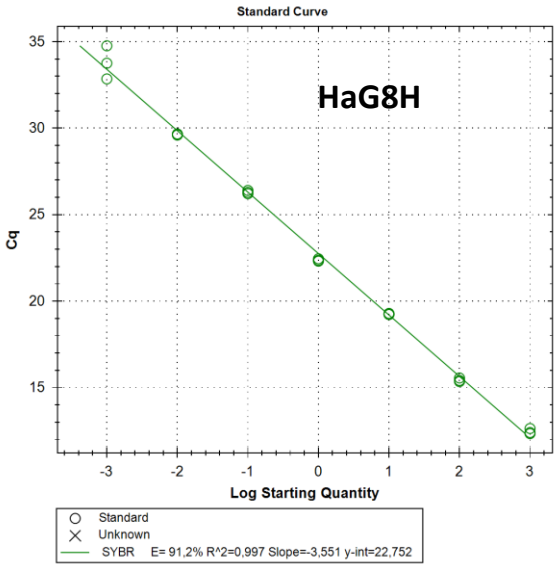
Vergleich von Extrakten aus *N. benthamiana* Blättern [p19/DXS + HaGAS1 + HaGAO + HaG8H + M4] sowie [p19/DXS + HaGAS1 + HaGAO + HaG8H + S2] und synthetischem 8β-OH-Costunolid-Cystein; **A,** ($C_{18}H_{27}NO_5S$) $[M+H]^+$=370, **B,** (+) MS-Spektren bei 5,56 min; **C,** (+) MS^2-Spektren bei 5,56 min; (*) mögliche Umlagerungsprodukte

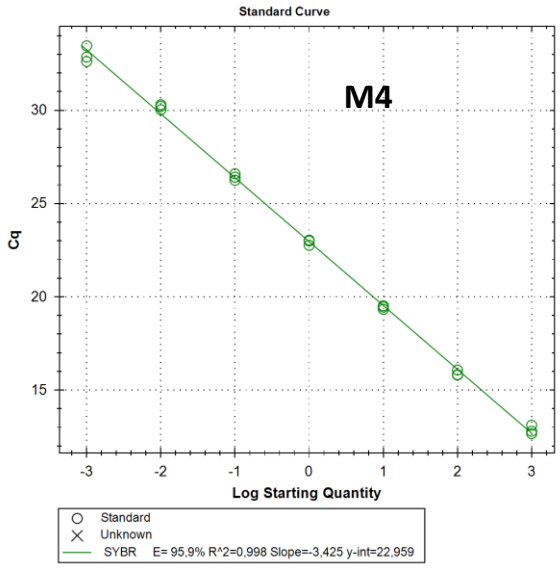


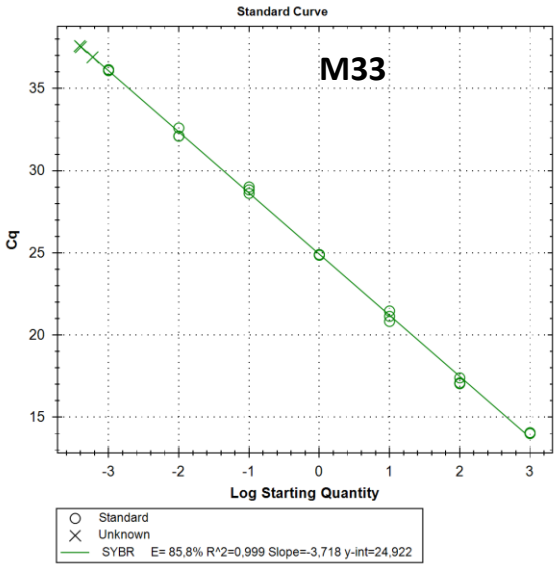
S 18: Abgleich mit synthetischem 8β-Hydroxy-Costunolid Glutathion inklusive der LC-MS Daten

Vergleich von Extrakten aus *N. benthamiana* Blättern [p19/DXS + HaGAS1 + HaGAO + HaG8H + M4] sowie [p19/DXS + HaGAS1 + HaGAO + HaG8H + S2] und synthetischem 8β-OH-Costunolid-Glutathion; **A,** EIC ($C_{25}H_{37}N_3O_9S$) $[M+H]^+$=556, **B,** (+) MS-Spektren bei 5,56 min; (*) mögliche Umlagerungsprodukte

7.6 Zusatzinformationen zur quantitativen PCR







S 19: Kalibrierkurven zur Bestimmung der Amplifikationseffizienz

Kalibrierkurven, Verwendet wurden pESC-Ura Plasmide, die die entsprechenden Gene codierten, in einer Verdünnungsreihe von 1 ng/µl x $10^{-(n)}$, mit n=0,1, 2, ..., 7 Amplifikationseffizienz E und Bestimmtheitsmaß R^2 wurden aus der Regressionsgerade berechnet. Für die Bestimmung der Amplifikationseffizienz der qPCR Primer von HaGAO, sowie der Referenzgene HaAct, HaTub und HaEF siehe (Schmauder 2015)

