

**MOLEKULARE UND GENETISCHE ASPEKTE  
DER BIOSYNTHESE VON KOMPLEXEN  
SESQUITERPENGEMISCHEN IN MAIS**

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

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Diplom-Biochemiker/Molekularbiologe

**Tobias G. Köllner**

geboren am 30. Oktober 1971 in Eisenach

Jena, im Januar 2004



Gutachter:

1. Prof. Dr. J. Gershenzon
2. Prof. Dr. G. Theißen
3. Prof. Dr. W. A. König

Tag der mündlichen Prüfung:

16. März 2004

Tag der öffentlichen Verteidigung:

17. Mai 2004



## Abkürzungsverzeichnis

3D	dreidimensional
<i>a.dest.</i>	destilliertes (deionisiertes) Wasser
APS	Ammoniumpersulfat
Ap <sup>r</sup>	Ampicillinresistenz
ATP	Adenosintriphosphat
BAP	6-Benzylaminopurin
BLAST	„Basic Local Alignment Search Tool“
bp	Basenpaar
cDNA	„copy DNA“
CPS	„counts per second“
CPM	„counts per minute“
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMAPP	Dimethylallylpyrophosphat
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EST	„expressed sequence tag“
FID	Flammenionisierungsdetektor
FPP	Farnesylpyrophosphat
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
gDNA	genomische DNA
GGPP	Geranylgeranylpyrophosphat
GPP	Geranylpyrophosphat
GUS	β-Glucuronidase
IPP	Isopentenylpyrophosphat
Km <sup>r</sup>	Kanamycinresistenz
kb	Kilobasen
MES	Morpholinoethansulfonsäure
MOPS	3-( <i>N</i> -Morpholino)propansulfonsäure
OD	Optische Dichte
ORF	“open reading frame“
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PDB	Proteindatenbank
PCR	„polymerase chain reaction“
RACE	„rapid amplification of cDNA ends“
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	„reverse transcriptase PCR“
SDS	Natriumdodecylsulfat
SPME	“solid phase micro extraction“
Sp <sup>r</sup>	Spectinomycinresistenz
ssDNA	„single stranded DNA“
STKW	Sesquiterpenkohlenwasserstoff
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TIC	“total ion chromatogram“
UV	ultraviolett
WWW	„world wide web“



## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Allgemeines	1
1.2	Überblick über die Terpenbiosynthese in Pflanzen	2
1.3	Terpensynthesen, die Schlüsselenzyme der Terpenbiosynthese	6
1.3.1	Enzymologie	6
1.3.2	Sequenzverwandtschaft und genomische Organisation von Terpensynthasegenen	8
1.3.3	Struktur-Funktionsbeziehungen	10
1.3.4	Gen-Expression und Regulation	14
1.4	Biologische Wirksamkeit von Maisterpenen	16
1.5	Ziel dieser Arbeit	17
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>18</b>
2.1	Pflanzenmaterial	18
2.1.1	<i>Zea mays</i> L.	18
2.1.2	<i>Arabidopsis thaliana</i> L.	18
2.1.2.1	Pflanzenanzucht	18
2.1.2.2	Stabile Transformation durch <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	19
2.2	<i>Spodoptera littoralis</i> (Boisd.) [Lepidoptera: Noctuidae]	19
2.3	Mikrobiologische Methoden	20
2.3.1	Bakterienstämme	20
2.3.2	Antibiotika	20
2.3.3	Medien	20
2.3.4	Kultivierung von Bakterien und Stammhaltung	20
2.3.5	Transformation von <i>Escherichia coli</i>	21
2.3.5.1	Elektrotransformation	21
2.3.5.2	Transformation nach der CaCl <sub>2</sub> -Methode	21
2.3.6	Transformation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	21
2.4	Isolierung von Nukleinsäuren	22
2.4.1	Isolierung genomischer DNA aus Mais	22
2.4.2	Isolierung von Gesamt-RNA aus Mais	22
2.4.3	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	22
2.5	DNA-Techniken	23
2.5.1	Synthese von cDNA	23
2.5.2	RACE	23
2.5.3	Oligonukleotide	23
2.5.4	Amplifikation von DNA-Fragmenten durch PCR	25
2.5.5	Restriktion von DNA	26
2.5.6	Ligation von DNA	26
2.5.7	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	26
2.5.8	Klonierung von DNA-Fragmenten	26
2.5.9	Site Directed Mutagenesis	27
2.5.10	Sequenzierung von DNA	27
2.5.11	DNA/Protein-Sequenzanalyse	28
2.6	Elektrophorese und Transfertechniken	28
2.6.1	DNA-Agarosegelelektrophorese	28
2.6.2	RNA-Agarosegelelektrophorese	29

2.6.3	DNA-Transferblot (Southern Blot).....	29
2.6.4	RNA-Transferblot (Northern Blot).....	29
2.6.5	Nukleinsäurehybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden.....	29
2.6.6	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	30
2.7	Proteintechniken.....	30
2.7.1	Herstellung und Reinigung rekombinanter Terpensynthasen.....	30
2.7.2	Herstellung hochreiner Proteine für die Enzymcharakterisierung.....	31
2.7.3	Proteinquantifizierung nach Bradford.....	32
2.7.4	Bestimmung des Molekulargewichtes von Terpensynthasen.....	32
2.7.5	Aktivitätsbestimmung von rekombinanten Terpensynthasen.....	32
2.7.6	Computergestützte Proteinstrukturanalysen.....	33
2.8	Techniken zur Terpenisolierung, -analyse und -darstellung.....	33
2.8.1	Terpenisolierung aus Maisgewebe.....	33
2.8.1.1	Extraktion.....	33
2.8.1.2	Duftsammlung.....	34
2.8.1.3	„closed loop collection“-Methode.....	34
2.8.2	Terpenanalyse.....	34
2.8.2.1	Chromatographische Trennung mittels GC-MS / GC-FID.....	34
2.8.2.2	Identifizierung von Terpenen.....	35
2.8.3	Darstellung von $\beta$ -Bisabolon aus $\alpha$ -Bisabolol.....	36
2.8.4	Gewinnung eines ätherischen Öles aus Ingwer.....	36
2.9	Anmerkungen.....	37
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>38</b>
3.1	Analyse der Sesquiterpenkohlenwasserstoffe (STKW) in der Maisinzuchtlinie B73.....	38
3.1.1	Vergleich der verschiedenen Methoden zur Terpenanalyse.....	38
3.1.2	Qualitative und quantitative Analyse der STKW in verschiedenen Pflanzenteilen und Entwicklungsstufen.....	39
3.2	Identifizierung und Charakterisierung von Terpensynthasen in der Maisinzuchtlinie B73.....	42
3.2.1	Identifizierung von Terpensynthasegenen.....	42
3.2.2	Funktionelle Analyse der identifizierten Terpensynthasen.....	45
3.3	Die Sesquiterpensynthase TPS4-B73.....	48
3.3.1	Die Sesquiterpenprodukte von TPS4-B73 sind ein Hauptbestandteil der STKW adulter B73-Pflanzen.....	48
3.3.2	Stereochemische Analyse der Hauptprodukte.....	49
3.3.3	Biochemische Charakterisierung.....	51
3.4	Untersuchung der molekularen Grundlagen der Terpenbiosynthese und ihrer genetischen Variabilität am Beispiel von TPS4 und TPS5.....	54
3.4.1	Klonierung und Charakterisierung der Gene <i>tps4</i> und <i>tps5</i> aus Delprim.....	54
3.4.2	Ein hypothetischer Reaktionsmechanismus für TPS4 und TPS5.....	58
3.4.3	Transkriptanalyse von <i>tps4/5</i> in verschiedenen Maisgeweben.....	59
3.4.4	Expression der Terpensynthasen TPS4 und TPS5 in <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	60
3.5	Struktur-Funktionsanalysen in Maisterpensynthasen.....	61
3.5.1	Untersuchungen an TPS4 und TPS5.....	61
3.5.1.1	Vier Aminosäuren im aktiven Zentrum bestimmen die Stereoselektivität von TPS4 und TPS5.....	61
3.5.1.2	Zwei Aminosäuren sind für die Inaktivität von TPS5-B73 verantwortlich.....	63
3.5.1.3	Das aktive Zentrum von TPS4.....	65
3.5.1.4	Modellierung von Enzym-Substratkomplexen am Beispiel von TPS4-B73.....	68

3.5.1.5	Die Aminosäurereste Tyrosin 382 und Tyrosin 528 im aktiven Zentrum von TPS4 .....	71
3.5.2	Struktur-Funktionsanalysen am Beispiel von TPS7-B73 .....	72
3.5.2.1	Die katalytische Triade im aktiven Zentrum der Mutante TPS7-B73 F521Y .....	72
3.5.2.2	Ist ein weiterer Protonierungsmechanismus involviert? .....	75
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>78</b>
4.1	Die Maisinzuchtlinie B73 bildet ein komplexes Spektrum verschiedenster Sesquiterpenkohlenwasserstoffe .....	78
4.2	Die Enzymfamilie der Terpensynthesen in Mais umfasst mehr als 20 Mitglieder .....	79
4.3	Die Muster in der Terpenemission von B73 lassen sich auf die Produktspektren von fünf Multiproduktenzymen zurückführen .....	82
4.4	Die biochemischen Merkmale von Terpensynthesen aus Mais sind ähnlich denen von Terpensynthesen aus anderen Pflanzenfamilien .....	84
4.5	Die Variabilität im Terpenspektrum adulter Pflanzen der Kultivare B73 und Delprim beruht auf funktionell unterschiedlichen Allelen von <i>tps4</i> und <i>tps5</i> .....	85
4.6	Zwei Aminosäureaustausche beeinflussen die Funktionalität von <i>tps5</i> -Allelen .....	86
4.7	Die gegensätzliche Stereoselektivität von TPS4 und TPS5 wird durch vier Aminosäuren im aktiven Zentrum bestimmt .....	87
4.8	Die Gene <i>tps4</i> und <i>tps5</i> sind vermutlich durch Genverdopplung aus einem zu <i>tps5</i> ähnlichen Ursprungsgen entstanden .....	88
4.9	Die Diversität der Produktbildung von TPS4 und TPS5 lässt sich durch hypothetische Reaktionsmechanismen erklären .....	89
4.10	Die Modellierung von Enzym-Substrat- und Enzym-Intermediat-Komplexen gibt einen Einblick in das aktive Zentrum von TPS4 .....	91
4.11	Das Produktspektrum von TPS7 kann durch Mutagenese gezielt verändert werden .....	93
4.12	Ausblick .....	96
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>98</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>100</b>
<b>7</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>108</b>
7.1	DNA-Sequenzen .....	108



# 1 Einleitung

## 1.1 Allgemeines

Seit altersher üben Duftstoffe und Aromen eine geradezu magische Wirkung auf den Menschen aus. So herrschte schon zur Zeit der Antike ein reger Handel mit diesen Substanzen. Welche Bedeutung ihnen damals zugemessen wurde, geht unter anderem aus der biblischen Erzählung der Geburt Jesu hervor. Die drei Weisen aus dem Morgenland schenkten dem Kind neben Gold auch Weihrauch und Myrrhe, zwei wohlriechende Harze aus verschiedenen *Boswellia*- und *Commiphora*-Arten. Ein anderer Balsam, das aus Kiefern gewonnene Terpentin, gab den Duftstoffen und Hauptbestandteilen dieser Harze ihren Namen: Terpene.

Die Terpene bilden mit mehr als 30.000 verschiedenen Substanzen die größte Klasse innerhalb der Naturstoffe [BUCKINGHAM, 1998]. In Form von ätherischen Ölen, oftmals äußerst komplexen Stoffgemischen, können Terpene z.B. mittels Wasserdampfdestillation, Extraktion oder durch Pressen aus Pflanzen oder bestimmten Pflanzenteilen gewonnen werden. Neben ihrem Einsatz als Duftstoff oder Lebensmittelzusatz werden sie heutzutage zur Gummierstellung, als synthetische Intermediate oder als Lösungsmittel für Lacke und Harze verwendet. Darüber hinaus gewinnen Terpene zunehmend als pharmakologisch interessante Substanzen an Bedeutung. So wird beispielsweise das aus der Rinde der Eibe (*Taxus brevifolia*) gewonnene Diterpenderivat Taxol zur Behandlung verschiedener Krebsarten eingesetzt [PEZZUTO, 1997].

Im Unterschied zu den meisten anderen Lebensformen besitzen Pflanzen nicht die Fähigkeit der freien Ortsbewegung. Sie sind daher ständig wechselnden biotischen und abiotischen Einflüssen ausgesetzt und mussten im Laufe ihrer Entwicklung Schutz- und Abwehrmechanismen entwickeln. Neben weiteren Sekundärmetaboliten spielen Terpene hierbei eine entscheidende Rolle. So können sie in hohen Konzentrationen z.B. in den Drüsen von Blättern der Baumwolle (*Gossypium hirsutum*) oder in den Harzgängen im Xylem von Koniferen als Fraßhemmstoffe, Toxine oder als mechanische Barriere fungieren [STIPANOVIC *et al.*, 1999; BOHLMANN *et al.*, 1998A]. In indirekte Abwehrmechanismen scheinen Terpene ebenfalls involviert zu sein. TURLINGS und Mitarbeiter (1990) konnten zeigen, dass Maispflanzen nach Raupenfraß ein Terpene enthaltendes, komplexes Duftbouquet freisetzen. Mit Hilfe dieses Duftes können parasitische Schlupfwespen eine von Raupen befallene Pflanze lokalisieren und effizient einen Wirt zur Eiablage finden. Neben diesen Abwehrmechanismen dienen flüchtige Terpene aber auch als Lockstoff für Bestäuber [RAGUSO *et al.*, 1995; DUDAREVA *et al.*, 1996; PICHERSKY & GERSHENZON, 2002] oder als Signalstoff zwischen Pflanzen [ARIMURA *et al.*, 2000; ARIMURA *et al.*, 2002]. Weiterhin können sie als Antioxidantien die Pflanzenzelle schützen. Einige, meist komplexere Terpene, haben Funktionen im Primärmetabolismus. So sind verschiedene Carotenoide und das, eine Phytolseitenkette enthaltende Chlorophyll an der Photosynthese beteiligt. Ubichinone und Plastochinone besitzen ebenfalls lange Terpenseitenketten und fungieren als

Elektronenüberträger. Als strukturelle Komponenten haben Terpene in Form von Phytosterolen Einfluss auf den Aufbau der Zellmembran und einige Gibberellane steuern als Phytohormone die Regulation des Pflanzenwachstums.

## 1.2 Überblick über die Terpenbiosynthese in Pflanzen

Betrachtet man die Summenformeln verschiedener Terpene, so fällt auf, dass die Anzahl der Kohlenstoffatome im Molekül in der Regel ganzzahligen Vielfachen der Zahl Fünf entspricht. Je nach Anzahl dieser  $C_5$ -Einheiten klassifiziert man die Terpene in Hemi- ( $C_5$ ), Mono- ( $C_{10}$ ), Sesqui- ( $C_{15}$ ), Di- ( $C_{20}$ ), Sester- ( $C_{25}$ ), Tri- ( $C_{30}$ ), Tetra- ( $C_{40}$ ) sowie Polyterpene ( $C_5$ )<sub>n</sub> mit  $n > 8$ . Durch Modifizierungsreaktionen können aber auch terpenoide Verbindungen entstehen, die eine von diesem Schema abweichende Anzahl an Kohlenstoffatomen enthalten. Die Abspaltung einer  $C_4$ -Einheit von Sesqui- und Diterpenen führt beispielsweise zur Bildung der sogenannten Homoterpene ( $C_{11}$  bzw.  $C_{16}$ ) [DONATH & BOLAND, 1994].

In der Natur kommen Terpene als reine Kohlenwasserstoffe, aber auch in mehr oder weniger modifizierter Form wie z.B. als Alkohole, Ether, Ketone, Carbonsäuren und Ester vor. Die große Anzahl möglicher Kohlenstoffgrundgerüste, die Lage der Doppelbindungen und die verschiedenen Modifikationsmöglichkeiten ergeben die schier unüberschaubare strukturelle Vielfalt dieser Stoffklasse (Abb. 1.1) [CONNOLLY & HILL, 1991].

Am Ende des 19. Jahrhunderts erkannte Otto Wallach aufgrund systematischer Studien an Monoterpenen, dass sich die meisten Terpene rein formell aus mehreren, in der Regel in Kopf-Schwanz-Stellung miteinander verbundenen, Isopreneinheiten (2-Methyl-1,3-Butadien) zusammensetzen [WALLACH, 1885]. Für dieses später als „Isoprenregel“ bezeichnete Konzept wurde er 1910 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet. Aufbauend auf Wallachs Arbeiten fand Leopold Ruzicka heraus, dass Terpene durch die Verknüpfung biologischer Isopreneinheiten, dem sogenannten „aktiven Isopren“, gebildet werden. Weiterhin postulierte er, dass bei der Bildung des Terpengrundgerüsts durch elektrophile Reaktionen carbokationische Intermediate entstehen, die verschiedenste Zyklisierungen und Umlagerungen durchlaufen können. Mittels dieser erweiterten „Isoprenregel“ („biogenetische Isoprenregel“, [RUZICKA, 1953]) konnte erstmalig gezeigt werden, dass auch Verbindungen zu den Terpenen gehören oder sich von ihnen ableiten, die, wie z.B. die Steroide, nicht in das von Wallach formulierte Prinzip passen. Auch Ruzicka erhielt für seine Arbeiten über Terpene 1939 den Nobelpreis. Das von ihm postulierte „aktive Isopren“ wurde im Jahre 1958 zeitgleich von Feodor Lynen in München [LYNEN *et al.*, 1958] und Konrad Bloch in Cambridge [CHAYKIN *et al.*, 1958] als Isopentenylidiphosphat (IPP) identifiziert (Nobelpreis 1964).

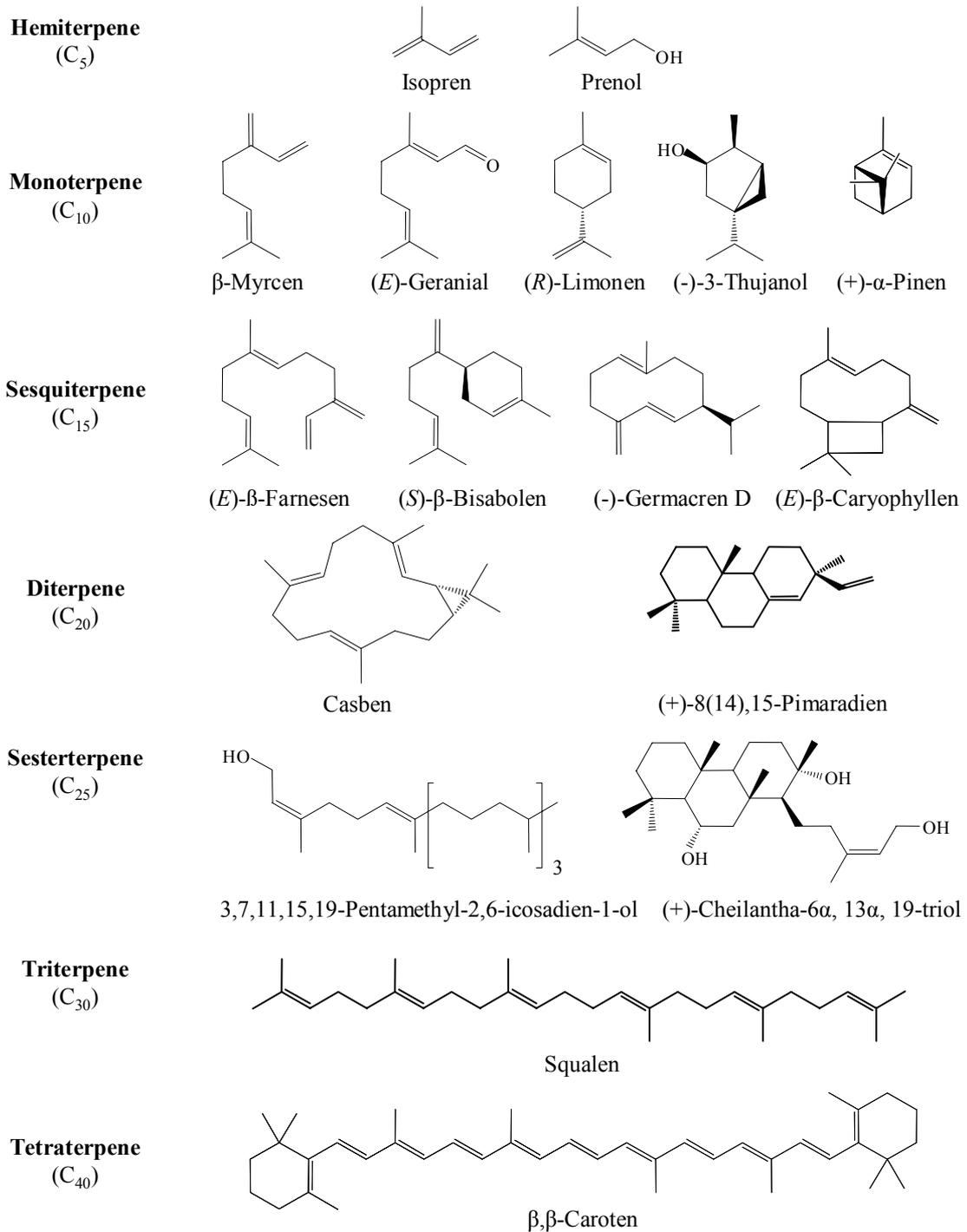
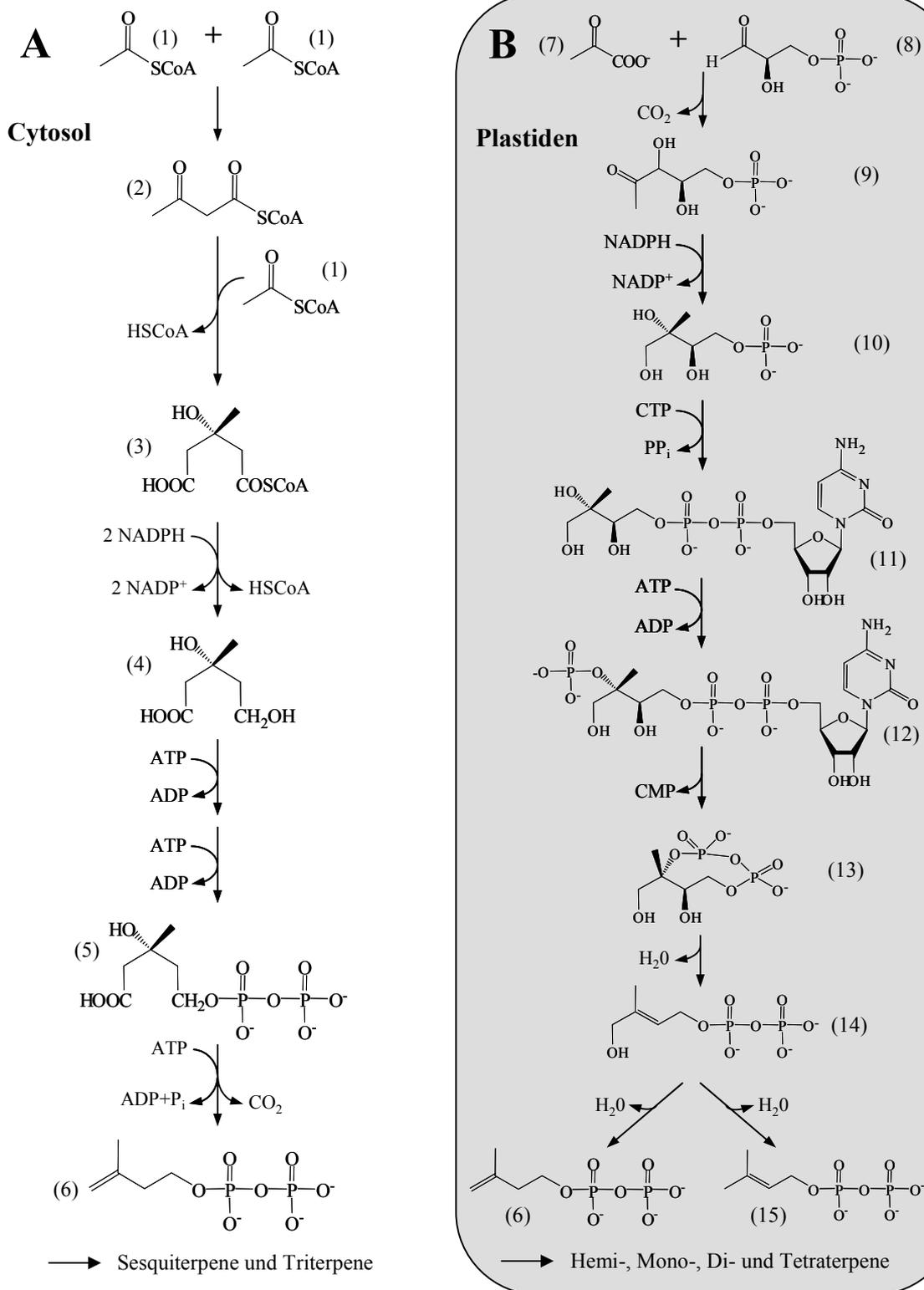


Abb. 1.1 Klassifizierung und Strukturen einiger ausgewählter Terpene.

Die Bildung von IPP erfolgt in höheren Pflanzen über zwei unterschiedliche Biosynthesewege: zum einen über den Mevalonatweg im Cytosol [LYNEN & HENNING, 1960) und zum anderen über einen erst vor ca. zehn Jahren entdeckten, ursprünglich in Bakterien beschriebenen alternativen Weg in den Plastiden [ROHMER *et al.*, 1993; SCHWENDER *et al.*, 1996; LICHTENTHALER *et al.*, 1997; RODRIGUEZ-CONCEPCION & BORONAT, 2002] (Abb. 1.2).



**Abb. 1.2** Der Mevalonat-Weg (A) im Cytosol und der Methylerythritolphosphat-Weg (MEP) (B) in den Plastiden von Pflanzenzellen führen zur Bildung von Isopentenylidiphosphat, dem Grundbaustein der Terpene [nach EISENREICH *et al.*, 2001]. Die Verbindungen sind: Acetyl-Coenzym A (1), Acetoacetyl-Coenzym A (2),  $\beta$ -Hydroxy- $\beta$ -Methylglutaryl-CoA (3), Mevalonsäure (4), Mevalonsäurediphosphat (5), Isopentenylidiphosphat (6), Pyruvat (7), Glyceraldehyd-3-Phosphat (8), 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat (9), 2-C-Methyl-D-Erythritol-4-Phosphat (10), Diphosphocytidyl-2-C-Methyl-D-Erythritol (11), 4-Diphosphocytidyl-2-C-Methyl-D-Erythritol-2-Phosphat (12), 2-C-Methyl-D-Erythritol-2,4-Cyclodiphosphat (13), Hydroxymethylbutenyl-4-Diphosphat (14), Dimethylallyldiphosphat (15).

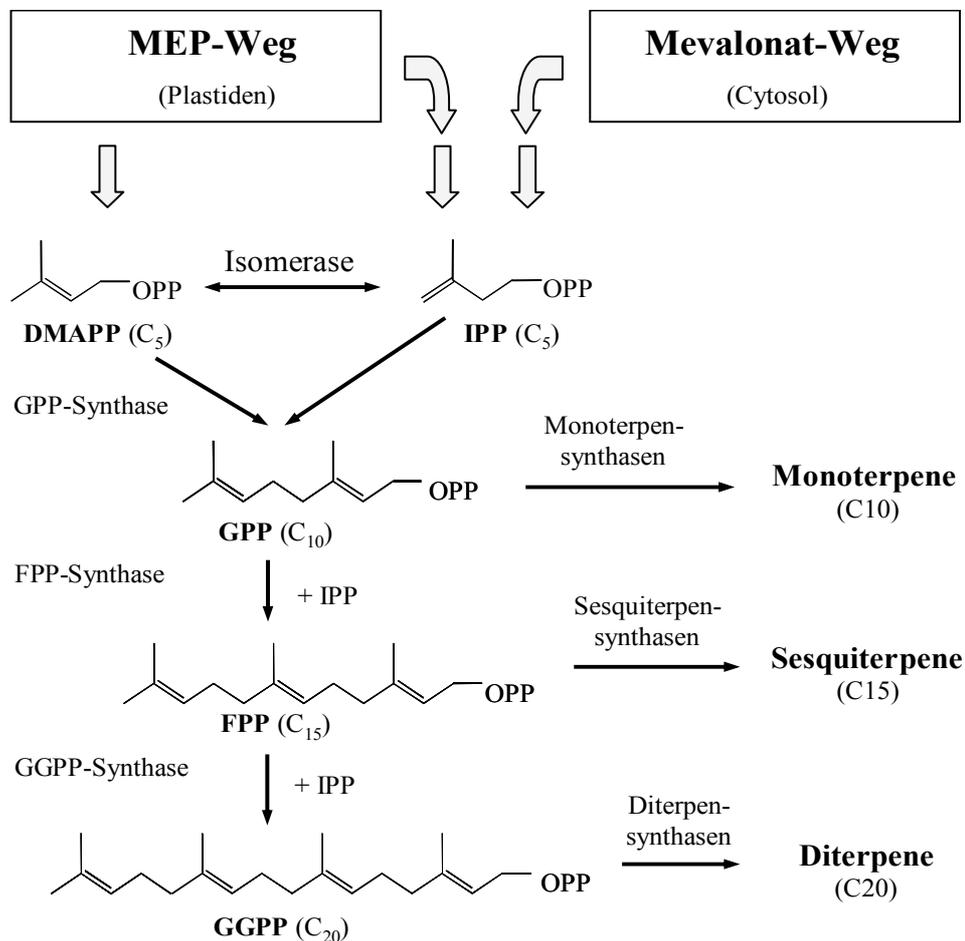
Im Mevalonat-Weg wird IPP aus drei Molekülen Acetyl-Coenzym A gebildet. Durch eine biologische Claisen-Kondensation zweier Acetyl-CoA-Reste zu Acetoacetyl-CoA und der anschließenden Aldol-Addition eines weiteren Moleküls Acetyl-CoA entsteht das  $\beta$ -Hydroxy- $\beta$ -Methylglutaryl-CoA (HMG-CoA). Die beteiligten Enzyme sind die Acetyl-CoA-Acetyltransferase und die HMG-CoA-Synthase. Die Reduktion von  $\beta$ -Hydroxy- $\beta$ -Methylglutaryl-CoA durch die HMG-CoA-Reduktase führt zur Mevalonsäure. Diese wird durch die Mevalonatkinase und die Phosphomevalonatkinase über das Mevalonatmonophosphat zum Mevalonatediphosphat phosphoryliert. Die Pyrophosphomevalonatedecarboxylase schließlich katalysiert die Decarboxylierung und Dehydratisierung von Mevalonatediphosphat zum Isopentenylidiphosphat.

Im Gegensatz zum Mevalonat-Weg wird IPP im MEP-Weg, benannt nach seinem Intermediat 2-C-Methyl-D-Erythritol-4-Phosphat, aus Glyceraldehyd-3-Phosphat und Pyruvat gebildet. Beide Vorstufen werden unter Abspaltung der Säuregruppe des Pyruvats durch die 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphatsynthase zum 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat verbunden. Die durch die 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphatreductoisomerase katalysierte Umlagerung des Kohlenstoffgerüsts und die Reduktion der Aldehydgruppe führen zum 2-C-Methyl-D-Erythritol-4-Phosphat. Dieses wird über die Zwischenstufen 4-Diphosphocytidyl-2-C-Methyl-D-Erythritol und 4-Diphosphocytidyl-2-C-Methyl-D-Erythritol-2-Phosphat durch die entsprechenden Synthasen zum 2-C-Methyl-D-Erythritol-2,4-Cyclodiphosphat umgewandelt. Eine Dehydratisierung resultiert nun in der Bildung von Hydroxymethylbutenyl-4-Diphosphat. Durch eine weitere Dehydratisierung entstehen als Endprodukte des MEP-Weges sowohl Isopentenylidiphosphat als auch Dimethylallyldiphosphat.

Die Biosynthese der Terpene aus Isopentenylidiphosphat (Abb. 1.3) ist in einer Vielzahl an Übersichtsartikeln detailliert beschrieben worden [GERSHENZON, 1993; MCGARVEY & CROTEAU, 1995; CHAPPELL, 1995; KREUZWIESER *et al.*, 1999]. Sie beginnt mit der reversiblen Isomerisierung von IPP zu Dimethylallyldiphosphat (DMAPP). Durch Verknüpfung der elektrophilen Allyl-CH<sub>2</sub>-Gruppe des DMAPP (C<sub>5</sub>) mit der nukleophilen Methylengruppe von IPP (C<sub>5</sub>) entsteht das Geranyldiphosphat (GPP, C<sub>10</sub>). Dessen Reaktion mit einem weiteren Äquivalent IPP führt zum Farnesyldiphosphat (FPP, C<sub>15</sub>). Eine weitere Kopf-Schwanz-Verknüpfung von IPP (nukleophiler Kopf) und FPP (elektrophiler Schwanz) liefert schließlich das Geranylgeranyldiphosphat (GGPP, C<sub>20</sub>). Diese Kondensationsreaktionen werden von Prenyltransferasen katalysiert. Höhermolekulare Terpene entstehen durch weitere Verknüpfung der verschiedenen Prenyldiphosphate. So führt die Schwanz-Schwanz-Dimerisierung von FPP zu Squalen (C<sub>30</sub>) und die Schwanz-Schwanz-Verknüpfung zweier Äquivalente GGPP zu Phytoen (C<sub>40</sub>).

Die azyklischen Prenyldiphosphate GPP, FPP und GGPP sind die direkten Vorstufen der Mono-, Sesqui- und Diterpene. Ihre Umwandlung in die verschiedenen Kohlenstoffgrundgerüste wird durch Terpensynthasen vermittelt. Monoterpensynthasen wandeln GPP in Monoterpene um, Sesquiterpensynthasen katalysieren die Reaktion von FPP zu Sesquiterpenen, und Diterpensynthasen die Reaktion von GGPP zu Diterpenen. Die durch intramolekulare Zyklisierungen, Hydridverschiebungen oder Umlagerungen entstandenen Terpengrundgerüste können nun noch eine Vielzahl von Reaktionen (z.B. Oxidationen,

Reduktionen, Isomerisierungen) eingehen. So werden beispielsweise verschiedene Sesquiterpenkohlenwasserstoffe durch einen mikrosomalen Enzymextrakt aus Zichorie (*Cichorium intybus*) in Gegenwart von NADPH hydroxyliert [DE KRAKER *et al.*, 2003]. Für solche Hydroxylierungen sind in der Regel Cytochrom-P450 abhängige Monooxygenasen verantwortlich [WÜST *et al.*, 2001, GREENHAGEN *et al.*, 2003]



**Abb. 1.3 Überblick über die Biosynthese von Mono-, Sesqui- und Diterpenen in höheren Pflanzen.** Das über den Mevalonat-Weg im Cytosol oder über den MEP-Weg in den Plastiden gebildete Isopentenylpyrophosphat (IPP) wird durch eine reversible Isomerisierung in Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) überführt. Die Verknüpfung von DMAPP und IPP führt zu den Prenylpyrophosphaten Geranylpyrophosphat (GPP), Farnesylpyrophosphat (FPP) und Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP). Diese werden schließlich in einer durch Terpensynthasen katalysierten Reaktion in die einzelnen Terpengrundgerüste umgewandelt.

## 1.3 Terpensynthasen, die Schlüsselenzyme der Terpenbiosynthese

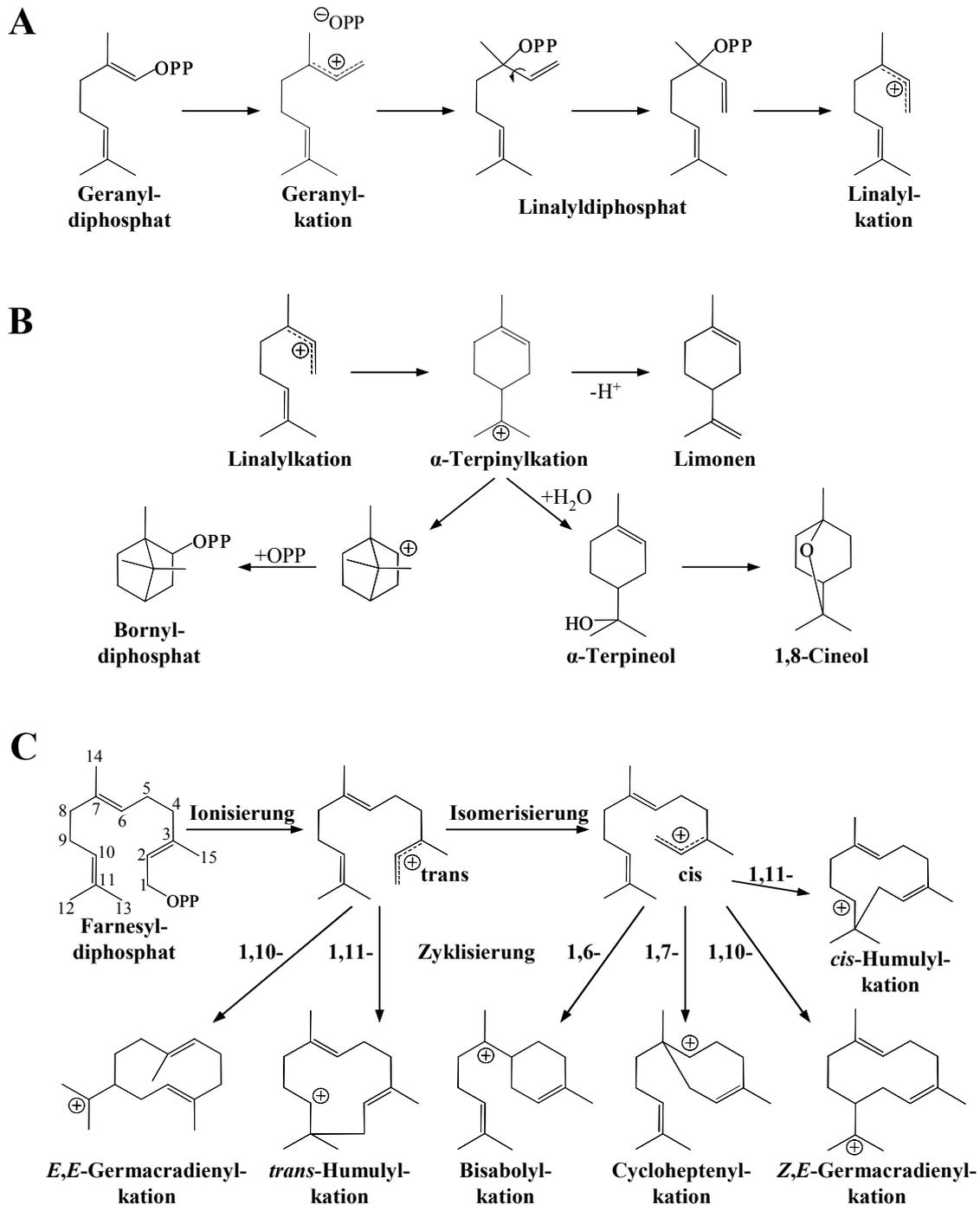
### 1.3.1 Enzymologie

Die Umwandlung der in allen Pflanzen vorhandenen Prenyldiphosphate zu einer großen Anzahl verschiedenster Kohlenstoffgrundgerüste wird von Terpensynthasen (EC 4.2.3.x.) katalysiert. Da dies der erste Schritt des Biosyntheseweges ist, in dem die Bildung einzelner Terpene maßgeblich kontrolliert werden kann, bezeichnet man Terpensynthasen im allgemeinen als die Schlüsselenzyme der Terpenbiosynthese.

Zur Zeit sind weit mehr als 30 Terpensynthasen pflanzlichen Ursprungs als cDNA kloniert oder als Protein direkt aus der Pflanze isoliert wurden [TRAPP & CROTEAU, 2001]. Die bisher untersuchten Proteine besitzen ähnliche physikalische und chemische Eigenschaften. Sie haben eine molare Masse zwischen 56 und 96 kDa [KREUZWIESER *et al.*, 1998] und treten als Monomer [ALONSO *et al.*, 1992; PICHERSKY *et al.*, 1995; WISE *et al.*, 1998] oder Homodimer [SCHNEE *et al.*, 2002; WISE *et al.*, 1998; WHITTINGTON *et al.*, 2002; RYNKIEWICZ *et al.*, 2001] auf. Das pH-Optimum liegt meist im Bereich von pH 6.0 bis 7.5, kann aber auch ins Basische verschoben sein. So besitzt die *epi*-Cedrolsynthase von *Artemisia annua* ein pH-Optimum nahe pH 9.0 [MERCCKE *et al.*, 1999]. Als Cofaktor benötigen Terpensynthasen ein divalentes Metallkation, in der Regel  $Mg^{2+}$  oder  $Mn^{2+}$ . Die Monoterpensynthasen von Gymnospermen unterscheiden sich von allen anderen bisher bekannten Terpensynthasen im zusätzlichen Bedarf eines monovalenten Kations, vorzugsweise  $K^+$ , und in der Bevorzugung von  $Mn^{2+}$  (oder  $Fe^{2+}$ ) vor  $Mg^{2+}$  als Cofaktor [BOHLMANN *et al.*, 1998A]. Außerdem besitzen sie ein generell höheres pH-Optimum [TRAPP & CROTEAU, 2001]. Ein gemeinsames Merkmal von Terpensynthasen ist, dass sie meist mehrere verschiedene Verbindungen mit teilweise sogar unterschiedlichen Kohlenstoffgrundgerüsten bilden. So wurden z.B. in den Produktspektren der  $\gamma$ -Humulensynthase und  $\delta$ -Selinensynthase von *Abies grandis* insgesamt 52 bzw. 34 verschiedene Sesquiterpene identifiziert [STEELE *et al.*, 1998A).

Die natürlichen Substrate der Mono- und Sesquiterpensynthasen sind das 2,3-(*E*)-GPP bzw. das 2,3-(*E*)-FPP. Da im Falle von GPP die *trans*-Konfiguration der C2-C3-Doppelbindung die intramolekulare Zyklisierung verhindert, muß als erster Schritt der Reaktion von GPP zu zyklischen Monoterpenen nach der Ionisierung eine *trans-cis*-Isomerisierung erfolgen. Von CROTEAU (1987) wurde dafür der in Abbildung 1.4.A dargestellte Mechanismus vorgeschlagen: die Dephosphorylierung von GPP erfolgt unter Beteiligung des divalenten Metallkations und führt zum Geranylkation. Durch Anlagerung des Pyrophosphatrests an Position C3 dieses Intermediates entsteht das enzymgebundene tertiäre GPP-Isomer Linalyldiphosphat. Dessen C2-C3-Einfachbindung kann nun rotieren und die folgende Dephosphorylierung resultiert im Linalylkation. Im weiteren Verlauf der katalytischen Kaskade kann es durch den elektrophilen Angriff des Carbokations auf die C2-C3-Doppelbindung zur 1,6- oder 1,7-Zyklisierung kommen. Hydridverschiebungen und/oder weitere elektrophile Zyklisierungen sowie die Deprotonierung oder Anlagerung einer nukleophilen Gruppe (z.B. Wasser, Diphosphat) führen schließlich zur Bildung des jeweiligen Monoterpens (Abb. 1.4.B).

Für Sesquiterpensynthasen wird als analoger Mechanismus die Isomerisierung des Farnesylkations über das Nerolidyldiphosphat angenommen [CANE *et al.*, 1990]. Da im Gegensatz zu GPP eine weitere, distale Doppelbindung (C10-C11) vorhanden ist, sind neben 1,6- und 1,7-Zyklisierungen auch 1,10- und 1,11-Zyklisierungen möglich (Abb. 1.4.C). Für letztere ist allerdings die Isomerisierung des Farnesylkations nicht unbedingt nötig, da keine sterischen Behinderungen vorhanden sind [HARRISON *et al.*, 1988].



**Abb. 1.4 Die Bildung von Mono- und Sesquiterpenen aus den Substraten Geranyldiphosphat und Farnesyldiphosphat.** (A) Von CROTEAU (1987) vorgeschlagener Mechanismus der *trans-cis*-Isomerisierung der C2-C3-Doppelbindung von GPP. (B) Mechanismus der Bildung einiger repräsentativer Monoterpene ausgehend vom Linalylkation. (C) Mögliche primäre Zyklisierungen des Farnesylkations.

### 1.3.2 Sequenzverwandtschaft und genomische Organisation von Terpensynthasengen

Terpensynthasen bilden eine große, strukturell und funktionell sehr heterologe Enzymfamilie. Es ist bisher nicht möglich, ausgehend von der Primärstruktur dieser Proteine auf ihre katalytische Funktion zu schließen. So produzieren einige

Terpensynthasen, die mit 70 bis 95% Sequenzidentität auf Aminosäureebene sehr ähnlich sind, völlig unterschiedliche Produkte, während andere Enzyme mit weniger als 30% Aminosäureidentität gleiche Reaktionen katalysieren [TRAPP & CROTEAU, 2001].

BOHLMANN, MEYER-GAUEN und CROTEAU (1998A) schlagen vor, die Terpensynthasen aus Pflanzen aufgrund ihrer Aminosäureidentität in sechs Untergruppen (Tpsa – Tpsf) einzuteilen. Die am Sekundärmetabolismus beteiligten Mono- und Sesquiterpensynthasen bilden hierbei die Gruppen Tpsa, Tpsb und Tpsd. Die wenigen bisher bekannten Terpensynthasen des Primärmetabolismus unterscheiden sich in ihrer Sequenz deutlich von denen des Sekundärmetabolismus und sind in die Untergruppen Tpse und Tpsc eingeordnet. Eine Linaloolsynthase aus *Clarkia breweri* zeigt Sequenzmerkmale sowohl der Synthasen des Primär- als auch des Sekundärmetabolismus. Sie wird als bisher einziges Mitglied der Gruppe Tpsf zugeordnet [BOHLMANN *et al.*, 1998A]. Erst kürzlich konnten im Löwenmäulchen (*Antirrhinum majus*) drei Monoterpensynthasen identifiziert werden, die zusammen mit der *Arabidopsis thaliana*-Terpensynthase AtTPS14 eine weitere Gruppe, Tpsg, formen [DUDAREVA *et al.*, 2003]. Diese 1998 erfolgte Einteilung der Terpensynthasen in sechs Untergruppen beruht nur auf Proteinsequenzdaten einer sehr begrenzten Anzahl unterschiedlicher Pflanzenarten. Mit Ausnahme der Copalyldiphosphatsynthase (Gruppe Tpsc) aus Mais (*Zea mays*) [BENSEN *et al.*, 1995] waren damals z.B. noch keine Vertreter aus einkeimblättrigen Pflanzen bekannt. Es bleibt daher abzuwarten, ob und in welchem Ausmaß dieses Schema in Zukunft verändert oder erweitert werden muss.

