

URN: urn:nbn:de:gbv:28-diss2011-0079-4

Charakterisierung der floralen (*E*)- $\beta$ -Ocimenproduktion  
in *Mirabilis jalapa* L.

Dissertation  
zur  
Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität Rostock

vorgelegt von

Jana Große, geb. am 5. August 1977 in Hagenow  
aus Rostock

Rostock, 4. Juni 2010

Erstgutachterin: Prof. Birgit Piechulla,  
Universität Rostock,  
Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät,  
FB Biowissenschaften

Zweitgutachterin: Prof. Ulrike Lindequist,  
Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald,  
Institut für Pharmazeutische Biologie

Wissenschaftliches Kolloquium: 13. Dezember 2010

# Inhalt

I	Abbildungsverzeichnis .....	IV
II	Tabellenverzeichnis .....	VII
III	Abkürzungen .....	VIII
1.	Einleitung .....	1
1.1.	Flüchtige pflanzliche Sekundärmetabolite — <i>Volatile organic compounds</i> .....	1
1.2.	Die Terpenoide und ihre Biosynthese .....	2
1.3.	Rolle und Funktion von Monoterpenen am Beispiel des ( <i>E</i> )- $\beta$ -Ocimens .....	5
1.4.	( <i>E</i> )- $\beta$ -Ocimen in <i>Mirabilis jalapa</i> .....	6
1.5.	Zielstellung .....	9
2.	Material und Methoden .....	10
2.1.	Material .....	10
2.1.1.	Pflanzenanzucht <i>Mirabilis jalapa</i> .....	10
2.1.2.	Chemikalien .....	10
2.1.3.	Hersteller .....	10
2.1.4.	Bakterienstämme und Vektoren .....	11
2.1.5.	Medien .....	11
2.2.	Proteinbiochemische Methoden .....	11
2.2.1.	Herstellung eines Proteinrohextraktes aus <i>Mirabilis jalapa</i> -Blüten (abgewandelt nach Croteau und Karp 1977) .....	11
2.2.2.	Colorimetrische Bestimmung des Proteingehalts .....	12
2.2.3.	<i>In vitro</i> -Assay der ( <i>E</i> )- $\beta$ -OS-Aktivität .....	12
2.2.4.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	12
2.2.5.	Proteinnachweis in Polyacrylamidgelen .....	14
2.2.6.	Proteinaufreinigung .....	15
2.2.7.	Analyse mittels nano-LC-ESI-Massenspektrometrie .....	16
2.3.	Molekularbiologische Methoden .....	17
2.3.1.	Extraktion von Nukleinsäuren .....	17
2.3.2.	Herstellung und Transformation chemokompetenter <i>E. coli</i> -Zellen .....	18
2.3.3.	Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	18
2.3.4.	Klonierung von PCR-Fragmenten .....	23
2.3.5.	Blockieren von Primern .....	24
2.3.6.	DNA-Sequenzierung .....	24
2.3.7.	Sequenzvergleich .....	24
2.4.	Histochemische Untersuchungen <i>in planta</i> .....	24
2.4.1.	Herstellung von Semidünnschnitten .....	24
2.4.2.	Untersuchungen des Terpengehaltes in pflanzlichen Geweben .....	25
2.4.3.	Untersuchungen des floralen Stärkegehaltes .....	26

2.5.	Headspace-Analysen.....	27
2.6.	Statistische Berechnungen .....	27
3.	Ergebnisse .....	28
3.1.	Charakterisierung der ( <i>E</i> )- $\beta$ -Ocimensynthese <i>in vivo</i> .....	28
3.1.1.	( <i>E</i> )- $\beta$ -OS-Aktivität in verschiedenen Geweben von <i>Mirabilis jalapa</i> .....	28
3.1.2.	Die Aktivität der ( <i>E</i> )- $\beta$ -OS in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium der Blüte .....	28
3.2.	Charakterisierung der ( <i>E</i> )- $\beta$ -Ocimensynthese <i>in vitro</i> .....	29
3.2.1.	Einfluss der Konzentration des Cofaktors auf die spezifische Aktivität der ( <i>E</i> )- $\beta$ -OS .....	30
3.2.2.	Einfluss der Reaktionstemperatur auf die spezifische Aktivität der ( <i>E</i> )- $\beta$ -OS .....	31
3.2.3.	Ermittlung der molekularen Masse der ( <i>E</i> )- $\beta$ -OS .....	31
3.2.4.	Stabilität der ( <i>E</i> )- $\beta$ -OS in Abhängigkeit von den Lagerungsbedingungen ..	32
3.2.5.	Stabilität der ( <i>E</i> )- $\beta$ -OS in Abhängigkeit von den Pufferbedingungen .....	33
3.2.6.	Etablierung eines ( <i>E</i> )- $\beta$ -OS-Standard-Assays.....	34
3.3.	Aufreinigung der ( <i>E</i> )- $\beta$ -Ocimensynthese aus <i>Mirabilis jalapa</i> -Blüten .....	35
3.3.1.	Vorversuche .....	35
3.3.2.	Pilotversuch zum Trennungsgang.....	39
3.3.3.	Trennungsgang .....	40
3.4.	Massenspektrometrische Analyse der ( <i>E</i> )- $\beta$ -OS-Kandidaten .....	43
3.5.	Molekularbiologische Untersuchungen zur Isolation der ( <i>E</i> )- $\beta$ -Ocimensynthese ..	46
3.5.1.	Untersuchungen mit peptidabgeleiteten Primern .....	46
3.5.2.	Analyse des Fragmentes FS-35 aus <i>Mirabilis jalapa</i> .....	48
3.6.	Histologische und biochemische Analysen des ( <i>E</i> )- $\beta$ -Ocimens in <i>Mirabilis jalapa</i> .....	51
3.6.1.	Untersuchungen der floralen ( <i>E</i> )- $\beta$ -Ocimenemission .....	51
3.6.2.	Quantifizierung des ( <i>E</i> )- $\beta$ -Ocimengehaltes der petaloiden Segmente .....	52
3.6.3.	Lokalisation von ( <i>E</i> )- $\beta$ -Ocimen im Blütengewebe .....	54
3.6.4.	Nachweis und Quantifizierung von Stärke in Blütengeweben von <i>Mirabilis jalapa</i> .....	62
4.	Diskussion.....	68
4.1.	Die ( <i>E</i> )- $\beta$ -Ocimensynthese aus <i>Mirabilis jalapa</i> hat typische biochemische Eigenschaften einer Monoterpensynthese. ....	68
4.2.	Aus dem Rohextrakt von <i>Mirabilis jalapa</i> konnte eine Monoterpensynthese angereinigt und mittels Massenspektrometrie analysiert werden. ....	71



4.3.	Die ( <i>E</i> )- $\beta$ -Ocimensynthese aus <i>Mirabilis jalapa</i> konnte mit RT-PCR nicht isoliert werden. ....	76
4.4.	( <i>E</i> )- $\beta$ -Ocimen wird in den Blüten der <i>Mirabilis jalapa</i> simultan synthetisiert und emittiert. ....	80
4.5.	In den Blüten der <i>Mirabilis jalapa</i> eingelagerte Stärke könnte als Ausgangsstoff für die ( <i>E</i> )- $\beta$ -Ocimensynthese genutzt werden .....	86
5.	Zusammenfassung .....	89
6.	Literatur.....	i
7.	Anhang.....	ix

# I      **Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1: Überblick über die Stoffwechselwege der Terpenbiosynthese und ihre zelluläre Lokalisation.....	2
Abb. 2: Charakteristika der Monoterpensynthasen. ....	4
Abb. 3: Stereoisomere des Ocimens (3,7-Dimethyl-1,3,6-Octatrien). ....	5
Abb. 4: Darstellung der in der vorliegenden Arbeit geltenden Terminologie der Blütenteile von <i>Mirabilis jalapa</i> . ....	7
Abb. 5: Stadien der Anthese und Seneszenz der <i>Mirabilis jalapa</i> . ....	7
Abb. 6: Spezifische Aktivität der ( <i>E</i> )- $\beta$ -OS in verschiedenen Geweben von <i>Mirabilis jalapa</i> . ....	28
Abb. 7: Spezifische Aktivität der ( <i>E</i> )- $\beta$ -OS im Verlauf der Blühperiode von <i>Mirabilis jalapa</i> . ....	29
Abb. 8: Effekt der Cofaktoren auf die spezifische Aktivität der ( <i>E</i> )- $\beta$ -OS. ....	30
Abb. 9: Einfluss der Inkubationstemperatur auf die spezifische Aktivität der ( <i>E</i> )- $\beta$ -OS. ....	31
Abb. 10: Molekularmassenbestimmung der ( <i>E</i> )- $\beta$ -OS mittels Chromatographie an einer kalibrierten Größenausschluss säule.....	32
Abb. 11: Einfluss der Lagerung des Rohextraktes bei 4°C auf die spezifische Aktivität der ( <i>E</i> )- $\beta$ -OS. ....	32
Abb. 12: Einfluss der Pufferbedingungen auf die spezifische Aktivität der ( <i>E</i> )- $\beta$ -OS. ....	33
Abb. 13: Identifikation des Produktes der <i>in vitro</i> -Assays durch GC-MS-Analyse. ....	35
Abb. 14: Spezifische Enzymaktivität der ( <i>E</i> )- $\beta$ -OS enthaltenden Fraktionen nach Größenausschluss-Chromatographie. ....	36
Abb. 15: Aktivität der ( <i>E</i> )- $\beta$ -OS nach der Anionenaustauschchromatographie. ....	37
Abb. 16: Einfluss der Chromatographie an Hydroxyapatit auf die spezifische Aktivität der ( <i>E</i> )- $\beta$ -OS. ....	38
Abb. 17: Schema der Aufreinigung der ( <i>E</i> )- $\beta$ -OS aus dem Rohextrakt. ....	39
Abb. 18: Proteinmuster des Rohextraktes aus petaloiden Segmenten (Ernte: 16–18 Uhr) und der Fraktionen nach der Größenausschluss-Chromatographie.....	41
Abb. 19: Proteinzusammensetzung der Fraktionen nach der Anreinigung der ( <i>E</i> )- $\beta$ -OS aus dem Rohextrakt petaloider Segmente im Trennungsgang 2. ....	42
Abb. 20: Schematische Darstellung der aus <i>Mirabilis jalapa</i> identifizierten Peptide. ....	46
Abb. 21: Qualität der aus den petaloiden Segmenten der <i>Mirabilis jalapa</i> isolierten RNA. ....	47
Abb. 22: Schematische Lage und Orientierung der Primer auf der FS-35 Sequenz. ....	48
Abb. 23: Florale ( <i>E</i> )- $\beta$ -Ocimenemission der <i>Mirabilis jalapa</i> im Verlauf einer Blühperiode. ....	51
Abb. 24: Vergleich der ( <i>E</i> )- $\beta$ -Ocimenemission mit dem –gehalt der petaloiden Segmente. ....	52

Abb. 25: Vergleich des (E)- $\beta$ -Ocimengehaltes mit der spezifischen Aktivität der (E)- $\beta$ -Ocimensynthase der petaloiden Segmente im Verlauf einer Blühperiode.....	53
Abb. 26: <i>In vitro</i> -Terpennachweis mit NADI-Reagenz.....	54
Abb. 27: NADI-Färbung in nativen Semidünnschnitten von <i>Salvia officinalis</i> Blättern. ....	55
Abb. 28: Ungefärbte native Semidünnschnitte von <i>Nicotiana glauca</i> Blüten. ....	55
Abb. 29: NADI-Färbung in nativen Semidünnschnitten von <i>Nicotiana glauca</i> Blüten. ....	56
Abb. 30: NADI-Färbung in nativen Semidünnschnitten von <i>Mirabilis jalapa</i> Blüten des Stadiums 3.....	58
Abb. 31: NADI-Färbung in nativen Semidünnschnitten von <i>Mirabilis jalapa</i> Blüten des Stadiums 5.....	58
Abb. 32: Terpennachweis in nativen Semidünnschnitten von <i>Mirabilis jalapa</i> Blüten des Stadiums 7.....	59
Abb. 33: NADI-Färbung in nativen Semidünnschnitten von Laubblättern der <i>Mirabilis jalapa</i> . ....	60
Abb. 34: NADI-Färbung in nativen Semidünnschnitten von Sprossen der <i>Mirabilis jalapa</i> .	61
Abb. 35: Terpenpositive Strukturen nach der Inkubation in NADI-Reagenz in floralen und vegetativen Geweben der <i>Mirabilis jalapa</i> . ....	62
Abb. 36: Stärkenachweis in fixierten Semidünnschnitten der petaloiden Segmente der <i>Mirabilis jalapa</i> . ....	63
Abb. 37: Stärkenachweis in fixierten Semidünnschnitten der petaloiden Segmente der <i>Mirabilis jalapa</i> im Verlauf Blühperiode.....	65
Abb. 38: Stärkegehalt der Blüten im Verlauf der Blühperiode.....	66
Abb. 39: Phylogenetische Beziehung der FS-35 zu Monoterpensynthasen. ....	79
Abb. 40: Mikroskopischer Nachweis von floralen epidermalen Sekreten in <i>Rosa x hybrida</i> . ....	84
Abb. 41: Vergleich des Stärke- und (E)- $\beta$ -Ocimengehaltes der petaloiden Segmente. ....	87
Abb. 42: Einfluss von mehreren Auftauzyklen auf die spezifische Aktivität der (E)- $\beta$ -OS. .	ix
Abb. 43: <i>ClustalW</i> -Alignment der zu den in Bande 2 identifizierten Peptiden gehörenden Aminosäuresequenzen. ....	xii
Abb. 44: <i>ClustalW</i> -Alignment der zu in Bande 3 identifizierten Peptiden gehörenden Aminosäuresequenzen. ....	xii
Abb. 45: <i>ClustalW</i> -Alignment der zu den in Bande 4 identifizierten Peptiden gehörenden Aminosäuresequenzen. ....	xiii
Abb. 46: Lage der von den Peptiden abgeleiteten Primer auf dem Alignment der beteiligten Aminosäuresequenzen. ....	xiv
Abb. 47: In der RT-PCR mit peptidabgeleiteten Primern generierte DNA-Fragmente. ....	xv
Abb. 48: <i>ClustalW</i> -Alignment der Aminosäuresequenzen von FS-35 aus <i>Mirabilis jalapa</i> und der putativen 1,8-Cineolsynthase aus <i>Ricinus communis</i> . ....	xv

Abb. 49: In der PCR mit FS-35 spezifischen Primern amplifizierte DNA-Fragmente. ....	xvi
Abb. 50: <i>ClustalW</i> -Alignement der zu FS-35 homologen Sequenzen der <i>Mirabilis jalapa</i> Blüte.....	xvii
Abb. 51: <i>ClustalW</i> -Alignement Vergleich der mittels PCR auf genomischer DNA generierter Sequenzen mit FS-35. ....	xviii
Abb. 52: In der PCR mit FS-35 spezifischen Primern amplifizierte DNA-Fragmente. ....	xix

## II Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Identifizierte ( <i>E</i> )- $\beta$ -Ocimensynthasen. ....	6
Tab. 2: Zur Optimierung des <i>in vitro</i> -Assays der ( <i>E</i> )- $\beta$ -OS-Aktivität untersuchte variable Parameter. ....	12
Tab. 3: Zusammensetzung der Polyacrylamidgele.....	13
Tab. 4: Aufsteigende Alkoholreihe zum Wasserentzug aus den zur Einbettung in PEG bestimmten Geweben.....	25
Tab. 5: Verdünnungsreihe zur Infiltration des Gewebes mit dem Polymer PEG. ....	25
Tab. 6: Zusammenfassung der Ergebnisse der <i>in vivo</i> - sowie <i>in vitro</i> - Charakterisierung der ( <i>E</i> )- $\beta$ -OS aus <i>Mirabilis jalapa</i> .....	34
Tab. 7: Kenndaten der Pilotaufreinigung der ( <i>E</i> )- $\beta$ -OS.....	40
Tab. 8: Kenndaten des Trennungsganges 2 zur Anreinigung der ( <i>E</i> )- $\beta$ -OS.....	41
Tab. 9: Mittels massenspektrometrischer Analysen identifizierte Peptide der Proteinbanden aus Trennungsgang 2. ....	45
Tab. 10: Ergebnisse der RT-PCR Untersuchungen mit den Primersets 1 und 2.....	47
Tab. 11: Nachweis des FS-35-Fragmentes in verschiedenen Teilen von <i>Mirabilis jalapa</i> -Blüten.....	49
Tab. 12: Inverse PCR auf genomischer DNA. ....	50
Tab. 13: Spezifische Aktivität ausgewählter Monoterpensynthasen im Rohextrakt .....	71
Tab. 14: Beispiele für die biochemische Aufreinigung von Monoterpensynthasen. ....	74
Tab. 15: <i>In planta</i> -Nachweis von Terpenen.....	82
Tab. 16: In der Terpensynthasen-Datenbank berücksichtigte Monoterpensynthasen .....	x
Tab. 17: Sequenzen der verwendeten Primer.....	xiv

### III Abkürzungen

Abb.	Abbildung
<i>ad</i>	bis
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
ACN	Acetonitril
APS	Ammoniumpersulfat
AT	Anionentauscher
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
ATP	Adenosintriphosphat
bzw.	beziehungsweise
C	Kohlenstoff
C-Terminus	Carbonylseite des DNA- oder Proteinstrangs
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
CHAPS	3-([3-Chloramidopropyl]dimethylammonio)-1-Propansulfonat
CIN	Cineolsynthase
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
Da	Dalton
DB	Datenbank
DDXXD	aspartatreiches Motiv
d.h.	das heißt
DI	<i>N,N</i> -Dimethyl-p-Phenylendiamindihydrochlorid
DL	<i>dye ligand</i>
DMAPP	Dimethylallylpyrophosphat
DMSO	Dimethylsulfoxyd
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
DXP	1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat
E	Extinktion
( <i>E</i> )- $\beta$ -OS	( <i>trans</i> )- $\beta$ -Ocimensynthase
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESI	Elektrospray Ionisierung
EST	<i>expressed sequence tag</i>
<i>et al.</i>	und andere
fkatal	Femtokatal
FM	Frischmasse
FPP	Farnesylpyrophosphat
FTICR	<i>Fourier transform ion cyclotron resonance</i>
fw	<i>forward</i>
GA	Größenausschluss-Chromatographie
GC	Gaschromatographie
GES	Geraniolsynthase
GGPP	Geranylgeranylpyrophosphat
GPP	Geranylpyrophosphat
GTC	Guanidinthiocyanat

H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	doppelt destilliertes Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	einfach destilliertes Wasser
HA	Hydroxyapatit
HIC	<i>hydrophobic interaction chromatography</i>
hiVOC	<i>herbivore-induced volatile organic compound</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
IA	Ionenaustauschchromatographie
IPP	Isopentenylpyrophosphat
K	Kelvin
K <sup>+</sup>	Kaliumion
k. A.	keine Angabe
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LC	<i>liquid chromatography</i>
LB	<i>Lysogeny broth</i>
LIS	Linaloolsynthase
M	Molar
m/z	Verhältnis Masse zu Ladung
MEV	Mevalonat
MES	2-(N-Morpholino)-Ethansulfonsäure
Mg <sup>2+</sup>	Magnesiumion
min	Minute
mM	millimolar
Mn <sup>2+</sup>	Manganion
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MS	Massenspektrum bzw. Massenspektrometer
MW	Mittelwert
N-Terminus	Aminoseite des Protein- bzw. DNA-Stranges
NA	1-Naphthol
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NPP	Nerylpyrophosphat
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PEG	Polyethylenglykol
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
pI	isoelektrischer Punkt
ppm	<i>parts per million</i>
r	<i>resolution</i>
rev	<i>reverse</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Runden pro Minute
RT	Reverse Transkription
RT-PCR	an Reverse Transkription anschließende Polymerasekettenreaktion
sec	Sekunde
SD	<i>standard deviation</i>
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SIM	<i>scan-selected ion monitoring</i>
spec.	Spezies

sscDNA	einzelsträngige komplementäre DNA
T	Tesla
Ta	Annealing-Temperatur
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamin
TG	Trennungsgang
Tps	Terpensynthase
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan
U	<i>Unit</i>
UV	ultraviolett
ü. N.	über Nacht
vgl.	vergleiche
Vh	Voltstunden
VOC	<i>volatile organic compound</i>
(v/v)	<i>(volume/volume)</i>
(w/v)	<i>(weight/volume)</i>
x g	Gravitationsfeldstärke
(Z)	trans <sup>#</sup>
z. B.	zum Beispiel
3'	Carboxyl-Terminus
5'	Amino-Terminus
<sup>14</sup> C	Radiokarbon
#	Errata



## 1. Einleitung

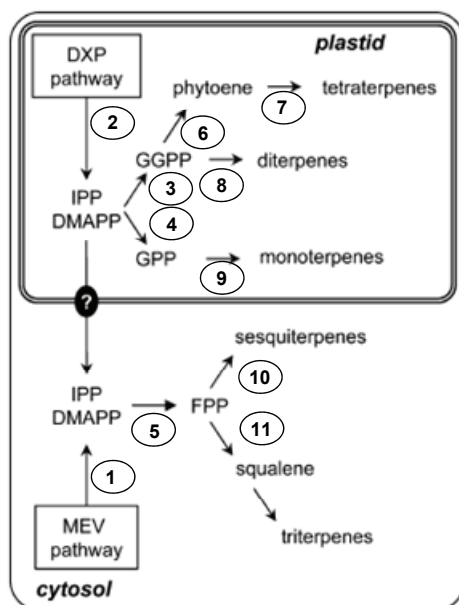
### 1.1. *Flüchtige pflanzliche Sekundärmetabolite — Volatile organic compounds*

Unter dem Begriff der *volatile organic compounds* (VOCs) werden unterschiedliche Substanzklassen organischen Ursprungs zusammengefasst. Dazu gehören unter anderem Benzenoide, Terpenoide, schwefelhaltige Verbindungen sowie Fettsäurederivate. Die Flüchtigkeit dieser Substanzen beruht auf ihrer geringen molekularen Masse in Verbindung mit einem hohen Dampfdruck. Die von Pflanzen produzierten VOCs ermöglichen ihnen die Kommunikation mit der Umgebung und tragen auf diesem Wege zur Sicherung des Überlebens bei. Volatile können in allen Organen gebildet werden. VOCs, die vornehmlich in vegetativem Gewebe neu synthetisiert, akkumuliert bzw. freigesetzt werden, dienen der Abwehr von Herbivoren. Dies geschieht entweder durch eine direkte toxische Wirkung oder auf indirekte Weise durch die Anlockung von Fraßfeinden der Schädlinge (Dicke und Sabelis 1988). Die Pflanzen reagieren damit auf einen Befall und können dadurch sowohl in angrenzenden als auch entfernten Pflanzenteilen oder benachbarten Individuen abwehrbezogene Reaktionen induzieren (Arimura *et al.* 2004, Heil *et al.* 2007).

Floral produzierte VOCs dienen in den meisten Fällen der Kommunikation mit potentiellen Bestäubern über lange Distanzen. Dennoch können auch Herbivoren durch sie angelockt bzw. abgeschreckt werden (Tholl *et al.* 2005, Theis 2006). Die Freisetzung der floralen VOCs ist oft an das Verhalten der Bestäuber angepasst. Pflanzen mit einem rhythmischen Emissionsmuster des Blütenduftes haben häufig einen spezifischen Bestäuber, wohingegen Arten mit konstanter Freisetzung der floralen VOCs oft von Generalisten (z.B. Bienen) bestäubt werden (Vainstein *et al.* 2001). Prinzipiell können diese flüchtigen Metabolite gleichmäßig oder rhythmisch emittiert werden. Das letztere Emissionsmuster ist entweder circadian, diurnal oder nocturnal reguliert und kann durch exogene Faktoren, wie Licht oder Temperatur, oder endogen durch eine innere Uhr induziert werden. Außerdem wurde bei einigen Pflanzenarten eine entwicklungsabhängige Regulation der VOC-Synthese bzw. -Emission beschrieben, bei der sich entweder die Zusammensetzung des Bouquets nach erfolgreicher Bestäubung oder mit Beginn der Seneszenz ändert (Dudareva *et al.* 2000, Schiestl *et al.* 1997) oder die Freisetzung von flüchtigen Metaboliten aus der Blüte eingestellt wird. Diese Phänomene werden als Schutzmechanismus der befruchteten Blüte angesehen (Theis und Raguso 2005).

## 1.2. Die Terpene und ihre Biosynthese

Die Terpene repräsentieren mit ihren derzeit ca. 40000 beschriebenen Strukturen die Klasse der Naturstoffe mit der höchsten Verbreitung (Yu und Utsumi 2009). Alle Vertreter bestehen aus Isoprenoideinheiten (C 5) und werden in Abhängigkeit von der Anzahl dieser Einheiten u.a. in Mono- (C 10), Sesqui- (C 15) und Diterpene (C 20) eingeteilt (Gershenzon und Kreis, 1999). Die Verbindungen bestehen aus verschiedenen Kohlenstoffgerüsten mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen und sind daher extrem variabel in ihrem Aufbau. Ebenso mannigfaltig sind ihre biologischen Funktionen. Terpene spielen sowohl im primären Stoffwechsel als Vitamine, Bestandteile der Elektronentransportkette, Pigmente, Membranbestandteile oder Hormone als auch im sekundären Metabolismus z.B. als Allomere eine Rolle.



**Abb. 1: Überblick über die Stoffwechselwege der Terpenbiosynthese und ihre zelluläre Lokalisation.**

Abgewandelt nach Sallaud *et al.* 2009, Bick und Lange 2003 und Laule *et al.* 2003.

1 – 11: Bislang charakterisierte Enzyme (Auswahl):

1 – Acetoacetyl-CoA-Thiolase, 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA-Synthase, 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA-Reduktase, MEV-Kinase, Phosphomevalonatkinase, MEV-Diphosphatdecarboxylase; 2 – 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphatsynthase, 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphatreduktase, Hydroxy-2-Methyl-2-(E)-Butenyl-4-Diphosphatsynthase, IPP:DMAPP-Synthase; 3 – GGPP-Synthase; 4 – GPP-Synthase; 5 – FPP-Synthase; 6 – Phytoensynthase; 7 – Phytoendesaturase,  $\zeta$ -Carotendesaturase; 8 – Diterpensynthase; 9 – Monoterpensynthase; 10 – Sesquiterpensynthase; 11 – Squalensynthase, Squalenmonooxygenase.

DXP – 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat, IPP – Isopentenylphosphat, DMAPP – Dimethylallyldiphosphat, GGPP – Geranylgeranylpyrophosphat, GPP – Geranylpyrophosphat, FPP – Farnesylpyrophosphat, MEV – Mevalonat

Die Terpene werden in Pro- und Eukaryoten ubiquitär durch die Kondensation von Isopentenylphosphat (IPP) und Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) synthetisiert. In höheren Pflanzen werden diese Intermediate durch zwei kompartimentspezifische Stoffwechsel-

wege (Abb. 1) gebildet (u.a. Eisenreich *et al.* 2001). Im Cytosol läuft die Synthese über die Kondensation von drei Molekülen Acetyl-CoA via Mevalonat (*MEV pathway*) ab. Die entstehenden Intermediate fließen u.a. in die Synthese der Sesquiterpene.

In den Plastiden wird durch die Kondensation von Pyruvat und Glyceraldehyd-3-Phosphat 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat synthetisiert (*DXP pathway*), das zu IPP umgesetzt wird. Aus den Intermediaten wird Geranylpyrophosphat (GPP) produziert, das entweder direkt zu Monoterpenen, oder, über die Kondensation zu Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP), zu Diterpenen umgesetzt wird. Beide Stoffwechselwege der pflanzlichen Terpenbiosynthese in Pflanzen sind über die Intermediate IPP und DMAPP miteinander verbunden, die aus den Plastiden ins Cytosol transportiert werden können (Laule *et al.* 2003, Hampel *et al.* 2005).

Die Monoterpene werden durch Monoterpensynthasen produziert. Der Reaktionsmechanismus dieser Enzyme umfasst die Ionisierung des Substrates GPP zu instabilen Zwischenstufen (Carbokationen), die durch lokale Ladungsreste im aktiven Zentrum stabilisiert werden (Kampranis *et al.* 2007). Bedingt durch die hohe Regio- und Stereospezifität der Monoterpensynthasen (Tholl 2006) leiten sich von den Carbokationen die unterschiedlichsten Produkte durch Modifikationen sowie intramolekulare Additionen und Umlagerungen ab. Das GPP galt lange Zeit als einziges Substrat aller Monoterpensynthasen. Neuere Studien zeigen allerdings, dass die Phellandrensynthase aus *Solanum lycopersicum* das *cis*-Isomer des GPP (NPP, Nerylpyrophosphat) zur Synthese von Monoterpenen verwendet (Schillmiller *et al.* 2009). Darüber hinaus wurde kürzlich gezeigt, dass auch eine Sesquiterpensynthase (Santalen- und Bergamotensynthase aus *Solanum habrochaites*) dieses Substrat zu Monoterpenen umsetzen kann (Sallaud *et al.* 2009). Für die Synthese benötigen alle Monoterpensynthasen ein divalentes Metallion ( $Mg^{2+}$  oder  $Mn^{2+}$ ), das für die Bildung des so genannten Metallion-Substratkomplexes verantwortlich ist. Dieser ermöglicht die Bindung des Diphosphatrestes des Substrates an das hochkonservierte aspartatreiche DDXXD-Motiv und ist somit für seine spezifische Positionierung im aktiven Zentrum wichtig (Starks *et al.* 1997).

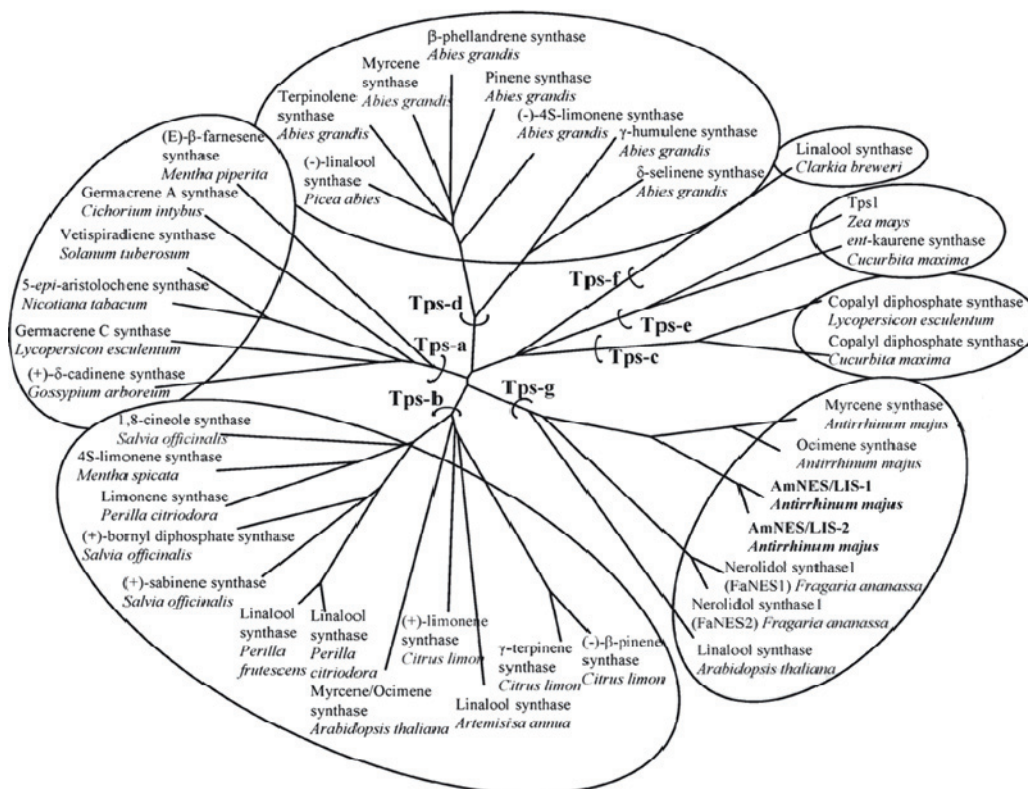
Da Monoterpensynthasen kerncodiert sind, besitzen nahezu alle bekannten Vertreter dieser Enzyme aus höheren Pflanzen ein individuelles N-terminales Transitpeptid in einer Länge von 50-70 Aminosäuren (Abb. 2A). Das bereits erwähnte DDXXD-Motiv ist das einzige Sequenzmotiv, das allen Monoterpensynthasen gemein ist. Sehr häufig tritt ebenfalls das RR(X)<sub>8</sub>W-Motiv auf, das oft den Beginn des funktionalen Enzyms nach der Abspaltung des Transitpeptides darstellt. Abgesehen von diesen Motiven sind die durchschnittlich aus 500-600 Aminosäuren bestehenden Monoterpensynthasesequenzen sehr heterogen und werden in Abhängigkeit von verschiedenen Strukturmerkmalen der DNA-Sequenz in mehrere Subfamilien eingeteilt (Tps b, d, f bzw. g; Lee und Chapell 2008, Abb.

2B). Da die Sequenzhomologien zwischen Monoterpensynthasen vom Verwandtschaftsgrad der Arten bestimmt werden, sind die Übereinstimmungen unabhängig von der Produktspezifität und die Sequenzen innerhalb dieser Gruppen ebenfalls recht heterogen (Kampranis *et al.* 2007).

A



B



**Abb. 2: Charakteristika der Monoterpensynthasen.**

**A) Schematische Aminosäuresequenz der Monoterpensynthase.** Rot – Transitpeptid, schwarz – Sequenz des funktionalen Proteins, \* nicht in allen Sequenzen vertreten.

**B) Phylogenetisches Baumdiagramm ausgewählter Monoterpensynthasen.** Die Einteilung der Subfamilien beruht auf einer Clusteranalyse (*unrooted neighbor-joining tree* erstellt mit ClustalX und TreeView). Aus Nagegowda *et al.* 2008.

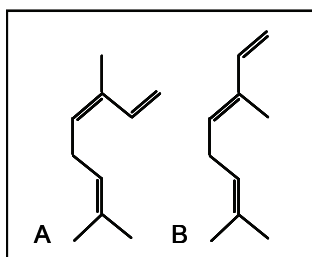
In der Vergangenheit wurde eine große Zahl der Monoterpensynthasen biochemisch aus Rohextrakten höherer (z.B. *Lamiaceae* und *Pinaceae*) und niederer Pflanzen (*Hepaticae*) aufgereinigt und charakterisiert (u.a. Adam *et al.* 1996, Adam und Croteau 1998). Die zunehmende Verbesserung der molekularbiologischen Methoden und die steigende Zahl bekannter DNA-Sequenzen verwandter Pflanzenarten ermöglichen heute vielfach die

Isolation neuer Enzyme mittels homologiebasierter Techniken oder Expressionsanalysen (Genbanken, EST).

### 1.3. Rolle und Funktion von Monoterpenen am Beispiel des (*E*)- $\beta$ -Ocimens

Das Ocimen ist ein Vertreter der mehr als 1000 bislang bekannten Monoterpene (Gershenzon und Croteau 1991), die entweder als azyklische Moleküle, wie das Ocimen, oder mono- bzw. bizyklische C<sub>10</sub>-Verbindungen in vielen verschiedenen Pflanzenfamilien nachgewiesen wurden (Kesselmeyer und Staudt 1999).

Der Name Ocimen bezieht sich auf *Ocimum rubrum*, aus dem diese Verbindung erstmalig isoliert wurde (Thieme *et al.* 1972). Dieses Monoterpen, welches in den stereoisomeren Formen *trans* / (*E*)- und *cis* / (*Z*)- $\beta$ -Ocimen vorliegt (Abb. 3) und ein Isomer des Myrcens darstellt, ist ein weit verbreiteter Bestandteil von Pflanzendüften (Knudsen *et al.* 2006).



**Abb. 3: Stereoisomere des Ocimens (3,7-Dimethyl-1,3,6-Octatrien).**  
A - *cis* / (*Z*)- $\beta$ -Ocimen, B – *trans* / (*E*)- $\beta$ -Ocimen.

Ebenso wie das Isopren, bildet Ocimen reaktive Gase in der Atmosphäre und ist somit klimarelevant (Winer *et al.* 1992, Sharkey *et al.* 2008). Weitaus intensiver erforscht wird derzeit die Rolle von (*E*)- $\beta$ -Ocimen als Bestandteil von Pflanzendüften. Da es vielen Insekten als Pheromon in der interspezifischen oder als Kairomon in der intraspezifischen Kommunikation dient, ist die Bedeutung des (*E*)- $\beta$ -Ocimen als am weitesten verbreitete *hiVOC* (*herbivore-induced organic compound*) in der indirekten pflanzlichen Abwehr von Herbivoren nicht überraschend (Arimura *et al.* 2004). Effmert *et al.* zeigten 2008, dass *Nicotiana suaveolens* mit der Emission von (*E*)- $\beta$ -Ocimen auf Herbivorie durch *Manduca sexta*-Larven reagiert. Außerdem wurde beschrieben, dass (*E*)- $\beta$ -Ocimen eine Komponente der *hiVOCs* mit Spinnmilben befallener Teesträucher (*Camellia sinensis*), der Limabohne (*Phaseolus lunatus*) und des Hornklees (*Lotus japonicus*) ist, die essentiell für die Anlockung der spezifischen Raubmilben ist (Ishiwari *et al.* 2007, Arimura *et al.* 2002 und 2004, Ozawa *et al.* 2000). Insbesondere die Limabohne ist im Hinblick auf die Funktion des (*E*)- $\beta$ -Ocimens als Signalmolekül in den Fokus der aktuellen Forschung gerückt (Arimura *et al.* 2000, 2002 und 2008, Mithöfer *et al.* 2005). Zhang *et al.* konnten

beispielsweise belegen, dass bei gleichzeitigem Befall mit Spinnmilben (*Tetranychus urticae*) und weißer Fliege (*Bemisia tabaci*) die Anlockung der Raubmilben aufgrund der Inhibition der (*E*)- $\beta$ -Ocimensynthese nicht funktioniert (2009). Dieses Phänomen ist ein Hinweis auf die komplexen Beziehungen im Zusammenwirken mehrerer Faktoren der VOC-vermittelten Kommunikation in der Natur.

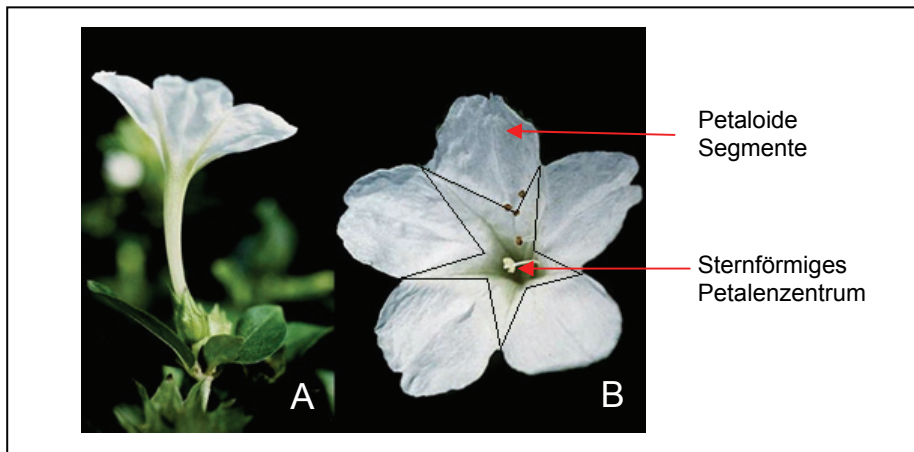
Spezies	Autor	Ursprung
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Fäldt <i>et al.</i> 2003	Blätter, jasmonsäureinduziert
<i>Lotus japonicus</i>	Arimura <i>et al.</i> 2004	Blätter, herbivorinduziert
<i>Antirrhinum majus</i>	Dudareva <i>et al.</i> 2003	Blüten
<i>Phaseolus lunatus</i>	Arimura <i>et al.</i> 2008	Blätter, jasmonsäure- und herbivorinduziert
<i>Citrus unshiu</i>	Shimada <i>et al.</i> 2005	Blüten
<i>Medicago trunculata</i>	Navia-Giné <i>et al.</i> 2009a und b	Blätter, herbivorinduziert

**Tab. 1: Identifizierte (*E*)- $\beta$ -Ocimensynthesen.**

Im Gegensatz dazu ist die Funktion des floral produzierten (*E*)- $\beta$ -Ocimens nahezu unerforscht. Die ubiquitär in floralen Bouquet nachgewiesene VOC gilt nicht als Lockstoff für spezifische Bestäuber (Knudsen *et al.* 2006, El-Sayed 2009). Darüber hinaus konnten bis dato nur zwei blütenspezifische (*E*)- $\beta$ -Ocimensynthesen isoliert und analysiert werden (Tab. 1).

#### 1.4. (*E*)- $\beta$ -Ocimen in *Mirabilis jalapa*

*Mirabilis jalapa* ist eine im tropischen Amerika beheimatete Pflanze, die in Europa wegen der Vielzahl ihrer auffallenden Blüten zunehmend als Zierpflanze geschätzt wird. Sie zählt zu den *Nyctaginaceae*. Pflanzen dieser Familie zeichnen sich u.a. durch eine spezielle Blütenmorphologie aus. Da ihre Blüten keine Petalen besitzen, übernehmen auffällig gefärbte Kelchblätter (Sepalen), die röhrenförmig verwachsen sind und trichterförmig auslaufen, die Schaufunktion. Abb. 4 zeigt eine *Mirabilis jalapa*-Blüte in zwei Perspektiven. Aufgrund äußerlicher Merkmale lässt sie sich in den petalenartigen oberen Teil und die tubuläre Blütenbasis unterteilen (A). Typisch insbesondere für die hell gefärbten Blüten dieser Art sind fünf grünliche spitz zulaufende Flächen entlang der Nerven auf der Außenseite der verwachsenen Sepalen. Wie in der Aufsicht (B) markiert, bilden diese Flächen eine sternförmige Struktur im Blütenzentrum, die nachfolgend mit dem Begriff sternförmiges Petalenzentrum bezeichnet wurde. Die Regionen der Blütenhülle außerhalb dieses Bereiches wurden als petaloide Segmente benannt (Große 2002).



**Abb. 4: Darstellung der in der vorliegenden Arbeit geltenden Terminologie der Blütenteile von *Mirabilis jalapa*.**

A: Gesamtblüte; B: Aufsicht.

Die *Mirabilis jalapa* ist ebenfalls unter dem Namen „4 o'clock“ bekannt, was sich auf die zeitlich präzise und synchrone Öffnung ihrer Blüten am späten Nachmittag bezieht. Die fünf Stunden andauernde Anthese verläuft in fünf Stadien, die hinsichtlich des Zeitpunktes sowie des Öffnungszustandes der Blüten deutlich unterscheidbar sind (Abb. 5). 12 Stunden nach Beginn des Lichtsignals beginnt die rund 8 Stunden andauernde Blühphase, nach deren Ablauf die Blüten deutliche Anzeichen der Seneszenz zeigen. Der Zeitpunkt der Anthese lässt sich ebenso wie die VOC-Emission durch die Veränderung des Lichtregimes variieren (Effmert *et al.* 2002).



**Abb. 5: Stadien der Anthese und Seneszenz der *Mirabilis jalapa*.**

(nach Gookin *et al.* 2003, abgewandelt)

1 – lange Knospe (6–13 Uhr), 2 – entspiralisierte Knospe (13–14 Uhr), 3 – röhrenförmig geöffnete Blüte (14–15.30 Uhr), 4 – trichterförmig geöffnete Blüte (15.30–18 Uhr), 5 – vollständig geöffnete Blüte, tellerförmig (18–22 Uhr), 6 – Stigmafalleffekt (22–2 Uhr), 7 – Seneszenz, gefaltete Blüte (ab 2 Uhr)

*Mirabilis jalapa* zeigt mit ihren nachts geöffneten, großen und hell gefärbten Blüten mit langem Kelch die charakteristischen Merkmale mottenbestäubter Blüten. In ihrem natürlichen Lebensraum wurden nachtaktive Insekten aus der Gruppe der *Sphingidae*, z.B. *Erinnyis ello* und *Hyles lineata*, als Bestäuber beschrieben (Martinez del Rio und Búrquez 1986). Häufig wird die Reproduktion jedoch durch Selbstbestäubung sichergestellt (Leal *et al.* 2001; Niesenbaum 1999).

*Mirabilis jalapa* war und ist ein vielseitiges Untersuchungsobjekt verschiedener Forschungsrichtungen. Correns nutzte sie in den Jahren 1902–1910 als Modell zur Untersuchung der Mendel'schen Vererbung anhand der Blütenfarbe. Aktuell wird sie in der Erforschung der Blütenöffnung und Seneszenz (Xu *et al.* 2005) eingesetzt. Außerdem besitzt sie hohes Transformationspotential, das die Grundlage für zukünftige Untersuchungen durch gentechnische Veränderungen ist (Zaccai *et al.* 2007, Xu *et al.* 2005, Effmert unveröffentlicht).

Heath und Manukian beschrieben 1994 erstmalig (*E*)- $\beta$ -Ocimen als Hauptbestandteil der von *Mirabilis jalapa* floral emittierten VOCs. Effmert *et al.* ermittelten die Zusammensetzung des Blütenduftes aus wenigen Komponenten (2005). Neben dem Monoterpen (*E*)- $\beta$ -Ocimen sind Spuren von Alloocimen und Myrcen ebenfalls nachweisbar. Untersuchungen des volatilen Profils haben ergeben, dass die florale VOC-Emission am frühen Abend (17–20 Uhr, Stadien 4 und 5) ihr Maximum erreicht und bis Mitternacht beendet ist. Neben der zeitlichen Regulation hat die Duftstoffemission auch eine organspezifische Komponente. Wie Effmert *et al.* ebenfalls 2005 nachwiesen, wird das (*E*)- $\beta$ -Ocimen nahezu ausschließlich von den petaloiden Segmenten der Blüte emittiert. Frühere Untersuchungen zeigten die hohe Permeabilität der Epidermis dieser Segmente (Große 2002). Weitere histologische Untersuchungen offenbarten eine Veränderung des Gewebes der petaloiden Segmente im Verlauf des Lebenszyklus der Blüte. Das im frühen Knospenstadium vorhandene kompakte Mesophyll ist bereits in der geöffneten Blüte nur noch rudimentär nachweisbar. Darüber hinaus wurden in diesen Untersuchungen keine Hinweise auf das Vorhandensein spezieller Organe zur VOC-Produktion und -Emission (Osmophoren) gefunden.

Die zeitlich kompakte Abfolge des Lebenszyklus der Einzelblüte und die Emission des komponentenarmen Blütenduftes sowie die einfache Manipulation des Anthesebeginns machen *Mirabilis jalapa* zu einem geeigneten Modell für die Erforschung der Regulation der floralen VOC-Synthese und -Emission. Der wenigschichtige Aufbau des Blütengewebes ermöglicht histologische Untersuchungen hinsichtlich der Biogenese und Speicherung oder der Freisetzung des Blütenduftes.



## 1.5. Zielstellung

Obwohl das Monoterpen (*E*)- $\beta$ -Ocimen eines der am weitesten verbreiteten VOCs ist, das sowohl aus vegetativem als auch floralem Geweben emittiert wird, ist über florale metabolische Prozesse, die zur Synthese und Emission dieses Monoterpens führen, vergleichsweise wenig bekannt. In der vorliegenden Arbeit soll die (*E*)- $\beta$ -Ocimensynthese in Blüten von *Mirabilis jalapa* umfassend beschrieben werden. Mit dieser Pflanze steht eine geeignete Modellpflanze zur Untersuchung des floralen (*E*)- $\beta$ -Ocimens zur Verfügung, da ihr Bouquet zu 90% aus diesem Monoterpen besteht.

Im ersten Teil sollte das die (*E*)- $\beta$ -Ocimensynthase codierende Gen aus *Mirabilis jalapa* isoliert werden, um die molekularbiologischen und biochemischen Grundlagen der (*E*)- $\beta$ -Ocimensynthese zu analysieren. Vorarbeiten (Große 2002) zur Findung dieses Gens empfahlen eine Aufreinigung des Enzyms mit anschließender Sequenzierung. Die Identifikation des Ocimen produzierenden floralen Gewebes und die Etablierung eines geeigneten Enzymassays bildeten die Basis der klassischen Aufreinigungsstrategie. Die mittels der sich daran anschließenden massenspektrometrischen Analysen gewonnenen Sequenzinformationen sollten zur Identifikation der vollständigen Sequenz der (*E*)- $\beta$ -Ocimensynthase via RT-PCR führen. Im Gegensatz zu anderen Modellpflanzen finden in *Mirabilis jalapa* sämtliche mit VOCs in Zusammenhang stehende Prozesse zeitlich komprimiert statt, da der Lebenszyklus der Einzelblüte nur 24 Stunden umfasst. Es war daher eine starke Regulation der Synthese des (*E*)- $\beta$ -Ocimens zu erwarten. Aus diesem Grund sollte die gewebespezifische Expression des codierenden Gens erforscht sowie die zeitliche Regulation, d.h. das Zeitfenster, in dem die mRNA oder das Protein nachweisbar sind, untersucht werden.

Im Focus des zweiten Teils der Arbeit standen Post-Synthese-Prozesse, die zur Emission von (*E*)- $\beta$ -Ocimen aus *Mirabilis jalapa* führen. Für Blütengewebe sind außer den beschriebenen Osmophoren keine mit der VOC-Produktion und -Emission assoziierten Strukturen bekannt. Darüber hinaus wurde die zelluläre Ebene der Produktion und des Transportes von VOCs bislang wenig untersucht. Aus diesem Grunde sollten die Blüten sowohl histologisch als auch biochemisch hinsichtlich ihres Terpengehaltes untersucht und aus den Ergebnissen Erkenntnisse für den floralen Monoterpenmetabolismus abgeleitet werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Pflanzenanzucht *Mirabilis jalapa*

*Mirabilis jalapa* wurden ganzjährig aus Samen (Monticello) im Gewächshaus unter natürlichen Lichtbedingungen in Einheitserde (Einheitserdewerk Uetersen) angezogen. Nachdem sich Knospen zeigten, wurden die Pflanzen in 5l-Töpfe umgesetzt und unter konstanten Lichtbedingungen ( $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , Tageslänge 14 h, Lichtphase 6–20 Uhr) und einer Temperatur von 21°C im Gewächshaus oder in Klimaschränken (*Percival Scientific*, CLF PlantClimatics GmbH) kultiviert.

#### 2.1.2. Chemikalien

Der überwiegende Teil der verwendeten Chemikalien wurde von der Carl Roth GmbH + Co. KG aus Karlsruhe bezogen. Ausnahmen werden bei den betreffenden Methoden benannt.

#### 2.1.3. Hersteller

Fett hinterlegt sind die in der Arbeit verwendeten Kurzbezeichnungen der Hersteller.

**Agilent** Technologies Deutschlang GmbH, Böblingen

Alltech Associates, Inc. Deerfield, USA

**Amicon**, Inc. Beverly, USA

Beckman Coulter, Inc., Brea, USA

**Biometra** GmbH, Göttingen

**Bio-Rad** Laboratories GmbH, München

Biozym Diagnostik GmbH, Hessisch Oldendorf

Canon Inc., Tokio, Japan

Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

Carl **Zeiss** AG, Oberkochen

CTC Analytics AG, Zwingen, Schweiz

DatInf GmbH, Tübingen

Einheitserdewerk Uetersen, Werner Tantau GmbH & Co. KG, Uetersen

**Fermentas** GmbH, St. Leon-Rot

**Finnzymes** Reagents, Espoo, Finnland

GATC-Biotech AG, Konstanz

**GE** Healthcare Life Sciences, Uppsala, Schweden

Gerhard Menzel, Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig

**Invitrogen** GmbH, Karlsruhe

Kleinfeld Labortechnik, Gehrden

KNF Neuberger GmbH, Freiburg

LC Packings Amsterdam, Niederlande

**MACHEREY-NAGEL** GmbH & Co. KG, Düren

Matrix Science, London, Großbritannien

**Millipore** Corporation, Billerica, USA

Monticello, Charlottesville, USA

**MWG**-Biotech AG Ebersberg

New England Biolabs, Ipswich, USA

Nikon, Tokio, Japan

Percival Scientific, CLF PlantClimatics GmbH, Emersacker

**Pharmacia**, Uppsala, Schweden  
**Philips**, Eindhoven, Niederlande  
**PLANO** Elektronenmikroskopie, Wetzlar  
**Promega** GmbH, Mannheim  
**ROCHE** Diagnostics – Applied Science, Mannheim  
**Sartorius Stedim Biotech**, Aubagne Cedex, Frankreich  
**Schneider Werkzeug- und Maschinenfabrik GmbH**, Bräunlingen  
**SHIMADZU CORPORATION**, Kyoto, Japan  
**SIGMA** Laborzentrifugen GmbH, Osterode  
Sigma-Aldrich, St. Louis, USA  
**SERVA** Electrophoresis GmbH, Heidelberg  
**Sorenson BioScience**, Salt Lake City, USA  
**Symrise AG**, Holzminden  
**Thermo Fisher Scientific Inc.** Waltham, USA  
**Qiagen**, N.V., Hilden  
**Vibratome**, St. Louis, USA

#### **2.1.4. Bakterienstämme und Vektoren**

<i>E. coli</i> XL-1 Blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proABlacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)]
<i>pJET</i>	<i>blunt end</i> -Klonierungsvektor zur Klonierung von PCR-Fragmenten (Fermentas GmbH)
<i>pGEM®-T</i>	Klonierungsvektor mit 3'-Thymidin Überhang zur Klonierung von PCR-Fragmenten (Promega GmbH)

#### **2.1.5. Medien**

LB-Medium: 10 g Bacterial Peptone, 5 g Hefe-Extrakt und 5 g NaCl, H<sub>2</sub>O *ad* 1l.

LB-Agar: 13 g Agar pro l LB-Medium.

Ampicillin-Stammlösung: 100 mg/ml H<sub>2</sub>O, 1 ml pro l LB-Medium bzw. Agar

### **2.2. Proteinbiochemische Methoden**

#### **2.2.1. Herstellung eines Proteinrohextraktes aus *Mirabilis jalapa*-Blüten (abgewandelt nach Croteau und Karp 1977)**

Alle Arbeiten wurden auf Eis oder bei 4°C durchgeführt. Frisch geerntete Blüten wurden in sternförmiges Petalenzentrum und petaloide Segmente zerteilt (vgl. Abb. 4), kurz in eiskaltem 0,1 M Croteau-Puffer (pH 6,9) inkubiert und unter Zusatz von gereinigtem Seesand im Mörser homogenisiert. Dem durch Zentrifugation (10 min, 13000 x g, 3K30, SIGMA) gewonnenen klaren Überstand wurde Glycerol in einer finalen Konzentration von 10% zugesetzt.

Croteau-Puffer: 0,1 M Natriumphosphat-Puffer (pH 6,9), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,25 mM Sucrose, 1 mM CaCl<sub>2</sub>.

Vor Verwendung 25 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 5 mM Ascorbinsäure, 1 mM DTT und 1 Spatel PVPP zugeben.