S 20: Stabilität von Referenz-Genen in Blatt-Primordien von *Helianthus annuus*

Referenzgen	CV	M-Wert[(b)]
Elongationsfaktor 1α	0,1430	0,4218
Actin	0,1733	0,4558
α-Tubulin	0,3348	0,6727
Soll-Wert (a)	CV<0,25	M-Wert<0,5

[(a)] Vorgeben für die Stabilität von Referenzgene in einer homogenen Probe (Hellemans et al. 2007), [(b)] M-Wert: Definiert in (Hellemans et al. 2007), CV: Varianzkoeffizient (*coefficience of variation*) wie bei Vandesompele et al. (2002) definiert, Für die Bestimmung der Referenzgen-Stabilität in Wurzeln und Kotyledonen siehe (Schmauder 2015)

Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name:	Maximilian Frey
Geburtsdatum:	29.11.1984
Familienstand:	verheiratet
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Schulbildung

08/1995 - 03/2004	Kurfürst-Ruprecht-Gymnasium, Neustadt an der Weinstraße

Zivildienst

04/2004 - 12/2004	Dürkheimer Werkstätten der Lebenshilfe e.V.

Studium

10/2005 - 03/2011	Studium der Biologie, TU Kaiserslautern und Universität Hohenheim Abschluss: Diplom

Praktika

08/2007	Laborges. für Umweltschutz mbH, Neustadt an der Weinstraße
02/2009 - 04/2009	BASF Plant Science GmbH, Limburgerhof

Wissenschaftliche Tätigkeit

04/2011 - 02/2017	Wissenschaftlicher Angestellter Universität Hohenheim
02/2012 - 02/2013	Lehrbeauftragter PH Schwäbisch-Gmünd und PH Ludwigsburg, einwöchige Kompaktkurse in Molekularbiologie
10/2010 - 02/2017	Übungen Biochemie für Biologen, Universität Hohenheim

Auslandsaufenthalt

04/2016 - 05/2016	Forschungsaufenthalt an der Universität Kopenhagen, Förderung durch das DAAD-Projekt "Strategisches Netzwerk Bioökonomie"

Fortbildungen

11/2012 - 12/2012	EBC*L-A (*European Business Competence Licence*)
05/2015 - 06/2015	Sachkunde zum Projektleiter und BBS (Beauftragter für Biologische Sicherheit) nach §15 GenTSV

Publikationen

Frey, M. & Spring, O., 2015. Molecular traits to elucidate the ancestry of *Helianthus* x *multiflorus*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 58, pp.51–58.

Poster

Frey, M. & Spring, O., 2013. Closing the last gap in costunolide synthesis of sunflower. Terpnet 2013, Kolymvari, Griechenland, Juni 2013.

Spring, O., Zipper, R. Frey, M., 2013. Sesquiterpene profiles and sequence analysis of terpene synthases as used to disclose the phylogenetic ancestry of hybrid species in Asteraceae – A case study with *Helianthus* x *multiflorus* L. Terpnet 2013, Kolymvari, Griechenland, Juni 2013.

Vorträge

Frey, M., 2016. P450 Enzymes Involved in Sesquiterpene Lactone Metabolism of Sunflower, Universität Hohenheim, Seminarreihe: Biologische Signale, Juni 2016.

Danksagung

Für die Überlassung des Themas, die Betreuung, für viel Geduld und die Beratung über das gesamte Promotions-Projekt hinweg, möchte ich mich herzlich bei Hr. Prof. Dr. O. Spring bedanken. Mein Dank gilt auch Hr. Prof. A. Huber für die Übernahme des Zweitgutachtens. Ich möchte mich bei der gesamten Arbeitsgruppe Spring und dem Institut für Botanik für eine tolle Zeit und hervorragende Arbeitsatmosphäre bedanken und ganz besonders bei Reinhard, der mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden ist. Für die NMR Messungen und Hilfe bei der Auswertung möchte ich mich bei J. Conrad bedanken und für die MS-Messungen bei I. Klaiber.

Ich danke Hr. Prof. B. Hamberger für die Einladung zu dem Forschungsaufenthalt an der Universität Kopenhagen. Mein Dank gilt der Diterpen-Arbeitsgruppe. und vor allem Irini und Tamil für die Unterstützung und Anleitung vor Ort.

Meinen Bachelorstudenten und Praktikanten danke ich für die spannende Erfahrung ein Projekt zu betreuen. Nathalie und Katharina möchte ich für den wertvollen Arbeitseinsatz als Hiwi danken.

Ich möchte auch meiner Familie und meinen Freunden danken.

Mein größter Dank gilt Helena, für die Unterstützung und Rückhalt zu allen Zeiten, für Freude und Aufregung, für Kraft und Ruhe, für ein wundervolles gemeinsames Leben.