Eine andere Klassifizierung von Terpensynthasen basiert auf ihrer Exon-Intron-Struktur. Ausgehend von der Analyse genomischer DNA von 18 unterschiedlichen Terpensynthasegenen aus verschiedenen Pflanzenarten teilen TRAPP & CROTEAU (2001) die Gene hierbei in drei verschiedene Klassen (I-III) ein. Weiterhin postulieren sie, dass der Vorläufer der rezenten, in den Sekundärmetabolismus eingebundenen, Terpensynthasen vor ca. 300 Millionen Jahren, also noch vor der Trennung von Gymnospermen und Angiospermen, durch Genverdopplung eines Diterpensynthase-ähnlichen Ursprungsgens entstanden ist. Aus diesem sogenannten Klasse I-Gen sind dann durch Exon- und Intronverlust die Gene der Klassen II und III hervorgegangen.

Im Gegensatz zu den in den Primärmetabolismus eingebundenen Terpensynthasen zeigen die Proteine der Gruppen Tpsa, Tpsb und Tpsd eine bedeutend breitere funktionelle Diversität. Dies steht vermutlich mit der Kopiezahl der Gene und der physiologischen Toleranz von funktionellen Mutationen im engen Zusammenhang [BOHLMANN *et al.*, 1998A]. Viele Terpensynthasen des Sekundärmetabolismus bilden große, wahrscheinlich durch häufige Genverdopplungen entstandene Genfamilien. Die Veränderungen der einzelnen Genkopien, bedingt durch die Anreicherung von Mutationen, ist die Basis der funktionellen Diversität. In Tabak haben Southern-Blot-Analysen gezeigt, dass im tetraploiden Genom etwa 12-15 verschiedene Gene vorhanden sind, die dem 5-*epi*-Aristolochensynthasegen sehr ähnlich sind [FACCHINI & CHAPPELL]. Ein weiteres Beispiel ist die Genfamilie der Germacren B-Synthase aus *Lycopersicon hirsutum*. VAN DER HOEVEN und Mitarbeiter (2000) identifizierten insgesamt neun verschiedene cDNAs, die mit ca. 93% Nukleotididentität untereinander eine relativ hohe

Sequenzähnlichkeit aufweisen. Im Gegensatz dazu bilden die Terpensynthasen des Primärmetabolismus offenbar keine großen Genfamilien. So gibt es in Mais nur ein Copalyldiphosphatsynthasegen [BENSEN *et al.*, 1995] und in *Arabidopsis* nur zwei Kopien dieses Gens [SUN & KAMIYA, 1994]. Die Gene des Sekundärmetabolismus sind in der Regel nicht essentiell für das Wachstum und die Entwicklung des Organismus [HARTMANN, 1996]. Daher werden funktionelle Mutationen in ihnen eher toleriert als in Genen des Primärmetabolismus. Ein veränderter Chemotyp kann unter Umständen sogar bei der Interaktion zwischen Pflanzen und anderen Lebewesen von Vorteil sein [BOHLMANN *et al.*, 1998A; THEIS & LERDAU, 2003].

### 1.3.3 Struktur-Funktionsbeziehungen

Die von Terpensynthase-cDNAs kodierte Proteine bestehen in der Regel aus 550-850 Aminosäuren. Monoterpensynthasen sind mit ca. 600-650 Aminosäuren etwa 50-70 Aminosäuren länger als Sesquiterpensynthasen [BOHLMANN *et al.*, 1998A]. Dieser Größenunterschied beruht auf dem Vorhandensein eines N-terminalen Signalpeptides, das als Targetingsignal für den Transport der Monoterpensynthasen vom Cytosol in die Plastiden fungiert [TURNER *et al.*, 1999]. Die Primärstruktur der Signalpeptide ist an sich zwar sehr unterschiedlich, aber ein gemeinsames Merkmal ist der hohe Gehalt an Serin und Threonin sowie die geringe Anzahl saurer Aminosäuren [BOHLMANN *et al.*, 1997]. Deletionsstudien des N-terminalen Bereiches der von COLBY und Mitarbeitern (1993) identifizierte Limonensynthase von *Mentha spicata* haben gezeigt, dass die stromaufwärts von einem konservierten Doppel-Argininmotiv gelegenen Aminosäuren nicht für die enzymatische Aktivität nötig sind [WILLIAMS *et al.*, 1998]. Die Deletion oder Mutation der beiden Argininreste des RR-Motivs der Limonensynthase führte hingegen zu einem Protein, das zwar Linalyldiphosphat, nicht aber Geranyldiphosphat als Substrat umsetzen kann. Es wird daher angenommen, dass sich der N-Terminus des prozessierten Proteins N-terminal des RR-Motivs befindet und dass die Arginine an der Isomerisierung von GPP zu Linalyldiphosphat direkt beteiligt sind [WILLIAMS *et al.*, 1998]. Für die Bildung einiger azyklischer Monoterpene ist die Isomerisierung von GPP zu Linalyldiphosphat nicht erforderlich. So konnten auch schon einige Monoterpensynthasen isoliert werden, die zwar kein RR-Motiv besitzen, aber trotzdem enzymatisch aktiv sind und die Umsetzung von GPP zu azyklischen Monoterpenen katalysieren [DUDAREVA *et al.*, 2003].

Die meisten Diterpensynthasen sind ca. 210 Aminosäuren länger als Monoterpensynthasen. Im N-terminalen Teil der Proteine befindet sich in diesen Fällen ein internes, hochkonserviertes Sequenzelement mit unbekannter Funktion [BOHLMANN *et al.*, 1998A]. Interessanterweise wurde dieses Sequenzelement auch in einer Sesquiterpensynthase [BOHLMANN *et al.*, 1998B] und einer Monoterpensynthase [DUDAREVA *et al.*, 1996] gefunden. Es wird daher angenommen, dass diese Sequenz ein Merkmal des gemeinsamen Vorläufergens der Terpensynthasen war [BOHLMANN *et al.*, 1998A].

Die 5-*epi*-Aristolochensynthase (TEAS) aus *Nicotiana tabacum* ist die erste pflanzliche Terpensynthase, die kristallisiert und deren Tertiärstruktur durch Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt werden konnte. Die von STARKS und Mitarbeitern (1997) veröffentlichte

Struktur zeigt, dass dieses Enzym aus zwei strukturellen Domänen besteht, welche ausschließlich aus  $\alpha$ -Helices und kurzen, verbindenden Schleifen aufgebaut sind. In der C-terminalen Domäne befindet sich das aktive Zentrum, eine von sechs  $\alpha$ -Helices (Helix C, D, F, G, H und J) umgebene, tiefe hydrophobe Tasche. Diese wird durch zwei an der Oberfläche des Proteins gelegene Schleifen (A-C-Loop und J-K-Loop) zum umgebenden Lösungsmittel hin abgeschlossen. Die Ergebnisse der Cokristallisierung von TEAS mit zwei nicht hydrolysierbaren Substratanaloga (Farnesylhydroxyphosphonat und Trifluorofarnesylidiphosphat) führten zu einem Modell der Substratbindung im aktiven Zentrum [STARKS *et al.*, 1997]. Die Diphosphatgruppe des FPP wird offensichtlich durch zwei Magnesiumionen im Eingangsbereich des aktiven Zentrums komplexiert, während der hydrophobe Rest des Substrates in die Tasche hineinragt. Die Asparaginsäurereste eines in allen Terpensynthasen konservierten „DDxxD“-Motivs sind am C-terminalen Ende von Helix D im Bereich der Öffnung des aktiven Zentrums lokalisiert. Mutagenesestudien an der Trichodiensynthese von *Fusarium sporotrichioides* ließen bereits vermuten, dass die Aminosäuren dieses Sequenzmotivs an der Bindung von Magnesiumionen und damit der Pyrophosphatgruppe beteiligt sein müssen [CANE *et al.*, 1996]. Die räumliche Struktur der 5-*epi*-Aristolochensynthase bestätigt diese Annahme. Eines der drei gebundenen Magnesiumionen wird tatsächlich durch Asp301 und Asp305 komplexiert [STARKS *et al.*, 1997].

Das 35 Aminosäuren stromaufwärts vom „DDxxD“-Motiv gelegene und in vielen Terpensynthasen konservierte „RxxR“-Motiv ist vermutlich ebenfalls an der Substratbindung und Katalyse beteiligt. STARKS und Mitarbeiter (1997) nehmen an, dass die Seitenketten der beiden Argininreste über ihre positiven Ladungen die vom Substrat abgespaltene negativ geladene Pyrophosphatgruppe fixieren und somit die nukleophile Addition dieser Gruppe an die entstehenden Carbokationen verhindern.

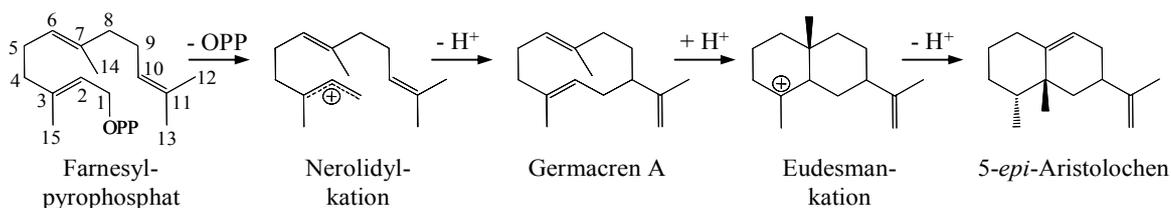
Mittlerweile sind die Tertiärstrukturen weiterer Terpensynthasen veröffentlicht worden: zwei Sesquiterpensynthasen aus verschiedenen Pilzen [CARUTHERS *et al.*, 2000; RYNKIEWICZ *et al.*, 2001], eine Sesquiterpensynthase aus *Streptomyces* UC5319 [LESBURG *et al.*, 1997] und eine Monoterpensynthase aus *Salvia officinalis* [WHITTINGTON *et al.*, 2002]. Letztere hat eine aus zwei strukturellen Domänen bestehende Struktur, die der von TEAS sehr ähnlich ist. Die Terpensynthasen aus Pilzen und Bakterien dagegen sind mit etwa 35-40 kDa kleiner als ihre pflanzlichen Pendanten und bilden im Gegensatz zu ihnen nur eine strukturelle Domäne. Diese weist allerdings eine zur C-terminalen Domäne pflanzlicher Terpensynthasen ähnliche Faltung auf. Als Name für das auch in anderen Enzymen der Terpenbiosynthese [TARSHIS *et al.*, 1994; PANDIT *et al.*, 2000] gefundene charakteristische Faltungsmuster wurde der Begriff „terpene synthase fold“ eingeführt [LESBURG *et al.*, 1997]. Aminosäuresequenzvergleiche und die Modellierung dreidimensionaler Strukturen auf Basis der schon bekannten Kristallstrukturen lassen den Schluss zu, dass zumindest alle Terpensynthasen der Gruppen *Tpsa*, *Tpsb* und *Tpsd* eine mit der 5-*epi*-Aristolochensynthase bzw. mit der Bornyldiphosphat-synthase aus *Salvia* verwandte Struktur aufweisen.

Die N-terminale Domäne der Terpensynthasen hat strukturelle Ähnlichkeit zu zwei Glycosylhydrolasen. Ihre Funktion innerhalb des Proteins ist bisher nicht bekannt

[STARKS *et al.*, 1997]. Da sich der N-Terminus der beiden bekannten Strukturen pflanzlicher Terpensynthasen direkt über dem Eingang des aktiven Zentrums befindet, wird vermutet, dass er, wie auch die A-C- und J-K-Schleife, nach der Substratbindung das aktive Zentrum gegen das umgebende wässrige Milieu hin abschirmt [WHITTINGTON *et al.*, 2002]. Die Konstruktion von verschiedenen Chimärenproteinen, die aus der N-terminalen Domäne und der C-terminalen Domäne zweier unterschiedlicher Terpensynthasen bestehen, zeigt, dass unter Umständen die N-terminale Domäne gegen die eines anderen Enzyms ausgetauscht werden kann, ohne dass es dabei zum Aktivitätsverlust oder zur Veränderung der Produktspezifität kommt [BACK & CHAPPELL, 1996; EL TAMER *et al.*, 2003; PETERS & CROTEAU]. So besitzt die aus der N-terminalen TEAS-Domäne und der C-terminalen Domäne der Vetispiradiensynthase aus *Hyoscyamus muticus* (HVS) gebildete Chimäre (N-TEAS-HVS-C) eine zum HVS-Wildtyp identische Aktivität. Das Konstrukt N-HVS-TEAS-C ist dagegen praktisch inaktiv [BACK & CHAPPELL, 1996]. Aus den Kristallstrukturen, den Ergebnissen der „domain swapping“-Experimente und Deletionsstudien ist ersichtlich, dass sich die am Aufbau des aktiven Zentrums beteiligten Aminosäuren in verschiedenen Abschnitten der C-terminalen Domäne und zumindest im Falle des „RR“-Motivs der Monoterpensynthasen auch im N-terminalen Bereich der Proteine befinden. Einige dieser Reste sind, wie z.B. das „DDxxD“-Motiv, hoch konserviert, andere wiederum sehr variabel. Durch *in-vitro*-Mutagenesestudien konnten in den letzten Jahren Einblicke in die spezifische Funktion einzelner Aminosäuren des aktiven Zentrums erhalten werden. Dies soll im Folgenden an zwei Beispielen illustriert werden.

Die von der 5-*epi*-Aristolochensynthase katalysierte Reaktion vom Farnesylpyrophosphat zum 5-*epi*-Aristolochen (Abb. 1.5) verläuft über das enzymgebundene Intermediat Germacren A [Cane, 1990]. Die Aktivierung dieses Zwischenprodukts durch Protonierung an C6 (MARKOWNIKOW-Orientierung) und die anschließende 2,7-Zyklisierung führen zum Eudesmankation. Eine 2,3-Hydridverschiebung, die Umlagerung der Methylgruppe von C7 zu C2 sowie eine Deprotonierung an C8 resultieren schließlich im Endprodukt 5-*epi*-Aristolochen. Ausgehend von der TEAS-Kristallstruktur wurde angenommen, dass die Protonierung von Germacren A über eine sogenannte katalytische Triade erfolgen könnte [STARKS *et al.*, 1997]. Mittelpunkt dieser Triade ist die Hydroxylgruppe von Tyrosin 520. In räumlicher Nachbarschaft befinden sich zwei Asparaginsäurereste (D444 und D525). Die Carboxylgruppe der Asparaginsäure 444 fungiert als Protonenakzeptor, d.h. sie übernimmt das Proton der OH-Gruppe von Tyrosin 520. Die Asparaginsäure 525 gibt nun ein Proton an den phenolischen Sauerstoff von Tyrosin 520 ab und dieses wird von hier auf das Kohlenstoffatom C6 des Germacren A übertragen. Die Annahme, dass die Hydroxylgruppe von Tyrosin 520 maßgeblich an der Protonierung von Germacren A beteiligt ist, konnte durch die Konstruktion und Analyse der Mutante TEAS (Y520F) bekräftigt werden [RISING *et al.*, 2000]. Phenylalanin ist bis auf das Fehlen der Hydroxylgruppe identisch zu Tyrosin und ein Austausch sollte dazu führen, dass Germacren A durch das Enzym nicht mehr protoniert werden kann und daher als Endprodukt freigesetzt wird. Dieser Effekt wurde tatsächlich beobachtet. Die Mutante

besitzt zwar nur noch ca. 3% der katalytischen Aktivität von TEAS, bildet aber als Hauptprodukt Germacren A.



**Abb. 1.5 Mechanismus der Bildung von 5-*epi*-Aristolochen aus Farnesylpyrophosphat über das enzymgebundene Intermediat Germacren A.**

Die von LITTLE & CROTEAU (2002) durchgeführten Mutagenesestudien an den zwei Terpensynthasen  $\alpha$ -Humulensynthase ( $\alpha$ HS) und  $\delta$ -Selinensynthase ( $\delta$ SS) aus *Abies grandis* sind ein weiteres Beispiel für die funktionelle Charakterisierung einzelner Aminosäureseitenketten in Mitgliedern dieser Enzymklasse. Beide Proteine bilden jeweils mehr als 30 unterschiedliche Sesquiterpene und haben als ungewöhnliches Merkmal ein zweites „DDxxD“-Motiv. Strukturmodelle zeigen, dass sich dieses zweite Motiv, wie auch das in allen Terpensynthasen konservierte erste „DDxxD“-Motiv, im Eingangsbereich zum aktiven Zentrum befindet. Da in beiden Sequenzmotiven der Abstand und die Anordnung der drei Seitenketten zueinander sehr ähnlich sind, wird spekuliert, dass hier eine zweite Diphosphatbindestelle vorliegt. Diese könnte eine alternative Bindungs- und Startkonformation für das Substrat vorgeben und damit zur beobachteten Produktvielfalt führen. Der Austausch des jeweils ersten Asparagins zu Alanin in beiden „DDxxD“-Motiven resultierte sowohl im Fall der  $\alpha$ HS (D343A, D488A) als auch der  $\delta$ SS (D331A, D475A) in einer Verringerung der  $k_{cat}$ -Werte. Die Produktdiversität beider Mutanten war im Gegensatz zum Wildtyp generell kleiner und es wurden vermehrt einfacher aufgebaute Sesquiterpenkohlenwasserstoffe wie z.B.  $\beta$ -Farnesen oder  $\beta$ -Bisabolen gebildet. Dies ist ein Hinweis dafür, dass beide „DDxxD“-Motive an der Substratbindung beteiligt sind. Eine Interpretation der Ergebnisse wird jedoch durch den Fakt erschwert, dass die jeweils erste Asparaginsäure des zweiten „DDxxD“-Motivs der  $\alpha$ HS und  $\delta$ SS dem Asparaginsäurerest 444 in TEAS entspricht. Da die beiden Enzyme  $\delta$ SS und  $\alpha$ HS Terpene bilden, deren Biosynthese über verschiedene Germacrene als Zwischenprodukte verläuft, ist es wahrscheinlich, dass diese Aminosäuren ( $\alpha$ HS: D488,  $\delta$ SS: D475) in Analogie zu TEAS Bestandteil der oben beschriebenen katalytischen Triade sind, und damit zusätzlich zur Substratbindung auch an der Protonierung der Germacrenintermediate beteiligt sein könnten. Die neben der Asparaginsäure 444 in den Aufbau der katalytischen Triade von TEAS involvierten Aminosäuren Tyrosin 520 und Asparaginsäure 525 sind in  $\alpha$ HS und  $\delta$ SS konserviert ( $\alpha$ HS: Y566 und D570,  $\delta$ SS: Y552 und D556). Der Austausch dieser Aminosäuren zu Phenylalanin und Asparagin führte, mit Ausnahme von  $\delta$ SS (D556N), bei allen Mutanten zur Verringerung der Bildung von Terpenen, die über Germacrenintermediate entstehen. Weiterhin traten in allen Fällen größere Veränderungen im Produktprofil auf. LITTLE & CROTEAU (2002) diskutieren, dass die Aminosäuren der katalytischen Triade zwar die Protonierung der Intermediate bewirken, aber auch noch

andere Schritte des Reaktionsmechanismus beeinflussen. Die beobachteten Ergebnisse sind daher vermutlich das Resultat mehrerer, sich überlagernder Effekte.

### 1.3.4 Gen-Expression und Regulation

Die im Sekundärmetabolismus von Pflanzen gebildeten Terpene fungieren z.B. als direkte Abwehrstoffe gegen Schädlinge, aber auch als Signalstoffe in vielfältigen Interaktionen zwischen Pflanzen und anderen Organismen [LANGENHEIM, 1994]. Ihre Synthese muss daher unter Berücksichtigung äußerer biotischer und abiotischer Faktoren präzise reguliert werden. Da Terpensynthasen als Schlüsselenzyme die Biosynthese von Terpenen aus IPP maßgeblich modulieren können, geben die Mechanismen ihrer Regulation wichtige Hinweise für das Verständnis der funktionellen Rolle der Terpene.

Messungen der mRNA-Akkumulation durch Northern Blot-Untersuchungen, RT-PCR-Analysen oder *in situ*-RNA-Hybridisierungsexperimente zeigen, dass die Transkription von Terpensynthasegenen meist spezifisch in einzelnen Pflanzenteilen [YUBA *et al.*, 1996; SHAH & CHA, 2000] oder Geweben [DUDAREVA *et al.*, 1996; BOUWMEESTER *et al.*, 2002; DUDAREVA *et al.*, 2003] erfolgt. So wird beispielsweise mindestens eine Kopie der drei in *Nicotiana attenuata* identifizierten Gene der 5-*epi*-Aristolochensynthase ausschließlich in der Wurzel transkribiert [BOHLMANN *et al.*, 2002].

Verschiedene Minze-Arten (*Lamiaceae*) wie z.B. *Mentha x piperita* oder *Mentha spicata* bilden Terpene in speziellen Drüsenhaaren [FAHN, 1979]. Biochemische Untersuchungen an isolierten glandulären Trichomen ergaben, dass die Terpenbiosynthese nur in einzelnen Zellen dieser Haare, den sogenannten sekretorischen Zellen, stattfindet [GERSHENZON *et al.*, 1992; McCASKILL *et al.*, 1992]. TURNER und Mitarbeiter (1999) konnten mit Hilfe von Immuno-Gold-Markierungen und Importstudien zeigen, dass eine Limonensynthase von *Mentha x piperita* als prozessiertes Protein in den Leucoplasten dieser sekretorischen Zellen lokalisiert ist.

Das Entwicklungsstadium der Pflanze beeinflusst ebenfalls die Expression von Terpensynthasen [DUDAREVA *et al.*, 1996; TAN *et al.*, 2000; CAI *et al.*, 2002]. In Mais (*Zea mays*) akkumuliert z.B. die mRNA des Terpensynthasegens *stc1* zwar in den Blättern junger Pflanzen, nicht jedoch in adulten Pflanzen [SHEN *et al.*, 2000].

Einige der bekannten Sesquiterpensynthasegene werden offenbar konstitutiv transkribiert [BENNETT *et al.*, 2002; BOUWMEESTER *et al.*, 2002]. In vielen Fällen ist die Transkription jedoch durch äußere Faktoren beeinflusst. So kommt es bei verschiedenen Cadinensynthasegenen der Baumwolle (*Gossypium arboreum*) durch direkte Injektion eines aus *Verticilium dahliae* partiell gereinigten Elicitors in die Pflanze oder durch die Zugabe des Elicitors zu Zellkulturen zur mRNA-Akkumulation [CHEN *et al.*, 1995; CHEN *et al.*, 1996; TAN *et al.*, 2000]. In *Lactuca sativa* wird die Transkription zweier Germacren A-Synthasen durch Pilzinfektion mit *Bremia lactucae* induziert [BENNETT *et al.*, 2002]. GUS-Fusionen eines 1,2 kb großen Promotorfragmentes der 5-*epi*-Aristolochensynthase aus Tabak ergaben, dass diese DNA-Sequenz ausreicht, die elicitor- oder pathogeninduzierbare Transkription des Gens zu vermitteln [YIN *et al.*, 1997]. Neben mikrobiellen Pathogenen bzw. deren Elicitoren können aber auch Insekten die

Terpenbiosynthese stimulieren. SCHNEE und Mitarbeiter (2002) zeigten, dass durch Raupenfraß in jungen Maispflanzen die Transkription der Sesquiterpensynthese TPS1 induziert werden kann.

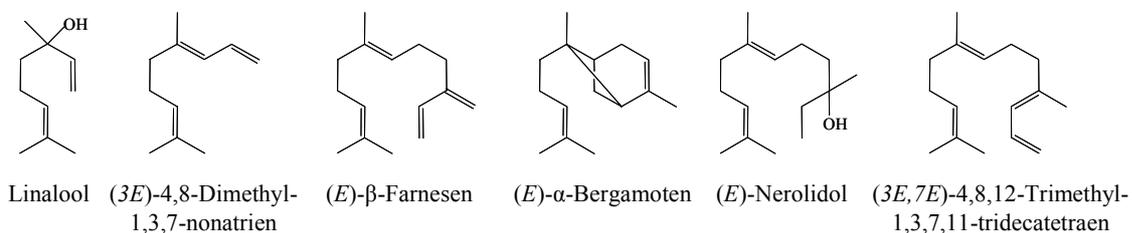
In vielen Fällen ist eine Verwundung der Pflanze schon ausreichend für die Aktivierung der Terpenbiosynthese. In *Abies grandis* werden z.B. verschiedene Mono- und eine Sesquiterpensynthese nach Verwundung des Stammes induziert [BOHLMANN *et al.*, 1997; BOHLMANN *et al.*, 1998B]. Interessanterweise erfolgt hierbei die Transkriptakkumulation aber nicht gleichzeitig. Bereits zwei Stunden nach der Verwundung sind erhöhte Transkriptmengen der Monoterpensynthesegene nachweisbar [STEELE *et al.*, 1998B]. Dieser Zeitrahmen ist in etwa vergleichbar mit der elicitor- oder herbivorabhängigen Induktion von Terpensynthesen in anderen Pflanzen [CHEN *et al.*, 1995; SHEN *et al.*, 2000]. Die maximale Transkriptmenge der Monoterpensynthesegene in *A. grandis* wird nach etwa 2-4 Tagen erreicht. Im Gegensatz dazu verläuft die Akkumulation des Sesquiterpensynthesegens bedeutend langsamer und erreicht erst nach 12 Tagen ein Maximum [STEELE *et al.*, 1998B]. Da die Verwundung von *Abies* häufig durch Insekten wie dem Borkenkäfer hervorgerufen wird, spekuliert man, dass die für die Käfer toxischen Monoterpene eine frühe, direkte Verteidigungsphase des Baumes darstellen. Das Produkt der später gebildeten (*E*)- $\alpha$ -Bisabolensynthese könnte als Juvenilhormonanaloga die Reproduktion des Borkenkäfers beeinflussen [BOHLMANN *et al.*, 1998A].

In verschiedenen Studien wurde in den letzten Jahren die Periodizität der Emission volatiler Stoffe in vielen Pflanzen untersucht [HELSPER *et al.*, 1998; VERDONK *et al.*, 2003]. So folgt z.B. die Terpenabgabe von Baumwollpflanzen, die durch Raupenfraß induziert sind, einem diurnalen Rhythmus, d.h. das Emissionsmaximum wird am frühen Nachmittag erreicht [LOUGHRIN *et al.*, 1994]. In kürzlich veröffentlichten Arbeiten ist erstmalig auch die Periodizität der Transkriptakkumulation von Terpensynthesegenen an zwei unterschiedlichen Beispielen beschrieben worden [LU *et al.*, 2002; DUDAREVA *et al.*, 2003]. DUDAREVA und Mitarbeiter (2003) fanden, dass sowohl die Emission der Terpene (*E*)- $\beta$ -Ocimen und Myrcen als auch die Transkriptmenge der für die Bildung dieser Terpene verantwortlichen Monoterpensynthesen zirkadian reguliert sind.

Die meisten Untersuchungen zur Regulation der Terpensynthesen erfolgten durch Messung der Transkriptakkumulation. Daher ist nicht auszuschließen, dass es weitere bisher unbekannte Regulationsmechanismen z.B. auf der Ebene der Translation oder der posttranslationalen Modifikation gibt. Proteingrößenbestimmungen von nativen, aus der Pflanze isolierten Terpensynthesen ergaben allerdings immer ein übereinstimmendes Ergebnis mit der theoretisch aus der Gensequenz berechneten Proteingröße [PICHERSKY *et al.*, 1995; CHEN *et al.*, 1995; YIN *et al.*, 1997; PHILLIPS, *et al.*, 1999]. Damit sind posttranslationale Modifikationen wie z.B. Glycosylierungen oder proteolytische Spaltungen, mit Ausnahme der N-terminalen Signalpeptide, eher unwahrscheinlich. In einigen Studien konnte weiterhin gezeigt werden, dass die mRNA-Akkumulation zu einer entsprechenden Proteinakkumulation [YIN *et al.*, 1997] bzw. zur Enzymaktivität [Martin *et al.*, 2003; DUDAREVA *et al.*, 2003] führt. Man kann deshalb spekulieren, dass in den meisten Fällen Terpensynthesen auf der Ebene der Transkription reguliert werden.

## 1.4 Biologische Wirksamkeit von Maisterpenen

Schon länger ist bekannt, dass komplexe, Terpene enthaltende pflanzliche Duftgemische als Signale in tritrophischen Interaktionen zwischen Pflanzen, Herbivoren und Carnivoren eine Rolle spielen [Turlings *et al.*, 1990; Dicke, 1994; McCal *et al.*, 1994; Takabayashi *et al.*, 1995; Röse *et al.*, 1996]. In Maissämlingen wird durch Herbivorenbefall die Synthese eines komplexen Duftgemisches induziert. Durch diese Duftstoffe können parasitische Schlupfwespen angelockt werden, welche die Herbivoren als Wirt zur Eiablage nutzen [TURLINGS *et al.*, 1990]. Die Hauptkomponenten im Duftprofil induzierter Maissämlinge sind zum einen verschiedene Mono-, Sesqui- und Homoterpene und zum anderen Indol sowie die sogenannten „green leaf volatiles“ (*Z*)-3-Hexenal, (*E*)-2-Hexenal, (*Z*)-3-Hexenol und (*Z*)-3-Hexenylacetat. Während letztere als Produkte des Lipoxygenase-Weges sofort nach dem Raupenbefall gebildet und freigesetzt werden, beginnt die Emission der Terpene zeitverzögert und erreicht nach ca. 3-8 Stunden ihr Maximum [TURLINGS *et al.*, 1998B].



**Abb. 1.6** Einige Terpene des durch Raupenfraß (*Spodoptera exigua*) induzierten Duftgemisches von Sämlingen der Maissorte „Ioana sweet corn“ [Turlings *et al.*, 1990].

In Blättern und Lieschblättern adulter Maispflanzen werden ebenfalls verschiedene Terpene und „green leaf volatiles“ gebildet [BUTTERY & LING, 1984; UDAYAGIRI & JONES, 1992A]. UDAYAGIRI & JONES (1992B) konnten in Olfactometerexperimenten zeigen, dass diese Substanzgemische einen Parasitoiden (*Macrocentrus grandii*) des Maiszünslers (*Ostrinia nubilalis*) anlocken können. Im Gegensatz zu Maissämlingen ist allerdings der Einfluss von Herbivorie auf die Duftemission adulter Pflanzen bisher nicht nachgewiesen worden.

Interessanterweise unterscheiden sich die Duftprofile von Pflanzen verschiedener Maiskultivare sowohl in qualitativer als auch quantitativer Hinsicht [UDAYAGIRI & JONES, 1992A; TURLINGS *et al.*, 1998B; GOINGUENE *et al.*, 2001; HOBALLAH *et al.*, 2002]. Während beispielsweise im, durch Raupenfraß induziertem Duftspektrum von „Ioana sweet corn“ kein (*E*)- $\beta$ -Caryophyllen vorhanden ist [TURLINGS *et al.*, 1990], ist dieses Terpen eine der Hauptkomponenten im Duftspektrum der Kultivare „Marquis“ [GOINGUENE *et al.*, 2001] und „LG11“ [TURLINGS *et al.*, 1998A]. Die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen dieser Unterschiede sind bisher nicht bekannt. Unklar ist weiterhin auch, ob und in welchem Maße die Interaktionen in den tritrophischen Systemen durch die Variabilität der Terpeninhaltsstoffe der einzelnen Kultivare beeinflusst werden.

## 1.5 Ziel dieser Arbeit

Bisherige Arbeiten zeigen, dass Maispflanzen unter dem Einfluss verschiedener biotischer und abiotischer Faktoren komplexe Terpengemische bilden können. Die qualitative und quantitative Zusammensetzung dieser Gemische, die hauptsächlich von Sesquiterpenen dominiert werden, ist hierbei vom Entwicklungsstand der Pflanze und vom jeweiligen Maiskultivar abhängig. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten nun erstmalig molekulare und genetische Mechanismen untersucht werden, die die Variabilität der Sesquiterpenbiosynthese bestimmen.

Die Maisinzuchtlinie B73 ist in den letzten Jahren als Modelllinie für genetische und molekularbiologische Experimente etabliert worden. So basieren z.B. viele Mais-EST-Datenbanken auf B73-Material [GAI *et al.*, 2000]. Aufgrund dieser Ressourcen war es naheliegend, die Inzuchtlinie B73 für die vorliegenden Untersuchungen auszuwählen. Da zu Beginn der Arbeit noch keine Erkenntnisse über die Terpeninhaltsstoffe von B73 vorlagen, war es nötig, eine detaillierte Analyse der Sesquiterpengemische in diesem Kultivar vorzunehmen. Weiterhin sollten die an der Biosynthese der Terpengemische beteiligten Terpensynthasen identifiziert, und nach heterologer Expression in *E. coli* funktionell charakterisiert werden. Um zu testen, ob die Variabilität der Terpengemische verschiedener Kultivare auf funktionell unterschiedlichen Allelen beruhen könnte, war geplant, Terpensynthasegene aus der Maishybridlinie Delprim zu isolieren und mit den entsprechenden Allelen aus B73 zu vergleichen. Durch Strukturmodellierung und *in vitro*-Mutagenese sollten schließlich Einblicke in die katalytischen Mechanismen der Terpensynthasen erhalten werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Pflanzenmaterial

#### 2.1.1 *Zea mays* L.

Die Pflanzen der Kultivare B73 und Delprim (s. Tabelle 2.1) wurden in Klimakammern der Firma York International (York, USA) unter folgenden Bedingungen aufgezogen: Lichtstärke: 1 mmol/m<sup>2</sup>/s, Luftfeuchte: 65%, Temperatur am Tag (16 h Licht): 22°C, Temperatur nachts: 18°C. Als Kulturmedium wurde mit Osmocote-Dünger (Scotts, Nordhorn, 1 g/l l Substrat) versetztes Tonsubstrat (Klasmann GmbH, Gross-Hesepe) verwendet. Die Pflanzen wurden in 40x60x6 cm großen Schalen ausgesät und als 10 Tage alte Sämlinge in Töpfe (10x10x15 cm) umgesetzt. Um ausgewachsene Pflanzen zu erhalten, wurden die Sämlinge einzeln in große Töpfe (Ø 35 cm) umgepflanzt und im Gewächshaus aufgezogen (Tag: 6-22 Uhr, 25°C, 65% Luftfeuchte; Nacht: 22-6 Uhr, 22°C, 70% Luftfeuchte).

Die Induktion der Terpenbiosynthese erfolgte durch Raupenfraß. Dazu wurden am mittleren Teil der Pflanze jeweils drei Raupen (*Spodoptera littoralis*, drittes Larvenstadium) in einem aus zwei Petrischalenhälften bestehenden Käfig [RÖSE *et al.*, 1996] für mindestens 12 h platziert. Für alle Experimente wurden zwölf bis fünfzehn Tage alte Maispflanzen (20–30 cm hoch, 4-5 ausgebildete Blätter) verwendet.

Tab. 2.1 Beschreibung der in dieser Arbeit verwendeten Maiskultivare

Name	Beschreibung	Herkunft
Delprim	Hybrid-Linie (DSP1387C[Dent] x DSP1743A[Flint])	DSP AG (Delley, Schweiz)
B73	Inzucht-Linie [Reid Yellow Dent]	KWS (Einbeck)

#### 2.1.2 *Arabidopsis thaliana* L.

##### 2.1.2.1 Pflanzenanzucht

Die Kultivierung der Pflanzen erfolgte in Klimakammern der Firma York International (York, USA) unter folgenden Bedingungen: Lichtstärke: 150 µmol/m<sup>2</sup>/s, Luftfeuchte: 45%, Temperatur: 21°C. Die Pflanzen wurden unter Kurztagbedingungen (10 h Tag, 14 h Nacht) angezogen, zur Induktion der Blütenbildung für 3 bis 4 Tage in Langtagkammern umgesetzt (16 h Tag, 8 h Nacht) und anschließend unter Kurztagbedingungen weiterkultiviert. Die transformierten Pflanzen wurden zur schnelleren Blütenbildung komplett unter Langtagbedingungen angezogen.

Das Kultursubstrat bestand aus einem Nullerde-Vermiculit-Sand-Gemisch (Klasmann GmbH, Gross-Hesepe) im Verhältnis 8:1:1 und den beiden Düngern Osmocote und Triabon (je 1 g/l l Gemisch, Scotts, Nordhorn).

Für alle Arbeiten wurde der *Arabidopsis thaliana* Ökotyp Columbia (Col-0) verwendet.

### 2.1.2.2 Stabile Transformation durch *Agrobacterium tumefaciens*

Die stabile Transformation von *Arabidopsis* erfolgte nach der „floral dip“-Methode [CLOUGH *et al.*, 1998]. 500 ml LB-Medium wurden mit 25 ml einer Vorkultur des entsprechenden Agrobakterienstammes (s. Tabelle 2.2) angeimpft, für 24 h bei 28°C mit 220 rpm inkubiert und anschließend zentrifugiert (1 min, 5000g, RT). Nach der Resuspension des Zellpellets in 400 ml Infiltrationsmedium (5% Saccharose [g/v], 0,5x Murashige-Skoog-Medium (Duchefa Biochemie, Amsterdam, Niederlande), 0,044 µM BAP, 0,02% Silwet L-77 [v/v]) und dem Einstellen der OD<sub>600</sub> auf 0,90-0,95 wurden die Blütenstände der zu transformierenden *Arabidopsis*-Pflanzen für je eine Minute in die Bakteriensuspension eingetaucht. Zur Regeneration wurden die Pflanzen über Nacht horizontal gelagert und am folgenden Tag in Leitungswasser gespült. Die nach etwa drei Wochen geernteten Samen wurden zum Trocknen für zwei bis drei Wochen bei Raumtemperatur mit Silicagel in verschlossenen Plastikröhrchen gelagert.

Zum Sterilisieren wurden die Samen für zwei Minuten in Ethanol (50% Ethanol [v/v], 0,01% Triton [v/v]) gespült, danach für zwei Minuten in Natriumhypochloridlösung (15% NaOCl [g/v], 0,01% Triton [g/v]) inkubiert und anschließend drei mal mit sterilem Wasser gewaschen. Die in 0,1% Top-Agar [g/v] (Pflanzenagar, Duchefa Biochemie, Amsterdam, Niederlande) aufgenommenen sterilisierten Samen wurden für einen Tag bei 4°C inkubiert und auf Pflanzenagar (0,8% Pflanzenagar [g/v], 0,44% Murashige-Skoog-Medium [g/v], 1% Saccharose [g/v], 100 µg/ml Kanamycin, 125 µg/ml Timentin (Ticarcillin/Clavulansäure (30:1)) (Duchefa Biochemie, pH 6.0 (Kaliumhydroxid)) ausplattiert. Das Keimen erfolgte unter Kurztagbedingungen (s. 2.1.2.1). Nach etwa zwei Wochen wurden die Sämlinge pikiert und unter Langtagbedingungen (s. 2.1.2.1) kultiviert. Zwei bis drei Wochen alte Pflanzen wurden mittels der „closed loop collection“-Methode (s. 2.8.1.3) phänotypisch charakterisiert.

## 2.2 *Spodoptera littoralis* (Boisd.) [Lepidoptera: Noctuidae]

Eier von *S. littoralis* wurden von Aventis (Frankfurt) oder Syngenta (Basel, Schweiz) bezogen. Die Aufzucht der geschlüpften Raupen erfolgte für 10 bis 15 Tage bei 22°C und einer Lichtstärke von 750 µmol/m<sup>2</sup>/s auf Weizenkeimextrakt (Heliopsis Mix, Stonefly Industries, Bryan, USA) in gut belüfteten Plastikschaalen.

## 2.3 Mikrobiologische Methoden

### 2.3.1 Bakterienstämme

Tab.2.2 Beschreibung der in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme

Bezeichnung/ Herkunft	Genotyp	Verwendung
<i>E. coli</i> BL21(DE3) (Novagen, Madison, USA)	F <sup>-</sup> <i>ompT gal [dcm] [lon] hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub> m<sub>B</sub><sup>-</sup>;</i> <i>E. coli</i> B strain) DE3 (λ Prophage mit T7-RNA-Polymerasegen	Proteinüberexpression (für Vektoren mit T7-Promotor)
<i>E. coli</i> XL1 blue (Stratagene, La Jolla, USA)	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17</i> <i>supE44 relA1 lac [F'proAB</i> <i>lacI<sup>f</sup>ZDM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)]</i>	Site Directed Mutagenesis
<i>E. coli</i> TOP10 (Invitrogen, Carlsbad, USA)	F <sup>-</sup> <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)</i> Φ80 <i>lacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1</i> <i>araD139 Δ (ara-leu)7697 galU galK</i> <i>rpsL (Str<sup>R</sup>) endA1 nupG</i>	Klonierungsarbeiten, Proteinüberexpression (für Vektoren mit <i>tet</i> -Promotor)
<i>A. tumefaciens</i>	Stamm: GV3101, Helferplasmid pMP90	Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i>

### 2.3.2 Antibiotika

Tab. 2.3 Konzentrationen der verwendeten Antibiotika

	Stammlösung (mg/ml in <i>a.dest.</i> )	Endkonzentration (µg/ml Medium)
Ampicillin	100	100
Kanamycin	50	50
Gentamycin	50	50
Spectinomycin	100	100

### 2.3.3 Medien

**LB-Medium:** 25 g LB (Luria-Bertani)-Medium (Invitrogen, Carlsbad, USA) / 1 l *a.dest.*

**LB-Agar:** 32 g LB-Agar (GibcoBrl, Karlsruhe) / 1 l *a.dest.*

**SOC-Medium:** 2% (g/v) Trypton (Sigma-Aldrich, St. Louise, USA), 0,5% (g/v) Hefeextrakt (Sigma-Aldrich), 0,5% (g/v) Glucose, 10 mM Natriumchlorid, 2,55 mM Kaliumchlorid, 21,6 mM Magnesiumchlorid, 20 mM Magnesiumsulfat

**TB-Medium:** 12 g Trypton (Sigma-Aldrich), 24 g Hefeextrakt (Sigma-Aldrich), 4 ml Glycerin, 2,31 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 12,5 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> / 1 l *a.dest.*

### 2.3.4 Kultivierung von Bakterien und Stammhaltung

Die Kultivierung von *Escherichia coli* und *Agrobacterium tumefaciens* erfolgte, wenn nicht anders erwähnt, unter folgenden Standardbedingungen:

Submerskultur: LB-Flüssigmedium, im Schüttelinkubator bei 220 rpm

Emerskultur: LB-Agar, im Brutschrank über Nacht (ca. 16 h)

*E. coli* wurde in der Regel bei 37°C, *A. tumefaciens* bei 28°C kultiviert. Zur Stammhaltung wurden 900 µl Submerskultur mit 100 µl sterilem Glycerol versetzt und bei -80°C eingefroren.

### 2.3.5 Transformation von *Escherichia coli*

#### 2.3.5.1 Elektrotransformation

Zur Herstellung elektrokompenter Zellen wurde eine Übernachtskultur 1:100 in 100 ml LB-Medium überimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> zwischen 0,5 bis 0,8 angezogen. Die Zellen wurden für 20 Minuten auf Eis gestellt, anschließend in einen vorgekühlten Rotor mit 5000g bei 4°C abzentrifugiert und in einem Volumen (100 ml) eiskalten, sterilen *a.dest.* resuspendiert. Nach zwei weiteren Waschschrritten (1x mit ½ Volumen (50 ml) *a.dest.*, 1x mit 1/50 Volumen (2 ml) 10% Glycerol [v/v]) wurden die Zellen in 0,2 ml 10% Glycerol [v/v] aufgenommen, aliquotiert, bei -80°C eingefroren und gelagert.

1-10 µl salzfreie, d.h. in *a.dest.* gelöste DNA und 40 µl auf Eis aufgetaute elektrokompente Zellen wurden zusammen in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (Eurogentech, Seraing, Belgien) gegeben, gemischt und einem elektrischen Puls von 2,5 kV ausgesetzt (Bio-Rad Gene Pulser (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) Kapazität: 25 µF, Widerstand: 200 Ω, Spannung: 2,5 kV). Die transformierten Zellen wurden in 1 ml SOC-Medium aufgenommen, eine Stunde bei 37°C kultiviert und anschließend auf LB-Agarplatten mit geeignetem Selektionsdruck ausgestrichen.

#### 2.3.5.2 Transformation nach der CaCl<sub>2</sub>-Methode

Eine Übernachtskultur wurde 1:50 in 5 ml LB-Medium überimpft, bis zu einer OD<sub>600</sub> zwischen 0,5 bis 0,8 angezogen, auf Eis abgekühlt und bei 4°C mit 5000g zentrifugiert. Nach dem Resuspendieren des Zellpellets in 1 ml Kalziumchlorid-Tris-Lösung (100 mM Kalziumchlorid, 10 mM Tris-HCl pH 7.5) und 10 min Inkubation auf Eis wurde erneut zentrifugiert. Die in 100 µl Kalziumchlorid-Tris-Lösung aufgenommenen Zellen wurden mindestens 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe der DNA (ca. 50-500 ng). Nach 30 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen für 45 Sekunden auf 42°C erwärmt, in 250 µl SOC-Medium aufgenommen, eine Stunde bei 37°C kultiviert und auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Selektionsmedium ausgestrichen.

Kommerziell erhältliche chemisch kompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut und nach Zugabe der DNA wie oben beschrieben transformiert.

#### 2.3.6 Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

Die Transformation von *A. tumefaciens* erfolgte nach HÖFGEN *et al.* (1988). Zur Herstellung kompetenter Zellen wurde eine 2 ml-Übernachtskultur des entsprechenden Agrobakterienstammes 1:25 in 50 ml LB-Medium überimpft, für etwa fünf Stunden bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 bis 1,0 unter Standardbedingungen kultiviert und anschließend zentrifugiert (4000g, 4°C, 5 min). Die Zellen wurden in 10 ml eiskalter Kalziumchlorid-Lösung (20 mM) resuspendiert und in 100 µl Aliquots in flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Zur Transformation wurden 100 µl auf Eis aufgetaute chemisch kompetente Zellen mit 1 µg DNA versetzt und zwei mal in flüssigen Stickstoff eingefroren und im Wasserbad bei

37°C wieder aufgetaut. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurde 1 ml LB-Medium zugegeben, die Kultur für zwei Stunden bei 28°C kultiviert und anschließend zentrifugiert (1 min, 7000g, RT). Die Zellen wurden in 100 µl LB-Medium resuspendiert, auf LB-Agarplatten mit geeignetem Selektionsmedium ausgestrichen und für ein bis zwei Tage bei 28°C im Brutschrank inkubiert.