### 2.2.2. Colorimetrische Bestimmung des Proteingehalts

Die Bestimmung der Proteingehalte sämtlicher Proben wurde nach Bradford (1976) mit dem entsprechenden Reagenz (Bio-Rad) durchgeführt. Alle Messungen erfolgten im Photometer (*Utrospec 3000*, Pharmacia) gegen eine Eichkurve mit BSA im Konzentrationsbereich von 1–20 µg/µl.

### 2.2.3. In vitro-Assay der (E)-β-OS-Aktivität

Zur Überprüfung der spezifischen Aktivität der (E)-β-OS wurden *in vitro*-Enzymassays mit allen Rohextrakten und Fraktionen sämtlicher Reinigungsstufen durchgeführt. Bei den Untersuchungen zur Etablierung und Optimierung des Assays wurde der Standardassay in jeweils einer der in Tab. 2 genannten Bedingungen oder Konzentrationen variiert.

Parameter	untersuchter Bereich
Substratkonzentration	0–378 µM GPP
Cofaktoren	5–85 mM MgCl <sub>2</sub> bzw. 0–30 mM MnCl <sub>2</sub>
Assaydauer	20–100 min
Temperatur	4–40 °C

**Tab. 2:** Zur Optimierung des *in vitro*-Assays der (E)-β-OS-Aktivität untersuchte variable Parameter.

Der Standardassay wurde folgendermaßen durchgeführt: 93 µl Probe wurden mit 30 mM MgCl<sub>2</sub> sowie 55 µM GPP gemischt und mit 200 µl Hexan überschichtet. Nach der Inkubation (40 min, 30°C) wurde die Reaktion durch kräftiges Schütteln abgestoppt und die Reaktionsprodukte nach der Zugabe von 2 µl des internen Standards α-Terpineol (Stammlösung 200 ng/µl) ausgeschüttelt. 170 µl der Hexanphase wurden zur Analyse und Identifikation der enthaltenen VOCs gaschromatographisch und massenspektrometrisch untersucht.

Die Proben wurden auf einer DB-5-MS-Säule (60 m x 0,25 mm x 0,25 µm; Agilent Technologies) analysiert (GC-MS QP 5000, 70 eV, SHIMADZU). Im *splitless liquid*-Injektionsmodus wurden 2 µl der Probe bei einer Temperatur von 200°C mittels eines Autosamplers (CTC Analytics) appliziert (*sampling time* 2 min). Die Säulentemperatur betrug 50°C am Anfang der Auftrennung, gefolgt von einer Steigerung von 10°C/min bis 300°C, mit einer finalen Verweilzeit von 15 min bei 300°C. Als Trägergas wurde Helium genutzt (Säulenfluss 1,1 ml/min, lineare *Velocity* 25,6 cm/s).

Die Massenspektren wurden im Ion-Scan-Modus gewonnen (*total ion count*, 35–350 *m/z*). Die Komponenten wurden durch den Vergleich der Massenspektren und Retentionszeiten mit denen von Standardsubstanzen und den Abgleich der Spektren mit den in der Bibliothek des *National Institute of Standards and Technology* (NIST 98 bzw. 147) hinterlegten identifiziert.

### 2.2.4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

#### A) Eindimensionale SDS-PAGE

Zur Kontrolle der Aufreinigung wurden die entstandenen Proteinfractionen mit der SDS-PAGE nach ihrer Molekularmasse aufgetrennt. Die genutzten diskontinuierlichen Polyacrylamidgele (12%, abgewandelt nach Lämmli 1970) wurden im *Miniprotean*-System (Bio-Rad) gegossen. Die Zusammensetzung der Gele ist Tab. 3 zu entnehmen.

	Trenngel	Sammelgel
30% Acrylamid	2,1 ml	1,65 ml
4 x Puffer	1,25 ml	1,25 ml
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	1,6 ml	2,05 ml
10% APS	50 µl	50 µl
TEMED	5 µl	5 µl

**Tab. 3: Zusammensetzung der Polyacrylamidgele**

Jeweils 10 µg Protein wurden in 1x Probenpuffer unter SDS-Überschuss auf 95°C erhitzt und kurz auf Eis abgekühlt. Die so vorbereiteten Proben wurden auf das Gel aufgetragen und in 1x Laufpuffer getrennt (90 min, 120 V). Die Größenbestimmung erfolgte durch die gleichzeitige Auftrennung von Markern, die Proteine bekannter Größe enthielten (*premixed molecular weight marker*, ROCHE).

5x Probenpuffer: 10 mM Tris-HCl (pH 6,8), 1 mM EDTA, 5% β-Mercaptoethanol, 10% Glycerol, 0,05% Bromphenolblau, 1% SDS. Lagerung bei 4°C.

Acrylamidlösung (30%): Rotiphorese®Gel30 (37,5:1)

Trenngelpuffer (4x): 1,5 M TRIS-HCl (pH 8,8), 0,4% (w/v) SDS

Sammelgelpuffer (4x): 0,5 M TRIS HCl (pH 6,8), 0,4% (w/v) SDS

Laufpuffer: 50 mM Tris (pH 8,3), 0,38M Glycin, 0,1% (w/v) SDS

Die für die massenspektrometrische Analyse bestimmten Proteinproben wurden in einem kommerziell erhältlichen Gradientengel (*NuPAGE Novex 4–12% Bis-TRIS Gel* 1,0 mm) in einem *XCell SureLock Mini-Cell* Elektrophoresesystem aufgetrennt. Maximal 0,5 µg Protein konnten pro Spur getrennt werden. Die Proben wurden mit 3x *NuPAGE LDS Sample Buffer* und 2x *NuPAGE Reducing Agent* gemischt und erhitzt (10 min, 70°C). Das Gel wurde nach Herstellerangaben vorbereitet und mit den Proben sowie dem Marker beladen (20 µl *SeeBlue®Plus2 Prestained Marker*, alle genannten Komponenten von Invitrogen). Die Auftrennung erfolgte in 50 mM MES (reduzierend, 30 min, 200 V).

MES Laufpuffer: 50 mM MES, 50 mM TRIS, 1 mM EDTA, 0,1% (w/v) SDS, 2,5 µl/ml *NuPAGE Antioxidant*

## **B) zweidimensionale SDS-PAGE**

Diese Methode diente ebenfalls der Auftrennung der mittels Chromatographie angereinigten Proteinfractionen zur massenspektrometrischen Analyse. Maximal 80 µg des zuvor in 50 mM Ammoniumacetat (pH 6,8) umgepufferten Proteins wurden lyophilisiert, in 400 µl Rehydratisierungslösung aufgenommen und auf IPG-Strips (*Immobilie Dry Strip* pH 4–7; Pharmacia) aufgetragen. Nach mindestens 10stündiger Inkubation erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der ersten Dimension nach folgendem Programm:

Stufe 1	500 V	500 Vh	2,5 h
Stufe 2	500 V	2500 Vh	5 h
Stufe 3	3500 V	10000 Vh	5,5 h
Stufe 4	3500 V	35000 Vh	10 h

Die Strips wurden anschließend mit Äquilibrierungslösung A und B behandelt und in die zuvor gegossenen SDS-Gele eingepasst, sowie 30 µl Marker (*premixed molecular weight marker*, ROCHE) aufgetragen. Die Auftrennung der zweiten Dimension erfolgte in einer Millipore-Apparatur bei 500 V und 1200-2000 W über Nacht. Abschließend wurden die Gele gefärbt (s. 2.2.5.B).

Rehydratisierungslösung: 8 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 1% CHAPS, 19,4 mM *DeStreak*-Lösung, 0,5% *Pharmalyte* (alle Komponenten GE Healthcare Life Sciences), Bromphenolblau

Trenngel: 119,7 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>, 136,8 ml 40% Acrylamid, 76,5 ml 2% Bis-Acrylamid, 112,5 ml 1,5 M TRIS-HCl (pH 8,8), 4,5 ml 10% SDS, 125 ml 10% APS, 225 µl Temed

Äquibrierungslösung A/B: 50 mM TRIS-HCl (pH 6,8), 6 M Harnstoff, 30% Glycerol, 4% SDS.

Für Lösung A 3,5 mg/ml DTT zufügen. Für Lösung B 45 mg/ml Iodoacetamid zufügen.

10x Laufpuffer 2. Dimension: 30 g/l Tris, 144 g/l Glycin, 10 g/l SDS

### **2.2.5. Proteinnachweis in Polyacrylamidgelen**

Alle mit der SDS-PAGE getrennten Proteine wurden zur Visualisierung der Banden gefärbt. Dazu wurden je nach applizierter Proteinmenge und Verwendungszweck unterschiedliche Methoden verwendet.

#### **A) Coomassie-Färbung**

Diese Methode wurde routinemäßig eingesetzt. Die Gele wurden für eine Stunde fixiert. Anschließend wurden sie in der Coomassie-Färbelösung bis zur optimalen Färbung der Banden inkubiert. Die unspezifische Färbung des Gels wurde durch die folgende Inkubation in Entfärber entfernt, bis der Hintergrund farblos erschien. Anschließend wurden die Gele in Cellophan getrocknet.

Fixierer: 25% (v/v) Isopropanol, 10% Eisessig

Coomassie-Färbelösung: 0,006% (w/v) *Serva Blau R-250* (SERVA Electrophoresis GmbH), 10% (v/v) Eisessig

Entfärber: 10% (v/v) Eisessig

#### **B) Kolloidale Coomassie-Färbung (Protokoll Dr. Christian Scharf)**

Mit dieser sensitiveren Variante der Coomassie-Färbung wurden Proteine angefärbt, die zur massenspektrometrischen Analyse verwendet werden sollten.

Die Gele wurden für ein bis zwei Stunden in Fixierer inkubiert und anschließend zweimal in Wasser gespült (10 min). Die Färbung erfolgte über Nacht in *Colloidal Coomassie Solution* (CCS). Überschüssiger Farbstoff wurde anschließend durch ein Bad in 20% Methanol entfernt. Abschließend wurde das Gel in H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> gewaschen (2 x 1h) und in Folie luftdicht eingeschweißt.

Coomassie Brilliant Blau Lösung (CBB stock): 5 g *Coomassie Brilliant Blau G-250*, H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> ad 100 ml.

Colloidal Coomassie Färbelösung (CCD stock): 50 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 6 ml Phosphorsäure (85%), mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> ad 490 ml sowie 10 ml *CBB stock* zufügen.

Colloidal Coomassie Solution (CCS): 200 ml *CDD stock* mit 50 ml Methanol mischen (frisch ansetzen).

#### **C) Silberfärbung (modifiziert nach Blum et al. 1987)**

Zur Visualisierung von Proben mit geringer Proteinkonzentration in SDS-Gelen wurde die Silberfärbung verwendet. Wegen ihrer irreversiblen Bindung an die Gelmatrix waren die Proteine nach der Färbung mit dieser Methode nicht zur massenspektrometrischen Analyse geeignet.

Zunächst wurden die Gele mindestens eine Stunde im Fixierer geschwenkt und anschließend in 50% Ethanol gewaschen (3 x 20 min). Das Gel wurde exakt 1 min mit Thiosulfatlösung behandelt und abgewaschen. Danach folgte die 20minütige Imprägnierung des Gels, die durch Wässern beendet wurde. Durch die anschließende Inkubation mit dem Entwickler wurden die Proteinbanden sichtbar gemacht. Nach dem Erreichen des optimalen Färbeergebnisses erfolgte Abbruch des Entwicklungsprozesses durch die Inkubation in Stopplösung (20 min). Abschließend wurden die Gele gewässert und in Cellophan getrocknet.

Fixierer: 25% Isopropanol, 10% Eisessig,  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  *ad* 100 ml.

Imprägnierer: 0,2 g  $\text{AgNO}_3$ , 75  $\mu\text{l}$  Formaldehyd,  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  *ad* 100 ml (frisch ansetzen).

Thiosulfat: 20 mg  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  *ad* 100 ml (frisch ansetzen).

Entwickler: 6 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 50  $\mu\text{l}$  Formaldehyd, 2 ml Thiosulfatlösung,  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  *ad* 100 ml (frisch ansetzen).

Stopplösung: 1,86 g EDTA,  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  *ad* 100 ml.

### **2.2.6. Proteinaufreinigung**

Zur Aufreinigung der (E)- $\beta$ -OS aus dem Rohextrakt wurden die unterschiedlichen biochemischen Eigenschaften der Proteine ausgenutzt.

#### **A) Ammoniumsulfatfällung**

Für diese Experimente, deren Schritte auf Eis stattfanden, wurden die Proteine aus 10 ml Rohextrakt durch 20, 40 bzw. 60% Ammoniumsulfat gefällt. Das entsprechende Volumen einer gesättigten Lösung (4,1 M) wurde mit dem Rohextrakt vermischt und 30 min inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Ansätze zentrifugiert (20 min, 13000 x g, 4°C, 1 K1, SIGMA). Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 0,1 M Crotaepuffer (pH 6,9) resuspendiert. Zur restlosen Entfernung des Ammoniumsulfates wurden alle Überstände und resuspendierten Pellets über Nacht gegen 0,1 M Crotaepuffer (pH 6,9) dialysiert.

#### **B) Säulenchromatographie**

Die zur Chromatographie verwendeten Lösungen mussten steril und partikelfrei sein, um die Säulenmatrix nicht zu verunreinigen. Daher wurden alle Puffer autoklaviert und/oder durch Filter mit 0,2  $\mu\text{m}$  Porengröße (Sartorius Stedim Biotech) filtriert. Alle Versuche fanden in einer Kühlzelle (Umgebungstemperatur  $5 \pm 1^\circ\text{C}$ ) statt. Die Auftrennungen wurden mit Hilfe des *Biologic Systems* (Bio-Rad) durchgeführt. Dadurch konnten definierte Flussraten der mobilen Phase sichergestellt werden. Die Probenapplikation erfolgte automatisch und die unterschiedlichen Fraktionen konnten mit Hilfe eines Fraktionssammlers (Modell 2110, Bio-Rad) gesammelt werden.

#### **Ultrafiltration**

Zwischen den einzelnen Chromatographieschritten war es nötig, die Pufferwechsel durchzuführen, die anfallenden großen Fraktionsvolumina aufzukonzentrieren oder die hohen Salzkonzentrationen zu senken. Dies wurde mit der Ultrafiltration in einer Ultrafiltrationszelle 8200 (Amicon, Inc.) mit einer Membran aus regenerierter Cellulose (Millipore) durchgeführt. Die Filtrationsmembran hatte eine Ausschlussgrenze von 30 kDa.

#### **Größenausschluss-Chromatographie (GA)**

Alle chromatographiespezifischen Komponenten wurden von der Firma GE bezogen. Das in Suspension vorliegende *Sephacryl S-200* wurde luftblasenfrei in eine 214 ml fassende Glassäule eingefüllt. Nach ihrer Sedimentation wurde die Matrix mit dem Laufpuffer 0,1 M

Croteaupuffer (pH 6,9) äquilibriert und anschließend mit dem *Gel Filtration Calibration Kit* nach Herstellerangaben kalibriert. Durch die GA konnten maximal 2 ml Rohextrakt pro Lauf mit einer Flussrate von 2 ml/min aufgetrennt werden. Die Fraktionen hatten ein Volumen von je 6 ml und wurden abschließend durch Ultrafiltration um das 3fache konzentriert.

### **Ionenaustauschchromatographie**

In diesen Untersuchungen wurden gebrauchsfertige Anionen- bzw. Kationenaustauscher-Säulen mit 10 ml Bettvolumen (*Bioscale Q* bzw. *S*, Bio-Rad) mit den vom Hersteller angegebenen Puffern (0,01-0,1 M TRIS (pH 8) bzw. 0,1 M MES (pH 5,5)) genutzt. Dies erforderte die Umpufferung der Proben in den spezifischen Laufpuffer vor ihrer Applikation. Die Chromatographie wurde mit Flussraten von 3 ml/min durchgeführt. Zur Elution wurde ein ansteigender Stufengradient in 0,1 M-Schritten von 0–1 M NaCl verwendet. Das Volumen der Fraktionen betrug 20 ml, die durch nochmaliges Umpuffern auf rund 1,5 ml konzentriert wurden.

### **Chromatographie an Hydroxyapatit (HA)**

Der für die Herstellung der Rohextrakte und die *in vitro*-Assays verwendete und auf 0,1 M Natriumphosphat basierende Croteaupuffer (pH 6,9) barg mit steigender Molarität das Risiko der Kristallbildung, das durch eine niedrige Umgebungstemperatur verstärkt wurde. Daher wurde 0,1 M K-Croteaupuffer (pH 6,9) basierend auf Kaliumphosphatpuffer (Startpuffer) für die Chromatographie an HA verwendet. In ihm wurde 1g kristallines Hydroxyapatit (*BioGel®HTP Gel*, Bio-Rad) suspensiert und die Lösung durch nachfolgendes Dekantieren von Bruchstücken getrennt. Die auf diese Weise vorbereitete Matrix wurde in eine Glassäule (5 ml, Bio-Rad) gefüllt und sedimentiert. Nach der Äquilibration mit Startpuffer konnten die in 0,1 M K-Croteaupuffer (pH 6,9) umpuffernten Proteinproben appliziert werden. Die Chromatographie wurde mit einer Flussrate von 2 ml/min durchgeführt. Durch eine stufenweise Erhöhung der Phosphatkonzentration im Startpuffer von 0,1–0,8 M in 0,1 M-Schritten wurden die Proteine in 20 ml-Fraktionen eluiert und während eines erneuten Pufferwechsels in 0,1 M Croteaupuffer (pH 6,9) auf ca. 1,5 ml konzentriert.

Die Säulen wurden vor jedem Chromatographie-Lauf erneuert.

## **2.2.7. Analyse mittels nano-LC-ESI-Massenspektrometrie**

Die Untersuchungen wurden freundlicherweise am Interfakultären Institut für Genetik und Funktionelle Genomforschung der Universität Greifswald durch Dr. Elke Hammer und Dr. Christian Scharf vorgenommen.

Gelbanden von Interesse wurden aus Coomassie-gefärbten 1-D-SDS-Gelen ausgeschnitten und in 0,5 ml Röhrchen (Sorenson, BioScience) überführt. Die Gelstückchen wurden mit 200 µl 20 mM Ammoniumbicarbonat ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) und 50% ACN entfärbt (30 min) und mit 100 µl 100% ACN dehydriert (2 x, 15 min, 37°C, leichtes Schütteln). Die anschließende Proteolyse wurde in Trypsinlösung in 20 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  durchgeführt (ü.N., 37°C) und die Reaktion durch den Zusatz von Essigsäure (Endkonzentration 0,1%) gestoppt. Die Peptidextraktion erfolgte durch die Inkubation der Gelstückchen in 25 µl 0,1% Essigsäure (30 min, 30°C, Ultraschallwasserbad), der ein zweiter Extraktionsschritt mit 25 µl 0,05% Essigsäure und 50% ACN unter denselben Bedingungen angeschlossen wurde. Beide Extrakte wurden vereint und nach ihrer Vakuumtrocknung mit 0,05% Essigsäure und 2% ACN auf ein Endvolumen von 12 µl aufgefüllt.

Die Peptidgemische wurden anschließend mittels einer *PepMap™ reverse phase*-Säule (C18, 75 µm innerer Durchmesser x 150 mm, LC Packings) in einer nano-HPLC-Anlage (MDLC, GE) getrennt (95 min, nichtlinearer Gradient 9–54% ACN in 0,1% Essigsäure, konstante Flussrate 300 nl/min). Das resultierende Eluat wurde in ein 7-Tesla Finnigan LTQ-FT-Massenspektrometer (Thermo Scientific) geleitet, das mit einer Nanoelektrospray-Ionenquelle ausgerüstet war. Nach einem ersten Übersichtsscan in einem FTICR (*Fourier transform ion cyclotron resonance*)-Massenspektrometer ( $r=25.000$ ) wurden die 3 Ionen



mit der höchsten Intensität in der linearen Ionenfalle jeweils isoliert und fragmentiert (induzierte Kollisionsenergie von 35%). Parallel dazu erfolgte die Bestimmung der exakten Ionenmasse im FTICR *single ion scan mode* ( $r=50.000$ ).

Die MS/MS-Spektren wurden mittels Mascot (Matrix Science) zunächst gegen die Datenbank SwissProt und anschließend gegen eine Datenbank mit allen bisher bekannten Terpensynthase-Sequenzen (74, vgl. Tab. 16, Anhang) und 100 Proteinen als Hintergrund auf homologe Sequenzen geprüft und dabei folgende Parameter angewendet: Peptidtoleranz: 20 ppm; Fragmenttoleranz: 0,8 Da, verpasste Trypsinspaltungen: 1. Als signifikant identifiziert wurden Peptide mit einem Score  $> 30$  ( $p<0,05$ ) angesehen. In einem zweiten Datenbankvergleich wurden die in der ersten Runde identifizierten Terpensynthasen einer Fehler-toleranten Analyse ([http://www.matrixscience.com/help/error\\_tolerant\\_help.html](http://www.matrixscience.com/help/error_tolerant_help.html)) unterzogen, um auch bisher unbekannte Modifikationen bzw. den Austausch von Aminosäuren in homologen Sequenzbereichen in Betracht zu ziehen.

## **2.3. Molekularbiologische Methoden**

### **2.3.1. Extraktion von Nukleinsäuren**

#### **RNA-Extraktion**

Die Extraktion von RNA aus 200 mg Blütenmaterial wurde entsprechend der kombinierten GTC-CTAB-Methode von Camacho-Villasana durchgeführt (2002).

#### **DNA-Extraktion**

Die Extraktion der genomischen DNA wurde mit dem *Nucleo Spin Plant Kit* (MACHEREY-NAGEL) nach Herstellerangaben durchgeführt.

#### **Plasmidisolation**

Eine Voraussetzung für den Erfolg der nachfolgenden Sequenzierungen war sehr reine Plasmid-DNA. Daher wurde der *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen) zur Plasmidisolation eingesetzt. Dazu wurden 5 ml *E.coli*-Kulturen in LB-Medium kultiviert (ü.N., 37°C, 180 rpm). Aus den anschließend pelletierten Zellen wurde die Plasmid-DNA nach den Herstellerangaben extrahiert.

#### **Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren**

Im Anschluss an die Extraktion erfolgte die Bestimmung der RNA- bzw. DNA-Konzentration der erhaltenen Lösung am Photometer (*Smart Spec 3000*, Bio-Rad). Die Nukleinsäurelösung wurde mit  $H_2O_{bidest}$  verdünnt und ihre Extinktion (E) bei den Wellenlängen 260 und 280 nm bestimmt. Vom Quotienten  $E_{260}/E_{280}$  ließ sich die Reinheit der Nukleinsäurelösung ableiten. Lag dieser Wert zwischen 1,8 und 2,0, hatte die RNA- bzw. DNA-Lösung eine Reinheit von 70–90%.

#### **Gelelektrophoretische Auftrennung von RNA**

Die Intaktheit der isolierten RNA wurde durch Auftrennung im denaturierenden 1%igen Agarosegel durch horizontale Elektrophorese im *Sub Cell GT System* (Bio-Rad) kontrolliert. 10 µg RNA wurden mit  $H_2O_{bidest}$  auf ein Volumen von 20 µl aufgefüllt und mit 40 µl RNA-Farbmix versetzt. Vor der Applikation in das vorbereitete Gel inkubierte der Ansatz 15 min bei 65 °C und danach weitere 2 min auf Eis. Nach der Elektrophorese (45 min, 70 V) wurden die Gele unter UV-Licht in einer Geldokumentationsanlage (MWG) fotografiert und gesichert.

**10x Laufpuffer:** 0,2 M MOPS (pH 7,0), 50 mM Natriumacetat, 5 mM EDTA

**1% denaturierendes Agarosegel:** 0,5 g Agarose (Duchefa Biochemie B.V.), 5 ml 10x Laufpuffer, 9 ml Formaldehyd (35% Lösung),  $H_2O_{dest}$  ad 50 ml.

RNA-Farbmix: 60 µl 10x Laufpuffer, 220 µl Formaldehyd, 600 µl Formamid (100%), 120 µl DNA-Farbmix, 10 µl Ethidiumbromidstammlösung (5 mg/ml)

### **Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA**

Die extrahierte DNA sowie die in der PCR hergestellten Amplifikate wurden in 1-1,5%igen Agarosegelen durch horizontale Elektrophorese im *Sub Cell GT System* (Bio-Rad) aufgetrennt. Die hochprozentigen Gele wurden bei erforderlicher Erhöhung der Trennschärfe eingesetzt. In den mit 1x TAE-Laufpuffer überschichteten Gelen wurden die mit 1/5 Volumen *Roti Load DNA* versehenen Proben bei einer Spannung von 65 V bis zum Erreichen der optimalen Separation aufgetrennt. Die Dokumentation der DNA erfolgte nach der Zugabe von Ethidiumbromid mittels UV-Licht (Geldokumentation, MWG).

50x TAE-Puffer: 2 M TRIS-HCl (pH 8,0), 0,05 M EDTA-Lösung, 1 M Eisessig

1% Agarosegel: 0,5 g Agarose, 50 ml 1x TAE

Ethidiumbromidstammlösung (5 mg/ml)

### **2.3.2. Herstellung und Transformation chemokompetenter *E. coli*-Zellen**

Eine *E. coli*-Einzelkolonie (*XL1 Blue*) wurde in 5 ml LB-Medium überimpft und über Nacht inkubiert (37°C, 180 rpm). Mit 1 ml dieser Vorkultur wurden 100 ml LB-Medium angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 ca. 2–3 Stunden geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen 5 min auf Eis inkubiert und nach der Überführung in 50 ml-Röhrchen zentrifugiert (5 min, 4000 x g, 4°C, 3K30, SIGMA). Die Zellpellets wurden in 15 ml kaltem TFB I Puffer resuspendiert und 90 min auf Eis gelagert. Nach einer weiteren Zentrifugation (5 min, 4000 x g, 4°C) wurden die Zellen in 4 ml kalten TFB II Puffer aufgenommen und in 50 µl Aliquots bei -70°C gelagert.

Vor der erstmaligen Verwendung der chemokompetenten Zellen wurde ihre Transformationsrate mit Hilfe eines Kontrollplasmides (z.B. zirkuläres *pGEM®-T*) bestimmt.

Zur Transformation wurde ein Aliquot chemokompetenter *E. coli*-Zellen auf Eis aufgetaut und mit 3 µl Plasmid-DNA vorsichtig vermischt. Nach 30minütiger Inkubation auf Eis folgte ein Hitzeschock (45 sec, 42°C). Anschließend wurden die Zellen 2 min bei 37°C gelagert, bevor sie mit 250 µl vorgewärmtem SOC-Medium gemischt und geschüttelt wurden (1 h, 37°C, 180 rpm). Im letzten Schritt wurden die Zellen auf selektiven LB-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

TFB I Puffer (pH 5,8): 0,1 M RbCl, 50 mM MnCl<sub>2</sub>x2H<sub>2</sub>O, 30 mM Kaliumacetat, 10 mM CaCl<sub>2</sub> x2H<sub>2</sub>O, 15% (v/v) Glycerol, sterilfiltrieren.

TFB II Puffer (pH 7,0): 75 mM CaCl<sub>2</sub>x2H<sub>2</sub>O, 10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 15% (v/v) Glycerol, sterilfiltrieren.

SOC-Medium: 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 2% (w/v) Trypton, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl. Nach dem Autoklavieren 20 mM Mg<sup>2+</sup>-Lösung (1 M MgI<sub>2</sub>x6H<sub>2</sub>O und 1 M MgSO<sub>4</sub>x7H<sub>2</sub>O) und 20 mM Glucose zufügen.

### **2.3.3. Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Durch die PCR wurden spezifische DNA-Fragmente in Thermocyclern (Biometra bzw. Hybaid) amplifiziert. Zur Kontrolle der Reaktion wurden stets Reaktionsansätze ohne Template bzw. ohne Polymerase mitgeführt. Die Ansätze wurden, wenn nicht anders beschrieben, nach der Reaktion elektrophoretisch im Agarosegel aufgetrennt, die

gewünschten Fragmente ausgeschnitten und mittels *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) aufgereinigt.

## **A) RT-PCR**

### **Reverse Transkription (RT)**

Um sicherzustellen, dass die Amplifikate der RT-PCR von der mRNA stammen, wurde die RNA zu Beginn einem DNase-Verdau unterzogen (DNase I, Sigma-Aldrich), für den 1-2 µg Gesamt-RNA eingesetzt wurden.

Eine hohe Reaktionstemperatur der Reversen Transkription kann die sie behindernden Sekundärstrukturen in der mRNA eindämmen. Daher wurden verschiedene Enzyme, die sich in ihren Temperaturoptima unterschieden, in den im Folgenden aufgeführten unterschiedlichen Reaktionsansätzen (I–III) genutzt.

<b>Ansatz I</b>	0,2 µg	RNA nach DNase-Verdau
	2 µl	dNTPs (jeweils 10 mM)
	1 µl	<i>antisense</i> Primer (10 pmol/µl)
	H <sub>2</sub> O	ad 17 µl
5 min 65°C		
	5 µl	5x <i>Thermoscript III-Puffer</i>
	1 µl	0,1 M DTT
	1 µl	<i>RNase OUT</i> (Invitrogen)
	1 µl	<i>Thermoscript III-RT</i> (200 U, Invitrogen)
60 min 60°C		
5 min 85 °C		
	1 µl	<i>RNaseT</i>
20 min 37°C		

<b>Ansatz II</b>	1 µg	RNA nach DNase-Verdau
	1 µl	<i>antisense</i> Primer (10 pmol/µl)
	H <sub>2</sub> O	ad 17 µl
5 min 70°C		
	6 µl	5x <i>Superscript III-Puffer</i>
	4 µl	dNTPs (jeweils 10 mM)
	2 µl	0,1 M DTT
	1 µl	<i>RNase Out</i> (Invitrogen)
2 min 55°C		
	1 µl	<i>Superscript III</i> (200 U, Invitrogen)
60 min 55°C		
15 min 70°C		

<b>Ansatz III</b>	1 µg	RNA nach DNase-Verdau
	1 µl	<i>antisense</i> Primer (10 pmol/µl)
	H <sub>2</sub> O	ad 17 µl
5 min 70°C		
	5 µl	5x <i>M-MLV-Puffer</i>
	1 µl	dNTPs (jeweils 10 mM)
	1 µl	<i>RNase OUT</i> (Invitrogen)
2 min 42°C		
	1 µl	<i>M-MLV-RT</i> (200 U, Invitrogen)
60 min 42°C		
10 min 70°C		

## PCR

Zur Amplifikation der in der RT generierten cDNAs wurden unterschiedliche DNA-Polymerasen in verschiedenen Reaktionsansätzen genutzt. Die gewählte Annealingtemperatur ( $T_a$ ) war abhängig von der eingesetzten Primerkombination. Routinemäßig wurde der *Taq PCR Master Mix* (Qiagen) in dem folgenden Pipettierschema eingesetzt:

Pipettierschema		Temperaturprogramm	
5–10 µl	RT-Reaktionsansatz	2 min	94°C
2 µl	sense Primer (10 pmol/µl)	30 sec	94°C
2 µl	antisense Primer (10 pmol/µl)	1 min	$T_a$
25 µl	<i>Taq PCR Master Mix</i> (Qiagen)	1 min	72°C
H <sub>2</sub> O ad 50 µl		10 min	72°C

35x

Zur Erhöhung der Stringenz wurde der PCR in einigen Fällen eine Zweitstrangsynthese vorangestellt (s. 2.3.3.C). Bei Amplifikationsproblemen wurde die *Taq*-Polymerase (Invitrogen) verwendet.

Pipettierschema		Temperaturprogramm	
5–10 µl	RT-Reaktionsansatz	2 min	94°C
2 µl	sense Primer (10 pmol/µl)	30 sec	94°C
2 µl	antisense Primer (10 pmol/µl)	1 min	$T_a$
1 µl	dNTPs (jeweils 10 mM)	1 min	74°C
5 µl	10x PCR Puffer	10 min	74°C
1,5 µl	50 mM MgCl <sub>2</sub>		
0,5 µl	<i>Taq</i> -Polymerase (5 U)		
H <sub>2</sub> O ad 50 µl			

35x

## B) Inverse RT-PCR

Zunächst wurde die cDNA an ihrem 5'-Ende mit dem zur Ligation nötigen Phosphatrest versehen. Dazu konnte entweder i) ein phosphorylierter Primer zur Herstellung der cDNA in der RT eingesetzt werden (Eyal *et al.* 1999), ii) die mit einem Standardprimer über Reverse Transkription erzeugte cDNA nachträglich phosphoryliert werden oder iii) ein phosphorylierter Primer an eine mit einem Standardprimer erzeugte cDNA ligiert werden (Tessier *et al.* 1986; Troutt *et al.* 1992; Edwards *et al.* 1991).

Für den Versuchsansatz i) wurde die RT-PCR mit der *Superscript III-RT* (s. Ansatz II, Abschnitt Reverse Transkription) und 5 µl des Primers MIR-rev-P (blockiert, 10 pmol/µl, s. 2.3.5.) durchgeführt. Die eingesetzte RNA wurde anschließend durch saure Hydrolyse zerstört (2 µl 6 N NaOH). Der pH-Wert der Ansätze wurde neutralisiert (2 µl 6 N Essigsäure) und die sscDNA abschließend mit dem *Extract II-Kit* (MACHEREY-NAGEL) gereinigt. Alternativ konnte die RNA durch den Einsatz von RNase H (Invitrogen) abgebaut und die sscDNA aufgereinigt werden.

Für den Versuchsansatz ii) wurde die cDNA wurde nach folgendem Schema phosphoryliert.

3 µl	cDNA (1/10 der RT-Ansätze)
1 µl	10x Kinasepuffer
3 µl	10 mM ATP
1 µl	PEG 4000 (50%)
2 µl	<i>T4-Polynucleotide Kinase</i> (20 U, New England Biolabs (NEB))
10 min 37°C	
10 min 70°C	

In Versuchsansatz iii) wurde ein phosphorylierter Primer an die cDNA ligiert.

<i>Pipettierschema</i>	5 µl	cDNA (1/6 der RT-Ansätze)
	2 µl	PEG 4000 (50%)
	1 µl	10x <i>T4-RNA-Ligasepuffer</i>
	0,5 µl	<i>T4-RNA-Ligase</i> (10 U, NEB)
	1 µl	MIR-rev-P (blockiert, 10 pmol)
ü.N. 37°C		

Die so vorbereiteten cDNAs wurden anschließend zirkularisiert und anschließend mit dem *Extract II-Kit* (MACHEREY-NAGEL) aufgereinigt.

<i>Pipettierschema</i>	8 µl	sscDNA
	3 µl	10x <i>T4-RNA-Ligasepuffer</i>
	1 µl	<i>T4-RNA-Ligase</i> (20 U, NEB)
	H <sub>2</sub> O	ad 30 µl
ü.N. 37 °C		
15 min 65°C		

Die zirkulären cDNAs wurden anschließend als Templates für die inverse PCR eingesetzt, durch die bekannte Sequenzen verlängert werden können. Die in den bekannten Sequenzabschnitten hybridisierenden Primer umschlossen den unbekannten Sequenzabschnitt und ermöglichten so die Amplifikation der unbekannten Bereiche.

<i>Pipettierschema</i>	<i>Temperaturprogramm</i>
1 µl zirkuläre sscDNA	2 min 94°C
2 µl <i>sense</i> Primer (10 pmol/µl)	30 sec 94°C
2 µl <i>antisense</i> Primer (10 pmol/µl)	30-60 sec Ta
1 µl dNTPs (jeweils 10 mM)	90 sec 72°C
5 µl 10xPCR Puffer	10 min 72°C
1,5 µl 50 mM MgCl <sub>2</sub>	} 25-30x
0,5 µl <i>Taq-Polymerase</i> (5 U, Invitrogen)	
H <sub>2</sub> O ad 50 µl	

Die Zyklenzahl war variabel und wurde für jede Amplifikation angepasst.

### **C) 5' RACE**

#### **Anhängen des Poly-A-Schwanzes**

Zur Vervollständigung einer bekannten Sequenz in Richtung 5'-Terminus wurde die cDNA durch eine Terminale Transferase mit einem Poly-A-Schwanz versehen.

Pipettierschema:

0,5 – 4 µl	cDNA (mit Primer <i>MIR-rev</i> generiert)
4 µl	<i>TdT</i> -Puffer
2,5 µl	10 mM ATP
1 µl	<i>Terminale Transferase</i> ( <i>TdT</i> , 15 U, Invitrogen)
2h 37°C	
0,5 µl	<i>TdT</i> (7,5 U)
ü.N. 37°C	
10 min 70°C	

#### **PCR**

Die mit dem Poly-A-Schwanz versehene cDNA wurde anschließend in einer PCR mit einem *Oligo-dT(N)* Primer und einem für die bekannte Sequenz spezifischen Primer amplifiziert.

<i>Pipettierschema</i>		<i>Temperaturprogramm</i>	
5 µl	<i>TdT</i> -Reaktionsansatz	2 min	94°C
5 µl	<i>Oligo-dT(N)</i> (10 pmol/µl)	30 sec	94°C
5 µl	<i>MIR-rev</i> (10 pmol/µl)	1 min	Ta
25 µl	<i>Taq PCR Master Mix</i> (Qiagen)	1 min	72°C
H <sub>2</sub> O	ad 50 µl	10 min	72°C

30x

Zur Steigerung der Stringenz wurde die PCR in einigen Fällen etwas abgewandelt. Zunächst wurde die cDNA in einer sogenannten Zweitstrangsynthese mit dem *sense* Primer in einem PCR-Zyklus amplifiziert. Ein Aliquot des Ansatzes diente anschließend in einem Standard-PCR-Ansatz als Template.

Zweitstrangsynthese:

<i>Pipettierschema</i>		<i>Temperaturprogramm</i>	
1,5 µl	cDNA-Ansatz	2 min	94°C
1 µl	<i>sense</i> Primer (10 pmol/µl)	30 sec	94°C
12,5 µl	<i>Taq PCR Master Mix</i> (Qiagen)	1 min	Ta
		1 min	72°C

PCR:

<i>Pipettierschema</i>		<i>Temperaturprogramm</i>	
5 µl	Reaktionsansatz Zweitstrangsynthese	2 min	94°C
2 µl	<i>sense</i> Primer (10 pmol/µl)	30 sec	94°C
2 µl	<i>antisense</i> Primer (10 pmol/µl)	1 min	Ta
25 µl	<i>Taq PCR Master Mix</i> (Qiagen)	1 min	72°C
H <sub>2</sub> O	ad 50 µl	10 min	72°C

35x

### **D) 3'-RACE**

Zur Vervollständigung einer bekannten Sequenz in Richtung ihres 3'-Terminus wurde die cDNA durch die Verwendung eines *Oligo-dT(N)* Primers, der eine Ankersequenz beinhaltet, durch Reverse Transkription (s. Abschnitt 2.3.3.) hergestellt. Anschließend wurde die cDNA mit einem ankerspezifischen und einem transkriptspezifischen Primer in einer PCR amplifiziert.

### **E) PCR auf genomischer DNA**

#### **Inverse PCR**

Zur Amplifikation unbekannter DNA-Abschnitte, die in unmittelbarer Nähe zu bekannten Sequenzabschnitten liegen, wurde die Inverse PCR eingesetzt. 2 µg genomische DNA wurden mit den Restriktionsendonukleasen *ECO RV* oder *Pvu II* nach Herstellerprotokoll gespalten (10 U, ü.N., 37°C) und das Ergebnis der Reaktion anschließend durch Agarosegelelektrophorese (siehe Abschnitt 2.3.1.) bewertet. Nach erfolgreichem Verdau wurde der Ansatz mit dem *NucleoSpin Extract II-Kit* (MACHEREY-NAGEL) gereinigt. Die entstandenen DNA-Fragmente wurden anschließend einer Religation unterzogen.

<i>Pipettierschema</i>	
0,1-0,5 µg	DNA
5 µl	10x- <i>Ligationspuffer</i>
5 µl	PEG 4000 (50%)
5 µl	<i>T4-DNA-Ligase</i> (5 U, Fermentas)
H <sub>2</sub> O	ad 50 µl
1 h Raumtemperatur	
ü. N. 4°C	
10 min 65°C	

Die bekannten Sequenzabschnitte umschlossen nun die unbekannten Bereiche. Die für die PCR genutzten Primer, die an den bekannten Regionen hybridisieren konnten, ermöglichten die Amplifikation der unbekannten Sequenzbereiche durch die in Abschnitt 2.3.3.A beschriebene PCR mit dem *Taq Master Mix Kit* (Qiagen). Wenn durch das Auftreten unspezifischer Amplifikate die Erhöhung der Stringenz erforderlich war, wurde entweder eine *Hotstart*-PCR oder eine *Nested*-PCR durchgeführt.

Bei der *Hotstart*-PCR wurde die Polymerase erst nach den zum Aufschmelzen der DNA notwendigen Hochtemperaturschritten mit den Reaktionsansätzen vermischt. Dadurch sollte eine unspezifische<sup>#</sup> Amplifikation durch Vermeidung von Fehlhybridisierungen erreicht werden. Alternativ wurde eine spezielle *HotStart* Polymerase (*Phire*; Finnzymes Reagents, Espoo, Finnland) eingesetzt, die durch die hohen Temperaturen aktiviert wurde.

#### Pipettierschema

10 µl	5x <i>Phire</i> reaction buffer
1 µl	dNTPs (10 mM)
4 µl	religierte DNA
4 µl	sense Primer (10 jeweils pmol/µl)
4 µl	antisense Primer (10 pmol/µl)
1 µl	<i>Phire Hot Start</i> (Finnzymes Reagents)

H<sub>2</sub>O ad 50 µl

#### Temperaturprogramm

1 min	98°C	} 35x
10 sec	98°C	
10 sec	Ta	
30 sec	72°C	
1 min	72°C	

In der *Nested*-PCR wurden in einer PCR amplifizierte Fragmente als Template für eine zweite Amplifikation eingesetzt, für die Primer verwendet wurden, die innerhalb des spezifischen Zielfragmentes hybridisierten.

#### Kolonie-PCR

Diese Methode diente dem molekularbiologischen Nachweis des in die Vektoren ligierten PCR-Fragmentes. Alle Untersuchungen wurden mit vektorspezifischen Primern durchgeführt, die den flankierenden 5' bzw. 3' Vektorbereichen des PCR-Fragmentes entsprachen (Tab. 17, Anhang). Die zu überprüfenden Kolonien wurden zuerst mit einer Pipettenspitze gepickt, auf eine Masterplatte übertragen und die Spitze anschließend in 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> gespült. Die so erhaltene Zellsuspension wurde anschließend erhitzt (5 min, 95°C) und als Template für die PCR genutzt.

#### Pipettierschema

2 µl	sense Primer (10 pmol/µl)
2 µl	antisense Primer (10 pmol/µl)
2,5 µl	10x MgCl <sub>2</sub> - Puffer (Fermentas)
0,5 µl	dNTPs (jeweils 10 mM)
5 µl	<i>E. coli</i> -Suspension
1 µl	<i>Taq</i> -Polymerase

H<sub>2</sub>O ad 25 µl

#### Temperaturprogramm

2 min	94°C	} 35x
30 sec	94°C	
1 min	Ta	
1 min	72°C	
10 min	72°C	

Die Annealingtemperatur betrug 53 °C für *pGEM®-T*- und 60°C für *pJet*-basierte Plasmide.

### 2.3.4. Klonierung von PCR-Fragmenten

Zur Klonierung der in der PCR amplifizierten Fragmente wurden zum einen der *blunt end*-Vektor *pJET* mit dem *Gene Jet™ PCR-Kloning Kit* (Fermentas) nach Herstellerangaben eingesetzt. Zum anderen wurde ein *pGEM®-T* Vektor mit T-Überhang genutzt. Vektor und Fragment wurden dazu in einem Verhältnis von 1:3 in einem 20 µl-Ansatz vermischt. Dieser enthielt neben 4 µl 5x Puffer 1 µl Ligase (1 U; Invitrogen). Die Ansätze wurden nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur über Nacht bei 4°C gelagert.



### 2.3.5. Blockieren von Primern

Phosphorylierte Primer, die zur Ligation an (c)DNA genutzt wurden, mussten an ihrer 3'OH-Gruppe blockiert werden, um eine Ligation der Primer untereinander auszu-schließen.

<i>Pipettierschema</i>	10 µg	Primer
	1,4 µl	ddATP (10 mM)
	14 µl	TdT-Puffer
	1 µl	Terminale Transferase (15 U, Invitrogen)
	H <sub>2</sub> O	ad 70 µl
60 min 37°C		

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 3 Volumen 16 mM EDTA gestoppt und die Primer durch NaCl- sowie Ethanolpräzipitation gereinigt.

### 2.3.6. DNA-Sequenzierung

Die Sequenz der aufgereinigten Plasmid-DNA wurde auf verschiedenen Wegen ermittelt. Einerseits wurde ein externer Dienstleister (GATC-Biotech AG) in Anspruch genommen. Zum anderen wurde die DNA nach Herstellerangaben mit dem *SequiTherm EXCEL™II DNA Sequencing Kit* (Biozym Diagnostik GmbH) mit IRD-800 markierten vektorspezifischen Primern (MWG) amplifiziert. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte durch vertikale Elektrophorese im LI-COR System (MWG). Die anschließende Auswertung der Gele wurde mit der *ImageAnalysis-Software (BaseImagIR, MWG)* durchgeführt. Alternativ bestand die Möglichkeit der Sequenzierung durch Lukas Krebs (AG Bastrop, Biowissenschaften an der Universität Rostock) unter Verwendung eines Kapillarsequenzierers (*CEQ 8000*, Beckman Coulter, Inc.).

### 2.3.7. Sequenzvergleich

Die ermittelten Sequenzen wurden durch *BLASTsearch* ([blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)) mit den in der *GenBank* Datenbank hinterlegten Sequenzen abgeglichen. Alle Alignments wurden mit Hilfe von *ClustalW* ([ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html](http://ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html)) durchgeführt.

## 2.4. Histochemische Untersuchungen in planta

### 2.4.1. Herstellung von Semidünnschnitten

#### **A) Semidünnschnitte unter Verwendung von frischem Material**

Die Pflanzenteile wurden nach der Ernte in 2,5% Agarose eingebettet und kühl gelagert. Anschließend wurden sie mit einem Vibratom (Vibratome) in knapp 100 µm dicke Scheibchen geschnitten, die in Wasser aufgenommen und dabei von der Agarose getrennt wurden.

#### **B) Semidünnschnitte unter Verwendung von fixiertem Material (nach Rohrbeck *et al.* 2006)**

Pro Erntezeitpunkt wurden zwei Blüten geerntet, zerteilt und die petaloiden Segmente in Fixierer über Nacht gelagert. Die Blütenteile wurden anschließend in PBS gewaschen (3 x 10 min), bevor ihnen in einer aufsteigenden Alkoholreihe (Tab. 4) das Wasser entzogen wurde. Die entwässerten Gewebeproben wurden für eine optimale Infiltration mit dem



Polymer nacheinander in den in Tab. 5 aufgeführten PEG-Ethanol-Verdünnungen bei 55°C inkubiert.

Dauer (min)	Ethanol (%)	Inkubation
30	10	Raumtemperatur
60	50	Raumtemperatur
ü. N.	70	Kühlschrank
60	90	Raumtemperatur
60	100	Raumtemperatur

**Tab. 4: Aufsteigende Alkoholreihe zum Wasserentzug aus den zur Einbettung in PEG bestimmten Geweben**

Verdünnung (PEG: Ethanol (absolut) v/v)	Dauer (h)
1:4	1
1:2	1
4:1	2

**Tab. 5: Verdünnungsreihe zur Infiltration des Gewebes mit dem Polymer PEG.**

Die so vorbereiteten Proben wurden anschließend in ein erwärmtes Gemisch aus PEG 1500 und PEG 4000 (2:1) eingebettet. Dazu war die Temperierung aller Geräte und Materialien auf 55°C erforderlich. Mit einer Pasteurpipette wurde ein Tropfen des PEG-Gemisches in die Einbettungsförmchen aus Silikon (PLANO Elektronenmikroskopie) gegeben und die Gewebeproben leicht eingedrückt. Die Aushärtung des Polymers erfolgte bei Raumtemperatur. Von den eingebetteten Proben wurden mittels eines Rotationsmikrotoms (Jung AG) Semidünnschnitte aus mehreren Bereichen der petaloiden Segmente hergestellt. Die PEG-Blockchen wurden dazu auf einem Holzstückchen fixiert, in das Mikrotom eingespannt und geschnitten (Winkel 14°, Schnittstärke 4 µm). Die Schnitte wurden mittels einer in 50% PEG 6000 (in PBS) getauchten Öse auf beschichtete Objektträger (Adhäsionsobjektträger Polysine™, Gerhard Menzel, Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG) transferiert und ihre Qualität mikroskopisch überprüft (*Axioplan II*, Zeiss). Die Objektträger mit unversehrten Schnitten wurden zur Entfernung des Polymers anschließend in 1x PBS gewaschen.

4x PBS (pH 7- 7,5): 0,54 M NaCl, 12 mM KCl, 6 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 32 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

Fixierer: 4% (w/v) Paraformaldehyd, 0,1% (v/v) Triton X<sup>100</sup>, 1x PBS *ad* 100%. Lagerung bei -20°C.

## 2.4.2. Untersuchungen des Terpengehaltes in pflanzlichen Geweben

### A) Terpennachweis mit NADI-Reagenz (nach David und Carde 1964)

#### **Terpennachweis anhand von Standardsubstanzen**

Zur Kontrolle der zu erwartenden Farbreaktion wurden 50 µl der Standardsubstanzen, die 1:1000 in Dichlormethan verdünnt waren, mit 900 µl Puffer und jeweils 10 µl NA- und DI-Lösung vermischt. Nach 30minütiger Inkubation unter Lichtabschluss wurden die Farbreaktionen fotografiert (IXUS 60, Canon). Die untersuchten Standardsubstanzen (Z)- und (E)-β-Ocimen hatten GC-Qualität und wurden von der Symrise AG zur Verfügung gestellt. Als Negativkontrollen dienten Ansätze, in denen nur das Lösungsmittel bzw. ausschließlich der Puffer mit der NA- und DI-Lösung inkubiert wurden.

NA-Stocklösung: 1% 1-Naphthol in 40% Ethanol (frisch ansetzen).

DI-Stocklösung: 1% N,N-Dimethyl-p-Phenylendiamindihydrochlorid in Wasser (frisch ansetzen)

50 mM Phosphatpuffer (pH 7,2)

NADI-Reagenz: 4,9 ml Phosphatpuffer, 50 µl NA-Lösung, 50 µl DI-Lösung (frisch ansetzen).

### **Terpennachweis in Semidünnschnitten**

Diese Untersuchungen wurden mit den Semidünnschnitten von frischem Material durchgeführt. Sie wurden in frisch angesetztem NADI-Reagenz oder Wasser bzw. Phosphatpuffer frei schwimmend unter Lichtabschluss für unterschiedlich lange Zeitperioden inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Schnitte in dunkler Umgebung mehrmals in Phosphatpuffer gespült und auf Objektträger gebracht, die ebenfalls dunkel gelagert wurden. Die Schnitte wurden innerhalb von einer Stunde lichtmikroskopisch (*Axioplan II*, Zeiss, *Coolpix 995*, Nikon) untersucht, da das Ergebnis der Färbung nicht dauerhaft war.

### **B) Terpenextraktion**

Die Terpenextraktion wurde in Anlehnung an eine Methode von Bowman *et al.* durchgeführt (1997). Pro Erntezeitpunkt wurden 2 Proben mit jeweils 6 Blüten geerntet. Sie wurden in petaloide Segmente und sternförmiges Petalenzentrum geteilt, ihre Frischmasse bestimmt und getrennt extrahiert. Dazu wurden die Blütenteile in einem Glaskolben mit 2 ml Hexan geschüttelt (15 min, Raumtemperatur). Das Lösungsmittel enthielt Nonylacetat (0,4 µl/ml) als internen Standard. Das Lösungsmittel wurde anschließend restlos abgenommen und jeweils zwei 170 µl Aliquots mit je 2 µl  $\alpha$ -Pinen (200 ng/µl) als zweitem internem Standard gemischt. 1 µl dieser Aliquots wurde gaschromatographisch vermessen. Als externen Standard wurden 2 µl  $\alpha$ -Terpineol in 170 µl Hexan analysiert. Zur Kontrolle wurden jeweils das Lösungsmittel inklusive der internen und des externen Standards sowie der externe Standard allein vermessen. Zur Quantifizierung wurde der interne Standard  $\alpha$ -Pinen herangezogen.

## **2.4.3. Untersuchungen des floralen Stärkegehaltes**

### **A) Mikroskopische Analysen**

Die auf den Objektträgern fixierten Semidünnschnitte wurden 10 min in 2,5%iger Lugol'scher Lösung inkubiert und die Reaktion durch Spülen mit  $H_2O_{dest}$  abgestoppt. Nach der Versiegelung mit Nitrocellulose konnten die Präparate lichtmikroskopisch (*Axioplan II*, Zeiss) untersucht und dokumentiert werden. Die Aufnahmen der Schnitte wurden anschließend mit Hilfe der Software *DatInf*® *Measure* (DatInf GmbH) ausgewertet. Hierzu wurde die Fläche der Lugolpositiven, d.h. blauviolett gefärbten, Stärkekörner bezogen auf die Gesamtfläche des Gewebeschnittes berechnet.

Pro Erntezeitpunkt wurden 2 Blüten untersucht, von denen jeweils 10–20 Schnitte hergestellt wurden. Von diesen Schnitten wurden jeweils mindestens 3 mikroskopische Bilder aufgenommen, so dass pro Erntezeitpunkt 60–180 Aufnahmen untersucht werden konnten. Pro Schnitt wurde ein Mittelwert berechnet. Die so errechneten 10–20 Mittelwerte eines Erntezeitpunktes flossen in die Berechnung des Stärkegehaltes ein.

### **B) Stärkeextraktion nach Lebon *et al.* (2004)**

Zu jedem Erntezeitpunkt wurden zwei Proben geerntet, die aus drei Blüten bestanden. Die Blüten jeder Probe wurden in petaloide Segmente und sternförmiges Petalenzentrum geteilt, ihre Frischmasse bestimmt und lyophilisiert. Anschließend wurde das Pflanzenmaterial mit 1 ml heißem (80°C) Ethanol und einer Spatelspitze Sand im Mörser zerkleinert und in ein Gefäß überführt. Die Proben schüttelten bei 84 °C (15 min, 250 rpm) und wurden anschließend auf 2 ml mit  $H_2O_{dest}$  aufgefüllt. Der bei der folgenden Zentrifugation (11000 x g, 10 min, 4°C, 3K30, SIGMA) entstandene Überstand wurde verworfen und das

Pellet in 750 µl DMSO/HCl resuspendiert. Die Proben inkubierten 30 min bei 60°C (250 rpm), wurden abgekühlt und danach zentrifugiert (13000 x g, 10 min, 20 °C). Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet erneut extrahiert. Die kombinierten Überstände wurden für den Stärkeassay genutzt. Dazu wurden 100 µl des Stärkeextraktes mit 100 µl Lugol'scher Lösung vermischt und nach 15minütiger Inkubation die Absorption gegen das Extraktionsmittel bei 600 nm bestimmt. Die Absorption wurde zur Berechnung des Stärkegehaltes unter Einbeziehung einer Eichreihe von 0,05–5 µg Stärke eingesetzt. Pro Probe wurden 4 Doppelbestimmungen durchgeführt.

DMSO/8N HCl (8:2)

Lugol'sche Lösung: 0,03% (w/v) I<sub>2</sub>, 0,06% (w/v) KI in 0,05 N HCl

## **2.5. Headspace-Analysen**

Die Beprobung und Akkumulation der VOCs von *Mirabilis jalapa* wurde mit einem "open loop"-System nach Effmert *et al.* (2008) durchgeführt. Drei Knospen wurden am Tag der Anthese in drei Glaskugeln platziert (Durchmesser 8 cm), die mit gereinigter Watte locker verschlossen wurden. Durch eine der Knospenzuführung gegenüberliegende Öffnung wurde mit Holzkohle gereinigte Luft eingeleitet (5,6 l/min, Kompressor, Schneider Werkstatt- und Maschinenfabrik GmbH). Die mit den Volatilen angereicherte Luft wurde mit 2,8 ml/min durch eine Glasröhre, die 100 mg SuperQ als Absorptionsfalle (Alltech Associates) enthielt, gezogen (Vakuumpumpe, KNF Neuberger). Die restliche Luft entwich durch die Knospenzuführung. Alle Glaskugeln und die VOC-Falle wurden durch Teflonschläuche und Isoversinic-Anschlüsse (Kleinfeldt Labortechnik) miteinander verbunden. Eine Beprobung umfasste 12 Sammelintervalle á 2 Stunden über eine Blühperiode (24 Stunden). Nach der Zugabe von Nonylacetat als internem Standard (1,5 µg) wurden die adsorbierten VOCs mit 200 und 100 µl Dichlormethan eluiert und anschließend mittels GC-MS analysiert (s. 2.2.3)

## **2.6. Statistische Berechnungen**

Alle Experimente wurden in mindestens zwei unabhängigen Versuchen in drei Parallelen durchgeführt und deren Mittelwerte in die Auswertung einbezogen. Die Varianzen wurden als Balken in den Diagrammen dargestellt. Nähere Angaben bzw. Abweichungen sind den entsprechenden Abbildungslegenden zu entnehmen.

Die Berechnungen zur Signifikanz der Mittelwerte wurden mit zwei unterschiedlichen statistischen Tests in Abhängigkeit von der Homogenität der Varianzen (Fischer-Test) durchgeführt. Bei homogenen Varianzen wurde der T-Test und bei heterogenen Varianzen der Welch-Test angewendet. Das Signifikanzniveau  $\alpha$  lag bei 0,05. Es wurden stets zweiseitige Auswertungen der Fragestellung einbezogen, d.h. die Veränderung des Mittelwertes nach oben bzw. unten im Vergleich zum Bezugswert betrachtet.

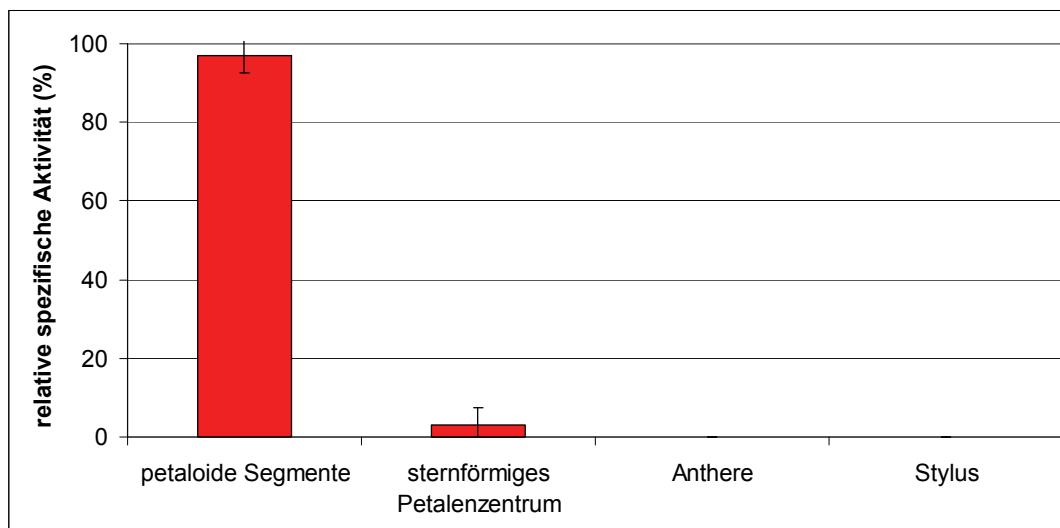
### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Charakterisierung der (*E*)- $\beta$ -Ocimensynthase *in vivo*

Die im Folgenden beschriebenen Analysen dienten der Untersuchung der (*E*)- $\beta$ -OS-Aktivität hinsichtlich ihrer Gewebespezifität sowie ihrer Korrelation mit einem charakteristischen floralen Entwicklungsstadium.

##### 3.1.1. (*E*)- $\beta$ -OS-Aktivität in verschiedenen Geweben von *Mirabilis jalapa*

Die Untersuchungen zur Gewebespezifität der (*E*)- $\beta$ -OS zeigten, dass das Enzym in *in vitro*-Assays nur in Rohextrakten aus floralem Gewebe, und dort nahezu ausschließlich im petaloiden Anteil, nachweisbar war (Abb. 6). In den Rohextrakten der Styli bzw. der Antheren konnte keine (*E*)- $\beta$ -OS-Aktivität ermittelt werden.



**Abb. 6: Spezifische Aktivität der (*E*)- $\beta$ -OS in verschiedenen Geweben von *Mirabilis jalapa*.**

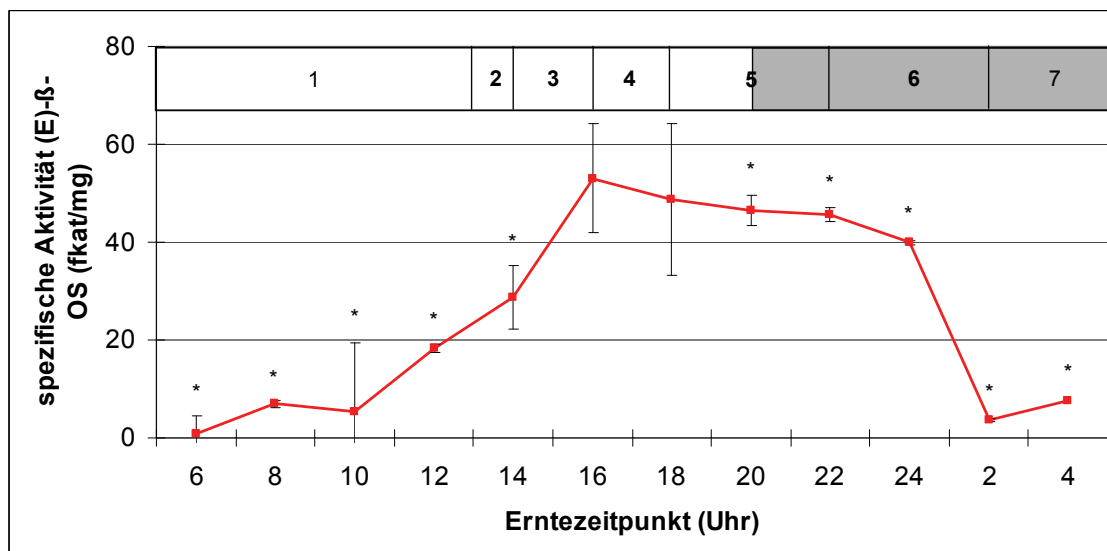
Die Aktivität wurde in *in vitro*-Tests mit Rohextrakten der verschiedenen Pflanzenteile (Ernte: 16–18 Uhr) mit 55  $\mu$ M GPP bestimmt. MW+SD aus n=4. 100%=Gesamtblüte (Versuch 1: 60 fkat/mg; 2: 10 fkat/mg, 3: 18 fkat/mg, 4: 11 fkat/mg).

Zur Herstellung der Proteinrohextrakte wurde in den folgenden Versuchen ausschließlich das petaloide Gewebe verwendet.

##### 3.1.2. Die Aktivität der (*E*)- $\beta$ -OS in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium der Blüte

Die spezifische Aktivität der (*E*)- $\beta$ -OS in den petaloiden Segmenten wurde in Knospen bzw. Blüten über eine Blühperiode mit Beginn der Lichtphase untersucht (Abb. 7). Bereits vor dem Beginn der Anthese war eine moderate (*E*)- $\beta$ -OS-Aktivität nachweisbar, die mit Beginn der Anthese im Stadium 1 und 2 stark anstieg. Das Maximum seiner Aktivität er-

reichte das Enzym in den trichterförmig geöffneten Blüten um 16 Uhr (Stadium 4, 53 fkat/mg). Über den gesamten Zeitraum der vollständig geöffneten Blüte blieb die Enzymaktivität stabil (Stadien 4–6, 50–40 fkat/mg) und sank mit dem Beginn der Seneszenz (Stadium 7) in die Nähe der Nachweisgrenze. Trotz der teilweise hohen Varianz waren alle Werte der (*E*)- $\beta$ -OS-Aktivität signifikant kleiner als der Maximalwert (16 Uhr).



**Abb. 7: Spezifische Aktivität der (*E*)- $\beta$ -OS im Verlauf der Blühperiode von *Mirabilis jalapa*.** Zur Aktivitätsbestimmung wurden Rohextrakte aus dem petaloiden Gewebe zu den angegebenen Erntezeitpunkten in *in vitro*-Assays mit 55  $\mu$ M GPP untersucht. MW + SD aus  $n=2$ , außer 22 Uhr ( $n=3$ ) und 10, 14, 16 und 18 Uhr ( $n=4$ ). \* signifikant nach Welch-Test;  $\alpha=0,05$ ; Bezugswert 16 Uhr, 1 – lange Knospe, 2 – entspiralisierte Knospe, 3 – röhrenförmig geöffnete Blüte, 4 – trichterförmig geöffnete Blüte, 5 – vollständig geöffnete Blüte, 6 – Stigmafall, 7 – Seneszenz, gefaltete Blüte, *grau hinterlegt* – Dunkelphase

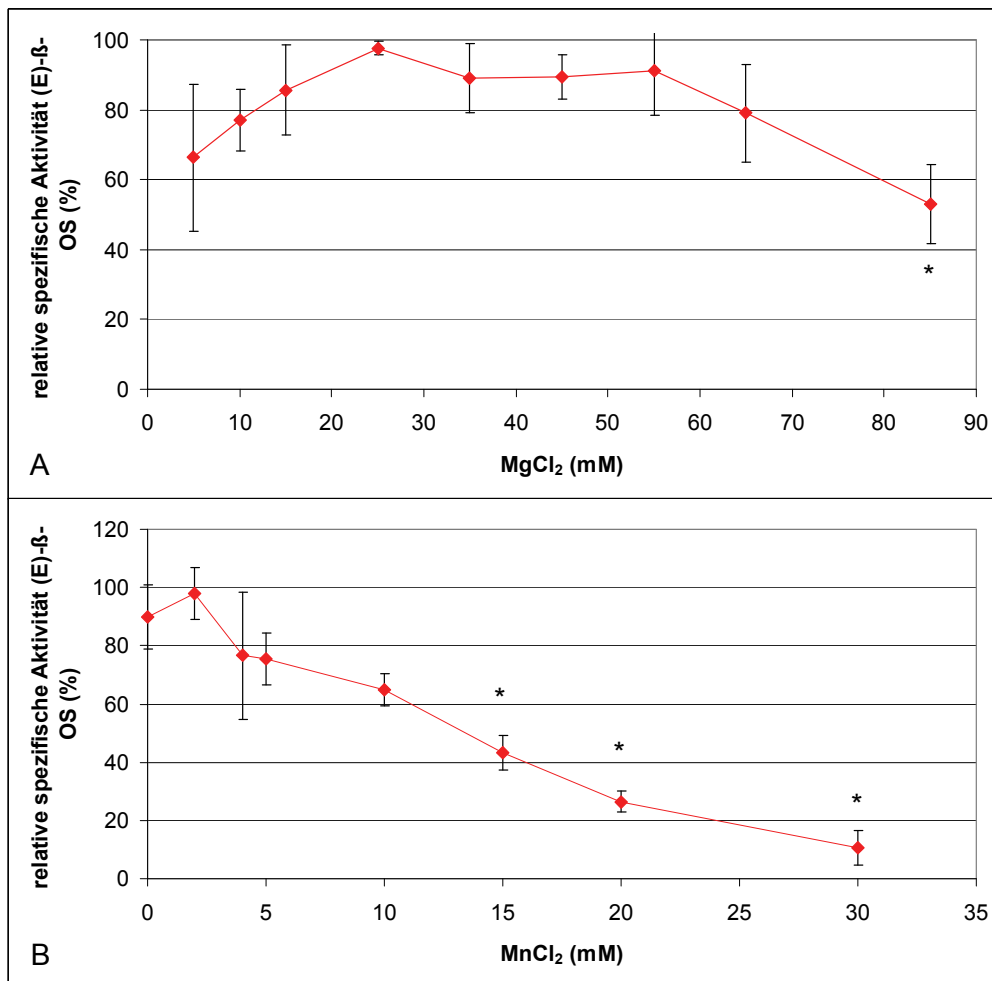
Der zur Anreinigung der (*E*)- $\beta$ -OS geeignete Erntezeitraum des Blütenmaterials lag zwischen 16 und 18 Uhr, dem Zeitraum der vollständigen Blütenöffnung und der höchsten Enzymaktivität.

### 3.2. Charakterisierung der (*E*)- $\beta$ -Ocimensynthase *in vitro*

Mit den in diesem Abschnitt beschriebenen Untersuchungen sollte die einerseits ein *in vitro*-Assay zum Nachweis der Enzymaktivität etabliert und andererseits die Eignung der (*E*)- $\beta$ -OS für die Aufreinigung aus dem Rohextrakt ermittelt werden. Alle Versuche wurden bei einer Substratkonzentration von 55  $\mu$ M GPP durchgeführt. Bei einer Assaydauer von 40 min lag das Substrat dabei im Überschuss vor. GPP-Konzentrationen von > 130  $\mu$ M führten zu keiner signifikanten Erhöhung der Enzymaktivität.

### 3.2.1. Einfluss der Konzentration des Cofaktors auf die spezifische Aktivität der (E)- $\beta$ -OS

Die in der Literatur im Zusammenhang mit Terpensynthesen als Cofaktoren beschriebenen Ionen  $Mg^{2+}$  bzw.  $Mn^{2+}$  wurden anhand der Substanzen  $MgCl_2$  und  $MnCl_2$  hinsichtlich ihrer optimalen Konzentrationen untersucht (Abb. 8). Das  $MgCl_2$  hatte in Konzentrationen zwischen 25 und 55 mM eine stabilisierende Wirkung auf die spezifische Aktivität der (E)- $\beta$ -OS (Abb. 8A). Die Erhöhung der Konzentration auf 85 mM führte zu einer signifikant geringeren spezifischen Aktivität.



**Abb. 8: Effekt der Cofaktoren auf die spezifische Aktivität der (E)- $\beta$ -OS.**

Die spezifische Aktivität wurde in *in vitro*-Assays mit Rohextrakten, die aus den petaloiden Segmenten (Ernte: 16–18 Uhr) gewonnen wurden, unter Zusatz von 55  $\mu$ M GPP bestimmt.

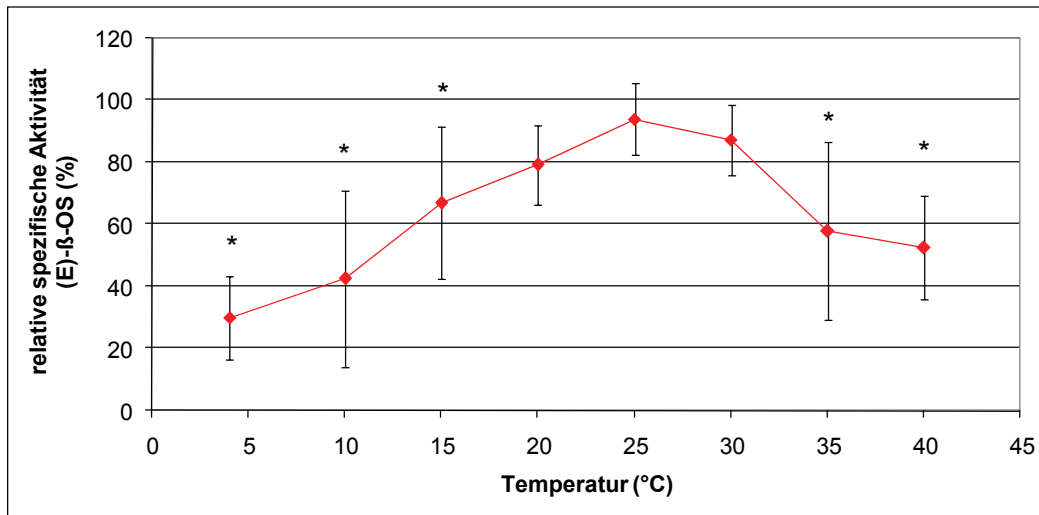
**A)  $MgCl_2$ .** MW+SD aus  $n=3$ , 100%=Maximale spezifische Aktivität im Einzelversuch: Versuch 1 (Maximum bei 50 mM): 24 fkat/mg, Versuch 2 (Maximum bei 10 mM): 31 fkat/mg, Versuch 3 (Maximum bei 20 mM): 11 fkat/mg (\* signifikant nach T-Test;  $\alpha=0,05$ , Bezugswert 25 mM).

**B)  $MnCl_2$ .** MW+SD aus  $n=2$ , 100%= Maximale spezifische Aktivität im Einzelversuch. Versuch 1 (Maximum bei 0 mM): 3 fkat/mg, Versuch 2 (Maximum bei 2 mM): 10 fkat/mg \* signifikant nach Welch-Test;  $\alpha=0,05$ , Bezugswert 0 mM).

Der Zusatz von  $MnCl_2$  resultierte grundsätzlich in einer sinkenden spezifischen Aktivität der (E)- $\beta$ -OS (Abb. 8B). In geringen Konzentrationen (bis 5 mM) war dieser Effekt minimal. Eine Steigerung auf 15–30 mM  $MnCl_2$  hatte einen signifikanten Aktivitätsverlust zur Folge.

### 3.2.2. Einfluss der Reaktionstemperatur auf die spezifische Aktivität der (E)- $\beta$ -OS

Diese Analysen hinsichtlich dieses Parameters zeigten, dass die (E)- $\beta$ -OS in einem breiten Temperaturbereich aktiv war (Abb. 9). Das Maximum der spezifischen Aktivität des Enzyms lag bei 25°C. Reaktionstemperaturen von 4 bis 15 sowie 35 bis 40°C führten zu einer signifikanten Aktivitätsabnahme.

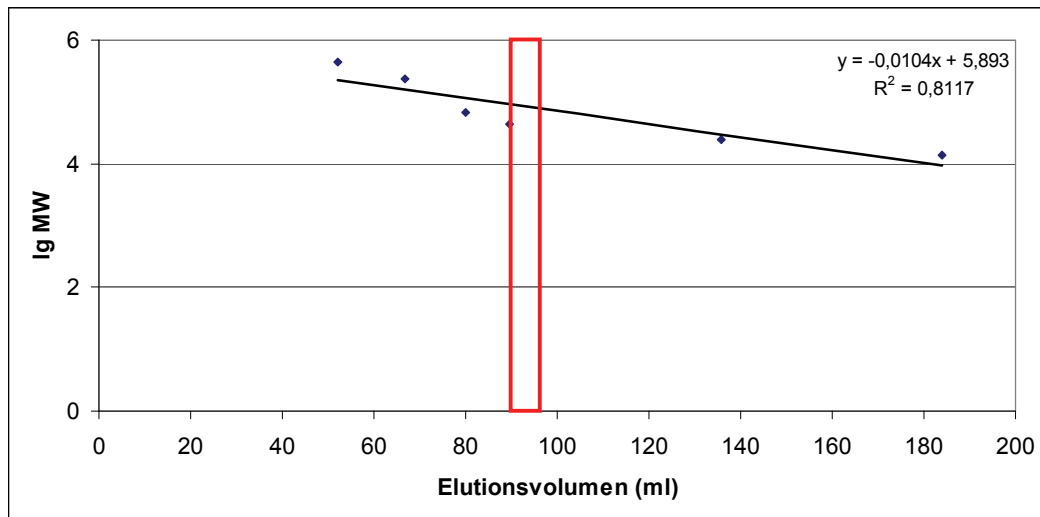


**Abb. 9: Einfluss der Inkubationstemperatur auf die spezifische Aktivität der (E)- $\beta$ -OS.**

Zur Bestimmung der Aktivität wurden Rohextrakte aus petaloiden Segmenten (Ernte: 16–18 Uhr) in *in vitro*-Assays (55  $\mu$ M GPP) bei verschiedenen Temperaturen inkubiert. MW+SD aus n=4, 100%=Maximale spezifische Aktivität im Einzelversuch, Versuch 1 und 2 (Maximum bei 25°C): 30 fkat/mg, Versuch 3 (Maximum bei 30°C): 49 fkat/mg, Versuch 4 (Maximum bei 20°C): 41 fkat/mg (\* signifikant nach T-Test;  $\alpha=0,05$ , Bezugsgröße: 25°C).

### 3.2.3. Ermittlung der molekularen Masse der (E)- $\beta$ -OS

Durch die Größenausschluss-Chromatographie (GA) wurden Proteine nach ihrer Molekülgröße (Stokes-Radius) getrennt. Obwohl dieser Wert nicht mit der molekularen Masse der Proteine gleichzusetzen ist, kann eine Korrelation zwischen beiden Parametern vorliegen. Die Kalibrierung der GA-Säule erlaubte die Zuordnung des Elutionsvolumens des Enzyms zu dessen molekularer Masse (Abb. 10). Der durchschnittliche Elutionsbereich der maximalen spezifischen (E)- $\beta$ -OS-Aktivität von 90–96 ml ist rot markiert. Das Enzym wurde demnach wie ein Protein mit einer Molekularmasse von 78–93 kDa eluiert.

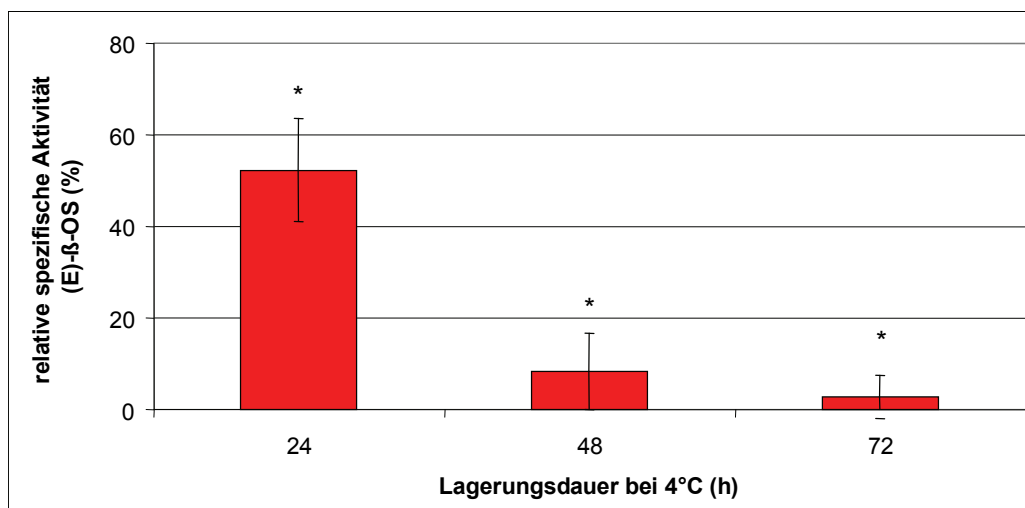


**Abb. 10: Molekularmassenbestimmung der (E)-β-OS mittels Chromatographie an einer kalibrierten Größenausschlußsäule.**

(Stationäre Phase: *Sephacryl S-200*, mobile Phase 0,1 M Croteapuffer (pH 6,9), Flussrate 2 ml/min). **Schwarz:** Elutionsvolumina der Standardproteine, n=1 (Molekulare Massen (von links): Ferritin 440 kDa; Katalase 232 kDa; Albumin 67 kDa; Ovalbumin 43 kDa; Chymotrypsinogen 25 kDa; Ribonuclease A 14 kDa). **Rot:** Elutionsvolumen der (E)-β-OS. n=30.

### 3.2.4. Stabilität der (E)-β-OS in Abhängigkeit von den Lagerungsbedingungen

Für den geplanten Reinigungsprozess war die hinreichende Stabilität des Enzyms bei verschiedenen Lagerungstemperaturen eine wichtige Voraussetzung. Zunächst wurde der Einfluss des Gefrierens auf die (E)-β-OS untersucht (Abb. 42, Anhang). Weder das einmalige Gefrieren bei -20°C noch sechsmalige Gefrier-Auftau-Zyklen hatten einen signifikanten Effekt auf die spezifische Aktivität des Enzyms.



**Abb. 11: Einfluss der Lagerung des Rohextraktes bei 4°C auf die spezifische Aktivität der (E)-β-OS.**

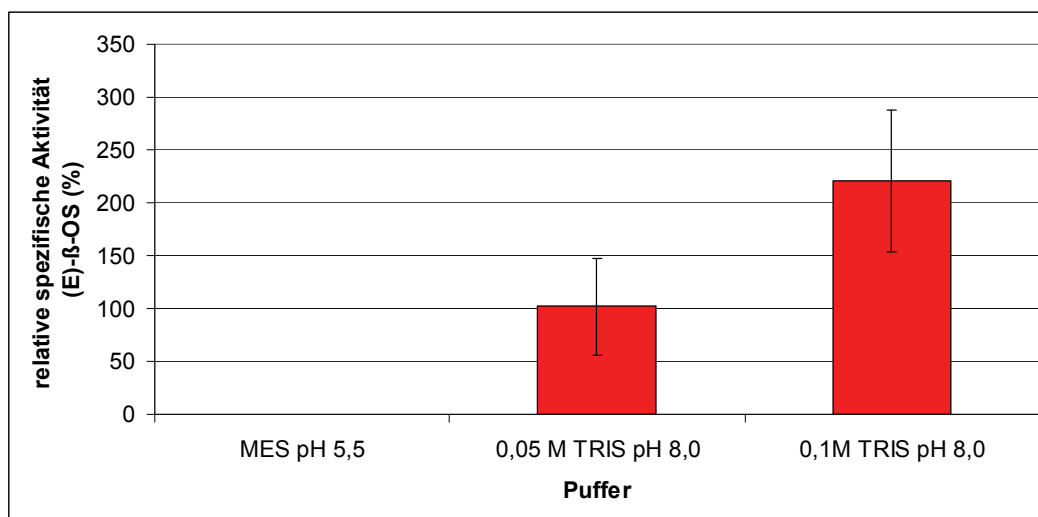
Frisch hergestellte Rohextrakte von petaloiden Segmenten (Ernte: 16–18 Uhr) wurden bei verschiedenen Temperaturen gelagert. In definierten Zeitabständen wurde ein Aliquot entnommen und im *in vitro*-Assay (55 μM GPP) analysiert. Bezugswert: spezifische Aktivität im frischen Rohextrakt. MW+SD aus n=3, 100%=3,1 ±0,3 fkat/mg (\* signifikant nach gepaartem T-Test; α=0,05).



Weiterhin wurden Untersuchungen zur Stabilität der (*E*)- $\beta$ -OS nach der Lagerung auf Eis, bei 4°C und bei Raumtemperatur durchgeführt. Als Bezugsgrößen dienten jeweils die frisch hergestellten Proteinextrakte. Abb. 11 zeigt exemplarisch den Einfluss der Lagerungsdauer des Rohextraktes bei 4°C auf die spezifische Aktivität des Enzyms. Mit steigender Dauer der Lagerung des Rohextraktes sank die spezifische Aktivität der (*E*)- $\beta$ -OS erwartungsgemäß signifikant. Nach 5stündiger Inkubation auf Eis, 24stündiger Lagerung bei 4°C bzw. einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur waren nur noch 50 % der spezifischen Ausgangsaktivität nachweisbar.

### 3.2.5. Stabilität der (*E*)- $\beta$ -OS in Abhängigkeit von den Pufferbedingungen

Die in diesen Versuchen analysierten Pufferbedingungen bezüglich der Ionenstärke und des pH-Wertes wurden im Hinblick auf die Aufreinigung des Zielenzymes mittels Ionenaustausch-Chromatographie gewählt. Zum einen führte die Inkubation der (*E*)- $\beta$ -OS in 0,1 M MES (pH 5,5) zu einem vollständigen Funktionsverlust. Zum anderen blieb die spezifische Aktivität des Enzyms nach der Inkubation in 0,05 M bzw. 0,1 M TRIS-Puffer (pH 8,0) im Vergleich zum Croteaupuffer stabil (Abb. 12). Die durch die Inkubation in 0,1 M TRIS-Puffer (pH 8,0) hervorgerufene Verdoppelung der spezifischen Aktivität war nicht signifikant.



**Abb. 12: Einfluss der Pufferbedingungen auf die spezifische Aktivität der (*E*)- $\beta$ -OS.**

Aus petaloiden Segmenten hergestellte Rohextrakte (Ernte: 16–18 Uhr) wurden durch Ultrafiltration auf die verschiedenen Pufferbedingungen eingestellt. Zum Aktivitätsassay erfolgte nach Abschluss der 3stündigen Inkubation eine zweite Ultrafiltration in 0,1 M Croteaupuffer (pH 6,9). Als Kontrolle dienten 3stündig in 0,1 M Croteaupuffer (pH 6,9) ultrafiltrierte Rohextrakte. MW+SD aus  $n=3$  bzw.  $n=4$  (0,1 M TRIS-Puffer). 100%=spezifische Aktivität der Kontrolle für MES-Puffer:  $2,9 \pm 2,2$  fkat/mg; 0,05 M TRIS-Puffer:  $11,0 \pm 6,9$  fkat/mg, 0,1 M TRIS-Puffer:  $1,9 \pm 1,4$  fkat/mg. (ungepaarter T-Test;  $\alpha=0,05$ ; Bezugswert=Kontrolle).

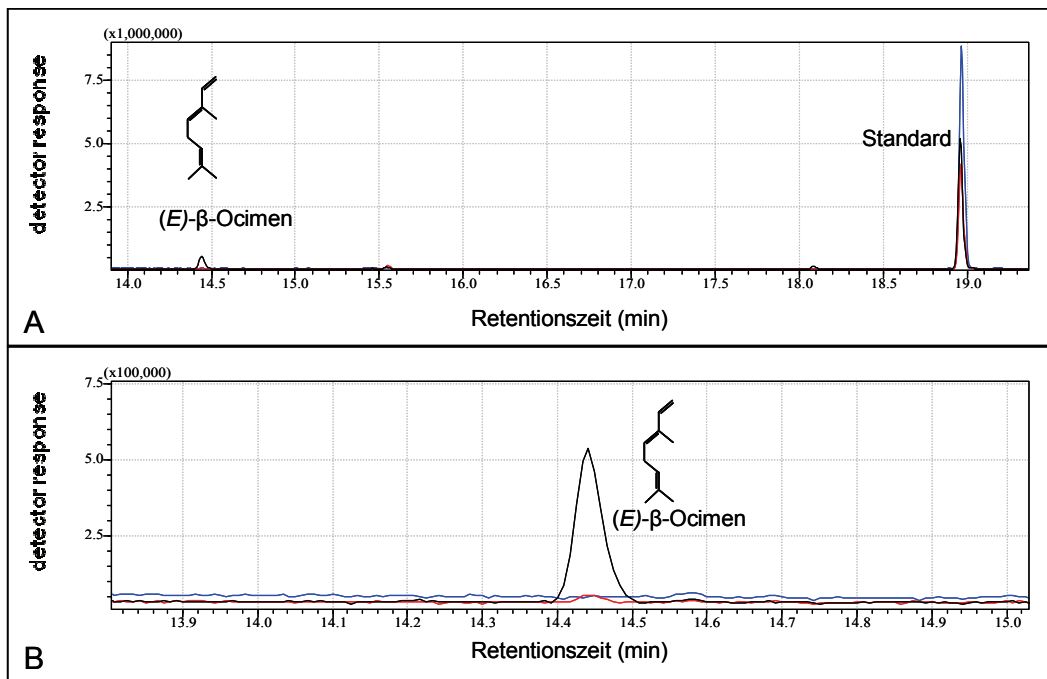
### 3.2.6. Etablierung eines (E)- $\beta$ -OS-Standard-Assays

Durch die *in vivo*- und *in vitro*-Charakterisierung der (E)- $\beta$ -OS konnten für die Aufreinigung der (E)- $\beta$ -OS wichtige Erkenntnisse gewonnen werden (Tab. 6). Zum einen wurde das zur Isolation optimale Gewebe identifiziert und die molekulare Masse des Enzyms eingegrenzt. Zum anderen konnten in den Untersuchungen sowohl Puffer- als auch Lagerungsbedingungen bestimmt werden, unter denen die (E)- $\beta$ -OS hinreichende Stabilität zeigte. Darüber hinaus wurden geeignete Reaktionsbedingungen für den Enzymtest belegt.

Parameter	Optimum
Enzymquelle	Gewebe: Petaloide Segmente
	Erntezeitraum: vollständige Blütenöffnung (Stadium 4, 16–18 Uhr)
Molekulare Masse	78-93 kDa
Cofaktoren	MgCl <sub>2</sub> : 25–55 mM
	MnCl <sub>2</sub> : -
Reaktionstemperatur	25 °C
Stabilität	Puffersystem: 0,1 M Crotaepuffer, pH 6,9, 0,05 bzw. 0,1 M Tris-Puffer, pH 6,9
	Lagerung: 4°C, 24 Stunden

**Tab. 6: Zusammenfassung der Ergebnisse der *in vivo*- sowie *in vitro*-Charakterisierung der (E)- $\beta$ -OS aus *Mirabilis jalapa*.**

Darauf aufbauend wurde ein Standardassay etabliert, der für das Monitoring der spezifischen Aktivität des Zielenzyms während der Aufreinigung genutzt wurde. Die (E)- $\beta$ -OS wurde in 0,1 M Crotaepuffer (pH 6,9) mit 55  $\mu$ M GPP und 30 mM MgCl<sub>2</sub> inkubiert (40 min, 30°C). Als Kontrollen wurde bei allen Versuchen jeweils ein Ansatz ohne Substratzugabe bzw. mit hitzeinaktiviertem Enzym durchgeführt, in denen keine (E)- $\beta$ -OS-Aktivität nachweisbar war. Abb. 13 zeigt exemplarisch ein Chromatogramm des Standardassays im Vergleich mit denen der Kontrollansätze.



**Abb. 13: Identifikation des Produktes der *in vitro*-Assays durch GC-MS-Analyse.**

Die Produkte der Assays (mit und ohne 55  $\mu$ M GPP) mit Rohextrakten der petaloiden Segmente (Ernte: 16–18 Uhr) wurden nach ihrer Extraktion mit Hexan durch die Auftrennung von 0,5% (1  $\mu$ l) des eingesetzten Extraktionsmittels analysiert. **A) Vergleich der Chromatogramme in der Gesamtansicht.** Interner Standard: Nonylacetat. **B) Detailansicht des (*E*)- $\beta$ -Ocimenpeaks.** Schwarzer Graph: Standardassay mit 55  $\mu$ M GPP, roter Graph: Kontrollansatz ohne GPP, blauer Graph: Standardansatz mit 55  $\mu$ M GPP und hitzeinaktiviertem Rohextrakt.

### 3.3. Aufreinigung der (*E*)- $\beta$ -Ocimensynthase aus *Mirabilis jalapa*-Blüten

Die (*E*)- $\beta$ -OS eignete sich aus mehreren Gründen zur klassischen Aufreinigung. Zum einen konnte ihre Expression in der Blüte zeitlich und gewebespezifisch eingegrenzt werden. Zum anderen war sie im Rohextrakt temperaturtolerant. Des Weiteren konnte ein reproduzierbarer und schneller Assay etabliert werden, der zum Monitoring der (*E*)- $\beta$ -OS-Aktivität während der Aufreinigung unerlässlich war. In Vorversuchen sollte der Einfluss von verschiedenen Prinzipien der Aufreinigung auf die spezifische Aktivität des Enzyms geklärt werden. An einen Pilotversuch, in dem der Trennungsgang getestet wurde, schlossen sich die eigentlichen Versuche zur Reinigung an.

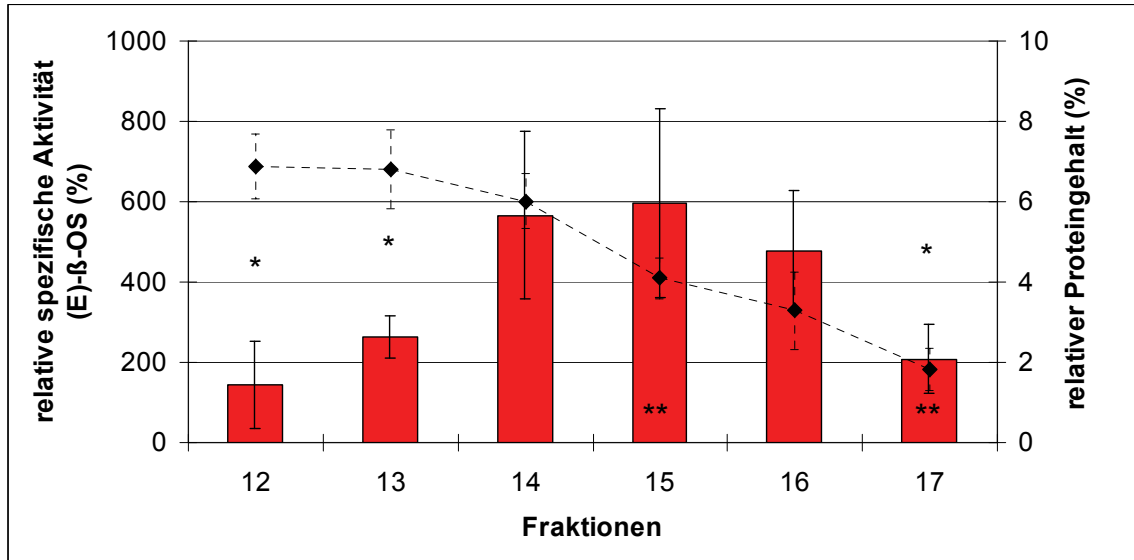
#### 3.3.1. Vorversuche

##### Fällung mit Ammoniumsulfat ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)

Am Beginn einer Aufreinigung steht häufig die Konzentrierung der Zielproteine durch die Fällung mittels antichaotropen Salzen, z.B. dem Ammoniumsulfat. Aufgrund der hohen Aktivitätsverluste war diese Methode jedoch nicht zur Anreinigung der (*E*)- $\beta$ -OS aus dem Rohextrakt geeignet.

**Größenausschluss-Chromatographie (GA)**

Das Trennprinzip dieser Chromatographiemethode wurde in Abschnitt 3.2.3. erläutert. In vorausgehenden Versuchen war die (E)- $\beta$ -OS ab einem Elutionsvolumen von 75 ml detektierbar (nicht gezeigt). Abb. 14 zeigt beispielhaft die Elution der (E)- $\beta$ -OS nach der Auftrennung von Rohextrakt mit dieser Methode. Das Enzym konnte in den Fraktionen 14 und 15 sechsfach angereichert werden.



**Abb. 14: Spezifische Enzymaktivität der (E)- $\beta$ -OS enthaltenden Fraktionen nach Größenausschluss-Chromatographie.**

Aufgetrennt wurden 2 ml Rohextrakt aus petaloiden Segmenten (Ernte: 16–18 Uhr). (Stationäre Phase: *Sephacryl S-200*, mobile Phase: 0,1 M Crotaepuffer (pH 6,9), Flussrate 2 ml/min, Fraktionsgröße: 6 ml). MW+SD aus n=5. **Rot: Spezifische Aktivität.** 100%=spezifische Aktivität im Rohextrakt im Einzelversuch. Versuch 1 und 2: 1,9 fkat/mg, Versuch 3 und 4: 4,6 fkat/mg, Versuch 5: 3,7 fkat/mg (\* signifikant nach Welch-Test,  $\alpha=0,05$ , Bezugsgröße Fraktion 4). **Schwarz: Proteingehalt** (Bestimmung nach Bradford). 100%=applizierte Proteinmenge im Einzelversuch, Versuch 1 und 2: 3,9 mg, Versuch 3 und 4: 4,7 mg, Versuch 5: 5,4 mg (\*\* signifikant nach gepaartem T-Test, Bezugsgröße: vorhergehende Fraktion).

Der Proteingehalt der analysierten Fraktionen betrug 2–7% der applizierten Proteinmenge und nahm mit steigendem Elutionsvolumen ab. In den Fraktionen 15 und 16<sup>#</sup> war die Abnahme signifikant.

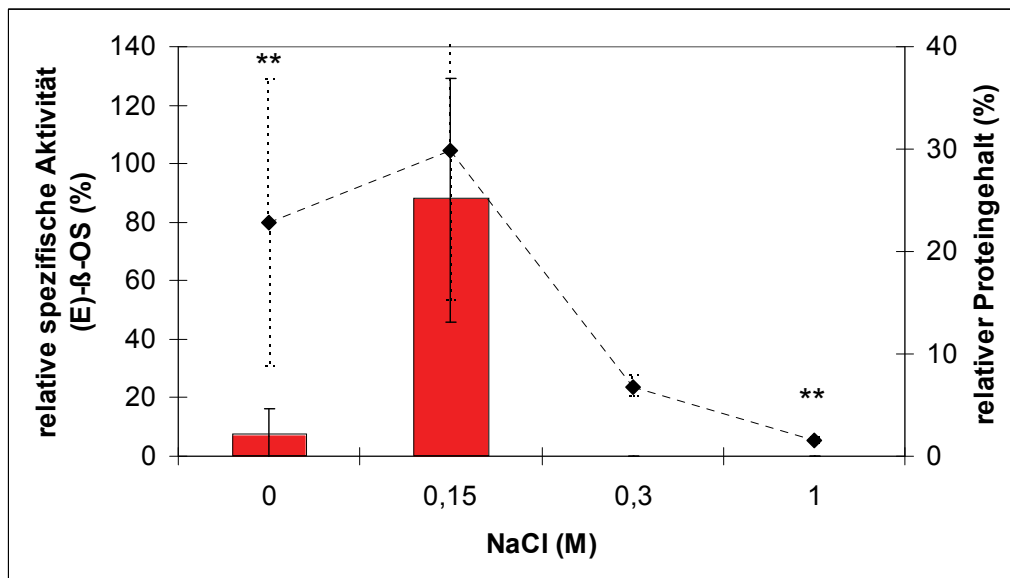
**Ionenaustausch-Chromatographie**

In der Ionenaustausch-Chromatographie wurden die Ladungsunterschiede der Proteine zu ihrer Trennung genutzt.

Die Tests in verschiedenen Puffersystemen haben gezeigt, dass nur der für die Anionenaustausch-Chromatographie einzusetzende TRIS-Puffer (pH 8,0) die Stabilität des Enzyms gewährleistete. Da ausschließlich in Verbindung mit 0,05 M Tris (pH 8,0) eine Adsorption des Enzyms an die Matrix möglich war, wurden die Versuche mit dem Anionenaustauscher in diesem Puffer durchgeführt (Abb. 15). Zur Elution der (E)- $\beta$ -OS

wurde ein NaCl-Stufengradient eingesetzt, dessen Intervalle auf den Ergebnissen vorangegangener Versuche mit linearen Gradienten basierten (Daten nicht gezeigt).

In der NaCl-freien Waschfraktion war eine geringe spezifische Aktivität der (E)- $\beta$ -OS nachweisbar, was auf eine unvollständige Bindung an die Matrix hindeutete. In den Elutionsfraktionen des Stufengradienten war ausschließlich in der 0,15 M-Fraktion spezifische Aktivität der (E)- $\beta$ -OS detektierbar. Sie war nicht signifikant verschieden von der eingesetzten Aktivität (90%). Leider erwies sich das Enzym außerdem nach der Auftrennung als instabil. Sowohl die Lagerung der Fraktionen bei -20°C als auch auf Eis resultierte in einem vollständigen Aktivitätsverlust.



**Abb. 15: Aktivität der (E)- $\beta$ -OS nach der Anionenaustauschchromatographie.**

Aus petaloiden Segmenten hergestellte Rohextrakte (Ernte: 16–18 Uhr) wurden in 0,05 M TRIS-Puffer (pH 8,0) umgepuffert, appliziert und mit einem NaCl-Stufengradienten (0–1 M) eluiert (Stationäre Phase: *BioScale* Q, mobile Phase: 0,05 M TRIS-Puffer (pH 8,0), Flussrate 2 ml/min). Die Aktivitätsbestimmung fand nach erneuter Umpufferung in 0,1 M Croteaupuffer (pH 6,9) im *in vitro*-Assay (55  $\mu$ M GPP) statt. MW+SD aus n=4. **Rot: Spezifische Aktivität.** 100%=spezifische Aktivität im Rohextrakt (Einzelversuch). Versuch 1 und 2: 8 fkat/mg, Versuch 3: 31 fkat/mg, Versuch 4: 13 fkat/mg (Welch-Test;  $\alpha=0,05$ , Bezugsgröße: Spezifische Aktivität im Rohextrakt). **Schwarz: Proteingehalt** (Bestimmung nach Bradford). 100%=applizierte Proteinmenge im Einzelversuch. Versuch 1: 10 mg, Versuch 2 und 3: 20 mg, Versuch 4: 52 mg (\*\* signifikant nach Welch-Test;  $\alpha=0,05$ , Bezugsgröße: vorhergehende Fraktion)

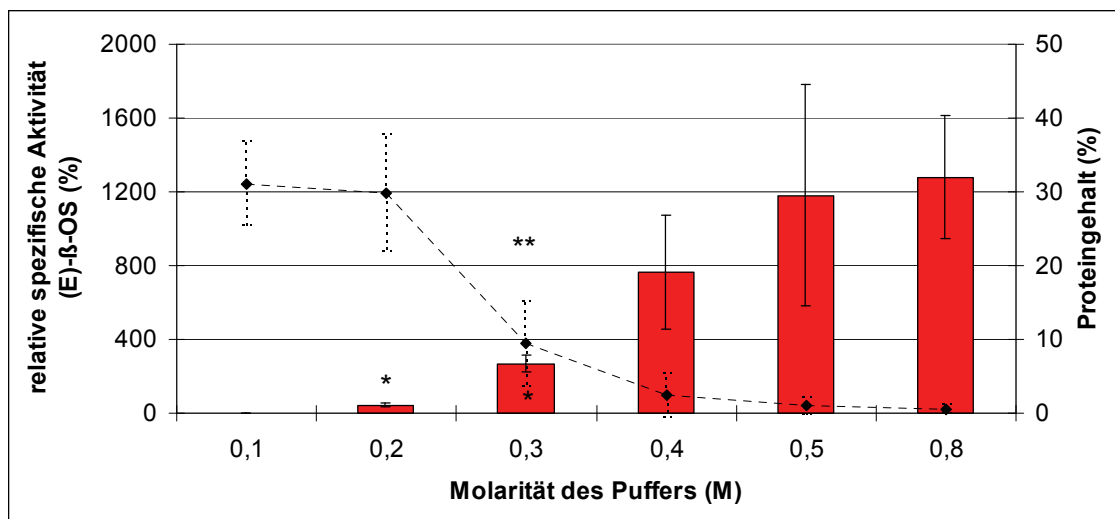
Knapp ein Viertel der applizierten Proteinmenge band nicht an die Matrix. Durch die erste Stufe des Gradienten wurden 30% der applizierten Proteinmenge eluiert. Die steigende NaCl-Konzentration resultierte in der Elution geringer Proteinmengen.

Für eine Anreicherung der (E)- $\beta$ -OS aus dem Rohextrakt war die Ionenaustauschchromatographie keine geeignete Methode.

**Chromatographie an Hydroxyapatit (HA)**

Bei dieser Methode wurden Proteine nach ihren sauren oder basischen Eigenschaften getrennt. Wegen seiner besseren Laufeigenschaften wurde 0,1 M Kaliumphosphat-Crotaepuffer (pH 6,9) statt gewöhnlichem, auf Natriumphosphat basierendem, Crotaepuffer als mobile Phase und in Form eines Stufengradienten (0,1–0,8 M) zur Fraktionierung eingesetzt. Dies beeinflusste die spezifische Aktivität der (E)- $\beta$ -OS nicht. In Konzentrationen >0,5 M neigte das im Puffer enthaltene Kaliumphosphat zur Kristallbildung, die zur Zerstörung der Säule führte. Zur Schonung der Matrix wurde daher ein wenigstufiger Gradient eingesetzt.

Abb. 16 zeigt die spezifische Aktivität und die Proteingehalte der Fraktionen nach der Auftrennung des Rohextraktes an HA. Die Enzymaktivität war über alle Stufen des Gradienten nachweisbar, wobei die Steigerung der Ionenstärke zur gesteigerten Elution der



**Abb. 16: Einfluss der Chromatographie an Hydroxyapatit auf die spezifische Aktivität der (E)- $\beta$ -OS.**

Aus petaloiden Segmenten hergestellte Rohextrakte (Ernte: 16–18 Uhr) wurden appliziert (Stationäre Phase: Hydroxyapatit, mobile Phase: 0,1 M K-Crotaepuffer (pH 6,9), Flussrate 1 ml/min) und mit einem K-Crotaeu-Stufengradienten (0,1–0,8 M) eluiert. Die Aktivitätsbestimmung fand nach der Umpufferung in 0,1 M Crotaepuffer (pH 6,9) im *in vitro*-Assay (55  $\mu$ M GPP) statt. MW+SD aus n=3. **Rot: Spezifische Aktivität.** 100%=spezifische Aktivität im Rohextraktes (Einzelversuch). Versuch 1: 5 fkat/mg, Versuch 2: 2 fkat/mg, Versuch 3: 9 fkat/mg (\* signifikant nach Welch-Test;  $\alpha=0,05$ , Bezugsgröße 0,8 M-Fraktion). **Schwarz: Proteingehalt** (Bestimmung nach Bradford). 100%=applizierte Proteinmenge im Einzelversuch. Versuch 1: 17 mg, Versuch 2: 25 mg, Versuch 3: 14 mg (\*\* signifikant nach gepaartem T-Test,  $\alpha=0,05$ , Bezugsgröße: jeweils vorhergehende Fraktion).

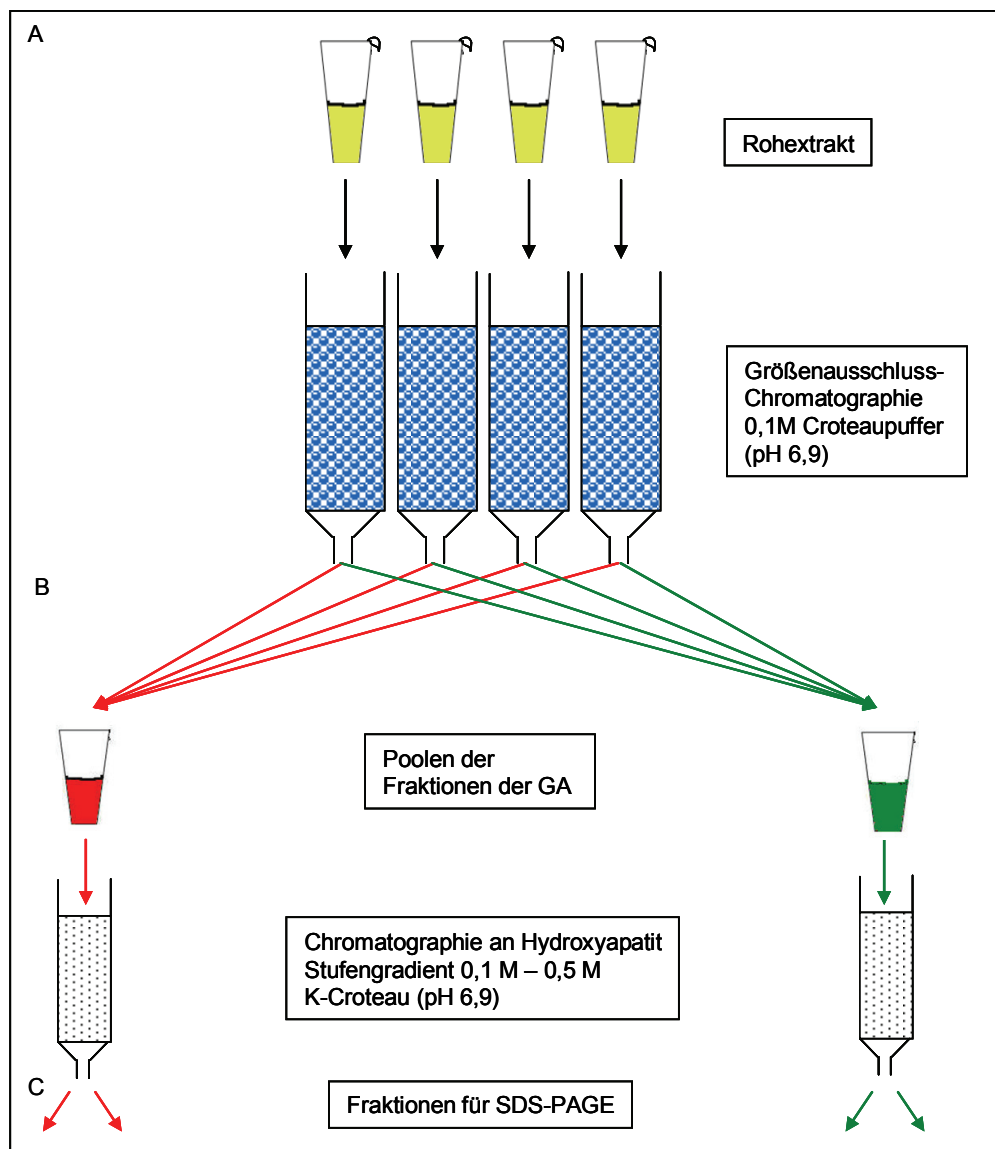
(E)- $\beta$ -OS führte. Das Maximum der spezifischen Aktivität lag bei ca. 1200% des Ausgangswertes (0,5 und 0,8 M). Aufgrund der hohen Varianz waren nur die Werte für 0,2 und 0,3 M K-Crotaeu signifikant verschieden vom Bezugswert (0,8 M).

Knapp 60% der applizierten Proteinmenge wurden bei geringen Ionenstärken (bis 0,2 M) eluiert. Der Proteingehalt der darauf folgenden 0,3 M Fraktion war signifikant geringer. In den 0,4–0,8 M Fraktionen war nur ein Bruchteil der eingesetzten Proteinmenge enthalten,

die (*E*)- $\beta$ -OS lag demzufolge hoch angereichert vor. Diese Ergebnisse zeigten, dass die Trennung an HA eine potente Methode zur Aufreinigung der (*E*)- $\beta$ -OS ist. Nachteilig war die zunehmende Verschlechterung der Flussraten bei steigenden Säulenvolumina, die ein „Up-Scaling“ der Auftrennung von Rohextrakt verhinderte.