## 2.4 Isolierung von Nukleinsäuren

### 2.4.1 Isolierung genomischer DNA aus Mais

Zur Isolierung genomischer DNA aus Mais wurde das entsprechende Gewebe (Blatt, Wurzeln) in flüssigen Stickstoff fein zermörsert und mit dem „DNeasy<sup>®</sup> Plant Maxi Kit“ der Firma Qiagen (Hilden) gemäß dem Herstellerprotokoll aufgearbeitet.

### 2.4.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus Mais

0,5 g von in flüssigem Stickstoff zermörserten Pflanzenmaterial wurden in 5 ml TRIZOL<sup>®</sup> Reagenz (Phenol-Guanidin-Wasser-Emulgatorgemisch, Invitrogen (Carlsbad, USA)) aufgenommen, für zwei Minuten mit dem Polytron PT3100 (Kinematica AG, Luzern, Schweiz) homogenisiert (2700 rpm) und fünf Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Lösung in 1 ml Aliquots in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt, je 200 µl Chloroform zugegeben, 15 Sekunden geschüttelt, zwei Minuten auf Eis inkubiert und zur Phasentrennung zentrifugiert (15 min, 12000g, 4°C). Die obere, wässrige Phase wurde nochmals mit je 400 µl Chloroform extrahiert und zentrifugiert. Die Fällung der RNA erfolgte durch Zugabe von je 0,5 ml Isopropanol, 10 min Inkubation bei Raumtemperatur und anschließender Zentrifugation (10 min, 12000g, 4°C). Die RNA-Pellets wurden mit je 1 ml 80% Ethanol [v/v] gewaschen, bei Raumtemperatur im Abzug getrocknet, in 10 µl Wasser aufgenommen und vereinigt.

Zur Isolierung von RNA für Northern-Blots (s. 2.6.4) wurde das „RNeasy Plant Mini Kit“ der Firma Qiagen (Hilden) gemäß dem Herstellerprotokoll verwendet.

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

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte nach BIRNBOIM *et al.* (1979). Die Zellen von 4 ml einer Übernachtskultur wurden nach der Zentrifugation in 100 µl Resuspensionspuffer (10 mM Tris-HCl pH 8.1, 10 mM EDTA, 20% Saccharose [g/v], 50 mM Natriumchlorid, 100 µg/ml RNase) resuspendiert und durch Zugabe von 200 µl Lyselösung (0,2 M Natriumhydroxid, 1% SDS [g/v]) und 5 min Inkubation bei Raumtemperatur lysiert. Nach Zugabe von 150 µl 3M Natriumacetat (pH 5.2) wurde intensiv geschüttelt, fünf Minuten auf Eis inkubiert und zehn Minuten mit 11000g zentrifugiert. Die Fällung der im geklärten Lysat lokalisierten Plasmid-DNA erfolgte durch Ethanolpräzipitation. Dazu wurde das Lysat mit 1/10 Volumen 3M Natriumacetat (pH 5.2) und 2 Volumen Ethanol (99%) versetzt, geschüttelt, 15 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend zentrifugiert (10 min, 11000g, 4°C). Das Nukleinsäurepellet wurde mit

Ethanol (70% [v/v]) gewaschen, bei Raumtemperatur getrocknet und in 30-50 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA) aufgenommen.

Zur Isolierung reinerer Plasmid-DNA für z.B. Sequenzierungen wurden Plasmidpräparationskits der Firma Macherey & Nagel (Düren) gemäß dem Herstellerprotokoll verwendet.

## 2.5 DNA-Techniken

### 2.5.1 Synthese von cDNA

Die cDNA-Synthese erfolgte mit dem Enzym „SuperScript™II RNase H<sup>-</sup> Reverse Transcriptase“ (Invitrogen, Carlsbad, USA) und wurde nach den Angaben des Herstellerprotokolls durchgeführt. Als Matrize für die cDNA-Synthese dienten 1-1,5 µg Gesamt-RNA.

### 2.5.2 RACE

Zur Verlängerung der 5'-Enden eines EST wurden RACE-PCR („rapid amplification of cDNA ends“) durchgeführt. Die Herstellung der als Template benötigten 5'-RACE-cDNAs wie auch die RACE-Reaktionen selbst erfolgten mit dem „SMART™ RACE cDNA Amplification Kit“ (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, USA) nach den Angaben des Herstellerprotokolls.

### 2.5.3 Oligonukleotide

In der Tabelle 2.4 sind die Sequenzen und der Verwendungszweck aller in dieser Arbeit benutzten Oligonukleotide aufgeführt. Standardoligonukleotide wurden nicht berücksichtigt. Die Orientierung ist mit „fwd“ (forward) und „rev“ (revers) angegeben. Die Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersbach) synthetisiert.

Tab. 2.4 Oligonukleotide

Name	Sequenz	Verwendung
M12	ccratcgagaccatggcgctctmccagcacatcgttcc	Klonierung TPS5 (pET11d) fwd
M13	ttattgcgatccttaagcttcgagcctcgtcattcgggwattgg	Klonierung TPS5 (pET11d) rev
M14	tatggcgctctmccagcacatcgttcc	Klonierung TPS4 (pSBET) fwd A
M15	tggcgctctmccagcacatcgttcc	Klonierung TPS4 (pSBET) fwd B
M16	gatccttaagcttcgagcctcgtcattcggg	Klonierung TPS4 (pSBET) rev A
M17	cttaagcttcgagcctcgtcattcggg	Klonierung TPS4 (pSBET) rev B
III5a	catggcgctctcctccagcacatcgttcc	Klonierung TPS4 (pQE60) fwd A
III5b	gcgctcctccagcacatcgttcc	Klonierung TPS4 (pQE60) fwd B
III3a	gatctttcgggtattggctccacaaaacag	Klonierung TPS4 (pQE60) rev A
III3b	tffcgggtattggctccacaaaacag	Klonierung TPS4 (pQE60) rev B
M38	atggtaacctgcattagcgcgatggcgtctcctccagcacatc	Klonierung TPS4/5 (pASK-IBA7) fwd
M39	atggtaggtctcatatcagcttcgattgcccttggtatg	Klonierung TPS4/5 (pASK-IBA7) rev
M89	ccagaattctcttcgaccttcacccaagtctg	Klonierung TPS4 (pHIS8-3) fwd
M90	atagtttagcggccgctcattcgggtattggctccacaaaac	Klonierung TPS4 (pHIS8-3) rev
M69	agactggatccaatcgagaacatggcg	Klonierung TPS4 (pBIN420) fwd
M70	gcttcgagctccgctcattcgggtattgg	Klonierung TPS4 (pBIN420) rev
M71	tccaaggatccatggcgctcctccagc	Klonierung TPS5 (pBIN420) fwd
M72	gttagagctcattcgggtattggctcc	Klonierung TPS5 (pBIN420) rev
M9	ggygcagtggcggctgtagrtcaggaag	5'RACE TPS4/5 rev

M10	actgcccccacagcctgggtggaagtc	5'RACE TPS4/5 rev
M6	ttaacttggttcgcagcggttctac	Sequenzierung TPS4/5 fwd
M8	tccttcatgtaacaatggacagtgga	Sequenzierung TPS4/5 rev
M60	gccagagaagactaccgtgtgc	Sequenzierung TPS4/5 fwd
M26	cttgtctatctcgttctcgtag	Sonde für DNA-/RNA-Blot TPS4/5 rev
M40	ccagcatatgcagaacatgtagagcattggctgcgatgg	TPS5 G409A rev
M41	ccagcatatgcagaacatgtagagcattggttccgatgg	TPS5 A410T rev
M42	ccagcatatgcagaacatgtagagcattggttgcgatgg	TPS5 G409A+A410T rev
M43	ccagcatatgcagaacatgtagagcaatggctccgatgg	TPS5 N411I rev
M44	ccagcatatgcagaacatgtagagcaatggctgcgatgg	TPS5 G409A+N411I rev
M45	ccagcatatgcagaacatgtagagcaatggttgcgatgg	TPS5 G409A+A410T+N411I rev
M48	gcatatgcagaacatgtagagcaatggttgcgatggctc	TPS5 G409A+A410T+N411I+S407T rev
M49	gcatatgcagaacatgtagagcaatggctccgatggctc	TPS5 S407T+N411I rev
M50	gcatatgcagaacatgtagagcaatggttccgatggctc	TPS5 S407T+A410T+N411I rev
M51	gcatatgcagaacatgtagagcattggctccgatggctc	TPS5 S407T rev
M55	gcatatgcagaacatgtagagcaatggtacgatggctc	TPS4 G409V rev
M56	gcatatgcagaacatgtagagcaatggttaggatggctc	TPS4 G409L rev
M57	gcatatgcagaacatgtagagcaatgtaaagatggctctcgc	TPS4 G409F rev
M85	gagctgccaagcctcttcgacctccac	TPS5-B73 V20A fwd
M86	gtggaaggtcgaagaagccttggcagctc	TPS5-B73 V20A rev
M77	gttagctatacagcaaggaaataaatg	TPS5-B73 T383S fwd
M78	cattttattccttgcgtatagctcaac	TPS5-B73 T383S rev
M79	aaatggcgtgatcagattatgtgg	TPS5-B73 E391Q fwd
M80	ccacataatcctgatcagccattt	TPS5-B73 E391Q rev
M67	cgacaatgagtgaacacctccaggttcagcag	TPS5-B73 K402Q fwd
M73	ctgctgaaacctggagggttctactcattgtcg	TPS5-B73 K402Q rev
M81	ggagcatggaacaacaatggatgatg	TPS5-B73 I479T fwd
M82	catcatcattgttgcctcctc	TPS5-B73 I479T rev
M83	gcagcatatctgaggaagcatggag	TPS5-B73 W163R fwd
M84	ctccatgcttctcagatatgctgc	TPS5-B73 W163R rev
M74	ctctccaacgatgctgatcgaaccaagcgtg	TPS5-B73 E455V fwd
M75	cacgcttgctgatacagacatcgttgagag	TPS5-B73 E455V rev
M91	cgcagcatatctgaagaagcatggagagg	TPS5-B73 W163K fwd
M92	cctctccatgcttctcagatatgctgcg	TPS5-B73 W163K rev
M93	cgcagcatatctgctgaagcatggagagg	TPS5-B73 W163L fwd
M94	cctctccatgcttcagagatatgctgcg	TPS5-B73 W163L rev
M100	ggatcgtgacgtattgacctctcgggaagc	TPS4 A533V fwd
M101	gcttccgaagaggtcaatcagtcacgatcc	TPS4 A533V rev
M102	ggatcgtgacctattgacctctcgggaagc	TPS4 A533L fwd
M103	gcttccgaagaggtcaataggtcacgatcc	TPS4 A533L rev
M112	cagggatcgtgactggtgacctctcgggaagc	TPS4 A533W fwd
M113	gcttccgaagaggtcaaccagtcacgatccctg	TPS4 A533W rev
M108	cgacaatgagtgaagaagctccaggttcagcag	TPS4 H400K fwd
M109	ctgctgaaacctggagcttttactcattgtcg	TPS4 H400K rev
M110	cgacaatgagtgaacgcctccaggttcagcag	TPS4 H400R fwd
M111	ctgctgaaacctggaggcgttactcattgtcg	TPS4 H400R rev
M104	ctgacaaagatcagcggacttattacaataat	TPS4 T301I fwd
M105	gattattgtaataagtccgatgatctttgtcag	TPS4 T301I rev
M98	ttatactgacaagatcttggacttattacaataatcga	TPS4 T301F fwd
M99	tcgattattgtaataagtccaagatctttgtcagtataa	TPS4 T301F rev
M114	actgacaagatctgggacttattacaataatcagtg	TPS4 T301W fwd
M115	catcgattattgtaataagtcacgatctttgtcagt	TPS4 T301W rev
M140	cgtttagttgagctattctccaaggaaataaa	TPS4 Y382F fwd
M141	tttattccttggagaatagctcaactaaacg	TPS4 Y382F rev
M144	cgtttagttgagctactctccaaggaaataaa	TPS4 Y382L fwd
M145	tttattccttggagagtagctcaactaaacg	TPS4 Y382L rev
M130	ccacggataaatgttcagggatcgtgacgca	TPS4 Y528F fwd
M131	tgcgtcacgatccctgaacatattatccgtgg	TPS4 Y528F rev
M132	ccacggataaatgttcagggatcgtgacgca	TPS4 Y528L fwd
M133	tgcgtcacgatccctgagcatattatccgtgg	TPS4 Y528L rev
Y7	atggtacgtctcagcgcattggcgcctcctcctccagc	Klonierung TPS9 (pASK-IBA7) fwd

Y8	atggtacgtctcatatcattcaggtattggctccacgaaca	Klonierung TPS9 (pASK-IBA7) rev
Y5	cttatgctgatgacacggca	Sequenzierung TPS9 fwd
Y6	taccactgaagactgcacca	Sequenzierung TPS9 fwd
H12	ctaataacatggctgccccaaactaactrea	Klonierung TPS6 (pET11d, pQE60) fwd
H13	cgcgatccttcacatgagtaacmaggcttcacataaag	Klonierung TPS6 (pET11d) rev
VI3HIS	ccaggaagatctcatgagtagcggcttcacataaag	Klonierung TPS6 (pQE60) rev
H2	ggcagccatccttttagcagatgtgtgggatcgg	5'RACE TPS6 rev
H5	caccagtgtacctccaatgcttatgagt	5'RACE TPS6 rev
H7	tggatgagtgggggatgctatgat	Sequenzierung TPS6 fwd
H3	ggaccttattatcacctgcagcgact	Sequenzierung TPS6 fwd
O5	tatgccagcacctgtgtttcacccca	Klonierung TPS7 (pSBET) fwd A
O6	tgccagcacctgtgtttcacccca	Klonierung TPS7 (pSBET) fwd B
AE7	gatccggatacccttatgaaaaataatacatatggttagacga	Klonierung TPS7 (pSBET) rev A
AE8	cggatacccttatgaaaaataatacatatggttagacga	Klonierung TPS7 (pSBET) rev B
VII5a	catgccagcacctgtgtttaacccca	Klonierung TPS7 (pQE60) fwd A
VII5b	ccagcacctgtgtttaacccca	Klonierung TPS7 (pQE60) fwd B
VII3a	gatcttagcggaatatgtcttacgaattggg	Klonierung TPS7 (pQE60) rev A
VII3b	ttagcggaatatgtcttacgaattggg	Klonierung TPS7 (pQE60) rev B
O29	atggtacgtctcagcgcacatggctactacgggcacaacatc	Klonierung TPS7 (pASK-IBA7) fwd
O30	atggtacgtctcatatcatagcggaaatgtcttacgaatgg	Klonierung TPS7 (pASK-IBA7) rev
AE19	gcttggagaggtgtgcccgtttcatggatgacat	TPS7 S442C fwd
AE20	atgtcatccatgaaacggcacacctccacaagc	TPS7 S442C rev
AE21	gcatgacactgctgtacctcgataagaggat	TPS7 F521Y fwd
AE22	atccctttatcgaggtagcagcagtgcatgc	TPS7 F521Y rev
AE23	cctcgataagaggaacgcgtacacatacagc	TPS7 D526N fwd
AE24	gctgtatgttacgcgttctcttatcgagg	TPS7 D526N rev
AE25	gtcacgtttcatgaacacatgtcagcgttc	TPS7 D442N fwd
AE26	gaacgcgtgacatgtcgttcataaaacgtgac	TPS7 D442N rev
O16	ggtcattggttataaccatcgataaagctcccgtct	5'RACE TPS7 rev
AE4	gatacttttcatgtgactccaactcatcc	Sequenzierung TPS7 rev
AE7	gatccggatacccttatgaaaaataatacatatggttagacga	Sequenzierung TPS7 fwd

### 2.5.4 Amplifikation von DNA-Fragmenten durch PCR

Die Vervielfältigung von spezifischen DNA-Fragmenten aus gDNA, cDNA oder Plasmid-DNA erfolgte durch Polymerasekettenreaktion (PCR). Für analytische PCR wurde Taq-DNA-Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, USA) verwendet. Die Amplifizierung von DNA-Fragmenten aus cDNA erfolgte mit Hilfe von „Advantage<sup>®</sup> 2 Polymerase Mix“ (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, USA) oder mit „PfuTurbo<sup>®</sup> DNA Polymerase“ (Stratagene, La Jolla, USA). In der Regel wurde die PCR nach folgendem Schema durchgeführt: 2 µl Oligonukleotid-1 (10 pmol/µl), 2 µl Oligonukleotid-2 (10 pmol/µl), 1 µl dNTP-Mix (10 mM), 5 µl 10x Polymerasepuffer, 1 µl Polymerase (je nach Herstellerempfehlung 0,1 – 2,5 U), 2 µl Template-DNA und 37 µl steriles *a.dest.* Für die Reaktion wurde ein Thermocycler Primus 96 Plus (MWG-Biotech, Ebersbach) wie folgt programmiert:

	94°C	2 min	(Denaturierung der DNA-Matrize)
30-38x	┌ 94°C	30 sec	(Denaturierung der DNA-Matrize)
	└ 72°C	1-2,5 min	(Synthese des Komplementärstranges (Extension))
	72°C	5 min	(Vervollständigung der DNA-Synthese)

Die Anlagerungstemperatur wurde den jeweiligen Schmelztemperaturen der Oligonukleotide angepasst (Anlagerungstemperatur = Schmelztemperatur – (3 bis 5)°C). Als Maß für die Synthesegeschwindigkeit der Polymerasen wurden 2000 Nukleotide/min angenommen.

### **2.5.5 Restriktion von DNA**

Zur Anwendung kamen Restriktionsenzyme und zehnfach konzentrierte Puffer der Firmen NEB (Schwalbach) und Invitrogen (Carlsbad, USA). In der Regel wurde das Reaktionsgemisch bestehend aus Enzym (1-10 U), Puffer und DNA (1-10 mg in TE oder Wasser) für 1-2 Stunden bei der für das jeweils verwendete Enzym optimalen Reaktionstemperatur (meist 37°C) inkubiert.

### **2.5.6 Ligation von DNA**

Zur Ligation von DNA-Fragmenten mit kompatiblen überhängenden oder stumpfen Enden wurde T4-DNA-Ligase (Invitrogen, Carlsbad, USA) und der mitgelieferte, ATP-enhaltende 10x Ligase-Puffer verwendet. Vektor- und Insert-DNA wurden im Mengenverhältnis von etwa 1:5 mit 1 U Ligase bei 18°C für 3-4 Stunden inkubiert.

Bei Verwendung der TOPO-Vektoren von Invitrogen wird keine Ligase benötigt. Hier übernimmt die kovalent an die Vektorenden gebundene Topoisomerase I die Funktion der Ligase. Die Ligation wurde in diesem Fall gemäß den Herstellerangaben durchgeführt.

### **2.5.7 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Die entsprechenden DNA-Banden wurden unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten und mittels des „Gel-Extraction-Kit“ (Macherey & Nagel, Düren) gereinigt. Dabei wird die DNA nach Auflösung der Agarose unter Hochsalzbedingungen an die Säulenmatrix gebunden, mit einem ethanolhaltigen Puffer gewaschen und in 30-50 µl 5 mM Tris-HCl (pH 8.5) eluiert.

### **2.5.8 Klonierung von DNA-Fragmenten**

Die mit PCR amplifizierte DNA-Fragmente wurden zur Erzeugung von spezifischen überhängenden Enden mit den entsprechenden Restriktasen wie unter 2.5.5 beschrieben verdaut (Restriktaseerkennungssequenz in den jeweiligen Oligonukleotiden) und in linearisierte Vektoren (siehe Tabelle 2.5) mit kompatiblen Enden durch Ligation eingebaut (s. 2.5.6). In Fällen, in denen kompatible Enden der DNA-Fragmente nicht durch Restriktion erzeugt werden konnten, weil sich im Fragment mehrere Restriktaseerkennungssequenzen befinden, wurde die „sticky end“-Klonierung nach ZENG (1998) angewendet.

Tab. 2.5 Beschreibung der in dieser Arbeit verwendeten Vektoren

Bezeichnung/Herkunft	Eigenschaften	Verwendungszweck
<b>pSBET</b> [SCHENK <i>et al.</i> 1995]	bakterieller Expressionsvektor, pACYC177-Derivat, 4401 bp, Km <sup>r</sup> , T7-Promotor, <i>argU</i> (kodiert seltene tRNA <sub>arg4</sub> )	Expression von Pflanzengenomen mit mehreren Kopien des seltenen AGA-Codons (Arg)
<b>pET11d</b> (NEB, Schwalbach)	bakterieller Expressionsvektor, pBR322-Derivat, 5675 bp, Ap <sup>r</sup> , T7-Promotor	Überexpression von Proteinen in <i>E. coli</i>
<b>pQE60</b> (Qiagen, Hilden)	bakterieller Expressionsvektor mit C-terminalen His(6)-tag, pDS56/RBSII-Derivat, 3431 bp, Ap <sup>r</sup> , T5-Promotor	Überexpression His-markierter Proteine in <i>E. coli</i>
<b>pHIS8-3</b> (Joseph P. Noel, The Salk Institute, La Jolla, USA)	bakterieller Expressionsvektor mit N-terminalen His(8)-tag, Km <sup>r</sup> , T7-Promotor	Überexpression His-markierter Proteine in <i>E. coli</i>
<b>pASK-IBA7</b> (IBA GmbH, Göttingen)	bakterieller Expressionsvektor mit N-terminalen Strep-tag, 3246 bp, Ap <sup>r</sup> , <i>tet</i> -Promotor	Überexpression Strep-markierter Proteine in <i>E. coli</i>
<b>pCR<sup>®</sup> 4-TOPO<sup>®</sup></b> (Invitrogen, Carlsbad, USA)	bakterieller Klonierungsvektor 3957 bp, Km <sup>r</sup> , Ap <sup>r</sup>	Klonierung von PCR-Fragmenten mit 3'-A-Überhang
<b>pCR<sup>®</sup>-Blunt II-TOPO<sup>®</sup></b> (Invitrogen, Carlsbad, USA)	bakterieller Klonierungsvektor 3519 bp, Km <sup>r</sup> , Ap <sup>r</sup>	Klonierung von PCR-Fragmenten mit glatten Enden
<b>pBIN420</b> [BROWSE <i>et al.</i> 2001]	binärer Vektor, pBIN19-Derivat ~ 12 kb, Sp <sup>r</sup> , CaMV 35S-Promotor Nopalinsynthase-Terminatorkassette	<i>Arabidopsis</i> -Transformation

### 2.5.9 Site Directed Mutagenesis

Mutanten zur Analyse der Stereospezifität von TPS4 und TPS5 wurden wie folgt hergestellt: Aus einem, den ORF von *tps5* tragenden Vektor (pASK-IBA7-*tps5*) wurden mittels PCR die ersten 1200 bp amplifiziert. Das dafür eingesetzte 3'-Oligonukleotid (s. Tab. 2.4) trägt die entsprechende Mutation und eine sich auch auf dem Gen befindende *Afl*III-Restriktaseerkennungsequenz. Da sich im 5'-Teil des Gens eine zweite, zur ersten *Afl*III-Erkennungsequenz nicht kompatible *Afl*III-Erkennungsequenz befindet, wurde durch Restriktion des PCR-Produktes mit *Afl*III ein Fragment erhalten, welches gerichtet in den ebenfalls mit *Afl*III linearisierten Ausgangsvektor pASK-IBA7-*tps5* eingebaut werden konnte. Der so erzeugte Vektor, pASK-IBA7-*tps5*MU, trägt die entsprechende Mutation im Gen *tps5*.

Zur Analyse der Reaktionsmechanismen und aktiven Zentren von TPS4, TPS5 und TPS7 wurden entsprechende Mutanten mit dem „QuikChange<sup>®</sup> Site-Directed Mutagenesis Kit“ (Stratagene, La Jolla, USA) gemäß den Angaben des Herstellerprotokolls durch PCR erzeugt. Alle für die Mutationen verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 2.4 aufgeführt.

### 2.5.10 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung erfolgte nach der von SANGER und Mitarbeiter (1977) beschriebenen Kettenabbruchmethode. Dazu wurden Sequenzierungsreaktionen wie folgt angesetzt: x µl Template-DNA (400 ng), 2 µl Oligonukleotid (10 pmol/µl), 4 µl „BigDye<sup>TM</sup>-Mix“

(BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kit v2) und (14-x)µl *a.dest.*. Der „BigDye™-Mix“, eine Mischung aus Puffer, dNTPs, Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Didesoxynukleotiden und DNA-Polymerase, wurde von der Firma Applied Biosystems (Foster City, USA) bezogen. Die eigentliche Sequenzierungsreaktion, eine lineare PCR mit einem Oligonukleotid, wurde unter folgenden Bedingungen im Thermocycler Primus 96 Plus (MWG-Biotech, Ebersbach) durchgeführt:

	96°C	5 min
35x	┌ 96°C	10 sec
	53°C	20 sec
	└ 60°C	4 min

Zum Entfernen der nichteingebauten fluoreszenten Nukleotide wurde die Reaktion über „DyeEX™ 2.0 Spin Columns“ (Qiagen, Hilden) nach dem Prinzip der Gelfiltration gereinigt und anschließend in einem Sequenzierer ABI3100 (Applied Biosystems) gelelektrophoretisch aufgetrennt und analysiert.

### 2.5.11 DNA/Protein-Sequenzanalyse

Die DNA-Rohsequenzdaten wurden mit dem Programm „Seqman“ (DNASTAR Inc., Madison, USA) analysiert, gegebenenfalls editiert und mit Hilfe des Programms „Editseq“ (DNASTAR Inc.) als DNA-Sequenzdatenfile gespeichert.

Datenbankrecherchen und Sequenzvergleiche erfolgten mit Hilfe des Internets unter folgenden www-Adressen: „<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>“ (NCBI - National Centre for Biotechnology Information), „<http://www.zmdb.iastate.edu/>“ (ZmDB – A Maize Genome Database), „<http://www.agron.missouri.edu/>“ (MaizeDB), „<http://www.tigr.org/>“ (TIGR - The Institute for Genomic Research). Sequenzalignments wurden mit den Programmen „Multalin“ (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html> [CORPET, 1988]) sowie „Clustal X“ (<http://www-igbmc.u-strasbg.fr/BioInfo/ClustalX>) erstellt und mit „TreeView“ (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html> [PAGE, 1996]) visualisiert.

Zur Analyse der Aminosäuresequenzen wurden die DNA-Sequenzen mit dem Programm „Editseq“ in Proteinsequenzen umgeschrieben. Die Kalkulation der molaren Massen und pK<sub>i</sub>-Werte erfolgte mit dem Programm „Protean“ (DNASTAR Inc.). Signalpeptidvorhersagen wurden im Internet unter „<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>“ [NIELSEN *et al.*, 1997], „<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>“ [EMANUELSSON *et al.*, 2000] und „<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>“ [EMANUELSSON *et al.* 1999] durchgeführt.

## 2.6 Elektrophorese und Transfertechniken

### 2.6.1 DNA-Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Gemischen nach Fragmentgröße erfolgte durch Elektrophorese in 1%igen Agarosegelen (1% Agarose [g/v] (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA), 1 µg/ml Ethidiumbromid, 0,5x TAE-Puffer: 40 mM Tris-HCl pH 8,2, 20 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA). Dazu wurden die DNA-Proben in einem Volumen

Auftragepuffer (50% Glycerin [v/v], 0,05% Bromphenolblau [g/v], 100 mM EDTA) aufgenommen und bei einer Spannung von 100 V in einer mit 0,5x TAE-Puffer gefüllten Elektrophoreseapparatur („i-Mupid“, Eurogentech, Seraing, Belgien) aufgetrennt. Die Nukleinsäurebanden sind aufgrund der Einlagerung des Ethidiumbromids zwischen die Basen der DNA im UV-Licht sichtbar. Für Southern-Blot-Analysen wurden 10 µg DNA pro Geltasche aufgetragen.

### 2.6.2 RNA-Agarosegelelektrophorese

10-20 µg RNA wurden in RNA-Auftragepuffer (20 mM MOPS pH 7.0; 8 mM Natriumacetat; 1 mM EDTA; 5,7 Volumen Formaldehyd (37%ig); 50% Formamid [v/v]; 1 µg/ml Ethidiumbromid) für 15 Minuten bei 65°C inkubiert und in einem 1%igen RNA-Agarosegel (1% Agarose [g/v]; 20 mM MOPS pH 7.0; 8 mM Natriumacetat; 1 mM EDTA; 5,7 Volumen Formaldehyd (37%ig)) mit einer konstanten Spannung von 100 V elektrophoretisch aufgetrennt (Laufpuffer: 20 mM MOPS pH 7.0; 8 mM Natriumacetat; 1 mM EDTA).

### 2.6.3 DNA-Transferblot (Southern Blot)

Nach der DNA-Agarosegelelektrophorese (s. 2.6.1) wurde die DNA durch 10 min Inkubation des Gels in 0,2 M Salzsäure depurinieren und anschließend durch 45 min Schwenken des Gels in 1,5 M Natriumchlorid, 0,5 M Natriumhydroxid denaturiert. Zum Neutralisieren wurde das Gel zwei mal für je 20 Minuten in 1 M Tris-HCl pH 7.0, 1,5 M Natriumchlorid inkubiert. Der DNA-Transfer auf eine Polyamidmembran NYTRAN-PLUS (Schleicher & Schuell, Einbeck) erfolgte durch Kapillarblot in 20x SSC-Puffer (3 M Natriumchlorid, 0,3 M Trinatriumcitratdihydrat, pH 7.0) über Nacht. Zum Fixieren der DNA an die Polyamidmembran wurde diese im UV-Stratalinker<sup>®</sup> 2400 (Stratagene, La Jolla, USA) zwei mal mit je 120 mJ/cm<sup>2</sup> („Autocrosslink“-Modus) bestrahlt.

### 2.6.4 RNA-Transferblot (Northern Blot)

Das RNA-Gel (s. 2.6.2) wurde nach der Elektrophorese drei mal in je 5 ml Wasser gespült, für 10 Minuten in 0,05 M Natriumhydroxidlösung geschwenkt und 20 Minuten in 20x SSC-Puffer (s. 2.6.3) inkubiert. Der Transfer der RNA auf die Membran und die anschließende Fixierung erfolgten analog dem DNA-Transferblot (s. 2.6.3).

### 2.6.5 Nukleinsäurehybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden

Der Nachweis von auf Nylonmembranen transferierten Nukleinsäuren erfolgte durch Hybridisierung mit radioaktiv markierten ssDNA-Sonden. Diese wurden mit Hilfe des „Strip-EZ<sup>™</sup> PCR“-Kit (Ambion, Austin, USA) durch lineare PCR hergestellt. Als Synthesematrize wurden 10 ng DNA-Fragment (ca. 500 bp Länge) eingesetzt. Die Markierung erfolgte mit [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dATP (20 µCi). Ungebundene Nukleotide wurden durch Gelfiltration mit „ProbeQuant<sup>™</sup> G-50 Micro Columns“ (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) entfernt.

Parallel zur Sondensynthese wurde die Membran in 10 ml Hybridisierungspuffer „ULTRAhyb<sup>TM</sup>“ (Ambion) für drei Stunden bei 42°C prähybridisiert. Nach Zugabe der gereinigten Sonde ( $1-6 \times 10^6$  CPM/ml Hybridisierungspuffer) wurde über Nacht bei 42°C im Hybridisierungsöfen hybridisiert und anschließend zwei mal bei 42°C mit 2x SSC (s. 2.6.3), 0,1% SDS [g/v] für je fünf Minuten gewaschen. Durch weitere 15 min Waschschrte in absteigenden SSC- und SDS-Konzentrationen (2x SSC, 0,1% SDS [g/v]; 0,5x SSC, 0,1% SDS [g/v]; 0,2x SSC, 0,1% SDS [g/v]; 0,1x SSC, 0,1% SDS [g/v]) und durch Erhöhung der Waschtemperatur auf bis zu 68°C wurde die Aktivität auf der Membran auf 20 bis 100 CPS reduziert. Die Messung der gebundenen Aktivität erfolgte hierbei mit einem Geigerzähler („Mini-Monitor Series 900“, Morgan).

Zur Visualisierung der gebundenen Aktivität wurde die Membran gegen einen Röntgenfilm „BioMax MS-1“ (Eastman Kodak Company, Rochester, USA) exponiert oder im Phosphorimager „Storm 840“ (Molecular Dynamics, Sunnyvale, USA) analysiert.

### 2.6.6 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Proteinproben wurden in 2x Probenpuffer (100 mM Tris-HCl pH 6.0, 4% SDS [g/v], 10% 2-Mercaptoethanol [v/v], 20% Glycerol [v/v], 0,1% Bromphenolblau [g/v]) aufgenommen und zum Denaturieren für zehn Minuten bei 95°C inkubiert. Die Elektrophorese erfolgte wie bei LAEMMLI und Mitarbeiter (1970) beschrieben. Zuerst wurden die Proteinproben bei konstanter Spannung von 100 V im 4%igen Sammelgel (0,125 M Tris-HCl pH 6.8, 4% Acrylamid/Bisacrylamid (29:1) Roth (Karlsruhe), 0,1% SDS [g/v], 0,075% APS [g/v], 0,05% TEMED [v/v]) konzentriert und anschließend bei einer konstanten Spannung von 200 V im 10%igen Trenngel (0,375 M Tris-HCl pH 8.8, 10% Acrylamid/Bisacrylamid (29:1), 0,1% SDS [g/v], 0,075% APS [g/v], 0,05% TEMED [v/v]) elektrophoretisch aufgetrennt.

Die aufgetrennten Proteine wurden mit Coomassie-Farbstoff angefärbt. Die Färbung erfolgte hierbei durch zweistündige Inkubation der Gele in Färbelösung (45% Methanol [v/v], 7% Essigsäure [v/v], 0,1% Coomassie Brilliant Blue R250<sup>®</sup> [g/v] (Sigma-Aldrich, St. Louise, USA) und anschließende 3-4 stündige Inkubation in Entfärbelösung (5% Methanol [v/v], 7% Essigsäure [v/v]).

## 2.7 Proteintechniken

### 2.7.1 Herstellung und Reinigung rekombinanter Terpensynthasen

Die Expression von Terpensynthasen erfolgte in *E. coli*, wobei die Auswahl des bakteriellen Wirtstammes sich nach den jeweils verwendeten Vektoren richtete. Die Gene *tps4-Dell*, *tps5-Dell* und *tps5-Del2* wurden in den Vektor pASK-IBA7 kloniert. Dieser Plasmid enthält einen Promotor, welcher von der *E. coli*-RNA-Polymerase erkannt und abgelesen wird. Da somit zur Expression kein spezieller *E. coli*-Stamm nötig ist, wurde der Stamm TOP10 benutzt. Die Klonierung von *tps4-B73*, *tps5-B73*, *tps6-B73* und *tps7-B73* erfolgte in die Vektoren pSBET oder pET11d. In diesen Plasmiden befindet sich das zu exprimierende Gen unter Kontrolle eines T7-Promotors. Als Wirtstamm wurde daher *E.*

*coli* BL21(DE3) verwendet, welcher eine Kopie des T7-RNA-Polymerasegens im Chromosom enthält.

Zur Expression der Proteine wurde eine 5 ml-Übernachtskultur des jeweiligen Klons in 100 ml LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika überimpft, und bei 30°C unter Schütteln bis zu einer OD<sub>600</sub> von etwa 0,5 kultiviert. Die Induktion der vektorvermittelten Expression erfolgte im Falle der pSBET- und pET11d-Konstrukte durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration: 1 mM). Der Tetracyclin-Promotor des Plasmides pASK-IBA7 wurde durch Anhydrotetracyclin (Endkonzentration: 200 µg/l) induziert. Nach der Induktion wurden die Kulturen für 16 h bei 18°C unter Schütteln inkubiert.

Zur partiellen Reinigung von rekombinanten Terpensynthasen wurden die Zellen einer 100 ml-Expressionskultur durch Zentrifugation (5 min, 5000xg, 4°C) sedimentiert, mit 5 ml eiskaltem Extraktionspuffer (50 mM MOPSO, 10% Glycerol, 5 mM Magnesiumchlorid, 5 mM DTT, 5 mM Natriumascorbat, 0,5 mM PMSF, pH 7.0) gewaschen, erneut zentrifugiert und in 3 ml eiskaltem Extraktionspuffer resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch Ultraschallbehandlung (4 x 20 sec, Bandelin UW2070, Bandelin, Berlin). Nach dem Abzentrifugieren der unlöslichen Zellbestandteile (30 min, 21000xg, 4°C) wurde der Überstand mittels einer Econopac 10DG-Säule (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) in Reaktionspuffer (10 mM MOPSO, 10% Glycerol, 1 mM DTT, pH 7.0) umgepuffert. Die Extrakte konnten bei -80°C mehrere Jahre ohne nennenswerten Aktivitätsverlust gelagert werden.

Die Reinigung von His-tag- und Strep-tag-Fusionsproteinen aus dem bakteriellen Rohextrakt erfolgte für Proteine mit His-tag durch Ni-NTA-Säulen (Qiagen, Hilden) und für Proteine mit Strep-tag durch Strep-Taktin-Säulen (IBA GmbH, Göttingen) gemäß dem Herstellerprotokoll. Zur Stabilisierung der gereinigten Proteine wurden diese mit 10% (v/v) Glycerol versetzt.

### 2.7.2 Herstellung hochreiner Proteine für die Enzymcharakterisierung

Die entsprechenden Gene wurden in den Vektor pHIS8-3 mit N-terminalen His-tag kloniert und in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert. Dazu wurden 8 Liter TB-Medium mit 50 ml Übernachtskultur angeimpft und wie unter 2.7.1 beschrieben kultiviert und induziert. Die durch Zentrifugation (5 min, 5000xg, 4°C) sedimentierten Zellen (ca. 50-60 g) wurden in 15 ml-Plasteröhrchen überführt, kurz in flüssigen Stickstoff eingefroren, wieder aufgetaut und in 200 ml Lysepuffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 20 mM Imidazol pH 8.0, 1% Tween20 (v/v), 10% Glycerol (v/v), 10 mM β-Mercaptoethanol) mit 200 mg Lysozym für zwei Stunden bei 4°C unter Rühren inkubiert. Die Zellyse erfolgte durch Ultraschallaufschluss (6x 30 sec., 0,5 sec Puls, Bandelin UW2070, Bandelin, Berlin). Danach wurden die unlöslichen Zelltrümmer durch Zentrifugation (20000xg, 4°C, 1 h) entfernt und der Überstand auf eine mit 6 ml Ni-NTA-Agarose (50%, Qiagen, Hilden) gefüllte und mit 50 ml eiskaltem Lysepuffer equilibrierte Säule aufgeladen. Zum Waschen wurde die Säule mit 50 ml eiskaltem Lysepuffer und 50 ml eiskaltem Waschpuffer (Lysepuffer ohne Tween20) gespült. Die Elution des an die Ni-NTA-Matrix gebundenen His-tag-Proteins erfolgte durch Zugabe von 30 ml eiskaltem Elutionspuffer (Waschpuffer

mit 250 mM Imidazol). Zum Entfernen des Imidazol und zur Abspaltung des His-Tag wurde die gesamte Elutionsfraktion mit 25 µg Thrombin über Nacht in fünf Liter Dialysepuffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 10 mM β-Mercaptoethanol) bei 4°C unter schwachem Rühren dialysiert und anschließend auf eine mit 2 ml Benzamidin-Sepharose 6B (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) und 2 ml Ni-NTA-Agarose gefüllte und mit 30 ml Dialysepuffer gespülte Säule aufgeladen. Der Durchlauf wurde aufgefangen und mittels Gelfiltration (FPLC, Superdex S200-Säule, Pharmacia Biotec, Freiburg) nach dem Molekulargewicht fraktioniert. Zum Aufkonzentrieren und Umpuffern des Proteins wurden die Proben mit Centriprep YM30-Säulchen (Amicon, Witten) von ca. 25 ml auf 1 ml eingengt und schließlich durch mehrmaliges Spülen mit 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM NaCl, 10 mM β-Mercaptoethanol über Centricon 30-Säulchen (Amicon) entsalzt (Endvolumen: 0,5 ml). Die Kontrolle der einzelnen Reinigungsschritte erfolgte durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (2.6.6).

### 2.7.3 Proteinquantifizierung nach Bradford

Die Quantifizierung von Proteinen nach BRADFORD (1976) erfolgte mit dem Proteinnachweis-Reagenz der Firma Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA). Ein Aliquot der Proteinprobe wurde in 800 µl Wasser verdünnt, mit 200 µl Reagenz versetzt, für 20 Minuten inkubiert und photometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm vermessen. Die Berechnung der Proteinmenge erfolgte anhand einer BSA-Eichgerade.

### 2.7.4 Bestimmung des Molekulargewichtes von Terpensynthasen

Die zu analysierende Terpensynthase wurde wie unter 2.7.1 beschrieben in *E. coli* exprimiert und aus dem Rohextrakt partiell gereinigt. Die Fraktionierung der Proteine im bakteriellen Extrakt (0,5 ml) erfolgte durch Gelfiltration (FPLC mit Reaktionspuffer (10 mM MOPSO, 10% Glycerol, 1 mM DTT, pH 7.0), Superdex S200-Säule (Pharmacia Biotec, Freiburg)). Die aufgefangenen Fraktionen wurden durch Enzym-Substrat-Reaktionen (s. 2.7.5) auf ihre Aktivität hin überprüft. Die Größenbestimmung erfolgte schließlich durch Vergleich der aktiven Fraktionen mit verschiedenen Standards (β-Amylase (200 kDa), Hefe-Alkoholdehydrogenase (150 kDa), Rinderserumalbumin (66 kDa), Carboanhydrase (29 kDa), Cytochrom C (12,4 kDa), „Molecular Weight Marker Kit“, Sigma-Aldrich, St. Louise, USA).

### 2.7.5 Aktivitätsbestimmung von rekombinanten Terpensynthasen

Zur Aktivitätsbestimmung von in *E. coli* heterolog exprimierten Terpensynthasen wurden in der Regel 200 µl partiell gereinigter bakterieller Rohextrakt mit 800 µl Reaktions-Mix (10 mM MOPSO, 10% Glycerol, 1 mM DTT, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM MnCl<sub>2</sub>, 0,2 mM NaWO<sub>4</sub>, 0,1 mM NaF, 60 µM GPP, FPP oder GGPP (Echelon Research Laboratories, Salt Lake City, USA)) für eine Stunde bei 30°C inkubiert. Die Reaktion erfolgte in 8-ml Glasröhrchen (DuPont, Wilmington, USA) mit Polypropylendeckel. Zur Isolierung der Reaktionsprodukte aus der Gasphase wurde eine SPME-Faser (PDMS-100,

Polydimethylsiloxan, Supelco, Bellafonte, USA) in einer Halterung im Reaktionsröhrchen platziert. Alternativ dazu wurde die Reaktion mit 2 ml Pentan überschichtet und nach der Inkubation ausgeschüttelt. Zum Aufkonzentrieren der Produkte wurde die Pentanphase abgenommen und unter einem leichten Stickstoffstrom auf 50  $\mu$ l eingengt. Die gaschromatographische Analyse der mittels SPME oder Pentanextraktion isolierten Terpenprodukte erfolgte wie unter 2.8.2.1 beschrieben.

Zur Bestimmung der Gesamtzymaktivität wurden die Proteine mit Tritium-markierten Substraten ([1-<sup>3</sup>H]-GPP, [1-<sup>3</sup>H]-(*E,E*)-FPP (37 GBq/mol), American Radiolabeled Chemicals, St. Louis, USA) inkubiert. Das Reaktionsvolumen betrug hierbei 1/10 des zuvor beschriebenen Volumens. Nach der Extraktion der Reaktionsprodukte aus der wässrigen Phase durch Ausschütteln mit 1 ml Pentan wurden 500  $\mu$ l Pentan mit 5 ml Szintillationsflüssigkeit Lipoluma (Packard Bioscience, Groningen, Niederlande) gemischt und im Szintillationszähler (Packard Tricarb 2300TR (<sup>3</sup>H-Effizienz: 63%) vermessen.

Zur Bestimmung der pH-Optima von Terpensynthasen wurden folgende Puffer in einer Endkonzentration von je 100 mM für die Reaktionsansätze eingesetzt: pH 5.0 und 5.5: Acetatpuffer, pH 6.0: MES-Puffer, pH 6.5 bis 9.5: bis-Tris-Propanpuffer.

### 2.7.6 Computergestützte Proteinstrukturanalysen

Dreidimensionale Strukturmodelle der untersuchten Terpensynthasen wurden mit dem Programm „Modeler“ (Accelry, San Diego, USA) auf Grundlage der bekannten 3D-Struktur der 5-*epi*-Aristolochensynthase aus Tabak [STARKS *et al.*, 1997] berechnet. Die Bindung verschiedener Substrate und Reaktionsintermediate im aktiven Zentrum von Terpensynthasen wurde mit dem Programm „GOLD“ (CCDC, Cambridge, England) analysiert. Die dreidimensionale Visualisierung der Modelle erfolgte mit den Programmen „Chimera“ (<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>, UCSF Computer Graphics Laboratory, San Francisco, USA) und „SPDBV 3.7“ (<http://www.expasy.org/spdbv/> [GUEx & PEITSCH, 1997]). Zum Erstellen der dreidimensionalen Modelle der Substrate und Intermediate wurden die Programme „ChemDraw Ultra“ und „Chem3D Ultra“ (CambridgeSoft, Cambridge, USA) verwendet.

## 2.8 Techniken zur Terpenisolierung, -analyse und -darstellung

### 2.8.1 Terpenisolierung aus Maisgewebe

#### 2.8.1.1 Extraktion

Ca. 3 g in flüssigem Stickstoff eingefrorenes Pflanzenmaterial wurde fein zermörsert, in 10 ml destilliertem Pentan aufgenommen und für eine Stunde bei Raumtemperatur unter Schwenken extrahiert. Nach Zentrifugation (1800g, 5 min) wurde die Pentanphase abgenommen und mit 40  $\mu$ l Nonylacetat (interner Standard, 20 ng/ $\mu$ l) versetzt. Anschließend wurde mit einer Spatelspitze Aktivkohle geklärt, erneut zentrifugiert und im Stickstoffstrom auf ein Volumen von 200  $\mu$ l eingengt. Das Ausfällen höhermolekularer

Wachse und Fette erfolgte durch Inkubation über Nacht bei -20°C. Die Analyse der extrahierten Terpene wurde mit GC-MS bzw. GC-FID (s. 2.8.2.1) durchgeführt.

### **2.8.1.2 Duftsammlung**

Die von Maispflanzen abgegebenen Terpene wurden mit einem automatischen Duftsammelsystem (Analytical Research Systems, Gainesville, USA) nach HEATH & MANUKIAN (1994) analysiert. Die Blätter und die Sprossachse der Pflanze befindet sich hierbei in einem Glaszylinder (Höhe: 50 cm, Ø: 20 cm), welcher mit zwei verschiebbaren Platten nach unten zum Topf verschlossen ist. Über Aktivkohlefilter gereinigte und angefeuchtete Luft (65% relative Luftfeuchte) strömt mit einer Flussrate von 5 l/min von oben in den Glaszylinder und wird am unteren Ende mit einer Flussrate von 1 l/min über Duftfallen (Glasröhrchen (Länge: 150 mm, Ø: 5 mm), gefüllt mit 75 mg SuperQ (Alltech, Deerfield, USA)) abgesaugt. Die überschüssige Luft entweicht durch die Öffnung um die Sprossachse. Der geringe Überdruck im Inneren des Glaszylinders verhindert das Einströmen eventuell kontaminierter Außenluft. Mit Hilfe eines programmierbaren Reglers kann sowohl die Dauer der Duftsammlung als auch das Umschalten zwischen den einzelnen Duftfallen kontrolliert werden.

Das gesamte Duftsammelsystem befindet sich in einer Klimakammer (VB1014/S, Voetsch, Balingen) mit folgenden Einstellungen: Lichtstärke: 750  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ , Luftfeuchte: 75%, Temperatur: 25°C.

Alle Experimente wurden zwischen 10 Uhr und 15 Uhr durchgeführt, um eventuelle, durch diurnale Rhythmen hervorgerufene Schwankungen in der Terpenemission zu vermeiden. Die Fallen wurden nach der Duftsammlung mit 200  $\mu\text{l}$  Dichlormethan eluiert und die Proben mit GC-FID oder GC-MS analysiert (s. 2.8.2.1).

### **2.8.1.3 „closed loop collection“-Methode**

Die Messung der Terpenemission transgener Arabidopsispflanzen erfolgte mit der „closed loop collection“-Methode [DONATH & BOLAND, 1995], einem geschlossenen System mit hoher Sensitivität. Hierbei befindet sich die Pflanze in einem Exsikkator. In einem kontinuierlichen Kreislauf wird Luft abgesaugt, über einen Aktivkohlefilter geleitet und wieder in den Exsikkator zurückgeführt. Die gesamte Versuchsanordnung wurde in einer Klimakammer unter den in Abschnitt 2.1.2.1 beschriebenen Bedingungen betrieben. Nach 3-5 stündiger Messung wurden die Aktivkohlefilter mit je 200  $\mu\text{l}$  Dichlormethan eluiert und das Eluat mit GC-MS analysiert.

## **2.8.2 Terpenanalyse**

### **2.8.2.1 Chromatographische Trennung mittels GC-MS / GC-FID**

Die gaschromatographische Trennung und Analyse von Terpengemischen wurde mit dem Gaschromatographen Modell 6890 der Firma Hewlett-Packard (PaloAlto, USA) und angekoppeltem Massenspektrometer (Hewlett-Packard 5973) durchgeführt. Als Trägergas wurde Helium verwendet (1 ml/ min). Die Injektortemperatur betrug 220°C, das

Injektionsvolumen 2 µl („splittless“). Alternativ erfolgte die Probenauftragung auch direkt über eine SPME-Faser (100 µm Polydimethylsiloxan, SUPELCO, Bellafonte, USA). Die Temperatur der Säule wurde von 40°C (3 min konstant) mit einer Rate von 5°C pro Minute auf 240°C erhöht. Das Massenspektrometer wurde mit folgenden Einstellungen betrieben: Transferline-Temperatur: 230°C, Quelle: 230°C, Quadrupol-Temperatur: 150°C, Ionisierungspotential: 70 eV, Scann-Bereich: 50-400 Atommasseneinheiten. Als Chromatographiesäulen wurden DB-WAX-Säulen (Polyethylenglycol, 30 m x 0,25 mm (Innendurchmesser) x 0,25 µm (Filmdicke), J&W Scientific, Folsom, USA), Chrompack CP-SIL-5-CB-MS-Säulen ([5%-Phenyl]-methylpolysiloxan, 25 m x 0,25 mm (Innendurchmesser) x 0,25 µm (Filmdicke), Varian Medical Systems, Palo Alto, USA) und DB5-MS-Säulen (30 m x 0,25 mm (Innendurchmesser) x 0,25 µm (Filmdicke), J&W Scientific) verwendet.

Die Quantifizierung von Terpenen erfolgte mittels GC und angekoppeltem Flammenionisationsdetektor (FID). Hierbei wurden die Proben gaschromatographisch mit den selben Einstellungen und Bedingungen wie oben beschrieben aufgetrennt (GC: HP 6890, Trägergas: Wasserstoff, 2 ml/min) und anschließend über einen FID (Detektortemperatur: 250°C) analysiert.

Für die Trennung und Identifizierung von Enantiomeren kam eine chirale Säule (Heptakis(6-*O*-tert-butylidimethylsilyl-2,3-di-*O*-methyl)-β-Cyclodextrin, BGB-Analytik, Adliswil, Schweiz) zum Einsatz. Die Temperaturprofile der GC wurden dabei von Fall zu Fall wie folgt variiert:

-Limonen und Sabinen: 35°C (1 min) bis 100°C (1°C/min)

-Linalool: 40°C (3 min) bis 150°C (5°C/min)

-β-Bisabolen: 40°C (1,5 min) bis 115°C (100°C/min), isotherm 115°C

### 2.8.2.2 Identifizierung von Terpenen

Zur Identifizierung von Terpenen wurden die Massenspektren der einzelnen, mittels GC voneinander getrennten Substanzen mit verschiedenen Massenspektrenbibliotheken verglichen. Dazu standen folgende Programme und Bibliotheken zur Verfügung: „MassFinder 2.1“ (D.H. Hochmuth, Universität Hamburg) verbunden mit der Massenspektrenbibliothek „Terpenoids and Related Constituents of Essential Oils“ (W.A. König, D.H. Hochmuth und D. Joulain, Universität Hamburg) sowie das Datenauswerteprogramm „Data Analysis“ der GC-MS Firmensoftware (HP ChemStation Software, Hewlett&Packart, PaloAlto, USA) verbunden mit den Massenspektrenbibliotheken „Nist98“ und „Wiley275“ (Hewlett&Packard).

Die eindeutige Identifizierung der Terpene erfolgte durch Vergleich ihrer Massenspektren und Retentionszeiten mit denen von authentischen Standards. In Tabelle 2.6 sind die für die jeweiligen Terpene verwendeten Standards und deren Herkunft aufgelistet.

Tab. 2.6 Standardsubstanzen zur Terpenidentifizierung und ihre jeweilige Herkunft.

Substanz	Standard	Herkunft des Standards
Limonen	(±)-; (+)-; (-)-Limonen	Sigma-Aldrich, St. Louise, USA
Linalool	(R)(S)-; (R)-Linalool	Fluka, Seelze
β-Myrcen	β-Myrcen	Fluka
Sabinen	Sabinen	Roth (>95% (+)-Enantiomer, pers. Mitteilung)
α-Terpinen	α-Terpinen	Fluka
γ-Terpinen	γ-Terpinen	Fluka
α-Terpinolen	α-Terpinolen	Fluka
α-Thujen	α-Thujen	Roth (Karlsruhe)
(E)-α-Bergamoten	Opoponaxöl	Dracoco (Minden)
(Z)-α-Bergamoten	<i>Phoebe porosa</i> -Öl	W.A. König (Universität Hamburg)
β-Bisabolen	(R)(S)-β-Bisabolen, Bergamotöl	Racemat: diese Arbeit Bergamotöl: Esence Pure.K. (Utting)
(E)-γ-Bisabolen	Bisabolen-Öl	Dracoco
(Z)-γ-Bisabolen	Bisabolen-Öl	Dracoco
α-Cadinen	<i>Aloysia sellowii</i> -Öl	W.A. König
γ-Cadinen	<i>Aloysia sellowii</i> -Öl	W.A. König
δ-Cadinen	<i>Aloysia sellowii</i> -Öl	W.A. König
(E)-β-Caryophyllen	(E)-β-Caryophyllen	Fluka
α-Copaen	<i>Aloysia sellowii</i> -Öl	W.A. König
β-Curcumen	<i>Phoebe porosa</i> -Öl	W.A. König
γ-Curcumen	<i>Phoebe porosa</i> -Öl	W.A. König
(E)-β-Farnesen	(E)-β-Farnesen	Bedoukian (Danbury, USA)
Germagren D	<i>Aloysia sellowii</i> -Öl	W.A. König
α-Humulen	α-Humulen	Fluka
α-Muurolen	<i>Aloysia sellowii</i> -Öl	W.A. König
α-Selinen	<i>Apium graveoleus</i> -Öl	Roth
β-Selinen	<i>Apium graveoleus</i> -Öl	Roth
Sesquiphellandren	<i>Zingiber officinale</i> -Öl	diese Arbeit
Sesquisabinen A	<i>Phoebe porosa</i> -Öl	W.A. König
Sesquisabinen B	<i>Aloysia sellowii</i> -Öl	W.A. König
Sesquithujen	<i>Aloysia sellowii</i> -Öl	W.A. König
7- <i>epi</i> -Sesquithujen	<i>Phoebe porosa</i> -Öl	W.A. König
Zingiberen	<i>Zingiber officinale</i> -Öl	diese Arbeit

### 2.8.3 Darstellung von β-Bisabolen aus α-Bisabolol

Die Darstellung von (R)- und (S)-β-Bisabolen erfolgte durch Dehydratisierung von racemischen α-Bisabolol. Dazu wurden 100 µl α-Bisabolol in 10 ml Toluol gelöst und mit 1 g saurem Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> für 5 Stunden bei 145°C unter Rückfluss gekocht. Die trübe Lösung wurde mit MgSO<sub>4</sub> entwässert und in einer Verdünnung von 1:1000 in Pentan als Standard für die Gaschromatographie eingesetzt.

### 2.8.4 Gewinnung eines ätherischen Öles aus Ingwer

Zur Herstellung eines Zingiberen-Standards wurde ein ätherisches Öl aus Ingwer (*Zingiber officinale*) durch Wasserdampfdestillation-Extraktion gewonnen. Dazu wurden 40 g Ingwerwurzel zerrieben und für eine Stunde in 200 ml Wasser in einer Wasserdampfdestillation-Extraktionsapparatur (J&W Scientific, Palo Alto, USA) destilliert. Für die

Extraktion der Terpene aus dem Wasserdampf wurde Pentan (25 ml) verwendet. Durch anschließendes Abdestillieren des Pentans und Behandlung mit  $\text{MgSO}_4$  konnte ca. 1 ml hochkonzentriertes und wasserfreies Öl gewonnen werden. Den Hauptbestandteil dieses Öles bildet das Sesquiterpen Zingiberen.

## **2.9 Anmerkungen**

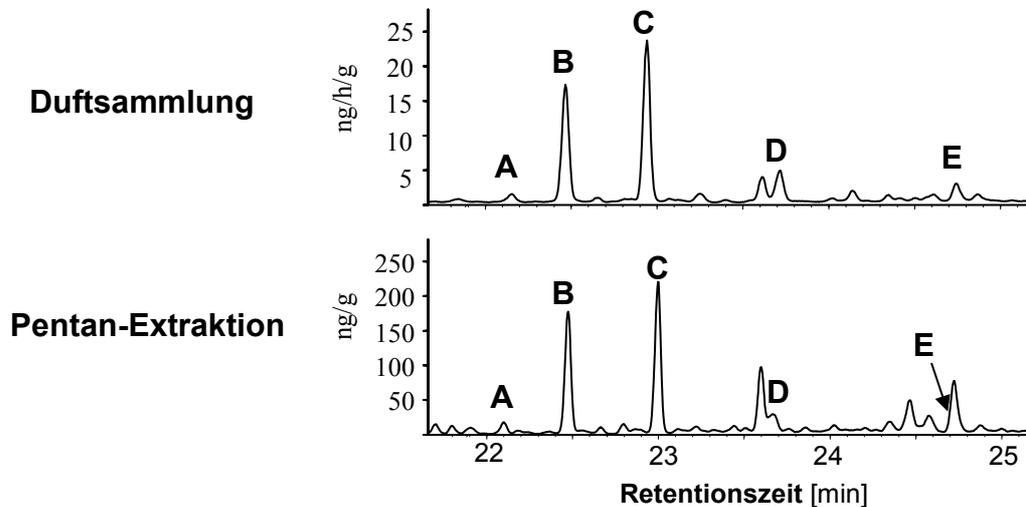
Mikrobiologische und molekularbiologische Techniken wurden, wenn nicht anders erwähnt, nach SAMBROOK *et al.* (1989) durchgeführt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Analyse der Sesquiterpenkohlenwasserstoffe (STKW) in der Maisinzuchtlinie B73

##### 3.1.1 Vergleich der verschiedenen Methoden zur Terpenanalyse

In vorangegangenen Arbeiten über Terpene und andere flüchtige Stoffe in Mais wurden sowohl verschiedene Duftsammelmethoden [BUTTERY & LING, 1984; TURLINGS *et al.*, 1998; GOINGUENE & TURLINGS, 2002] als auch kombinierte Vakuumdestillation-Extraktionen [FLATH *et al.*, 1978; BUTTERY *et al.*, 1978] angewendet. Beide Verfahren haben Vor- und Nachteile. Während in Duftsammlungen naturgemäß nur die von der Pflanze abgegebenen Verbindungen analysiert werden können, ist es durch Extraktionen möglich, auch weniger flüchtige bzw. in der Pflanze gespeicherte Stoffe zu isolieren. Der Nachteil kombinierter Destillation-Extraktionsmethoden ist jedoch der, dass relativ viel Untersuchungsmaterial benötigt wird (im Falle von Mais bis zu 3 kg [FLATH *et al.*, 1978]), und dass es häufig zur Artefaktbildung im Extrakt durch Verunreinigungen, Oxidationen oder thermischen Reaktionen kommen kann [CHAINTEAU, 2001]. Für diese Arbeit wurde daher eine einfache Pentanextraktion etabliert, mit der relativ geringe Mengen Pflanzenmaterial (1-3 g) bei Raumtemperatur analysiert werden konnten.



**Abb. 3.1** Vergleich der durch Duftsammlung bzw. Pentanextraktion gewonnenen Sesquiterpenkohlenwasserstoffe aus Blättern von 14 Tage alten, durch Raupenfraß induzierten B73-Sämlingen. Die Abbildung zeigt einen Ausschnitt aus den GC-MS Chromatogrammen („total ion chromatogram“ (TIC)) der STKW-Fractionen (Säule: DB5-MS). (A): (*E*)- $\beta$ -Caryophyllen, (B): (*E*)- $\alpha$ -Bergamoten, (C): (*E*)- $\beta$ -Farnesen, (D): Germacren D, (E):  $\beta$ -Sesquiphellandren

Ein Vergleich zwischen Duftsammlung und Pentanextraktion (s. Abb. 3.1) zeigte, dass es keine qualitativen Unterschiede im Bereich der STKW-Fractionen gab. Alle in den Pentanextrakten identifizierten STKW wurden auch im von der Pflanze emittierten Duftspektrum gefunden. Weiterhin waren die Mengenverhältnisse der einzelnen

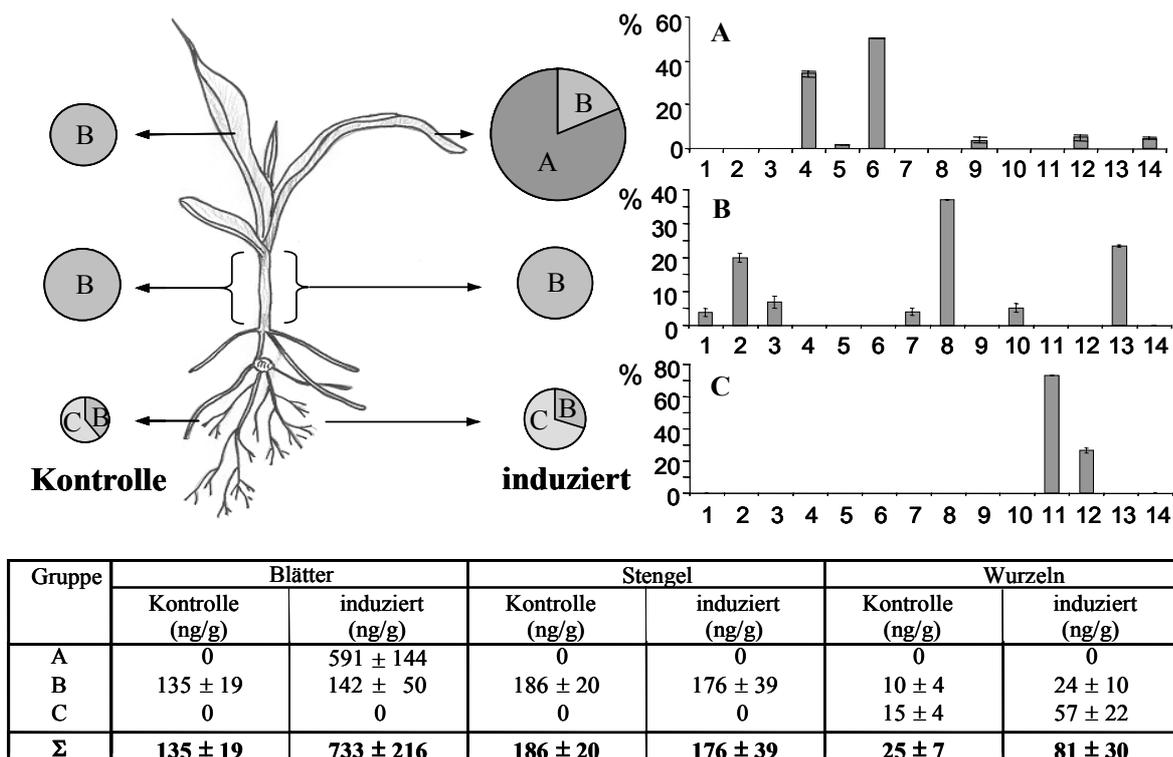
Sesquiterpene untereinander in beiden Proben sehr ähnlich. Man kann daher davon ausgehen, dass sich beide Methoden gleichermaßen für die Analyse der STKW in Maispflanzen eignen.

### 3.1.2 Qualitative und quantitative Analyse der STKW in verschiedenen Pflanzenteilen und Entwicklungsstufen

Die Produktion von Terpenen in Mais nach Raupenfraß ist bereits untersucht worden [TURLINGS *et al.*, 1990]. Über den Terpengehalt adulter Maispflanzen liegen nur wenige Veröffentlichungen vor, die allerdings eine starke Veränderung der Terpensynthese im Gegensatz zu jungen Pflanzen vermuten lassen [BUTTERY & LING, 1984; UDAYAGIRI & JONES, 1992A]. Um die komplexen räumlichen und zeitlichen Muster der Terpenbildung in Mais zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Arbeit die Sesquiterpeninhaltsstoffe sowohl von Blättern, Sproßachsen und Wurzeln induzierter und nicht induzierter B73-Sämlinge als auch von Blättern und Blütenständen adulter Pflanzen bestimmt. Die Isolation der Terpene erfolgte durch Pentanextraktion oder Duftsammlung. Die einzelnen Komponenten der erhaltenen Stoffgemische wurden gaschromatographisch voneinander getrennt und mittels Massenspektrometrie identifiziert.

Als STKW-Hauptkomponenten wurden in den Blättern und Sprossachsen uninduzierter B73-Sämlinge  $\alpha$ -Copaen, Germacren D sowie  $\delta$ -Cadinen und als Nebenprodukte (*E*)- $\beta$ -Caryophyllen,  $\alpha$ -Muurolen und ein nicht identifiziertes Sesquiterpen gefunden. Aus den Wurzeln der Pflanzen wurden neben diesen STKW zwei weitere Sesquiterpene extrahiert,  $\beta$ -Bisabolen und ein unbekanntes Terpen. Das Massenspektrum dieser unbekanntes Verbindung (siehe auch Abb. 3.7.A) konnte in keiner der zur Verfügung stehenden Terpen-Massenspektrenbibliotheken gefunden werden. In einer Massenspektrendatenbank von bisher nicht bestimmten Terpenen existierte ebenfalls kein vergleichbares Spektrum (Robert P. Adams, persönliche Mitteilung). Daher ist dieses Sesquiterpen vermutlich noch nicht identifiziert worden. In induzierten Sämlingen fanden sich die in den uninduzierten Pflanzen bestimmten STKW in gleicher Menge. Durch Raupenfraß wurde in Blättern die Synthese von (*E*)- $\alpha$ -Bergamoten, (*E*)- $\beta$ -Farnesen, Sesquisabinen A, Zingiberen,  $\beta$ -Bisabolen und  $\beta$ -Sesquiphellandren induziert. Eine Induktion der (*E*)- $\beta$ -Caryophyllenbildung konnte hingegen, im Gegensatz zu anderen Kultivaren [TURLINGS, 1998], in B73 nicht beobachtet werden. In den Wurzeln induzierter Pflanzen war die Menge an  $\beta$ -Bisabolen und dem unbekanntes Terpen etwa dreifach höher als in Wurzeln uninduzierter Pflanzen.

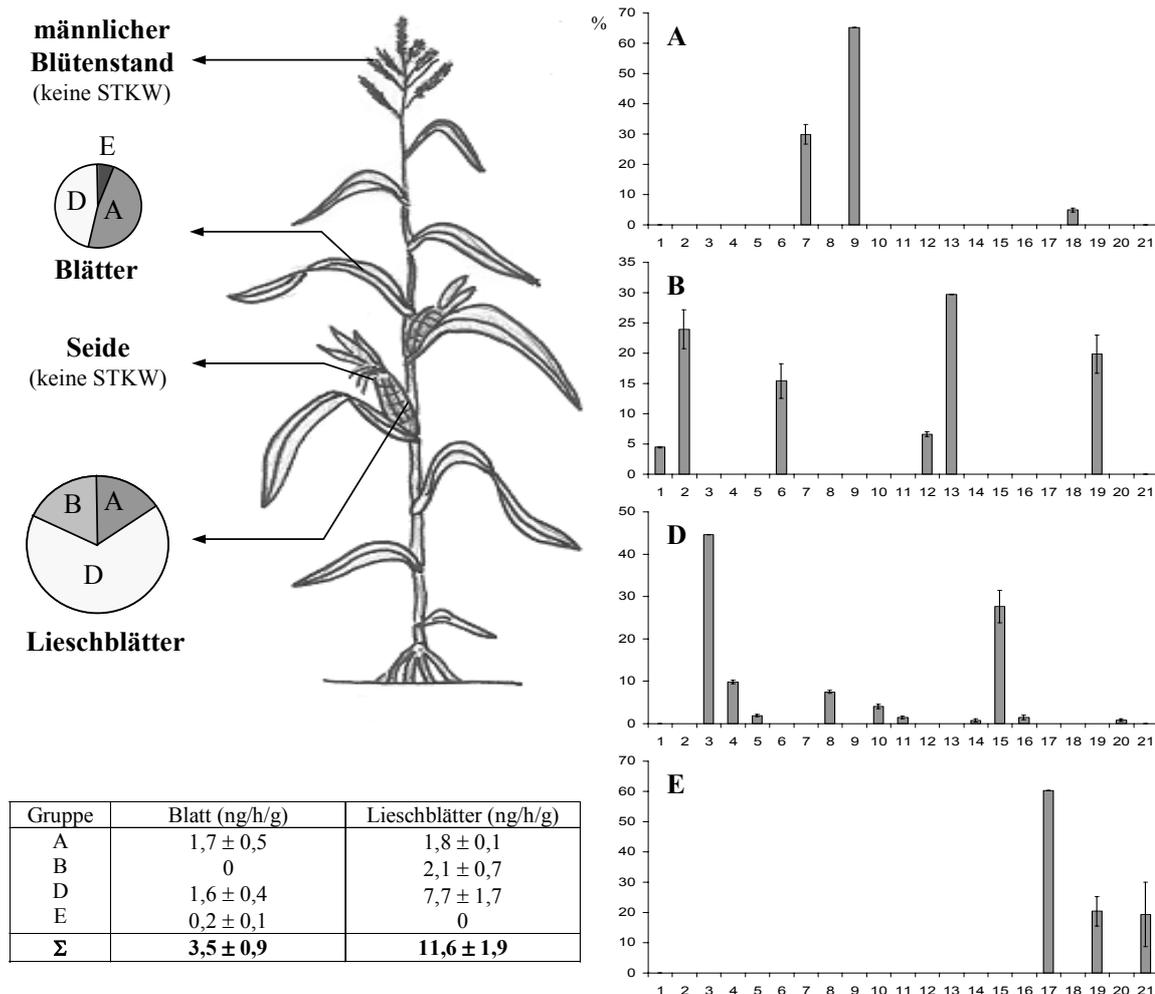
Interessanterweise traten die STKW innerhalb der Pflanze in separaten Gruppen auf. So bildeten die vierzehn in jungen B73-Pflanzen identifizierten STKW drei distinkte Gruppen (Abb. 3.2: Balkendiagramme A bis C). Die Gruppe A umfasste die durch Herbivorie induzierten Substanzen (*E*)- $\alpha$ -Bergamoten, Sesquisabinen A, (*E*)- $\beta$ -Farnesen, Zingiberen,  $\beta$ -Bisabolen und Sesquiphellandren. Zur Gruppe B gehörten die konstitutiv in der Pflanze gebildeten Terpene Germacren D, (*E*)- $\beta$ -Caryophyllen,  $\delta$ -Cadinen,  $\alpha$ -Copaen,  $\alpha$ -Muurolen und zwei nicht identifizierte Sesquiterpene. Das ausschließlich in Wurzeln gefundene unbekanntes Sesquiterpen sowie  $\beta$ -Bisabolen bildeten die Gruppe C.



**Abb. 3.2 Sesquiterpenkohlenwasserstoffe in B73-Sämlingen.** Die STKW in den unterschiedlichen Pflanzenteilen von 10-14 Tage alten Maissämlingen wurden mit Pentanextraktion isoliert und mit GC-FID quantifiziert. Die Identifizierung erfolgte durch Vergleich der Massenspektren und Retentionszeiten mit Standardsubstanzen. Mittelwerte und angegebene Standardfehler wurden aus den Daten dreier unabhängiger Messungen errechnet. Zum Induzieren der Pflanzen wurden Raupen von *Spodoptera littoralis* verwendet. In den Balkendiagrammen sind die einzelnen STKW den Gruppen A bis C zugeordnet. Die Kreisdiagramme veranschaulichen die unterschiedlichen Anteile dieser Gruppen am Gesamtgehalt an STKW in den jeweiligen Pflanzenteilen und beruhen auf den in der Tabelle aufgeführten Mittelwerten. (1): unbekannt, (2):  $\alpha$ -Copaen, (3): (*E*)- $\beta$ -Caryophyllen, (4): (*E*)- $\alpha$ -Bergamoten, (5): Sesquisabinen A, (6): (*E*)- $\beta$ -Farnesen, (7): unbekannt, (8): Germacren D, (9): Zingiberen, (10):  $\alpha$ -Muurolen, (11): unbekannt, (12):  $\beta$ -Bisabolen, (13):  $\delta$ -Cadinen, (14): Sesquiphellandren

Bezogen auf ihre Biomasse produzierten adulte B73-Pflanzen im Gegensatz zu Sämlingen weniger STKW. Da eine Pentanextraktion in diesem Konzentrationsbereich nicht sensitiv genug war und nur mit erheblich größeren Mengen an Ausgangsmaterial und Lösungsmittel zu befriedigenden Resultaten führte, wurde die Duftsammlung nach HEATH & MANUKIAN (1994) zur Untersuchung der STKW in adulten Pflanzen eingesetzt.

Die Ergebnisse in Abbildung 3.3 zeigen, dass die einundzwanzig in adulten B73-Pflanzen identifizierte Sesquiterpene auf Grund der gleichen Merkmale wie in jungen Pflanzen in insgesamt vier Gruppen eingeteilt werden konnten. Die Gruppen A und B enthielten wiederum die in jungen Pflanzen gefundenen Terpene und die Gruppen D und E umfassten die Verbindungen 7-*epi*-Sesquithujen, Sesquithujen, (*Z*)- $\alpha$ -Bergamoten, Sesquisabinen A, Sesquisabinen B,  $\alpha$ -Humulen, Zingiberen,  $\beta$ -Bisabolen, (*Z*)- $\gamma$ -Bisabolen und (*E*)- $\gamma$ -Bisabolen bzw.  $\gamma$ -Cadinen,  $\delta$ -Cadinen und  $\alpha$ -Cadinen.



**Abb. 3.3 Sesquiterpenkohlenwasserstoffe in adulten B73-Pflanzen.** Die Isolierung und Analyse der STKW adulter Maispflanzen erfolgte durch Duftsammlung und anschließender GC-FID bzw. GC-MS. Zur Identifizierung wurden die Massenspektren und Retentionszeiten der Terpene mit denen von Standards verglichen. Mittelwerte und angegebene Standardfehler wurden aus den Daten von vier unabhängigen Messungen errechnet. In den Balkendiagrammen sind die einzelnen STKW den Gruppen A, B, D und E zugeordnet. Die Kreisdiagramme veranschaulichen die unterschiedlichen Anteile dieser Gruppen am Gesamtgehalt an STKW in den jeweiligen Pflanzenteilen und beruhen auf den in der Tabelle aufgeführten Mittelwerten. (1): unbekannt, (2):  $\alpha$ -Copaen, (3): 7-*epi*-Sesquithujen, (4): Sesquithujen, (5): (*Z*)- $\alpha$ -Bergamoten, (6): (*E*)- $\beta$ -Caryophyllen, (7): (*E*)- $\alpha$ -Bergamoten, (8): Sesquisabinen A, (9): (*E*)- $\beta$ -Farnesen, (10): Sesquisabinen B, (11):  $\alpha$ -Humulen, (12): unbekannt, (13): Germacren D, (14): Zingiberen, (15):  $\beta$ -Bisabolen, (16): (*Z*)- $\gamma$ -Bisabolen, (17):  $\gamma$ -Cadinen, (18): Sesquiphellandren, (19):  $\delta$ -Cadinen, (20): (*E*)- $\gamma$ -Bisabolen, (21):  $\alpha$ -Cadinen

Da die Nebenprodukte Sesquisabinen A, Zingiberen und  $\beta$ -Bisabolen der Gruppe A gleichzeitig einige der Hauptbestandteile von Gruppe D waren, kam es zu einer Überlagerung beider Gruppen. Diese konnte nicht aufgelöst werden, weil die durch die Überlagerung entstehenden Unterschiede im Bereich der natürlichen Schwankungen zwischen verschiedenen Pflanzen lagen.

Die Sesquiterpene von Gruppe B waren bis auf das Fehlen von  $\alpha$ -Muurolen identisch mit denen der Gruppe B junger Pflanzen. Lediglich die Mengenverhältnisse der einzelnen

Komponenten untereinander wichen in einigen Fällen (Germacren D :  $\alpha$ -Copaen bzw. Germacren D :  $\beta$ -Caryophyllen) voneinander ab.

Für die Gruppen D und E gab es keine entsprechenden Gruppen in B73-Sämlingen, d.h. die Terpene dieser Gruppen wurden spezifisch nur in adulten Pflanzen gebildet. Die Sesquiterpene der Gruppe D bildeten die Hauptbestandteile der STKW in Lieschblättern, waren aber auch als Nebenprodukte in normalen Blättern in etwa vierfach geringerer Menge vorhanden. In den männlichen Blütenständen und in den Narbenfäden (Seide) der weiblichen Blütenstände wurden keine STKW gefunden.

Die in den beschriebenen Experimenten vermessenen adulten B73-Pflanzen wurden im Gewächshaus angezogen und zeigten keinen Schädlingsbefall. Die Biosynthese der STKW war deshalb vermutlich nicht durch äußere biotische Faktoren induziert. Abiotische Faktoren, Verletzungen der Pflanzen oder ein sehr geringer Befall mit Schädlingen waren allerdings nicht auszuschließen und könnten eventuell die Terpenbiosynthese beeinflusst haben. Versuche, die Pflanzen durch Raupenfraß zu induzieren, waren nicht erfolgreich, da die zur Verfügung stehenden Raupen der Gattung *Spodoptera* nicht bzw. nur in äußerst geringem Umfang an den Blättern adulter Pflanzen fraßen.

### 3.2 Identifizierung und Charakterisierung von Terpensynthasen in der Maisinzuchtlinie B73

#### 3.2.1 Identifizierung von Terpensynthasegenen

Zur Identifizierung von Terpensynthasegenen in der Maisinzuchtlinie B73 konnte auf eine EST-Datenbank der Firma „Pioneer Hi-Bred International“ zurückgegriffen werden. Durch BLAST-Analyse wurden in dieser Datenbank eine Vielzahl von Sequenzen gefunden, die Ähnlichkeiten zu schon bekannten Sesquiterpensynthasegenen aus Pflanzen haben. Fünf dieser ESTs wurden ausgewählt und vollständig sequenziert. Die erhaltenen cDNA-Sequenzen enthielten jeweils einen offenen Leserahmen. Die mehrfache Durchführung von RACE-PCR ergab in allen Fällen identische 5'-Enden, so dass davon auszugehen war, dass die einzelnen cDNAs vollständig sind. Die entsprechenden Gene, *tps4-B73* (1665 bp, Accession-Nr.: AY518310), *tps5-B73* (1665 bp, Accession-Nr.: AY518311), *tps6-B73* (1647 bp, Accession-Nr.: AY518315), *tps7-B73* (1647 bp, Accession-Nr.: AY518316) und *tps9-B73* (1584 bp, Accession-Nr.: AY518317), kodieren Proteine mit für Terpensynthasen charakteristischen Merkmalen und Sequenzmotiven (Abb. 3.4). Als Bezeichnung wurde die Abkürzung für Terpensynthase „tps“ gewählt. Der Anhang „B73“ spezifiziert die Herkunft der Allele aus B73.

Die kalkulierten Molekulargewichte (TPS4-B73 und TPS5-B73: 63,9 kDa; TPS6-B73: 63,7 kDa; TPS7-B73: 62,6 kDa; TPS9-B73: 61,3 kDa) lagen im Bereich der Molekulargewichte anderer pflanzlicher Sesquiterpensynthasen. Eine Analyse der Proteinsequenzen mit den verwendeten Programmen zur Signalpeptid-Vorhersage erbrachte keine Hinweise auf das Vorhandensein möglicher Signalpeptide. Das für Terpensynthasen charakteristische „DDxxD“-Motiv sowie ein konserviertes „RxR“-Motiv wurde in allen fünf identifizierten Proteinen gefunden.

TPS4-B73	MASPPAHR.SKAADEELPKASSTFHPSLWGSFFLTYQF.PTA..PQRANMKERAEVLRERVRKVLKGSTTDQLPE	72
TPS5-B73	MASPPAHR.SKAADEELPKVSTFHPSLWGSFFLTYQF.PTA..PQRANMKERAEVLRERVRKVLKGSTTDQLPE	72
TPS9-B73	.....MAPPALAEETAAFHPSLWGDFFLTYQF.PTA..PQACMKERAEVLRERVRKILMGPC..ELPE	61
TPS6-B73	MAAPTTLADGPRLGQQEMKMSPSFHPITLWGDFFLTYQF.PTE..AQEAQMRKAAVLRKEVRNMKIGSH..DVPE	71
TPS7-B73	.....MATTGTTSMPPVVFHPTVWGDYFIKVFVEPLQ..VSDETMAERIRHREVEVSGMFQ.AC.KNVVD	61
TEAS	.....MASAAVANYEEIVRPVADFSPSLWGDQDFLFSIDN.Q..VA.EKYAKEIEALRKEQTRNMLL.ATGMKLD	66
TPS1-B73	MAMPVKLTPASLSLKAVCCRFSSGGHALRFGSSLPWCRRRTPTQRSTSSSTYAKEIEALRKEQTRNMLL.ATEATRQ	75
TPS4-B73	TVNLIITLQRLGLGYEYENETDKLLHQIYSN..SDYNVKDLNLV..SQRFYLLRKNGYDVPDVFVLSF.KTEE.GG	142
TPS5-B73	TVNLIITLQRLGLGYEYENETDKLLHQIYSN..SDYNVKDLNLV..SQRFYLLRKNGYDVPDVFVLSF.KTEE.GG	142
TPS9-B73	TLGLIITLQRLALDYEYENETDKLLHCIYDDDDSDYDDKDLNLV..SLRFYLLRKNGYDVPDVFVLSF.KTEE.GS	133
TPS6-B73	IVDLIITLQRLNLDYHYEDETNEKLTIVYK...SNYDGGNLDLV..SRRFYLLRKNGYDVPDVFVLSF.KDQL.GN	140
TPS7-B73	KTNLVDVQRLGIDHFFEQIATALASLHSA..GLNFSSSLHEA..ALRFYLLRKNGYDVPDVFVLSF.KNED.GS	132
TEAS	TLNLIITLQRLGLGYEYENETDKLLHQIYSN..SDYNVKDLNLV..SQRFYLLRKNGYDVPDVFVLSF.KDQL.GN	135
TPS1-B73	QLQVLDVLENMGISRHFAAETKCILDRYRSWLQRHEIEMLDTMTCAMAFRI.LRNLGNVSSDELYHVVEASGLHN	151
TPS4-B73	FACA.AADTRSLSLYNAAYLR.KHGEV..LDEAISSTRLRQLDQLLGRLLPESPFAKEVSSSRTPPLFRRVVGILE	214
TPS5-B73	FACA.AADTRSLSLYNAAYLR.KHGEV..LDEAISSTRLRQLDQLLGRLLPESPFAKEVSSSRTPPLFRRVVGILE	214
TPS9-B73	FAYA.D.DTASLSSLYNAAYLR.KHGEV..LDEAISFARRRCE.....AGIERTPLFRRVVGILE	189
TPS6-B73	FVEA...DTRSLSLYNAAYLR.KHGEV..LDEAISFTMRVLQDRLEHL..ESPLAEVSSSRTPPLFRRVVGILE	208
TPS7-B73	IVDGIITLQRLNLDYHYEDETNEKLTIVYK...SNYDGGNLDLV..SRRFYLLRKNGYDVPDVFVLSF.KDQL.GN	206
TEAS	FKESLASDVLGLNLVYFASHVR.THADDI..LEDALAFSTIHLESAAP.HL.KSPLREQVTHALRQCLHKGVPRVE	206
TPS1-B73	SLGGYLNDRITLLELHKASTVTSISEDESILDSIGSRRTLLRQLESGLRKPSPFLKVEVEHADGGPFYTTLDRLH	227
		RxR
TPS4-B73	ARNYIP...IYET.....EATRNEAVLELAKLNFNLQQLDFCEELKHCSA...WNEMIAKSKLTFVDRIVEEY	278
TPS5-B73	ARNYIP...IYET.....EATRNEAVLELAKLNFNLQQLDFCEELKHCSA...WNEMIAKSKLTFVDRIVEEY	278
TPS9-B73	ARNYIP...IYEK.....EAARNDVLELAKLNFNLQQLDFCEELKHCSA...WNEMIAKSKLTFVDRIVEEY	253
TPS6-B73	MKDYIP...IYEK.....DAKQNSILEFAKLNFNLLQLRYSSSELKECTTWKELRVESNLSFVDRIVEEY	272
TPS7-B73	AIAFIPEYSSQD.....QQVYSPVITLAKLNFNLQQLDFCEELKHCSA...WNEMIAKSKLTFVDRIVEEY	273
TEAS	TRFFIS...SIYDK.....EQSKNVLLRFKAKLNFNLQQLDFCEELKHCSA...WNEMIAKSKLTFVDRIVEEY	271
TPS1-B73	HRWNLNFNIIHQHMLETPYLSNQHTSRDILALSRDESSSQFTYQOELQHLESVWKECRLD.QLQFAROKLAYFY	302
		DDxxD
TPS4-B73	FWMNGACYDPPYLSRSRIILTKITGLITIDDDMDTHGTTEDCMKFAEAFGRWDES.AIHLLPEYMKDFYILMLETF	353
TPS5-B73	FWMNGACYDPPYLSRSRIILTKITGLITIDDDMDTHGTTEDCMKFAEAFGRWDES.AIHLLPEYMKDFYILMLETF	353
TPS9-B73	FWMNGACYDPPYLSRSRIILTKITGLITIDDDMDTYGTTEDCKTFHEAIGRWDES.ALPLLQYMKGFYLFQLETF	328
TPS6-B73	FWMGGCYDPPYLSRSRIILTKIVAFITLDDTLDSHATSCEMSQLAEATERWDES.AVSLLEPEYMKDFYMYLLKTF	347
TPS7-B73	FWSYTVHYERGQARARMLAKVFMVLSLDDTYVHATLEEARLNKAIQRWDES.DVSLLEPEYMKDFYMYLVISNF	348
TEAS	FWALGVYFEPQYSQARVMLVKTISMISIVDDTFDAYGIVKLEAYTDAIQRWDLN.EIDRLPDYMKISYKAILDLY	346
TPS1-B73	LSAAGTMFSPPELSDARTLWAKNGVLTITVDDFFDVAGSKEELENLVMVLEMWDEHHKVEFYSEQVEIIFSSIYDSV	378
TPS4-B73	QSFEDAL.GPEKSYRVLVYLKQAMERLVELYSKELIKWRDDDYVP.TMSEHLQVSAETIATIALTCSAYAGMGDMSIR	427
TPS5-B73	QSFEDAL.GPEKSYRVLVYLKQAMERLVELYSKELIKWRDEYVA.TMSEHLKVSASIESIGANALTCSAYAGMGDSIT	427
TPS9-B73	RSFEDEL.GPENSRYRHYLKKSMERLVQYYRFLIKWRDENYVPKTMTMTEHLQVSMESIGSVALACAAAYGMGDV.IT	402
TPS6-B73	SSFENEL.GPKSYRVLVYLKQAMERLVELYSKELIKWRDEYVPKTLKELHKLVSLSISIGTLLVLSAFVGMGDV.VT	421
TPS7-B73	REFEDELSEHEKYRNV.YNIKGFQTLKSHYLOBAEFHHGCTP.SFKDQVNVSVITGGAQVLSIGLLVGMGHE.AT	421
TEAS	KDYEKELSSAGRSIIVCHAIERMKVEVRYNVSTWFIQYTP.PVSEYLSNALATTTYYLATTSYLGM.KS.AT	419
TPS1-B73	NQLGEKASLVQDRSITKHLVEIWLDDLKSMMTVEVWRLSKYVP.TEKFYMINASLIFGLGPVLPALYFVGPK..I	451
		*
TPS4-B73	KETFEWALSFPQFIRTFGSFVRLSNDVSTKREQTKDHPSTVHCYMKEHGTMDDACEKIKELIEDSWKDMLEQS	503
TPS5-B73	KETFEWALSFPQFIRTFGSFVRLSNDVSTKREQTKDHPSTVHCYMKEHGTMDDACEKIKELIEDSWKDMLEQS	503
TPS9-B73	KETLDWVLSYQFQLTTYG.IVRLSNDVSTKREQTKDHPSTVHCYMKEHGTMDDACEKIKELIEDSWKDMLEQS	477
TPS6-B73	KIKIMKVVMSDAELVKSFGIFVRLSNDVSTKREQTKDHPSTVHCYMKEHGTMDDACEKIKELIEDSWKDMLEQS	497
TPS7-B73	REAFEWAIQDGTDAIWACGEVSRFMDMSAFKNGRNMKMDVASSVECYIKHNVPEVALARINSLVEDAWKTINQAP	497
TEAS	EQDFEWLSKNPKILEASVICTRVIDDTATYFEVKSQGIATGIECCMRDYGISTKEAMAKFQNAETANKDINEGL	495
TPS1-B73	SESIVKDPEYDELFKLMSTCGRLLNDVQTFEREYNEGLNSVSLVLLVHGGPMSISDAKRKLQKPIQDTCRRDLLSLV	527
		*
TPS4-B73	LALKGLPKVVPQLVDFDSRTTNDMY.RDRDALTS.SEALKEMIQLLFVEPIPE.....	554
TPS5-B73	LALKGLPKVVPQLVDFDSRTTNDMY.RDRDALTS.SEALKEMIQLLFVEPIPE.....	554
TPS9-B73	LALKGLPKAVPRTVDFDLRTADNMY.KNCDAFTS.SEVLREMIQLLFVEPIPE.....	528
TPS6-B73	LALKEYPIIVPRTVLEFARTVDYMY.KEADKYTV.SHTIKDMLTSLYKPVLM.....	548
TPS7-B73	FK.YPALFPVQVQRTVLSLAKSMTLLFLDKRDAYTY.SKDFQTTLETHFVRHPL.....	548
TEAS	LRPTPVSTEFLLPILNLARIVEVTVIHNLDGYTHPEKVLKPHIINLLVDSIKI.....	548
TPS1-B73	LRRESVVRPCKELFWKMKVCYFFYSTTDGFFSQVERAKE.VDAVINEPLKLGSHTLVSDV	590

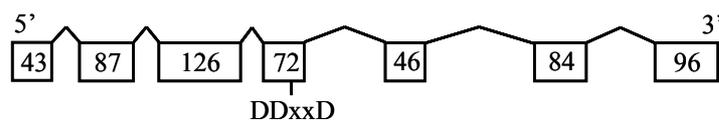
**Abb. 3.4 Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen von TPS4-B73, TPS5-B73, TPS6-B73, TPS7-B73 und TPS9-B73.** Die Abbildung zeigt ein Alignment der B73-Allele von TPS4, TPS5, TPS6, TPS7 und TPS9 sowie der Terpensynthase TPS1-B73 aus Mais [SCHNEE *et al.*, 2002] und der 5-*epi*-Aristolochensynthase (TEAS) aus *Nicotiana tabacum* [FACCHINI & CHAPPEL, 1992]. Schwarz hinterlegte Aminosäuren sind in allen sieben Sequenzen identisch und die mit Grau hinterlegten Aminosäuren sind in mindestens 4 Sequenzen identisch. Die hochkonservierte Bindestelle für Magnesiumionen („DDxxD“-Motiv) sowie das „RxR“-Motiv sind gekennzeichnet. Ein \* markiert die Positionen der Aminosäuren, die an der katalytischen Triade von TEAS beteiligt sind.