### 3.3.2. Pilotversuch zum Trennungsgang

Basierend auf den Erkenntnissen der Vorversuche wurde die in Abb. 17 gezeigte Strategie zur Anreicherung des Enzyms genutzt.



**Abb. 17: Schema der Aufreinigung der (*E*)- $\beta$ -OS aus dem Rohextrakt.**

**A)** Mehrere Aliquots des Rohextraktes wurden mit der Größenausschluss-Chromatographie (GA) aufgetrennt und die Fraktionen mit der höchsten (rot) bzw. zweithöchsten (grün) spezifischen Aktivität der (*E*)- $\beta$ -OS gepoolt. **B)** Auftrennung der Fraktionen an Hydroxyapatit. **C)** Auftrennung der Hydroxyapatit-Fraktionen durch SDS-PAGE.

Aufgrund des geringen Proteingehaltes (max. 0,5 mg Gesamtprotein) wurden die GA-Fraktionen zu zwei Pools zusammengefasst. In Pool 1 wurden jeweils die Fraktionen mit maximaler sowie in Pool 2 diejenigen mit zweithöchster spezifischer Aktivität vereinigt (Abb. 17). Die Pools wurden anschließend jeweils einzeln an Hydroxyapatit getrennt.

Die Kenndaten der Pilotaufreinigung sind in Tab. 7 zusammengefasst. Nach der Chromatographie beider Pools an Hydroxyapatit wurde jeweils nur die Fraktion mit der höchsten spezifischen Aktivität berücksichtigt. Die Auftrennung von Pool 1 führte zu einer knapp 400fachen Anreicherung der spezifischen Aktivität bezogen auf den Wert des Rohextraktes. 0,3% der eingesetzten Gesamtaktivität waren in dieser Fraktion enthalten. Die Trennung von Pool 2 führte zu einer geringeren Anreicherung des Enzyms. Etwa 3% der ursprünglich im Rohextrakt enthaltenen Gesamtaktivität waren in dieser Fraktion enthalten. Verglichen mit den Ergebnissen der Vorversuche war die Anreicherung nach der GA im Bereich der Erwartung (4–18fach) und nach der HA deutlich höher (bis zu 18fach im Vorversuch). Die in den Fraktionen mit dem höchsten Anreicherungsgrad enthaltenen Proteine lagen in ihrer Konzentration nach der Separierung im zweidimensionalen Polyacrylamidgel unterhalb der Nachweisgrenze der zur Visualisierung eingesetzten Methoden. Auf die Darstellung wurde daher verzichtet.

Probe		Gesamtaktivität (fkat)	Gesamtprotein (mg)	spezifische Aktivität (fkat/mg)	Anreicherung	Ausbeute (%)
RE		98	14,3424	7	1	100
GA	Pool 1	22	0,9048	24	4	23
	Pool 2	16	0,5975	26	4	16
HA	Pool 1	0,3	0,0001	2674	392	0,3
	Pool 2	3,3	0,0014	2456	360	3,4

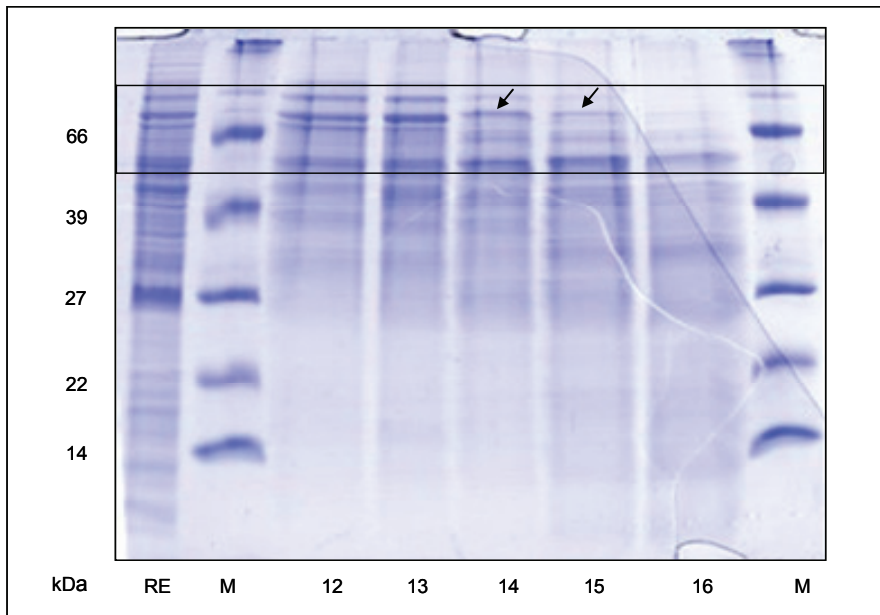
**Tab. 7: Kenndaten der Pilotaufreinigung der (E)- $\beta$ -OS.**

Rohextrakte aus petaloiden Segmenten (Ernte 16–18 Uhr) wurden durch nacheinander geschaltete Größenausschluss- (GA) und Hydroxyapatit-Chromatographie (HA) aufgetrennt. Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität der (E)- $\beta$ -OS wurden *in vitro*-Assays (55  $\mu$ M GPP) durchgeführt. *Rot*: Pool 1, Fraktionen mit der höchsten spezifischen Aktivität nach der GA, *grün*: Pool 2, Fraktionen mit der zweithöchsten spezifischen Aktivität nach der GA.

### 3.3.3. Trennungsgang

Durch die Erhöhung der zur Aufreinigung eingesetzten Proteinmenge sollte die Konzentration des Zielenzyms in den stark angereicherten Fraktionen gesteigert werden. Zu diesem Zweck wurden zwei weitere Trennungsgänge unternommen, von denen einer im Folgenden exemplarisch dargestellt wird. Die Kenndaten der Trennung sind in Tab. 8 zusammengefasst. Mittels GA wurden 14 Aliquots à 2 ml getrennt. Die applizierte Gesamtproteinmenge betrug 84 mg, was der Proteinmenge des Rohextraktes von 300 Blüten entsprach.





**Abb. 18: Proteinmuster des Rohextraktes aus petaloiden Segmenten (Ernte: 16–18 Uhr) und der Fraktionen nach der Größenausschluss-Chromatographie.**

Repräsentatives Polyacrylamidgel nach Coomassiefärbung. 10 µg Protein wurden pro Spur aufgetrennt. RE – Rohextrakt, M – *Premixed Protein Molecular Weight Marker* (ROCHE), 12–16: Fraktionen der Größenausschluss-Chromatographie). Fraktionen mit nachgewiesener spezifischer Aktivität der (*E*)-β-OS (höchste → niedrigste Aktivität): 14, 15, 13, 12. *Rahmen* – Charakteristische molekulare Masse der Monoterpensynthasen (50–75 kDa), *Pfeil* – Angereicherte Proteinbande

Abb. 18 zeigt die Proteinzusammensetzung in den einzelnen GA-Fractionen am Beispiel einer Trennung nach deren Elektrophorese im Polyacrylamidgel. Mit steigendem Elutionsvolumen sank die molekulare Masse der nachweisbaren Proteine, wobei vor allem die Proteine von sehr hoher (>100 kDa) und sehr niedriger (<20 kDa) molekularer Masse in den Fraktionen mit (*E*)-β-OS-Aktivität (12–15) nicht vorhanden waren. Mit den Pfeilen wurden Proteinbanden bei ca. 75 kDa markiert. Sie waren nur in Fraktion 14 und 15 (sechs- bzw. zweifach höhere Aktivität als im Rohextrakt) in dieser Region der für die (*E*)-β-OS bestimmten molekularen Masse erkennbar. Im Rohextrakt war keine distinkte Bande an dieser Stelle sichtbar.

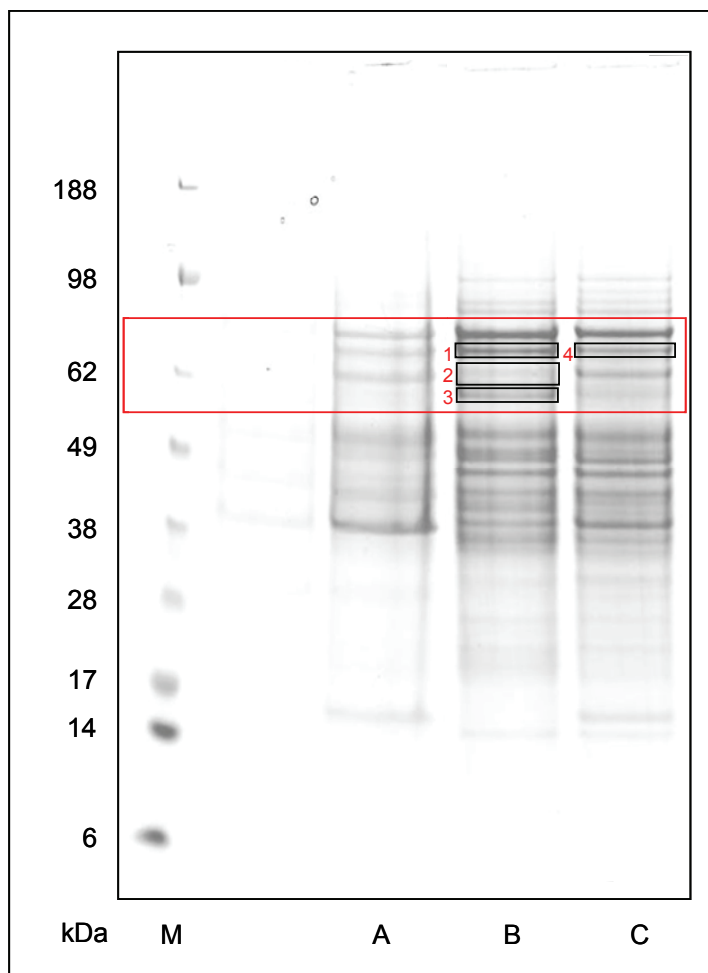
		Gesamt-aktivität (fkat)	Gesamt-protein (mg)	spezifische Aktivität (fkat/mg)	Anreicherung	Ausbeute (%)
RE		732	84	9	1	100
GA	Pool 1	266	2,20	121	14	36
	Pool 2	42	1,03	41	5	6
HA	Pool 1	aktivste (0,3 M)	40	0,02	1659	190
		zweitaktivste (0,4 M)	23	0,03	756	87
	Pool 2	aktivste (0,3 M)	37	0,07	559	64

**Tab. 8: Kenndaten des Trennungsganges zur Anreicherung der (*E*)-β-OS.**

Rohextrakte aus petaloiden Segmenten (16–18 Uhr) wurden durch nacheinander geschaltete Größenausschluss- (GA) und Hydroxyapatit-Chromatographie (HA) aufgetrennt. Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität der (*E*)-β-OS wurden *in vitro*-Assays (55 µM GPP) durchgeführt. *Rot*: Pool 1, Fraktionen mit der höchsten spezifischen Aktivität nach GA, *grün*: Pool 2, Fraktionen mit der zweithöchsten spezifischen Aktivität nach GA.

Im ersten Reinigungsschritt (GA) wurde die (*E*)- $\beta$ -OS in Pool 1 vierzehnfach und in Pool 2 fünffach angereichert. Die Ausbeute betrug 36% bzw. 6% der eingesetzten Gesamtkativität im Rohextrakt. Bei der Chromatographie an HA wurde in beiden Pools die höchste spezifische Aktivität des Enzyms in der 0,3 M K-Crotau-Fraktion nachgewiesen und das Zielenzym in Pool 1 um das knapp 200fache und in Pool 2 um das ca. 70fache angereichert. Die Ausbeute betrug in beiden Fällen 5%. Verglichen mit dem Pilotversuch wurde im Trennungsgang eine deutlich geringere Anreicherung erzielt.

Im Anschluss an die chromatographische Anreinigung wurden die HA-Fractionen mit der höchsten bzw. zweithöchsten spezifischen Aktivität (Pool 1: 0,3 M und 0,4 M sowie Pool 2: 0,3 M, vgl. Tab. 8) in der eindimensionalen SDS-PAGE aufgetrennt. Zur optimalen Trennung der Proteine wurde ein Gradientengel von 4–12% Acrylamid genutzt (Abb. 19).



**Abb. 19: Proteinzusammensetzung der Fraktionen nach der Anreinigung der (*E*)- $\beta$ -OS aus dem Rohextrakt petaloider Segmente im Trennungsgang 2.**

Auftrennung von Fraktionen der nacheinander geschalteten Größenausschluss- und Hydroxyapatit-Chromatographie. Acrylamid-Gradientengel (Stationäre Phase: *NuPAGE* Bis-TRIS 4–12% Acrylamid, mobile Phase: MES, reduzierend, Invitrogen) nach colloidaler Coomassiefärbung. Spur A – 14  $\mu$ g Protein, 0,3 M-Fraktion von Pool 1, 190fache Anreicherung. B – 17  $\mu$ g Protein, 0,4 M-Fraktion von Pool 1, 87fache Anreicherung, C – 18  $\mu$ g Protein, 0,3 M-Fraktion von Pool 2 64fache Anreicherung, M – Marker *SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard* (Invitrogen). Rot – Bereich des für die (*E*)- $\beta$ -OS charakteristischen Molekulargewichtes. 1–4 – Banden, die zur weiteren Analyse eingesetzt wurden.

In allen angereinigten Fraktionen konnten mehrere Proteine nachgewiesen werden. Der rot umrahmte Bereich umfasst großzügig den für die (E)- $\beta$ -OS bestimmten charakteristischen Molekularmassenbereich. In ihm kamen in allen Fraktionen drei Banden vor, die in der Fraktion mit der höchsten spezifischen Aktivität der (E)- $\beta$ -OS (Spur A) eine ähnliche Intensität hatten. In den Fraktionen mit geringerem Anreicherungsgrad des Enzyms (Spur B und C) war die Intensität einzelner Banden in diesem Bereich schwächer. Sie sind in der Abb. mit 1, 2 und 4 (rot) beziffert. Da das Enzym in diesen Fraktionen in geringerer Konzentration enthalten war, kamen diese Proteinbanden als (E)- $\beta$ -OS-Kandidaten in Frage. Die oberhalb der Banden 1 und 2 befindliche Bande zeigte keine Änderungen ihrer Intensität in den verschiedenen Fraktionen und wurde daher nicht als Kandidat des gesuchten Enzyms angesehen. Außerdem war in Spur B eine zusätzliche Bande vertreten (3). Diese insgesamt vier in der Abbildung rot bezifferten Banden (1–4) wurden zur weiteren Analyse massenspektrometrisch untersucht.

### 3.4. Massenspektrometrische Analyse der (E)- $\beta$ -OS-Kandidaten

In den analysierten Proteinbanden konnten durch ESI-MS (*electron spray ionisation–mass spectrometry*) insgesamt 12 Peptidmassen detektiert werden (Tab. 9), die in einem Fehler-toleranten Vergleich mit homologen Sequenzen bekannter Terpensynthasen zugeordnet werden konnten. Die nachgewiesenen Massen der Peptide aus *Mirabilis jalapa* wichen mit einer Ausnahme<sup>#</sup> von den Massen der in der Datenbank vertretenen Monoterpensynthasepeptide (Tab. 16, Anhang) ab. Allerdings war ein hoher Grad der Homologie zu verzeichnen, da die Peptidsequenzen aus *Mirabilis jalapa* sich jeweils nur in einer Aminosäure von der in der Datenbank enthaltenen Aminosäuresequenz unterschieden.

Bei der Analyse des Peptidextraktes der Bande 1 wurden 643 MS/MS-Spektren aufgenommen. Nach Vergleich der Daten mit der SwissProt-Datenbank 56.1 wurden neben kontaminierenden Keratinen und dem proteolytischen Enzym Trypsin diverse Hitzeschockproteine identifiziert. Unter den Precursormassen, die keiner Sequenz der SwissProt-DB zugeordnet wurden, konnten bei einer Error-toleranten Suche in einer die Terpensynthasen enthaltenden Datenbank die beiden in Tab. 9 aufgeführten Peptide 1-1 und 1-2 identifiziert werden, die sich in der Geraniolsynthese aus *Ocimum basilicum* wieder fanden.

Bei der Analyse des Peptidextraktes der Bande 2 wurden 3027 MS/MS-Spektren aufgenommen. Im Vergleich der Daten mit der SwissProt-Datenbank wurden neben den bereits oben genannten Kontaminationen die Proteine *Glyoxysomal fatty acid beta-oxidation multifunctional protein* (*Cucumis sativus*) und diverse pflanzliche Hitzeschockproteine identifiziert. Unter den Precursormassen, die keiner Sequenz der SwissProt-DB zugeord-

net wurden, konnten bei einer Error-toleranten Suche der Terpensynthasen-Datenbank die Peptide 2-1 bis 2-6 identifiziert werden: Jeweils zwei Peptide mit hoher Ähnlichkeit zur Cineolsynthese aus *Citrus unshiu* (Peptide 2-1 und 2-2) konnten bestimmt werden. Außerdem wurden vier Peptide (2-3 bis 2-6) identifiziert, die zu jeweils einer Sequenz der folgenden Enzyme ähnlich waren: Linaloolsynthese (*Perilla citriodora*), Myrcensynthese (*Antirrhinum majus*), Limonencyclase (*Arabidopsis thaliana*) und S-Linaloolsynthese (*Clarkia breweri*). Mit Ausnahme des letztgenannten lag in jedem Peptid aus *Mirabilis jalapa* ein Aminosäureaustausch im Vergleich zu den bereits bekannten Sequenzen vor.

Bei der Untersuchung des Peptidextraktes der Bande 3 wurden 2758 MS/MS-Spektren aufgenommen. Durch den Abgleich der Daten mit der SwissProt-Datenbank konnten neben kontaminierenden Proteinen diverse Hitzeschockproteine pflanzlichen Ursprungs sowie *2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase* (*Mesembryanthemum crystallinum*) identifiziert werden: Der anschließende Vergleich der in dieser Datenbank nicht zugeordneten Precursormassen mit der Terpensynthasen-Datenbank führte zur Identifikation von den in Tab. 9 genannten Peptiden 3-1 und 3-2, die eine hohe Homologie zu *Wound-inducible putative chloroplast terpene synthase 3* (*Medicago trunculata*) und Myrcensynthese (*Antirrhinum majus*) aufwiesen.

2664 MS/MS-Spektren wurden bei der Analyse des Peptidextraktes der Bande 4 gescannt. Durch den Abgleich der Daten mit der SwissProt-Datenbank konnten neben kontaminierenden Proteinen diverse pflanzliche Hitzeschockproteine sowie *luminal-binding protein* (*Spinacia oleracea*) identifiziert werden. Der anschließende Vergleich der in SwissProt nicht zuordnungsfähigen Precursormassen mit der Terpensynthasen-Datenbank führte zur Identifikation von den Peptiden 4-1 bis 4-5. Zwei der identifizierten Peptide aus Bande 1 konnten ebenso in Bande 4 ermittelt werden (Peptide 4-1 und 4-2), die in der Geraniolsynthese (*Ocimum basilicum*) enthalten waren. In beiden Banden wurde jeweils der gleiche Aminosäureaustausch detektiert. Zusätzlich konnte noch eine dritte Peptidsequenz (4-3) aus diesem Enzym nachgewiesen werden. Außerdem wurden zwei Peptide (4-4 und 4-5) identifiziert, die hohe Ähnlichkeit zu einem als monoterpensynthaseähnlich bezeichneten Protein aus *Pinus taeda* hatten. In ihnen lagen keine Sequenzmodifikationen vor.

Die zu den belegten Peptiden einer Bande gehörenden Aminosäuresequenzen wurden miteinander verglichen (Abb. 43–45, Anhang). Das Alignment der zu Bande 2 gehörenden Aminosäuresequenzen (Abb. 43) verdeutlichte, dass im überwiegenden Maße die Sequenzunterschiede sehr hoch waren. Die nachgewiesenen Peptide lagen hauptsächlich im N-terminalen Bereich. Einzig das zur S-Linaloolsynthese aus *Clarkia breweri* homologe Peptid befand sich C-terminal.

Der Vergleich der zu Bande 3 zugeordneten Sequenzen zeigte in einigen Bereichen des

Band	Peptidnummer	m/z	Ladung	Identifizierte Sequenz <i>Mirabilis jalapa</i>	Ion-Score	Peptid in Datenbank	Enzym (Spezies)	Mascot-Score
1	1-1	357.73	2	LAELIR	36	LTEIR	Geraniolsynthase (O. <i>basilicum</i> )	44
	1-2	501.28	2	INVALNIMAR	44	IKVALNIMAR		
2	2-1	378.78	2	QLQELK	38	QLQKLK	Cinadiolsynthase (C. <i>unshiu</i> )	72
	2-2	431.74	2	EILNFAR	43	ERLNFAR		
	2-3	586.78	2	EGEDTLELER	42	EGEDTLELAR	Linaldiolsynthase (P. <i>citriodora</i> )	42
	2-4	357.73	2	IAELIR	38	IEELIR	Myrcensynthase (A. <i>Majus</i> )	38
	2-5	588.34	2	ERUSJUDK	28	ERUSJUDK	Limonencyclase (A. <i>thaliana</i> )	37
	2-6	351.72	2	TIKNVVK	33	TIINVK	S-Linaldiolsynthase (C. <i>breweri</i> )	33
3	3-1	743.80	2	KDLFPRDERIK	48	KDLFARDEPIK	Wound-inducible putative chloroplast terpene synthase 3 (M. <i>trunculata</i> )	74
	3-2	357.73	2	IAELIR	37	IEELIR	Myrcensynthase (A. <i>Majus</i> )	37
4	4-1	357.73	2	LAELIR	38	LTEIR	Geraniolsynthase (O. <i>basilicum</i> )	85
	4-2	501.28	2	INVALNIMAR	38	IKVALNIMAR		
	4-3	457.78	2	ILTDAIR	38	ILTDAIR	Monoterpensynthase- ähnliches Protein (P. <i>taeda</i> )	50
	4-4	384.77	2	VNNLLK	33	VNNLLK		
	4-5	650.37	2	IPNLVMCRRK	35	IPNLVMCRRK		

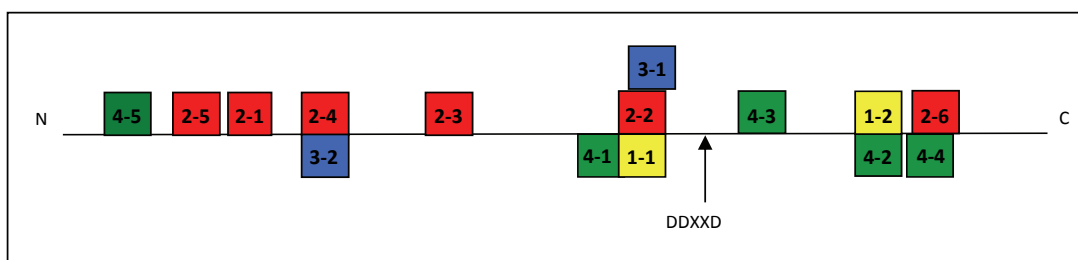
**Tab. 9: Mittels massenspektrometrischer Analysen identifizierte Peptide der Proteinbanden aus Trennungsgang 2.**

Die Banden wurden aus dem SDS-Gel ausgeschnitten (vgl. Abb. 19) und mit Trypsin verdaut. Die Aminosäuresequenzen der so gewonnenen Peptide wurden mittels nano-LC-ESI-Massenspektrometrie bestimmt. Dabei gewonnene MS/MS-Spektren, die in ihrem Mascot-Abgleich mit der Monoterpdatenbank einen Score von >30 hatten, galten als signifikant identifiziert und wurden in einer Fehler-toleranten Analyse auf Aminosäureaustausche untersucht. Zugangsnummern GenBank: *Ocimum basilicum* AY362553, *Citrus unshiu* AB110638, *Arabidopsis thaliana* AK118969, *Clarkia breweri* U58314, *Antirrhinum majus* AY195609, *Perilla citriodora* AY917193, *Medicago trunculata* AY766249, *Pinus taeda* AF543531, fett/kursiv – in Peptiden aus *Mirabilis jalapa* abweichende Aminosäure

C-Terminus und des DDXXD-Motivs Übereinstimmungen der insgesamt zu 35% ähnlichen Sequenzen (Abb. 44). Die Peptide lagen in den variableren N-terminalen Regionen. Das zur Myrcensynthese passende Peptid 3-2 entsprach dem in Bande 2 identifizierten (Peptid 2-7<sup>#</sup>).

Das Alignment der Bande 4 zugeordneten Sequenzen (Abb. 45) zeigte eine geringe Identität (26%). Die Peptide waren über den gesamten Sequenzbereich verteilt.

Das Schema in Abb. 20 zeigt die Lage der Peptide auf einem Alignment aller einbezogenen Terpensynthesesequenzen. Direkt übereinander liegende Felder symbolisieren, dass einzelne Peptide in nicht nur einer Bande identifiziert wurden.



**Abb. 20: Schematische Darstellung der aus *Mirabilis jalapa* identifizierten Peptide.**

Ihre Lage bezieht sich auf das Alignment aller zu den Peptiden Ähnlichkeiten aufweisenden Terpensynthasen. *Gelb* - Bande 1; *rot* – Bande 2; *blau* – Bande 3; *grün* – Bande 4.

Verschiebungen signalisieren im Gegensatz dazu die räumliche Nähe von unterschiedlichen Peptiden im Alignment. Die Peptide waren über den gesamten Sequenzbereich verteilt. Im Bereich des DDXXD-Motivs war eine Gruppierung auffällig, in der Vertreter aus allen Banden nahe zusammen lagen. Die Lage der Peptide war neben ihrer Sequenz eine wichtige Information, die bei der Ableitung der Primer berücksichtigt wurde.

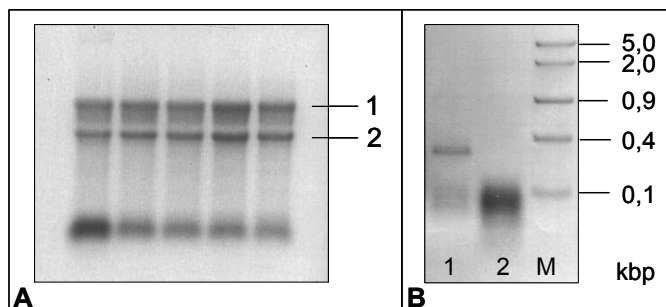
### 3.5. Molekularbiologische Untersuchungen zur Isolation der (E)- $\beta$ -Ocimensynthase

Aufbauend auf die durch die Anreinigung des Zielenzymes aus dem Rohextrakt und der massenspektrometrischen Analyse gewonnenen Sequenzinformationen sollte die (E)- $\beta$ -OS anschließend molekularbiologisch isoliert werden.

#### 3.5.1. Untersuchungen mit peptidabgeleiteten Primern

In Vorversuchen (Daten nicht gezeigt) wurde deutlich, dass nur die kombinierte GTC-CTAB-Methode von Camacho-Villasana (2002) für die Präparation von intakter RNA aus

*Mirabilis jalapa* Blüten in für die cDNA-Analyse hinreichender Qualität einsetzbar war (Abb. 21).



**Abb. 21: Qualität der aus den petaloiden Segmenten der *Mirabilis jalapa* isolierten RNA.**

**A) Gelelektrophorese.** Isolierung mit der kombinierten GTC-CTAB-Methode (Camacho-Villasana, 2002) aus jeweils 200 mg Blütengewebe. Gelelektrophoretische Auftrennung von 5 µg RNA (Stationäre Phase: 1% Agarosegel, mobile Phase 1x RNA-Laufpuffer, 45 min, 70 V).

1 – 28 S rRNA, 2 – 18 S rRNA

**B) cDNA-Synthese.** Repräsentatives Gel der elektrophoretischen Auftrennung von 5 µl RT-PCR-Ansatz (Stationäre Phase 1% Agarosegel, mobile Phase: 1x TAE, 45 min, 65V)

1 – Positivkontrolle (Primerkombination *Mir rev/ fw 1*, erwartetes Fragment 350 bp), 2 – repräsentativer Versuchsansatz, M – *Fast Ruler™ Middle Range DNA Ladder* (Fermentas)

Alle 12 identifizierten Peptide wurden zur Primerableitung herangezogen. Die belegten Peptide der Banden 1, 2 und 4 dienten zur Ableitung von Primern, deren Sequenzen in Tab. 17 (Anhang) zusammengefasst sind. Dabei wurden entweder die *Mirabilis jalapa* spezifischen *codon usage* vernachlässigt (Primerset 1) oder berücksichtigt (Primerset 2). Von den in Bande 3 identifizierten Peptiden konnte kein für die PCR geeignetes Primerpaar abgeleitet werden, da mehrere *wobble*-Triplets seine Spezifität reduzierten. Die Lage der einzelnen Primer auf dem Alignment der zugeordneten Terpensynthasen ist im Anhang dargestellt (Abb. 46).

Der Einsatz des Primersets 1 führte nach der RT-PCR in beiden Kombinationen zu keinen Amplifikationen von DNA-Fragmenten (s. Tab. 10).

Primerkombination		Fragmentgröße (bp)	
antisense	sense	erwartet	generiert
Tps 1a	Tps 1a	0,8	-
	Tps 1b	0,8	-
<b>Tps 1b</b>	<b>Tps 1c</b>	0,8	0,7
	<b>Tps 1d</b>	0,9	3,5; 1,8
<b>Tps 2c</b>	<b>Tps 2d</b>	0,2	0,6
<b>Tps 2d</b>	<b>Tps 2d</b>	0,5	0,5; 1,0
<b>Tps 4a</b>	<b>Tps 4a</b>	0,6	1,4; 2,5; >3,0
	<b>Tps 4f</b>	1,7	-

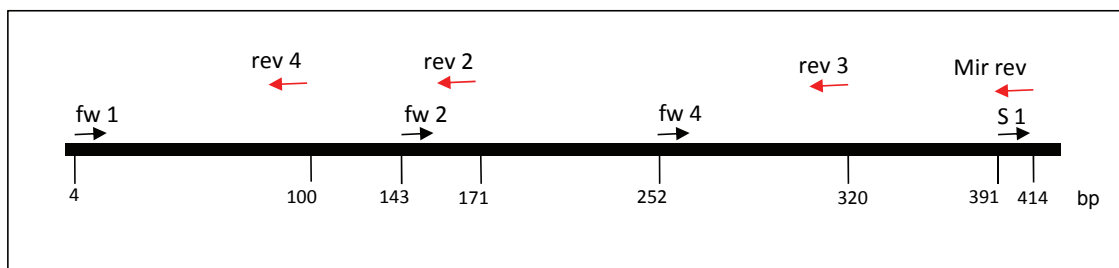
**Tab. 10: Ergebnisse der RT-PCR Untersuchungen mit den Primersets 1 und 2.**

Fett - Primerset 2. Die Größenangaben basieren auf der in Abb. 46 im Anhang gezeigten schematischen Lage der Primer.

Für die RT-PCR-Experimente mit dem Primerset 2 standen insgesamt vier *antisense* und sechs *sense* Primer zur Verfügung (Tab. 10). Im Falle der Untersuchungen mit dem *antisense*-Primer *Tps 1b* konnten mit den *sense* Primern drei DNA-Fragmente amplifiziert werden, deren Länge der annähernd erwarteten Fragmentlänge von 0,8 bis 0,9 kb entsprach oder darüber hinausging. Sie konnten erfolgreich kloniert werden. Die Experimente mit dem Primerpaaren *Tps 2c-Tps 2d* und *Tps 2d-Tps 2d* ergaben ein bzw. zwei Amplifikat(e) im gesuchten Größenbereich, welche leider nicht kloniert werden konnten. Die Kombination *Tps 4a antisense -Tps 4a sense* führte zu drei DNA-Fragmenten oberhalb der erwarteten Größe, die ebenfalls nicht kloniert werden konnten. In Verbindung mit dem *sense* Primer *Tps 4f* wurden keine Fragmente generiert. Alle erhaltenen Fragmente sind im Anhang (Abb. 47) dokumentiert. Die Sequenzierung aller Amplifikate ergab keine Übereinstimmung mit Terpensynthasegenen.

### 3.5.2. Analyse des Fragmentes FS-35 aus *Mirabilis jalapa*

Weitere molekularbiologische Untersuchungen konzentrierten sich auf das Fragment FS-35, dessen Sequenz (AY589702) als terpensynthaseähnliche Sequenz aus *Mirabilis jalapa* in der NCBI-Datenbank hinterlegt wurde (Meir *et al.* 2006). FS-35 wurde aus einer cDNA-Bank isoliert, die aus dem Gewebe der Abbruchzone der Petiolen einer Pflanze nach der Entfernung ihrer Blätter hergestellt wurde. Durch diese Manipulation wurde die Expression gesteigert. Bei dem Fragment handelt es sich um eine 455 bp lange DNA-Sequenz, die auf Nukleotidebene zu 66 % und auf Ebene der Aminosäuresequenz zu 57 % zum C-terminalen Bereich der putativen 1,8-Cineolsynthase aus *Ricinus communis* identisch war (NCBI: XP\_002518583). Ein Alignment beider Aminosäuresequenzen ist im Anhang hinterlegt (Abb. 48). Zunächst sollte untersucht werden, ob diese cDNA in Blüten nachgewiesen werden konnte. Im positiven Falle sollte anschließend eine Charakterisierung dieser floralen terpensynthaseähnlichen Sequenz aus *Mirabilis jalapa* erfolgen. Dies setzte die 5'-terminale Vervollständigung der Sequenz voraus. Zu diesem Zweck wurden Primer in verschiedenen Orientierungen von der Sequenz abgeleitet (Abb. 22, Tab. 17, Anhang).



**Abb. 22: Schematische Lage und Orientierung der Primer auf der FS-35 Sequenz.**

Die Startposition des Primers ist jeweils mit der korrespondierenden Nukleotidnummer der DNA-Sequenz versehen.



**Nachweis der FS-35 Sequenz in Blüten von *Mirabilis jalapa***

Für diese Untersuchungen wurden einerseits RT-PCR- und andererseits PCR-Experimente durchgeführt. Die eingesetzte Gesamt-RNA bzw. genomische DNA wurde von 3 Erntezeitpunkten im Verlauf der Anthese (14, 16 bzw. 18 Uhr) gepoolt. Für alle Amplifikationen wurden der *antisense* Primer *Mir rev* und die *sense* Primer *fw 1* bzw. *fw 2* genutzt. Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigt Tab. 11. Durch RT-PCR konnte die Expression des Fragmentes FS-35 in den Blüten nachgewiesen werden. Im Einzelnen führten die RT-PCR-Experimente mit der RNA aus dem sternförmigen Petalenzentrum zu einem 0,3 kb großen Amplifikat. Durch die Sequenzierung und den Abgleich mit den in der NCBI-Datenbank hinterlegten Sequenzen (*BLASTsearch*-Analyse) wurde bestätigt, dass es sich um das bekannte Fragment FS-35 handelte. Die RT-PCR-Untersuchungen der RNA der petaloiden Segmente ergaben die Amplifikation von zwei Fragmenten von 0,3 bzw. 0,5 kb Länge. Die Sequenzierungen und *BLASTsearch*-Analysen zeigten, dass nur das kürzere DNA-Fragment der bereits bekannten Sequenz FS-35 entsprach. Das längere Amplifikat wies weder eine Ähnlichkeit zu FS-35 noch zu anderen Terpensynthasen auf (Abb. 49A und 50, Anhang).

Template	Primer-kombination	Blütenteil	DNA Fragment (kb)		Homologie
			erwartet	generiert	
mRNA (RT-PCR)	<i>Mir rev / fw2</i>	sternförmiges Petalenzentrum	0,3	0,3	FS 35
		petaloide Segmente	0,3	0,3	FS 35
				0,5	keine Ähnlichkeit
Genomische DNA (PCR)	<i>Mir rev / fw2</i>	petaloide Segmente	≥0,3	0,6	FS 35 + Intron?
	<i>Mir rev / fw1</i>	petaloide Segmente	≥0,4	0,8	FS 35 + Intron?

**Tab. 11: Nachweis des FS-35-Fragmentes in verschiedenen Teilen von *Mirabilis jalapa*-Blüten.**

Die Homologie wurde durch *BLASTsearch* ermittelt.

Bei den Untersuchungen der genomischen DNA konnte das FS-35-Fragment ebenfalls nachgewiesen werden. Mit beiden verwendeten Primerkombinationen wurden größere Fragmente amplifiziert, deren Sequenzen in Teilen vom FS-35-Fragment verschieden waren. So war im 0,8 kb-Amplifikat (*rev/fw1*) das C-terminale Ende identisch zur FS-35-Sequenz ab Position 191. N-terminal wies das Amplifikat keine Ähnlichkeit zur Vergleichssequenz auf. Im Falle des 0,6 kb-DNA-Fragmentes (*rev/fw2*) war bei Position 190/FS-35 ein 450 bp langer und nicht zur Vergleichssequenz homologer Abschnitt eingeschoben. Obwohl die zusätzlichen Sequenzabschnitte beider Fragmente nicht vollständig zueinander homolog waren, wiesen die Ergebnisse auf ein Intron in der Region um 190 bp auf FS-35 hin (Abb. 49B und 51, Anhang).

### **Versuche zur Amplifikation des 5'-Endes des FS-35-Fragmentes**

Verschiedene Strategien wurden zur Vervollständigung der cDNA-Sequenz FS-35 eingesetzt. Zum einen sollte durch cDNA-basierte Experimente eine Verlängerung erzielt werden (Eyal *et al.* 1999; Tessier *et al.* 1986; Troutt *et al.* 1992; Edwards *et al.* 1991). Dazu wurde Gesamt-mRNA durch Reverse Transkription mit FS-35-spezifischen oder *Oligo-dT*-Primern in cDNA umgeschrieben, die anschließend in drei methodischen Ansätzen untersucht wurde. Erstens wurde sie direkt als Template in einer PCR zur Amplifikation verwendet. Zweitens wurde versucht, die entstandene DNA unter Zuhilfenahme von phosphorylierten Primern zu ligieren und in einer inversen PCR zu vervielfältigen. Im dritten Ansatz sollte sie mit einem Poly-A-Schwanz versehen (5'RACE) und anschließend in einer PCR vervielfältigt werden.

Zum anderen sollte über die Verwendung von genomischer DNA eine Verlängerung der bekannten FS-35-Sequenz erzielt werden. Dazu wurde die DNA nach der Restriktion mit anschließender Religation in einer inversen PCR amplifiziert.

In der vorliegenden Arbeit konnten nur durch auf genomischer DNA basierende Methoden Amplifikate hergestellt werden. Bei der Verwendung der cDNA-basierten Ansätze wurden keine DNA-Fragmente von ausreichender Größe generiert. Die inverse PCR wurde in zwei Ansätzen durchgeführt, die durch den Einsatz verschiedener Restriktionsendonukleasen, die die DNA nicht innerhalb der bekannten Sequenz spalteten, gekennzeichnet waren. Die gewählten Primer (Tab. 12) hybridisierten außerhalb des vermuteten Introns, sodass nach erfolgreicher Religation in beiden Versuchen die Amplifikation von DNA-Fragmenten möglich war. Die PCR mit *EcoRV*-geschnittener (Ansatz 1) bzw. *PvuII*-

Ansatz	Primer-kombination	DNA-Fragment (kb)		Übereinstimmung mit FS-35
		erwartet	generiert	
1	<i>rev2/fw4</i>	>0,2	2,0; 1,1; 0,8; 0,6;0,3	Keine Ähnlichkeit
2	<i>rev2/fw 4</i>	>0,2	0,5; 0,4	
	<i>S1/rev2</i>	>0,3	0,6; 0,3	

**Tab. 12: Inverse PCR auf genomischer DNA.**

*Ansatz 1* – Restriktion mit *EcoRV*, *Ansatz 2* –: Restriktion mit *PvuII*. Beide Restriktionsenzyme haben keine Schnittstelle auf dem bekannten Fragment. Die Homologie wurde durch *BLASTsearch* ermittelt.

geschnittener DNA (*Ansatz 2*) führte zur Vervielfältigung mehrerer Fragmente (Abb. 52, Anhang). Alle Amplifikate konnten sequenziert werden. Sie wiesen jedoch keine Ähnlichkeit zu einer Terpensynthase oder zu FS-35 auf. Durch die gewählten Methoden konnte keine über die bekannte Sequenz hinausgehende Amplifikation erzielt werden.

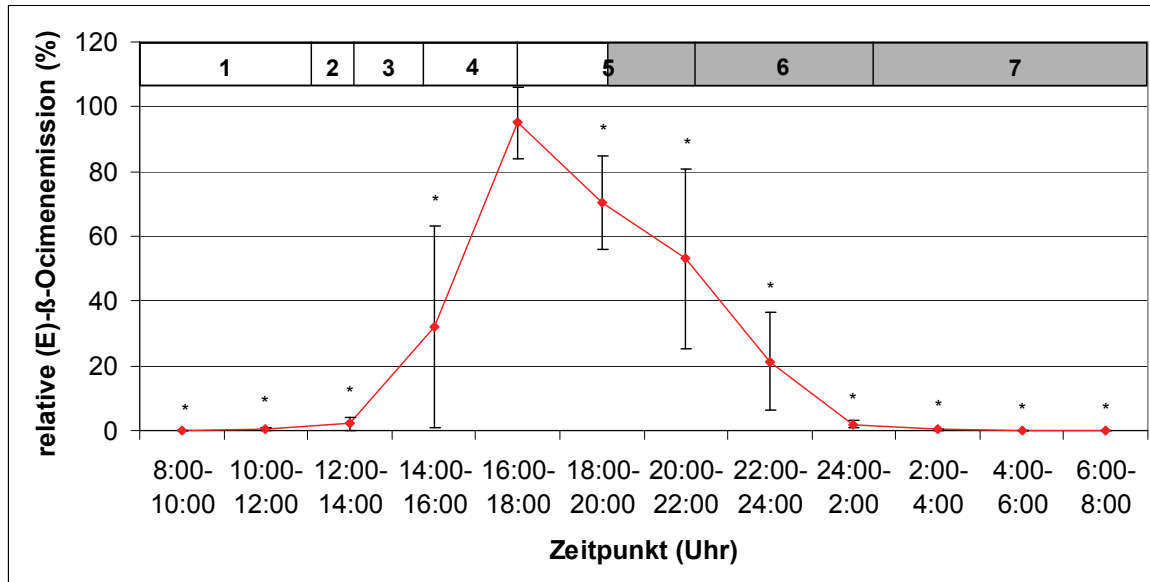
Abschließend kann festgehalten werden, dass weder die Verwendung der von den Peptiden noch der vom Fragment FS-35 abgeleiteten Primer zur Isolation der (*E*)- $\beta$ -OS führten.

### 3.6. Histologische und biochemische Analysen des (*E*)- $\beta$ -Ocimens in *Mirabilis jalapa*

Ergänzend zur angestrebten Isolation des (*E*)- $\beta$ -Ocimen produzierenden Enzyms sollte dessen Emissionsmuster sowie die Prozesse der Post-(*E*)- $\beta$ -Ocimensynthese auf zellulärer Ebene *in planta* untersucht werden.

#### 3.6.1. Untersuchungen der floralen (*E*)- $\beta$ -Ocimenemission

Die Headspace-Analysen bestätigten den von Effmert *et al.* 2005 gezeigten Verlauf der (*E*)- $\beta$ -Ocimenemission (Abb. 23). Das Volatil konnte mit Beginn der Anthese (Stadium 2) nachgewiesen werden. Seine Emission erreichte zum Zeitpunkt der vollständigen Blütenöffnung (Stadium 4) im Intervall von 16–18 Uhr das Maximum und nahm in den folgenden Stunden signifikant ab. Die seneszenten Blüten (Stadien 6/7) emittierten kein (*E*)- $\beta$ -Ocimen.



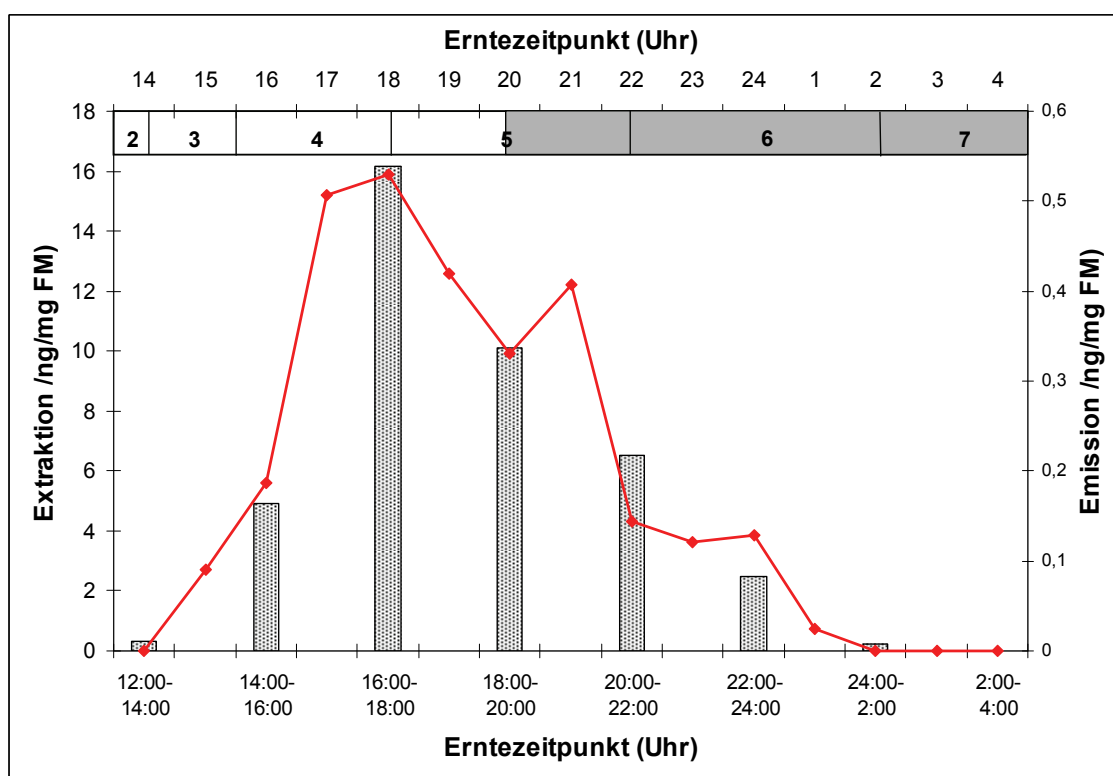
**Abb. 23: Florale (*E*)- $\beta$ -Ocimenemission der *Mirabilis jalapa* im Verlauf einer Blühperiode.**

Das in den Headspace einer Einzelblüte emittierte (*E*)- $\beta$ -Ocimen wurde in Intervallen von 2 Stunden mittels SuperQ gesammelt, mit Dichlormethan eluiert und mittels GC-MS analysiert. MW+SD aus n=6. \* signifikant nach zweiseitigem T-Test, Bezugswert 18 Uhr.

1 – lange Knospe, 2 – entspiralisierte Knospe, 3 – röhrenförmig geöffnete Blüte, 4 – trichterförmig geöffnete Blüte, 5 – vollständig geöffnete Blüte, tellerförmig, 6 – Stigmafall, 7 – Seneszenz, gefaltete Blüte, grau hinterlegt – Dunkelphase

### 3.6.2. Quantifizierung des (*E*)- $\beta$ -Ocimengehaltes der petaloiden Segmente

In diesen Versuchen wurde das in den petaloiden Segmenten enthaltene (*E*)- $\beta$ -Ocimen in Intervallen von einer Stunde über eine Blühperiode nach der Extraktion mit Hexan gaschromatographisch quantifiziert (Abb. 24). Der Ocimengehalt korrelierte eng mit der Emission, war jedoch ca. 16fach vermindert. Der höchste (*E*)- $\beta$ -Ocimengehalt der petaloiden Segmente korrelierte mit dem Maximum der floralen VOC-Emission in vollständig geöffneten Petalen. Zu Beginn der Anthese (Stadium 2, 14 Uhr) konnte kein (*E*)- $\beta$ -Ocimen nachgewiesen werden. Im Verlauf der Blütenöffnung (Stadien 3 und 4) war es in den petaloiden Segmenten in steigenden Konzentrationen messbar und erreichte sein Maximum in den vollständig geöffneten Blüten (Übergang Stadium 4/5, 18 Uhr). Mit fortschreitender Blühdauer nahm der (*E*)- $\beta$ -Ocimengehalt kontinuierlich ab.



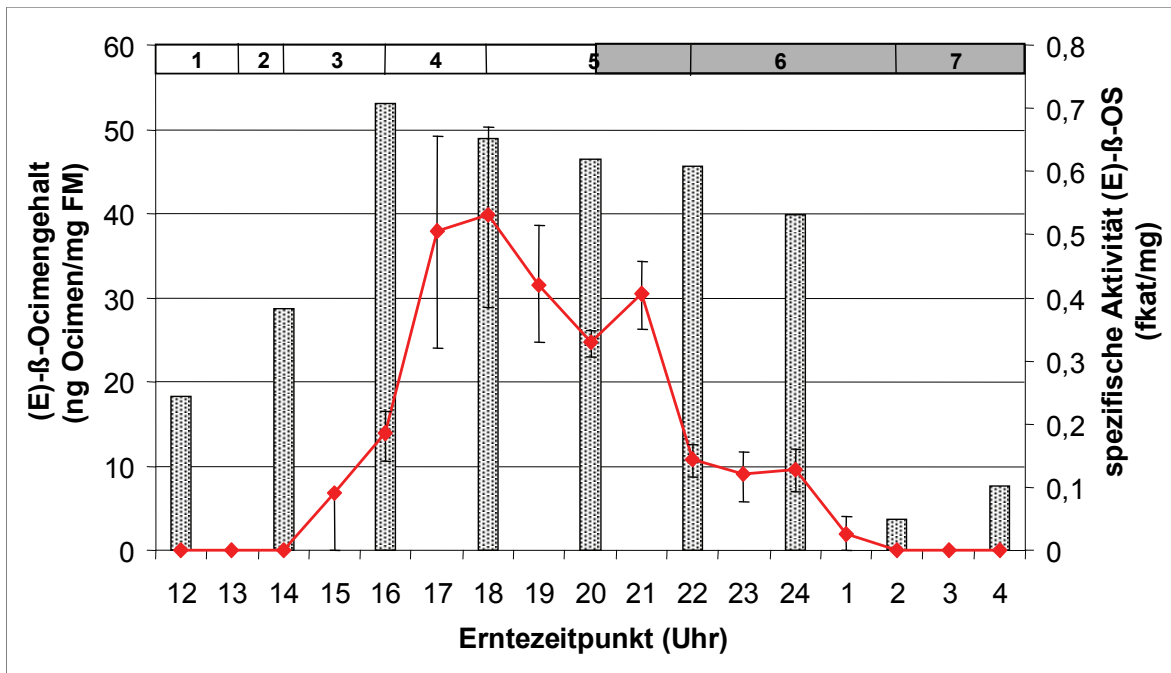
**Abb. 24: Vergleich der (*E*)- $\beta$ -Ocimenemission mit dem -gehalt der petaloiden Segmente.**

**Grau:** (*E*)- $\beta$ -Ocimenemission. Das in den Headspace einer Einzelblüte emittierte (*E*)- $\beta$ -Ocimen wurde in Intervallen von 2 Stunden mittels SuperQ gesammelt, mit Dichlormethan eluiert und mittels GC-MS analysiert. **Rot:** (*E*)- $\beta$ -Ocimengehalt. Die VOCs wurden mit Hexan extrahiert und mittels GC-MS analysiert. Stündliche Beprobung<sup>#</sup>

1 – lange Knospe, 2 – entspiralisierte Knospe, 3 – röhrenförmig geöffnete Blüte, 4 – trichterförmig geöffnete Blüte, 5 – vollständig geöffnete Blüte, tellerförmig, 6 – Stigmafall, 7 – Seneszenz, gefaltete Blüte, *grau hinterlegt* – Dunkelphase

Der Vergleich der Daten zum (*E*)- $\beta$ -Ocimengehalt und der spezifischen Aktivität der (*E*)- $\beta$ -OS in den petaloiden Segmenten zeigt eine Korrelation beider Parameter (Abb. 25). Vor bzw. zu Beginn der Anthese (Stadien 1 und 2) war allerdings trotz nachweisbarer Enzymaktivität im Rohextrakt kein Produkt im floralen Gewebe messbar. Mit fortschreitender

Anthese nahm sowohl die Aktivität als auch der (*E*)- $\beta$ -Ocimengehalt stark zu. Jedoch lag die maximale (*E*)- $\beta$ -OS-Aktivität (Übergang Stadien 3 und 4) zeitversetzt vor dem Maximum des nachweisbaren Produktes (0,5 ng/mg, Übergang Stadien 4 und 5). Während der (*E*)- $\beta$ -Ocimengehalt mit steigendem Blütenalter kontinuierlich abnahm, blieb die Enzymaktivität bis zur einsetzenden Seneszenz nahezu unverändert. Am Ende der Blühperiode war keine (*E*)- $\beta$ -Ocimenproduktion *in planta* nachweisbar, obwohl eine geringe Aktivität des synthetisierenden Enzyms im Rohextrakt vorlag.



**Abb. 25: Vergleich des (*E*)- $\beta$ -Ocimengehaltes mit der spezifischen Aktivität der (*E*)- $\beta$ -Ocimensynthese der petaloiden Segmente im Verlauf einer Blühperiode.**

**Rot: (*E*)- $\beta$ -Ocimengehalt.** MW+ Differenz zu MW aus n=2. Die VOCs von 2x6 Blüten wurden mit Hexan extrahiert und mittels GC-MS analysiert (interner Standard 1: Nonylacetat, interner Standard 2 (Quantifizierung):  $\alpha$ -Pinen)

**Grau: Spezifische Aktivität der (*E*)- $\beta$ -OS.** Zur Aktivitätsbestimmung wurden Rohextrakte aus dem petaloiden Gewebe zu den angegebenen Erntezeitpunkten in *in vitro*-Assays mit 55  $\mu$ M GPP untersucht. MW aus n=2, außer 22 Uhr (n=3) und 10, 14, 16 und 18 Uhr (n=4)<sup>#</sup>

1 – lange Knospe, 2 – entspiralisierte Knospe, 3 – röhrenförmig geöffnete Blüte, 4 – trichterförmig geöffnete Blüte, 5 – vollständig geöffnete Blüte, tellerförmig, 6 – Stigmafall, 7 – Seneszenz, gefaltete Blüte, grau hinterlegt – Dunkelphase

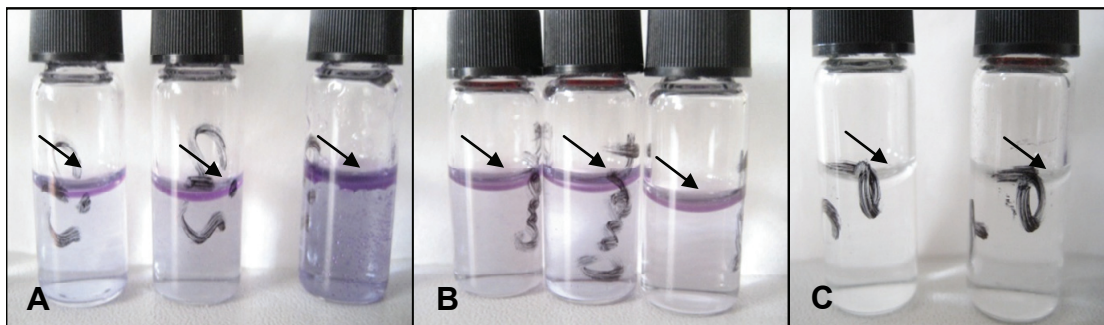
Die Quantifizierung des in die Umgebung emittierten bzw. im floralen Gewebe enthaltenen (*E*)- $\beta$ -Ocimens zeigte, dass beide Parameter in ihrer Rhythmik synchron vorlagen. Allerdings war die emittierte VOC-Menge etwa 16fach höher als die im Gewebe nachweisbare. Die Enzymaktivität im Rohextrakt korrelierte in geringerem Umfang mit der Menge des nachweisbaren Produktes.