Der Grad der Identität der abgeleiteten Aminosäuresequenzen war sehr unterschiedlich. Während z.B. TPS4-B73 und TPS5-B73 zu knapp 98% identisch waren, betrug die Aminosäureidentität zwischen TPS4-B73 und TPS7-B73 lediglich 33%. Zwei bereits

bekannte Mais-Terpensynthasen, STC1 [SHEN *et al.*, 2001] und TPS1 [SCHNEE *et al.*, 2002], zeigten 40% bzw. 25% Aminosäureidentität zu TPS4-B73.

Die hohe Sequenzähnlichkeit zwischen *tps4-B73* und *tps5-B73* ließ die Frage zu, ob beide Sequenzen nicht Allele eines Gens sind. Da es aber in einer Inzuchtlinie keine Allelvariation gibt, sollten beide Sequenzen unterschiedliche Gene darstellen. Um allerdings eine eventuell vorhandene partielle Heterozygotie der Inzuchtlinie auszuschließen, wurde die Segregation einer Transposoninsertion in *tps5-B73* untersucht. Die PCR-Analyse der Nachkommen einer mit sich selbst gekreuzten Pflanze ergab dabei kein für die Transposoninsertion heterozygotes Segregationsmuster, welches im Falle einer partiellen Heterozygotie zu erwarten gewesen wäre (Christiane Schnee, pers. Mitteilung). Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass *tps4-B73* und *tps5-B73* separate Gene sind.

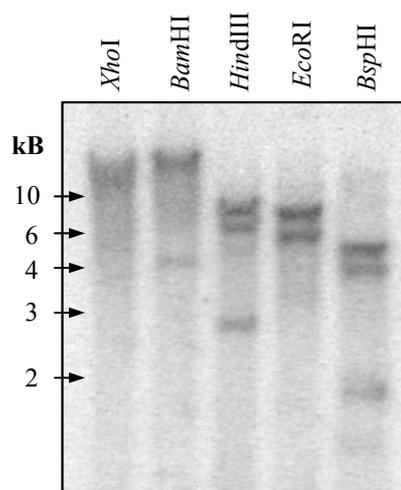
Die Amplifizierung und Sequenzierung eines genomischen Klons von *tps5-B73* aus chromosomaler DNA junger B73-Pflanzen ergab, dass dieses Gen aus sieben Exons besteht, die durch sechs Introns voneinander separiert sind (Abb. 3.5). Aufgrund der Anzahl und Lage der Introns konnte *tps5* in Anlehnung an die von TRAPP & CROTEAU (2001) aufgestellte Klassifikation der Genstrukturen von Terpensynthasen als Klasse-III-Terpensynthase eingestuft werden.



**Abb. 3.5 Die Exon-Intron-Struktur von TPS5.** Die sieben Exons sind als Rechtecke gezeichnet. Die Nummern geben die ungefähre Anzahl der jeweiligen Aminosäuren des Exons an. Das „DDxxD“-Motiv befindet sich im Exon 4.

Um zu untersuchen, ob eventuell weitere zu *tps4* und *tps5* ähnliche Gene in der Pflanze vorhanden sind, wurde eine Southern-Analyse durchgeführt. Dafür wurde genomische DNA aus Blättern junger B73-Pflanzen isoliert, mit den Restriktasen *Xho*I, *Bam*HI, *Hind*III, *Eco*RI und *Bsp*HI geschnitten und nach gelelektrophoretischer Auftrennung auf eine Nylonmembran transferiert. Die Detektion der Restriktionsfragmente erfolgte mit einer radioaktiv markierten ssDNA-Sonde, welche durch lineare PCR synthetisiert wurde und den ersten 286 Basen von *tps4* entsprach. Da sich *tps4* und *tps5* in diesem Bereich in nur vier Basen unterscheiden, konnte die Sonde beide Gene detektieren.

In Abbildung 3.6 ist das Autoradiogramm der Southern-Analyse dargestellt. Im Falle von *Hind*III, *Eco*RI und *Bsp*HI sind jeweils zwei Hauptbanden und mit einer Ausnahme (*Eco*RI) eine schwächere Nebenbande vorhanden. Da weder in den ersten beiden Exons von *tps4* und *tps5* noch im ersten Intron von *tps5* Erkennungssequenzen für diese Enzyme vorhanden sind, ist anzunehmen, dass nur diese beiden Gene im Genom vorliegen. Die schwächere Nebenbande könnte durch Hybridisierung der Sonde mit einem zu *tps4* und *tps5* ähnlichen Genfragment (z.B. *tps9*) erklärt werden. Eine *Hind*III- oder *Bsp*HI-Schnittstelle im ersten Intron von *tps4* kann als Grund für diese Bande ebenfalls nicht ausgeschlossen werden.



**Abb. 3.6 Southern-Analyse der Gene *tps4* und *tps5*.** 10 µg von aus jungen Maispflanzen (B73) isolierter genomischer DNA wurden mit den Restriktasen *XhoI*, *BamHI*, *HindIII*, *EcoRI* und *BspHI* geschnitten, auf einem 0,8% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine Nylonmembran übertragen. Die Detektion der Restriktionsfragmente erfolgte mit einer sowohl zu *tps4* als auch *tps5* homologen, die ersten 286 Basenpaare von *tps4* umfassenden ssDNA-Sonde (markiert mit  $\alpha$ - $^{32}$ P-dATP). Dargestellt ist das Autoradiogramm.

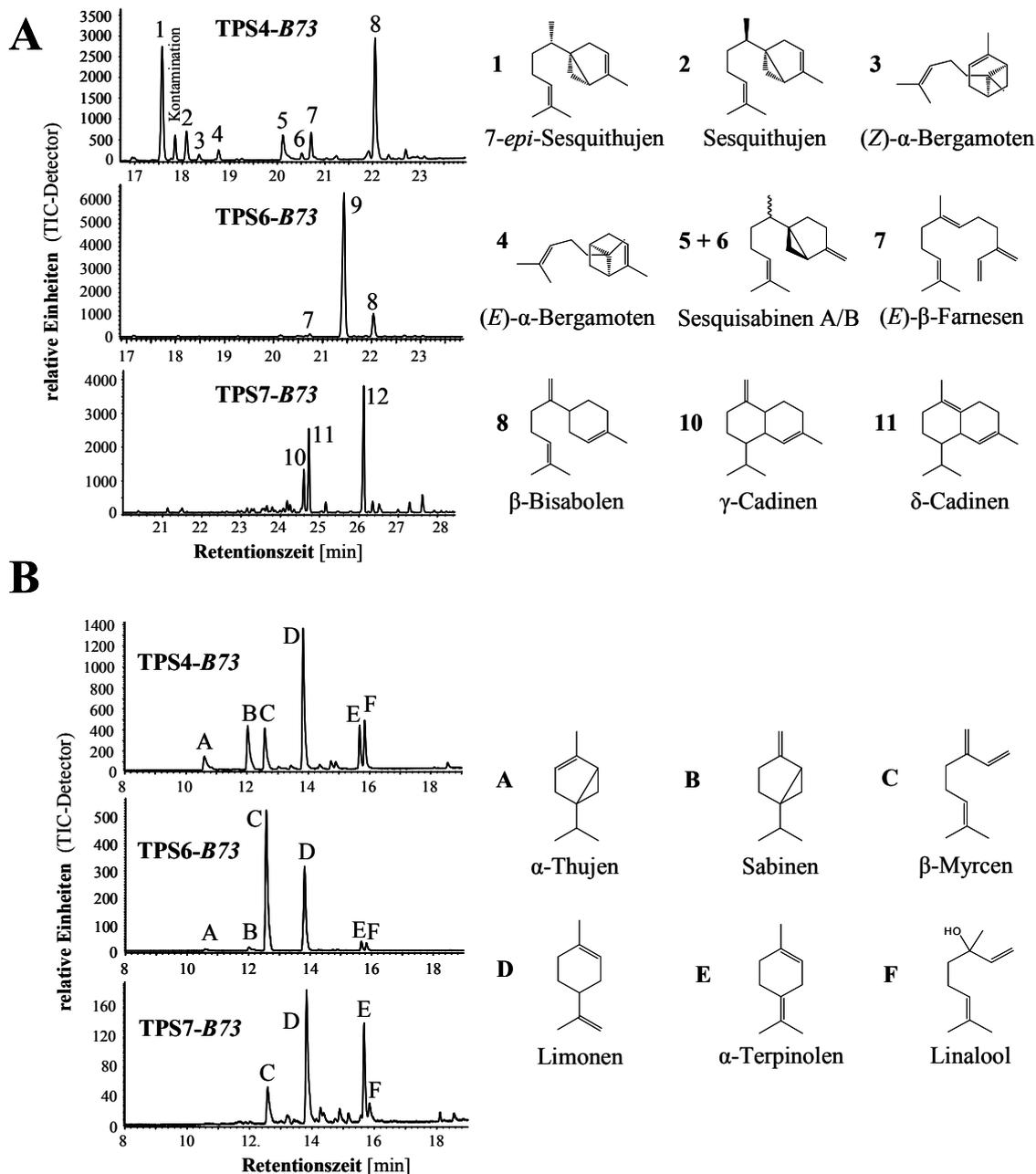
### 3.2.2 Funktionelle Analyse der identifizierten Terpensynthasen

Da es derzeit noch nicht möglich ist, auf Grund der Aminosäuresequenz eine Aussage zur enzymatischen Aktivität von Terpensynthasen zu machen, sollten die identifizierten Proteine in einem heterologen System exprimiert und anschließend durch Enzym-Substrat-Reaktionen *in vitro* funktionell charakterisiert werden.

Auf Grundlage der kompletten EST-Sequenzen wurden Oligonukleotide (s. Tab. 2.4) konstruiert und die Gene aus einer cDNA-Bank von durch Raupenfraß induzierten B73-Blättern mittels PCR amplifiziert. Die Gene *tps4-B73* und *tps7-B73* wurden als *NdeI/BamHI*-Fragment durch „sticky end“-Klonierung in den Vektor pSBET inseriert. Die Klonierung von *tps5-B73* und *tps6-B73* erfolgte als *NcoI/BamHI*-Fragment in den Vektor pET11d und *tps9-B73* wurde als *BsmBI*-Fragment in den Vektor pASK-IBA7 eingebaut. Zur Charakterisierung der katalytischen Aktivität wurden die Terpensynthasen in *E. coli* exprimiert, partiell gereinigt und mit den potentiellen Substraten GPP, FPP und GGPP inkubiert. Die Ergebnisse der gaschromatographischen Analyse der Reaktionsprodukte sind in Abbildung 3.7 dargestellt.

TPS4-B73, TPS6-B73 und TPS7-B73 akzeptierten sowohl GPP als auch FPP als Substrat, das jeweils zu Mono- und Sesquiterpenen umgewandelt wurde. Die Bildung von Diterpenen aus GGPP ist von keinem der untersuchten Enzyme katalysiert worden. Die hauptsächlich von TPS4-B73 gebildeten Sesquiterpene waren 7-*epi*-Sesquithujen und  $\beta$ -Bisabolen. Weiterhin wurden mehr als sechzehn verschiedene STKW (s. Tabelle 3.1) sowie geringe Mengen Nerolidol und ein nicht identifizierter Sesquiterpenalkohol als Nebenprodukte synthetisiert. TPS6-B73 wandelte FPP zu einem bisher unbekanntem Sesquiterpen um (s. Abb. 3.8). Als Nebenprodukte wurden  $\beta$ -Bisabolen und (*E*)- $\beta$ -Farnesen identifiziert. TPS7-B73 produzierte drei Sesquiterpenhauptprodukte: das nur anhand des Massenspektrums bestimmte 1,6-Germacradien-5-ol und die mit einem

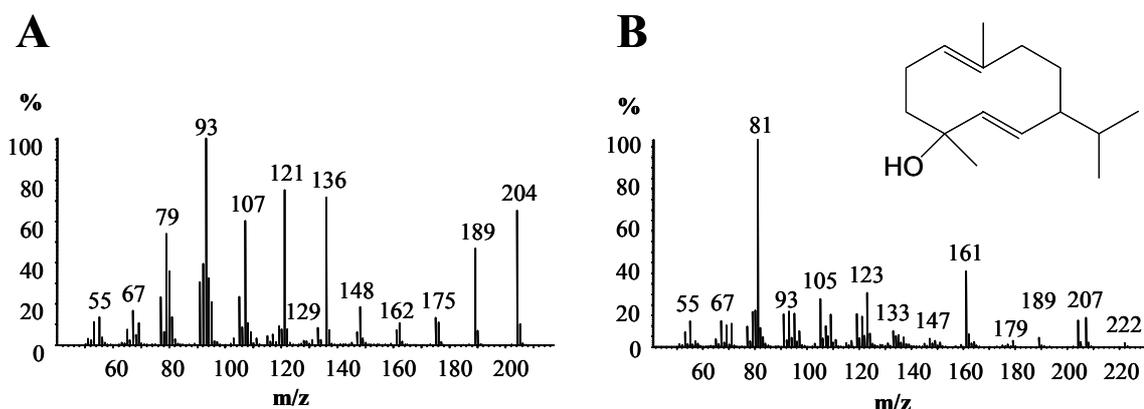
Standard verlässlich identifizierten Verbindungen  $\delta$ -Cadinen und  $\gamma$ -Cadinen sowie etwa 40 verschiedene Nebenprodukte. Als Monoterpene wurden von allen drei Enzymen  $\beta$ -Myrcen, Limonen,  $\alpha$ -Terpinolen und Linalool in jeweils unterschiedlichen Mengenverhältnissen gebildet. In den Monoterpenproduktspektren von TPS4-B73 und TPS6-B73 fanden sich zusätzlich noch  $\alpha$ -Thujen und Sabinen.



**Abb.3.7 Sesquiterpenprodukte (A) und Monoterpenprodukte (B) der Maisterpensynthesen TPS4-B73, TPS6-B73 und TPS7-B73.** Die Enzyme wurden in *E. coli* exprimiert, partiell gereinigt und mit den potentiellen Substraten FPP und GPP inkubiert. Die Trennung und Detektion der Terpenprodukte erfolgte mittels GC-MS und einer DB-WAX-Säule für Sesquiterpene oder einer CP-SIL-Säule für Monoterpene. Zur Identifizierung der einzelnen Substanzen wurden die Retentionszeiten und Massenspektren dieser Terpene mit denen von authentischen Standards verglichen. Das Sesquiterpen (9) ist ein bisher unbekanntes Terpen. Sesquiterpen (12) ist nur auf Grund des Massenspektrums als 1,6-Germacradien-5-ol identifiziert worden. In dieser Abbildung sind nur die Hauptprodukte und wichtigsten Nebenprodukte markiert und dargestellt.

Die Gesamtzymaktivität von TPS5-*B73* war im Vergleich zu TPS4-*B73*, TPS6-*B73* und TPS7-*B73* sehr gering (< 1%). Als Produkte wurden die Sesquiterpene  $\beta$ -Bisabolen und Sesquithujen gebildet (GC-MS-Chromatogramm nicht gezeigt). Für TPS9-*B73* war keinerlei Enzymaktivität *in vitro* feststellbar. Eventuell handelt es sich hierbei um ein inaktives Enzym. Die Tatsache, dass das Gen aus cDNA amplifiziert werden konnte zeigt aber, dass es zumindest transkribiert wird.

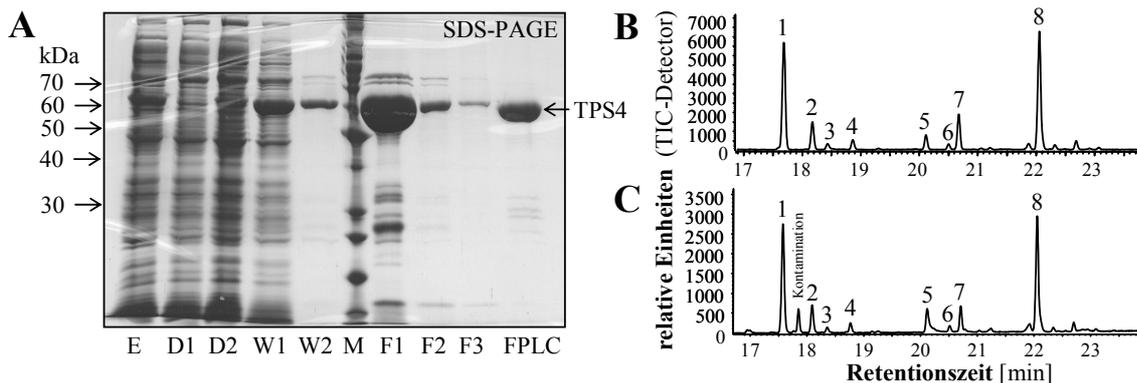
Die Massenspektren der beiden nicht mit Standards identifizierten Sesquiterpenhauptprodukte von TPS6-*B73* und TPS7-*B73* sind in Abbildung 3.8 dargestellt. Das von TPS6-*B73* produzierte Terpen war identisch zu dem in der Wurzel von *B73* gefundenen unbekanntem Sesquiterpen (siehe auch 3.1.2). Für das Massenspektrum dieser Substanz wurden keine entsprechenden Einträge in den zur Verfügung stehenden Massenspektrenbibliotheken gefunden. Die Verbindung ist daher vermutlich ein bisher unbekanntes Terpen. Der Massenpeak 222 im Massenspektrum und auch die relativ lange Retentionszeit des Sesquiterpenhauptprodukts von TPS7-*B73* deuten auf einen Alkohol hin. Tatsächlich ist das Spektrum sehr ähnlich dem Spektrum von 1,6-Germacradien-5-ol [JOULAIN & LAURENT, 1989]. Die Strukturformel dieses Terpens ist in Abb. 3.8.B gezeigt. Da allerdings kein entsprechender Standard zur Verfügung stand und es weitere ähnliche Spektren gibt (z.B. 1-endo-Bourbonanol [SURBURG & KÖPSEL, 1989]), ist die Identität dieser Substanz weiterhin unklar.



**Abb. 3.8** Massenspektrum des Sesquiterpenhauptprodukts von TPS6-*B73* (A) und TPS7-*B73* (B). In den zur Verfügung stehenden Massenspektrenbibliotheken wurden keine zu Spektrum A ähnlichen Einträge gefunden. Das Massenspektrum B ist sehr ähnlich dem Massenspektrum von 1,6-Germacradien-5-ol.

Um zu klären, ob die beobachtete Produktvielfalt allein auf die jeweilige Terpensynthese zurückzuführen ist oder ob eventuell *E. coli*-Enzyme im bakteriellen Rohextrakt das Produktspektrum beeinflussten, wurden Fusionsproteine mit N- oder C-terminaler His-Markierung (tag) zur vereinfachten Proteinreinigung hergestellt. Dazu wurden die Gene *tps4-B73* und *tps7-B73* als *EcoRI/NotI*- bzw. *NcoI/NotI*-Fragment in den Vektor pHIS8-3 (N-terminaler His-tag) inseriert und als *NcoI/BamHI*-Fragment in den Vektor pQE60 (C-terminaler His-tag) kloniert. Nach heterologer Expression in *E. coli* wurden die Proteine über Affinitätschromatographie aus dem bakteriellen Rohextrakt gereinigt und in Enzym-Substrat-Reaktionen funktionell charakterisiert. Im Falle von TPS7 gelang es trotz

mehrmaliger Versuche nicht, ein aktives Fusionsprotein mit C-terminalem His-tag zu erhalten. Alle anderen Fusionsproteine zeigten sowohl als ungereinigtes Protein im bakteriellen Rohextrakt als auch als gereinigtes Protein eine identische Enzymaktivität (Abb. 3.9). Dabei war es unerheblich, ob der His-Tag durch Thrombin-Behandlung während der Reinigungsprozedur abgespalten wurde oder nicht. Diese Experimente belegen, dass die beobachteten Terpenprodukte direkt von den Terpensynthasen gebildet und nicht durch bakterielle Enzyme im Rohextrakt beeinflusst wurden. Mit Ausnahme der C-terminalen TPS7-B73-His-Fusion hatte auch der His-Tag keinen Einfluss auf die Enzymaktivität.



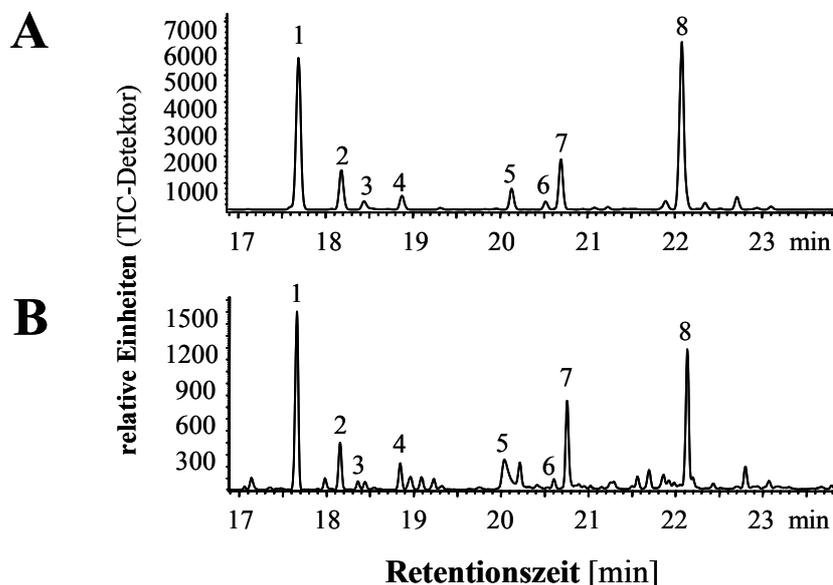
**Abb. 3.9 Vergleich der Produktspektren von gereinigten und ungereinigten TPS4-B73.** Das Gen *tps4-B73* wurde in den Vektor pHIS8-3 kloniert, als Fusionsprotein mit N-terminalem HIS-Tag in *E. coli* exprimiert und mittels Affinitätschromatographie und anschließender Gelfiltration gereinigt. Um einen eventuellen Einfluss des His-tags auf die Enzymaktivität auszuschließen, wurde dieser durch Thrombin-Behandlung vor dem Gelfiltrationsschritt abgetrennt. Das SDS-Gel **A** dokumentiert die einzelnen Reinigungsschritte: (E): bakterieller Rohextrakt, (D1) und (D2): Durchlauf 1 und 2 der Ni-NTA-Säule, (W1) und (W2): Waschschrte 1 und 2 der Ni-NTA-Säule, (M): Marker, (F1) bis (F3): Elutionsfraktionen 1 bis 3 der Gelfiltration über Superdex200-Säule. Im GC-MS-Chromatogramm **B** (DB-WAX) sind die TPS4-B73-Sesquiterpenprodukte eines mit FPP inkubierten bakteriellen Rohextraktes zu sehen. Chromatogramm **C** zeigt die Sesquiterpenprodukte des gereinigten Enzyms TPS4-B73. Die mit GC aufgetrennten Terpene sind entsprechend der Abbildung 3.7.A markiert.

### 3.3 Die Sesquiterpensynthase TPS4-B73

#### 3.3.1 Die Sesquiterpenprodukte von TPS4-B73 sind ein Hauptbestandteil der STKW adulter B73-Pflanzen

Ein Vergleich der Sesquiterpenkohlenwasserstoffe von B73 mit den Produktspektren der in dieser Arbeit identifizierten Terpensynthasen ergab, dass das Terpenmuster der Gruppe D adulter Pflanzen dem Sesquiterpenproduktspektrum von TPS4-B73 entsprach. Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass die Terpene der Gruppe D auch *in vivo* von TPS4-B73 gebildet werden. TPS4-B73 katalysierte zusätzlich zur Synthese der Gruppe D-Terpene die Bildung geringer Mengen (*E*)- $\alpha$ -Bergamoten und (*E*)- $\beta$ -Farnesen. Da diese aber die Hauptterpene der Gruppe A waren, konnte ihr Anteil am Terpenmuster von Gruppe D nicht erkannt werden. Die Terpensynthase TPS5-B73 bildete *in vitro* geringe Mengen der Sesquiterpene  $\beta$ -Bisabolon und Sesquithujen. Um zu testen, ob dieses Enzym an der Biosynthese der

Terpene von Gruppe D beteiligt ist, wurde die Sesquiterpenemission einer homozygoten Transposoninsertionsmutante von *TPS5-B73* analysiert. Da diese Mutante kein im Vergleich zum Wildtyp verändertes Sesquiterpenproduktspektrum aufwies (Christiane Schnee, pers. Mitteilung), ist anzunehmen, dass *TPS5-B73* keinen Anteil an der Bildung dieser Substanzen in adulten Pflanzen hat.



**Abb. 3.10 Vergleich der Sesquiterpenprodukte von *TPS4-B73* (A) mit den von adulten *B73*-Pflanzen emittierten Sesquiterpenen (B).** Das GC-MS-Chromatogramm A zeigt die *in vitro*-Sesquiterpenprodukte von *TPS4-B73*. Die mittels Duftsammlung von *B73*-Lieschblättern gewonnenen STKW sind im GC-MS-Chromatogramm B zu sehen. Die Bezeichnung der Peaks erfolgte wie bei Abbildung 3.7.A.

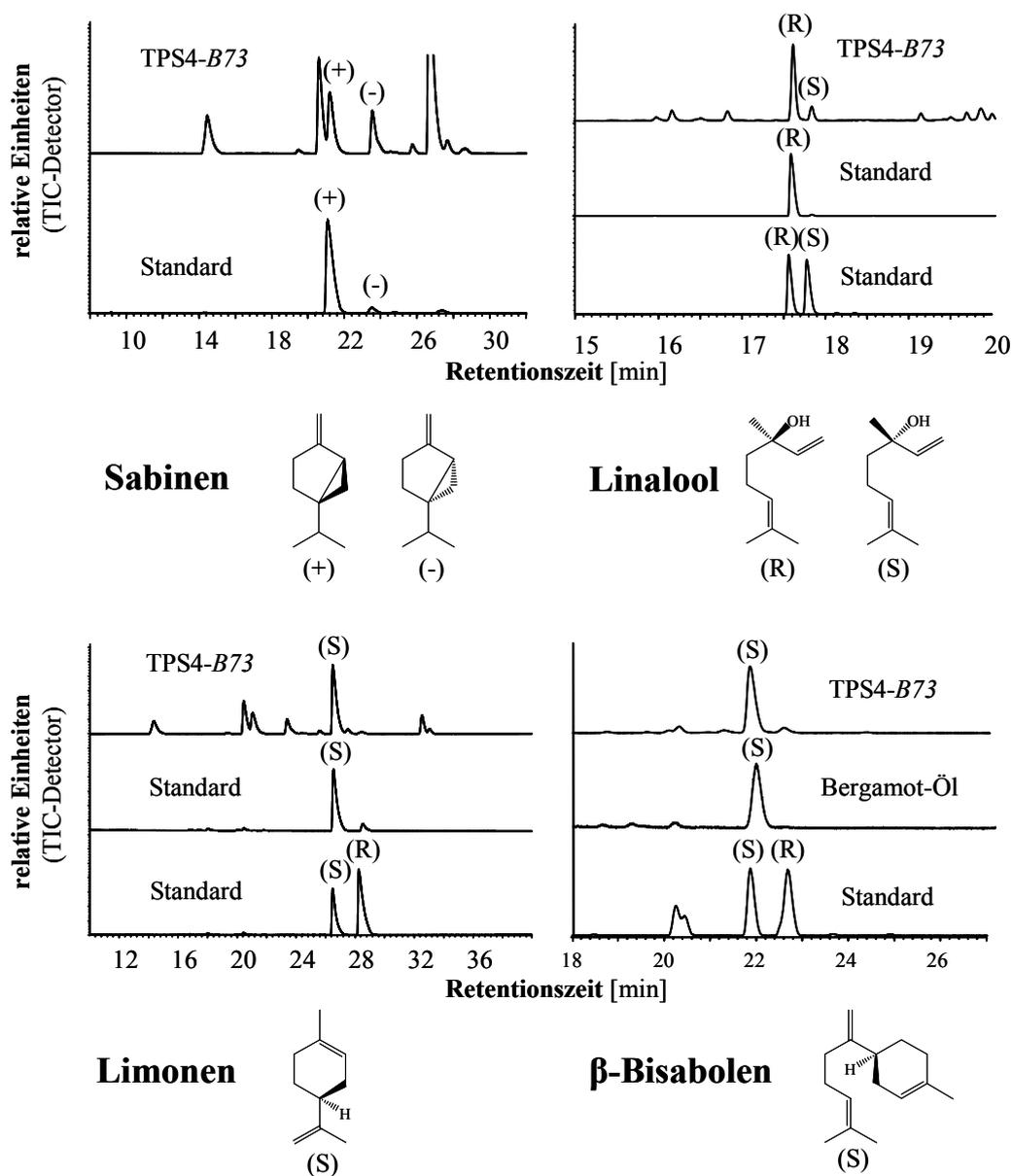
Die Monoterpenprodukte von *TPS4-B73* wurden mit Ausnahme von Limonen und Linalool nicht von Blättern oder Lieschblättern ausgewachsener Maispflanzen emittiert. Diese Tatsache sowie das offensichtliche Fehlen eines Signalpeptides lassen den Schluss zu, dass *TPS4-B73 in vivo* im Cytosol als Sesquiterpensynthase fungiert.

### 3.3.2 Stereochemische Analyse der Hauptprodukte

Betrachtet man die Strukturformeln der auf einer DB-WAX-Säule chromatographisch voneinander getrennten Sesquiterpenprodukte von *TPS4-B73*, so stellt man fest, dass zwei Stereoisomerenpaare gebildet wurden: die Diastereomere Sesquithujen und 7-*epi*-Sesquithujen sowie Sesquisabinen A und Sesquisabinen B (s. Abb. 3.6.A). Weiterhin findet man das Isomerenpaar (*E*)- und (*Z*)- $\alpha$ -Bergamoten. Auffällig ist, dass in jedem dieser Paare das Mengenverhältnis zugunsten eines der beiden Isomere verschoben ist, es also keine racemische Verteilung gibt. Die von *TPS4-B73* gebildeten Terpene  $\beta$ -Bisabolen, Limonen, Sabinen und Linalool sind ebenfalls chirale Substanzen. Die möglichen Enantiomerenpaare können aber, im Gegensatz zu Diastereomeren oder Isomeren, nicht auf herkömmlichen Chromatographiesäulen getrennt werden.

Aus früheren Arbeiten ist bekannt, dass die durch Terpensynthasen katalysierten Reaktionen von FPP zu komplexen Mono- und Sesquiterpenen über mehrere Carbokation-Zwischenstufen ablaufen [CANE, 1990]. Es war daher zu vermuten, dass die für *TPS4-*

B73 beobachteten Mengenverhältnisse innerhalb der einzelnen Diastereomerenpaare auf einem gemeinsamen, frühen Reaktionsschritt in der katalytischen Kaskade beruhen könnten, welcher zur Bildung zweier zueinander stereoisomerer Intermediate führt. In diesem Falle sollten aber auch die Enantiomerenpaare ähnliche Mengenverhältnisse aufweisen. Daher wurde versucht, Enantiomere mit chiraler GC zu trennen, um weitere Hinweise für diese These zu erhalten.



**Abb. 3.11 Stereochemische Analyse einiger Mono- und Sesquiterpenprodukte von TPS4-B73.** Das Protein wurde in *E. coli* exprimiert, partiell gereinigt und mit FPP und GPP inkubiert. Die Trennung und Detektion der Terpenprodukte erfolgte mittels GC-MS (Heptakis(6-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-2,3-di-*O*-methyl)-β-Cyclodextrin-Säule). Zur Identifizierung der einzelnen Substanzen wurden die Retentionszeiten und Massenspektren dieser Terpene mit denen von authentischen Standards verglichen.

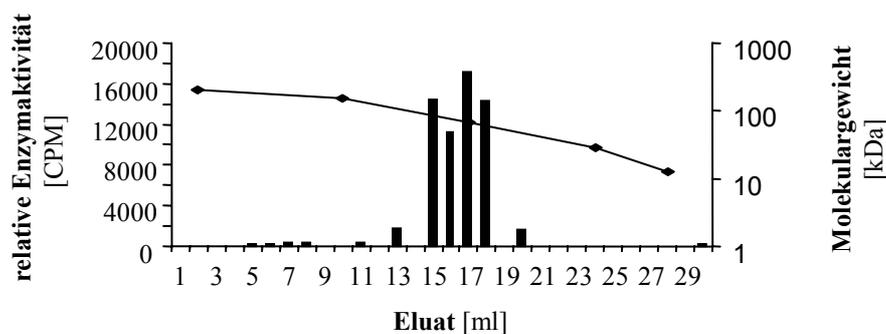
Abbildung 3.11 zeigt, dass entgegen den Erwartungen β-Bisabolen und Limonen stereospezifisch gebildet wurden. In beiden Fällen konnte nur das (S)-Enantiomer

gefunden werden. Sabinen wurde dagegen als Racemat produziert, und die beiden Linalool-Enantiomere traten etwa im Verhältnis 10:1 (R:S) auf.

Die Enantiomere der Nebenprodukte  $\beta$ -Curcumen und  $\gamma$ -Curcumen konnten mit der zur Verfügung stehenden chiralen Säule nicht bis zur Basislinie voneinander getrennt werden. Die ansatzweise Trennung (Daten nicht gezeigt) ließ aber erkennen, dass jeweils beide Formen in ähnlichen Mengenverhältnissen wie die Diastereomere Sesquithujen und 7-*epi*-Sesquithujen sowie Sesquisabinen A und Sesquisabinen B gebildet wurden (Tab. 3.1). Die Identifizierung der Enantiomere war nicht möglich, da in der Literatur keine Angaben zur Trennung zu finden waren und keine geeigneten Standards zur Verfügung standen.

### 3.3.3 Biochemische Charakterisierung

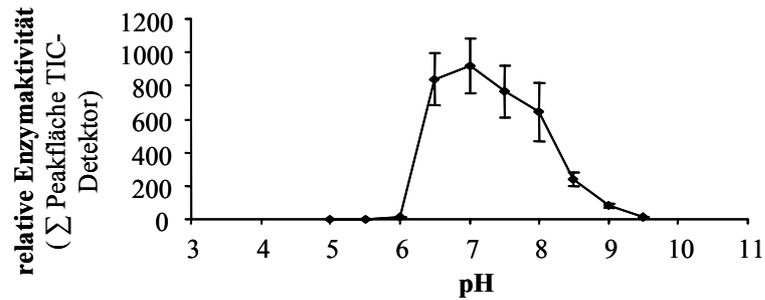
Über die biochemischen Eigenschaften von Terpensynthasen aus Monocotyledonen ist bisher erst wenig bekannt. Daher sollten die grundlegenden enzymatischen Merkmale der Maisterpensynthase TPS4-*B73* untersucht werden.



**Abb. 3.12 Bestimmung des Molekulargewichtes von TPS4-*B73*.** Das rekombinante Protein wurde mittels Gelfiltration (Superdex200-Säule) separiert. Die Balken repräsentieren die Terpensynthaseaktivitäten der Elutionsfraktionen und die Eichgerade gibt die Molekulargewichte der Proteine in den einzelnen Fraktionen an.

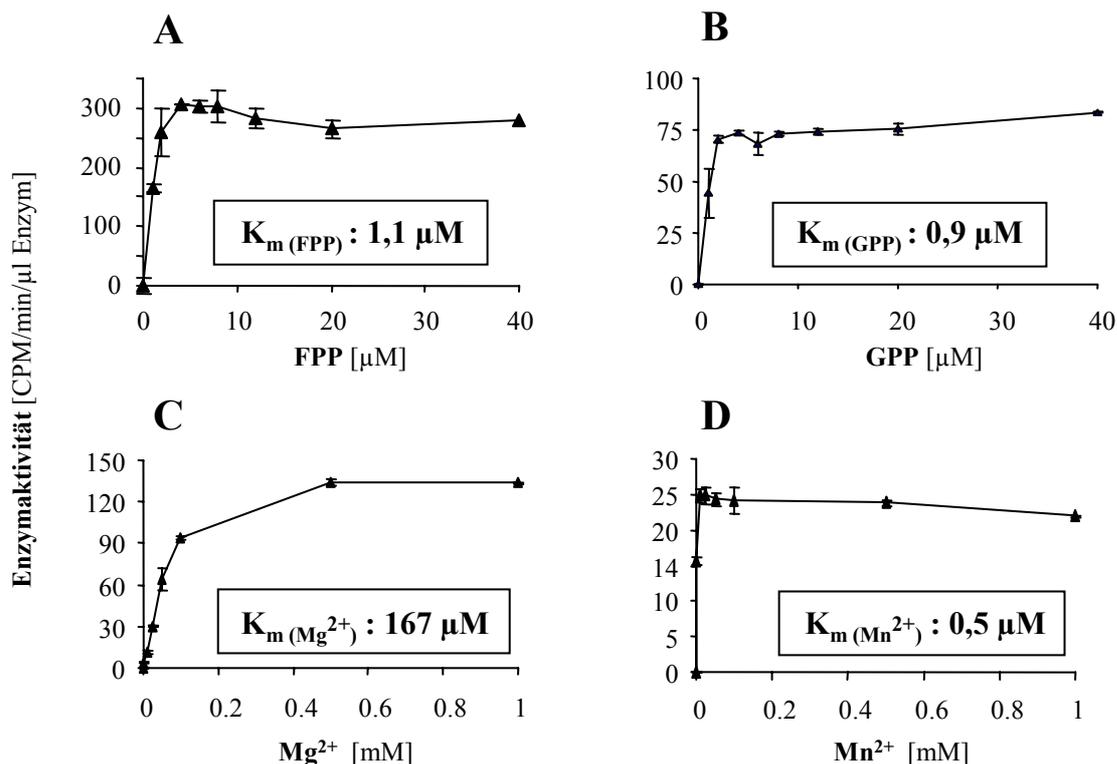
Für das heterolog exprimierte Protein TPS4 konnte über Gelfiltrationschromatographie ein Molekulargewicht von  $66 \pm 5$  kDa ermittelt werden (Abb. 3.12). Dies stimmte mit dem aus der Aminosäuresequenz berechneten Wert von 63,9 kDa überein. Somit war anzunehmen, dass das in *E. coli* exprimierte Protein nach der Translation nicht signifikant prozessiert oder modifiziert wurde. Im Gegensatz zur Maisterpensynthase TPS1, bei der die Bildung eines Homodimers beobachtet wurde [SCHNEE *et al.*, 2002], erfolgte im Falle von TPS4-*B73* offenbar keine Dimerisierung.

Das pH-Optimum von TPS4-*B73* lag im für Terpensynthasen typischen Bereich um pH 7.0 (Abb. 3.13). Die Halbmaxima befanden sich bei pH 6.3 und pH 8.2. Da es im gesamten getesteten pH-Bereich keine Veränderungen in der Terpenbildung gab, kann man davon ausgehen, dass die verschiedenen pH-Werte keinen Einfluss auf die Produktspezifität des Enzyms hatten.



**Abb. 3.13 pH-Abhängigkeit der Enzymaktivität.** Das in *E. coli* exprimierte und über Affinitätschromatographie gereinigte Protein wurde in verschiedenen Puffersystemen mit FPP inkubiert. Die Analyse der Reaktionsprodukte erfolgte mittels GC-MS (DB-WAX). Als Maß für die Enzymaktivität wurden die Peakflächen aller gebildeten Sesquiterpene miteinander addiert.

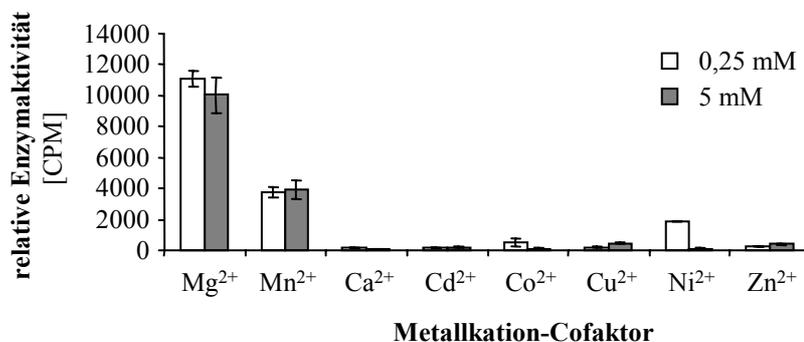
Die für FPP und GPP ermittelten  $K_m$ -Werte von 1,1 und 0,9 (Abb. 3.14.A und B) lagen im Bereich der  $K_m$ -Werte anderer Terpensynthasen pflanzlichen Ursprungs. Die Sesquiterpenaktivität im Substratsättigungsbereich war etwa vierfach höher als die Monoterpenaktivität. Dies ist ein weiterer Hinweis dafür, dass *TPS4-B73 in vivo* eine Sesquiterpensynthase ist.



**Abb. 3.14 Bestimmung der  $K_m$ -Werte für die Substrate FPP (A) und GPP (B) und die Cofaktoren Magnesium (C) und Mangan (D).** Nach Inkubation des heterolog exprimierten und partiell gereinigten Protein *TPS4-B73* mit den Tritium-markierten Substraten FPP und GPP wurden die Reaktionsprodukte mit Pentan aus der wässrigen Phase extrahiert und im Szintillationszähler quantifiziert. Die Kalkulation der  $K_m$ -Werte erfolgte über lineare Regression nach Lineweaver-Burk. Die Bestimmung der  $K_m$ -Werte für die Cofaktoren wurde bei einer FPP-Konzentration von 0,5 µM wie oben beschrieben durchgeführt.

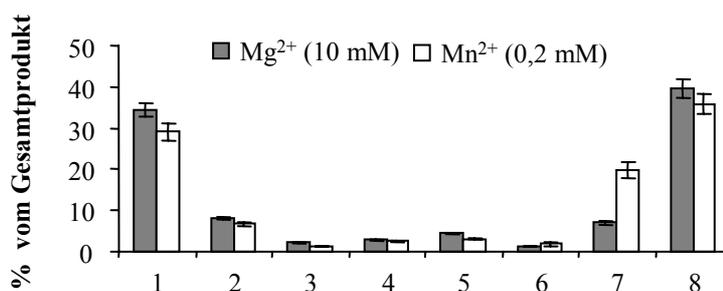
Da Terpensynthasen im allgemeinen ein divalentes Metallion als Cofaktor benötigen [BOHLMANN *et al.*, 1998A], wurden acht verschiedene potentielle Metall-Cofaktoren in

zwei verschiedenen Konzentrationen getestet (Abb. 3.15). Eine nennenswerte Enzymaktivität war nur in der Gegenwart von Magnesium und Mangan zu beobachten. Der für Magnesium bestimmte  $K_m$ -Wert war etwa 300fach größer als der entsprechende  $K_m$ -Wert für Mangan (Abb. 3.14 C und D). Die relative Enzymaktivität in Gegenwart von Magnesium war im Vergleich zu Mangan allerdings doppelt so hoch (Abb. 3.15).



**Abb. 3.15 Abhängigkeit der Enzymaktivität von verschiedenen Metall-Cofaktoren.** Das heterolog exprimierte und partiell gereinigte Protein TPS4-B73 wurde mit Tritium-markierten FPP und dem jeweiligen Cofaktor inkubiert. Die Bestimmung der relativen Enzymaktivität erfolgte durch Messung der Radioaktivität der mit Pentan aus der wässrigen Phase extrahierten Sesquiterpenprodukte.

Die Art des Metall-Cofaktors bestimmte nicht nur die Gesamtenzymaktivität (Abb. 3.15) sondern auch die Produktspezifität. In Abbildung 3.16 ist zu erkennen, dass in Gegenwart von Mangan das azyklische (*E*)- $\beta$ -Farnesen relativ zu den zyklischen Sesquiterpenprodukten in größerer Menge gebildet wurde.



**Abb. 3.16 Einfluss der Cofaktoren Magnesium und Mangan auf die Produktspezifität von TPS4-B73.** Das in *E. coli* exprimierte und partiell gereinigte Protein wurde mit FPP in Anwesenheit von Magnesiumchlorid oder Manganchlorid inkubiert. Die Extraktion und Analyse der Reaktionsprodukte erfolgte durch SPME und GC-FID. (1): 7-*epi*-Sesquithujen, (2): Sesquithujen, (3): (*Z*)- $\alpha$ -Bergamoten, (4): (*E*)- $\alpha$ -Bergamoten, (5): Sesquisabinen A, (6): Sesquisabinen B, (7): (*E*)- $\beta$ -Farnesen, (8):  $\beta$ -Bisabolen

### 3.4 Untersuchung der molekularen Grundlagen der Terpenbiosynthese und ihrer genetischen Variabilität am Beispiel von TPS4 und TPS5

#### 3.4.1 Klonierung und Charakterisierung der Gene *tps4* und *tps5* aus Delprim

Für Untersuchungen zum Einfluss abiotischer und biotischer Faktoren auf die Terpenemission in Mais wurde in den letzten Jahren hauptsächlich die Maishybridlinie Delprim verwendet. Es liegen daher detaillierte Ergebnisse zum Terpengehalt junger Sämlinge vor [GOUINGUENE *et al.*, 2001; GOUINGUENE & TURLINGS, 2002; GOUINGUENE *et al.*, 2003; SCHMELZ *et al.*, 2003]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals die Terpenemission adulter Delprim-Pflanzen analysiert. Ein Vergleich der STKW-Fractionen von Lieschblättern der Kultivare Delprim und B73 zeigte, dass zwar beide Varietäten identische Terpene freisetzen, es aber Unterschiede im Stereoisomerenverhältniss von 7-*epi*-Sesquithujen und Sesquithujen, Sesquisabinen A und Sesquisabinen B sowie (*E*)- $\alpha$ -Bergamoten und (*Z*)- $\alpha$ -Bergamoten gab. So waren in B73 7-*epi*-Sesquithujen, Sesquisabinen A und (*E*)- $\alpha$ -Bergamoten die Hauptkomponenten des jeweiligen Isomerenpaares, während in Delprim die Isomere Sesquithujen, Sesquisabinen B und (*Z*)- $\alpha$ -Bergamoten die Stereoisomerenpaare dominierten (Abb. 3.18).

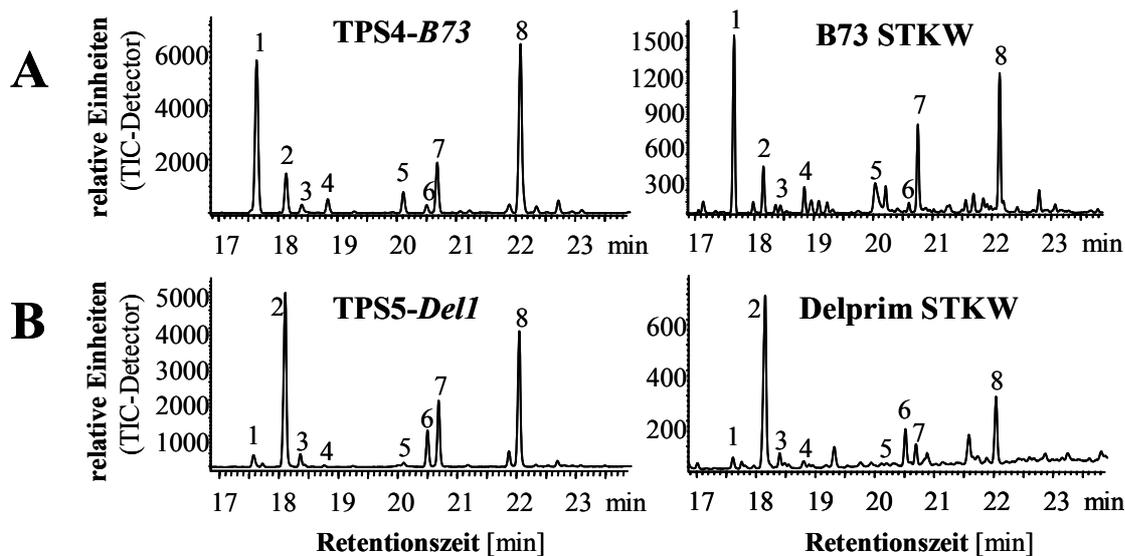
In B73 werden die Hauptkomponenten im Duftspektrum der Lieschblätter offensichtlich von TPS4-B73 gebildet (s. Kapitel 3.3.1). Das mit 98% Aminosäureidentität nahverwandte TPS5-B73 produzierte zwar auch einige der TPS4-Produkte, ist aber aufgrund der geringen katalytischen Aktivität vermutlich nicht an der Produktion der von B73 emittierten Terpene beteiligt. Da aber die zwei von TPS5-B73 gebildeten Terpene  $\beta$ -Bisabolen und Sesquithujen im Kultivar Delprim die Hauptkomponenten des Duftspektrums der Lieschblätter waren, wurde vermutet, dass in Delprim ein entsprechendes Allel TPS5-Del mit höherer Aktivität als TPS5-B73 für deren Bildung verantwortlich sein könnte.

Mittels der schon für die Klonierung von *tps4*-B73 verwendeten Oligonukleotide (s. Tab. 2.4) konnte aus einer cDNA-Bank von Lieschblättern der Varietät Delprim ein DNA-Fragment von etwa 1670 bp Länge isoliert werden. Dieses wurde nach *Bsp*MI-Verdau in den mit *Bsa*I linearisierten Vektor pASK-IBA7 inseriert. Die Sequenzierung mehrerer Klone ergab, dass insgesamt drei unterschiedliche offene Leserahmen mit sehr hoher Sequenzähnlichkeit zueinander amplifiziert wurden. In Abbildung 3.17 ist ein Vergleich der durch diese Leserahmen kodierten Aminosäuresequenzen dargestellt. Das auffälligste Unterscheidungsmerkmal der Proteine TPS4-B73 und TPS5-B73 war der Austausch von je vier Aminosäuren zwischen den Resten 407 und 411 in der C-terminalen Domäne. In TPS4-B73 fand sich hier das Motiv „TIATI“ während in TPS5-B73 das Motiv „SIGAN“ vorlag. Auf Grund dieser Motive wurden zwei der aus Delprim isolierten Sequenzen als allelische Variation dem Gen *tps5* (*tps5-Del1*, Accession-Nr.: AY518313; *tps5-Del2*, Accession Nr. AY518314) und eine dem Gen *tps4* (*tps4-Del*, Accession Nr. AY518312) zugeordnet. Eine Leserahmenmutation in *tps4-Del* bei Nukleotid 1321 führte zur Veränderung der Aminosäuresequenz und zur frühen Termination des Proteins an Position 461. Damit fehlte ein großer Teil der für die katalytische Aktivität wichtigen C-terminalen Domäne, so dass dieses Protein inaktiv war.

TPS4-B73	MASPPAHRSSKAADEELPKASSTFHPSLWGSFFLTYQPPTAPQRANMKERAEVLRRV	.RKVLKGSTTDQLPET	73
TPS5-B73	MASPPAHRSSKAADEELPKVSSSTFHPSLWGSFFLTYQPPTAPQRANMKERAEVLRRV	.RKVLKGSTTDQLPET	73
TPS4-Del1	MASPPAHRSSKAADEELPKASSTFHPSLWGSFFLTYQPPTAPQRANM <del>Q</del> ERAEVLRRV	.RKVLKGSTTDQLPET	73
TPS5-Del1	MASPPAHRSSKAADEELPKASSTFHPSLWGSFFLTYQPPTAPQRANMKERAEVLRRV	.RKVLKGSTTDQLPET	73
TPS5-Del2	MASPPAHRSSKAADEELPKASSTFHPSLWGSFFLTYQPPTAPQRANMKERAEVLRRV	.RKVLKGSTTDQLPET	73
TEAS	...MASAAVANYEE <del>E</del> IVRPVAD <del>F</del> SPSLWGDQ <del>F</del> LSFSIDNOVA.EKYAKEI <del>E</del> ALKE <del>E</del> QTRNMLLATGM...KLAD <del>T</del>		67
TPS4-B73	VNLIILTLQRLGLGYYYENEIDKLLHQIYSNSDYNV <del>K</del> DLNLVSQRFYLLRKNGYDVP <del>S</del> VDVFLSFKTEEGGFA	.CAA	147
TPS5-B73	VNLIILTLQRLGLGYYYENEIDKLLHQIYSNSDYNV <del>K</del> DLNLVSQRFYLLRKNGYDVP <del>S</del> VDVFLSFKTEEGGFA	.CAA	147
TPS4-Del1	VNLIILTLQRLGLGYYYENEIDKLLHQIYSNSDYNV <del>K</del> DLNLVSQRFYLLRKNGYDVP <del>S</del> VDVFLSFKTEEGGFA	.CAA	147
TPS5-Del1	VNLIILTLQRLGLGYYYENEIDKLLHQIYSNSDYNV <del>K</del> DLNLVSQRFYLLRKNGYDVP <del>S</del> VDVFL <del>N</del> FKTEEGGFA	.CAA	147
TPS5-Del2	VNLIILTLQRLGLGYYYENEIDKLLHQIYSNSDYNV <del>K</del> DLNLVSQRFYLLRKNGYDVP <del>S</del> VDVFLSFKTEEGGFA	.CAA	147
TEAS	LNLI <del>D</del> TL <del>E</del> RLG <del>I</del> SYHF <del>E</del> KEID <del>D</del> LDQ <del>I</del> Y <del>N</del> QNS.NCNDL <del>C</del> T <del>S</del> ALQ <del>F</del> RL <del>L</del> RQ <del>H</del> E <del>F</del> NI <del>S</del> PE <del>I</del> FSK <del>F</del> Q <del>D</del> EN <del>C</del> K <del>F</del> KESLA		141
*			
TPS4-B73	ADTRSLLSLYNAAYLRKHGEEVLDEA <del>I</del> SSTR <del>L</del> RLQD <del>L</del> LGRLLPES <del>P</del> FAKEVSSSLR <del>T</del> PLFRRV <del>G</del> I <del>L</del> EARNYIP	.I	221
TPS5-B73	ADTRSLLSLYNAAYLRKHGEEVLDEA <del>I</del> SSTR <del>L</del> RLQD <del>L</del> LGRLLPES <del>P</del> FAKEVSSSLR <del>T</del> PLFRRV <del>G</del> I <del>L</del> EARNYIP	.I	221
TPS4-Del1	ADTRSLLSLYNAAYLRKHGEEVLDEA <del>I</del> SSTR <del>L</del> RLQD <del>L</del> LGRLLPES <del>P</del> FAKEVSSSLR <del>T</del> PLFRRV <del>G</del> I <del>L</del> EARNYIP	.I	221
TPS5-Del1	ADTRSLLSLYNAAYLRKHGEEVLDEA <del>I</del> SSTR <del>L</del> RLQD <del>L</del> LGRLLPES <del>P</del> FAKEVSSSLR <del>T</del> PLFRRV <del>G</del> I <del>L</del> EARNYIP	.I	221
TPS5-Del2	ADTRSLLSLYNAAYLRKHGEEVLDEA <del>I</del> SSTR <del>L</del> RLQD <del>L</del> LGRLLPES <del>P</del> FAKEVSSSLR <del>T</del> PLFRRV <del>G</del> I <del>L</del> EARNYIP	.I	221
TEAS	SDV <del>L</del> GL <del>N</del> LNLY <del>E</del> ASHV <del>R</del> THADD <del>I</del> LED <del>A</del> LAFST <del>I</del> HL <del>E</del> SAAPH <del>L</del> .KSP <del>L</del> REQV <del>T</del> HAL <del>E</del> EQ <del>L</del> HKGV <del>P</del> RV <del>E</del> TR <del>F</del> FF <del>L</del> SSI		214
TPS4-B73	YE <del>T</del> EATRNEAVLELAKLNFNLQQLDFCEELKHCSAWWNEMIAKSKLTFV <del>R</del> DRIVEEYFWMNGAC <del>D</del> PPYSLRS <del>I</del> I		296
TPS5-B73	YE <del>T</del> EATRNEAVLELAKLNFNLQQLDFCEELKHCSAWWNEMIAKSKLTFV <del>R</del> DRIVEEYFWMNGAC <del>D</del> PPYSLRS <del>I</del> I		296
TPS4-Del1	YE <del>K</del> EATRNEAVLELAKLNFNLQQLDFCEELKHCSAWWNEMIAKSKLTFV <del>R</del> DRIVEEYFWMNGAC <del>D</del> PPYSLRS <del>I</del> I		296
TPS5-Del1	YE <del>K</del> EATRNEAVLELAKLNFNLQQLDFCEELKHCSAWWNEMIAKSKLTFV <del>R</del> DRIVEEYFWMNGAC <del>C</del> DPYSLRS <del>I</del> I		296
TPS5-Del2	YE <del>T</del> EATRNEAVLELAKLNFNLQQLDFCEELKHCSAWWNEMIAKSKLTFV <del>R</del> DRIVEEYFWMNGAC <del>D</del> PPYSLRS <del>I</del> I		296
TEAS	YD <del>K</del> E <del>Q</del> SK <del>N</del> NV <del>L</del> RF <del>A</del> K <del>L</del> DF <del>N</del> L <del>L</del> Q <del>M</del> LHKQ <del>E</del> L <del>A</del> QV <del>S</del> RW <del>W</del> KDLDFV <del>T</del> TL <del>P</del> Y <del>A</del> DR <del>V</del> VE <del>C</del> Y <del>F</del> W <del>A</del> LGV <del>Y</del> F <del>E</del> P <del>Q</del> YS <del>Q</del> AR <del>V</del> M		289
		! ! !	
DDxxD			
TPS4-B73	LT <del>K</del> ITGLITI <del>I</del> DDMF <del>D</del> THG <del>T</del> TEDCMKFAEAFGRWDESAIHL <del>L</del> PEYMKDFYI <del>L</del> MLET <del>F</del> QSFEDALGPE	.KSYRVLY	370
TPS5-B73	LT <del>K</del> ITGLITI <del>I</del> DDMF <del>D</del> THG <del>T</del> TEDCMKFAEAFGRWDESAIHL <del>L</del> PEYMKDFYI <del>L</del> MLET <del>F</del> QSFEDALGPE	.KSYRVLY	370
TPS4-Del1	LT <del>K</del> ITGLITI <del>I</del> DDMF <del>D</del> THG <del>T</del> TEDCMKFAEAFGRWDESAIHL <del>L</del> PEYMKDFYI <del>L</del> MLET <del>F</del> QSFEDALGPE	.KSYRVLY	370
TPS5-Del1	LT <del>K</del> ITGLITI <del>I</del> DDMF <del>D</del> THG <del>T</del> TEDCMKFAEAFGRWDESAIHL <del>L</del> PEYMKDFYI <del>L</del> MLET <del>F</del> QSFEDALGPE	.KSYRVLY	370
TPS5-Del2	LT <del>K</del> ITGLITI <del>I</del> DDMF <del>D</del> THG <del>T</del> TEDCMKFAEAFGRWDESAIHL <del>L</del> PEYMKDFYI <del>L</del> MLET <del>F</del> QSFEDALGPE	.KSYRVLY	370
TEAS	LV <del>K</del> TI <del>S</del> MI <del>S</del> I <del>V</del> DD <del>T</del> F <del>A</del> Y <del>G</del> T <del>V</del> KELEAY <del>T</del> DA <del>I</del> QR <del>W</del> D <del>I</del> NE <del>I</del> DR <del>L</del> ED <del>Y</del> M <del>K</del> LSY <del>K</del> AILDL <del>D</del> Y <del>K</del> DY <del>E</del> K <del>E</del> L <del>S</del> SAG <del>R</del> SH <del>I</del> V <del>C</del> H		364
		! ! !	
+++++			
TPS4-B73	LKQAMERLVELYSKEIKWRD <del>D</del> DYVPTMSEHLQVSAET <del>I</del> ATI <del>I</del> ALTCSAYAGMGDMSI <del>R</del> KETFEWALSFPQFIRTFG		445
TPS5-B73	LKQAMERLVELYSKEIKWRD <del>D</del> DYVPTMSEHLQVSAE <del>S</del> IGANALTCSAYAGMGDMSITKETFEWALSFPQFIRTFG		445
TPS4-Del1	LKQAMERLVELYSKEIKWRD <del>D</del> DYVPTMSEHLQVSAET <del>I</del> ATI <del>I</del> ALTCSAYAGMGDMSITKETFEWALSFPQFIRTFG		445
TPS5-Del1	LKQAMERLVELYSKEIKWRD <del>D</del> DYVPTMSEHLQVSAE <del>S</del> IGANALTCSAYAGMGDMSITKETFEWALSFPQFIRTFG		445
TPS5-Del2	LKQAMERLVELYSKEIKWRD <del>D</del> DYVPTMSEHLQVSAE <del>S</del> IGANALTCSAYAGMGDMSITKETFEWALSFPQFIRTFG		445
TEAS	AIER <del>M</del> KEV <del>V</del> R <del>N</del> V <del>N</del> VE <del>S</del> T <del>W</del> FIE <del>C</del> Y <del>T</del> PV <del>S</del> EV <del>L</del> SNALA <del>T</del> TTY <del>Y</del> L <del>A</del> TTS <del>V</del> LGM <del>K</del> SAT..EQDFEWLSKNPKILEASV		437
		! ! !	
*			
TPS4-B73	SFVRLSNDV <del>V</del> STKREQTKDHS <del>P</del> STVHCYMK <del>E</del> HGITMDDACEIKELIEDSWKDMLEQSLALKGLPKVVPQLVDFD		520
TPS5-B73	SFVRLSNDV <del>V</del> STKREQTKDHS <del>P</del> STVHCYMK <del>E</del> HGITMDDACEIKELIEDSWKDMLEQSLALKGLPKVVPQLVDFD		520
TPS4-Del1	WF <del>I</del> CTALQRCRIDQA		
TPS5-Del1	SFVRLSNDV <del>V</del> STKREQTKDHS <del>P</del> STVHCYMK <del>E</del> HGITMDDACEIKELIEDSWKDMLEQSLALKGLPKVVPQLVDFD		520
TPS5-Del2	SFVRLSNDV <del>V</del> STKREQTKDHS <del>P</del> STVHCYMK <del>E</del> HGITMDDACEIKELIEDSWKDMLEQSLALKGLPKVVPQLVDFD		520
TEAS	II <del>C</del> RV <del>L</del> DD <del>T</del> ATYEV <del>E</del> KSRGQIATGIE <del>C</del> Q <del>M</del> RDY <del>G</del> I <del>S</del> TKE <del>A</del> MA <del>K</del> FQ <del>N</del> MA <del>E</del> TAW <del>K</del> D <del>I</del> NE <del>G</del> L <del>I</del> RP <del>T</del> VPVST <del>E</del> FT <del>P</del> L <del>I</del> N <del>L</del>		512
		! ! !	
TPS4-B73	SRTTDNMY.RDRDALTSSE.ALKEMIQLLFVEPIPE		554
TPS5-B73	SRTTDNMY.RDRDALTSSE.ALKEMIQLLFVEPIPE		554
TPS4-Del1	SRTTDNMY.RDRDALTSSE.ALKEMIQLLFVEPIPE		
TPS5-Del1	SRTTDNMY.RDRDALTSSE.ALKEMIQLLFVEPIPE		554
TPS5-Del2	SRTTDNMY.RDRDALTSSE.ALKEMIQLLFVEPIPE		554
TEAS	AR <del>I</del> VEV <del>T</del> Y <del>I</del> HN <del>L</del> D <del>G</del> Y <del>T</del> HP <del>E</del> KV <del>L</del> KPH <del>I</del> IN <del>L</del> L <del>V</del> DS <del>I</del> KI		548
		! ! !	

Abb. 3.17 Vergleich der Aminosäuresequenzen von TPS4-B73, TPS5-B73, TPS4-Del1, TPS5-Del1 und TPS5-Del2. Die Abbildung zeigt ein Alignment der B73- und Delprim-Allele von TPS4 und TPS5 sowie der 5-*epi*-Aristolochensynthase (TEAS) aus *N. tabacum*. Schwarz hinterlegte Aminosäuren sind in mindestens drei der sechs Sequenzen identisch. Das hochkonservierte „DDxxD“-Motiv ist hervorgehoben. Die Leserahmenverschiebung in TPS4-Del1 ist durch einen schwarzen Kreis gekennzeichnet. Sternchen (\*) markieren die Aminosäuren, die für die Inaktivität von TPS5-B73 verantwortlich sind (s. 3.5.1.2). Das die Stereospezifität von TPS4 und TPS5 bestimmende „TIATI“- bzw. „SIGAN“-Motiv ist durch „+“-Zeichen hervorgehoben (s. 3.5.1.1). Mit „!“-Zeichen versehene Aminosäuren sind am Aufbau des aktiven Zentrums von TEAS beteiligt [STARKS *et al.*, 1997].

Die beiden Isoallele *TPS5-Del1* und *TPS5-Del2* besaßen auf Aminosäureebene 98,2 bzw. 99,5% Identität zu *TPS5-B73*. Zur funktionellen Charakterisierung wurden sie in *E. coli* exprimiert, partiell gereinigt und mit den Substraten FPP und GPP analysiert. Die von *TPS5-Del1* gebildeten Mono- und Sesquiterpene stimmten mit den Enzymprodukten von *TPS4-B73* (Tabelle 3.1) überein und zeigten die erwarteten Unterschiede in der Verteilung der Stereoisomere. So wurde im Gegensatz zu *TPS4-B73* als Hauptprodukt Sesquithujen gebildet. Die Hauptkomponenten der anderen Isomerenpaare waren Sesquisabinen B und (*Z*)- $\alpha$ -Bergamoten.



**Abb. 3.18 Die Sesquiterpenprodukte von TPS4 und TPS5 sind Bestandteil der von adulten B73- und Delprim-Pflanzen emittierten Sesquiterpenkohlenwasserstoffe.** (A): Vergleich der Enzymprodukte von *TPS4-B73* mit den von Lieschblättern der Inzuchtlinie B73 emittierten Sesquiterpenen: das heterolog exprimierte Protein wurde partiell gereinigt und mit FPP inkubiert. Die Extraktion und Analyse der Terpene erfolgte mittels SPME und GC-MS (DB-WAX, TIC). Die durch Duftsammlung gewonnenen Sesquiterpene von Lieschblättern adulter B73-Pflanzen wurden durch GC-MS (DB-WAX, TIC) separiert und identifiziert. (B): Vergleich der Enzymprodukte von *TPS5-Del1* mit den von Lieschblättern der Hybridlinie Delprim emittierten Sesquiterpenen. (1): 7-*epi*-Sesquithujen, (2): Sesquithujen, (3): (*Z*)- $\alpha$ -Bergamoten, (4): (*E*)- $\alpha$ -Bergamoten, (5): Sesquisabinen A, (6): Sesquisabinen B, (7): (*E*)- $\beta$ -Farnesen, (8):  $\beta$ -Bisabolene

Das in Abbildung 3.18.B dargestellte *in vitro*-Produktspektrum von *TPS5-Del1* enthält alle Hauptkomponenten des von Delprim emittierten Terpengemischs. *TPS5-Del1* scheint daher maßgeblich an der Biosynthese der von adulten Delprim-Pflanzen gebildeten Sesquiterpene beteiligt zu sein. Das zweite aus Delprim isolierte Allel *TPS5-Del2* unterschied sich in drei Aminosäuren von *TPS5-B73* und war wie dieses ebenfalls praktisch inaktiv. Die Produkte Sesquithujen und  $\beta$ -Bisabolene konnten lediglich in Spuren nachgewiesen werden.

In Tabelle 3.1 sind alle von *TPS4* und *TPS5* produzierten Sesquiterpenkohlenwasserstoffe mit ihren prozentualen Anteil am Gesamtprodukt aufgelistet und gegenübergestellt. Die stereochemische Analyse der von *TPS5* gebildeten Enantiomere erfolgte wie in Kapitel 3.3.2 für *TPS4* beschrieben. Deutlich zu erkennen ist, dass die Enantiomerenverhältnisse von  $\beta$ - und  $\gamma$ -Curcumen ebenso umgekehrt waren wie die Diastereomerenverhältnisse der

Sesquithujene und Sesquisabinene. Dagegen wurde  $\beta$ -Bisabolen auch von TPS5 ausschließlich als (S)-Enantiomer gebildet. Im Duftspektrum adulter B73- und Delprim-Pflanzen konnte ebenfalls nur das (S)-Enantiomer von  $\beta$ -Bisabolen gefunden werden (Daten nicht gezeigt).

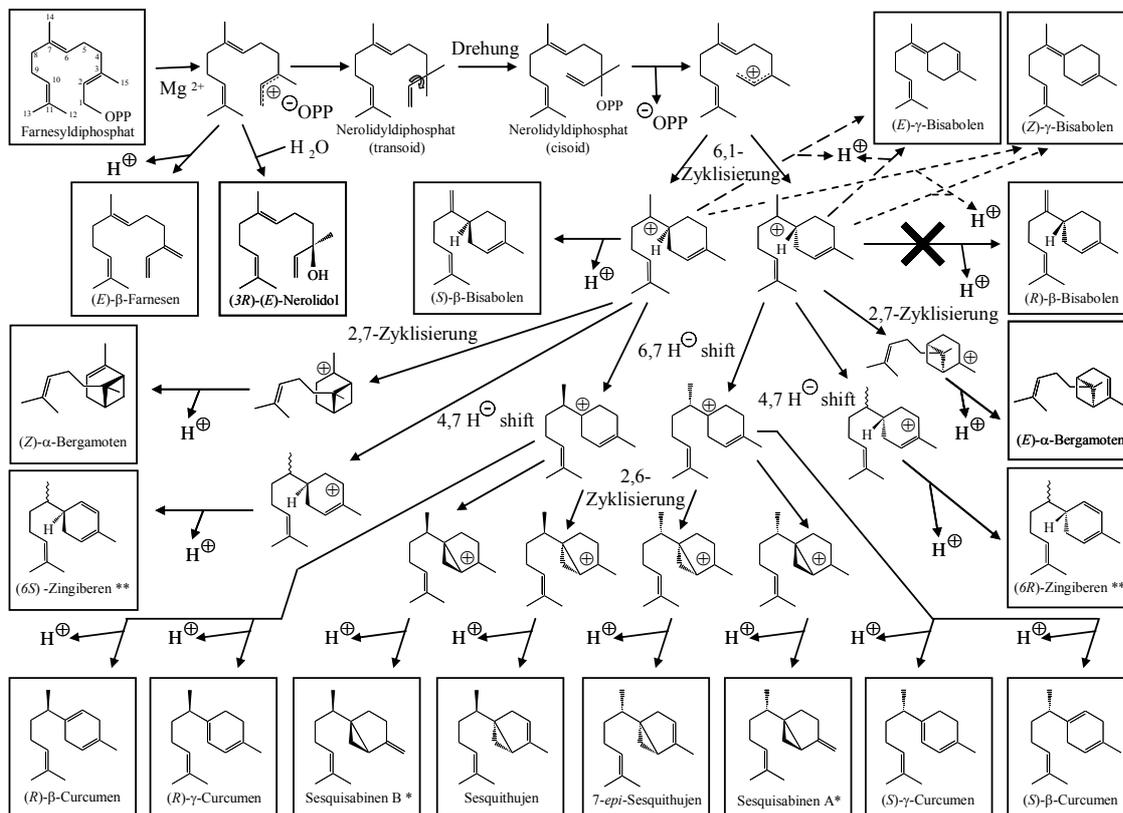
**Tab. 3.1 STKW-Produkte der Maisterpensynthesen TPS4-B73 und TPS5-Dell.** Die von TPS4-B73 und TPS5-Dell gebildeten STKW sind mit ihrem prozentualen Anteil am Gesamtprodukt aufgelistet. Mit (\*) markierte Substanzen wurden nur anhand der Massenspektren identifiziert. Die mit (#) gekennzeichneten  $\beta$ - und  $\gamma$ -Curcumene konnten zwar als Enantiomere ansatzweise getrennt, aber in ihrer absoluten Konfiguration nicht eindeutig bestimmt werden. Die jeweiligen Hauptprodukte der Terpensynthesen sind schwarz unterlegt dargestellt.

Sesquiterpen-Kohlenwasserstoff	TPS4-B73 [%]	TPS5-Dell [%]
S- $\beta$ -Bisabolen	<b>29,1</b>	<b>26,7</b>
7- <i>epi</i> -Sesquithujen	<b>24,4</b>	2,1
( <i>E</i> )- $\beta$ -Farnesen	9,3	13,3
$\beta$ -Curcumen #	5,7	0,7
Sesquithujen	5,6	<b>28,3</b>
$\gamma$ -Curcumen #	3,3	0,9
( <i>E</i> )- $\alpha$ -Bergamoten	2,6	0,6
$\alpha$ -Farnesen *	2,6	2,1
( <i>Z</i> )- $\gamma$ -Bisabolen	2,3	0
Sesquisabinen A	2,1	0,5
( <i>Z</i> )- $\alpha$ -Bisabolen *	2,1	1,4
( <i>E</i> )- $\gamma$ -Bisabolen	1,7	1,6
( <i>Z</i> )- $\alpha$ -Bergamoten	1,5	2,4
Zingiberen	1,2	1,5
$\beta$ -Sesquiphellandren	1,0	1,2
unbekannt 1	1,0	0,4
Sesquisabinen B	0,9	4,6
unbekannt 2	0,9	0,6
$\gamma$ -Curcumen #	0,8	3,7
unbekannt 3	0,7	0,4
$\beta$ -Curcumen #	0,6	5,9
unbekannt 4	0,4	0,5
unbekannt 5	0,3	0,5

Die absolute Konfiguration der von TPS4 und TPS5 gebildeten Substanzen (*E*)- $\alpha$ -Bergamoten und (*Z*)- $\alpha$ -Bergamoten konnte nicht zweifelsfrei bestimmt werden. In der Literatur sind zwar Angaben zur Trennung vorhanden [SARITAS *et al.*, 1998], die beschriebene chirale Säule stand jedoch nicht zur Verfügung. Auf der verwendeten Säule (Heptakis(6-*O*-tert-butyl-dimethylsilyl-2,3-di-*O*-methyl)- $\beta$ -Cyclodextrin) stimmten die Retentionszeiten dieser Terpenprodukte mit denen der (-)-Enantiomere aus dem Opoponaxöl überein. Aufgrund des Fehlens von racemischen Standards ist es aber nicht sicher, ob überhaupt eine Trennung unter diesen Bedingungen und auf dieser Säule erfolgte.

### 3.4.2 Ein hypothetischer Reaktionsmechanismus für TPS4 und TPS5

Die von Terpensynthasen katalysierten Reaktionen verlaufen im Allgemeinen über eine Serie hochreaktiver carbokationischer Intermediate [CANE, 1990; COLBY *et al.*, 1993; RISING *et al.*, 2000]. Die Reaktion wird durch Abspaltung eines Protons oder durch die Anlagerung einer nukleophilen Gruppe gestoppt und resultiert oft in der Bildung mehrerer Produkte.



**Abb. 3.19** Der hypothetische Reaktionsmechanismus von TPS4 und TPS5. Für die mit (\*) gekennzeichneten Verbindungen ist die absolute Konfiguration nicht bekannt. Die in diesem Schema vorgeschlagenen Konfigurationen ergeben sich aus dem Reaktionsmechanismus. Mit (\*\*) markierte Stereoisomere wurden nicht voneinander getrennt.

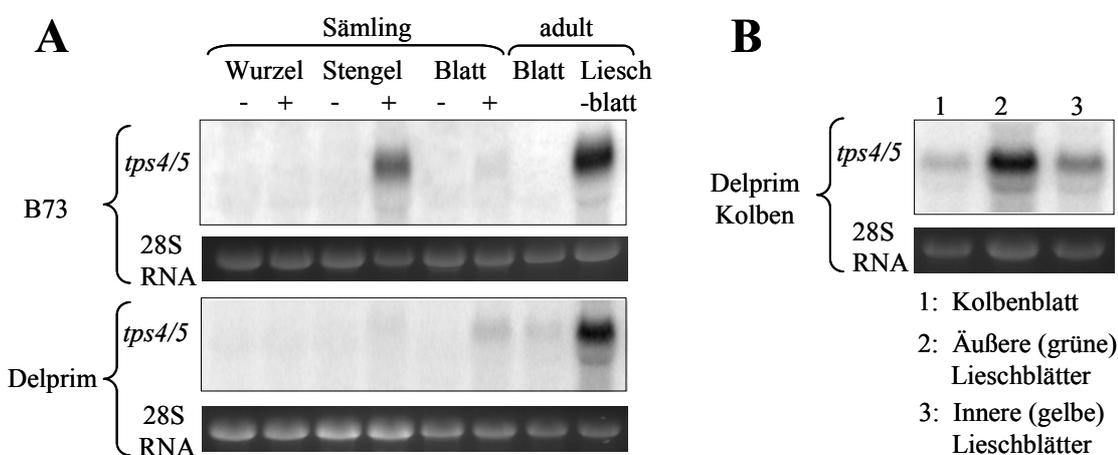
Um die unterschiedliche Stereospezifität von TPS4 und TPS5 besser verstehen zu können, wurde ein hypothetischer Reaktionsmechanismus für beide Enzyme aufgestellt (Abb. 3.19). Die azyclischen Produkte (*E*)- $\beta$ -Farnesen und Nerolidol werden direkt nach Abspaltung des Pyrophosphatrests des FPP durch Deprotonierung oder Wasseranlagerung gebildet. Der Hauptteil des (*E*)-Farnesylkations wird jedoch über die Bildung des (*E*)-Nerolidyldiphosphates und Isomerisierung zum (*Z*)-Nerolidyldiphosphat in die (*Z*)-Form umgewandelt. Die aus dem elektrophilen Angriff von C1 auf die Doppelbindung zwischen C6 und C7 resultierende 1,6-Zyklisierung führt zur Bildung der Bisabolylkation-Enantiomere. Durch Eliminierung eines Protons an C14 des (*S*)-Bisabolylkation entsteht (*S*)- $\beta$ -Bisabolen, eines der Hauptprodukte beider Enzyme. Die entsprechende Deprotonierung des (*R*)-Enantiomers ist offensichtlich nicht möglich, da weder im

Produktspektrum von TPS4 noch in dem von TPS5 (*R*)- $\beta$ -Bisabolon gefunden wurde (s. auch 3.4.1). Über eine 6,7-Hydridverschiebung, eine 2,6-Zyklisierung und anschließende Deprotonierung entsteht aus dem (*S*)-Bisabolylkation das TPS5-Hauptprodukt Sesquithujen. Ein analoger Mechanismus, ausgehend vom (*R*)-Bisabolylkation, führt zur Bildung von 7-*epi*-Sesquithujen. Alle anderen Produkte werden über verschiedene Hydridverschiebungen, Umlagerungen und Zyklisierungen ebenfalls aus den beiden Bisabolylintermediaten gebildet.

Die absolute Konfiguration von Sesquisabinen A und Sesquisabinen B ist nicht bekannt. Der vorgeschlagene Reaktionsmechanismus und die von beiden Enzymen gebildeten Mengenverhältnisse dieser Verbindungen im Vergleich zu Sesquithujen und 7-*epi*-Sesquithujen (Tab. 3.1) deuten aber darauf hin, dass Sesquisabinen A das (7*S*)- und Sesquisabinen B das (7*R*)-Isomer ist.

### 3.4.3 Transkriptanalyse von *tps4/5* in verschiedenen Maisgeweben

Die in dieser Arbeit beschriebenen Allele von *tps4* und *tps5* wurden aus cDNA-Banken isoliert. Dies bedeutet, dass alle Allele, auch die, welche inaktive Proteine kodieren, transkribiert werden. Um mehr über die Regulation der Expression von *tps4* und *tps5* zu erfahren, wurde die Transkriptakkumulation in verschiedenen Geweben vor und nach Herbivorinduktion gemessen.



**Abb. 3.20** Transkriptanalyse von *tps4* und *tps5* in den Kultivaren B73 und Delprim. (A): Transkriptkonzentration von *tps4* und *tps5* in verschiedenen Organen und Entwicklungsstadien von unverletzten (-) bzw. herbivor-induzierten (+) Mais. Die RNA wurde aus vierzehn Tage alten Sämlingen der Kultivare B73 und Delprim bzw. aus adulten Pflanzen isoliert, auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer radioaktiv markierten Sonde, die sowohl an *tps4* als auch an *tps5* bindet, hybridisiert. Die oberen Teile der Abbildung zeigen jeweils die Autoradiogramme, in den unteren Teilen ist die mit Ethidiumbromid gefärbte 28s RNA im Agarosegel als Ladekontrolle gezeigt. (B): Transkriptkonzentration von *tps4* und *tps5* in den äußeren (grünen) und inneren (gelben) Lieschblättern sowie in den Kolbenblättern eines Maiskolbens der Hybridlinie Delprim.

In RNA-Hybridisierungsexperimenten mit einer Sonde, die sowohl mit *tps4* als auch mit *tps5* hybridisierte, wurde in beiden Maislinien eine erhöhte Transkriptakkumulation in

Lieschblättern festgestellt (Abb. 3.20.A). Dies korreliert sehr gut mit der hohen Emission der durch TPS4-B73 gebildeten Terpene in Lieschblättern des Kultivars B73. Eine detaillierte Analyse der verschiedenen Lieschblätter der Hybridlinie Delprim ergab, dass in den äußeren, grünen Lieschblättern eine höhere Transkriptkonzentration vorlag als in den inneren, gelben Lieschblättern (Abb. 3.20.B). Die als Verlängerung der Lieschblätter gebildeten Kolbenblätter haben die gleiche Morphologie wie Maisblätter adulter Pflanzen. Die Transkriptkonzentration in diesem Gewebe war sehr gering und entsprach in etwa der Konzentration, die im Gewebe normaler Blätter gemessen wurde. In jungen Pflanzen konnten *tps4/tps5*-Transkripte, mit Ausnahme des Stengels induzierter B73-Sämlinge, nur in geringer Konzentration im induzierten Blattgewebe nachgewiesen werden. Da in den Blättern und der Sprossachse von jungen induzierten B73-Pflanzen keine dem Produktspektrum von TPS4/5 entsprechenden Terpenprofile gefunden wurden, muss angenommen werden, dass hier die Genexpression in einem späteren Schritt blockiert war oder dass das inaktive TPS5-B73 exprimiert wurde.

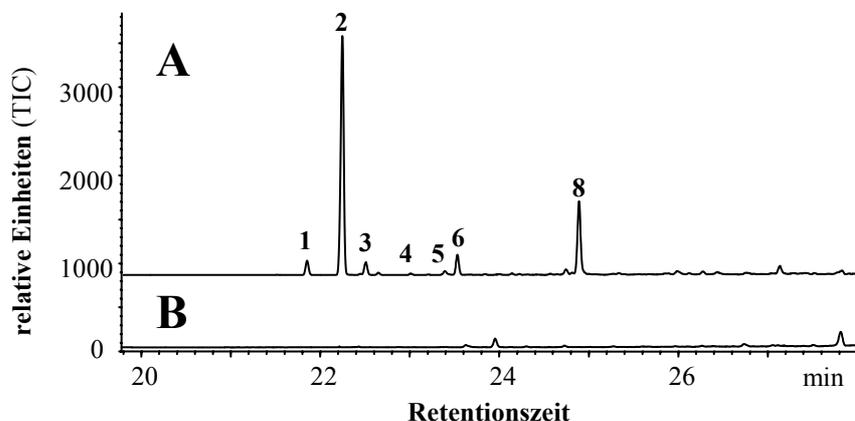
#### 3.4.4 Expression der Terpensynthasen TPS4 und TPS5 in *Arabidopsis thaliana*

Die von TPS4 und TPS5 *in vitro* gebildeten Sesquiterpene waren mit den Hauptkomponenten des Sesquiterpenspektrums von Lieschblättern der Kultivare B73 und Delprim identisch (Abb. 3.18). Weiterhin zeigte die Transkriptanalyse von *tps4* und *tps5* in verschiedenen Maisorganen, dass die Gene spezifisch in den Lieschblättern transkribiert wurden (Abb. 3.20). Deshalb ist anzunehmen, dass TPS4 und TPS5 für die Biosynthese der entsprechenden Terpene in den Lieschblättern von B73 bzw. Delprim verantwortlich sind. Ein direkter Beweis für diese Annahme wäre eine phänotypische Veränderung im Sesquiterpenspektrum nach dem Ausschalten beider Gene durch z.B. Transposoninsertion. Leider erbrachte aber der Versuch der Identifizierung einer Insertionsmutante in einer Transposoninsertionsbibliothek in B73 durch PCR-Methoden nur eine Mutante mit unterbrochenen *tps5-B73*-Leserahmen (Christiane Schnee, pers. Mitteilung). Da die durch dieses Gen kodierte Terpensynthase praktisch keine *in vitro*-Aktivität besaß (Kapitel 3.2.2), konnten keine phänotypischen Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante festgestellt werden. Um dennoch die Funktionalität der Terpensynthasen TPS4 und TPS5 *in vivo* testen zu können, wurde versucht, beide Gene in *Arabidopsis* zu exprimieren. Eine homologe Expression in Mais war aufgrund des Zeitaufwandes für die stabile Transformation dieser Spezies nicht möglich.

Die Gene *tps4-B73* und *tps5-Dell* wurden als *Bam*HI/*Sst*I-Fragmente in den Vektor pBIN420 eingefügt und über Agrobakterien-vermittelte Transformation in das Genom von *Arabidopsis thaliana* Ökotyp Columbia (Col-0) inseriert. Transformierte Pflanzen wurden unter Langtagbedingungen kultiviert und im Rosettenstadium durch Duftsammlung phänotypisch untersucht. In diesem Entwicklungsstadium produziert *Arabidopsis* praktisch keine eigenen Sesquiterpene [CHEN *et al.*, 2003].

Für TPS4-B73 wurden keine Transformanten mit ausgebildetem Phänotyp gefunden. Dagegen konnten eine Vielzahl von TPS5-Dell-Transformanten identifiziert werden, die die Sesquiterpenprodukte dieses Enzyms bildeten. In Abbildung 3.21 ist das

Sesquiterpenprofil einer mit *tps5-Dell* transformierten *Arabidopsis*-Pflanze im Vergleich zum Wildtyp dargestellt. Die emittierten Terpene waren identisch mit den *in vitro*-Enzymprodukten von TPS5. Allerdings fiel auf, dass, im von der Pflanze abgegeben Spektrum, kein (*E*)- $\beta$ -Farnesen vorhanden war.



**Abb. 3.21** Sesquiterpenspektrum einer mit *tps5-Dell* transformierten *Arabidopsis thaliana*-Pflanze. Pflanzen von *A. thaliana* Ökotyp Columbia (Col-0) wurden mittels *Agrobacterium tumefaciens* mit *tps5-Dell* transformiert. Die phänotypische Charakterisierung erfolgte durch Duftsammlung („closed loop collection“-Methode). Die emittierten Sesquiterpene wurden mit GC-MS analysiert (GC-Säule: DB5-MS). Dargestellt sind die GC-Chromatogramme der Duftspektren von Transformante (A) und Wildtyp (B). (1): 7-*epi*-Sesquithujen, (2): Sesquithujen, (3): (*Z*)- $\alpha$ -Bergamoten, (4): (*E*)- $\alpha$ -Bergamoten, (5): Sesquisabinen A, (6): Sesquisabinen B, (8):  $\beta$ -Bisabolen.

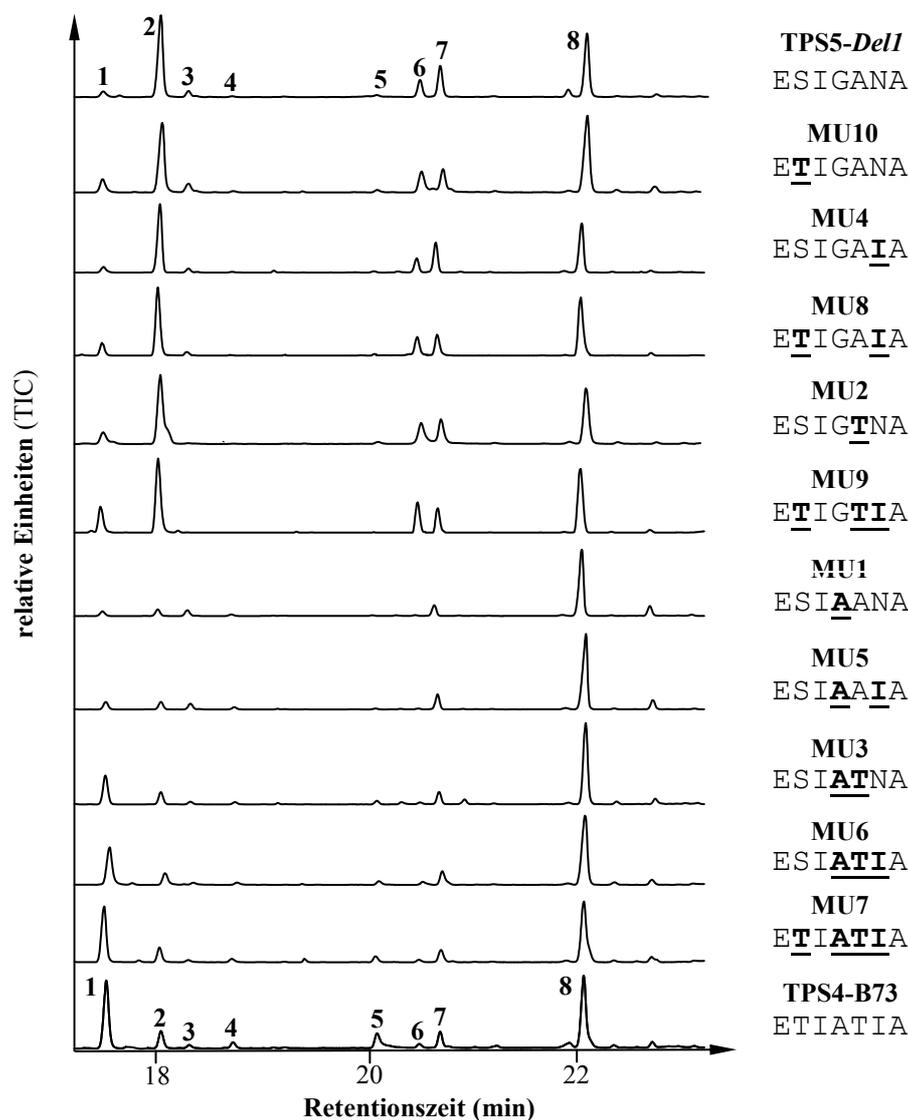
### 3.5 Struktur-Funktionsanalysen in Maisterpensynthesen

#### 3.5.1 Untersuchungen an TPS4 und TPS5

##### 3.5.1.1 Vier Aminosäuren im aktiven Zentrum bestimmen die Stereoselektivität von TPS4 und TPS5

Die Maisterpensynthesen TPS4-*B73* und TPS5-*Dell* sind auf Aminosäureebene zu 98% identisch. Trotz dieser großen Ähnlichkeit besitzen sie eine unterschiedliche Stereoselektivität, d.h. sie bilden gegensätzliche Enantiomere, Diastereomere und Isomere. Um die strukturellen Grundlagen dieses Effekts verstehen zu können, war es nötig, die Aminosäuren zu identifizieren, die die Stereoselektivität der Enzyme bestimmen. Dazu wurden die dreidimensionalen Strukturen von TPS4 und TPS5 am Computer modelliert und analysiert. Aufgrund der großen strukturellen Ähnlichkeiten aller bisher aufgeklärten 3D-Strukturen von Terpensynthesen [PANDIT *et al.*, 2000; RYNKIEWICZ *et al.*, 2001] ist es möglich, als Matrize für die Modellierung auch Proteine mit relativ geringer Sequenzähnlichkeit einzusetzen. Die 5-*epi*-Aristolochensynthase aus *N. tabacum* [FACCHINI & CHAPPEL, 1992] ist auf Aminosäureebene zu etwa 37% identisch mit TPS4/5. Der Sequenzvergleich in Abb. 3.4 zeigt, dass keine größeren Lücken in der Sequenz vorhanden sind. Daher wurde die Struktur dieses Enzyms [STARKS *et al.*, 1997] als Modellierungsvorlage benutzt.

In den berechneten Strukturmodellen sieht man, dass die Aminosäuren 407 bis 411, die in TPS5 das „SIGAN“-Motiv und in TPS4 das „TIATI“-Motiv bilden, am Aufbau des Bodens einer Tasche in der C-terminalen Domäne beteiligt sind (Abb. 3.25). Diese Tasche entspricht dem aktiven Zentrum in der dem Modell zugrundeliegenden Struktur der 5-*epi*-Aristolochensynthase. Somit war es wahrscheinlich, dass die Tasche das aktive Zentrum von TPS4 und TPS5 darstellt und dass die am Aufbau dieser Tasche beteiligten Aminosäuren prinzipiell die katalytische Aktivität und die Stereoselektivität beeinflussen könnten. Durch *in vitro*-Mutagenese wurden daher vier Aminosäuren des „SIGAN“-Motivs von TPS5-*Dell* in die des „TIATI“-Motivs umgewandelt. Die Messung der Enzymaktivität der Mutanten erfolgte nach heterologer Expression in *E. coli*.