### 3.6.3. Lokalisation von (*E*)- $\beta$ -Ocimen im Blütengewebe

Das in den petaloiden Segmenten von *Mirabilis jalapa* produzierte (*E*)- $\beta$ -Ocimen sollte durch die nachstehend beschriebenen Experimenten auf zellulärer Ebene visualisiert werden. Von diesen Untersuchungen wurden Hinweise auf eine mögliche Speicherung des Volatiles erwartet.

#### Etablierung der Methode

Terpene lassen sich durch eine Farbreaktion mit NADI-Reagenz in pflanzlichen Geweben nachweisen. Da bekannt war, dass das Reagenz zu unterschiedlichen Farbreaktionen führen könnte, wurden zunächst *in vitro*-Versuche unternommen, in denen die in  $\text{MeCl}_2$  verdünnten Standardsubstanzen (*Z*)- $\beta$ -Ocimen und (*E*)- $\beta$ -Ocimen mit NADI-Reagenz inkubiert wurden. Eine leichte Färbung der Proben setzte nach 5minütiger Inkubation ein und steigerte sich mit der Zeit. Nach ca. 30 min blieb der Farbton unverändert (Abb. 26).



**Abb. 26: *In vitro*-Terpennachweis mit NADI-Reagenz.**

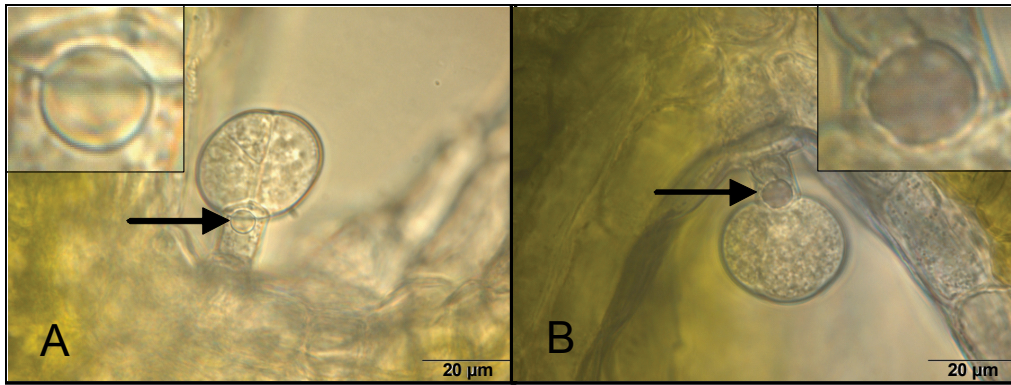
50  $\mu\text{l}$  einer 1:1000 Verdünnung der Standardsubstanz in  $\text{MeCl}_2$  wurden 30 min mit 950  $\mu\text{l}$  NADI-Reagenz unter Lichtabschluss inkubiert. **A) (*Z*)- $\beta$ -Ocimen.** Die unterschiedliche Farbintensität wurde durch die Verteilung der organischen Phase verursacht. **B) (*E*)- $\beta$ -Ocimen.** **C) Lösungsmittel  $\text{MeCl}_2$ .** *Pfeil* – Standardsubstanz in organischer Phase.

Beide Monoterpene wurden violett gefärbt, wobei das *cis*-Isomer etwas dunkler erschien (A). Bei der Lösungsmittelprobe war über den gesamten Versuchszeitraum keine Farbveränderung zu ermitteln (C). Durch die Verlängerung der Inkubationsdauer auf 60 min wurde dieses Ergebnis bestätigt.

#### *in planta*-Terpennachweis in Vergleichsproben

Zur Etablierung der *in planta*-Färbemethode wurden zunächst Tests mit Laubblättern von *Salvia officinalis* unternommen, deren Drüsenzellen reich an Monoterpenen sind. Die Inkubation nativer Semidünnschnitte der Blattspreiten resultierte bereits nach 5 min in einer Violettfärbung des Inhaltes der Drüsenzellen (Abb. 27, Pfeil).





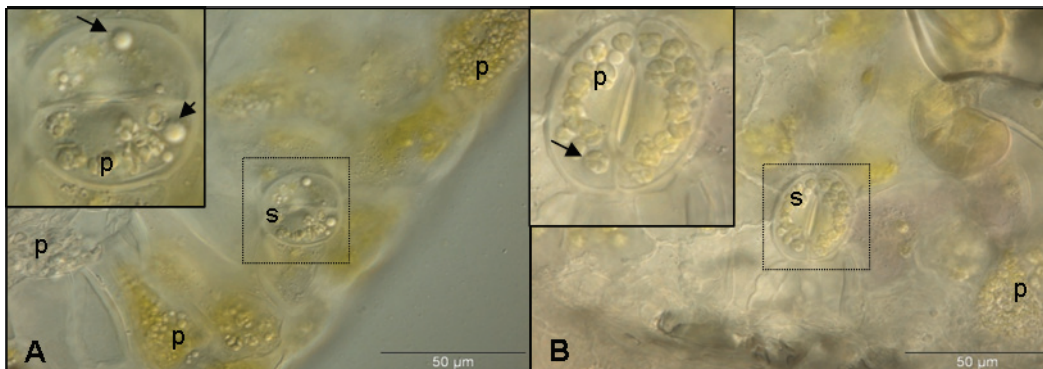
**Abb. 27: NADI-Färbung in nativen Semidünnschnitten von *Salvia officinalis* Blättern.**

Von in Agarose eingebetteten Blättern wurden Semidünnschnitte im Bereich der mittleren Blattspreite angefertigt, über unterschiedliche Zeiträume in NADI-Reagenz unter Lichtabschluss inkubiert und anschließend mikroskopisch untersucht (*Axioplan II*, Zeiss, repräsentative Aufnahmen in 100facher Vergrößerung, Details digital doppelt vergrößert. Balken 20 µm).

**Abaxiale Epidermis, Inkubation in NADI-Reagenz:** A) 0 min; B) 5 min.

*Pfeil* – Kügelchen im Inneren des Drüsenhärchens

Zur Applikation der NADI-Färbung in Blütengewebe wurde *Nicotiana glauca* ausgewählt, die sich durch einen hohen Monoterpengehalt, z.B. an Myrcen und Linalool, auszeichnete (Ganz 2005). Auch die lichtmikroskopische Untersuchung der NADI-Färbung von Terpenen in *Nicotiana glauca*-Blüten setzte die Herstellung von nativen Semidünnschnitten voraus, die sowohl Aufsichten der adaxialen und abaxialen Epidermen als auch Einblicke in die Gewebeschichten (Querschnitte) ermöglichten. Die Inkubation der Schnitte in Puffer (Abb. 28A) oder Wasser (Abb. 28B) rief in den Geweben keine sichtbaren Unterschiede hervor. Beide Abbildungen zeigen Aufsichten der abaxialen Epidermis, in denen z.B. Plastiden und Stomata zu erkennen waren. In den Schließzellen der Stomata waren neben den Plastiden kleinere farblose Kügelchen von ca. 1–5 µm Durchmesser erkennbar (*Pfeil*). In allen Bildern war eine leichte violette Färbung einiger Zellen auffällig.



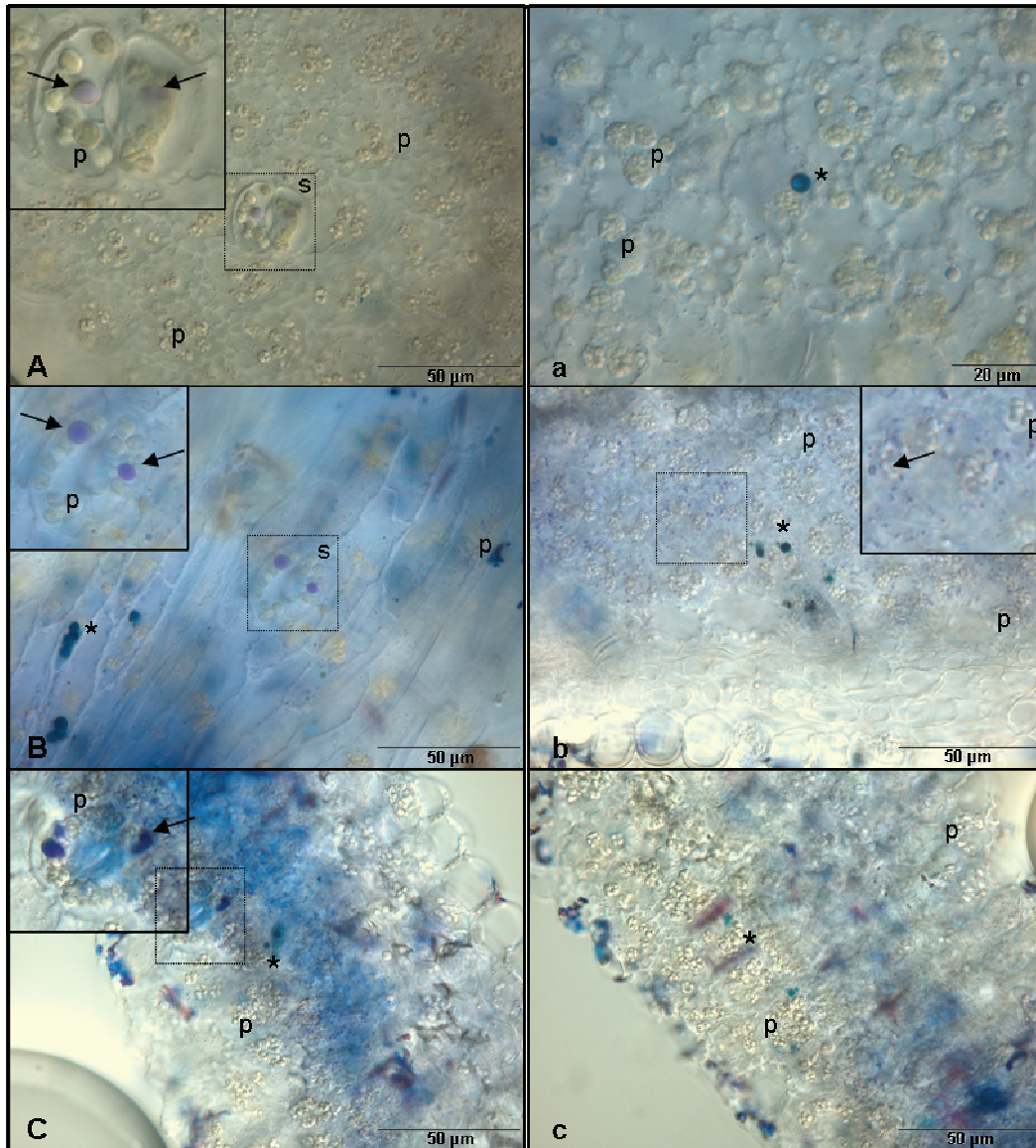
**Abb. 28: Ungefärbte native Semidünnschnitte von *Nicotiana glauca* Blüten.**

Von in Agarose eingebetteten Blüten (Ernte 16 Uhr, 2. Tag Postanthese) wurden Semidünnschnitte im Bereich der Petalenspitzen angefertigt und mikroskopisch untersucht (*Axioplan II*, Carl Zeiss AG, Oberkochen, repräsentative Aufnahmen in 63facher Vergrößerung, Details digital doppelt vergrößert. Balken 50 µm). Ansichten der abaxialen Epidermis. **A) Lagerung in Phosphatpuffer.**

**B) Lagerung in Wasser.**

*Pfeil* – farblose Kügelchen in Schließzellen der Stomata, *p* – Plastiden, *s* – Schließzellen der Stomata

Die Inkubation von *Nicotiana alata*-Blüten in NADI-Reagenz führte zu sichtbaren Veränderungen, deren Intensität mit der Dauer der Inkubation korrelierte (Abb. 29). Der schnellste nachweisbare Effekt betraf die Schließzellen der Stomata. Dort war nach 5minütiger Inkubation eine leichte Violettfärbung von zwei 1–5 µm großen Kügelchen sichtbar, von denen sich jeweils eins in jeder Schließzelle befand (A). Bei diesen Strukturen handelte es sich um die in den ungefärbten Schnitten aufgefallenen farblosen Kügelchen. Nach längerer Inkubation in NADI-Reagenz verstärkte sich die Violettfärbung (Abb. 29B und C,



**Abb. 29: NADI-Färbung in nativen Semidünnschnitten von *Nicotiana alata* Blüten.**

Von in Agarose eingebetteten Blüten (Ernte 16 Uhr, 2. Tag Postanthese) wurden Semidünnschnitte im Bereich der Petalenspitzen angefertigt, über unterschiedlich lange Zeit in NADI-Reagenz unter Lichtabschluss inkubiert und anschließend mikroskopisch untersucht (*Axioplan II*, Zeiss, repräsentative Aufnahmen in 63facher Vergrößerung, Details digital doppelt vergrößert. Balken 50 µm).

**A–C) Abaxiale Epidermis, Inkubation in NADI-Reagenz.** A) 5 min; B) 10 min; C) 30 min. **a–c) Mesophyll, Inkubation in NADI-Reagenz.** a) 5 min; b) 10 min; c) 30 min.

Pfeil – violettgefärbte Kügelchen, \* – türkisgefärbte Kügelchen, p – Plastiden, s – Schließzellen der Stomata



10 und 30 min, Pfeile). Eine weitere Verlängerung der Inkubation führte zu keiner Veränderung der Violettfärbung. Nach 10minütiger Inkubation waren in nahezu allen Zellen äußerst kleine (um 1  $\mu\text{m}$ ) violette Tröpfchen sichtbar (Abb. B–c). Die schon in den ungefärbten Schnitten nachweisbaren türkis gefärbten Kügelchen waren ebenfalls vorhanden und sind in den Abbildungen a bis c sowie B und C mit einem Stern gekennzeichnet. Sowohl ihre Färbung als auch ihre Größe blieb nach der Inkubation mit dem Reagenz unverändert. In den Bildern auftretende blaugefärbte Bereiche sind als Artefakte zu betrachten.

Die violette Färbung von Tröpfchen bzw. Kügelchen innerhalb der Schnitte nach der Inkubation mit dem NADI-Reagenz wies auf das Vorhandensein von Terpenen im Gewebe hin. Die Kügelchen in den Schließzellen der Stomata zeigten nach kurzer Inkubation eine terpenpositive Färbung. In den übrigen Zellen wurden die deutlich kleineren Tröpfchen nach 10minütiger Inkubation zweifelsfrei sichtbar.

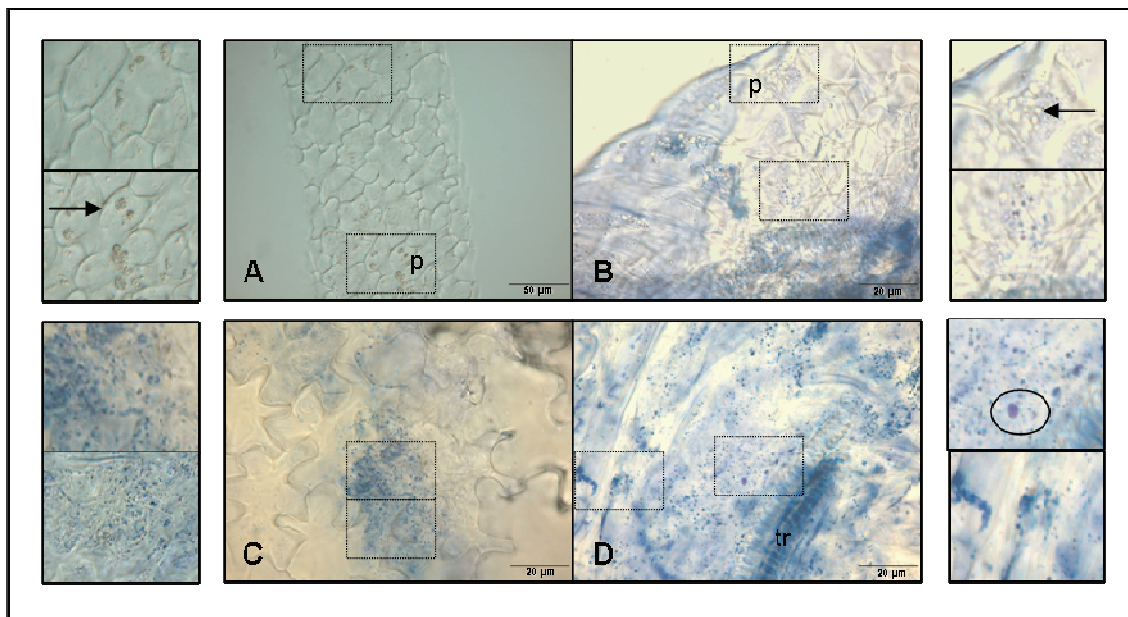
#### **Terpennachweis in *Mirabilis jalapa***

Nach der Detektion von Terpenen in *Nicotiana glauca* wurden verschiedene Gewebe von *Mirabilis jalapa* eingehend untersucht.

Vor dem Hintergrund der durch die Extraktion nachgewiesenen Unterschiede im (*E*)- $\beta$ -Ocimengehalt der Blüten verschiedener Entwicklungsstufen wurden diese Untersuchungen an Blüten aller Öffnungsstadien durchgeführt. Die Ergebnisse dreier charakteristischer Stufen 3 (Trichterstadium, vor VOC-Emission), 5 (geöffnete Blüte, Höhepunkt der VOC-Emission) und 7 (Seneszenz, nach VOC-Emission) werden exemplarisch erläutert.

Das Blütengewebe des Stadiums 3 war vor der Inkubation in NADI-Reagenz vollständig farblos (Abb. 30A). Die Inkubation mit NADI-Reagenz führte stets zu einer Blaufärbung des Gewebes. Diese Färbung wurde durch eine Vielzahl kleiner blauer Tröpfchen (<1  $\mu\text{m}$  Durchmesser) hervorgerufen. Die Intensität der Blaufärbung stieg mit der Inkubationsdauer. Die opaken Plastiden wurden durch das Reagenz nicht gefärbt (Pfeil, A und B). Teilweise von ovaler Form waren die violetten Partikel, die nach der Inkubation von mindestens 40 Min. in einigen Zellen auftraten (F<sup>#</sup>; oval umrahmt in der Detailansicht). Ihre Größe variierte von unter 1 bis 2  $\mu\text{m}$ . Sie kamen in den am längsten inkubierten Schnitten (über Nacht) am häufigsten vor. Dennoch korrelierte das Auftreten dieser terpenpositiven Strukturen nicht mit der Inkubationsdauer.

Den Terpennachweis in vollständig geöffneten *Mirabilis jalapa* Blüten während der maximalen Emission des (*E*)- $\beta$ -Ocimens (Stadium 5) zeigt die Abbildung 31 beispielhaft. Alle in NADI-Reagenz inkubierten Schnitte hatten die durch kleine Tröpfchen hervorgerufene Blaufärbung, die teilweise nur einzelne Zellen betraf, während benachbarte Zellen fast

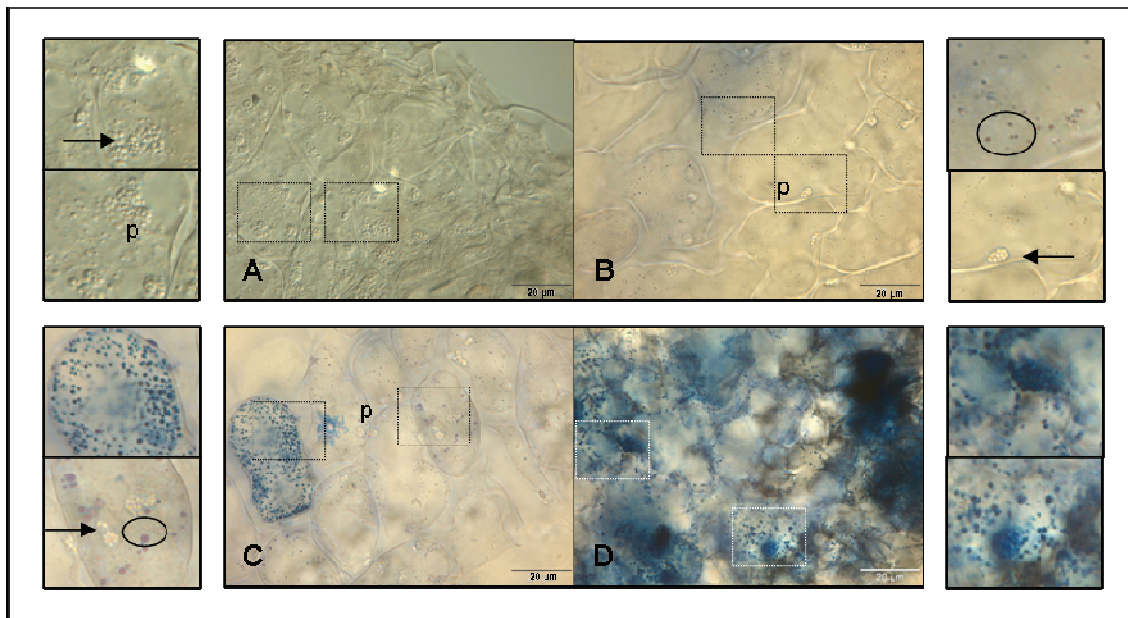


**Abb. 30: NADI-Färbung in nativen Semidünnschnitten von *Mirabilis jalapa* Blüten des Stadiums 3.**

Von in Agarose eingebetteten Blüten (Ernte 14.30 Uhr) wurden Semidünnschnitte im oberen Bereich der petaloiden Segmente angefertigt, über unterschiedlich lange Zeit in NADI-Reagenz unter Lichtabschluss inkubiert und anschließend mikroskopisch untersucht (*Axioplan II*, Zeiss, repräsentative Aufnahmen in 63–100facher Vergrößerung, Details nochmals digital vergrößert. Balken 20 bzw. 50 µm).

**Inkubation in NADI-Reagenz.** A) 0 min, Ansicht der adaxialen Epidermis, Balken 50 µm; B) 5 min, Querschnitt, Balken 20 µm; C) 10 min, Ansicht der adaxialen Epidermis, Balken 20 µm; D) 40 min, Querschnitt, Balken 20 µm.

*p* – Plastiden, *tr* – Tracheen, *Pfeil* – Plastiden, *ovaler Rahmen* – terpenpositiv gefärbte Struktur



**Abb. 31: NADI-Färbung in nativen Semidünnschnitten von *Mirabilis jalapa* Blüten des Stadiums 5.**

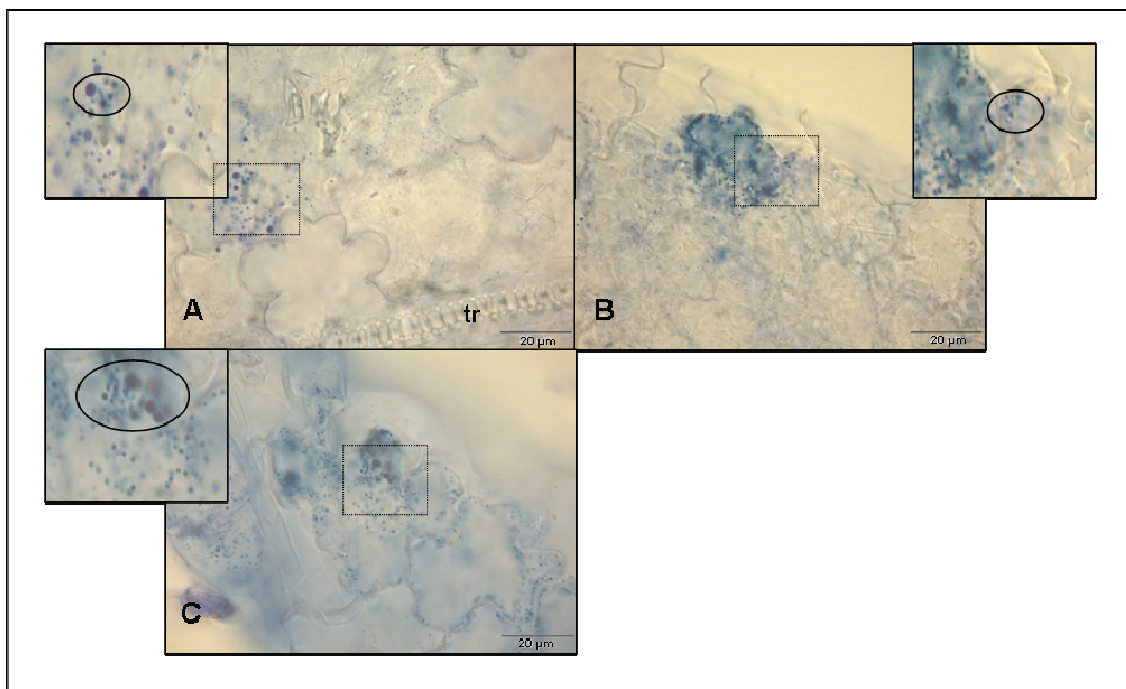
Von in Agarose eingebetteten Blüten (Ernte 18 Uhr) wurden Semidünnschnitte im oberen Bereich der petaloiden Segmente angefertigt, über unterschiedlich lange Zeit in NADI-Reagenz unter Lichtabschluss inkubiert und anschließend mikroskopisch untersucht (*Axioplan II*, Zeiss, repräsentative Aufnahmen in 100facher Vergrößerung, Details digital doppelt vergrößert, Balken 20 µm).

**Ansicht der adaxialen Epidermis nach der Inkubation in NADI-Reagenz.** A) 0 min; B) 5 min; C) 10 min; D) 40 min.

*p*, *Pfeil* – Plastiden, *ovaler Rahmen* – terpenpositive Struktur

farblos erschienen (C). Insgesamt korrelierte die Intensität der Blaufärbung jedoch mit der Inkubationsdauer. Außerdem führte die Inkubation in allen Fällen zur violetten, terpenpositiven Färbung von Partikeln mit einem Durchmesser von  $<1\ \mu\text{m}$  (besonders B und C; ovaler Rahmen in Detailansicht).

In seneszenten Blüten (Stadium 7, Ernte 7.30 Uhr) waren nach der Inkubation mit NADI-Reagenz unabhängig von der Inkubationsdauer kleine blaue Tröpfchen sichtbar, die den Zellen eine blaue Färbung verliehen (Abb. 32). Neben diesen waren violette, terpenpositive Strukturen (ovaler Rahmen in den Detailansichten) erkennbar. Die Größe der beiden gefärbten Zellbestandteile schwankte um  $1\ \mu\text{m}$ . Sie waren vergleichbar mit den in den Untersuchungen der Blütenstadien 3 und 5 aufgetretenen, kleinsten blauen und violetten Kügelchen. Größere violett- oder blaugefärbte Partikel traten vereinzelt in allen Schnitten auf (s. Details).



**Abb. 32: Terpenennachweis in nativen Semidünnschnitten von *Mirabilis jalapa* Blüten des Stadiums 7.**

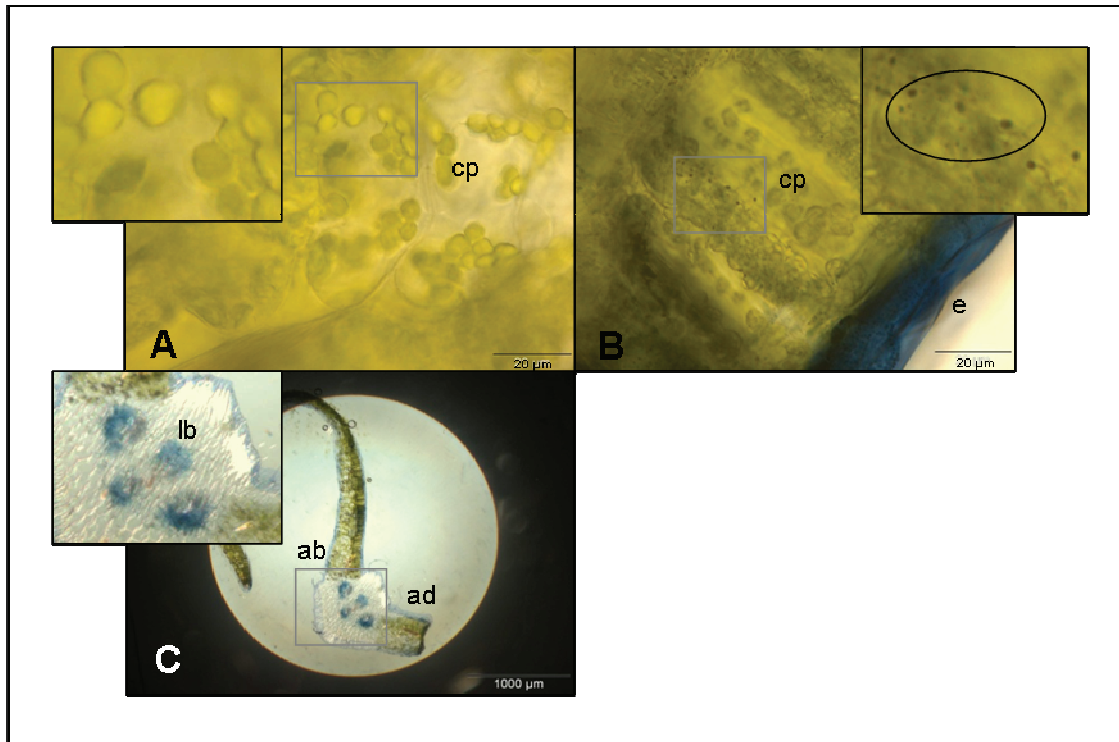
Von in Agarose eingebetteten Blüten (Ernte 7.30 Uhr) wurden Semidünnschnitte im oberen Bereich der petaloiden Segmente angefertigt, über unterschiedlich lange Zeit in NADI-Reagenz unter Lichtabschluss inkubiert und anschließend mikroskopisch untersucht (*Axioplan II*, Zeiss, repräsentative Aufnahmen in 100facher Vergrößerung, Details digital doppelt vergrößert, Balken  $20\ \mu\text{m}$ ).

**Querschnitte nach der Inkubation in NADI-Reagenz.** A) 5 min; B) 10 min; C) 40 min.

*tr* – Tracheen, *ovaler Rahmen* – terpenpositive Struktur

Durch den Einsatz der NADI-Färbung wurden in den Blüten von *Mirabilis jalapa* unabhängig von ihrem Entwicklungsstadium Strukturen mit terpenpositiver Färbung nachgewiesen. Mit den Untersuchungen der vegetativen Gewebe sollte ein ubiquitäres Anfärben von Terpenen in *Mirabilis jalapa* überprüft werden.

In ungefärbten Schnitten der Laubblätter waren keine auffällig gefärbten Regionen oder Strukturen zu erkennen (Abb. 33A). Die Inkubation in NADI-Reagenz erzeugte violett-gefärbte, terpenpositive Partikel von  $<1\ \mu\text{m}$  Größe, die mit zunehmender Inkubationsdauer zahlreicher nachweisbar waren (Abb. 33B, in Detailansicht oval umrahmt). Sie traten nach 10minütiger Inkubation sporadisch und nach 30minütiger Inkubation gehäuft auf.



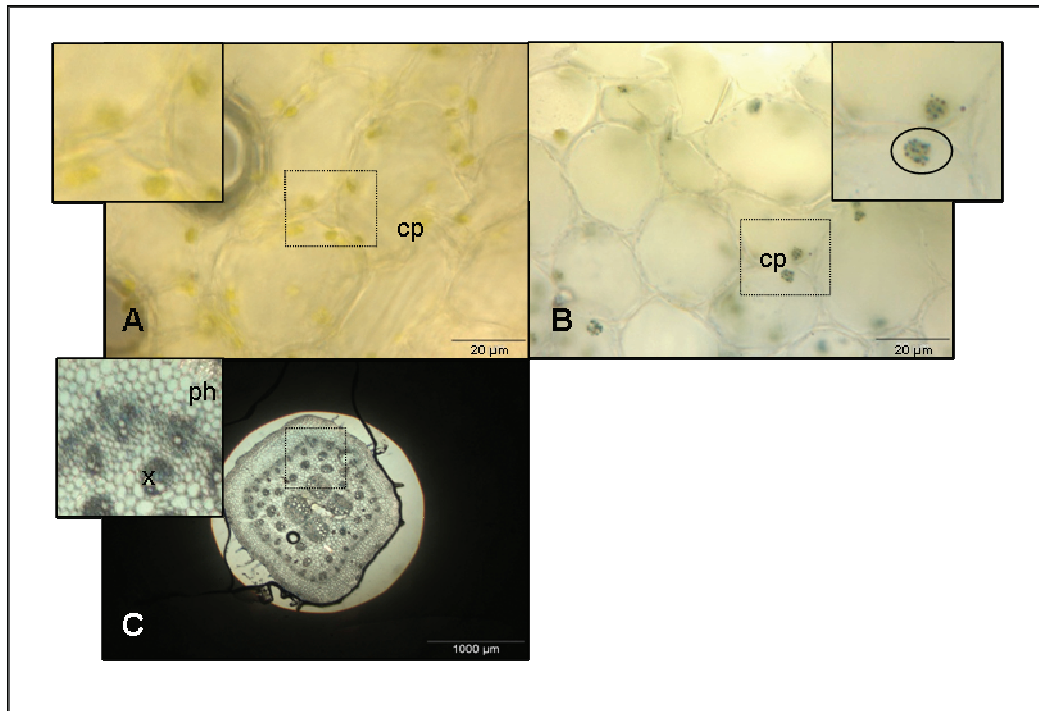
**Abb. 33: NADI-Färbung in nativen Semidünnschnitten von Laubblättern der *Mirabilis jalapa*.** Von in Agarose eingebetteten Blättern (Ernte 16 Uhr) wurden Semidünnschnitte im mittleren Bereich der Blattspreite angefertigt, über unterschiedlich lange Zeit in NADI-Reagenz unter Lichtabschluss inkubiert und anschließend mikroskopisch untersucht (*Axioplan II*, Zeiss, A und B: repräsentative Aufnahmen in 100facher Vergrößerung, Details digital doppelt vergrößert. Balken  $20\ \mu\text{m}$  C: 2,5 fache Vergrößerung, Detail digital doppelt vergrößert. Balken  $1000\ \mu\text{m}$ ). **Querschnitte nach der Inkubation in NADI-Reagenz.** A) 0 min; B) 30 min; C) 20 min. *ab* – abaxiale Epidermis, *cp* – Chloroplasten, *ad* – adaxiale Epidermis, *lb* – Leitbündel, *ovaler Rahmen* – terpenpositive Struktur

Die Partikel gruppierten sich scheinbar um die Chloroplasten, die ihrerseits frei von Veränderungen waren. Die längere Inkubationszeit führte zusätzlich zu einer starken Blaufärbung der gesamten Epidermiszellen (B). Dieser Effekt wurde in der Gesamtansicht der Schnitte sehr deutlich, in der sowohl die adaxiale bzw. abaxiale Epidermis als auch die Leitgewebe blau gefärbt waren (C).

Die Ergebnisse der Untersuchungen des Sprosses (Abb. 34) glichen denen der Laubblätter. In ungefärbten Schnitten waren keine auffällig gefärbten Organellen oder Zellen erkennbar (A). Nach einstündiger Inkubation in NADI-Reagenz waren deutliche Effekte sichtbar (B). Auf der Oberfläche jedes im Sprossmesophyll vorhandenen Chloroplasten befanden sich mehrere violette Kügelchen von  $<1\ \mu\text{m}$  Durchmesser (ovaler Rahmen in der Detailansicht), wohingegen andere keine Verbindung zu Organellen hatten. Ebenfalls



gefärbt wurden die Epidermen und die Leitgewebe im Spross (Abb. 34C). Die Detailansicht zeigt die blau gefärbten Zellen der Leitbündel im Sprosszentrum.



**Abb. 34: NADH-Färbung in nativen Semidünnschnitten von Sprossen der *Mirabilis jalapa*.**

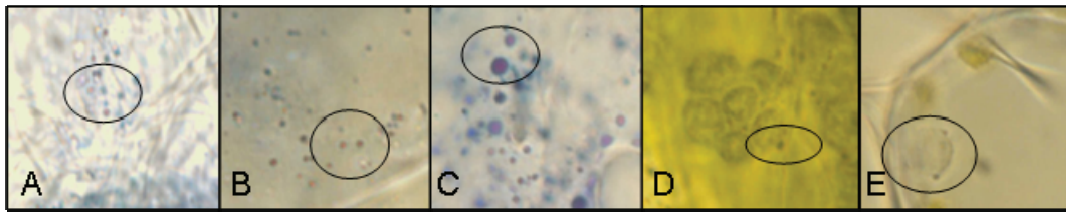
Von in Agarose eingebetteten Sprossen (Ernte 16 Uhr) wurden Semidünnschnitte angefertigt, über unterschiedlich lange Zeit in NADH-Reagenz unter Lichtabschluss inkubiert und anschließend mikroskopisch untersucht (*Axioplan II*, Zeiss, A und B: repräsentative Aufnahmen des Mesophylls in 100facher Vergrößerung, Details digital doppelt vergrößert. Balken 20 µm, C repräsentative Aufnahme in 2,5 facher Vergrößerung, Detail digital doppelt vergrößert. Balken 1000 µm).

**Querschnitte nach der Inkubation in NADH-Reagenz.** A) 0 min, B und C) 60 min.

cp – Chloroplasten, ph – Phloem, x – Xylem, ovaler Rahmen – terpenpositiv gefärbte Struktur

In den Blüten von *Mirabilis jalapa* wurden Kügelchen violett angefärbt, die auf das Vorhandensein von Terpenen hinwiesen. Da diese terpenpositiven Signale unabhängig vom Blütenentwicklungsstadium vorkamen und ebenfalls in Blättern und im Spross zu finden waren, sprachen sie nicht für eine spezifische Terpenakkumulation in den petaloiden Segmenten der Blüte (Abb. 35).

Die Ergebnisse der Untersuchungen zu Post-Synthese-Prozessen des (*E*)- $\beta$ -Ocimens in *Mirabilis jalapa* zeigten, dass der Gehalt des Volatiles in den petaloiden Segmenten mit dessen Emission aus diesen korreliert. Obwohl beide Parameter ein im Vergleich zur Aktivität des Enzyms verzögertes Maximum haben, zeigte die Inkubation in NADH-Reagenz keine Speicherung floralen (*E*)- $\beta$ -Ocimens.



**Abb. 35: Terpenpositive Strukturen nach der Inkubation in NADI-Reagenz in floralen und vegetativen Geweben der *Mirabilis jalapa*.**

Repräsentative Details der Abb. 31–34 (200fache Vergrößerung).

**Querschnitte nach 5minütiger Inkubation in NADI-Reagenz.** A) Blüte, Stadium 3 (Ernte 14.30 Uhr, Trichterstadium, vor VOC-Emission); B) Blüte, Übergang Stadium 4 und 5 (Ernte 18 Uhr, vollständig geöffnete Blüte, VOC-Emission); C) Blüte, Stadium 6 (Ernte 7.30, Seneszenz, keine VOC-Emission); D) Laubblatt; E) Spross.

ovaler Rahmen – terpenpositiv gefärbte Struktur

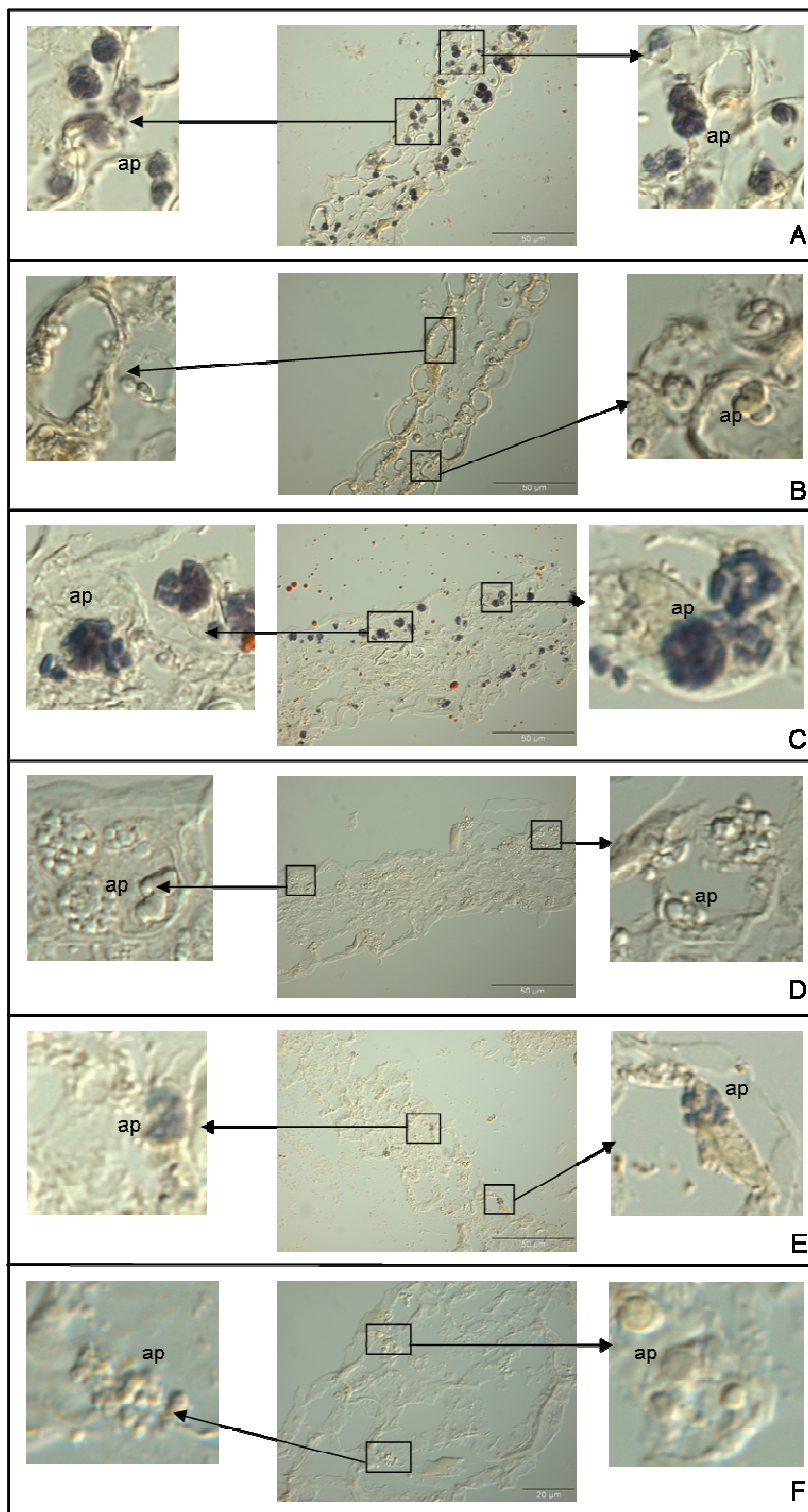
### 3.6.4. Nachweis und Quantifizierung von Stärke in Blütengeweben von *Mirabilis jalapa*

Zur Untersuchung des Zusammenhangs von Speicherstoffen und VOC-Produktion wurden histologische und biochemische Verfahren angewendet. Bei mikroskopischen Untersuchungen von Semidünnschnitten der Blüten waren die opaken Strukturen der Plastiden vor und während der Anthese zu erkennen. Aus unterschiedlichen Studien war bekannt, dass Blütenknospen Stärke enthalten (van Doorn und van Meeteren 2003, Sood *et al.* 2006). Daher könnte es sich bei den in *Mirabilis jalapa* nachgewiesenen Plastiden um Amyloplasten handeln. Die im Folgenden beschriebenen Methoden dienen dem morphologischen Nachweis von Amyloplasten und der Quantifizierung der in den Blüten enthaltenen Stärke während einer Blühperiode.

#### Stärkenachweis durch Lugol'sche Lösung

Mit Lugol'scher Lösung angefärbte Semidünnschnitte wurden mikroskopisch ausgewertet. Dabei galt eine blauviolette Färbung der Plastiden als Indikator für Stärke in den Organellen. Die Untersuchungen zeigten, dass angefärbte Strukturen nur bei in Lugol'scher Lösung inkubierten Schnitten nachweisbar waren (Abb. 36A, C und E). In den ungefärbten Schnitten waren die Plastiden opak (B, D und F). Demzufolge konnte die Vermutung bestätigt werden, dass es sich bei diesen Organellen um Amyloplasten handelt. Außerdem war in allen Schnitten deutlich sichtbar, dass diese speziellen Plastiden meist mit mehreren kleineren globulären Gebilden, den Stärkekörnern, gefüllt waren.

Die Abbildung beinhaltet Schnitte einer vollständigen Blüh- und (E)- $\beta$ -Ocimenemissionsperiode. In den Proben der geschlossenen Knospe (Stadium 1) lagen die Stärkekörner in den großen runden Amyloplasten kompakt zusammen (A und B). Im Gewebe der beendeten Anthese (Stadium 5) waren die Amyloplasten ebenfalls vorhanden (C und D), d.h. die einzelnen Stärkekörner formten allerdings keine kompakte Einheit mehr. Dieser Trend setzte sich in den seneszenten Blüten (Stadium 7) fort, in



**Abb. 36: Stärkenachweis in fixierten Semidünnschnitten der petaloiden Segmente der *Mirabilis jalapa*.**

Von den in Polyethylenglycol eingebetteten Segmenten (unterschiedliche Erntezeitpunkte) wurden Semidünnschnitte angefertigt, für 10 min in 2,5%iger Lugol'scher Lösung bzw. Phosphatpuffer inkubiert und anschließend mikroskopisch untersucht (*Axioplan II*, Zeiss, repräsentative Aufnahmen in 63facher Vergrößerung, Details digital doppelt vergrößert. Balken 50 µm).

**Querschnitte A, C, E: Inkubation in Lugol'scher Lösung.** A) Ernte 12 Uhr, Stadium 1; C) Ernte 18 Uhr, Stadium 4; E) Ernte 8 Uhr, Stadium 7.

**Querschnitte B, D, F: Inkubation in Phosphatpuffer.** B) Ernte 12 Uhr, Stadium 1; D) Ernte 18 Uhr, Stadium 4; F) Ernte 8 Uhr, Stadium 7; Balken 20 µm.

ap – Amyloplasten

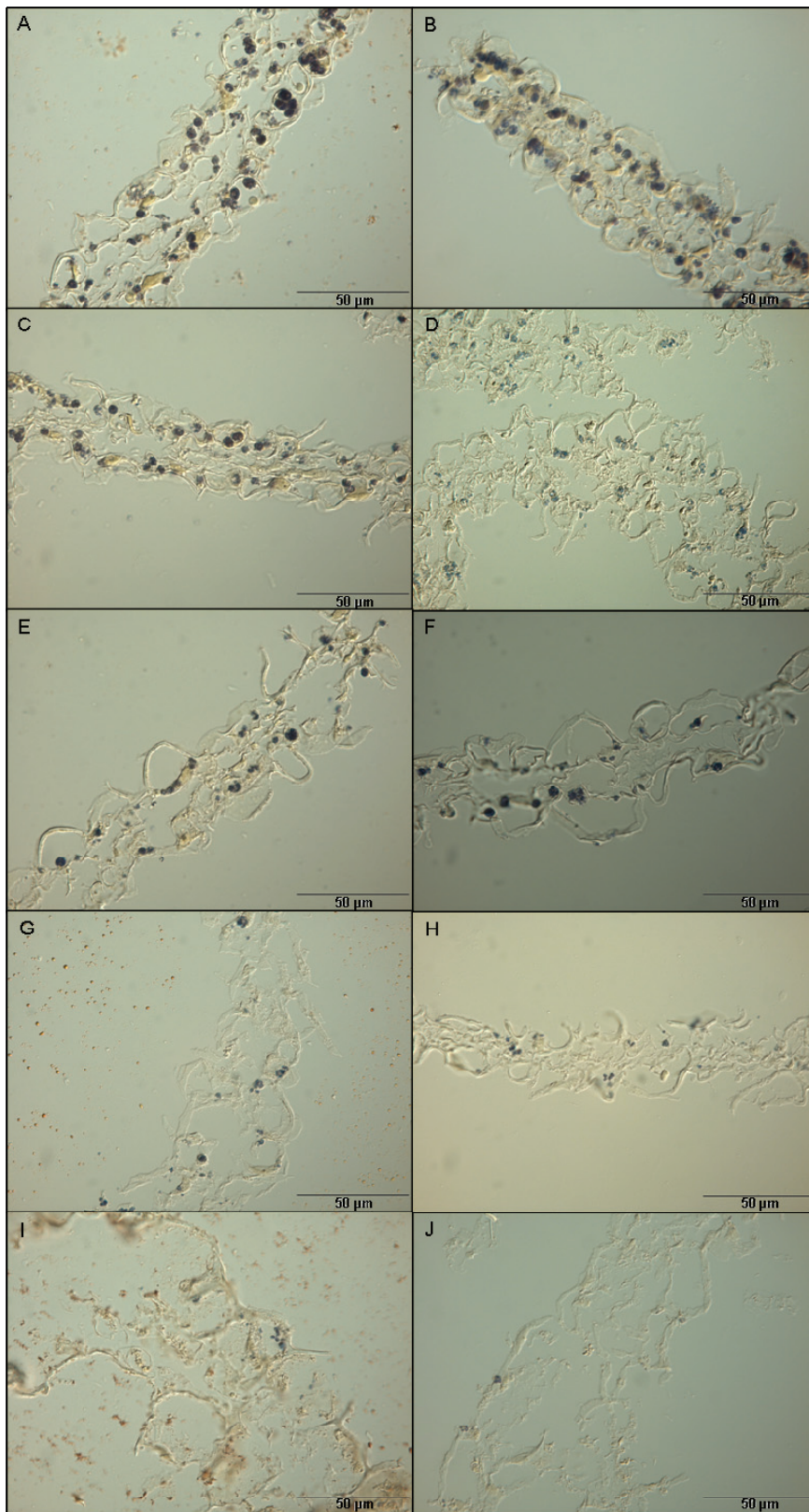
denen selten mehrere Stärkekörner zusammen liegend sichtbar waren (E und F). In der Mehrheit bestanden diese Amyloplasten nur noch aus einzelnen kleinen Stärkekörnern. Offensichtlich wurde die Stärke im Verlauf der Anthese und Blüte metabolisiert.

### **Quantifizierung des Stärkegehaltes im Tagesgang**

Die Abnahme des Stärkegehaltes der petaloiden Segmente ließ sich in unterschiedliche Abschnitte einteilen (Abb. 37). Der erste Abschnitt umfasste den Zeitraum vor und der einsetzenden Anthese (Stadium 1–2, A und B), in dem eine hohe Anzahl von dichten und großen Amyloplasten nachweisbar und das Blütengewebe kompakt aufgebaut war. Die maximale Amyloplastenzahl wurde dabei im Stadium 1 (A) erreicht, in dem sie sich in den Epidermis- und Mesophyllzellen befanden. Ab dem Stadium 2 (B) wurde eine Konzentration der Amyloplasten in beiden Epidermen erkennbar. Im zweiten Abschnitt schritt die Anthese fort (Stadien 3 und 4, C und D), was in den mikroskopischen Aufnahmen durch eine geringere Anzahl der Amyloplasten und größere Lücken im Mesophyll gekennzeichnet war. Die maximale Blütenöffnung (Stadium 5, E und F) kennzeichnete den dritten Abschnitt. In diesem Zeitraum waren weniger Amyloplasten nachweisbar, deren Anzahl und Größe darüber hinaus mit fortschreitender Blühperiode abnahm. Außerdem war das Mesophyll in diesen Schnitten nahezu aufgelöst. Der letzte Abschnitt markierte das Ende der (*E*)- $\beta$ -Ocimenemission und die Seneszenz der Blüte (Stadien 6 und 7, G–J). Dieser Zeitraum war durch das vereinzelte Auftreten kleiner Amyloplasten gekennzeichnet. Das untersuchte Gewebe war durch die aufgeblähten Epidermiszellen sehr instabil.

Die quantitative Auswertung aller Aufnahmen zeigte (Abb. 38, schwarzer Graph), dass der Stärkegehalt im ersten Abschnitt (Stadien 1–3; 12–15 Uhr) mit rund 8% am höchsten war, d.h. in diesem Zeitraum nahmen die Stärkekörner 8% der untersuchten Schnittfläche ein. Der Stärkegehalt war in dieser Phase signifikant höher als in den folgenden Abschnitten der Anthese und (*E*)- $\beta$ -Ocimenemission (ab Stadium 3, 16 Uhr). Diese waren von einem kontinuierlichen Absinken des Stärkegehaltes von 6 auf 0,5% charakterisiert.



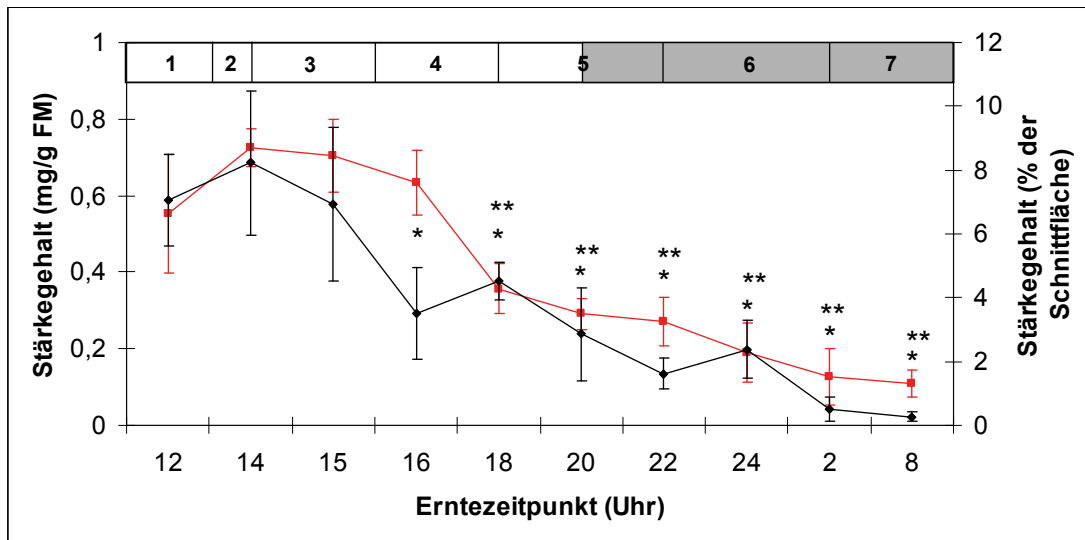


**Abb. 37: Stärkenachweis in fixierten Semidünnschnitten der petaloiden Segmente der *Mirabilis jalapa* im Verlauf Blühperiode.**

Von in Polyethylenglycol eingebetteten petaloiden Segmenten (unterschiedliche Erntezeitpunkte) wurden Semidünnschnitte angefertigt, für 10 min in 2,5%iger Lugol'scher Lösung inkubiert und anschließend mikroskopisch untersucht (*Axioplan II*, Zeiss, repräsentative Aufnahmen in 63facher Vergrößerung, Details nochmals doppelt vergrößert. Balken 50 µm).