**Abb. 3.22 Die Stereospezifität von TPS4 und TPS5 wird durch vier Aminosäuren bestimmt.** Die Aminosäuren 407, 409, 410 und 411 des „SIGAN“-Motivs von TPS5-*Dell* wurden mittels *in vitro*-Mutagenese in die entsprechenden Aminosäuren des „TIATI“-Motivs umgewandelt. Die mutierten Enzyme wurden in *E. coli* exprimiert, partiell gereinigt und mit FPP inkubiert. Die Analyse der Reaktionsprodukte erfolgte über SPME und GC-MS (DB-WAX). (1): 7-*epi*-Sesquithujen, (2): Sesquithujen, (3): (*Z*)- $\alpha$ -Bergamoten, (4): (*E*)- $\alpha$ -Bergamoten, (5): Sesquisabinen A, (6): Sesquisabinen B, (7): (*E*)- $\beta$ -Farnesen, (8):  $\beta$ -Bisabololen.

Der Austausch der Aminosäuren 407, 410 und 411 einzeln oder in Gruppen beeinflusste nicht die Enzymaktivität. Der Wechsel von Glycin 409 zu Alanin führte dagegen zu einem Protein, welches hauptsächlich (S)- $\beta$ -Bisabolen und nur noch kleinste Mengen der anderen ursprünglichen Produkte bildete (Abb. 3.22). Der gemeinsame Austausch aller vier Aminosäuren des „SIGAN“-Motives resultierte schließlich in einer zu TPS4 identischen Enzymaktivität. Diese Ergebnisse demonstrieren, dass die vier Aminosäuren des „SIGAN“- bzw. „TIATI“-Motivs die Stereoselektivität der Proteine TPS4 und TPS5 bestimmen.

Bemerkenswert ist, dass alleine der Austausch von Glycin zu Alanin an Position 409, d.h. das Einfügen einer Methylgruppe, das Produktspektrum von TPS5 drastisch veränderte. Es war daher interessant zu untersuchen, ob bzw. wie sich eine weitere Vergrößerung der Seitenkette dieser Aminosäure auf das Produktspektrum auswirkt. Dazu wurden durch *in vitro*-Mutagenese an Position 409 die Aminosäuren Valin, Leucin und Phenylalanin eingebaut. Die entsprechenden Mutanten besaßen keine Enzymaktivität (Daten nicht gezeigt). Das bedeutet, dass offenbar eine weitere Vergrößerung der Seitenkette an Position 409 zu einer kompletten Inaktivierung des Proteins führt.

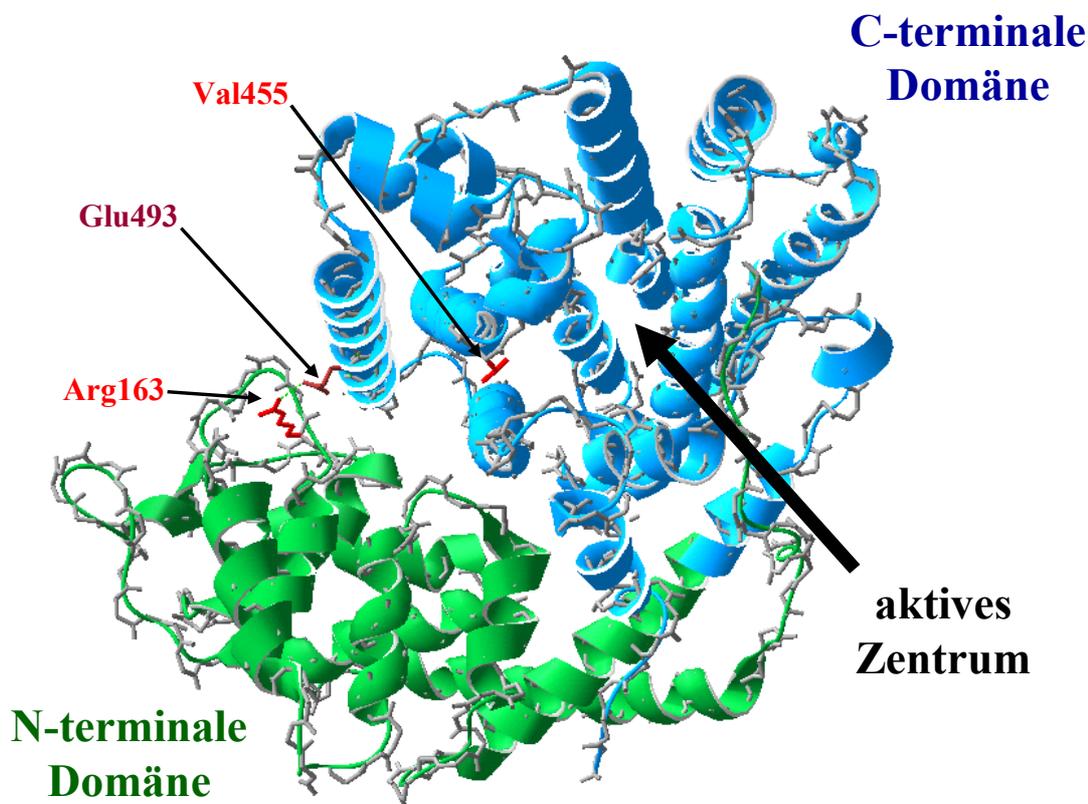
### 3.5.1.2 Zwei Aminosäuren sind für die Inaktivität von TPS5-B73 verantwortlich

Ein Sequenzvergleich der Proteine TPS4-B73, TPS5-B73, TPS5-Dell und TPS5-Del2 zeigte, dass der Unterschied zwischen aktiven und praktisch inaktiven Proteinen auf nur sieben Aminosäuren beruht. Um zu untersuchen, welche dieser sieben Aminosäuren für die unterschiedlichen Enzymaktivitäten verantwortlich waren, wurde eine Mutationsanalyse durchgeführt. Dazu wurden die entsprechenden Aminosäuren des inaktiven Proteins TPS5-B73 jeweils einzeln und in verschiedenen Kombinationen in die entsprechenden Aminosäuren des aktiven Proteins TPS5-Dell umgewandelt. Die Messung der Enzymaktivität der Mutanten erfolgte nach heterologer Expression in *E. coli*.

Die Mutationen V20A, T383S, E391Q, K402Q und I479T hatten sowohl einzeln als auch in verschiedenen Kombinationen keinen Einfluss auf die Enzymaktivität (Daten nicht gezeigt). Alle untersuchten Konstrukte waren wie der Wildtyp praktisch inaktiv. Erstaunlicherweise ergab der Austausch des nicht in der C-terminalen, katalytischen Domäne gelegenen Tryptophan 163 zu Arginin ein funktionell aktives Protein (Abb. 3.23). Im Produktspektrum dieser Mutante fiel auf, dass die Konzentration von (*E*)- $\beta$ -Farnesen relativ zu Sesquithujen und  $\beta$ -Bisabolen erhöht war (Abb. 3.23 Kasten A). Die Mutation von Glutaminsäure 455 zu Valin resultierte in einer im Vergleich zu TPS5-B73 schwach erhöhten Enzymaktivität. Das Terpenprofil dieser Mutante war identisch mit dem des aktiven Allels TPS5-Dell (Abb. 3.23 Kasten B). Die Doppelmutante TPS5-B73 (W163R, E455V) zeigte schließlich das für TPS5-Dell charakteristische Produktspektrum mit vergleichbarer Enzymaktivität. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass beide Aminosäuren, Tryptophan 163 und Glutaminsäure 455, für den Verlust der katalytischen Aktivität von TPS5-B73 verantwortlich sind.



keine Rolle bei der Dimerisierung. Möglicherweise wird in TPS5-B73 die Wechselwirkung beider Domänen durch die große Tryptophanseitenkette an Position 163 lediglich sterisch behindert.

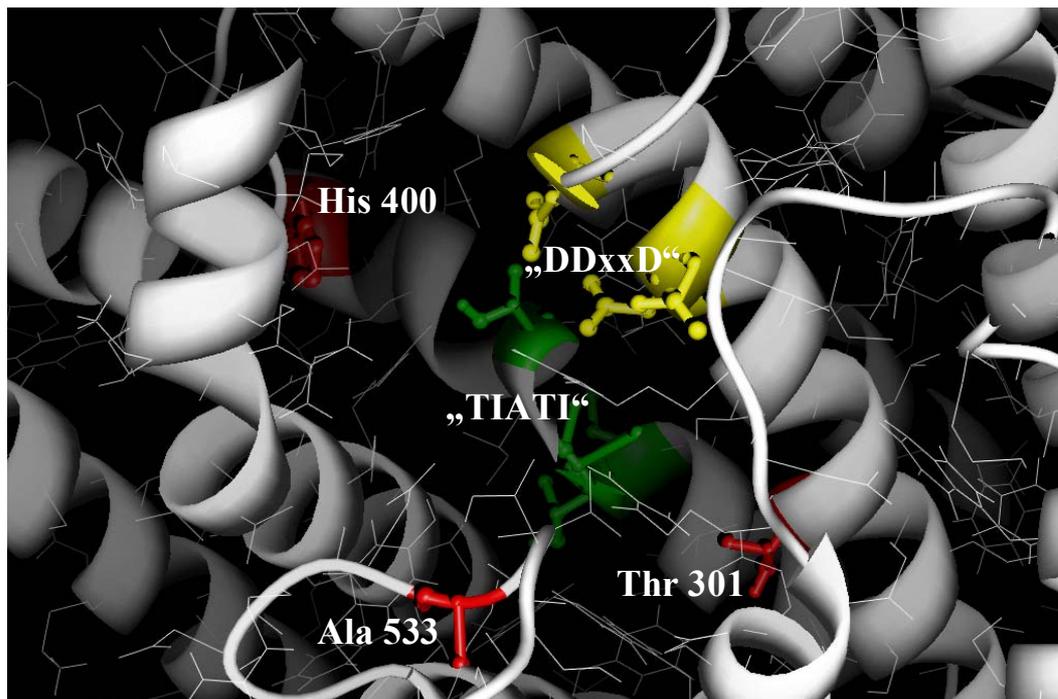


**Abb. 3.24** Dreidimensionales Strukturmodell der Terpensynthase TPS5-Dell. Die N-terminale Domäne ist in grün und die C-terminale Domäne in blau dargestellt. Die Aminosäuren Arginin 163, Valin 455 und Glutaminsäure 493 sind gekennzeichnet. Das Modell wurde auf Grundlage der 3D-Struktur der 5-*epi*-Aristolochensynthase aus Tabak [STARKS *et al.*, 1997] mit dem Programm „Modeler“ erstellt.

### 3.5.1.3 Das aktive Zentrum von TPS4

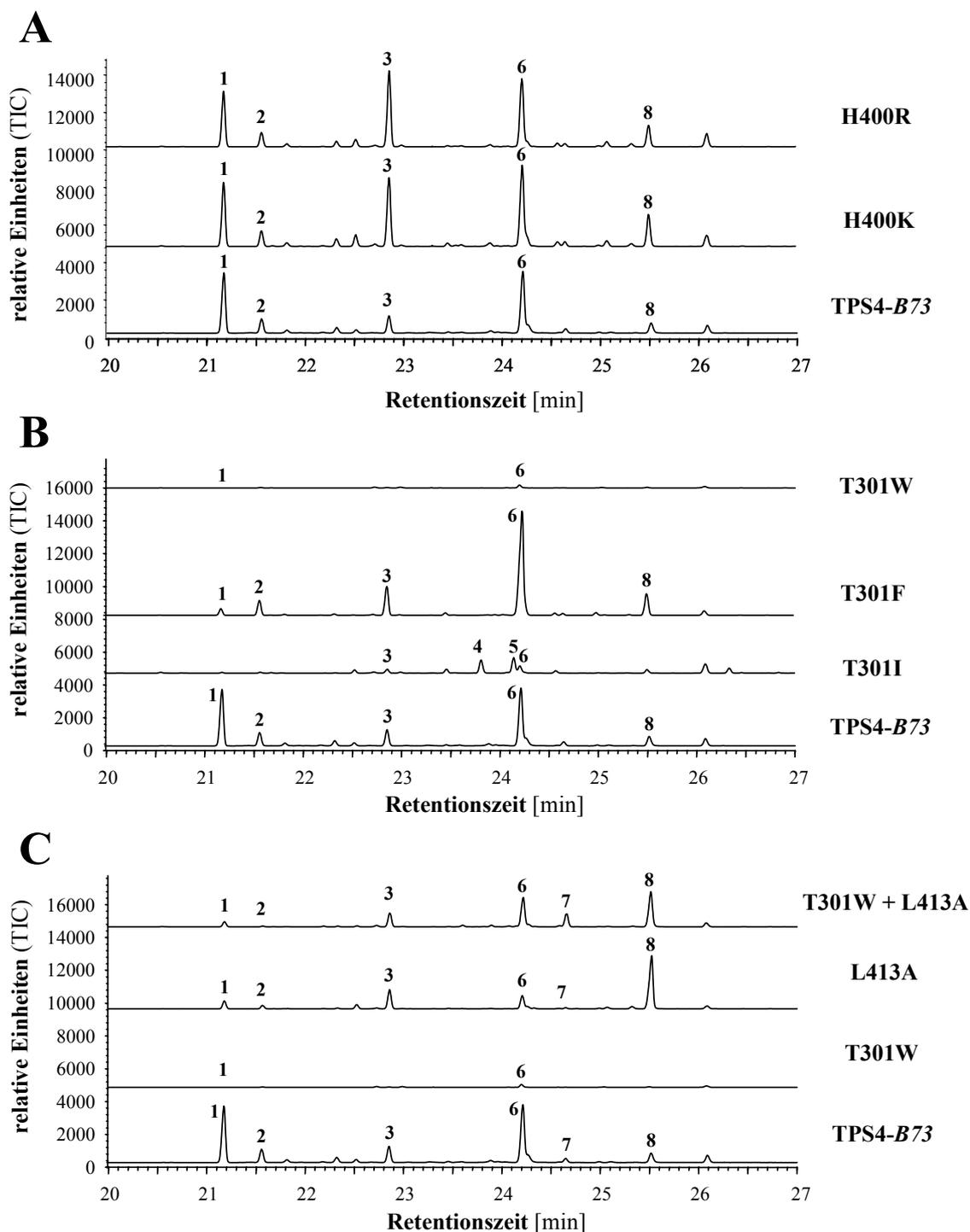
Aus früheren Studien ist bekannt, dass die Asparaginsäurereste des „DDxxD“-Motivs am Aufbau des aktiven Zentrums von Terpensynthasen beteiligt sind [RYNKIEWICZ *et al.*, 2001, CARUTHERS *et al.*, 2000, STARKS *et al.*, 1997]. Das dreidimensionale Modell von TPS4 zeigte, dass es in diesem Bereich der Struktur eine relativ große Tasche (ca. 20x12x10 Å) mit mehreren theoretischen Möglichkeiten zur Aufnahme des Substrates gibt (Abb. 3.25).

Da es für die im nächsten Kapitel beschriebenen computerbasierten Enzym-Substrat-Bindungsstudien essentiell war, das aktive Zentrum und den Bindungsort des Substrates genau zu lokalisieren, wurde eine Mutationsanalyse durchgeführt. Die dafür ausgewählten Aminosäuren haben Seitenketten, die in Richtung des aktiven Zentrums positioniert sind. Durch *in vitro*-Mutagenese wurden diese in größere Seitenketten umgewandelt, um die Platzverhältnisse in den entsprechenden Taschen zu verändern und damit mögliche Effekte auf die Enzymaktivität zu bestimmen.



**Abb. 3.25** Ausschnitt aus dem Strukturmodell von TPS4-B73. Die Abbildung zeigt den Blick in das aktive Zentrum. Die Aminosäuren des „TIATI“-Motivs Threonin 407, Alanin 409, Threonin 410 und Isoleucin 411 befinden sich im Boden der Tasche (grün). An der rechten Seite des Eingangs zum aktiven Zentrum sind die drei Asparaginsäurereste 308, 309 und 312 lokalisiert, die das konservierte Magnesiumbindemotiv („DDxxD“) bilden (gelb). Die in rot dargestellten Aminosäuren wurden für die Mutationsanalyse des aktiven Zentrums ausgewählt. Das Modell wurde auf Grundlage der 3D-Struktur der 5-*epi*-Aristolochensynthase aus Tabak [STARKS *et al.*, 1997] mit dem Programm „Modeler“ erstellt.

Der Austausch des gegenüber dem „DDxxD“-Motiv im Eingangsbereich des aktiven Zentrums lokalisierten Alanin 533 zu Valin, Leucin oder Tryptophan beeinflusste nicht die Enzymaktivität oder Spezifität. Es wurden keine Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp festgestellt (Daten nicht gezeigt), was darauf hindeutet, dass diese Region des Reaktionszentrums nicht für die Aktivität benötigt wird. Eine Veränderung der Seitenkette von Histidin 400 führte dagegen zu einer leicht modifizierten Produktspezifität: die Mutanten TPS4-B73 (H400K) und TPS4-B73 (H400R) bildeten (*E*)- $\beta$ -Farnesen, 7-*epi*-Sesquithujen und  $\beta$ -Bisabolen als Hauptprodukte (Abb. 3.26.A). Die Vergrößerung der Seitenkette an Position 301 beeinflusste sowohl die Aktivität als auch die Spezifität von TPS4-B73 (Abb. 3.26.B). So bildete die Mutante T301I zusätzlich zwei neue Sesquiterpenprodukte ((*Z,E*)- $\alpha$ -Farnesen und (*E,E*)- $\alpha$ -Farnesen) und zeigte insgesamt eine verminderte Enzymaktivität. Eine weitere Vergrößerung der Seitenkette durch Einfügen eines Phenylalanins an Position 301 führte zwar wieder zu einer dem Wildtyp ähnlichen Enzymaktivität, die Bildung von 7-*epi*-Sesquithujen, Sesquithujen, Sesquisabinen A, Sesquisabinen B sowie (*Z*)- und (*E*)- $\alpha$ -Bergamoten war dagegen stark verringert. Der Austausch von Threonin 301 zu Tryptophan resultierte schließlich in einem fast inaktiven Enzym.



**Abb. 3.26** Mutationsanalyse von Aminosäuren im aktiven Zentrum von TPS4-B73: (A) Histidin 400, (B) Threonin 301, (C) Isoleucin 413. Der Austausch der entsprechenden Aminosäuren erfolgte durch *in vitro*-Mutagenese. Die Enzyme wurden in *E. coli* exprimiert, partiell gereinigt und mit FPP inkubiert. Die Reaktionsprodukte wurden mit SPME extrahiert und gaschromatographisch analysiert (GC-MS, DB5-MS). (1): 7-*epi*-Sesquithujen, (2): Sesquithujen, (3): (*E*)- $\beta$ -Farnesen, (4): (*Z,E*)- $\alpha$ -Farnesen\*, (5): (*E,E*)- $\alpha$ -Farnesen\*, (6):  $\beta$ -Bisabolen, (7): (*E*)- $\gamma$ -Bisabolen, (8): Nerolidol. Mit (\*) markierte Substanzen wurden nur anhand der Massenspektren identifiziert.

Die *in silico*-Analyse der Mutante TPS4-B73 (T301W) ergab, dass es in der durch das Strukturmodell von TPS4-B73 vorgegebenen Proteinkonformation keine energetisch günstige Position für die Tryptophanseitenkette gibt. Der beobachtete Aktivitätsverlust

könnte daher das Resultat einer größeren Konformationsänderung in diesem Bereich des aktiven Zentrums sein. Im Modell befindet sich in unmittelbarer räumlicher Nachbarschaft zu Threonin 301 die Seitenkette von Leucin 413. Ein *in silico*-Austausch dieser Aminosäure zu Alanin, d.h. die Verkleinerung der Seitenkette an dieser Position, führte zu einer Lücke in der Struktur, die perfekt die Seitenkette von Tryptophan 301 der Mutante TPS4-B73 (T301W) aufnehmen konnte. Sollte also die Doppelmutante TPS4-B73 (T301W, L413A) eine zum Wildtyp bzw. zur Einzelmutante TPS4-B73 (L413A) vergleichbare Enzymaktivität besitzen, dann wäre das ein Indiz für die Genauigkeit der Computermodelle. Tatsächlich zeigte die Doppelmutante eine der Einzelmutante TPS4-B73 (L413A) entsprechende Aktivität (Abb. 3.26.C). Die Produktspezifität beider Mutanten war allerdings im Vergleich zum Wildtyp verändert. Dies bedeutet, dass Leucin 413 alleine ebenfalls an der Bildung der korrekten Wildtypkonformation des aktiven Zentrums beteiligt ist.

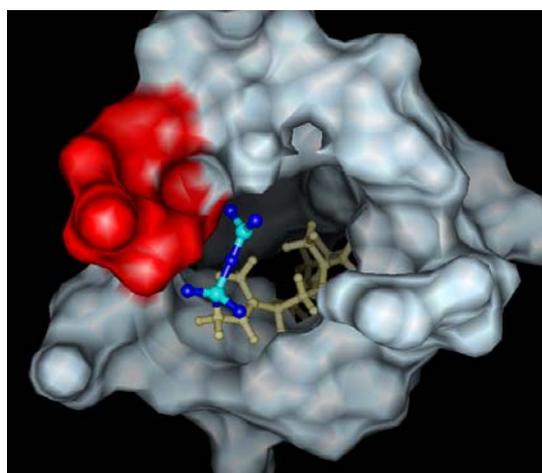
#### 3.5.1.4 Modellierung von Enzym-Substratkomplexen am Beispiel von TPS4-B73

Durch *in vitro*-Mutagenese konnte gezeigt werden, dass in TPS4 und TPS5 die Aminosäuren 407 bis 411 die Stereospezifität der Enzyme bestimmten (Abb. 3.22). Weiterhin beeinflusste die Art und Größe der Seitenkette an Position 301 die Aktivität und Produktspezifität von TPS4 (Abb. 3.26.B). Eine Veränderung der Seitenketten der Aminosäuren 533 und 400 hingegen hatte keinen bzw. nur einen geringen Einfluss auf die von TPS4 katalysierten Reaktionen. Somit konnte das aktive Zentrum des Proteins auf den Bereich zwischen dem „DDxxD“-Motiv, dem „TIATI“-Motiv und Threonin 301 eingeschränkt werden (s. Abb. 3.25). Um ein besseres Verständnis der Struktur-Funktionsbeziehungen zu erhalten, wurden *in silico* Enzym-Substrat- und Enzym-Intermediat-Komplexe modelliert.

**Tab. 3.2 Die am Aufbau der Tasche des aktiven Zentrums von TPS4 beteiligten Aminosäuren.** Die Aminosäuren wurden durch die Analyse eines 3D-Modelles von TPS4 identifiziert und sind nach den Eigenschaften ihrer Seitenketten in Gruppen zusammengefasst.

hydrophob	polar	aromatisch	sauer	basisch
I 304	T 301	W 280	E 277	R 271
L 378	T 305	Y 382	D 308	R 273
A 405	T 407	F 520	D 309	R 449
I 408	T 410	Y 528	D 312	
A 409	N 452		D 532	
A 412	S 456			
L 413	T 523			
G 445	T 524			
V 448	T 535			
V 455				
M 527				
A 533				
L 534				

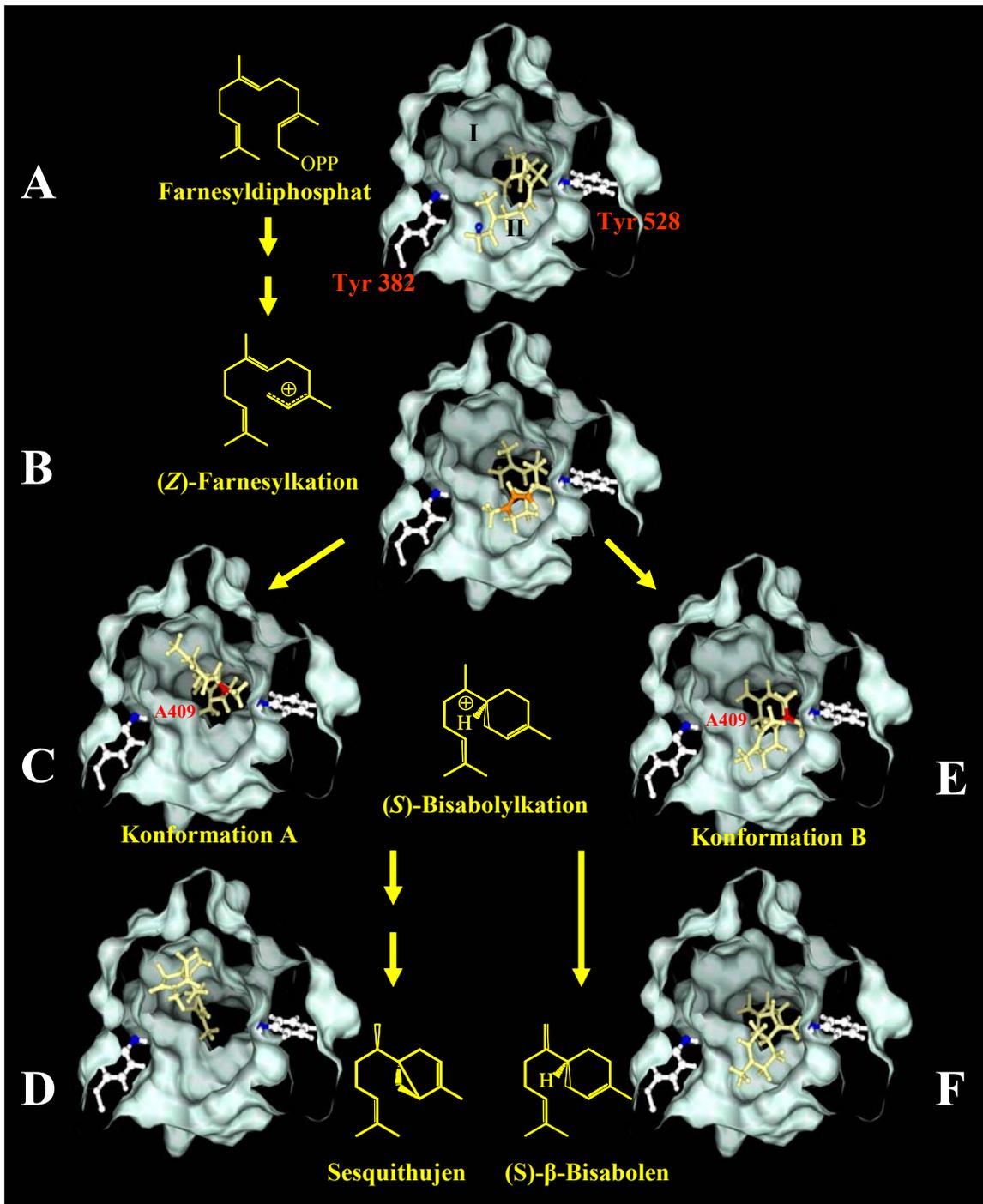
Dazu wurde ein dreidimensionales Strukturmodell des kompletten Proteins mit dem Programm „Modeler“ auf Grundlage der bekannten 3D-Struktur der 5-*epi*-Aristolochensynthase erstellt. Da das Programm „Modeler“ keine Protonen in der Struktur berücksichtigt, war es nötig, diese nachträglich mit Hilfe des Programmes „SPDBV“ in das Modell einzurechnen. In der erhaltenen PDB-Datei befinden sich die räumlichen Koordinaten jedes einzelnen Atoms des Proteins. Durch Löschen der Koordinaten aller nicht am Aufbau des aktiven Zentrums beteiligten Aminosäuren war es möglich, eine relativ übersichtliche „Minimalstruktur“ dieses Proteinbereichs zu erhalten (Abb. 3.27). Die Berechnungen der Enzym-Intermediat-Komplexe erfolgten mit dem Programm „GOLD“ unter Verwendung der „Minimalstruktur“ des aktiven Zentrums. Zum Erstellen der 3D-Modelle des Substrats und der verschiedenen Reaktionsintermediate der katalytischen Kaskade wurden die Programme „ChemDraw“ und „Chem3D“ benutzt.



**Abb. 3.27 Die Bindung von FPP im aktiven Zentrum von TPS4.** Die Abbildung zeigt die „Minimalstruktur“ der das aktive Zentrum bildenden Tasche mit dem Substratmolekül FPP. Die nicht direkt am Aufbau des aktiven Zentrums beteiligten Aminosäuren sind der besseren Übersicht halber nicht dargestellt. Die Pyrophosphatgruppe (blau) des Substrates (beige) befindet sich in unmittelbarer räumlicher Nähe zu den Asparaginsäureresten 308 und 312 des „DDxxD“-Motivs (rot). Das Modell des aktiven Zentrums wurde mit dem Programm „Modeler“ erstellt und die Berechnung der Substratbindung wurde mit dem Programm „GOLD“ durchgeführt.

In Tabelle 3.2 sind die wahrscheinlich am direktem Aufbau des aktiven Zentrums von TPS4 beteiligten Aminosäuren aufgelistet. Am Boden des aktiven Zentrums befindet sich ein durch die Aminosäuren des „TIATI“-Motivs gebildeter Grat, der das aktive Zentrum in zwei Taschen teilt (Tasche I und II, Abb. 3.28.A). Die Oberfläche dieser Taschen wird zum großen Teil durch hydrophobe Aminosäureseitenketten bestimmt. Einige polare Threoninreste sowie die sauren Aminosäuren Glutaminsäure 277 und Asparaginsäure 309 sind ebenfalls am Aufbau beteiligt. Die Asparaginsäurereste 308, 312 und 532 sowie die drei Arginine 271, 273 und 449 bilden den Eingangsbereich des aktiven Zentrums. Kristallisierungsexperimente der 5-*epi*-Aristolochensynthase mit verschiedenen Substratanaloga haben gezeigt, dass die Pyrophosphatgruppe des FPP im Eingangsbereich direkt am „DDxxD“-Motiv lokalisiert ist [STARKS *et al.*, 1997]. Der restliche Teil des Moleküls ragt in das aktive Zentrum hinein. Die *in silico*-Bindungsstudien mit TPS4 und FPP ergaben ein ähnliches Resultat (Abb. 3.26). Die Pyrophosphatgruppe hatte direkten

Kontakt zu den Asparaginsäureresten 308 und 312 des „DDxxD“-Motivs. Der hydrophobe und nicht an der enzymatischen Reaktion beteiligte Dimethylallylrest des FPP lagerte sich hingegen in einem im rechten Teil (Tasche II) des aktiven Zentrums gelegenen engen hydrophoben Hohlraum an (Abb. 3.26.A).



**Abb. 3.28 Modellierung von Enzym-Substrat- und Enzym-Intermediatkomplexen am Beispiel von TPS4.** (A): FPP, (B): (Z)-Farnesylylkation, (C): Konformation A des (S)-Bisabolylkation, (D): Sesquithujen, (E): Konformation B des (S)-Bisabolylkation, (F): (S)-β-Bisabolon. Das Strukturmodell des aktiven Zentrums von TPS4 wurde mit dem Programm „Modeler“ erstellt. Das Einfügen der Intermediate erfolgte mit dem Programm „GOLD“. Die Aminosäuren des „TIATI“-Motivs bilden einen Grat (A409) am Boden des aktiven Zentrums, der es in zwei Taschen (I und II) teilt.

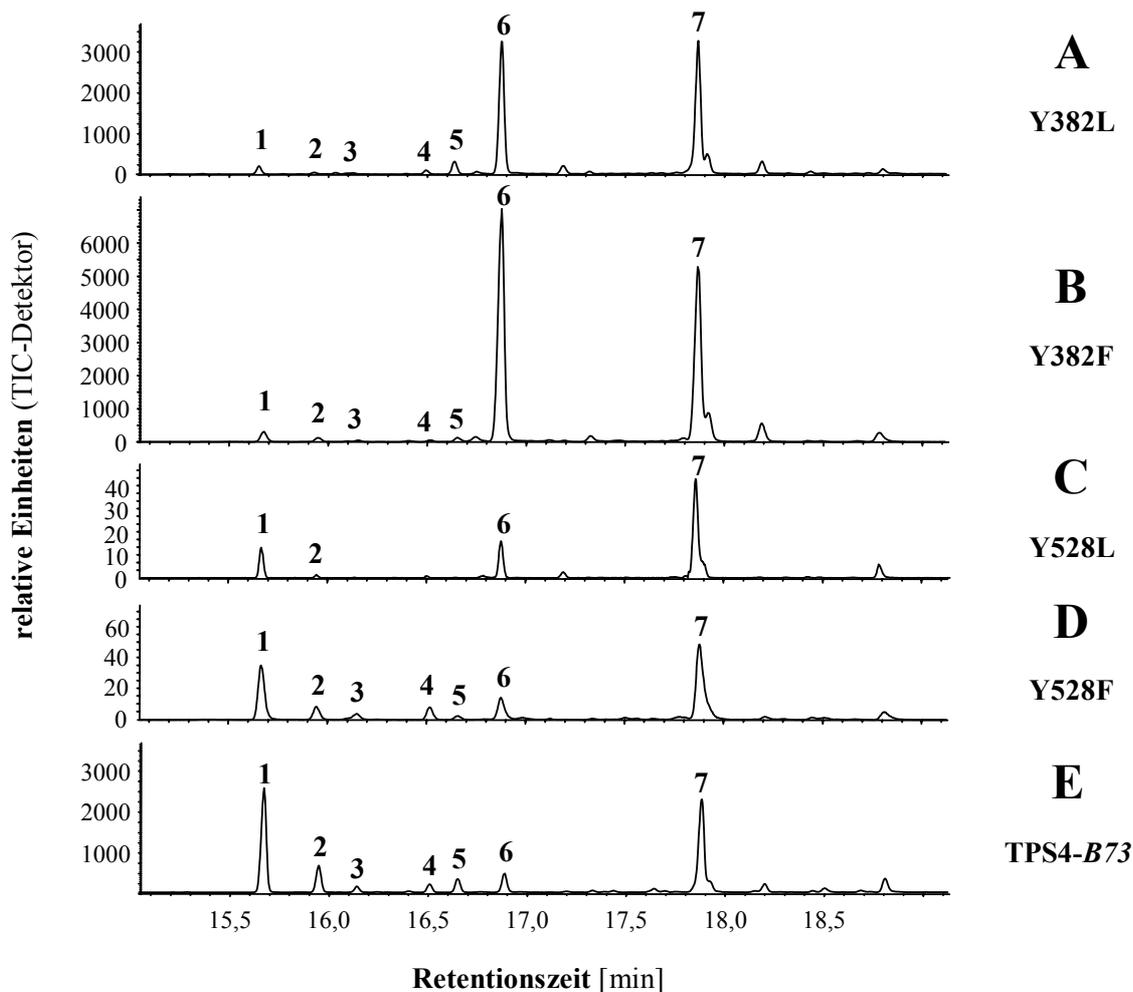
Durch das Abspalten der Pyrophosphatgruppe und die anschließende *trans-cis*-Isomerisierung entsteht als Intermediat das (*Z*)-Farnesylkation (vergleiche auch Abb. 3.19). Das Computermodell zeigte, dass das C1-Atom des (*Z*)-Farnesylkation in direkter Nachbarschaft zu C6 lag (Abb. 3.28.B). Dies ist eine günstige Konformation für den elektrophilen Angriff von C1 auf die Doppelbindung zwischen C6 und C7, die zur 1,6-Zyklisierung und damit zur Bildung des (*S*)-Bisabolykations führt (Abb. 3.28.E). Das an C7 lokalisierte Carbokation könnte durch das benachbarte aromatische Ringsystem oder durch die Hydroxylgruppe der Seitenkette von Tyrosin 528 stabilisiert werden. Die Abbildung 3.28.F zeigt schließlich eines der beiden TPS4-Hauptprodukte, (*S*)- $\beta$ -Bisabolen, das direkt aus dem (*S*)-Bisabolykation durch Deprotonierung an Position C14 entsteht. Eine zweite, energetisch günstige Konformation (Konformation A) des (*S*)-Bisabolykation ist in Abbildung 3.28.C dargestellt. Der Methylcyclohexenylrest befand sich hierbei in der linken Tasche (I) des aktiven Zentrums in der Nähe der Aminosäure Threonin 301 während der Dimethylallylrest weiterhin im hydrophoben Hohlraum der rechten Tasche (II) des aktiven Zentrums lokalisiert war. Da die carbokationischen Intermediate der Reaktion vom (*S*)-Bisabolykation zum Sesquithujen in einer jeweils ähnlichen räumlichen Anordnung in das aktive Zentrum modelliert werden konnten (Daten nicht gezeigt), ist es wahrscheinlich, dass das Produkt Sesquithujen (Abb. 3.28.D) aus dem (*S*)-Bisabolykation mit Konformation A (Abb. 3.28.C) entsteht. Am linken Rand des aktiven Zentrums (Tasche I) befindet sich die Seitenkette von Tyrosin 382. Eventuell kann diese, wie oben schon für Tyr 528 diskutiert, ebenfalls Carbokationen stabilisieren.

#### 3.5.1.5 Die Aminosäurereste Tyrosin 382 und Tyrosin 528 im aktiven Zentrum von TPS4

Die im vorigem Kapitel erhaltenen Ergebnisse ließen vermuten, dass die aromatischen Aminosäureseitenketten von Tyrosin 382 und 528 Carbokationen stabilisieren können und damit die Bildung von *7-epi*-Sesquithujen, Sesquithujen und  $\beta$ -Bisabolen ermöglichen.

Um den Einfluss der Seitenketten Tyrosin 382 und 528 auf die Reaktion zu untersuchen, wurden durch *in vitro*-Mutagenese die Mutanten TPS4-*B73* (Y382F), TPS4-*B73* (Y382L), TPS4-*B73* (Y528F) und TPS4-*B73* (Y528L) hergestellt und anschließend funktionell charakterisiert. Abb. 3.29 zeigt die Produktspektren der mit FPP inkubierten rekombinanten Proteine.

Der Austausch von Tyrosin 528 zu Phenylalanin oder Leucin führte im Vergleich zum Wildtyp zu einer ca. 80fach verringerten Enzymaktivität. Das Hauptprodukt der zu TPS4-*B73* sehr ähnlichen Produktspektren war in beiden Fällen  $\beta$ -Bisabolen. Die entsprechenden Mutationen an Position 382 hatten keinen Einfluss auf die Gesamtaktivität, veränderten aber die Produktspezifität. So wurden als Hauptprodukte beider Mutanten die Sesquiterpene (*E*)- $\beta$ -Farnesen und  $\beta$ -Bisabolen identifiziert. Die Bildung der Diastereomere *7-epi*-Sesquithujen und Sesquithujen war hingegen drastisch verringert.



**Abb. 3.29** Analyse des Einfluss der Tyrosin-Seitenketten 382 und 528 auf die von TPS4-B73 katalysierte Reaktion von FPP zu verschiedenen Sesquiterpenen. Der Austausch der Aminosäuren Tyr 382 und Tyr 528 zu Phenylalanin oder Leucin erfolgte mittels *in vitro*-Mutagenese. Die Enzyme wurden in *E. coli* exprimiert, partiell gereinigt und mit FPP inkubiert. Anschließend wurden die Reaktionsprodukte mit SPME extrahiert und gaschromatographisch analysiert (GC-MS, DB5-MS). (1): 7-*epi*-Sesquithujen, (2): Sesquithujen, (3): (*Z*)- $\alpha$ -Bergamoten, (4): (*E*)- $\alpha$ -Bergamoten, (5): Sesquisabinen A, (6): (*E*)- $\beta$ -Farnesen, (7):  $\beta$ -Bisabolon.

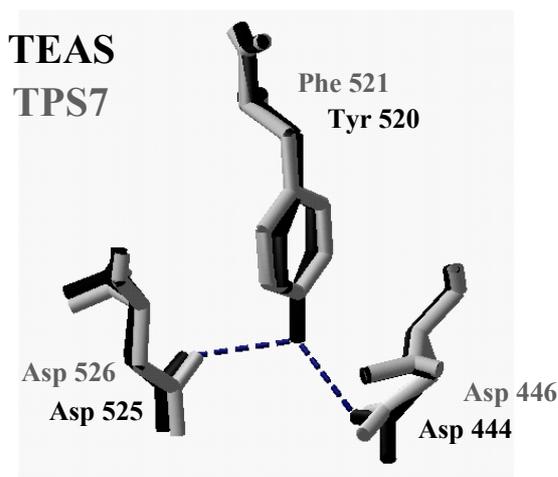
### 3.5.2 Struktur-Funktionsanalysen am Beispiel von TPS7-B73

#### 3.5.2.1 Die katalytische Triade im aktiven Zentrum der Mutante TPS7-B73 F521Y

In Analogie zu TPS4 sollte auch für TPS7 durch *in vitro*-Mutagenese der Reaktionsmechanismus und wichtige Aminosäuren im aktiven Zentrum bestimmt werden. Die 5-*epi*-Aristolochensynthase (TEAS) aus *N. tabacum* [FACCHINI & CHAPPEL, 1992] katalysiert eine zu TPS7 ähnliche Reaktion, die Umsetzung von Farnesylpyrophosphat zu 5-*epi*-Aristolochen. Diese Reaktion verläuft über das enzymgebundene stabile Intermediat Germacren A (Abb. 1.5). Durch Protonierung von Germacren A und der anschließenden 2,7-Zyklisierung entsteht ein Carbokation mit Eudesmangrundgerüst. Die folgende 2,3-Hydridverschiebung, eine Wagner-Meerwein-Umlagerung und eine Deprotonierung führen schließlich zum 5-*epi*-Aristolochen. Mutagenesestudien bekräftigen die von STARKS und Mitarbeitern (1997) veröffentlichte Hypothese, dass die Hydroxylgruppe einer

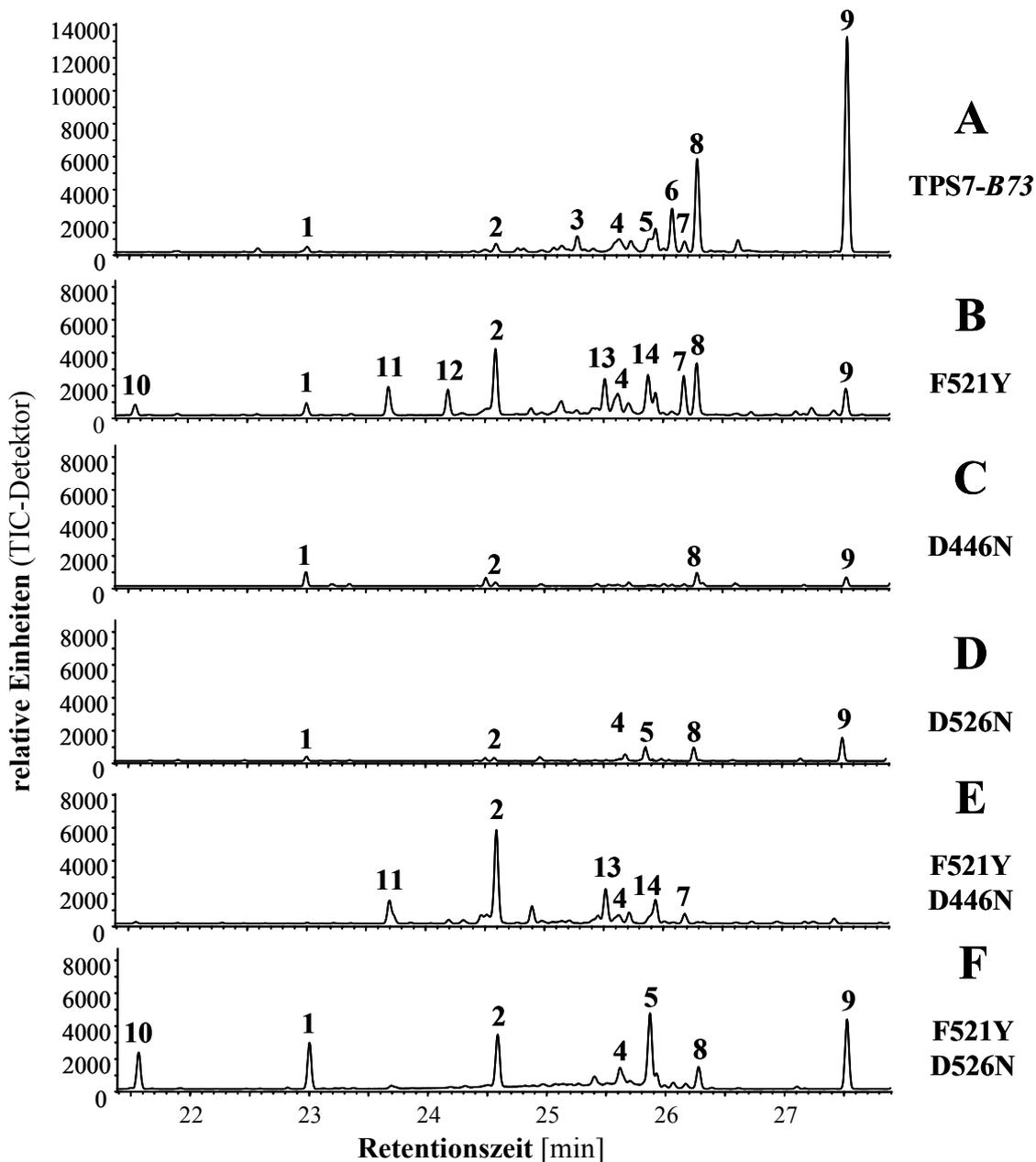
Tyrosinseitenkette (Tyr 520) im Zusammenspiel mit zwei Asparaginsäureresten (Asp 444 und Asp 525) als Protonendonator für die Aktivierung des Germacren A zum Eudesmancarbokation verantwortlich ist [RISING *et al.*, 2000]. So führt das Fehlen der Hydroxylgruppe in der Mutante TEAS (Y520F) zu einem Enzym, welches als Hauptprodukt Germacren A bildet.