**Erntezeitpunkte** A) 12 Uhr; B) 14 Uhr; C) 15 Uhr; D) 16 Uhr; E) 18 Uhr; F) 20 Uhr; G) 22 Uhr; H) 24 Uhr; I) 2 Uhr; J) 8 Uhr.

Mit einer weiteren Methode wurde der Stärkegehalt der petaloiden Segmente durch die Extraktion und photometrische Messung der Stärke bestimmt (Abb. 38, roter Graph). Der Stärkegehalt des Gewebes ließ sich in zwei Phasen einteilen, von denen die erste die geschlossene bis röhrenförmig geöffnete Blüte (Stadien 1–3; 12–16 Uhr) repräsentierte. In diesem Zeitraum lag der nachweisbare Stärkegehalt zwischen 0,5–0,7 mg/g FM. Während der vollständigen Anthese (Stadium 4; 16–18 Uhr) sank der Stärkegehalt der petaloiden Segmente signifikant. Dieser Abschnitt markierte den Übergang in die zweite Phase, die die Stadien 5–7 umfasste. Darin sank der Stärkegehalt stetig auf 0,1 mg/g FM.



**Abb. 38: Stärkegehalt der Blüten im Verlauf der Blühperiode.**

**Schwarz: Mikroskopische Bestimmung.** Von in Polyethylenglycol eingebetteten petaloiden Segmenten (unterschiedliche Erntezeitpunkte) wurden Semidünnschnitte in der oberen Region der petaloiden Segmente angefertigt und nach Inkubation in 2,5%iger Lugol'scher Lösung (10 min) mikroskopisch untersucht (*Axioplan II*, Zeiss, 60-100fache Vergrößerung). Mittels der Software *DatInf® Measure* wurde der prozentuale Anteil der Fläche der Amyloplasten an der Querschnittsfläche berechnet.  $n=2$  mit je 20–40 MW+SD). (\* signifikant nach Welch-Test;  $\alpha=0,001$  Bezugsgröße: 14 Uhr).

**Rot: Bestimmung durch Extraktion.** Pro Erntezeitpunkt wurde die in den petaloiden Segmenten von 3 Blüten enthaltene Stärke mittels Ethanol-DMSO/HCl extrahiert. Aliquots der Extrakte wurden im Verhältnis 1:1 mit Lugol'scher Lösung vermischt und die Absorption bei 600 nm bestimmt.  $n=2$  mit 8 MW+SD. (\*\* signifikant nach Welch-Test;  $\alpha=0,001$  bezogen auf den Maximalwert bei 14 Uhr:  $0,7 \pm 0,05$  mg/g FM),

1 – lange Knospe, 2 – entspiralisierte Knospe, 3 – röhrenförmig geöffnete Blüte, 4 – trichterförmig geöffnete Blüte, 5 – vollständig geöffnete Blüte, tellerförmig, 6 – Stigmafall, 7 – Seneszenz, gefaltete Blüte, *grau hinterlegt* – Dunkelphase

Durch das Anfärben der Schnitte sowie die Extraktion der Stärke konnte gezeigt werden, dass dieser Speicherstoff in den petaloiden Segmenten von *Mirabilis jalapa* eingelagert wurde. Innerhalb der Blühperiode waren zwei Phasen des Stärkegehaltes charakteristisch, die sich jedoch in Abhängigkeit von der Quantifizierungsmethode unterschieden. Die mikroskopische Bestimmung zeigte, dass der Gehalt in Knospen bzw. Blüten mit geringem Öffnungsgrad signifikant höher (Phase 1) als der in den vollständig geöffneten Blüten

(Phase 2) war. Die Ergebnisse der Extraktion zeigten abweichend davon, dass dieser Phasenwechsel im Stärkegehalt erst in den vollständig geöffneten Blüten auftrat.

## 4. Diskussion

### 4.1. Die (*E*)- $\beta$ -Ocimensynthase aus *Mirabilis jalapa* hat typische biochemische Eigenschaften einer Monoterpensynthase.

Durch die Untersuchungen zur *in vitro*- bzw. *in vivo*-Charakterisierung der (*E*)- $\beta$ -OS wurde die Grundlage für die geplante Aufreinigung geschaffen. Die Enzymaktivität konnte in den petaloiden Segmenten vom Knospenstadium bis zur beginnenden Seneszenz in einer für den Enzymtest hinreichend hohen Konzentration nachgewiesen werden. Dies könnte einerseits für eine hohe Stabilität des Proteins, beispielsweise durch eine niedrige Turnover-Rate, oder andererseits für eine stetige Expression der (*E*)- $\beta$ -OS sprechen. Insbesondere im ersten Fall lässt sich davon eine positive Eigenschaft für die biochemische Isolation vermuten.

Die biochemischen Eigenschaften der bislang charakterisierten Monoterpensynthasen sind weitgehend übereinstimmend. Jedoch wurde die Mehrzahl der Charakterisierungen an gereinigten bzw. überexprimierten Enzymen vorgenommen, so dass die in dieser Arbeit gezogenen Vergleiche vor diesem Hintergrund zu betrachten sind.

Die Mehrheit der Monoterpensynthasen wurde in 10–100 mM MOPS-, TRIS- bzw. HEPES-Puffern (pH 6–8) getestet. Der für die (*E*)- $\beta$ -OS aus *Mirabilis jalapa* eingesetzte 0,1 M Croteaupuffer (pH 6,9) wurde nur im Zusammenhang mit den Myrcen- und Ocimensynthasen häufiger genutzt und zeichnet sich durch eine spezifische Kombination stabilisierender bzw. antioxydativ wirkender Substanzen aus. In nahezu allen Assaypuffern werden Glycerol (10%) zur Erhöhung der Temperaturstabilität (Croteau *et al.* 1994) und das Reduktionsmittel DTT (1–5 mM) als Oxydationsschutz, das z.B. essentiell für die Enzymstabilität der Linaloolsynthase aus *Clarkia breweri* ist (LIS, Pichersky *et al.* 1995), eingesetzt. Daraus lässt sich eine Beeinflussung der Monoterpensynthase durch Redox-Prozesse vermuten. Darüber hinaus enthält der Croteaupuffer die Antioxydantien Ascorbinsäure und Natriummetabisulfit. Als weitere Vorteile dieses Puffers sind seine vielseitigen Nutzungsmöglichkeiten sowohl als Extraktions- als auch Assaypuffer sowie mobile Phase bei Chromatographien zu nennen.

Die (*E*)- $\beta$ -OS aus *Mirabilis jalapa* benötigte wie das Gros der charakterisierten Enzyme zwischen 50 und 70  $\mu$ M GPP für ihre optimale Aktivität. Für die Funktion aller pflanzlichen Monoterpensynthasen sind darüber hinaus divalente Metallionen essentiell. Chelatisierungsexperimente belegten die reversible Inhibition dieser Enzyme in Rohextrakten oder Puffern ohne  $Mg^{2+}$ -Ionen (Chen *et al.* 2004, Jia *et al.* 1999, Wise *et al.* 2002). Sowohl der Konzentrationsbereich als auch das Optimum, in dem  $MgCl_2$  die spezifische Aktivität der (*E*)- $\beta$ -OS aus *Mirabilis jalapa* unterstützte, war wesentlich breiter als in den bekannten Monoterpensynthasen aus Angiospermen (15–55 mM vs. 10–20 mM). Außer der möglicherweise stabilisierenden Wirkung im Assay ist die biologische Relevanz dieses Phäno-

mens derzeit unklar, da die Vergleichswerte zu intrazellulären  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionenkonzentration in Chloroplasten deutlich geringer sind (3–5 mM). Für stromagebundene Chloroplastenproteine wurde eine Toleranz gegenüber  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen beschrieben, die im Zusammenhang mit der lichtabhängigen Steigerung des pH-Wertes und der  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionenkonzentration im Stroma gesehen wird (Taiz und Zeiger, 2008). Da sich florale Plastiden von den im Knospenstadium in der Blüte vorhandenen Chloroplasten ableiten, ist ein erhöhtes  $\text{Mg}^{2+}$ -Optimum der plastidär vorkommenden Monoterpensynthasen zu erwarten.

Neben den  $\text{Mg}^{2+}$ - waren  $\text{Mn}^{2+}$ -Ionen häufig genutzte Cofaktoren von Monoterpensynthasen, die üblicherweise in Konzentrationen zwischen 1–10 mM entweder einzeln oder in Kombination mit  $\text{MgCl}_2$  eingesetzt wurden. Für die (*E*)- $\beta$ -OS aus *Mirabilis jalapa* konnte der Einfluss des  $\text{MnCl}_2$  nur in Kombination mit dem zur Extraktion genutzten und 5 mM  $\text{MgCl}_2$  enthaltenen Croteaupuffer untersucht werden. Die Enzymaktivität nahm bereits bei vergleichsweise geringen  $\text{MnCl}_2$ -Konzentrationen ab. Eine durch die verschiedenen Cofaktoren hervorgerufene Veränderung des Produktspektrums wie bei der Pinensynthese aus *Salvia officinalis* oder der Myrcensynthese aus *Picea abies* wurde nicht beobachtet (Gambliel und Croteau 1982, Fischbach *et al.* 2000).

Die für Myrcen- bzw. Ocimensynthese-Assays typische Inkubationstemperatur lag mit 30–40 °C im Rahmen der für Monoterpensyntheseassays angegebenen Werte. Für die Aktivitätstests der (*E*)- $\beta$ -OS aus *Mirabilis jalapa* wurde jedoch aus rein praktischen Erwägungen mit 30°C eine leicht suboptimale Inkubationstemperatur genutzt. Der Vergleich mit Literaturwerten war aufgrund oft fehlender Charakterisierung hinsichtlich des Temperaturoptimums schwer. Die (*E*)- $\beta$ -OS war bei niedrigen (4°C) bzw. hohen (60 °C, Einzelversuch, nicht gezeigt) Temperaturen aktiv. Die Stabilität gegenüber hohen Temperaturen war vor dem Hintergrund der in den Assays genutzten Inkubationstemperatur nicht überraschend. Allerdings wurde die Aktivität bei vergleichbaren Temperaturen bisher nur für die bis 50 bzw. 55°C aktive LIS aus *Nicotiana glauca* bzw. Myrcensynthese aus *Quercus ilex* beschrieben (Ganz 2005, Fischbach *et al.* 2001). Monoterpensynthasen, die bei einer Inkubationstemperatur von 4°C Monoterpene synthetisieren, sind bislang unbekannt. Während die biologische Funktion der Aktivität bei hohen Temperaturen hinsichtlich der natürlichen Verbreitungsgebiete der Pflanzen plausibel erscheint, bleibt sie für die niedrigen Temperaturen unklar.

Aussagen über die Stabilität von Monoterpensynthasen gegenüber verschiedenen Lagerungsbedingungen wurden bislang selten getroffen. Die (*E*)- $\beta$ -OS war daher neben der aus dem Rohextrakt isolierten Geraniolsynthese (GES) aus *Ocimum basilicum*, die einzige Monoterpensynthese, deren spezifische Aktivität nach dem Einfrieren und Auftauen erhalten blieb (Iijima *et al.* 2004). Zu den Enzymen mit hoher Temperaturstabilität gehören weiterhin die aus dem Rohextrakt angereinigte Limonensynthese aus *Mentha x piperita*

(Rajaonarivony *et al.* 1992), deren Aktivität nach einwöchiger Lagerung bei 4°C im Assay-puffer vollständig blieb. Die Aktivität der überexprimierten 1,8-Cineolsynthase (CIN, Roeder *et al.* 2007) aus *Nicotiana suaveolens* blieb nach deren vier- bzw. zweistündiger Lagerung auf Eis bzw. bei Raumtemperatur zu 80% erhalten.

Monoterpensynthasen werden abhängig von ihrem Produktspektrum in *single*- oder *multi product*-Enzyme eingeteilt, wobei die Übergänge zwischen beiden Kategorien fließend sind. Enzyme, deren Hauptprodukt 90% ihres Spektrums ausmachen, wurden wiederholt als *single product*-Enzyme beschrieben (u.a. Dudareva 2003). Nach dieser Bewertung gehört jeweils die Hälfte aller Monoterpensynthasen zu einer Kategorie. Während das Produktspektrum von Myrcensynthasen oft mehrere Monoterpene in hohen Anteilen umfasst (Bohlmann *et al.* 2000, Fischbach *et al.* 2000, Hosoi *et al.* 2004), zeigte die (*E*)- $\beta$ -OS aus *Mirabilis jalapa* das für die bislang isolierten (*E*)- $\beta$ -Ocimensynthasen typische *single product*-Profil (Fäldt *et al.* 2003, Dudareva *et al.* 2003, Arimura *et al.* 2004 und 2008, Shimada *et al.* 2005, Navia-Giné *et al.* 2009a). Das im Emissionsspektrum der Blüten in Spuren nachgewiesene Myrcen wurde in den Assays mit Rohextrakten selten detektiert und fehlte in den angereinigten Fraktionen vollständig. Dies könnte ein Indiz für eine spezifische Myrcensynthase im Rohextrakt sein, die bei der Anreinigung abgetrennt wurde. Da Ocimen- und Myrcensynthasen aus einem Organismus aufgrund ihrer hohen Sequenz-ähnlichkeit gleichartige Proteineigenschaften haben sollten, war die Abtrennung eines Enzyms während der Aufreinigung allerdings unwahrscheinlich. Die geringen Myrcen-mengen im Emissionsspektrum wiesen auf eine andere Erklärung hin. Da die stereochemischen Bedingungen bei der Synthese des Ocimens und seines Isomeres Myrcen gleich sind, könnte das Myrcen als Nebenprodukt der (*E*)- $\beta$ -OS gelten, das nur unter den im Rohextrakt bzw. *in vivo* herrschenden Bedingungen synthetisiert wurde (Croteau und Satterwhite, 1989).

Die mit der Größenausschluss-Chromatographie ermittelte Molekularmasse der (*E*)- $\beta$ -OS sollte als Richtwert betrachtet werden, da die Säule nur einmalig kalibriert werden konnte. In Verbindung mit den Ergebnissen der SDS-PAGE, in denen eine distinkte Bande in allen Fraktionen mit hoch angereicherter (*E*)- $\beta$ -OS bei rund 75 kDa nachweisbar war, entsprach ihre Größe der bislang beschriebenen Monoterpensynthasen von 50–75 kDa. Der nicht abschließend geführte Nachweis der (*E*)- $\beta$ -OS in den Banden der SDS-PAGE schloss eine konkretere Größenbestimmung aus. Das für die  $\gamma$ -Terpinensynthase aus *Thymus vulgaris*, die GES aus *Ocimum basilicum* oder die Bornyldiphosphatsynthase aus *Salvia officinalis* beschriebene Auftreten von Dimeren wurde durch die Ergebnisse der GA und SDS-PAGE für das Zielenzym aus *Mirabilis jalapa* ausgeschlossen (Alonso *et al.* 1991, Iijima *et al.* 2004, Wise *et al.* 1998).

Unter Berücksichtigung aller Ergebnisse zeigte die (*E*)- $\beta$ -OS aus *Mirabilis jalapa* im Rohextrakt die charakteristischen biochemischen Merkmale der Monoterpensynthasen.

Herausragend waren ihre Aktivität über einen breiten Temperaturbereich, ihre Stabilität gegenüber mehreren Einfrier-Auftau-Zyklen sowie das höhere  $\text{MgCl}_2$ -Optimum.

#### **4.2. Aus dem Rohextrakt von *Mirabilis jalapa* konnte eine Monoterpensynthase angereinigt und mittels Massenspektrometrie analysiert werden.**

Vorangegangene molekularbiologische Untersuchungen führten nicht zur Isolation der (*E*)- $\beta$ -OS aus *Mirabilis jalapa* (Große 2002). Außerdem wurden bislang keine Monoterpensynthasen aus mit *Mirabilis jalapa* eng verwandten Pflanzen, z.B. den *Caryophyllaceae*, isoliert bzw. publiziert. Dies wäre jedoch die Voraussetzung für die Anwendung homologiebasierter Techniken der Genisolation. Daher wurde der klassische Weg über die Reinigung des Proteins und die Bestimmung seiner Aminosäuresequenz zur Isolation der DNA-Sequenz gewählt, obwohl mit zunehmender Verbesserung der molekularbiologischen Techniken in den letzten Jahren weniger Monoterpensynthasen auf diesem Wege direkt aus Geweben isoliert wurden. Insbesondere blütenspezifische Enzyme waren in diesem Zusammenhang unterrepräsentiert. Die (*E*)- $\beta$ -OS aus *Mirabilis jalapa* ist neben der LIS aus *Clarkia breweri* (Pichersky *et al.* 1995) und der Nerolidol/Linaloolsynthase aus *A. majus* (Nagegowda *et al.* 2008) eines von bislang auf diese Art isolierten drei blütenspezifischen Enzymen.

Enzym	Spezies	Spezifische Aktivität	Autor
( <i>E</i> )- $\beta$ -Ocimensynthase	<i>Mirabilis jalapa</i>	20 fkat/mg	Große 2010
Limonensynthase	<i>Mentha x piperita</i>	8 $\mu$ kat/mg	Alonso <i>et al.</i> 1992
Geraniolsynthase	<i>Ocimum basilicum</i>	160 pkat/mg	Iijima <i>et al.</i> 2004
Linaloolsynthase	<i>Clarkia breweri</i>	15 pkat/mg	Pichersky <i>et al.</i> 1995

**Tab. 13: Spezifische Aktivität ausgewählter Monoterpensynthasen im Rohextrakt**

Die Tab. 13 zeigt die im Vergleich mit den wenigen verfügbaren Literaturwerten geringe spezifische Aktivität der (*E*)- $\beta$ -OS im Rohextrakt (ca. 20 fkat/mg).

Die in den einzelnen Chargen des Rohextraktes nachgewiesene spezifische Aktivität der (*E*)- $\beta$ -OS unterlag teilweise deutlichen Schwankungen. Dies ist einerseits durch die Verwendung von biologischem Material und den damit verbundenen Unterschieden im Enzymgehalt erklärbar, die offensichtlich nicht durch das Einbeziehen mehrerer Individuen in die Probennahme ausgeglichen werden konnten. Andererseits können minimale Abweichungen im Extraktionsprotokoll zur unterschiedlichen Enzymaktivität im Rohextrakt führen, indem z.B. für die Stabilität des Enzyms kritische Proteinkonzentrationen über- oder unterschritten wurden.

Einige charakteristische Eigenschaften der (*E*)- $\beta$ -OS erforderten die Anpassung der klassischen Abfolge der Reinigungsschritte. Die häufig an erster Stelle stehende Fällung mit Ammoniumsulfat zur Konzentration des Zielproteins konnte nicht angewandt werden, da das Enzym dabei irreversibel deaktiviert wurde. Ein derartig negativer Effekt des Salzes auf Monoterpensynthasen wurde bislang nicht publiziert, es wurde im Gegenteil zur Aufreinigung einiger Enzyme eingesetzt (Croteau und Karp 1977, Alonso und Croteau 1991, Alonso *et al.* 1992, Croteau *et al.* 1994). Die alternative Fällung mit PEG 5000 führte zu einer nur ungenügenden Anreicherung (Einzelversuch, Daten nicht gezeigt).

Der klassischen Aufreinigung folgend, würden dann im zweiten Schritt Chromatographien an Ionenaustauschern durchgeführt. Dabei werden die hohen Bindungskapazitäten der Matrices und die selektive Elution von unterschiedlich geladenen Proteinen über Änderungen der Ionenstärke und/oder des pH-Wertes verbunden. Die Verwendung unterschiedlicher Matrices wurde durch die einzusetzenden Puffer stark eingeschränkt. Wie im Hinblick auf die pH-Optima der Monoterpensynthasen zu erwarten war, wurde die (*E*)- $\beta$ -OS unter den Bedingungen des Kationenaustauschers (pH 5,5) irreversibel inaktiviert. Die Anionenaustauschchromatographie konnte ebenfalls nicht zur Anreinigung genutzt werden, obwohl das Enzym an die Matrix gebunden und eluiert werden konnte. Es kam jedoch zu keiner Anreicherung in der entsprechenden Fraktion. Dieses Phänomen könnte einerseits mit einer unvollständigen Elution des Zielproteins oder, aufgrund der hohen Proteinkonzentration der betreffenden Fraktion wahrscheinlicher, der Coelution desselben mit einer hohen Zahl von Fremdproteinen erklärt werden. Die für die Bindung der (*E*)- $\beta$ -OS an die Matrix notwendige geringere Ionenstärke des TRIS-Puffers hatte darüber hinaus einen negativen Einfluss auf die Stabilität des Enzyms (Daten nicht gezeigt). Andererseits könnte der konformationsstabilisierende Einfluss des DTTs durch die Chromatographie verloren gegangen sein, was trotz der nachfolgenden Umpufferung in Croteaupuffer zu einer irreversiblen Inaktivierung und damit zu einem fehlenden Nachweis im Assay geführt haben könnte. Ebenso denkbar wäre die Abtrennung bisher unbekannter stabilisierend wirkender Moleküle.

Die Proteinaufreinigung würde anschließend durch die Größenausschluss-Chromatographie (GA) im dritten Schritt beendet. Dabei liegen die durch die ersten Schritte stark vorgereinigten Proteinfractionen in kleinen Volumina vor und die Molekularmassen der unterschiedlichen Proteine unterscheiden sich im Idealfall stark. Für diese Methode konnten bei der Trennung von Rohextrakt recht hohe Anreicherungen (6–8fach) der (*E*)- $\beta$ -OS aus *Mirabilis jalapa* erzielt werden.

Zu den seltener genutzten Trennungsmethoden (s. Tab. 14) zählt die Chromatographie an Hydroxyapatit (HA), die sich bei der Aufreinigung einiger Monoterpensynthasen entweder als gute oder ungeeignete Methode erwiesen hatte (Croteau und Karp 1977, Alonso und Croteau 1991, Pichersky *et al.* 1995, Crowell *et al.* 2002). Trotz der problematischen



Handhabung der instabilen Matrix und des in hohen Ionenstärken kristallbildenden Laufpuffers konnten durch diese Trennungsmethode hohe Anreicherungen der (*E*)- $\beta$ -OS erzielt werden. Allerdings wurde das Enzym nicht in einer, sondern in mehreren Stufen des Gradienten eluiert. Der extrem geringe Proteingehalt der Fraktionen mit höchster (*E*)- $\beta$ -OS-Aktivität lässt vermuten, dass das Zielprotein bereits hoch aufgereinigt vorlag. Dies konnte aufgrund der Verwendung des gesamten Proteins für den notwendigen Enzymtest nicht im SDS-Gel überprüft werden. Ein „Up-Scaling“ der Auftrennung von Rohextrakt an HA war wegen der begrenzten Bindekapazität der Matrix und der daraus resultierenden notwendigen Volumenvergrößerung, die zu einer Verschlechterung der Laufeigenschaften führte, nicht möglich. Außerdem war die Matrix nach einem Chromatographielauf unbrauchbar, so dass die stets neu herzustellenden Säulen jeweils individuelle Trennungsergebnisse lieferten. Aus diesen Gründen war eine Kombination der hochaufgereinigten Fraktionen mehrerer Trennungen für anschließende Analyseschritte nicht aussichtsreich.

Weitere, bei der Aufreinigung von Monoterpensynthasen Erfolg versprechende, Chromatographiemethoden wie z.B. die HIC (*hydrophobic interaction chromatography*) isoelektrische Fokussierung oder die *dye ligand chromatography* konnten aufgrund der negativen Einflüsse von Ammoniumsulfat, geringen Ionenstärken u.ä. die Stabilität des Enzyms nicht sicherstellen.

Eine weit verbreitete Anreinigungsstrategie von Monoterpensynthasen ist die Ionenaustauschchromatographie, GA und HIC bzw. HA in unterschiedlichen Kombinationen (Tab. 14). Die für (*E*)- $\beta$ -OS genutzte alternative Strategie von mehreren GA und der anschließenden HA-Chromatographie, gefolgt von der Auftrennung im SDS-Gel, resultierte zunächst aus der guten Anreicherung ohne Pufferwechsel durch die GA im ersten Schritt. Da in den einzelnen Fraktionen eines Laufes erhebliche Unterschiede im Anreicherungsgrad bestanden, sollten sie anschließend getrennt weiterbehandelt werden. Dies war wegen der geringen Proteingehalte der Fraktionen nicht möglich. Daher wurden mehrere Aliquots des Rohextraktes durch GA getrennt, die Fraktionen mit dem relativen höchsten bzw. zweithöchsten Anreicherungsgrad der (*E*)- $\beta$ -OS gepoolt und anschließend mit der HA-Chromatographie weiter aufgetrennt. Die Untersuchungen zeigten, dass sich die spezifische Aktivität beider Pools nach der GA nicht stark voneinander unterschied. Begründet war dies in der teilweise erheblich verschiedenen Anreicherung der einzelnen Fraktionen in den verschiedenen GA-Läufen (Pilotversuch: Pool 1 Vereinigung von Fraktionen mit vier- bis sechsfacher Anreicherung; Pool 2 Vereinigung von Fraktionen mit zwei- bis fünffacher Anreicherung). Das unterschiedliche Elutionsverhalten der beiden Pools an der HA-Matrix zeigte aber deren unterschiedliche Proteinzusammensetzung und rechtfertigte letztlich die gewählte Vorgehensweise. Alternativ wäre die Vereinigung der

GA-Fractionen nach ihrem absoluten Anreicherungsgrad denkbar gewesen. Die zu erwartende Anreicherungssteigerung hätte allerdings in keinem vertretbaren Verhältnis zum Arbeitsaufwand durch die notwendige Vielzahl von GA-Läufen gestanden. Gegen die Chromatographie an HA als erstem Schritt sprach das dafür nötige „Up-Scaling“ der Trennung sowie die zeitaufwändige Umpufferung der Proben vor und nach der Auftrennung. Somit konnte diese Trennung nur für die bereits vorgereinigten GA-Fractionen verwendet werden.

Enzym	Spezies	Gewebe	Reinigungsschritte	Anreicherung	Autor
(E)- $\beta$ -Ocimen-synthase	<i>Mirabilis jalapa</i>	Petaloide Segmente	GA-HA	190-400 fach	Große 2010
Geraniol-synthase	<i>Ocimum basilicum</i>	Drüsenzellen der Trichome	AT A, AT B, GA	38fach	Iijima <i>et al.</i> 2004
$\gamma$ -Terpinen-synthase	<i>Thymus vulgaris</i>	Blatt	DL, IF, AT B, HIC, GA	500fach	Alonso und Croteau 1991
Limonen-synthase	<i>Mentha x piperita</i>	Trichomzell-Cluster	DL, AT B, HIC	400fach	Alonso <i>et al.</i> 1992

**Tab. 14: Beispiele für die biochemische Aufreinigung von Monoterpensynthasen.**

AT A – Anionenaustauscher Whatman DE-53, AT B – Anionenaustauscher MonoQ, GA – Größenausschluss-Chromatographie, DL – dye ligand chromatography, IF – isoelektrische Fokussierung, HIC – hydrophobic interaction chromatography

Die abschließende Elektrophorese der HA-Fractionen zeigte einerseits deren geringen Proteingehalt, der die für die nachfolgende Sequenzierung optimal geeignete 2D-SDS-PAGE unmöglich machte und für eine deutliche Reinigungswirkung der Chromatographie spricht. Andererseits konnte die (E)- $\beta$ -OS nach eindimensionaler SDS-PAGE trotz vergleichbarer Anreicherung mit anderen Monoterpensynthasen nicht zur Homogenität aufgereinigt werden (Tab. 14). So genügte beispielsweise eine 38fache Anreicherung der GES aus *Ocimum basilicum* zum Nachweis des Enzyms als nahezu einzige Bande im SDS-Gel (Iijima *et al.* 2004). Ein Grund für diese hohe Reinheit war die Extraktion des Enzyms aus Drüsengewebe, in dem es in hoher Konzentration vorlag. Für die Anreinigung der (E)- $\beta$ -OS wäre aus diesem Grund die vorangehende Isolation der Plastiden eine Option gewesen, da z.B. die Nerolidol/Linaloolsynthase aus *Antirrhinum majus* exklusiv in den floralen Leukoplasten vorkommt und diese Organellen u.a. als Ort der Monoterpensynthese in Citrus-Spezies beschrieben wurden (Nagegowda *et al.* 2008, Pauly *et al.* 1986). Ein Isolationsversuch von Plastiden der *Mirabilis jalapa*-Blüten zeigte jedoch, dass einerseits die Ausbeute sehr gering und damit die Verfügbarkeit von ausreichend Ausgangsmaterial limitierend war. Darüber hinaus war der notwendige

Aufschluss der Plastidenmembranen mit der Beeinträchtigung der Enzymfunktion verbunden (Einzelversuch, Daten nicht gezeigt).

Die erzielte Anreicherung war im Pilotversuch (ca. 400fache Anreicherung) am höchsten und in den anderen Trennungsgängen deutlich geringer. Dies kann nur ungenügend mit der Verwendung unterschiedlicher Rohextrakte und damit verbundenen verschiedenen Wechselwirkungen von Proteinen erklärt werden. Im Pilotversuch wurde insgesamt eine geringere Proteinmenge für die Chromatographie eingesetzt, was eventuell für eine bessere Auflösung der nachfolgenden Trennung an HA sorgte. Die für jede Chromatographie an HA notwendige Erneuerung der Säule, sowie das Alter der für alle Versuche genutzten GA-Säule könnte ebenfalls einen negativen Effekt gehabt haben.

In den SDS-Gelen der Fraktionen mit hohem Anreicherungsgrad der (*E*)- $\beta$ -OS war stets eine Bande bei ca. 75 kDa vorhanden, die zur Sequenzierung herangezogen werden sollte. Eine optimale Analyse hätte jedoch die Untersuchung des gesamten MW-Bereiches der Monoterpensynthesen umfasst. Dies war wegen der eingeschränkten Analysekapazität nicht möglich, so dass 4 Banden selektiert wurden. Die Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse der Proteinbanden zeigten erstens, dass im analysierten Molekularmassenbereich mindestens eine Monoterpensynthase vorhanden war. Jedoch waren im ersten Abgleich mit der SwissProt-Datenbank in allen Banden vorwiegend Hitzeschockproteine nachweisbar. Dies ist einerseits in deren Eigenschaft als proteinprotektive Substanzen begründet. Hitzeschockproteine können daher im Aufreinigungsprozess schwer von anderen Proteinen zu trennende Komplexe bilden. Außerdem war eine Detektion von Monoterpensynthesen mit dieser Datenbank unwahrscheinlich, da ausschließlich Proteine mit nachgewiesener biologischer Funktion in ihr annotiert sind. Für die Mehrzahl der bekannten Monoterpensynthesen ist dies nicht der Fall. Diese Enzymsequenzen konnten daher nur in einem zweiten Abgleich, der nur die mit SwissProt nicht identifizierbaren Precursormassen umfasste, gegen die selbst erstellte Monoterpensynthesen-Datenbank mit in die Suche einbezogen werden. In dieser waren in der Trembl-Datenbank verzeichnete Enzyme vertreten, die bekannte Proteine/Transkripte darstellen, deren Annotation nicht verifiziert wurde.

Zweitens waren mit wenigen Ausnahmen alle detektierten Peptide aus *Mirabilis jalapa* in einer Aminosäure abweichend. Dieses Resultat bestätigte ein allgemeingültiges Charakteristikum der Monoterpensynthesen, dass zwischen Enzymen mit gleichem Produktspektrum aus verschiedenen Spezies starke Sequenzunterschiede bestehen (Kampranis *et al.* 2007). Die Unterschiede nehmen bei geringer werdendem Verwandtschaftsgrad der Spezies zu. So waren beispielsweise die Sequenzen der aus der Ordnung der *Fabales* (*Lotus japonicus*, *Phaseolus lunatus* und *Medicago trunculata*) isolierten Ocimensynthesen

zu rund 70% zueinander ähnlich, aber zur systematisch weiter entfernt stehenden Ordnung der *Lamiales* (*Antirrhinum majus*) nur zu 27%. Aus der in der Systematik isoliert stehenden Ordnung *Caryophyllales*, der die *Nyctaginaceae* derzeit zugeordnet werden, wurden bisher keine Terpensynthasen isoliert. Daher sollten die erhaltenen Sequenzen zur Ableitung von spezifischen Primern für *Mirabilis jalapa* genutzt werden.

In den Banden 1 und 4 war dasselbe Protein enthalten. Die dort identifizierten Monoterpensynthase-Peptide in Kombination mit der mit dem Anreicherungsgrad korrelierenden Bandenintensität deuten auf die (*E*)- $\beta$ -OS in diesen Banden hin.

Aufgrund der geringen identifizierten Peptidanzahl in Bande 3 blieb unklar, ob die Banden 2 und 3 ein oder zwei Proteine repräsentieren. Insbesondere zwischen beiden Banden könnte ein Bereich mit suboptimaler Proteinauftrennung existiert haben, was zum Nachweis von Peptiden in Bande 3 geführt haben könnte, die letztlich der Bande 2 zuzuordnen wären. Aufgrund ihrer Peptidzusammensetzung könnte diese Bande ebenfalls eine Monoterpensynthase darstellen. Da in den Assays nur (*E*)- $\beta$ -Ocimen detektiert wurde, sollte die (*E*)- $\beta$ -OS allerdings die einzige im floralen Rohextrakt vorhandene Monoterpensynthase sein. Obwohl eine exakte Zuordnung einer Bande zur (*E*)- $\beta$ -OS nicht möglich war, kann die Bande 2 aufgrund ihrer geringen Intensität in der Spur mit dem höchsten Anreicherungsgrad als Kandidatin ausgeschlossen werden. Die Expression von Di- bzw. Sesquiterpensynthasen in *Mirabilis jalapa*-Blüten zum untersuchten Erntezeitpunkt war vor dem Hintergrund ihrer Bedeutung für den primären Stoffwechsel zu erwarten. In der Tat weisen diese Enzyme Sequenzähnlichkeiten mit Monoterpensynthasen auf, die auf Peptidebene zur Detektion in der monoterpensynthasespezifischen Datenbank geführt haben könnten. Die Substrate GGPP und FPP wurden in den Assays mit Rohextrakten jedoch nicht zu detektierbaren Produkten umgesetzt (Einzelversuche, nicht gezeigt). Wegen begrenzter Verfügbarkeit wurden die Anreinigungsfractionen nicht mit den alternativen Substraten getestet. Die Existenz einer Di- oder Sesquiterpensynthase in Bande 2 bleibt daher ungeklärt.

#### **4.3. Die (*E*)- $\beta$ -Ocimensynthase aus *Mirabilis jalapa* konnte mit RT-PCR nicht isoliert werden.**

Mit den von den Peptiden einer Terpensynthase aus *Mirabilis jalapa* abgeleiteten Primern wurden keine terpensynthaseähnlichen Sequenzen isoliert. Die Gründe für dieses Ergebnis sind weniger in der klassischen Anreinigung und Proteinsequenzierung, die ebenfalls in aktuellen Untersuchungen zur Identifikation von Monoterpensynthasen eingesetzt wurden (Nagegowda *et al.* 2008), sondern in der molekularbiologischen Analyse zu suchen.

Da die RNA-Qualität entscheidenden Einfluss auf den Erfolg der Amplifikation haben kann, wurde die Eignung der auf der Verwendung von CTAB, GTC oder SDS basierenden

verschiedenen Methoden der RNA-Isolation untersucht (Andrew Hudson, Cheng und Seeman 1998, Chang *et al.* 1993, Daten nicht gezeigt). Dabei wurde deutlich, dass nur die in der vorliegenden Arbeit angewendete kombinierte GTC-CTAB-Methode von Camacho-Villasana (2002) für die optimale Amplifikation von Fragmenten mittels RT-PCR bei *Mirabilis jalapa* einsetzbar war.

Eine zu geringe mRNA- bzw. cDNA-Konzentration gilt als häufiger Grund für das Scheitern von RT-PCRs. Dieses Problem sollte durch Reverse Translation mit *Oligo(dT)*-Primern umgangen werden und führte dennoch zu keiner Amplifikation der (*E*)- $\beta$ -OS. Eine Erhöhung der eingesetzten Gesamt-RNA-Menge könnte dieses Problem in weiteren Experimenten lösen. Da die Isolation von mRNA aus Kapazitätsgründen nicht durchgeführt werden konnte, sollte sie ebenfalls für zukünftige Untersuchungen in Betracht gezogen werden. Weiterhin können Sekundärstrukturen der mRNA zur Behinderung der Reversen Transkription führen (Wang *et al.* 2001). Der für *Mirabilis jalapa* angegebene GC-Gehalt lag mit 43% im Rahmen des für Pflanzen allgemein beschriebenen (vgl. [www.kazusa.or.jp](http://www.kazusa.or.jp)). Dies schließt das Auftreten von Sekundärstrukturen der (*E*)- $\beta$ -OS-mRNA jedoch nicht aus, so dass die Amplifikation trotz der Verwendung von unterschiedlichen Enzymen mit hohen Reaktionstemperaturen nicht erfolgreich war.

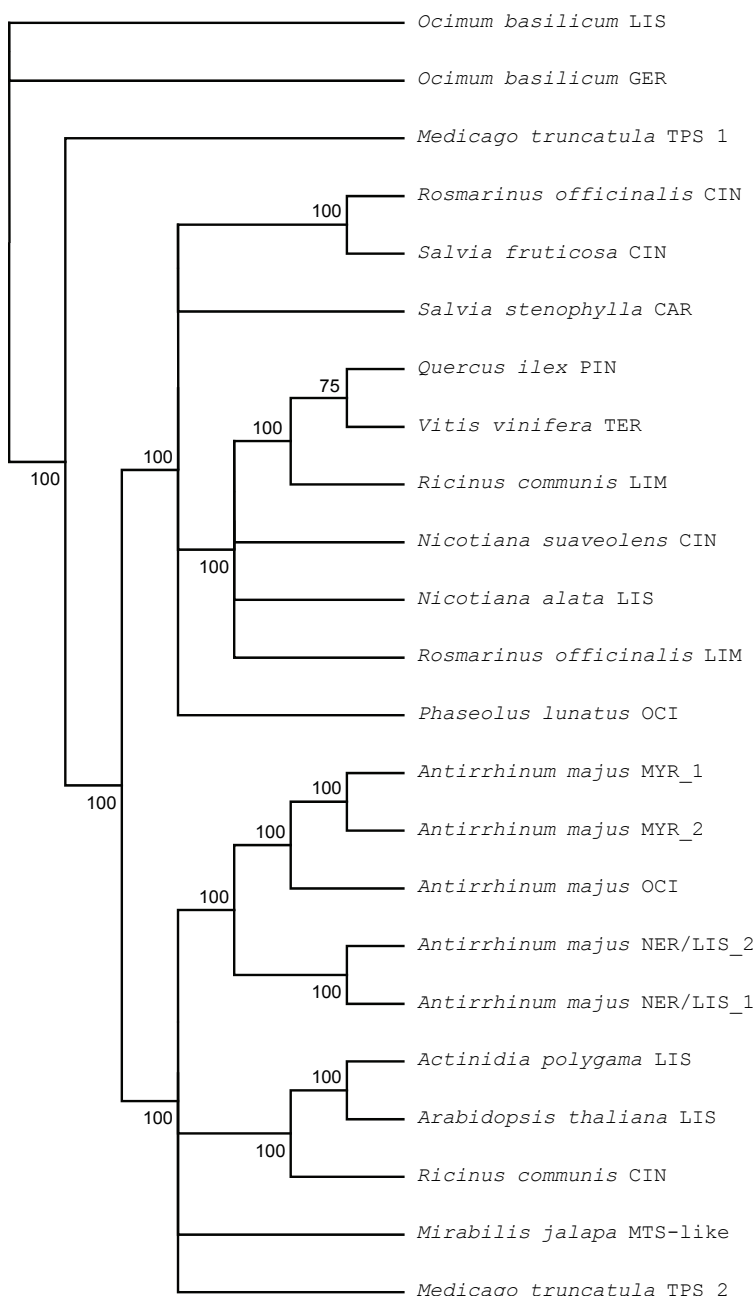
Andererseits könnte die mRNA im Erntezeitraum von 14 bis 18 Uhr nicht oder in zu geringer Konzentration expremiert worden sein, da in diesem Zeitfenster bereits aktives Enzym im *in vitro*-Assay mit Rohextrakt nachgewiesen wurde. Die wenigen publizierten *in vivo* Expressions- und Emissionsdaten von nicht herbivorinduzierten Monoterpensynthasen rechtfertigten dennoch diese Eingrenzung des Untersuchungszeitraumes. Es wurde gezeigt, dass die mRNA vom Knospenstadium bzw. der eben geöffneten Blüte bis weit in die Blüh- und Emissionsperiode hinein nachgewiesen werden konnte, d.h. mRNA und Enzym coexistierten parallel (LIS aus *Nicotiana glauca* und *C. breweri*, Ocimensynthase *Antirrhinum majus*, CIN aus *Nicotiana glauca*; Ganz 2005, Pichersky *et al.* 1995, Dudareva *et al.* 2003, Roeder *et al.* 2007). Darüber hinaus war vor dem Hintergrund des auf 12 Stunden komprimierten Aktivitätsfensters des Enzyms bzw. des Emissionszeitraumes des (*E*)- $\beta$ -Ocimens in *Mirabilis jalapa* die Expression im Bereich des gewählten Erntezeitraumes zu erwarten. Allerdings kann eine exklusive Expression in den jüngeren Knospenstadien nicht ausgeschlossen werden. Zur Abklärung dieser Frage sollten sich weiterführende molekularbiologische Untersuchungen dennoch mit diesen Geweben beschäftigen.

Die Analysen des Fragmentes FS-35 zeigten, dass diese terpensynthaseähnliche Sequenz neben den Petiolen (Blattstielen) auch in Blüten im Verlauf der Anthese expremiert wurde. Die Verlängerung der Sequenz aus Blüten war nicht möglich, da mit den cDNA-basierten Methoden keine Amplifikation gelang. Dieses Ergebnis stand eventuell mit der eingangs vermuteten geringen mRNA-Konzentration in Verbindung. Darüber hinaus ist der

Abbruch der Transkription durch Sekundärstrukturen oder Stoppcodons denkbar. Diese Vermutung wurde durch die PCR auf genomischer DNA gestützt. Dabei wurden zwar Hinweise auf ein Intron im FS-35-Fragment gefunden, aber keine Verlängerung der bekannten Sequenz erzielt.

Die fehlende Verlängerung des Fragmentes FS-35 könnte theoretisch auch durch die Unvollständigkeit der mRNA bedingt sein. FS-35 könnte daher das Produkt eines (Monoterpensynthase-)Pseudogens sein, dessen Sequenz sich zu stark von der seines Originals unterscheidet, um dieses mit den spezifischen Primern zu amplifizieren (Thibaud-Nissen *et al.* 2009). Pseudogene wurden oft mit der Regulation der Expression ihrer Originale oder anderer Gene in Verbindung gebracht (Hirotsume *et al.* 2003). Dieser Zusammenhang ist interessant, da FS-35 als in der Expression hochreguliert beschrieben und auch in Blättern nur der C-terminale Sequenzabschnitt als cDNA detektiert wurde (Meir *et al.* 2006, Xu *et al.* 2007). Darüber hinaus wurde die Existenz von Pseudogenen von Terpensynthasen in *Arabidopsis thaliana*, *Magnolia spec.* und *Vitis spec.* bestätigt (Aubourg *et al.* 2002, Lee und Chappell 2008, Adam-Blondon 2007).

Wegen der fehlenden Verlängerung konnte nicht geklärt werden, ob es sich bei dem Fragment FS-35 um einen Teil der (*E*)- $\beta$ -OS aus Blüten handelt. Einerseits waren die identifizierten Peptide des angereinigten Enzyms nicht Bestandteil der Fragmentsequenz. Andererseits ist FS-35 ein viel versprechender Kandidat für die florale (*E*)- $\beta$ -OS aus *Mirabilis jalapa*, da in der BLASTsearch-Analyse Ähnlichkeiten zu den in den Banden 1–4 identifizierten Enzymen GES (*Ocimum basilicum*) und Myrcensynthase (*Antirrhinum majus*) und anderen, teilweise erst nach Abschluss der Versuche publizierten, Monoterpensynthasen gefunden wurden. Bei einer phylogenetischen Analyse (Abb. 39) dieser ähnlichen Sequenzen zeigte sich die isolierte Stellung von FS-35, die auf Grund der ebenfalls separaten systematischen Einordnung von *Mirabilis jalapa* zu erwarten war. Obwohl der Sequenzvergleich ausschließlich auf C-terminalen Sequenzabschnitten beruht, kann daraus abgeleitet werden, dass eine homologiebasierte Genisolierung nicht vielversprechend ist.



**Abb. 39: Phylogenetische Beziehung der FS-35 zu Monoterpensynthasen.**

Verglichen wurden nach *BLASTsearch* ähnlichste Sequenzen zu FS-35. Ungewurzelter Parasi-mony-Baum (Konsensus aus 4 berechneten Bäumen, Ähnlichkeiten <50% unberücksichtigt) basie-rend auf Ähnlichkeiten der Aminosäuresequenz. Zur Erstellung wurde PAUP (Version 4.0b10) und zur Visualisierung TreeView genutzt. Gaps im Alignment (*ClustalW*) wurden vor der Analyse ent-fernt. Verwendete Pflanzenspezies und Accession Numbers: *Actinidia polygama* LIS ADD81295, ***Antirrhinum majus* MYR\_1 AY195608**, *Antirrhinum majus* MYR\_2 AY195609, *Antirrhinum majus* OCI AY195607, *Antirrhinum majus* NER/LIS\_1 ABR24418, *Antirrhinum majus* NER/LIS\_2 ABR24417, *Arabidopsis thaliana* LIS AF497485, *Medicago truncatula* TPS 1 ABB01626, *Medicago truncatula* TPS 2 AAV36466, *Mirabilis jalapa* MTS\_like AAT07457, *Nicotiana alata* LIS -, *Nicotiana suaveolens* CIN EF175166, ***Ocimum basilicum* GER AY362553**, *Ocimum basilicum* LIS AY693647, *Phaseolus lunatus* OCI ABY65110, *Quercus ilex* PIN AM283099, *Ricinus communis* CIN EEF43970, *Ricinus communis* LIM EEF29029, *Rosmarinus officinalis* CIN DQ839411, *Rosmarinus officinalis* LIM DQ421800, *Salvia fruticosa* CIN ABH07667, *Salvia stenophylla* CAR AF527416, *Vitis vinifera* TER AAS79351

CAR Carensynthase, CIN Cineolsynthase, GER Geraniolsynthase, LIM Limonensynthase, LIS Linaloolsynthase, MTS Monoterpensynthase, MYR Myrcensynthase, OCI Ocimensynthase, PIN Pinensynthase, TER Terpinensynthase, TPS Terpensynthase, *fett* – Peptide in *Mirabilis jalapa* durch massenspektrometrische Analyse nachgewiesen

Die Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen sowohl der Vorarbeiten mit dem homologiebasierten Ansatz (Große 2002), der Arbeiten mit den spezifischen peptidabgeleiteten Primern als auch des Fragmentes FS-35 lassen sich wie folgt einschätzen: Zur Identifikation der (*E*)- $\beta$ -OS aus *Mirabilis jalapa*-Blüten ist nur die Analyse aller exprimierten Gene in einer cDNA-Bank vielversprechend. Diese gegenwärtig immer häufiger verwendete Methode verbindet die Generation und Sequenzierung von kurzen cDNA-Bereichen (*EST*) und deren *in silicio*-Abgleich mit Sequenzen bekannter Monoterpensynthasen (Shelton *et al.* 2004, Iijima *et al.* 2004, Kampranis *et al.* 2007, Nagegowda *et al.* 2008). Weiterführende Arbeiten sollten einerseits die Anzahl der verfügbaren spezifischen Primer durch eine erneute Anreicherung und intensivere Analyse der Proteinbanden z.B. durch verschiedene massenspektrometrische Verfahren erhöhen. In Verbindung mit einer *EST*-Bank, beispielsweise aus verschiedenen Knospen- bzw. Blütenstadien, bergen diese Primer sowie die Sequenzinformation des Fragmentes FS-35 ein hohes Potential zur Identifikation der (*E*)- $\beta$ -OS aus *Mirabilis jalapa*. Darauf aufbauend können die molekularbiologischen Untersuchungen zur Regulation der Expression durchgeführt werden.

#### **4.4. (*E*)- $\beta$ -Ocimen wird in den Blüten der *Mirabilis jalapa* simultan synthetisiert und emittiert.**

Aufgrund einiger Untersuchungen können Pflanzen oder Gewebe entsprechend ihres Monoterpengehaltes klassifiziert werden. Zu den monoterpenreichen Pflanzenteilen zählen beispielsweise die Petalen duftender Rosen sowie die zur Bestäuberanlockung VOCs emittierenden Blätter von *Chamaerops humilis* (Bergougnoux *et al.* 2007, Caissard *et al.* 2004b). In die Gruppe mit geringem Monoterpengehalt werden Petalen nichtduftender Rosen sowie *Antirrhinum majus* eingeordnet (Bergougnoux *et al.* 2007, Dudareva *et al.* 2003). *Mirabilis jalapa* ist aufgrund ihres (*E*)- $\beta$ -Ocimengehaltes in die zweite Gruppe einzuordnen, da der maximale Monoterpengehalt petaloiden Segmente ca. 500– bzw. 100fach geringer als in den Petalen einer duftenden Rose oder den Blättern von *Chamaerops humilis* war. Mit 0,5  $\mu$ g (*E*)- $\beta$ -Ocimen pro Blüte lag der maximale Gehalt in *Mirabilis jalapa* im Bereich nichtduftender Rosen und war vergleichbar mit dem Ocimenanteil, den *A. majus* pro Stunde aus den Petalen emittiert.

Es konnte gezeigt werden, dass der Gehalt an und die Emission des (*E*)- $\beta$ -Ocimens im Verlauf der Blühphase synchron verlaufen. Im Zeitraum der maximalen Emission (Übergang der Stadien 4 und 5) war der Gehalt an (*E*)- $\beta$ -Ocimen im Gewebe ebenfalls am höchsten. Beide Parameter waren im Zeitraum der fortschreitenden Anthese bis zum Stigmafall erhöht. Eine Begründung hierfür könnte die nur in der Phase der Reproduktionsfähigkeit der Blüte notwendige Bestäuberanlockung oder eine Antagonistenabwehr



sein (Junker und Blüthgen, 2010). Da zumindest für die außerhalb des natürlichen Habitats existierenden *Mirabilis jalapa* keine Bestäuber bekannt sind und die Reproduktion über Selbstbestäubung sichergestellt wird, ist die letztere Funktion des (*E*)- $\beta$ -Ocimens wahrscheinlicher. Die im Vergleich zum Gehalt ca. 16fach höhere nachweisbar emittierte Ocimenmenge könnte im Versuchsaufbau begründet sein. Die emittierte (*E*)- $\beta$ -Ocimenmenge entspricht der akkumulierten Substanz im Intervall von 2 Stunden wohingegen durch die Extraktion nur die zu diesem Zeitpunkt im Gewebe befindliche Substanz als Momentaufnahme ermittelt werden konnte.

Die vereinzelt in den Messungen von 17–19 Uhr nachgewiesenen geringen (*E*)- $\beta$ -Ocimenmengen in den Hexanextrakten aus dem sternförmigen Petalenzentrum konnten mit dem Erfassen der Randbereiche der petaloiden Segmente beim Zerteilen der Blüte erklärt werden, da der Nachweis in den Zeitraum des höchsten VOC-Gehaltes der petaloiden Segmenten fiel. Effmert *et al.* beschrieben, dass aus dem sternförmigen Petalenzentrum eine geringe Ocimenemission nachweisbar war, die Ungenauigkeiten bei der Blütenzerteilung zugerechnet wurde (2005). Es ist daher davon auszugehen, dass (*E*)- $\beta$ -Ocimen nur von petaloiden Segmenten emittiert wurde und die Daten zur Emission der VOC mit ihrem Gehalt vergleichbar waren.

Zur Klärung des Verbleibs der VOCs nach ihrer Synthese ist die Visualisierung dieser Moleküle im Gewebe und ihre subzelluläre Detektion unerlässlich. Terpene wurden in mehreren Pflanzenarten *in vivo* unter Verwendung von NADI-Reagenz (David und Carde 1964) nachgewiesen (Tab. 15). Obwohl dieser Nachweis als relativ unspezifisch galt, konnten Machado *et al.* (2006) ihn in Verbindung mit Dünnschichtchromatographie spezifisch für Monoterpene (z. B. Myrcen) einsetzen. Caissard *et al.* (2004b) wiesen in nach NADI-Inkubation terpenpositiven Geweben (Laubblätter) u.a. (*E*)- $\beta$ -Ocimen durch Gaschromatographie nach. Mit einer Ausnahme wurden Terpene durch eine violette Färbung überwiegend in Blatt-Trichomen detektiert. Seltener wurden Terpene in Mesophyll- bzw. Epidermiszellen angefärbt. So konnten Bergougoux *et al.* (2007) beispielsweise durch Anfärbung mit NADI-Reagenz zeigen, dass in den petaloiden Epidermen von Rosen Terpene vorhanden sind, die im mikroskopischen Bild als violett gefärbte Tröpfchen nachweisbar waren.

Die Funktionsfähigkeit der Nachweismethode wurde in dieser Arbeit einerseits *in planta* in den Schild-Trichomen von *Salvia officinalis* gezeigt, die Terpene enthalten (Corsi und Bottega 1999). Die Inkubation von Blättern mit NADI-Reagenz führte zur Violettgefärbung von Kügelchen in den Trichomen. Die anschließende Applikation der Methode auf Blütengewebe wurde an 2 Tage alten *Nicotiana glauca* Blüten durchgeführt, für die nocturnale Emission der Monoterpene  $\beta$ -Myrcen, Limonen, 1,8-Cineol,  $\beta$ -Linalool und  $\alpha$ -Terpineol von *Nicotiana glauca*-Blüten bekannt ist (Ganz 2005). In den Schließzellen der

Spezies	Organ	Nachweis mit NADI-Färbung		Zus. Analyse	Autor
		Färbung	Tröpfchen-durchmesser		
<i>Plectranthus ornatus</i>	Trichome, Sekrete (sub-cuticulärer Raum)	violett	3-17 µm	-	Ascensao <i>et al.</i> 1999
<i>Houttuynia cordata</i>	Drüsenhaar Blatt, Ölzele Blatt	Übergang: blau-grün-gelb	60-80 µm	-	Ni <i>et al.</i> 2007
<i>Zeyheria montana</i>	Schildförmige Trichome (Ovarium), Sekrete	blauviolett	k.A.	TLC	Machado <i>et al.</i> 2006
<i>Salvia blepharophylla</i>	Trichome Blatt	blauviolett	k.A.	GC-MS	Bisio <i>et al.</i> 1999
<i>Cucurbita pepo</i>	Trichome Blatt	blauviolett	k.A.	-	Kolb und Müller 2004
<i>Rosa x hybrida</i>	Mesophyllzellen Blüte	violett	4-7 µm	-	Bergougnoux <i>et al.</i> 2007
<i>Chamaerops humilis</i>	Epidermis- und Mesophyllzellen Blatt	violett	6-10 µm	GC-MS	Caissard <i>et al.</i> 2004b
<i>Salvia officinalis</i>	Trichome Blatt	violett	k.A.	-	Corsi und Bottega 1999
<i>Stachys recta</i>	Trichome Blatt	blau-violett	k.A.	GC-MS	Giuliani <i>et al.</i> 2008

**Tab. 15 : *In planta*-Nachweis von Terpenen.**

k.A. – keine Angabe, TLC – *thin layer chromatography* (Dünnschichtchromatographie), GC-MS – mit Massenspektrometrie gekoppelte Gaschromatographie

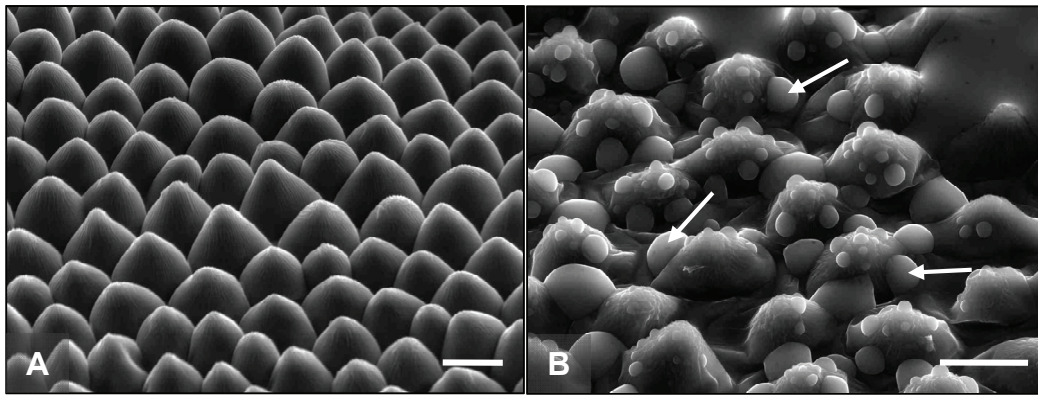
Stomata konnten durch NADI-Färbung ebenfalls Terpene durch violettgefärbte Kügelchen von bis zu 5 µm Durchmesser nachgewiesen werden. Die blau gefärbten Tröpfchen waren Artefakte (Bergougnoux *et al.* 2007). Da die Reinsubstanzen (*E*)- sowie (*Z*)-β-Ocimen *in vitro* ebenfalls violett gefärbt wurden, konnte vom Einsatz von mit dem Nachweis von Terpenen in Verbindung gebrachten Methoden (z.B. *Nil Blue A*) abgesehen werden (Cain 1947).

Durch die Verwendung der NADI-Färbung konnten in allen untersuchten Pflanzenteilen (Blätter, Spross und Blüten) der *Mirabilis jalapa* kleine (maximal 2 µm Durchmesser) violette Partikel nachgewiesen werden, die in den vegetativen Geweben überwiegend chloroplastenassoziiert waren. In den Blüten lagen die Partikel entweder scheinbar frei im Cytosol oder traten in Verbindung mit Plastiden auf. Obwohl die Plastiden als Orte der Mono- und Diterpensynthese gelten, wurde dieses an Organellen gekoppelte Vorkommen von Terpenpartikeln in anderen Untersuchungen nicht beschrieben. Allerdings kamen die Partikel in *Mirabilis jalapa* redundant unabhängig vom Blütenentwicklungsstadium vor. Obgleich durch die NADI-Färbung allein keine qualitativen Aussagen über die Art der Terpene möglich sind, ist davon auszugehen, dass die Partikel nicht an der Speicherung von (*E*)-β-Ocimen beteiligt sind, sondern ein oder mehrere ubiquitär in der Pflanze vorkommende Terpene aus dem Primärstoffwechsel angefärbt wurden. Da sie in den

Hexanextrakten nicht detektierbar waren, lag ihre Konzentration vermutlich unterhalb der Nachweisgrenze.

Die Diskrepanz zwischen durch Extraktion nachgewiesenem (*E*)- $\beta$ -Ocimengehalt der Blüten bei fehlendem überzeugenden histologischem Nachweis könnte mehrere Szenarien widerspiegeln. Einerseits könnte der Nachweis durch das Entweichen eventuell vorhandenen (*E*)- $\beta$ -Ocimens aus den Zellen fehlgeschlagen sein. Dies ist jedoch durch die Untersuchung von Semidünnschnitten, die aus intakten Zellschichten bestanden, nahezu ausgeschlossen. Eine schlüssige Erklärung wäre die fehlende Speicherung des (*E*)- $\beta$ -Ocimens. Bislang wurden nur Terpenttröpfchen in Trichomen als Speicherform für VOCs oder ätherische Öle beschrieben und durch NADI-Färbung nachgewiesen (Tab. 15). Diese terpenpositiven Strukturen besaßen einen deutlich größeren Durchmesser als die in *Mirabilis jalapa* nachgewiesenen Tröpfchen. Die Größenunterschiede könnten durch die deutlich höhere Terpenkonzentration in den Trichomen bedingt sein. Hinsichtlich der in pflanzlichen Geweben nachgewiesenen, kleineren Tröpfchen wurde bislang über ihre Speicher- oder Transportfunktion spekuliert. Bergougnaux *et al.* wiesen aber darauf hin, dass es bislang keine Information über die Speicherung von VOC-Molekülen in Blüten gibt, da das Schicksal dieser Metabolite in Petalen gänzlich unbekannt ist (2007). Neben dem fehlenden Nachweis der Speicherung konnten bisher weder der intrazelluläre Transport noch die Passage der Zellwände und Cuticulae beschrieben werden (Jetter 2006). Allerdings steht außer Frage, dass VOCs sekretiert werden, wie die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Petalenoberfläche duftender und nichtduftender Rosen zeigen (Abb. 40 sowie Bergougnaux *et al.* 2007). Auf der adaxialen Epidermis duftender Rosen waren Ansammlungen flüssigen Sekrets nachweisbar. Da diese Tropfen auf der Epidermis nichtduftender Rosenblütenblätter fehlten, handelt es sich dabei vermutlich um Metabolite, die in flüssiger Form sekretiert werden und anschließend auf der Petalenoberfläche evaporieren.

In *Cucurbita pepo* konnte die Verlagerung der terpenpositiv gefärbten Tröpfchen von der Trichombasis bis zur Spitze verfolgt und damit erste Hinweise auf Transportprozesse geliefert werden (Kolb und Müller 2004). Weitere Anzeichen für verschiedene Sekretionsmechanismen sind die Verschmelzung von Vesikeln mit der Plasmamembran oder die Diffusion bzw. aktive Transport der VOCs (Caissard *et al.* 2004a). Darüber hinaus wurde der Transport floraler Metabolite der Nelke (*Dianthus caryophyllus*) beschrieben, die über den Lipoxygenaseweg aus membranabgeleiteten Fettsäuren synthetisiert werden (*green leaf volatiles*). Als Transporter dienen im Cytosol vorkommende, membranbasierte Lipid-Protein-Partikel (Hudak und Thompson 1997). Wie die fehlende NADI-Färbung des



**Abb. 40: Mikroskopischer Nachweis von floralen epidermalen Sekreten in *Rosa x hybrida*.**

Aufsicht auf die adaxiale Epidermis. Die Petalen wurden mit Wachs auf einem gekühlten Träger fixiert und mit einem *Environmental Scanning Electron Microscope* (XL30 ESEM, Phillips) untersucht. Balken 20  $\mu\text{m}$ . Aufnahmen von Dr. Fred Ehrig, Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen (BAZ), Institut für Resistenzforschung und Pathogendiagnostik, Aschersleben.

**A) Nicht duftende Blüte, B) Duftende Blüte.** Pfeile – Tropfenförmige Ansammlungen von flüssigem Sekret

Volatils zeigt, war mit den in dieser Arbeit durchgeführten lichtmikroskopischen Experimenten keine Aussage über den Transport- bzw. Sekretionsmechanismus des (*E*)- $\beta$ -Ocimens in *Mirabilis jalapa* möglich, da diese Prozesse vermutlich auf subzellulärer Ebene ablaufen. Die dafür notwendigen Techniken befinden sich in der Entwicklung. So berichten Harada *et al.* (2009) von der Untersuchung eines Monoterpens in Schnitten des Ingwerrhizoms mit einem an ein Mikroskop gekoppeltes Massenspektrometer. Darüber hinaus könnten Untersuchungen der Ultrastruktur der für einige VOC-sekretierende Gewebe als charakteristisch beschriebenen Merkmale (Leukoplasten, Plastoglobuli, kleine Vakuolen) Abhilfe schaffen (Caissard *et al.* 2004a). Diese Untersuchungen könnten ebenfalls klären, ob (*E*)- $\beta$ -Ocimen durch aktive Transportprozesse (eccrin) oder durch Vesikelfusion mit der Plasmamembran (granulocrin) die Zellen verlässt. Ultrastrukturelle Untersuchungen könnten außerdem zeigen, dass z.B. azyklische Monoterpene nach ihrer plastidiären Synthese über derzeit ungeklärte Prozesse in das ER aufgenommen werden können. Dieser Transfer von Terpenen zwischen Kompartimenten wurde nach zytologischen Studien an reifen Petalen von *Rosa x hybrida* skizziert, in denen osmiophile Globuli zwischen Plastiden und Periplasmatischem Retikulum über teilweise kontinuierliche Membrannetzwerke mobil waren (Caissard *et al.* 2004b). Außerdem existieren Hinweise für den aktiven Transport von VOCs. Jasski *et al.* (2001) identifizierten einen ABC-Transporter in der Plasmamembran von Tabak-Zellen, der an der Sekretion von antifungal wirkenden Terpenen beteiligt ist. Da Blüten im Allgemeinen aus wenigen Zellschichten bestehen, wäre in diesem Falle nur der subzelluläre sowie der cuticuläre Transport zu berücksichtigen. Einige Arbeitsgruppen (Kolosova *et al.* 2001, Rohrbeck *et al.* 2006) konnten zeigen, dass an der Synthese von Komponenten des Blütenduftes beteiligte Enzyme in den Epidermen der Petalen exprimiert werden.

Niinemets *et al.* beschrieben, dass VOCs in Blättern von Pflanzen ohne spezielle zelluläre Speicherkompartimente gespeichert werden können (2002a). Loreto *et al.* berichteten 1998, dass lipophile Komponenten, wie das nichtoxygenierte (*E*)- $\beta$ -Ocimen, in signifikanten Mengen in der Lipidphase der Blätter unspezifisch gespeichert werden können. Diese VOCs können 10–15 min nach der *de novo*-Synthese emittiert werden. Konkretere Untersuchungen der histologischen Zusammenhänge wurden nicht durchgeführt. Es ist denkbar, dass das (*E*)- $\beta$ -Ocimen ebenfalls in der noch genauer zu definierenden Lipidphase der Petalen nach der Synthese (zwischen)gespeichert wird. Damit wäre sowohl die Extraktion von im Gewebe vorhandenem (*E*)- $\beta$ -Ocimen als auch die negative NADI-Färbung erklärbar.

Eine simultane Produktion und Freisetzung des Monoterpens in *Mirabilis jalapa* würde bedeuten, dass die emittierte und die in den petaloiden Segmenten enthaltene Menge ähnlich sind. Bergougnaux *et al.* wiesen beispielsweise für *Rosa x hybrida* nach, dass die Emission von z.B. Geraniol grob der Größe seines internen Pools entspricht (2007). Dieses Muster ist im Pflanzenreich weit verbreitet und wurde für im System weit voneinander entfernte Familien, beispielsweise der Rutaceae, Asteraceae und Solanaceae, beschrieben (MacTavish und Menary, 1997, Flamini *et al.* 2003 und Oyama-Okubo *et al.* 2005). Dieser Punkt kann durch die bisherigen Untersuchungen weder bestätigt noch widerlegt werden und bedarf weiterer Experimente. Durch die Verkürzung der Messintervalle der VOC-Emission von 120 auf 10 min könnte die freigesetzte (*E*)- $\beta$ -Ocimenmenge ermittelt und mit den Extraktionsdaten verglichen werden.

Die fehlende Detektion des (*E*)- $\beta$ -Ocimens durch NADI kann ferner mit seinem Aggregatzustand in Verbindung stehen. Bisher ist nicht bekannt, ob VOCs in gasförmigem Zustand in den Pflanzen vorkommen. Für *Pinaceae* wurde jedoch die vegetative Monoterpenemission durch Stomata beschrieben (Kesselmeier und Staudt 1999, Niinemets *et al.* 2002a und b). Demgegenüber steht die generelle Verneinung der stomatösen Kontrolle der VOCs (Sharkey *et al.* 1991). Diese Prozesse könnten in Blüten von *Mirabilis jalapa* außerdem nur eine untergeordnete Rolle spielen, da der Öffnungszustand der Stomata nicht mit der (*E*)- $\beta$ -Ocimenemission korrelierte (Große 2002). Außerdem ist ihr Vorkommen in dieser Spezies auf die abaxialen Epidermen beschränkt, die z.B. in Rosen zwar als VOC-Reservoir aber nicht als Emissionsort fungieren (Bergougnoux *et al.* 2007). Der Nachweis von Terpenen in den Schließzellen der Stomata von *Nicotiana glauca* in der vorliegenden Arbeit zeigt allerdings, dass dieses Thema weitergehender Untersuchung bedarf.

Der fehlende überzeugende Nachweis von Monoterpenen *in planta* durch NADI-Färbung bei durch Extraktion nachgewiesenem (*E*)- $\beta$ -Ocimengehalt der Blüten ist nach der Be-

trachtung der in Frage kommenden Szenarien als Hinweis auf eine simultane Synthese und Emission des Volatils aus den petaloiden Segmenten von *Mirabilis jalapa* zu sehen.

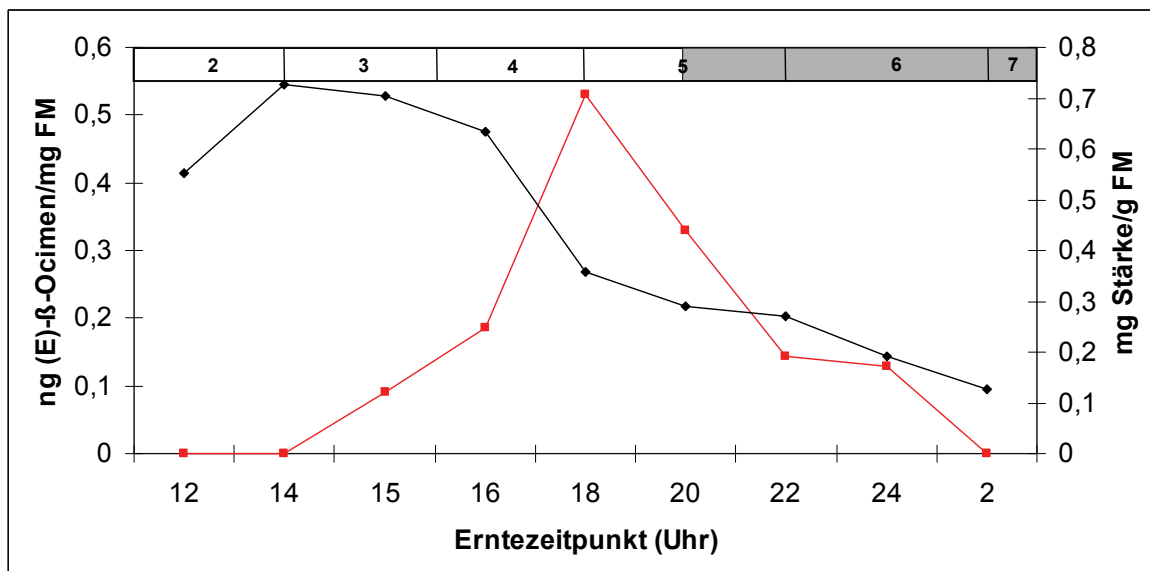
Die Frage der Regulation der (*E*)- $\beta$ -Ocimensynthese konnte in dieser Arbeit wegen der fehlenden molekularbiologischen Isolation nicht untersucht werden. Die Daten zur Emission bzw. Speicherung in den petaloiden Segmenten legen allerdings die Vermutung nahe, dass das Enzym *in planta* über die Verfügbarkeit seines Substrates reguliert ist und ausschließlich die Zugabe von GPP in den Enzymtests mit Rohextrakten für den breiten Aktivitätszeitraum verantwortlich war. Es ist bekannt, dass z.B. die Monoterpensynthese in *Antirrhinum majus* oder *Clarkia breweri* durch die Regulation der GPP-Verfügbarkeit über die Expression der kleinen Untereinheit der GPP-Synthase reguliert wird (Tholl *et al.* 2004). *In vivo*-Supplementexperimente mit markiertem GPP könnten diese Vermutung untermauern.

In der vorliegenden Arbeit waren die wasserlöslichen glycosylierten Monoterpene nicht in der unpolaren Hexanfraktion enthalten. Obwohl das (*E*)- $\beta$ -Ocimen bisher nicht in dieser modifizierten Form beschrieben wurde, wäre die Analyse der polaren Inhaltsstoffe der petaloiden Fragmente dennoch sinnvoll, um die eventuelle Regulation der Emission durch Vorläufer oder Speichermoleküle abschließend zu untersuchen.

#### **4.5. In den Blüten der *Mirabilis jalapa* eingelagerte Stärke könnte als Ausgangsstoff für die (*E*)- $\beta$ -Ocimensynthese genutzt werden**

In den petaloiden Segmenten konnte Stärke durch beide Analysemethoden eindeutig nachgewiesen werden. Die Extraktion der Stärke war als aussagekräftiger einzustufen, da dabei die Gesamtheit der petaloiden Segmente einbezogen werden konnte. Nachweisbar war eine signifikante Abnahme des Stärkegehaltes im Gewebe im Zeitraum der vollständigen Anthese (Stadium 4). Dies könnte mit dem der Blütenöffnung zugrunde liegenden Zellwachstum in Zusammenhang stehen, das mit der Stärkehydrolyse verbunden sein soll (Evans und Reid 1988). Die dabei freigesetzten Monosaccharide führen über die Veränderung der osmotischen Bedingungen zu einem Wassereinstrom in die Zellen, der Zell-elongation bewirkt. Dadurch war kurz vor der Blütenöffnung ein drastischer Abfall im Stärkegehalt von Petalen nachweisbar (van Doorn und van Meeteren 2003). Dieses Phänomen ist zwar mit den Daten von *Mirabilis jalapa* vergleichbar. Jedoch könnte ebenfalls ein Zusammenhang zwischen abnehmender Stärkekonzentration und VOC-Produktion bestehen (Abb. 41), da der (*E*)- $\beta$ -Ocimengehalt der petaloiden Segmente im Zeitraum der abgeschlossenen Blütenöffnung maximal war. Sood *et al.* berichteten, dass Stärke in Petalen für die Kohlenstoff- und Energieverfügbarkeit wichtig sei (2006). Außerdem wurden Knospen vor der Anthese durch Markierungsexperimente mit  $^{14}\text{CO}_2$  oder  $^{14}\text{C}$ -

Sucrose als starke Verbrauchsgewebe (*sinks*) identifiziert. Diese Eigenschaft ändert sich nach der Anthese dramatisch, d.h. die photosynthetisch produzierten Metabolite werden nicht konstant in die Blüte eingelagert (Effmert *et al.* 2008). Der Stoffwechsel der geöffneten Blüte wird allein durch gespeicherte Komponenten gespeist. Dieses Phänomen wird im Zusammenhang mit der floralen Autonomie nach der Anthese gesehen, da beispielsweise die florale VOC-Produktion und -Emission in *Nicotiana suaveolens* nach dem Befall mit Herbivoren unverändert bleibt (Effmert *et al.* 2008). Vogel postulierte 1962 ebenfalls, dass die in den Osmophoren der Orchideaceae gespeicherte Stärke für die Duftbiosynthese genutzt wird. Allerdings waren die Blütengewebe nach ihrer Funktion in das stärkereiche Produktionsgewebe und das stärkefreie Emissionsgewebe getrennt. Für *Mirabilis jalapa* wurde diese Trennung und daher das Vorliegen eines Osmophors nicht bestätigt (Große 2002).



**Abb. 41: Vergleich des Stärke- und (E)-β-Ocimengehaltes der petaloiden Segmente.**

**Schwarz: Stärkegehalt (Extraktion), rot: (E)-β-Ocimengehalt.**

1 – lange Knospe, 2 – entspiralisierte Knospe, 3 – trichterförmige Blüte, 4 – vollständig geöffnete Blüte, 5 – Stigmafall, 6 – Seneszenz, *grau hinterlegt* – Dunkelphase.

Andererseits konnte bislang keine klare Korrelation zwischen Stärke und VOCs nachgewiesen werden (Bergougnoux *et al.* 2007), obwohl beispielsweise der Stärkegehalt in jungen Petalen von *Rosa x hybrida* höher als in älteren war. Darüber hinaus zeigten Versuche mit nichtduftenden Rosensorten, in denen ebenfalls Amyloplasten vorkamen, keinen Zusammenhang zwischen dem Stärkegehalt der jungen Stadien und der Duftproduktionskapazität in späten Stadien. Stärke war daher nicht der limitierende Faktor der VOC-Produktion in Rosen.

Im Verlauf der Blühphase von *Mirabilis jalapa* nahmen die Kompaktheit einerseits des Gewebes der petaloiden Segmente und andererseits der Amyloplasten ab. Diese

Ergebnisse stimmen mit denen von Bergougnoux *et al.* für *Rosa x hybrida* gemachten Aussagen überein. Allerdings waren die Amyloplasten dort im gesamten Petalengewebe verteilt und konzentrierten sich nicht wie im Falle von *Mirabilis jalapa* im Verlauf der Anthese auf die Epidermen. Diese Verteilungsunterschiede deuten auf eine epidermisspezifische VOC-Synthese hin. Morphologisch ähnelten die Amyloplasten in Blüten von *Mirabilis jalapa* denen in den Blättern von *Chamaerops humilis* nachgewiesenen, die ebenfalls in allen Geweben vorkamen (Caissard *et al.* 2004b). Auf der Ebene der Ultrastruktur wurden Unterschiede im Plastidenbau bei Rosen sichtbar: In jungen, nicht duftenden Knospen waren die Plastiden stärkeereich (Amyloplasten) und in älteren, VOC-emittierenden Petalen enthielten sie viele Lipoproteinpartikel (Plastoglobuli), die in Verbindung mit der Tocopherolbiosynthese stehen sollen (Bergougnoux *et al.* 2006, Kessler und Vidi 2007). Diese Umwandlung könnte ebenso ein Grund für die in *Mirabilis jalapa* stattfindenden Veränderungen im floral nachweisbaren Stärkegehalt während der Anthese sein.

Der Zusammenhang zwischen in den Petalen gespeicherter Stärke und der VOC-Produktion könnte einerseits durch Versuche mit markiertem Kohlenstoff für *Mirabilis jalapa* geklärt werden. Ergänzend könnten Untersuchungen an zukünftigen (*E*)- $\beta$ -OS Knockout-Mutanten zeigen, ob der Stärkeabbau geringer ist oder ausfällt. Durch Untersuchungen der Ultrastruktur wären andererseits auch auf diesem Gebiet grundlegende Erkenntnisse zu erwarten.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Abnahme des Stärkegehaltes in den petaloiden Segmenten während der Anthese einerseits mit dem damit zusammenhängenden Zellwachstum in Verbindung zu setzen ist. Andererseits ist die Verwendung der Stärke als Ressource zur VOC-Biosynthese nicht ausgeschlossen, da der sinkende Stärkegehalt zeitlich mit dem höchsten (*E*)- $\beta$ -Ocimengehalt und -emission korreliert. Daher ist nach dem derzeitigen Kenntnisstand keine eindeutige Zuordnung des sinkenden Stärkegehaltes nur zu einem Prozess vertretbar.



## 5. Zusammenfassung

Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in den Blüten der *Mirabilis jalapa* eine (*E*)- $\beta$ -Ocimensynthase vorhanden ist, deren biochemische Eigenschaften im Rohextrakt denen der bereits beschriebenen Monoterpensynthasen gleichen. Obwohl das Enzym nicht bis zur Homogenität aufgereinigt werden konnte, ermöglichten die durch ESI-MS ermittelten Peptidsequenzen die Ableitung von für *Mirabilis jalapa* spezifischen (*E*)- $\beta$ -OS-Primern. Die angestrebte Isolation des für die (*E*)- $\beta$ -OS codierenden Gens mittels dieser Primer in der RT-PCR wurde jedoch nicht erreicht. Allerdings konnte mit dem Fragment FS-35 ein Kandidat dieses Gens in Blüten identifiziert werden.

Zusätzlich zu den histologischen Untersuchungen konnte durch Hexanextraktion gezeigt werden, dass (*E*)- $\beta$ -Ocimen in den petaloiden Segmenten enthalten war. Dennoch konnte keine entwicklungsabhängige Terpenakkumulation in den Blüten durch NADI-Färbung nachgewiesen werden. Wenngleich die subzelluläre Ebene in die histologische Betrachtung noch nicht eingeschlossen werden konnte, deuten die Analysen auf eine simultane Synthese und Emission des (*E*)- $\beta$ -Ocimens hin.

Die Ergebnisse des Stärkenachweises fügen sich in die kontroverse Diskussion über die Rolle dieses Speicherstoffes in Blüten ein. Einerseits zeigt die Abnahme des Stärkegehaltes im Verlauf der Anthese auf die Bedeutung der Stärke als Reservestoff für die Synthese von Zellwandbestandteilen und als osmotisch wirksame Substanz im Zusammenhang mit dem Längenwachstum. Andererseits kann aufgrund des ähnlichen zeitlichen Verlaufes der (*E*)- $\beta$ -Ocimenproduktion auf der einen und der Anthese sowie der Abnahme des floralen Stärkegehaltes auf der anderen Seite eine direkte Korrelation von Stärkeabbau und VOC-Produktion nicht ausgeschlossen werden.

## 6. Literatur

- Adam K.-P., Crock J., Croteau R. (1996) Partial Purification and Characterization of a Monoterpene Cyclase, Limonene Synthase, from the Liverwort *Ricciocarpos natans*. Archives of Biochemistry and Biophysics 332:352–356
- Adam K.-P., Croteau R. (1998) Monoterpene Biosynthesis in the Liverwort *Conocephalum Conicum*: Demonstration of Sabinene Synthase and Bornyl Diphosphate Synthase. Phytochemistry 49:475–480
- Adam-Blondon A.-F. (2007) The French Italian sequencing project of the grapevine genome. UMR INRA-CNRS-UEVE of Research in Plant Genomics Bruxelles
- Alonso W.R., Croteau R. (1991) Purification and characterization of the monoterpene cyclase  $\gamma$ -terpinene synthase from *Thymus vulgaris*. Archives of Biochemistry and Biophysics 286: 511–517
- Alonso W.R., Rajaonarivony J.I.M., Gershenzon J., Croteau R. (1992) Purification of 4S-Limonene Synthase, a Monoterpene Cyclase from the Glandular Trichomes of Peppermint (*Mentha x piperita*) and Spearmint (*Mentha spicata*). Journal of Biological Chemistry 11:7582–7587
- Arimura G., Ozawa R., Shimoda T., Nishioka T., Boland W., Takabayashi J. (2000) Herbivory-induced volatiles elicit defense genes in lima bean leaves. Nature 406: 512–515
- Arimura G., Ozawa R., Nishioka T., Boland W., Koch T., Künemann F., Takabayashi J. (2002) Herbivore-induced volatiles induce the emission of ethylene in neighboring lima bean plants. Plant Journal 29:87–98
- Arimura G., Ozawa R., Kugimiya S., Takabayashi J., Bohlmann J. (2004) Herbivore-Induced Defense Response in a Model Legume. Two-Spotted Spider Mites Induce Emission of (*E*)- $\beta$ -Ocimene and Transcript Accumulation of (*E*)- $\beta$ -Ocimene Synthase in *Lotus japonicas*. Plant Physiology 135:1976–1983
- Arimura G., Köpke S., Kunert M., Volpe V., David A., Brand P., Dabrowska P., Maffei M.E., Boland W. (2008) Effects of Feeding *Spodoptera littoralis* on Lima Bean Leaves: IV. Diurnal and Nocturnal Damage Differentially Initiate Plant Volatile Emission. Plant Physiology 146:965–973.
- Ascensao L., Mota L., de M Castro M. (1999) Glandular Trichomes on the Leaves and Flowers of *Plectranthus ornatus*: Morphology, Distribution and Histochemistry. Annals of Botany 84:437–447
- Aubourg S., Lecharny A., Bohlmann J. (2002) Genomic analysis of the terpenoid synthase (AtTPS) gene family of *Arabidopsis thaliana*. Molecular Genetics and Genomics 267:730–745
- 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 415:146–154
- Bisio A., Corallo A., Gastaldo P., Romussi G., Ciarallo G., Fontana N., de Tomasi N., Profumo P. (1999) Glandular Hairs and Secreted Material in *Salvia blepharophylla* Brandegees ex Epling Grown in Italy. Annals of Botany 83:441–452
- Bergougnoux V., Caissard J.-C., Jullien F., Magnard J.-L., Scalliet G., Cock J.M., Hugueney P., Baudino S. (2007) Both the adaxial and abaxial epidermal layers of the rose petal emit volatile scent compounds. Planta 226:853–866
- Blum H., Beier H., Gross H.J. (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. Electrophoresis 8:93–99

- Bohlmann J., Martin D., Oldham N.J., Gershenzon J. (2000) Terpenoid Secondary Metabolism in *Arabidopsis thaliana*: cDNA Cloning, Characterization of a Myrcene/(E)- $\beta$ -Ocimene Synthase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 375:261–269
- Bowman J.W., Braxton M.S., Chruchill M.A., Hellie J.D., Starrett S.J., Causby G.Y., Ellis D.J., Ensley S.D., Maness S.J., Meyer C.D., Sellers J.R., Hua Y., Woosley R.S., Butcher D.J. (1997) Extraction Method for the Isolation of Terpenes from Plant Tissue and Subsequent Determination by Gas Chromatography. *Microchemistry Journal* 56:10–18
- Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248–254
- Cain A.J. (1947) The Use of Nile Blue in the Examination of Lipoids. *Quarterly Journal of Microscopical Science* 88:383.
- Caissard J.-C., Joly C., Bergougnoux V., Huguene P., Mauriat M., Baudino S. (2004a) Secretion mechanisms of volatile organic compounds in specialized cells of aromatic plants. *Recent Research in Developmental Molecular Cell Biology* 2:1–15
- Caissard J.-C., Meekijironenroj A., Baudino S., Anstett M.-C. (2004b) Localization of production and emission of pollinator attractant in whole leaves of *Chamaerops humilis* (Arecaceae). *American Journal of Botany* 91:1190–1199
- Camacho-Villasana Y.M., Ochoa-Alejo N., Walling L., Bray E.A. (2002) An improved method for isolating RNA from dehydrated and nondehydrated chili pepper (*Capsicum annuum* L.) plant tissues. *Plant Molecular Biology Reporter* 20:407–414
- Chang S., Pryear J., Cairney J. (1993) A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Molecular Biology Reporter* 11:113–117.
- Chen F., Ro D.-K., Petri J., Gershenzon J., Bohlmann J., Pichersky E., Tholl D. (2004) Characterization of a Root-Specific Arabidopsis Terpene Synthase Responsible for the Formation of the Volatile Monoterpene 1,8-Cineole. *Plant Physiology* 135:1–11
- Cheng S.-H., Seeman J.R. (1998) Extraction and Purification of RNA from Plant Tissues Enriched in Polysaccharides. In: R Rapley and DL Manning (editors) *Methods in Molecular Biology, volume 86: RNA Isolation and Characterization Protocols*. Totowa, N.J: Humana Press, Inc. p 27–32.
- Correns C. (1902) Über Bastardsierungsversuche mit *Mirabilis*-Sippen. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* 20:504–608
- Correns C.E. (1910) Der Übergang aus dem homozygotischen in einen heterozygotischen Zustand im selben Individuum bei buntblättrigen und gestreiftblühenden *Mirabilis*-Sippen. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* 28:418–434.
- Corsi C., Bottega S. (1999) Glandular Hairs of *Salvia officinalis*: New Data on Morphology, Localization and Histochemistry in Relation to Function. *Annals of Botany* 84:657–664
- Croteau R., Karp F. (1977) Biosynthesis of Monoterpenes: Partial Purification and Characterization of 1,8-Cineole Synthetase from *Salvia officinalis*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 179:257–265
- Croteau R., Alonso W.R., Koepp A.E., Johnson M.A. (1994) Biosynthesis of monoterpenes: partial purification, characterization, and mechanism of action of 1,8-cineole synthase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 309:184–192
- Croteau R., Satterwhite D.M. (1989) Biosynthesis of monoterpenes. Stereochemical implications of acyclic and monocyclic olefin formation by (+)- and (-)-pinene cyclases from sage. *Journal of Biological Chemistry* 264:15309–15315.

- Crowell A.L., Williams D.C., Davis E.M., Wildung M.R., Croteau R. (2002) Molecular cloning and characterization of a linalool synthase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 405: 112–121
- David R., Carde J.P. (1964) Coloration différentielle des inclusions lipidiques et terpéniques des pseudophylles du pin maritime au moyen du réactif Nadi. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Paris* 258:1338–1340
- Dicke M., Sabelis M.W. (1988) Infochemical terminology: based on cost benefit analysis rather than origin of compounds? *Functional Ecology* 2:131–139.
- van Doorn W.G., van Meeteren U. (2003) Flower opening and closure: a review. *Journal of Experimental Botany* 54:1801–1812
- Dudareva N., Pichersky E. (2000). Biochemical and molecular aspects of floral scents. *Plant Physiology* 122:627–634.
- Dudareva N., Martin D., Kish C.M., Kolosova N., Gorenstein N., Fäldt J., Miller B., Bohlman J. (2003). (*E*)- $\beta$ -Ocimene and myrcene synthase genes of floral scent biosynthesis in snapdragon: Function and expression of three terpene synthase genes of a new TPS-subfamily. *Plant Cell* 15:1227–1241
- Edwards J.B.D.M., Delort J., Mallet J. (1991) Oligodeoxyribonucleotide ligation to single-stranded cDNAs: A new tool for cloning 5' ends of mRNAs and for constructing cDNA libraries by in vitro amplification. *Nucleic Acids Research* 19:5227–32.
- Effmert U., Große J., Röse U., Piechulla B. (2002) Flower opening and floral scent production of *Mirabilis jalapa* L. Posterbeitrag, Gordon Research Conference Biology, Chemistry, and Evolution of Floral Scent 3-8.3.2002, Ventura, Kalifornien, USA
- Effmert U., Große J., Röse U.S.R., Ehrig F., Kägi R., Piechulla B. (2005) Volatile composition, emission pattern, and localization of floral scent emission in *Mirabilis jalapa* (Nyctaginaceae). *American Journal of Botany* 92:2–12
- Effmert U., Dinse C., Piechulla B. (2008) Influence of Green Leaf Herbivory by *Manduca sexta* on Floral Volatile Emission by *Nicotiana suaveolens*. *Plant Physiology* 146:1996–2007
- El-Sayed A.M. (2009) The Pherobase: Database of Insect Pheromones and Semiochemicals. <http://www.pherobase.com>
- Eisenreich W., Rohdich F., Bacher A. (2001) Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids. *Trends in Plant Sciences* 6:78–84
- Evans R.Y., Reid M.S. (1988) Changes in carbohydrates and osmotic potential during rhythmic expansion of rose petals. *Journal of the American Society for Horticultural Sciences* 113:884–888
- Eyal Y., Neumann H., Or E., Frydman A. (1999) Inverse Single Strand RACE: An Adapter Independent Method of 5' RACE. *Biotechniques* 27:656–658.
- Fäldt J., Arimura G., Gershenzon J., Takabayashi J., Bohlmann J. (2003) Functional identification of AtTPS03 as (*E*)- $\beta$ -ocimene synthase: a monoterpene synthase catalyzing jasmonate- and wound-induced volatile formation in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 216: 745–751
- Fischbach R.J., Zimmer I., Steinbrecher R., Pfichner A., Schnitzler J.-P. (2000) Monoterpene synthase activity in leaves of *Picea abies* (L.) Karst. and *Quercus ilex* L. *Phytochemistry*. 54: 257–265
- Fischbach R.J., Zimmer W., Schnitzler J.-P. (2001) Isolation and functional analysis of a cDNA encoding a myrcene synthase from holm oak (*Quercus ilex* L.). *European Journal of Biochemistry* 268:5633–5638

- Flamini G., Cioni P.L., Morell I. (2003) Differences in the fragrances of pollen, leaves , and floral parts of garland (*Chrysanthemum coronarium*) and composition of the essential oils from flowerheads and leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51:2267–2271
- Gambliel H., Croteau R. (1982) Biosynthesis of (+)- $\alpha$ -Pinene and (-)- $\beta$ -Pinene from Geranyl Pyrophosphate by a Soluble Enzyme System from Sage (*Salvia officinalis*). *Journal of Biological Chemistry* 257:2335–2342
- Ganz C. (2005) Duftstoffemission und Charakterisierung der Linalool-Synthase aus *Nicotiana glauca* Dissertation. Universität Rostock
- Gershenzon J.; Kreis W. (1999): Biochemistry of terpenoids: monoterpenes, sesquiterpenes, diterpenes, sterols, cardiac glucosides and steroid saponins. *Biochemistry of plant secondary metabolism*, CRC Press, pp 222-299
- Gershenzon J., Croteau R. (1991) in: *Herbivores: Their Interaction with Secondary Metabolites* (Rosenthal GA, and Berenbaum M eds), Academic Press, New York, pp. 165-219
- Giuliani C., Pellegrino R., Tirillini B., Maleci Bini L. (2008) Micromorphological and chemical characterization of *Stachys recta* L. subsp. *serpentina* (Fiori) Arrigoni in comparison to *Stachys recta* L. subsp. *recta* (Lamiaceae). *Flora* 203:376–385
- Gookin T.E., Hunter D.A., Reid M.S. (2003). Temporal analysis of alpha and beta-expansin expression during floral opening and senescence. *Plant Sciences*. 164:769–781.
- Große J. (2002) Untersuchungen zur Duftstoffemission aus *Mirabilis jalapa* L. Diplomarbeit. Universität Rostock
- Hampel D., Mosandl A., Wust M. (2005) Biosynthesis of mono- and sesquiterpenes in carrot roots and leaves (*Daucus carota* L.): metabolic cross talk of cytosolic mevalonate and plastidial methylerythritol phosphate pathways. *Phytochemistry* 66: 305–311
- Harada T., Yuba-Kubo A., Sugiura Y., Zaima N., Hayasaka T., Goto-Inoue N., Wakui M., Suematsu M., Takeshita K., Ogawa K., Yoshida Y., Setou M. (2009) Visualization of Volatile Substances in Different Organelles with an Atmospheric-Pressure Mass Microscope. *Analytical Chemistry* 81:9153–9157
- Heath R.R., Manukian A. 1994. An automated system for use in collecting volatile chemicals released from plants. *Journal of Chemical Ecology* 20:593–608.
- Heil M., Bueno J.C.S. (2007) Within-plant signaling by volatiles leads to induction and priming of an indirect plant defense in nature. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104:5467–5472.
- Hosoi M., Ito M., Yagura T., Adams R.P., Honda G. (2004) cDNA Isolation and Functional Expression of Myrcene Synthase from *Perilla frutescens*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 27:1979–1985
- Hudak K.A., Thompson J.E. (1997) Subcellular Localization of Secondary Lipid Metabolites Including Fragrance Volatiles in Carnation Petals. *Plant Physiology* 114:705–713
- Hudson A. [www.arabidopsis.org/comguide/chap\\_4\\_rna\\_techniques/1\\_RNA\\_extraction.html](http://www.arabidopsis.org/comguide/chap_4_rna_techniques/1_RNA_extraction.html)
- Hirotsune S., Yoshida N., Chen A., Garrett L., Sugiyama F., Takahashi S., Yagami K.-I., Wynshaw-Boris A., Yoshiki A. (2003) An expressed pseudogene regulates the messenger-RNA stability of its homologous coding gene. *Nature* 423:91–96
- Iijima Y., Gang D.R., Fridman E., Lewinsohn E., Pichersky E. (2004) Characterization of geraniol synthase from the peltate glands of sweet basil. *Plant Physiology* 134: 370–379
- Ishiwari H., Suzuki T., Maeda T. (2007) Essential compounds in herbivore-induced plant volatiles that attract the predatory mite *Neoseiulus womersleyi*. *Journal of Chemical Ecology* 33: 1670–1681

- Jasski M., Stukkens Y., Degand H., Purnelle B., Marchand-Brynaert J., Boutry M. (2001) A Plant Plasma Membrane ATP Binding Cassette-Type Transporter Is Involved in Antifungal Terpenoid Secretion. *Plant Cell* 13:1095–1107
- Jia J.-W., Crock J., Lu S., Croteau R., Chen X.-Y. (1999) (3R)-Linalool Synthase from *Artemisia annua* L.: cDNA Isolation, Characterization, And Wound Induction. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 372:143–149
- Jetter R. (2006) Examination of the processes involved in the emission of scent volatiles from flowers. In: Dudareva N, Pichersky E (eds) *Biology of floral scent*. Informa Healthcare, London, pp 125–144
- Junker R.R., Blüthgen N. (2010) Floral scents repel facultative flower visitors, but attract obligate ones. *Annals of Botany* 105:777–782
- Kampranis S.C., Ionnidis D., Purvis A., Mahrez W., Ninga E., Katerelos N.A., Anssour S., Dunwell J.M., Degenhardt J., Makris A.M., Goodenough P.W., Johnson C.B. (2007) Rational Conversion of Substrate and Product Specificity in a *Salvia* Monoterpene Synthase: Structural Insights into the Evolution of Terpene synthase Function. *Plant Cell* 19:1994–2005
- Kesselmeyer J., Staudt M. (1999) Biogenic volatile organic compounds (VOC): an overview on emission, physiology and ecology. *Atmospheric Chemistry and Physics* 33:23–88
- Kessler F., Vidi P.-A. (2007) Plastoglobule Lipid Bodies: their Functions in Chloroplasts and their Potential for Applications. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology* 107:153–172
- Kolb D., Müller M. (2004) Light, Conventional and Environmental Scanning Electron Microscopy of the Trichomes of *Cucurbita pepo* subsp. *pepo* var. *styriaca* and Histochemistry of Glandular Secretory Products. *Annals of Botany* 94:515–526
- Kolosova N., Sherman D., Karlson D., Dudareva N. (2001) Cellular and Subcellular Localization of S-Adenosyl-L-Methionine:Benzoic Acid Carboxyl Methyltransferase, the Enzyme Responsible for Biosynthesis of the Volatile Ester Methylbenzoate in Snapdragon Flowers. *Plant Physiology* 126:956–964
- Knudsen J.T., Eriksson R., Gershenzon J., Ståhl B. (2006) Diversity and Distribution of Floral Scent. *Boanical. Review* 72:1–120
- Laule O., Fürholz A., Chang H., Zhu T., Wang X., Heifetz P.B., Grissem W., Lange M. (2003). Crosstalk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100:6866–6871.
- Lämmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685
- Leal A.A., Terada Y., de Fátima Pires da Silva Machado M. (2001) Floral biology of a population of *Mirabilis jalapa* L. (*Nyctaginaceae*) from Southern Brazil. *Acta Scientiarum* 23:587–591
- Lebon G., Duchene E., Brun O., Magné C., Clément C. (2004) Flower abscission and inflorescence carbohydrates in sensitive and non-sensitive cultivars of grapevine. *Sexual Plant Reproduction* 17:71–79
- Lee S., Chappell J. (2008) Biochemical and Genomic Characterization of Terpene Synthases in *Magnolia grandiflora*. *Plant Physiology* 147:1017–1033
- Loreto F., Ciccioli P., Brancaleoni E., Cucinato A., Frattoni M. (1998) Measurement of isoprenoid content in leaves of Mediterranean *Quercus spp.* by a novel and sensitive method and estimation of the isoprenoid partition between liquid and gas phase inside the leaves. *Plant Science* 136:25–30

- Machado S.R., Gregório E.A., Guimaraes E. (2006) Ovary Peltate Trichomes of *Zeyheria montana* (Bignoniaceae): Developmental Ultrastructure and Secretion in Relation to Function. *Annals of Botany* 97:357–369
- MacTavish H.S., Menary R.C. (1997) Volatiles in different floral organs, and effect of floral characteristic on yield of extract from *Boronia megastigma* (nees). *Annals of Botany* 80:305–311
- Martinez del Rio C., Burquez A. (1986). Nectar production and temperature-dependent pollination in *Mirabilis jalapa*. *L. Biotropica* 18:28–31
- Meir S., Hunter D.A., Chen J.-C., Halaly V., Reid M.S. (2006) Molecular Changes Occurring during Acquisition of Abscission Competence following Auxin Depletion in *Mirabilis jalapa*. *Plant Physiology* 141:1604–1616
- Mithöfer A., Wanner G., Boland W. (2005) Effects of Feeding *Spodoptera littoralis* on Lima Bean Leaves. II. Continuous Mechanical Wounding Resembling Insect Feeding Is Sufficient to Elicit Herbivory-Related Volatile Emission. *Plant Physiology* 137:1160–1168
- Nagegowda D.A., Gutensohn M., Wilkerson C.G., Dudareva N. (2008) Two nearly identical terpene synthases catalyze the formation of nerolidol and linalool in snapdragon flowers. *Plant Journal* 55:224–239
- Navia-Giné W.G., Yuan J.S., Mauromoustakos A., Murphy J.B., Chen F., Korth K.L. (2009a) *Medicago truncatula* (*E*)-beta-ocimene synthase is induced by insect herbivory with corresponding increases in emission of volatile ocimene. *Plant Physiology and Biochemistry* 475:416–25
- Navia-Giné W.G., Gomez S.K., Yuan J., Chen F., Korth K.L. (2009b) Insect-induced gene expression at the core of volatile terpene release in *Medicago truncatula*. *Plant Signalling and Behavior* 4:639–641.
- Ni X.-L., Peng L., Liu W.-Z. (2007) Structures, Components and Functions of Secretory Tissues in *Houttuynia cordata*. *Journal of Integrative Plant Biology*. 49:1734–1745
- Niesenbaum R.A. (1999). The effects of pollen load size and donor diversity on pollen performance, selective abortion, and progeny vigor in *Mirabilis jalapa* (Nyctaginaceae). *American Journal of Botany* 86:261–268.
- Niinemets Ü., Reichstein M. (2002a) Effects of nonspecific monoterpenoid storage in leaf tissues on emission kinetics and composition in Mediterranean sclerophyllous *Quercus* species: a model analysis. *Global Biogeochemical Cycles* 16: 1110–1136
- Niinemets Ü., Reichstein M., Staudt M., Seufert G., Tenhunen J.D. (2002b). Stomatal constraints may affect emission of oxygenated monoterpenoids from the foliage of *Pinus pinea*. *Plant Physiology* 130:1371–1385.
- Olsen J.V., Ong S.-E., Mann M.. (2004) Trypsin Cleaves Exclusively C-terminal to Arginine and Lysine Residues. *Molecular and Cellular Proteomics* 3:608–614
- Oyama-Okubo N., Ando T., Watanabe N., Marchesi E., Uchida K., Nakayam M. (2005) Emission mechanism of floral scent in *Petunia axillaris*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 69:773–777
- Ozawa R., Shimoda T., Kawaguchi M., Arimura G., Horiuchi J., Nishioka T., Takabayashi J. (2000) *Lotus japonicus* Infested with Herbivorous Mites Emits Volatile Compounds That Attract Predatory Mites. *Journal of Plant Research* 113:427–433
- Pauly G., Belingheri L., Marpeau A., Gleizes M. (1986) Monoterpene formation by leucoplasts of *Citrofortunella mitis* and *Citrus unshiu*. *Plant Cell Reports* 5:19–22
- Pichersky E., Lewinsohn E., Croteau R. (1995) Purification and Characterization of S-Linalool Synthase, an Enzyme Involved in the Production of Floral Scent in *Clarkia breweri*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 316:803–807

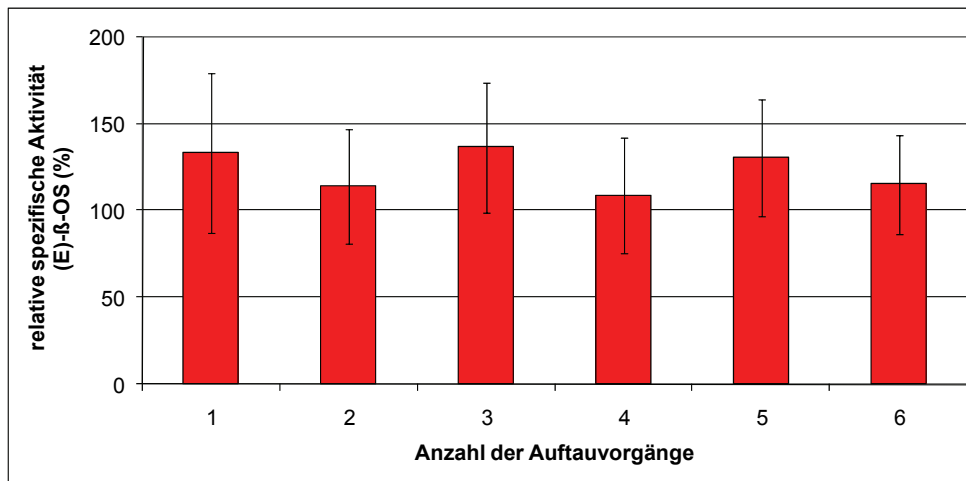


- Rajaonarivony J.I.M., Gershenzon J., Croteau R. (1992) Characterization and Mechanism of (4S)-Limonene Synthase, a Monoterpene Cyclase from the Glandular Trichomes of Peppermint (*Mentha x piperita*). Archives of Biochemistry and Biophysics 296:49–57
- Roeder S., Hartmann A.-M., Effmert U., Piechulla B. (2007) Regulation of simultaneous synthesis of floral scent terpenoids by the 1,8-cineole synthase of *Nicotiana suaveolens*. Plant Molecular Biology 65:107–124
- Rohrbeck D., Buss D., Effmert U., Piechulla B. (2006) Localization of methyl benzoate synthesis and emission in *Stephanotis floribunda* and *Nicotiana suaveolens* flowers. Plant Biology 8:615–26
- Sallaud C., Rontein D., Onillon S., Jabès F., Duffé P., Giacalone C., Thoraval S., Escoffier C., Herbette G., Leonhardt N., Causse M., Tissier A. (2009) A Novel Pathway for Sesquiterpene Biosynthesis from Z,Z-Farnesyl Pyrophosphate in the Wild Tomato *Solanum habrochaites*. Plant Cell 16:3110–3131
- Schiestl F.P., Ayasse M., Paulus H.F., Erdmann D., Fancke, W. 1997. Variation of floral scent emission and postpollination changes in individual flowers of *Ophrys sphegodes* subsp. *sphgodes*. Journal of Chemical Ecology 23:2881–2895.
- Schillmiller A.L., Schauvinhold I., Larson M., Xu R., Charbonneau A.L., Schmidt A., Wilkerson C., Last R.L., Pichersky E. (2009) Monoterpenes in the glandular trichomes of tomato are synthesized from a neryl diphosphate precursor rather than geranyl diphosphate. PNAS 106:10865–10870
- Sharkey T.D. (1991) Stomatal control of trace gas emissions. Aus: Trace gas emissions by plants. (Sharkey TD et al. (eds)), Academic Press, pp 335–339
- Sharkey T.D., Wiberley A.E., Donohue A.R. (2008) Isoprene Emission from Plants: Why and How. Annals of Botany 101:5–18
- Shelton D., Zabarás D., Chohan S., Wyllie S.G., Baverstock P., Leach D., Henry R. (2004) Isolation and partial characterization of a putative monoterpene synthase from *Melaleuca alternifolia*. P Physiol. Biochem. 42:875–882
- Shimada T., Endoa T., Fujii H., Hara M., Omura M. (2005) Isolation and characterization of (E)-beta-ocimene and 1,8 cineole synthases in *Citrus unshiu* Marc. Plant Science 168:987–995
- Sood S., Vyas D., Nagar P.K. (2006) Physiological and biochemical studies during flower development in two rose species. Scientia Horticulturae. 108:390–396
- Starks C.M., Back K., Chappell J., Noel J.P. (1997) Structural basis for cyclic terpene biosynthesis by tobacco 5-epi-aristolochene synthase. Science, 277:1815–1820.
- Taiz L., Zeiger E. (2008) Physiologie der Pflanzen, Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg
- Tessier D.C., Brosseau R., Vernet T. (1986) Ligation of single-stranded oligodeoxyribonucleotides by T4 RNA ligase. Analytical Biochemistry 158:171–178.
- Theis N., Raguso R.A. (2005) The effect of pollination on floral fragrance in thistles. Journal of Chemical Ecology 31:2581–2600.
- Theis N. (2006) Fragrance of Canada thistle (*Cirsium arvense*) attracts both floral herbivores and pollinators. Journal of Chemical Ecology 32:917–27
- Thibaud-Nissen F., Ouyang S., Buell R. (2009) Identification and characterization of pseudogenes in the rice gene complement. BMC Genomics 10:317–330
- Thieme et al. (1972) Pharmazie 27:255



- Tholl D., Kish C.M., Orlova .I., Sherman D., Gershenzon J., Pichersky E., Dudareva N. (2004) Formation of Monoterpenes in *Antirrhinum majus* and *Clarkia breweri* Flowers Involves Heterodimeric Geranyl Diphosphate Synthases. *Plant Cell* 16:977–992
- Tholl D., Chen F., Petri J., Gershenzon J., Pichersky E. (2005) Two sesquiterpene synthases are responsible for the complex mixture of sesquiterpenes emitted from *Arabidopsis* flowers, *Plant Journal* 42:757–771
- Tholl D. (2006) Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism. *Current Opinon in Plant Biology* 9:297–304
- Troutt A.B., McHeyzer-Williams M.G., Pulendran B., Nossal G.J. (1992) Ligation-anchored PCR: A simple amplification technique with single-sided specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89:9823–5.
- Vainstein A., Lewinsohn E., Pichersky E., Weiss D. (2001) Floral Fragrance. New Inroads into an Old Commodity. *Plant Physiology* 127:1308–1389
- Vogel S. (1962) Duftdrüsen im Dienste der Bestäubung. *Akademie der Wissenschaften und der Literatur. Abhandlungen der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Klasse* 10:598–763
- Wang L., Wessler S.R. (2001) Role of mRNA Secondary Structure in Translational Repression of the Maize Transcriptional Activator Lc. *Plant Physiology*. 125:1380–1387
- Winer D.M., Arey J., Atkinson R., Aschmann S.H., Long W.D., Morrison C.L., Olszyk D.M. (1992) Emission rates of organics from vegetation in California’s Central Valley. *Atmospheric Environment* 26A:2647–2659
- Wise M.L., Rorrer G.L., Polzin J.J., Croteau R. (2002) Biosynthesis of Marine natural Products: Isolation and Characterization of a Myrcene Synthase from Cultured Tissues of the Marine Red Alga *Ochtodes secundiramea*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 400:125–132
- Wise M.L., Savage T.J., Katahira E., Croteau R. (1998) Monoterpene Synthases from Common Sage (*Salvia officinalis*). cDNA isolation, characterization, and functional expression of (+) sabinene synthase, 1,8-cineole synthase and (+) bornyl diphosphate synthase. *Journal of Biological Chemistry* 273:14891–14899.
- Xu X., Hunter D., Reid M.S. (2005) An Efficient Regeneration System for Four O’clocks (*Mirabilis jalapa*) in Proc. VIIIth IS Postharvest Phys. Ornamentals Eds. N. Marissen et al. *Acta Hort.* 669, ISHS 2005
- Xu X., Gookin T., Jiang C.-Z., Reid M. (2007) Genes associated with opening and senescence of *Mirabilis jalapa* flowers. *Journal of Experimental Botany* 58:2193–2201
- Yu F., Utsumi R. (2009) Diversity, regulation and genetic manipulation of plant mono- and sesquiterpenoid biosynthesis. *Cellular and Molecular Life Sciences* 66:3043–3052
- Zaccai M., Jia G., Chen X., Genis O., Feibin D., Gesua R. (2007) Regeneration and transformation system in *Mirabilis jalapa*. *Scientia Horticulturae* 111:304–309
- Zhang P.-J., Zheng S.-J., van Loon J.J.A., Boland W., David A., Mumm R., Dicke M. (2009) Whiteflies interfere with indirect plant defense against spider mites in Lima bean. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106:21202–21207.

## 7. Anhang



**Abb. 42: Einfluss von mehreren Auftauzyklen auf die spezifische Aktivität der (E)-β-OS.**

Frisch hergestellte Rohextrakte von petaloiden Segmenten (Ernte: 16–18 Uhr) wurden nach der Entnahme eines zur Analyse im *in vitro*-Assay (55 μM GPP) genutzten Aliquots bei -20°C gefroren, anschließend im Eisbad aufgetaut und erneut gefroren. SD+MW aus n=4, 100%=frischer Rohextrakt (11,0 ± 5,2 fkat/mg). (Welch-Test; α=0,05, Bezugsgröße: Aktivität im frischen Rohextrakt).

Nummer (Swiss-Prot)	Name	Spezies
Q940E7_AGARU	D-Limonensynthase	<i>Agastache rugosa</i>
Q84NC9_ANTMA	Myrcensynthase 1e20	<i>Antirrhinum majus</i>
Q84ND0_ANTMA	Myrcensynthase Oc15	<i>Antirrhinum majus</i>
Q84NC8_ANTMA	(E)-β-Ocimensynthase	<i>Antirrhinum majus</i>
Q84UV0_ARATH	Linaloolsynthase	<i>Arabidopsis thaliana</i>
O23516_ARATH	Limonencyclase	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Q84UV1_ARATH	Monoterpensynthase	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Q9LRZ6_ARATH	Limonencyclase 1,8-Cineol- synthase	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Q9LDF1_ARATH	Limonencyclase	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Q84NE5_ARATH	(E)-β-Ocimensynthase (Fragment)	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Q9FVI8_ARATH	Myrcen/Ocimensynthase (Fragment)	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Q94G53_ARTAN	(-)-β-Pinensynthase	<i>Artemisia annua</i>
Q9SPN1_ARTAN	(3R)-Linaloolsynthase	<i>Artemisia annua</i>
Q8GUE4_9MAGN	Geraniolsynthase	<i>Cinnamomum tenuipile</i>
Q8L5K4_CITLI	γ-Terpinensynthase	<i>Citrus limon</i>
Q8L5K2_CITLI	(-)-β-Pinensynthase	<i>Citrus limon</i>
Q8L5K1_CITLI	(+)-Limonensynthase 2	<i>Citrus limon</i>
RLC1_CITLI	(R)-Limonensynthase 1	<i>Citrus limon</i>
Q6F5H3_CITUN	D-Limonensynthase	<i>Citrus unshiu</i>
Q5CD81_CITUN	(E)-β-Ocimensynthase	<i>Citrus unshiu</i>
Q6F5H0_CITUN	γ-Terpinensynthase	<i>Citrus unshiu</i>
Q6F5G9_CITUN	β-Pinensynthase	<i>Citrus unshiu</i>
Q5CD82_CITUN	Monoterpensynthase	<i>Citrus unshiu</i>
Q96376 LIS_CLABR	S-Linaloolsynthase	<i>Clarkia breweri</i>
Q9ZPN5_CLACO	Linaloolsynthase	<i>Clarkia concinna</i>
Q0PCI4_EUCGL	Monoterpensynthase	<i>Eucalyptus globulus</i>
Q0PCI3_EUCGL	Monoterpensynthase	<i>Eucalyptus globulus</i>
Q2XSC4_LAVAN	(E)-α-Bergamotensynthase	<i>Lavandula angustifolia</i>
Q2XSC5_LAVAN	Linaloolsynthase	<i>Lavandula angustifolia</i>
Q2XSC6_LAVAN	Limonenesynthase	<i>Lavandula angustifolia</i>
A0ERE2_9LAMI	Linaloolsynthase	<i>Lavandula latifolia</i>
Q672F7_LOTJA	(E)-β-Ocimensynthase 1,8-Cineolsynthase	<i>Lotus japonicus</i> . <i>Lotus corniculatus</i> var.

# Anhang

		<i>japonicus</i>
A0RZI3_MEDTR	Terpensynthase	<i>Medicago truncatula</i>
Q5UB06_MEDTR	Wundinduzierbare putative Chloroplasten Terpensynthase 3	<i>Medicago truncatula</i>
A0RZI3_MEDTR	Terpensynthase	<i>Medicago truncatula</i>
Q5UB07_MEDTR	Wundinduzierbare putative Chloroplasten Terpensynthase 4	<i>Medicago truncatula</i>
Q7Y1V1_9MYRT	Putative Monoterpensynthase	<i>Melaleuca alternifolia</i>
Q8H2B4_MENAQ	Linaloolsynthase	<i>Mentha aquatica</i>
Q40322_MENSP	4S-Limonensynthase	<i>Mentha spicata</i>
Q9SW76_MENLO	Limonensynthase	<i>Mentha longifolia</i>
	Linaloolsynthase	<i>Nicotiana glauca</i>
A5Y5L5_9SOLA	1,8-Cineolsynthase	<i>Nicotiana glauca</i>
Q6USK1_OCIBA	Geraniolsynthase	<i>Ocimum basilicum</i>
Q5SBP3_OCIBA	R-Linaloolsynthase	<i>Ocimum basilicum</i>
Q5SBP0_OCIBA	Terpinolensynthase	<i>Ocimum basilicum</i>
Q5SBP2_OCIBA	Fencholsynthase	<i>Ocimum basilicum</i>
Q5SBP1_OCIBA	$\beta$ -Myrcensynthase	<i>Ocimum basilicum</i>
Q8W1J9_PERFR	Linaloolsynthase	<i>Perilla frutescens</i> var. <i>crispa</i>
Q09HU5_PERFR	Geraniolsynthase	<i>Perilla frutescens</i> var. <i>crispa</i>
O04806_PERFR	Limonencyclase	<i>Perilla frutescens</i> var. <i>acuta</i>
Q9AXM7_PERFR	Limonensynthase	<i>Perilla frutescens</i> var. <i>frutescens</i>
Q9FV73_PERFR	Limonensynthase	<i>Perilla frutescens</i>
Q9FV72_PERFR	Limonensynthase	<i>Perilla frutescens</i>
Q7GDN8_PERFR	1-Limonensynthase	<i>Perilla frutescens</i>
Q9LKM5_PERFR	Myrcensynthase	<i>Perilla frutescens</i>
Q308N0_PERFR	Geraniolsynthase	<i>Perilla frutescens</i>
Q4JHG3_9LAMI	Geraniolsynthase	<i>Perilla citriodora</i>
Q9FV75_9LAMI	Limonensynthase	<i>Perilla citriodora</i>
Q9M5A4_9LAMI	Limonensynthase	<i>Perilla citriodora</i>
Q5D1Y7_9LAMI	Linaloolsynthase	<i>Perilla citriodora</i>
A1JH12_QUEIL	Pinensynthase	<i>Quercus ilex</i>
Q93X23_QUEIL	Putative Chloroplasten Terpensynthase	<i>Quercus ilex</i>
A0SNS9_ROSOF	Cinenolsynthase	<i>Rosmarinus officinalis</i>
SCS_SALOF -	1,8-Cineolsynthase	<i>Salvia officinalis</i>
SSS_SALOF (+)	Sabinensynthase	<i>Salvia officinalis</i>
BPPS_SALOF	(+)-Bornyldiphosphatsynthase,	<i>Salvia officinalis</i>
Q8L5J7_9LAMI	3-Carensynthase	<i>Salvia stenophylla</i>
Q9FUW5_9LAMI	(+)-4R-Limonensynthase	<i>Schizonepeta tenuifolia</i>
Q1XBU5_SOLLC	Monoterpensynthase 1	<i>Solanum lycopersicum</i>
Q1XBU4_SOLLC	Monoterpensynthase 2	<i>Solanum lycopersicum</i>
Q6PWU2_VITVI	Terpenoidsynthase	<i>Vitis vinifera</i>
Q6PWU1_VITVI	Terpenoidsynthase	<i>Vitis vinifera</i>

**Tab. 16: In der Terpensynthasen-Datenbank berücksichtigte Monoterpensynthasen**

## Anhang

AB110638 PVDQTIIRR-SADYGPTIW-SVDYIQSLDS-EYKEKSYARQLQKLKEQVSAMLQQDNKVV 105  
AY917193 PADEILTARRSGNYQPSLW-DFNYLQSLNTTHYKEERHLKREAEELIEQVKMLLDEE--- 108  
AL161544 CQRNERNQRRHGESPSPQE-RLISLIDKNVRNRLTMSGGGVLYKDGMRKEVETAEK-- 102  
AY195609 TSRWNIPGDBGSTPPPSKL-HQALCLNEHSLSCMAELPMDYEGKIKETRHLLHLKGEN-- 97  
U58314 QNRDDILTREEVDEKKQYSPLLLFLEALPAQSYDNDVLKQIIDKNLSNDGSLQSPSATA 240  
:  
AB110638 -----DLDPHQLLELIDNLHRLGVSYHFEDEIK 133  
AY917193 -----MEAVQKLDLVDDLKNLGLSYFFEDQIK 135  
AL161544 -----AILFKEELEMIDSLQRLGISYHKHEIH 130  
AY195609 -----DPIESLIFVDATLRLGVNHHFQKEIE 123  
U58314 RAYMITGNTRCLSYLHSLTNSCSNGGVPSFYVDDDLHDLVMVNQLTRSGLTEHLIPEID 300  
..\* ::: .\*: . :\*.  
AB110638 RTLDRIHNKN-----TNKSLYARALKFRILRQYGYNTPVKETFSRFMDEKGS- 180  
AY917193 QILTFIYNEHECFRS---NVEAKERDLYFTALGFRLLRQHGFQVS-QEVFDCFKNEEGS- 190  
AL161544 DILRKIHQHG-----EIERETQDLHATSLEFILLRQHGFQVS-QDAFDVFISETG-- 180  
AY195609 EILRKSYATMKS-----PIICEYHTLHEVSLFFRLMRQHGRVYS-ADVFNPFKGESG-- 174  
U58314 HLLLVQKNYKYYKASPKSLYSTAAELYRDSLAFWLLRVNNHWS-PSIFCWFDDDEIR 359  
\* \*: \* \*: \* . . . \* \* :.  
AB110638 -FKLSSHSDCKGMLALYEAAYLLVEEESSIFRDAIRFTTAYLKEWVVK--HDIDKNDD 236  
AY917193 -DFKASLGDDTKGLLQLYEASFLLREGED-TLELARQYATKFLQKKVDH--ELID--DD 243  
AL161544 -EFRKTLHSDIKGLLSLYEASYFSMDSEF-KLKETRIYANKRLSEFVAES-SKTICREDE 237  
AY195609 -RFKEELKRDTRGLVELYEAQLSFEGER-ILDEAENFSRQILHGNLAG-----ME 223  
U58314 DHJETNYEEFAAVLLNVYRATDLMFSGEV-QLVEARSFATKNLEKILATGNIHKTNADIS 418  
:::\*.\*: : . \* : : : \* :  
AB110638 EYLC TLVKHALELPLHWRMRRLLEARWFDVYESGPD MN-----PILDLAKL 283  
AY917193 SNLLSWIRHSLEIPLHWRIQRLEARWFLDAYATRHDVN-----PIILELAKL 290  
AL161544 TYILEMVKRALETPYHWSIRRLLEARWYINVYEKKHEMN-----PLLLFAAI 284  
AY195609 DNLRRSVGNKLRYPFHTSIRFTGRNYDDDLGGM YEWG-----KTRELALM 270  
U58314 SSLHKMIEHEL RVPWTARMDHVENRIWIEE IASSALWFGKSSYLRLSCFHKMSLQQLAVK 478  
: : . \*. \* : : . \* : : : : \* :  
AB110638 DFNIVQAVHQEDIKYASRWKKIGLGERLNFARDRIMENFFWTVGVIFEPN-FGYCRMMS 342  
AY917193 DFNIRATQQEELKDL SRWWNSTCLAELKLPFVRDRLVESYFWAIALFEPHQ-YGYHRKIA 349  
AL161544 DFNMLQANHQEELKLIS---STGLMKQLDFVRDRITESYFWTIGIFYEPE-FKYCRKIL 339  
AY195609 DLQVERS VYQEELQVSKWWNELGLYKKLN LARNRPFEFYTWSMVILADYINLSEQRVEL 330  
U58314 NYTLRQLVYRDELAEVERWSKERGLCDMGFCREKTGYCYAFAASTCLPWS--SDVRLVL 536  
: : : : : . . \* . . : : \*  
AB110638 TMVNALITTI DDVYDVYGTLDLELFTDAVERWDATTIEQLPDYMKLCFHALHNSINEMA 402  
AY917193 AKIITLITSLDDVYDIYGTLDLELQ LFTDAIQRWDTESISRPLPYMQLFYMVLYNFVSELA 409  
AL161544 TKIFMLIVIMDDIYDIYGTLELELFTNVVEKWDVNHVERLPNYMRMCFLLYNEINQIG 399  
AY195609 TKSVAFIYLI DDIFDVYGTLDLELIIFTEAVNKWDYSATDTLPENMKMCCMTLLDTINGTS 390  
U58314 TKAAVVI TVADDFDVEGSMVLEKLTDAVRWD AEGLG--SHSKTIFEALDDL VNEVR 593  
: . \* \*\*.:\*: \*: : \* :\*:.:\*\* : \* : :.  
AB110638 FDALRDQGVGMVISYLKKA WADICKTYLVEAKWYN-NGYIPTLQEYMENAWISISAPVIL 461  
AY917193 YDGLKEK--GFII PYLQRSWADLVVAYLKEAKW FY-NGYTPSMEEYLN NAYISIGATPVI 466  
AL161544 YDVL RDKG-LNVIPYLKQVWTDLFKTF LTESKWYK-TGHKPSFEEYMQNGVVISSSVPTIL 457  
AY195609 QKIYEK HG-YNPIDSLKTTWKSLSAFLVEAKWSA-SGSLPSANEYLENEKVS SGVYVVL 448  
U58314 LKCFQQNG-QDIKNNLQQQLWYETFH SWLMEAKWGKGLTSKPSVDVYLG NAMTSIAAHTMV 652  
 . . : \* : \* . :\*: \*\* \* : : \* : \* \* . . : :  
AB110638 VHAYTYTANPITKEGLEFVKDYPNI IRWSSIILRLADDLGTSSDELKRGDVHKS IQCYMH 521  
AY917193 SQVFFTLATSIDKPVIESLYEYHRI LRSLGMLVRLPDDLGTSSFEMKRGDVPKTIELYMK 526  
AL161544 LHLFSVLSDHISDQTLTDDSKNHSVVRSCATILRLANDLATSTEEMARGDSPKSVQCYMY 517  
AY195609 VHLFCMLGLGGSRSRGSIELNDTQELMSSIAIIFRLWNDLGS AKNEHQNGKDGSYLNCYKK 508  
U58314 LTASCLLGPGFPVHQ LWSQRRHQDITSLLMVLTRLLNDIQSYLKEEDEGKIN-YVWMYMI 711  
 . : : \* \*: : \* . . : \*  
AB110638 EAG-VSEREAREHI HDLIAQTWMKMNRDR-FGNPHFVSDV FVGIAMNLARMSQCMYQFG- 578  
AY917193 ERN-ATEIEAQEHVRFLIREAWKEMNTAT-AAADCPFTDDLVA AANLGRAAQFMYLDG- 583  
AL161544 ETR-ASEEEARRHMQSMISDSWDIINS DLKTAHTSSSLPRGFLAAAANLNRVVQCIYRHG- 575  
AY195609 EHINLTAAQAHEHALELVAIEWKRLNKES-FNLNHDSVSSFKQAALN LARMVPLMYSYD- 566  
U58314 ENNQASIDDSVRHVQT IINVKKQEFIQRVLS DQHCNLPKSFQQLHFSC LKVFNMFFNSSN 771  
\* : : . \* : : : : . : : : .

AB110638 – Cineolsynthase *Citrus unshiu*, AK118969 – Limonencyclase *Arabidopsis thaliana*, U58314 – S-Linaloolsynthase *Clarkia breweri*, AY195609 – Myrcensynthase *Antirrhinum majus* und AY197193 – Linaloolsynthase *Perilla citriodora*; Rot – Peptide; Linie – DDXXD-Motiv.

AY766249	-----MAFSLS-----FATSTKHSSTFNSSKNTSNILEYKNNTLTSVFNQIHIP	42
AY195609	MAFCISYLGAVLPPFSLSPRTKFAIFHNTSKHAAYKTCRWNIPRDVGSTPPPSKLHQALCL	60
	: . * * * *            * : . : * * : : : : . : . * . * : : *	
AY766249	--KSGKCKDDLHIRHAKALDEVKQVFVRNIRKNTDECLSMVDSIQRLGMEYNFEEEEIEAT	100
AY195609	NAHSTS <del>CMAELPMDYE</del> GKIQGTRHLLHLKDENDPIESLI FVDATQRLGVNHFFQK <b>E T E I</b>	120
	: * . * : * : : : : : : : : : : : . : . : . * . * : * : * * * : : : : * * * :	
AY766249	LERKH <del>TMLRFQN</del> FQRNEYQGLSQAAFQFRMLRQE <del>GY</del> IISPDI <del>FKDC</del> NKGKLYTFSED	160
AY195609	<b>R</b> KSYATMKSPSICK--YHTLHDVSLFFCLMRQHGRYVSADVN <del>NNFGESGRFKEELKR</del> D	178
	* . : : : : : : : : : * : * : : : * : * * . * * . * : * : * . : . * : * : . . *	
AY766249	INGMIALFEASQLSIEGEDCLDNVGQFCGQYLNDWSSTFHGHQPAKFVAHTLMYPH <del>TKTL</del>	220
AY195609	TRGLVELYEAAQLSFEGE <del>RI</del> LDEAENFSRQILHG <del>NLAS</del> MEDN-LRRSVGNKLRYPFH <del>KSI</del>	237
	. : : : * : * * : * * . * * * : : . : . * * * . : : : : : : : * . : . * * * * : :	
AY766249	SRFTPTIMQSQN---ATW <del>TNSIQQ</del> FSKIDTQM <del>VSSSHLKE</del> IFAVSKWWKDLGLP <b>KDLEFA</b>	277
AY195609	ARFTGINYDDDLGGMYEWGKTRELALMDLQVERSVYQEELLQVSKWWNELGLYKKLTLA	297
	: * * * : : : :        * : : : : : : : * : * : : : : : * * * : : * * : *	
AY766249	<b>RDEPIK</b> WYSWSMACLPDPQ-FSEERIETKPLSLIYIIDIFFFYGNIDELTFLTDAVKR	336
AY195609	RNRPEEFYMWSMVILT <del>DYIN</del> LSEQRVELTKSAFIY <del>LI</del> DDIFFDVYGTLD <del>E</del> LIIFTEAVNK	357
	* . : : : : * * * . * . * : * * : * * * . : : : * * * * * . * . : * * : * * : * * :	
AY766249	WDLSAIEQLPCDKVCFKALYDITNEFALRTYIKHGWNP <del>LTSLIKSWRLLNAFLQEAKW</del>	396
AY195609	WDYSATDTLPDNMKCMYMTLLDTNGTSQKIYEKYGHNPIDS <del>LKTTWKSLCSAF</del> LV <del>EAKW</del>	417
	** ** : * * * * : * * * : : * * * * : * * . * * * . * * * * * *	
AY766249	FASGNVPKSEEYLKNAIVSTGVHVILVHAFFCMQGQITEKTVSLMDDFPTIIISTTA <del>KILR</del>	456
AY195609	SASGSLPSANEYLENEKVSSGVYVVLIH <del>LF</del> FMGLGGTNRGSIELNDPRELMS <del>SIATIVR</del>	477
	* * * . * . : * * * : * * : * * : * * * * * * : : : : * : : * : * * * :	
AY766249	LCDDLEGDKDVNCEGNDGSYSKCYMKDNPGVSI <del>GLTKEHMSEQISDAWKQLNKEC</del> LNTN-	515
AY195609	IWN <del>DLGC</del> AKNEHQNGKDGSYLDCYKKEHINLTAAQVHEHALELVAIEWKRLNKESFNLNH	537
	: : * * * : : : * : * * * * . * * : : : : : . : * * * : : : * * * * : * *	
AY766249	PLPSSFTKLC <del>LNAARMV</del> PIMYNYDGN-TPSKLEEYVKSLLN <del>DGGYLQSIH</del> SP <del>TSEHSTV</del>	573
AY195609	DSVSSFQKAALNFARMVPLMYSYDNNRRGPVLEEYVKFMLSD-----	579
	* * * * : : . * * * * * * . * * . : : : . : . * * * : : * * * * : * *	

AY362553	MSCARITVTLPYRSAKTSIQRGITHYPALIRPRFSACTPLASAMPLSSTPLINGDNSQRK	60
AF543531	-RRSLFSSPYELKSIDKTI <b>PNLVMCRKR</b> MSGRPSIRVSSTASVSNDGVRVRVGDYRYNH	59
	: : : . : * . : * . : : : : : . : * . : . . : * : . :	
AY362553	NTRQHMEESS-----KRREYLLEETTRKLQRNDTES-----VEKCLKIDNI	102
AF543531	WDEDLIDSLATSIEAPSYLKRADTLVEATKDRFNSMGVDDGQRMSPITDLYQRLWMVDSV	119
	: : : . : : : * : * : * . : : : . : . : : * : * : . :	
AY362553	QQLGIGYYFEDAINAVLRSPFSTGEE-----DLFTAALFRLLRHNGIEISPE	150
AF543531	ERLGIDRHFQNEIKSALDYVFSYWKKEGIGRGRQSAVTDLNSTALGLRTLRLHGYPVSSD	179
	: : * : . : * : : * : . : * : : * : : * : * : * : * : * : * : :	
AY362553	IFLKFKDERGKFDES-----DTLGLLSLYEASNLGVAGEEILEEAMEFAEARLRRSLSE	204
AF543531	VLENFKDHNGQFTCSGIQTGEIRGVNLFRASLIAFPGEKVMQEAEIFSTMYLKHALQK	239
	: : : * : . : * : * : : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : :	
AY362553	PAAP-LHGEVAQALDVPRHLRMARLEARRFIEQYQKQSDHGDLLLEAILDYNQVQAQHQ	263
AF543531	IAVSSLSQEIEYLLLEYGWHNPPRLEARMYMEVFPQDTIYEQKLVELAKVEFNIFHSLQK	299
	* . . * * : * : * . . * : * : * : : : : . : * : * : * : * : : : :	
AY362553	<b>SELTEIIR</b> WWKELGLVDKLSFGRDRPLECFLWTVGLLPEPKYSSVRIELAKAISILLV <sup>D</sup>	323
AF543531	RELQSLCRWWKHYGFP-QLSFTRHIHVEYYTFASCIATDPKQSAFRLGFAKMSYFVTVLD	358
	* : . : * : * : . : * : * : * : * : * : : : : . : * : * : * : * : : * :	
AY362553	DIFDTYGE <sup>D</sup> DDL <b>ILFTDAIR</b> RWDLEAMEGLPEYMKICYMALYN <sup>T</sup> TNEVCYKVL <sup>R</sup> DTGRIV	383
AF543531	DIYDTYGTMEEL <sup>E</sup> LFTAAIKRWDP <sup>S</sup> VDCLPEYMKGVMAVYDTVNEMAKEAEKVQGRDT	418
	* : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : . :	
AY362553	LLNLKSTWIDMIEGFME <sup>E</sup> EAKWFGGSAPKLEEYIENG <sup>V</sup> STAGAYMAFAHIFFLIGEGVTH	443
AF543531	LNIVRQAWELYIDAYMPEAKWISSGYLPTFQ <sup>E</sup> YLDSSKISFGTRITILQPIITLGEPLSH	478
	* : : : * : * : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :	
AY362553	QNSQLFTQKPYPKVFS <sup>A</sup> AGRILRLWDDLGTAK <sup>E</sup> EQERGD <sup>L</sup> ASC <sup>V</sup> QLFMKEKS-LTEEEAR	502
AF543531	EILQEIDFS--AKFN <sup>D</sup> LISVILRLKGGQGSV <sup>V</sup> QE-----ASSVSCYMKDNAGL <sup>T</sup> EE <sup>D</sup> AI	530
	: * : . . * . . . * : * . . * : * : * : * : * : * : * : * : * :	
AY362553	SRILEEIKGLWRDLN <sup>G</sup> ELVYN-KNLPLSI <b>IKVALN</b> MARASQVVKHDQDT--YFSSVDNY	559
AF543531	HCINDM <b>VNNLL</b> KELN <sup>W</sup> ELLKPD <sup>S</sup> NPISCRKA <sup>A</sup> FDICRIFHHGYKYR <sup>D</sup> GYGDATIEVKNL	590
	* : : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :	
AY362553	VDALFFTQ---	567
AF543531	VKRTVLEPVPL	601
	* . . :	

**Abb. 45: ClustalW-Alignment der zu den in Bande 4 identifizierten Peptiden gehörenden Aminosäuresequenzen.**

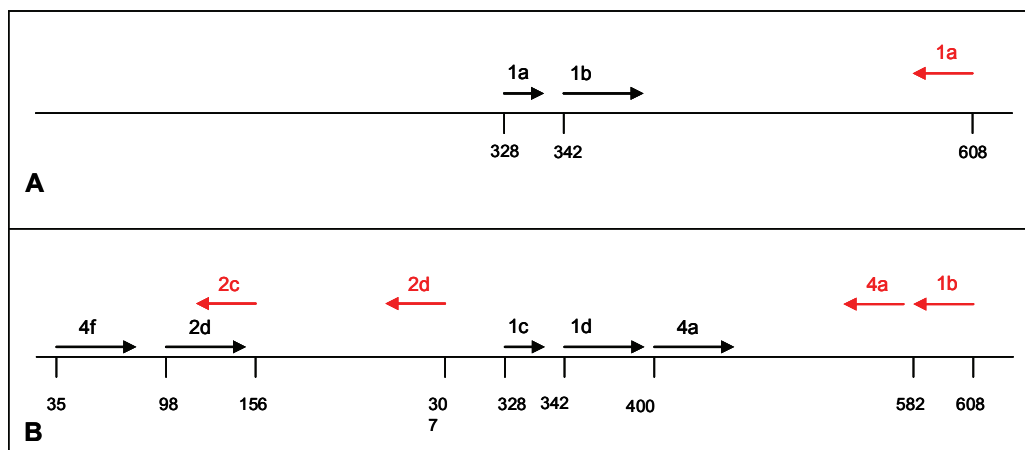
AY362553 – Geraniolsynthase *Ocimum basilicum*; AF543531 – monoterpensynthaseähnliches Protein *Pinus taeda*. Rot – identifizierte Peptide, Linie – DDXXD-Motiv.

Primer	Sequenz	Spezifikation
M13 forward	d(GTTTTCCCAGTCACGAC)	Klonierungsvektoren
M13 reverse	d(CAGGAAACAGCTATGAC)	Klonierungsvektoren
pJET1.2 forward	d(CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC)	Klonierungsvektoren
pJet1.2 reverse	d(AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG)	Klonierungsvektoren
Tps 1a sense	GAR YTN GCN GAR ATH ATH MGN TGG	peptidabgeleitet
Tps 1b sense	YTN GGN GGN AAR YTN AAY TTY GC	peptidabgeleitet
Tps 1c sense	<b>TNG CTG AAA TTA TTM GDT GG</b>	peptidabgeleitet
Tps 1d sense	<b>GGW GGW AAM YTN AAY TTY GC</b>	peptidabgeleitet
Tps 1b anti	<b>AGC HCK AGC CAT RAA NAR AGC</b>	peptidabgeleitet
Tps 2d sense	<b>TCA AYT NGA AAA RYT NCA AG</b>	peptidabgeleitet
Tps 2b anti	YTG ICK YTG IAR YTC IAR IGT RTC YTC CICC	peptidabgeleitet
Tps 2c anti	<b>AAC YTT HCK NAR AAT TTC AGC</b>	peptidabgeleitet
Tps 2d anti	<b>ART TCN ARW GTA TCT TCW CC</b>	peptidabgeleitet
Tps 4a sense	<b>ATT YTN YTN TTY ACW GAT GC</b>	peptidabgeleitet
Tps 4f sense	<b>ATT CCW ATY YTN GTT ATG TG</b>	peptidabgeleitet
Tps 4a anti	<b>TTC YTT NAR NAR RAT RAT AAC C</b>	peptidabgeleitet
Mir rev	ATC ATA GCT ATA CAT CAA CGG GAC	FS-35- abgeleitet
Fw 1	CAA GTA GTG AGG AAT ATT TGA AG	FS- 35 abgeleitet
S1	GTC CCG TTG ATG TAT AGC TAT GAT	FS-35- abgeleitet
Rev 2	CCA AAG ACG AAG AAT AGT GGC	FS- 35 abgeleitet
Fw 2	CAT CCA CGG CCA CTA TTC TT	FS-35- abgeleitet
Rev 3	TTC AGG CAC TTC CAT GCA TTC G	FS-35- abgeleitet
Rev 4	CAT TTC TTC CAT GTC CAA GT	FS- 35 abgeleitet
Fw4	AAG GAA GCT CTA TTG AAA GT	FS-35- abgeleitet

**Tab. 17: Sequenzen der verwendeten Primer**

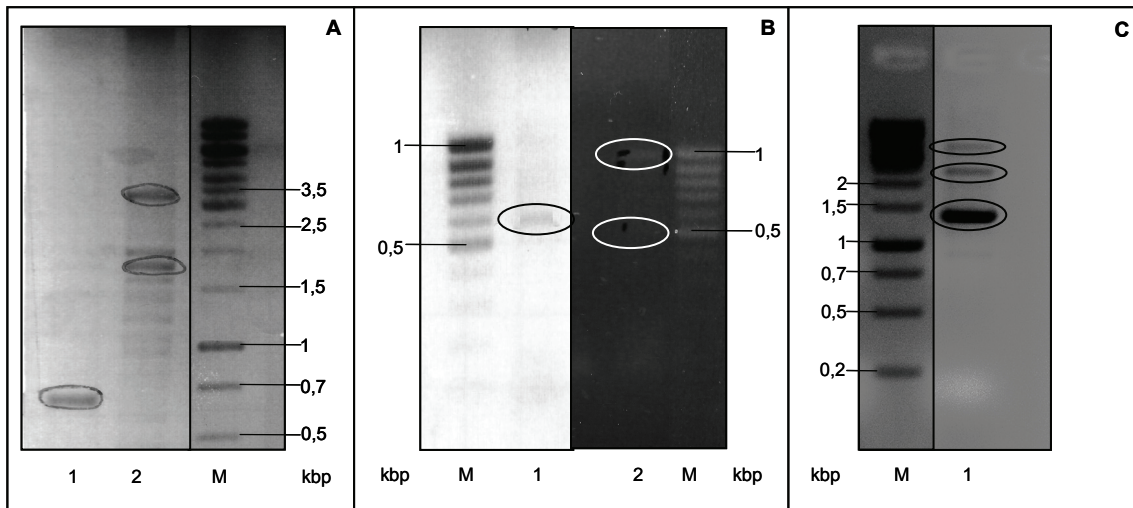
Spezifikationen: peptidabgeleitet – von den identifizierten Peptiden abgeleitete Primer. Normalschrift: Primersset 1, ohne *Mirabilis jalapa codon usage* abgeleitet; Fett: Primersset 2, *Mirabilis jalapa codon usage*

rev – (reverse) antisense Primer, fw – (forward) sense Primer



**Abb. 46: Lage der von den Peptiden abgeleiteten Primer auf dem Alignment der beteiligten Aminosäuresequenzen.**

Der Primerbeginn ist jeweils mit der Nummer der Aminosäure beziffert. A) Primersset 1; B) Primersset 2; Schwarz – sense-Primer; Rot – antisense-Primer



**Abb. 47: In der RT-PCR mit peptidabgeleiteten Primern generierte DNA-Fragmente.**

Die cDNAs wurden aus 1 µg Gesamt-RNA aus petaloiden Segmenten (Ernte (14, 16 und 18 Uhr) nach DNase-Behandlung mittels *M-MLV-RT* (Invitrogen) und dem *antisense* Primer generiert. Ein Drittel dieser Reaktionsansätze wurden für die PCR mit der *Taq*-Polymerase (Invitrogen) eingesetzt. Jeweils ein Fünftel der PCR-Ansätze wurde gelelektrophoretisch getrennt (Stationäre Phase: 1,5% Agarosegel, mobile Phase: 1x TAE, 45 min, 65 V) und die amplifizierten DNA-Fragmente im Anschluß mittels Ethidiumbromidfärbung visualisiert.

A) 1 – *Tps 1b anti/Tps 1c sense*, 2 – *Tps 1b anti/Tps 1d sense*, M – Marker O'Gene Ruler (Fermentas). B) 1 – *Tps 2c anti/Tps 2d sense*, 2 – *Tps 2d anti/Tps 2d sense*, M – Marker GeneRuler™ (Fermentas) C). 1 – *Tps 4a anti/Tps 4a sense*, M – Marker O'Gene Ruler (Fermentas). Rahmen – zur weiteren Analyse verwendete Bande

```

AY589702      -----
XP_002518538  ATLSDP SLSQQRIDLT KPISFIYI IDDFDVQ GSLDELT LFT EIVKRW DVEAVEQL PGYM 360

AY589702      -----LPSSE EYL 8
XP_002518538  RACFKALDSVTNEIGYKVYKQHGWNPVHSLRETWASLCKAFLVEARWFASGHLPA AEEYL 420
                                     **: :****

AY589702      KNGIIS SLLV VSTLLFYLLGHGRNDNNI IGLNKYLD MATSTATILRLWDDLGC AKDENQ 68
XP_002518538  QNGIVSSGVHVVLVHIFYLLGHGV TREGVDFIGNRP AITSTATILRLWDDLGI SKDENQ 480
:***:*. : ** . :***** . :. : :. : : ***** :*****

AY589702      DGNDWSFIECYLKEHEGSSIESARETMNMLISNAWKCLNEKCLSHHHFSQH LIEACL NLA 128
XP_002518538  DGHGDSYVECYVKEHKGSLVEIATKKVTVMISDAWKQLNQ ECLHPNPFSPNFTK SCLNLA 540
**:* ** :***:***:***: * * :. :. :*:*** **:*** : ** :. :*****

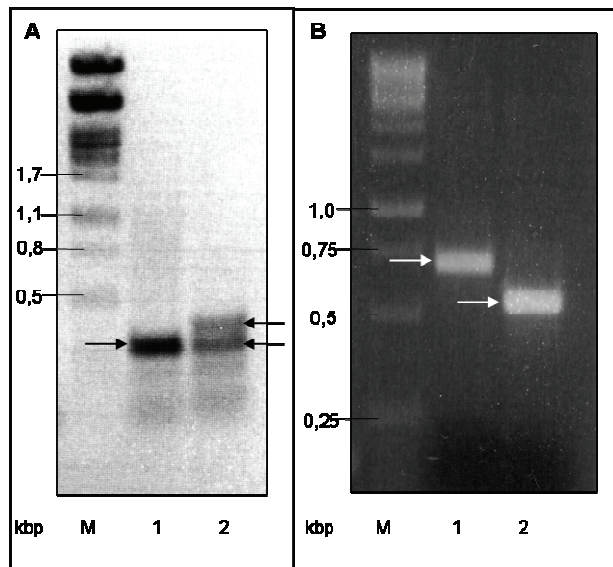
AY589702      RMVPLMYSYDDDHRLLDLERLIQV----- 152
XP_002518538  RMVPLMYSYDDNHRLPVLEY YTKSLLFESVSI 572
***** ***** **

```

**Abb. 48: ClustalW-Alignment der Aminosäuresequenzen von FS-35 aus *Mirabilis jalapa* und der putativen 1,8-Cineolsynthase aus *Ricinus communis*.**

AY586702 – FS-35 *Mirabilis jalapa*, XP\_002518538 – putative 1,8-Cineolsynthase *Ricinus communis*. Linie – DDXXD-Motiv





**Abb. 49: In der PCR mit FS-35 spezifischen Primern amplifizierte DNA-Fragmente.**

Jeweils 1/5 der PCR-Ansätze wurde gelelektrophoretisch getrennt (Stationäre Phase: 1% Agarosegel, mobile Phase: 1x TAE, 45 Minuten, 65 V) und die amplifizierten DNA-Fragmente im Anschluss mittels Ethidiumbromidfärbung visualisiert.

**A) RT-PCR auf Gesamt-RNA:** Jeweils 1 µg RNA (Erntezeitpunkt: 14 Uhr) wurde mit dem Primer *Mir-rev* und der *M-MLV-RT* revers translatiert. Die Hälfte der Reaktionsansätze wurde als Template für die PCR mit den Primern *Mir-rev* und *fw 2* eingesetzt (*Taq PCR Master Mix*, Qiagen). M – Marker, *PstI*-geschnittene Lambda-DNA, 1 – sternförmiges Petalenzentrum, 2 – petaloide Segmente

**B) PCR auf genomischer DNA der petaloiden Segmente:** Pro Reaktionsansatz wurden 0,1 µg DNA (Erntezeitpunkte 14, 16 und 18 Uhr) nach der Restriktion mit *PstI* mit den spezifischen Primern und dem *Taq PCR Master Mix* (Qiagen) amplifiziert.

M - Marker, O'Gene Ruler (Fermentas), 1 – Amplifikation mit *rev1/fw1*, 2 – Amplifikation mit *rev1/fw2*

*Pfeile* – zur weiteren Analyse verwendete Banden

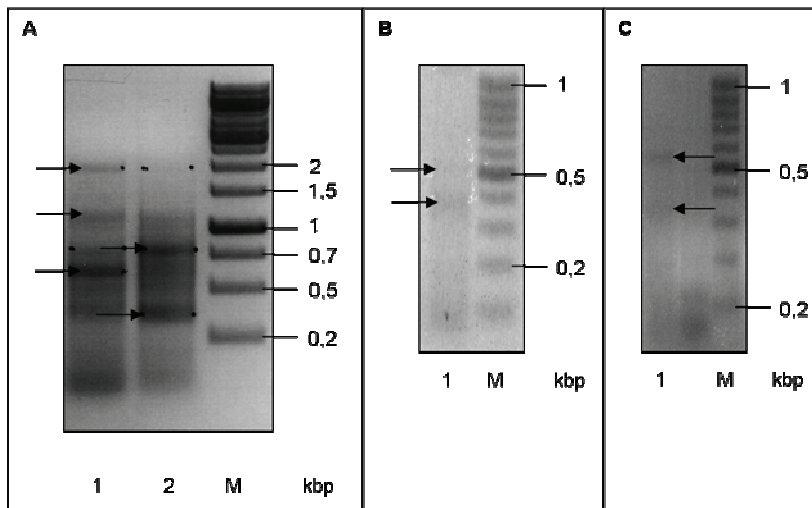
Stern	-----TATCATAGCTATACATCAAC	20
petSegmente	-----TATCATAGCTATACATCAAC	20
FS35	ACTTGAATGAGTCGTTCAGATCTAGAAGTCGATGGTCGTCATCATAGCTATACATCAAC	60
	*****	
Stern	GGGACCATTCTAGCAAGATTAAGACAAGCTTCTATTAATGTTGTGAAAAATGGTGGTGA	80
petSegmente	GGGACCATTCTAGCAAGATTAAGACAAGCTTCTATTAATGTTGTGAAAAATGGTGGTGA	80
FS35	GGGACCATTCTAGCAAGATTAAGACAAGCTTCTATTAATGTTGTGAAAAATGGTGGTGA	120
	*****	
Stern	GATAAACACTTTTCATTTCAGGCACCTCCATGCATTCGAAATCAACATATTCATAGTTTCT	140
petSegmente	GATAAACACTTTTCATTTCAGGCACCTCCATGCATTCGAAATCAACATATTCATAGTTTCT	140
FS35	GATAAACACTTTTCATTTCAGGCACCTCCATGCATTCGAAATCAACATATTCATAGTTTCT	180
	*****	
Stern	CGTGCACTTTCAATAGAGCTTCCTTCATGTTCTTTCAAATAGCATTCTATGAATGACCAA	200
petSegmente	CGTGCACTTTCAATAGAGCTTCCTTCATGTTCTTTCAAATAGCATTCTATGAATGACCAA	200
FS35	CGTGCACTTTCAATAGAGCTTCCTTCATGTTCTTTCAAATAGCATTCTATGAATGACCAA	240
	*****	
Stern	TCATTTCCATCTTGATTTTCATCCTTGGCGCAACCAAGATCATCCCAAAGACGAAGAATA	260
petSegmente	TCATTTCCATCTTGATTTTCATCCTTGGCGCAACCAAGATCATCCCAAAGACGAAGAATA	260
FS35	TCATTTCCATCTTGATTTTCATCCTTGGCGCAACCAAGATCATCCCAAAGACGAAGAATA	300
	*****	
Stern	GTGGCCGTGGATGA-----	274
petSegmente	GTGGCCGTGGATGA-----	274
FS35	GTGGCCGTGGATGTTGCCATGTCTAGATACTTGTTCAGCCAATTATATGTTGTCATTT	360
	*****	
Stern	-----	
petSegmente	-----	
FS35	CTTCCATGTCCAAGTAGATAAAAAGAGGAGAGTTGAAACAACAAGAAGGCTAGAACTAATA	420
Stern	-----	
petSegmente	-----	
FS35	ATCCCATCTTCAAATATTCCTCACTACTTGGTAA	455

**Abb. 50: ClustalW-Aligment der zu FS-35 homologen Sequenzen der *Mirabilis jalapa* Blüte.**  
**Stern** – Durch RT-PCR auf Gesamt-RNA aus dem sternförmigen Petalenzentrum generierte Sequenz. **petSegmente** – Durch RT-PCR auf Gesamt-RNA aus den petaloiden Segmenten generierte Sequenz. **FS35** – AY589702, terpensynthaseähnliche Sequenz

FS35 revlfw1	-----TTACCAAGTAGT--GAGGAATATTTGAAGAATGGG 33 CCGACAGGTGGGGTTTCAGCTTACCTTTTCCTTTTACTTCAATTCACGTTTCAAGGCTGGG 480 * * * * *
FS35 revlfw1	ATTATTAGTTC-TAGCCTTCTTGTTGTTTCAACTCTCCTCTTTTATCTACTTGGACATG- 91 GCTAATGATGGCGGACTAATCTCACCCCTTTTAAACGATCAAATAATTAAGTAAAC 540 * * * * *
FS35 revlfw1	-GAAGAAATGAC--AACAATATAATTGGCTTGAACAAGTATCTAGACATGGCAACATCCA 148 TAAATAAATAATTAAATCTTAAATAAACTTTTANTATGAATTCATTTAAAAACTTATT 600 * * * * *
FS35 revlfw1	CGGCCACTATCTCTCGTCTTTGGGATGATCT--TGGTTCGCGCCAA-----GGAT 195 TATTTAAGGTTGGTC--TCCTCATAATAATTATTATTATTGTCACCTTATAATGTAGGAT 659 * * * * *
FS35 revlfw1	GAAAT-CAAGATGGAATGATTGGTCATTCATAGAAATGCTATTTGAAAGAACATGAAGG 254 GAAATTCAGATGGAATGATTGGTCATTCATAGAAATGCTATTTGAAAGAACATGAAGG 719 *****
FS35 revlfw1	AAGCTCTATTGAAAGTGCACGAGAACTATGAATATGTTGATTTCGAATGCATGGAAGTG 314 AAGCTCTATTGAAAGTGCACGAGAACTATGAATATGTTGATTTCGAATGCATGGAAGTG 779 *****
FS35 revlfw1	CCT-GAATGAAAGTGTATTCTCACCACCATTTTTCAACATTTAATAGAAGCTTGTC 373 CCTCGAATGAAAGTGTATTCTCACCACCATTTTTCAACATTTAATAGAAGCTTGTC 839 *** *****
FS35 revlfw1	TTAATCT-TGCTAGAATGGTCCCGTTGATGTATAGCTATGATGACGACCATCGACTTCTA 432 TTAATCTGCAATGAAGTA----- 857 ***** * * *
FS35 revlfw1	GATCTTGAACGACTCATTCAAGT 455 -----
<b>A</b>	
FS35 revlfw2nterm	TCAACTCTCCTCTTTTATCTACTTGGACATGGAAGAAATGACAACAATATAATTGGCTTG 120 -----
FS35 revlfw2nterm	AACAAGTATCTAGACATGGCAACATCCACGGCCACTATTCTTCGTCTTTGGGATGATCTT 180 -----CCATCCACGTCCACTATTATTAGTCTTCGTGATGATCTT 40 *****
FS35 revlfw2nterm	GGTTCGCGCCAAGGATGAAATCAAGATGGAATGATTGGTCATTCATAGAATGCTATTTG 240 GGTCGCGCCAAGG----- 53 *** *****
FS35 revlfw2nterm	AAAGAACATGAAGGAAGCTCTATTGAAAGTGCACGAGAACTATGAATATGTTGATTTCG 300 -----
<b>B</b>	
FS35 revlfw2cterm	AACAAGTATCTAGACATGGCAACATCCACGGCCACTATTCTTCGTCTTTGGGATGATCTT 180 -----
FS35 revlfw2cterm	GGTTCGCGCCAAGGATGAAA-ATCAAGATGGAA-ATGATTGGTCA-TTCATAGA-ATGCT- 235 -----AGGATGAAACATCAAGATGGAACATGATTGGTCAATTCATAGACATGCTC 50 *****
FS35 revlfw2cterm	ATTTGAAAGAA--CATGAAGGAAGCTCTATTGAAAGTGC-ACGAGA--AACTATGAA--T 288 ATTTGAAAGACACCATGAAGGAAGCTCTATTGAAAGTGCCACGAGACCACTCATGACATC 110 *****
FS35 revlfw2cterm	ATGTTG-ATTTCGA-ATGC-ATGGAAGTGCCTGAA--TGAAAAGTGTTC-ATCTC-ACCA 341 ATGTTGCATTTTCGACATGCCATGGAAGTGCCTCGACATGAAAAGTGTTCATCTCCACCA 170 *****
FS35 revlfw2cterm	CCATTTTTCACAACATTTAATAGAAGCTTGCTTAATCTTGCTAGAATGGTCCCGTTGAT 401 CCATTTT-ACACCAACCATTT----- 191 *****
FS35 revlfw2cterm	GTATAGCTATGATGACGACCATCGACTTCTAGATCTTGAACGACTCATTCAAGT 455 -----
<b>C</b>	

**Abb. 51: ClustalW-Aligment Vergleich der mittels PCR auf genomischer DNA generierter Sequenzen mit FS-35.**

**A) Vergleich FS-35 vs. mit *Mir rev/ fw 1* generiertes 0,8 kb Fragment. B) Vergleich FS-35 vs. mit *Mir rev/ fw 2* generiertes 0,6 kb Fragment, N-terminal. C) Vergleich FS-35 vs. mit *Mir rev/ fw 2* generiertes 0,6 kb Fragment, C-terminal.**



**Abb. 52: In der PCR mit FS-35 spezifischen Primern amplifizierte DNA-Fragmente.**

Jeweils 1/5 der PCR-Ansätze wurde gelelektrophoretisch getrennt (Stationäre Phase: 1,5% Agarosegel, mobile Phase: 1x TAE, 45 min, 65 V) und die amplifizierten DNA-Fragmente im Anschluss mittels Ethidiumbromidfärbung visualisiert.

**A) PCR auf Genomischer DNA:** 1,5 µg DNA (petaloide Segmente, gepoolt aus den Erntezeitpunkten: 14, 16 und 18 Uhr) wurde mit *EcoRV* gespalten und jeweils 1/10 der DNA mit der *T4-Ligase* religiert. 1/5 der Ligationsansätze wurden mit der *Tag-Polymerase* (Invitrogen) und den Primern *rev 2/fw4* amplifiziert. 1 – Ligation mit HCC, 2 – Ligation ohne HCC, Pfeile – zur weiteren Analyse verwendete DNA-Fragmente.

**B) PCR auf Genomischer DNA:** 1,5 µg DNA (petaloide Segmente, gepoolt aus den Erntezeitpunkten: 14, 16 und 18 Uhr) wurde mit *PvuII* gespalten und jeweils 1/10 der DNA mit der *T4-Ligase* religiert. 1/5 der Ligationsansätze wurden mit dem *Taq PCR Master Mix* (Qiagen) und den Primern *rev2/fw4* amplifiziert. Pfeile – zur weiteren Analyse verwendete DNA-Fragmente.

**C) PCR auf Genomischer DNA:** 1,5 µg DNA (petaloide Segmente, gepoolt aus den Erntezeitpunkten: 14, 16 und 18 Uhr Tag) wurde mit *PvuII* gespalten und jeweils 1/10 der DNA mit der *T4-Ligase* unter Zusatz von HCC religiert. 1/5 der Ligationsansätze wurden mit dem *Taq PCR Master Mix* (Qiagen) und den Primern *rev2/S1* amplifiziert. Pfeile – zur weiteren Analyse verwendete DNA-Fragmente.

Diese Arbeit wäre ohne die tatkräftige Unterstützung vieler Personen nicht möglich gewesen. Für die Bereitstellung des Themas und die Möglichkeit der Promotion in der Abteilung Biochemie danke ich Frau Prof. Birgit Piechulla. Den Arbeitsgruppen der Biochemie sowie Mikrobiologie danke ich für die gute Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre. Besonders erwähnt seien stellvertretend Martina, Conny, Marco, Diana, Claudia und Frau Bauer, die neben konstruktiven Gesprächen und Diskussionen ebenso Motivation und Rat in allen Lebenslagen beisteuerten. Ganz besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Dr. Uta Effmert für den unermüdlichen Ansporn und die Unterstützung in jeglicher Hinsicht, die Arbeit fortzusetzen und abzuschließen.

Viele in der Arbeit angewendete Methoden beruhen auf der Zusammenarbeit mit Arbeitsgruppen inner- und außerhalb der Universität Rostock. Zum Kreis der universitätsinternen Kooperationspartner zählt zum Einen Dr. Christoph Unger (ehemals Abteilung Phytomedizin, Agrar- und Umweltwissenschaftliche Fakultät), der durch seine Unterstützung hinsichtlich der Chromatographiemethoden und -ausrüstung, der Bereitstellung der großen Pflanzenkultivierungsfläche sowie der Gespräche und Hilfen die Proteinaufreinigung ermöglicht hat. Dr. Thomas Hübener und seinen Kollegen von der AG Phykologie danke ich für die Überlassung und Einweisung in die Arbeit mit dem Lichtmikroskop. Weiterhin möchte ich Dr. Sabine Fulda (Pflanzen-genetik) für die Hilfe bei der zweidimensionalen Gelelektrophorese, Dr. Ralf Bastrop und Mitarbeitern (Tierphysiologie) für Sequenzierungen und Prof. Martin Hagemann für viele Diskussionen und Denkanstöße danken. Die initialen Versuche der Proteinaufreinigung konnte ich im Labor von Prof. Eran Pichersky an der University of Michigan durchführen. Ihm danke ich für Anregungen und Diskussionen, der Überlassung des Hydroxyapatites sowie der Möglichkeit, 3 Monate in seiner Arbeitsgruppe tätig zu sein. Dr. Sylvie Baudino (Universität St. Etienne) verdanke ich das Protokoll der NADI-Färbung in englischer Sprache. Besonderer Dank gilt Dr. Elke Hammer und Dr. Christian Scharf (Interfakultäres Institut für Genetik und funktionelle Genomforschung, Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald) für die Durchführung und Auswertung der massenspektrometrischen Proteinanalysen.

Durch die finanzielle Unterstützung in Form von Stipendien des DAAD und der Rosa-Luxemburg-Stiftung konnte die Dissertation realisiert werden.

Aus meinem persönlichen Umfeld, insbesondere meiner Familie und Freunde, habe ich auf dem langen Weg der Experimente und des Verfassens der Dissertation Unterstützung in vielfältiger Form erfahren, für die ich sehr dankbar bin. Vor allem Sven und Tibor, die in dieser von einigen Höhen und zahlreichen Tiefpunkten geprägten Zeit für die Motivation, den Rückhalt, den Spaß sowie den Bezug zu den (wirklich) wichtigen Dingen im Leben sorgten, möchte ich an dieser Stelle DANKE sagen.

# **Errata** (Stand Februar 2011):

S. X:	<i>cis</i>
S. 23	spezifische
S. 36	17
S. 43	drei Ausnahmen
S. 46	2-4
S. 52	Bezeichnung der primären y-Achse: Emission (ng/mg FM) Bezeichnung der sekundären y-Achse: Extraktion (ng/mg FM)
S. 53	Bezeichnung der primären y-Achse: spezifische Aktivität ( <i>E</i> )- $\beta$ -OS (fkat/mg) Bezeichnung der sekundären y-Achse: ( <i>E</i> )- $\beta$ -Ocimengehalt (ng Ocimen/mg FM)
S. 57	D