TPS7-*B73* zeigte 32% Aminosäureidentität zu TEAS. Das Hauptprodukt dieses Enzyms konnte bisher nicht eindeutig identifiziert werden. Vermutlich handelt es sich aber um 1,6-Germacradien-5-ol (Abb. 3.8.B), ein formal durch Hydroxylierung aus einem Germacren D-Kation entstehender Sesquiterpen-Alkohol. Im Produktspektrum von TPS7 konnten weiterhin als Nebenprodukte Germacren A und Germacren D identifiziert werden (Abb. 3.31.A). Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen von TPS7-*B73* und TEAS zeigte, dass zwar in TPS7 die beiden am Aufbau der katalytischen Triade von TEAS beteiligten Aspartatreste Asp 525 und Asp 444 konserviert waren (Asp 526 und Asp 446), sich jedoch an Stelle des Tyrosins (TEAS Y520) ein Phenylalaninrest (TPS7 F521) befand (Abb. 3.4). Mit Hilfe von Strukturmodellen und *in vitro*-Mutagenesestudien sollte untersucht werden, ob in TPS7 durch den Austausch dieses Phenylalanin 521 zu Tyrosin eine zu TEAS homologe katalytische Triade erzeugt werden kann. In diesem Fall könnte die Protonierung der Germacrenintermediate zur Bildung neuer Produkte des Eudesmantyps führen. Weiterhin war zu klären, in welchem Umfang die beiden Aspartatreste an dem Prozess der Protonierung beteiligt sind.



**Abb. 3.30** Die katalytische Triade von TEAS (schwarz) im Vergleich mit den korrespondierenden Aminosäuren von TPS7-*B73* (grau). Die beiden Wasserstoffbrücken zwischen Tyr 520 und Asp 525 sowie Asp 444 sind gestrichelt dargestellt. Anstelle des Tyrosins befindet sich in TPS7 ein Phenylalanin (Phe 521). Wasserstoffbrücken können daher aufgrund des Fehlens der Hydroxylgruppe nicht ausgebildet werden.

Das auf Grundlage der TEAS-Tertiärstruktur erstellte Strukturmodell von TPS7-*B73* verdeutlichte, dass die Seitenketten der Aminosäuren der katalytischen Triade von TEAS und die entsprechenden Aminosäuren in TPS7 sehr ähnliche Konformationen und Orientierungen besitzen (Abb. 3.30). Eine *in silico*-Mutagenese von Tyrosin 521 zu Phenylalanin ergab ein zu TEAS homologes Modell der katalytischen Triade mit jeweils einer Wasserstoffbrücke zwischen den Säuregruppen der entsprechenden Aspartatreste und der Hydroxylgruppe des Tyrosins (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 3.31 Die Seitenketten der Aminosäuren Tyr 521 und Asp 526 der Mutante TPS7-B73 (F521Y) sind an der Aktivierung von Germacrenintermediaten beteiligt.** Die Aminosäuren Phenylalanin 521, Asparaginsäure 446 und Asparaginsäure 525 von TPS7-B73 wurden durch *in vitro*-Mutagenese zu Tyrosin bzw. Asparagin umgewandelt. Nach heterologer Expression in *E. coli* wurden die Mutanten partiell gereinigt und mit FPP inkubiert. Die Analyse der Reaktionsprodukte erfolgte über SPME und GC-MS (DB5-MS, Injektortemperatur: 160°C zur Vermeidung von thermischen Artefakten). In der Abbildung sind die TIC-Chromatogramme der Sesquiterpenprodukte des Wildtyps TPS7-B73 (A) sowie die der Mutanten TPS7-B73 (F521Y) (B), TPS7-B73 (D446N) (C) TPS7-B73 (D526N) (D), TPS7-B73 (D446N, F521Y) (E) und TPS7-B73 (D526N, F521Y) (F) dargestellt. (1):  $\beta$ -Elemen, (2):  $\alpha$ -Humulen, (3): Germacren D, (4):  $\alpha$ -Selinin, (5) Germacren A, (6):  $\gamma$ -Cadinin, (7): 7-*epi*- $\alpha$ -Selinin, (8):  $\delta$ -Cadinin, (9): 1,6-Germacradien-5-ol, (10):  $\delta$ -Elemen, (11): unbekanntes Sesquiterpen, (12):  $\alpha$ -Guajen, (13):  $\delta$ -Selinin, (14):  $\delta$ -Guajen. Die Produkte 2,3,4,5,6 und 8 wurden durch Vergleich der Massenspektren und Retentionszeiten mit Standardsubstanzen identifiziert. Die Bestimmung der anderen gebildeten Sesquiterpene erfolgte durch Vergleich der Massenspektren mit Einträgen in verschiedenen Massenspektrenbibliotheken.

Die durch *in vitro*-Mutagenese hergestellte und in *E. coli* heterolog exprimierte Mutante TPS7-B73 (F521Y) produzierte tatsächlich Sesquiterpene mit Eudesmangrundgerüst (Abb. 3.31.B). Im Produktspektrum dieses Enzyms konnten die auch vom Wildtyp (Abb. 3.31.A) in allerdings geringeren Mengen gebildeten Substanzen  $\alpha$ -Selinen und  $\beta$ -Selinen identifiziert werden. Weitere Eudesmane waren das durch Massenspektrometrie bestimmte 7-*epi*- $\alpha$ -Selinen und  $\delta$ -Selinen. Während die Eudesmane durch 2,7-Zyklisierung aus Germacrenen gebildet werden können, führt die 2,6-Zyklisierung dieser Intermediate zum Guajangrundgerüst. Zwei Vertreter ( $\alpha$ -Guajen und  $\delta$ -Guajen) dieser Terpenklasse wurden ebenfalls gebildet. Das Hauptprodukt der Mutante war jedoch  $\alpha$ -Humulen, ein formal durch 1,11-Zyklisierung aus dem (*E*)-Farnesylation entstehendes Sesquiterpen.

Um den Einfluss der Aspartatreste auf die Protonierung zu studieren, wurden Doppelmutanten konstruiert, die anstelle von Phenylalanin 521 ein Tyrosin besaßen und in denen jeweils eines der beiden Aspartate zu Asparagin umgewandelt war. In Abbildung 3.31.E und F sind die Produktspektren dieser Mutanten dargestellt. Der gemeinsame Austausch von Aspartat 446 zu Asparagin und Phenylalanin 521 zu Tyrosin führte im Vergleich zur Einzelmutante TPS7-B73 (F521Y) nur zu leichten Veränderungen im Produktprofil. Es wurden weiterhin Eudesmane gebildet. Im Gegensatz dazu bildete die Mutante TPS7-B73 (D526N, F521Y) wieder die Hauptprodukte des Wildtyps, sowie aber auch Germacren A,  $\beta$ -Elemen und  $\delta$ -Elemen. Beide Elemene können im GC-Injektor durch thermische Umlagerungen aus Germacren A ( $\beta$ -Elemen) bzw. Germacren C ( $\delta$ -Elemen) entstehen [DE KRAKER *et al.*, 1998; MORIKAWA & HIROSE, 1971]. Durch die Verringerung der Injektortemperatur von 220°C auf 160°C konnte auch im Falle der Mutante TPS7-B73 (D526N, F521Y) nachgewiesen werden, dass die Elemene nicht spezifisch vom Enzym, sondern im GC-Injektor aus den entsprechenden Germacrenen gebildet wurden. So resultierte die Verringerung der Injektortemperatur in einer Zunahme der Germacrene A und C bei gleichzeitiger Abnahme der Elemene (Daten nicht gezeigt).

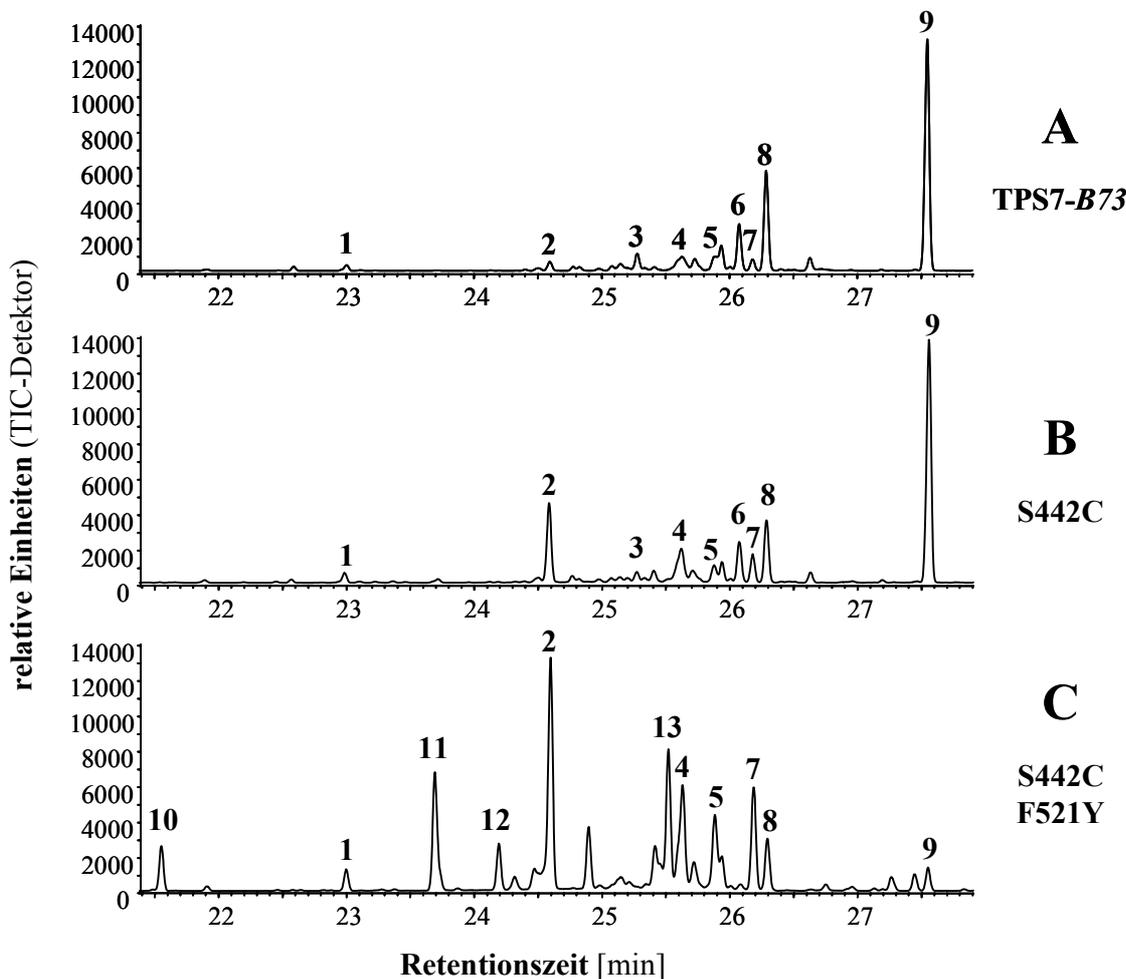
Im Gegensatz zu den Doppelmutanten TPS7-B73 (D446N, F521Y) und TPS7-B73 (D526N, F521Y) war die Enzymaktivität der jeweiligen Einzelmutanten TPS7-B73 (D446N) und TPS7-B73 (D526N) etwa achtfach verringert.

### 3.5.2.2 Ist ein weiterer Protonierungsmechanismus involviert?

Neuere Studien an TEAS ergaben, dass der Austausch von Cystein 440 zu Serin, in Abhängigkeit vom pH, zur vermehrten Bildung von Germacren A führt [O'MAILLE & NOEL, 2003]. Weiterhin wurde beobachtet, dass sich auch im Produktspektrum des Wildtyps bei höheren pH-Werten (um pH 8.8) die Mengenverhältnisse von 5-*epi*-Aristolochen und Germacren A zugunsten von Germacren A verschieben. In einem aktualisierten mechanistischen Modell der Protonierung von Germacren A durch TEAS diskutiert O'Maille daher die Beteiligung von Cystein 440 und einem Wassermolekül.

Die zum TEAS-Rest Cystein 440 korrespondierende Aminosäure von TPS7 ist Serin. Eine Umwandlung dieses Restes zu Cystein könnte analog zu TEAS den Reaktionsmechanismus beeinflussen. Daher wurden die Mutanten TPS7-B73 (S442C) und

TPS7-*B73* (S442C, F521Y) durch *in vitro*-Mutagenese hergestellt, in *E. coli* heterolog exprimiert und analysiert.



**Abb. 3.32** Der Cysteinrest 442 der Mutante TPS7-*B73* (S442C) beeinflusst die Protonierung der Germacrenintermediate. Die Aminosäuren Serin 442 und Phenylalanin 521 von TPS7-*B73* wurden durch *in vitro*-Mutagenese zu Cystein bzw. zu Tyrosin umgewandelt. Die mutierten Enzyme wurden in *E. coli* exprimiert, partiell gereinigt und mit FPP inkubiert. Die Analyse der Reaktionsprodukte erfolgte über SPME und GC-MS (DB5-MS, Injektortemperatur: 160°C). In der Abbildung sind die TIC-Spektren der Sesquiterpenprodukte des Wildtyps TPS7-*B73* (A) sowie die der Mutanten TPS7-*B73* (S442C) (B) und TPS7-*B73* (S442C, F521Y) (C) dargestellt. (1):  $\beta$ -Elemen, (2):  $\alpha$ -Humulen, (3): Germacren D, (4):  $\alpha$ -Selinen, (5) Germacren A, (6):  $\gamma$ -Cadinen, (7): 7-*epi*- $\alpha$ -Selinen, (8):  $\delta$ -Cadinen, (9): 1,6-Germacradien-5-ol, (10):  $\delta$ -Elemen, (11): unbekanntes Sesquiterpen, (12):  $\alpha$ -Guajen, (13):  $\delta$ -Selinen.

Die Mutation von Serin 442 zu Cystein resultierte lediglich in einer leichten Zunahme von  $\alpha$ -Selinen, 7-*epi*- $\alpha$ -Selinen und  $\alpha$ -Humulen (Abb. 3.32.B). Das Produktspektrum der Doppelmutante TPS7-*B73* (S442C, F521Y) (Abb. 3.32.C) war hingegen sehr ähnlich dem Produktspektrum von TPS7-*B73* (F521Y) (Abb. 3.31.B). Die Gesamtaktivität war etwa vierfach höher und die Mengenverhältnisse zwischen den Eudesmanen/Guajenen und den Wildtypprodukten  $\delta$ -Cadinen und 1,6-Germacradien-5-ol waren im Vergleich zur Einfachmutante TPS7-*B73* (F521Y) zugunsten der Selinene und Guajene verschoben.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Cysteinrest an Position 442 in TPS7 (S442C) nicht an der Protonierung von Germcarenintermediaten beteiligt ist. Da die Enzymreaktionen jedoch bisher nur bei pH 7.0 durchgeführt wurden, ist nicht auszuschließen, dass eventuelle Effekte, wie für TEAS beobachtet, erst bei höheren pH-Werten auftreten. In zukünftigen Experimenten muß daher die Abhängigkeit der Produktbildung dieser Mutanten vom pH untersucht werden.

## 4 Diskussion

Die Zusammensetzung komplexer, von Sesquiterpenen dominierter Terpengemische in Mais ist vom Entwicklungsstand der Pflanze und von der jeweiligen Maisvarietät abhängig. Da über die molekularen und genetischen Mechanismen der Komplexität der Terpenbiosynthese in Mais derzeit wenig bekannt ist, sollten diese Mechanismen im Rahmen der vorliegenden Arbeit am Beispiel der Sesquiterpenkohlenwasserstoffe untersucht werden.

### 4.1 Die Maisinzuchtlinie B73 bildet ein komplexes Spektrum verschiedenster Sesquiterpenkohlenwasserstoffe

Im ersten Teil der Arbeit wurden die STKW in einzelnen Pflanzenteilen von Sämlingen und adulten Pflanzen der Maisinzuchtlinie B73 bestimmt.

Einige der STKW in B73-Sämlingen sind bereits in früheren Arbeiten über Mais identifiziert wurden. TURLINGS und Mitarbeiter (1990) konnten zeigen, dass im Kultivar „Ioana sweet corn“ die Emission von (*E*)- $\alpha$ -Bergamoten und (*E*)- $\beta$ -Farnesen durch Raupen der Gattung *Spodoptera* induziert werden kann. In anderen Kultivaren wurde zusätzlich die Induktion von (*E*)- $\beta$ -Caryophyllen und der Nebenprodukte  $\beta$ -Bisabolen und  $\beta$ -Sesquiphellandren beobachtet (TURLINGS *et al.*, 1998; GOINGUENE *et al.*, 2001; GOINGUENE *et al.*, 2003). Die Hauptterpenkomponenten induzierter B73-Sämlinge sind, wie auch in „Ioana sweet corn“, (*E*)- $\alpha$ -Bergamoten und (*E*)- $\beta$ -Farnesen. (*E*)- $\beta$ -Caryophyllen ist jedoch im Gegensatz zu „Ioana sweet corn“ in B73 nicht induziert, sondern wird konstitutiv in allen Pflanzenteilen gebildet.

Aus der Literatur ist bekannt, dass adulte Maispflanzen ebenfalls STKW emittieren. BUTTERY und LING (1984) identifizierten im Duftspektrum von Blättern und Lieschblättern der Kultivare „Bonanza“ und „Stylepak“ insgesamt acht STKW und aus Blättern des Kultivars „Jubilee“ wurden elf verschiedene STKW isoliert [UDAYAGIRI & JONES, 1992]. Einige dieser Terpene konnten auch in B73 gefunden werden. Überraschenderweise sind jedoch die Hauptterpenkomponenten völlig unterschiedlich. Während in „Bonanza“, „Stylepak“ und „Jubilee“ die Substanzen Cyclosativen,  $\alpha$ -Ylangen und (*E*)- $\beta$ -Caryophyllen das Terpenspektrum dominieren, wurden in B73 7-*epi*-Sesquithujen, (*E*)- $\alpha$ -Bergamoten, (*E*)- $\beta$ -Farnesen und  $\beta$ -Bisabolen als Hauptbestandteile des Sesquiterpenspektrums identifiziert. Cyclosativen und  $\alpha$ -Ylangen werden, zumindest unter den getesteten Bedingungen, in B73 nicht gebildet. (*E*)- $\beta$ -Caryophyllen liegt nur in geringen Mengen vor.

In Übereinstimmung mit den Literaturangaben (BUTTERY & LING, 1984) wurde in Lieschblättern von B73 eine im Vergleich zu Blättern etwa vier bis fünf mal höhere spezifische STKW-Biosyntheseaktivität gefunden. Die Beobachtung, dass in den Narbenfäden der weiblichen Blütenstände keine STKW gebildet werden (FLATH *et al.*, 1978; ZERINGUE, 2000), konnte in der Linie B73 ebenfalls bestätigt werden. Über

volatile Stoffe in männlichen Maisblütenständen gibt es keine Angaben in der Literatur. In B73 wurden in den Antheren keine STKW gefunden.

Die Resultate der Untersuchung von STKW in B73 bestätigen die schon von anderen Autoren beschriebenen Beobachtungen, dass es zwischen jungen, durch Raupenfraß induzierten Pflanzen verschiedener Maiskultivare sowohl quantitative als auch qualitative Unterschiede in der Sesquiterpenbiosynthese gibt (GOUNGUENE *et al.*, 2001, TURLINGS *et al.*, 1998). Erstmals konnte gezeigt werden, dass sich aber auch adulte Pflanzen verschiedener Kultivare in ihrem STKW-Spektrum gravierend unterscheiden können. Die spezifische STKW-Biosyntheseaktivität in den Organen adulter Maispflanzen ist jedoch in vielen Kultivaren offenbar sehr ähnlich.

Die biologische Funktion der in B73 identifizierten STKW ist derzeit noch unklar. Das komplette, nach Raupenfraß durch Mais gebildete Duftspektrum wirkt anziehend auf verschiedene Parasitoiden der Herbivoren (TURLINGS *et al.*, 1990). Da aber neben den Sesquiterpenen auch die Freisetzung von Monoterpenen, Indol und den sogenannten „green leaf volatiles“ durch Raupenfraß induziert wird (TURLINGS *et al.*, 1990), ist es noch nicht sicher, ob Sesquiterpene in diesem tritrophischen System eine Rolle spielen. Die konstitutiv in der Pflanze gebildeten Sesquiterpene könnten auch als Fraßhemmstoffe oder als Abwehrstoffe gegen Mikroorganismen fungieren. Eine im Vergleich zur übrigen Pflanze erhöhte STKW-Biosyntheseaktivität in den Lieschblättern lässt vermuten, dass die Sesquiterpene hier zum Schutz des Kolbens ebenfalls als Fraßhemmstoffe dienen könnten. Um die STKW in B73 zu analysieren, wurden sowohl Duftsammelmethoden als auch Extraktionen angewendet. Ein direkter Vergleich beider Methoden zeigte, dass sie zu identischen Ergebnissen führen. Es wurden keine qualitativen und, bezogen auf die Verhältnisse der einzelnen Komponenten untereinander, quantitativen Unterschiede zwischen den von der Pflanze abgegebenen STKW und den in der Pflanze befindlichen STKW festgestellt. Das bedeutet, dass es in Mais offenbar keine selektiven Barrieren für die verschiedenen STKW beim Transport aus der Zelle in die Umgebungsluft gibt. Dieser Transport beruht daher wahrscheinlich auf Diffusion der STKW durch die Cuticula oder die Stomata der Pflanze.

#### **4.2 Die Enzymfamilie der Terpensynthasen in Mais umfasst mehr als 20 Mitglieder**

Terpensynthasen als die Schlüsselenzyme der Terpenbiosynthese sind seit ca. 15 Jahren Gegenstand regen Interesses. Der anfänglich überwiegend biochemische Zugang zu diesen Enzymen, d.h. die direkte Isolierung und Aufreinigung aus Pflanzenmaterial, ist auf Grund der häufig nur sehr geringen Expression relativ kompliziert. Zur Untersuchung von Terpensynthasen wird daher heute meist der molekularbiologische Weg über die Isolierung und Klonierung der cDNA und die anschließende heterologe Expression angewendet.

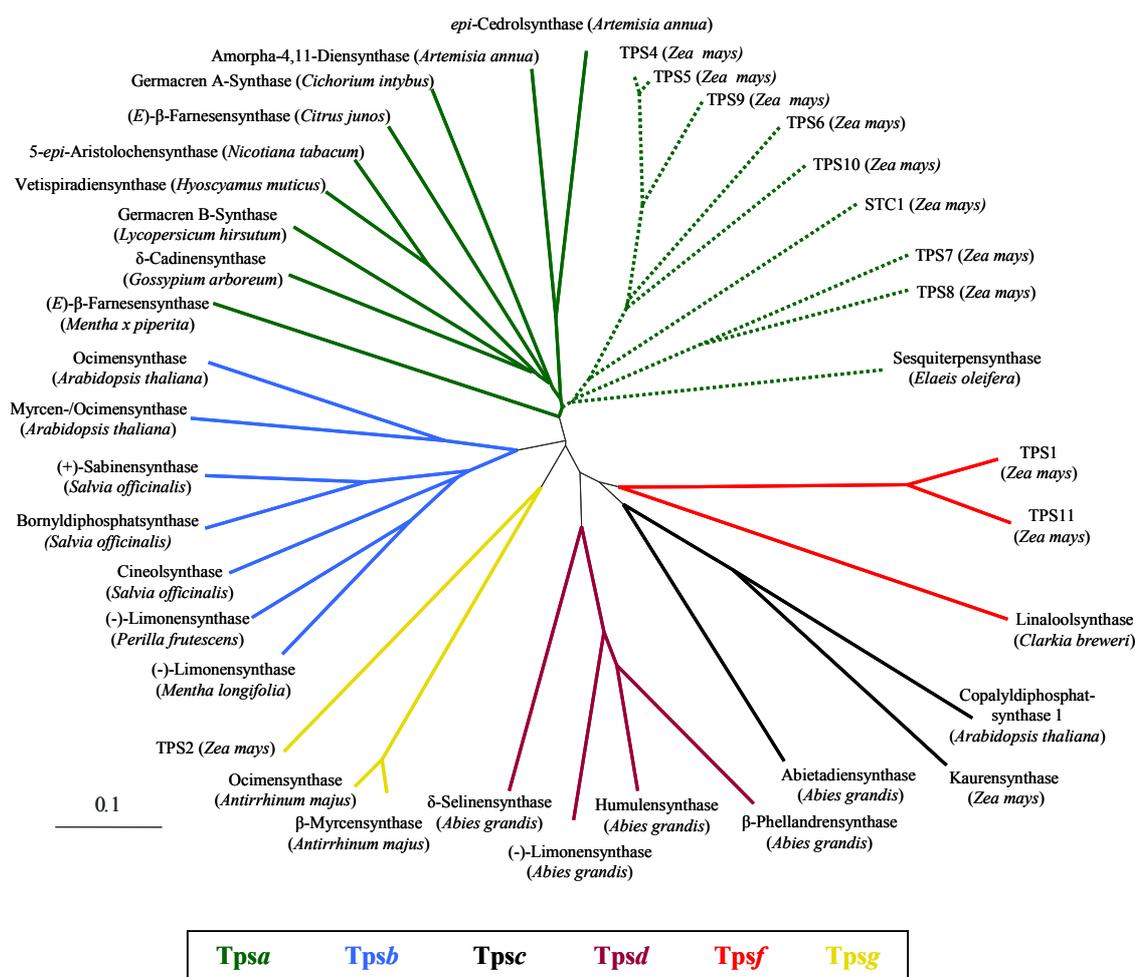
Zu Beginn dieser Arbeit waren bereits die zwei Maisterpensynthasen AN1 und STC1 bekannt. Die Diterpensynthase AN1, ein Enzym des Primärmetabolismus, katalysiert die Umsetzung von Geranylgeranyldiphosphat zu *ent*-Kauren, dem ersten tetrazyklischen Intermediat im Biosyntheseweg der Gibberellinsäure [BENSEN *et al.*, 1995]. Das von SHEN und Mitarbeitern (2000) identifizierte Gen *stc1* kodiert vermutlich eine

Sesquiterpensynthese. Die heterologe Expression in unserem Labor ergab aber, dass STC1 zumindest *in vitro* keine katalytische Aktivität besitzt (unveröffentlichte Ergebnisse). Ausgehend von den Gensequenzen von AN1 sowie weiterer pflanzlicher Terpensynthasen wurden in der AG Degenhardt am MPI für Chemische Ökologie degenerierte Oligonukleotide konstruiert, um verwandte Gene aus einer cDNA-Bank von Mais zu amplifizieren. Da diese Experimente nicht erfolgreich waren, war geplant, durch BLAST-Analysen cDNA-Fragmente mit ähnlicher Sequenz zu bereits bekannten pflanzlichen Terpensynthasegenen in einer Mais-EST-Datenbank zu identifizieren.

Durch diese Methode konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit fünf komplette offene Leserahmen gefunden werden, die mit *tps4-B73*, *tps5-B73*, *tps6-B73*, *tps7-B73* und *tps9-B73* bezeichnet wurden. Die erhaltenen cDNAs kodieren die Proteine TPS4-B73, TPS5-B73, TPS6-B73, TPS7-B73 und TPS9-B73. Die kalkulierten Molekulargewichte dieser Enzyme (61-64 kDa) liegen im Bereich der Molekulargewichte pflanzlicher Sesquiterpensynthasen [BOHLMANN *et al.*, 1998A]. Weiterhin weisen sie einige für Terpensynthasen typische Sequenzmerkmale auf. So besitzen sie das in die Substratbindung involvierte „DDxxD“-Motiv. Es wird angenommen, dass die Pyrophosphatgruppe des Prenyldiphosphates über mehrere divalente Metallkationen durch die Aspartatreste dieses Motivs komplexiert wird [CANE *et al.*, 1996; STARKS *et al.*, 1997]. Das 35 Aminosäuren stromaufwärts vom „DDxxD“-Motiv gelegene „RxR“-Motiv ist ebenfalls in den fünf identifizierten Terpensynthasen konserviert. STARKS und Mitarbeiter (1997) postulieren, dass die Arginine die vom Substrat abgespaltene Pyrophosphatgruppe fixieren und somit eine nukleophile Addition dieser Gruppe an die entstehenden Carbokationen verhindern.

Insgesamt konnten bis heute aus mehreren verschiedenen Mais-EST-Datenbanken weitere fünfzehn Terpensynthasegene bzw. Genfragmente isoliert werden [SCHNEE *et al.*, 2002; SCHNEE, 2004; BARTSCH & DEGENHARDT, unveröffentlichte Ergebnisse]. Zusammen mit den fünf in dieser Arbeit beschriebenen Genen und den zwei bereits bekannten Terpensynthasen AN1 und STC1 ergibt sich daher eine große, aus mindestens 22 Mitgliedern bestehende Genfamilie (s. Tab. 4.1). Da die in *Arabidopsis thaliana* gefundene Terpensynthasefamilie insgesamt 40 Gene umfasst [AUBOURG *et al.*, 2002] und in den EST-Datenbanken von *Oryza sativa* [<http://www.tigr.org>; <http://www.shigen.nig.ac.jp>; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>] bisher 26 unterschiedliche Terpensynthasegene eingetragen sind, kann man spekulieren, dass auch in Mais noch weitere Gene vorhanden sind.

In einer von BOHLMANN und Mitarbeitern (1998A) vorgeschlagenen Klassifizierung werden die pflanzlichen Terpensynthasen, basierend auf der Ähnlichkeit ihrer Aminosäuresequenzen, in sechs Untergruppen eingeteilt. Die Synthasen einer Untergruppe haben hierbei ähnliche Sequenzen und besitzen im allgemeinen auch ähnliche Funktionen. So bilden die Monoterpensynthasen der Angiospermen die Gruppe *Tpsb*, während die Sesquiterpensynthasen und einige Diterpensynthasen der Gruppe *Tpsa* zugeordnet sind. Mono- und Sesquiterpensynthasen von Gymnospermen unterscheiden sich deutlich von denen der Angiospermen und sind in der Gruppe *Tpsd* zusammengefasst.



**Abb. 4.1** Darstellung der Sequenzverwandtschaft der Maisterpensynthasen TPS4-B73, TPS5-B73, TPS6-B73, TPS7-B73 und TPS9-B73 sowie einiger ausgewählter repräsentativer Terpensynthasen aus anderen Pflanzenfamilien. Die Einteilung in die einzelnen Gruppen erfolgte durch Cluster-Analyse [BOHLMANN *et al.*, 1998A; AUBOURG *et al.*, 2002; DUDAREVA *et al.*, 2003]. Die Sequenzverwandtschaft der Proteine wurde mit dem Programm „Clustal X“ nach der „neighbor-joining“-Methode analysiert und mit dem Programm „TreeView“ visualisiert. Die unterschiedlichen Gruppen sind farblich voneinander getrennt: grün: Tpsa, blau: Tpsb, schwarz: Tpsc, violett: Tpsd, rot: Tpsf, gelb: Tpsg. Die Sesquiterpensynthasen von Monocotyledonen bilden eine abgegrenzte, durch punktierte Linien dargestellte Untergruppe in Tpsa.

Drei kürzlich im Löwenmäulchen (*Antirrhinum majus*) identifizierte Monoterpensynthasen passen nicht in die 1998 aufgestellte Klassifizierung und werden daher in eine neue Gruppe von Terpensynthasen (Tpsg) eingeordnet [DUDAREVA *et al.*, 2003]. BOHLMANN und Mitarbeiter (1998A) spekulieren, dass alle heutigen Terpensynthasen aus einem gemeinsamen Vorläufergen entstanden sind. Weiterhin zeigen die phylogenetischen Rekonstruktionen, dass die Trennung der in den Sekundärmetabolismus involvierten Terpensynthasen von den entsprechenden Enzymen des Primärmetabolismus noch vor der Entstehung von Angiospermen und Gymnospermen stattgefunden haben muss [BOHLMANN *et al.*, 1998A].

Ein Sequenzvergleich der Terpensynthasen TPS4-B73, TPS5-B73, TPS6-B73, TPS7-B73 und TPS9-B73 mit einigen repräsentativen Vertretern anderer Pflanzen zeigt, dass diese Proteine der Gruppe *Tpsa* zuzuordnen sind (Abb. 4.1). Innerhalb von *Tpsa* formen sie aber, zusammen mit einer Sesquiterpensynthase aus der Ölpalme (*Elaeis oleifera*), eine separate Untergruppe. Da die Ölpalme sowie Mais zu den Monocotyledonen zählen, könnten die entsprechenden Gene dieser Untergruppe erst nach der Entstehung von Monocotyledonen und Dicotyledonen aus einem gemeinsamen monocotyledonen-spezifischen Vorläufergen entstanden sein. Die Maisterpensynthasen TPS1, TPS2 und TPS11 [SCHNEE *et al.*, 2002; SCHNEE 2004] ordnen sich jedoch in andere Gruppen ein (s. Abb. 4.1). Daher sollte bereits während der Trennung von Monocotyledonen und Dicotyledonen mindestens ein weiteres Vorläufergen existiert haben.

Basierend auf den Ergebnissen der Analyse von Intron-Exon-Strukturen verschiedener Terpensynthasegene schlugen TRAPP & CROTEAU (2001) vor, diese Gene in drei distinkte Klassen einzuteilen. Sie kommen zur selben Schlussfolgerung wie BOHLMANN und Mitarbeiter (1998A), dass die Gene der in den Sekundärmetabolismus involvierten Terpensynthasen durch Genverdopplung eines Diterpensynthase-ähnlichen Ursprungsgens entstanden sind. Aus diesem Klasse I-Gen sind dann im Verlauf der Entwicklung durch Intronverlust die Gene der Klassen II und III hervorgegangen. Die Intron-Exon-Struktur einer Maisterpensynthase ist bereits bekannt. Das Gen *stc1* enthält sechs Introns, welche sich an für Gene der Klasse III typischen Positionen befinden [SHEN *et al.*, 2000]. Durch die Sequenzierung eines genomischen Klons von *tps5-B73* konnte nun die Genstruktur einer weiteren Terpensynthase aus Mais aufgeklärt werden. Ein Vergleich der gDNA-Sequenzen von *stc1* und *tps5-B73* zeigte, dass sowohl die Anzahl der Introns als auch ihre Lage im Gen und ihre Größen konserviert sind. Das Gen *tps5-B73* ist damit auch der Klasse III zuzuordnen.

#### **4.3 Die Muster in der Terpenemission von B73 lassen sich auf die Produktspektren von fünf Multiproduktenzymen zurückführen**

Ein interessantes Ergebnis der Analyse der Sesquiterpeninhaltsstoffe von B73 war, dass sich die in dieser Inzuchtlinie identifizierten Sesquiterpene in insgesamt fünf separate Gruppen (A-E) einteilen lassen, in denen jeweils die Mengenverhältnisse der einzelnen Substanzen konstant bleiben. Messungen an mehreren Pflanzen zeigten, dass die Varianz der Mengenverhältnisse zwischen Terpenen einer Gruppe deutlich kleiner ist als die zwischen Terpenen verschiedener Gruppen. Dies deutet darauf hin, dass die Biosynthese der STKW der jeweiligen Gruppe gekoppelt ist.

Es ist seit längerem bekannt, dass Terpensynthasen die Synthese mehrerer verschiedener Produkte katalysieren können. So wurden z.B. in den Produktspektren der  $\gamma$ -Humulensynthase und  $\delta$ -Selinensynthase von *Abies grandis* insgesamt 52 bzw. 34 verschiedene Sesquiterpene identifiziert (STEELE *et al.*, 1998A). Daher lag die Vermutung nahe, dass die Sesquiterpene einer Gruppe von jeweils einem Multiproduktenzym synthetisiert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Terpensynthesen aus Mais charakterisiert, deren Produkte teilweise den Terpengruppen der Pflanze entsprechen. Die Enzyme TPS4-B73, TPS6-B73 und TPS7-B73 akzeptieren sowohl Farnesylpyrophosphat als auch Geranylpyrophosphat als Substrat und bilden jeweils mehrere Sesqui- und Monoterpene. Das Fehlen der für Monoterpensynthesen charakteristischen Signalpeptide lässt den Schluss zu, dass diese Proteine *in vivo* Sesquiterpensynthesen sind. Das Gen *tps9-B73* kodiert vermutlich ein inaktives Enzym, da weder mit GPP, FPP noch GGPP eine katalytische Aktivität nachweisbar war. TPS5-B73 besitzt eine im Vergleich zu TPS4-B73 etwa 100fach verringerte *in vitro*-Enzymaktivität und ist damit praktisch ebenfalls inaktiv.

Die Insertion eines aktiven *tps5*-Allels aus der Hybridlinie Delprim in *Arabidopsis thaliana* zeigte, dass sich die Produktspektren des heterolog in *E. coli* und in *A. thaliana* exprimierten Proteins nicht wesentlich voneinander unterscheiden. Das bakterielle Expressionssystem hat offenbar keinen Einfluss auf die Produktspezifität der Enzyme und die Sesquiterpenspektren der bakteriell hergestellten Proteine sollten denen *in planta* entsprechen.

Der Vergleich der Sesquiterpenaktivität der rekombinanten Enzyme mit den in B73 identifizierten Sesquiterpengruppen ergab, dass die *in vitro*-Produkte von TPS4-B73 und TPS6-B73 identisch mit den Verbindungen der Gruppen D bzw. C der Pflanze sind. Die Terpene der Gruppe C werden ausschließlich in Wurzeln, und die der Gruppe D in Lieschblättern und Blättern adulter Pflanzen gebildet. Die Analyse der Transkriptakkumulation von *tps4* und *tps6* zeigte, dass *tps4* hauptsächlich in adulten Pflanzen und *tps6* in Wurzeln exprimiert wird (Daten für *tps6* in dieser Arbeit nicht gezeigt). Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass *in planta* die Sesquiterpene der Gruppe D von TPS4 und die der Gruppe C von TPS6 synthetisiert werden. Zwei von SCHNEE (2004) identifizierte und charakterisierte Sesquiterpensynthesen (TPS8 und TPS10) konnten aufgrund ähnlicher Merkmale eindeutig den Gruppen A und B zugeordnet werden (Tab. 4.1). Diese Ergebnisse bestätigen die Vermutung, dass jeweils nur ein Enzym an der Synthese der Sesquiterpene einer Gruppe beteiligt ist. Das in der vorliegenden Arbeit analysierte komplexe Sesquiterpen-Duftspektrum von B73-Pflanzen wird daher möglicherweise nur durch fünf Multiprodukt-Terpensynthesen gebildet.

Tabelle 4.1 gibt einen Überblick über die bislang bekannten Mitglieder der Familie der Terpensynthesen in Mais. Da die Enzymaktivität von einigen Proteinen noch nicht bestimmt wurde, ist es möglich, dass eine dieser Terpensynthesen für die Synthese der Sesquiterpene der Gruppe E verantwortlich sein könnte. Auffallend ist, dass die Produkte der bereits charakterisierten Sesquiterpensynthesen TPS7 und TPS16 nicht im Terpenspektrum von B73 gefunden werden konnten. Zwar handelt es sich bei den Hauptprodukten um Alkohole, die im Rahmen dieser Arbeit in B73 nicht analysiert wurden, die Nebenprodukte sind jedoch charakteristische STKW. Wahrscheinlich wird die Synthese dieser Enzyme durch bisher nicht systematisch untersuchte Faktoren reguliert. Denkbar wäre z.B. der Befall mit pathogenen Mikroorganismen. Ebenso gut könnten aber auch andere Herbivoren die Produktion dieser Verbindungen auslösen. Da Alkohole nicht so flüchtig wie reine STKW sind, ist eine Funktion als Fraßhemmstoff gegen diese Herbivoren vorstellbar. Letztlich kann man auch nicht ausschließen, dass die Produkte von

TPS7 und TPS16 Intermediate des Sekundärmetabolismus sind und daher nicht akkumulieren.

**Tab. 4.1 Überblick über die Familie der Terpensynthasen in Mais.** Soweit bekannt, sind die Hauptprodukte der heterolog in *E. coli* exprimierten Enzyme aufgelistet. Als Substrate wurden jeweils GPP, FPP und GGPP getestet. Die Produktspezifität von AN1 ist nur anhand von knock-out-Mutanten bestimmt worden [BENSEN *et al.*, 1995]. Die komplette cDNA der Proteine TPS13, TPS14, TPS17-20 ist derzeit noch nicht bekannt.

Protein	Hauptprodukte	Gruppe	Quelle
TPS1	( <i>E</i> )- $\beta$ -Farnesen, ( <i>E</i> )-(3 <i>R</i> )-Nerolidol	-	SCHNEE <i>et al.</i> , 2002
TPS2	( <i>E</i> )-(3 <i>S</i> )-Nerolidol, ( <i>S</i> )-Linalool	-	SCHNEE, 2004
TPS3	keine Aktivität	-	AG Degenhardt
TPS4	7- <i>epi</i> -Sesquithujen, $\beta$ -Bisabolen	Gruppe D	diese Arbeit
TPS5	Spuren von Sesquithujen	-	diese Arbeit
TPS6	unbekanntes Sesquiterpen	Gruppe C	diese Arbeit
TPS7	1,6-Germacradien-5-ol, $\delta$ -Cadinen	-	diese Arbeit
TPS8	Germacren D, $\alpha$ -Copaen, $\delta$ -Cadinen	Gruppe B	SCHNEE, 2004
TPS9	keine Aktivität	-	diese Arbeit
TPS10	( <i>E</i> )- $\beta$ -Farnesen, ( <i>E</i> )- $\alpha$ -Bergamoten	Gruppe A	SCHNEE, 2004
TPS11	keine Aktivität	-	SCHNEE, 2004
TPS12	Enzymaktivität nicht getestet	-	AG Degenhardt
TPS13	Enzymaktivität nicht getestet	-	AG Degenhardt
TPS14	Enzymaktivität nicht getestet	-	AG Degenhardt
TPS15	keine Aktivität	-	BARTSCH (unveröffentlicht)
TPS16	verschiedene Sesquiterpenalkohole	-	BARTSCH (unveröffentlicht)
TPS17	Enzymaktivität nicht getestet	-	BARTSCH (unveröffentlicht)
TPS18	Enzymaktivität nicht getestet	-	BARTSCH (unveröffentlicht)
TPS19	Enzymaktivität nicht getestet	-	BARTSCH (unveröffentlicht)
TPS20	Enzymaktivität nicht getestet	-	BARTSCH (unveröffentlicht)
AN1	<i>ent</i> -Kauren (Diterpen)	-	BENSEN <i>et al.</i> , 1995
STC1	keine Aktivität	-	SHEN <i>et al.</i> , 2000; KÖLLNER (unveröffentlicht)

#### 4.4 Die biochemischen Merkmale von Terpensynthasen aus Mais sind ähnlich denen von Terpensynthasen aus anderen Pflanzenfamilien

Eine detaillierte Analyse der Sesquiterpensynthese TPS1 ergab bereits, dass die biochemischen Charakteristika dieses Enzyms gut mit denen bekannter Terpensynthasen aus anderen Pflanzen übereinstimmen [SCHNEE *et al.*, 2002]. Die für TPS4-*B73* experimentell bestimmten Werte und kinetischen Parameter bestätigen nun die Ähnlichkeit des biochemischen Verhaltens der Maisterpensynthasen im Vergleich zu entsprechenden Enzymen anderer Angiospermen oder Gymnospermen.

TPS4-*B73* kann die Substrate GPP und FPP in mehr als zehn Monoterpene und in über zwanzig Sesquiterpene umwandeln. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit der Monoterpenbildung im Vergleich zur Sesquiterpenbildung ist jedoch, wie auch schon für

einige andere Sesquiterpensynthesen beschrieben [CROCK *et al.*, 1997; MERCKE *et al.*, 1999], verringert.

Für die katalytische Aktivität von Terpensynthesen ist im allgemeinen ein divalentes Metallkation erforderlich [BOHLMANN *et al.* 1998A]. Im Falle von TPS4-B73 werden sowohl Magnesium als auch Mangan als Cofaktor akzeptiert. Da aber die Magnesiumkonzentration in der Pflanzenzelle ca. 100fach höher ist als die Mangankonzentration [MARSCHNER, 1998], sollte *in planta* TPS4 trotz des signifikant niedrigeren  $K_m$ -Wertes für Mangan überwiegend mit Magnesium als Cofaktor operieren. Ein weiterer Hinweis dafür ist der offensichtliche Einfluss des Cofaktors auf die Produktspezifität. Wird Magnesium als Cofaktor verwendet, so stimmen die quantitativen Verhältnisse im Produktspektrum von TPS4-B73 sehr gut mit den entsprechenden Verhältnissen des von Lieschblättern abgegebenen Terpenspektrums überein. Mangan hingegen führt zur Zunahme an (*E*)- $\beta$ -Farnesen bei gleichzeitiger Abnahme der anderen Produkte. Ähnliche Effekte wurden auch für TPS5 und TPS6 beobachtet (Daten nicht gezeigt). Es ist daher wahrscheinlich, dass Magnesium der bevorzugte Cofaktor dieser Terpensynthesen in Mais ist.

#### **4.5 Die Variabilität im Terpenspektrum adulter Pflanzen der Kultivare B73 und Delprim beruht auf funktionell unterschiedlichen Allelen von *tps4* und *tps5***

Die quantitative und qualitative Zusammensetzung der in Maispflanzen gebildeten Sesquiterpengemische kann zwischen Kultivaren teils erhebliche Variationen aufweisen (GOUINGUENE *et al.*, 2001, TURLINGS *et al.*, 1998). Für diese Unterschiede gibt es zwei theoretische Erklärungen. Einerseits können in der großen Familie der Terpensynthesen einzelne Enzyme auf Ebene der Transkription oder Translation kultivarspezifisch reguliert werden. Die andere Möglichkeit ist das Vorhandensein verschiedener Alloenzyme mit veränderter katalytischer Aktivität in den einzelnen Kultivaren. Letztere Erklärung wird durch die Ergebnisse von Mutageneseexperimenten gestützt, in denen schon der Austausch einzelner Aminosäuren zu teils drastischen qualitativen als auch quantitativen Veränderungen im Produktspektrum von Terpensynthesen führte (DELIGEORGOPOLUOU & ALLEMANN, 2003; LITTLE & CROTEAU, 2002; SEEMANN *et al.*, 2002). In dieser Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass die Variabilität im Terpenspektrum von zwei verschiedenen Maiskultivaren auf funktionell unterschiedlichen Allelen zweier Gene beruht.

Seit einigen Jahren wird als Modellsystem zur Erforschung von tritrophischen Interaktionen zwischen Mais, Herbivoren und deren Parasiten die Hybridlinie Delprim eingesetzt [SCHMELZ *et al.*, 2001; SCHMELZ *et al.*, 2003; GOUINGUENE *et al.*, 2003]. Die Terpenemission von jungen Pflanzen dieser Linie ist bereits eingehend charakterisiert worden [GOUINGUENE *et al.*, 2001; GOUINGUENE & TURLINGS, 2002] und zeigt im Vergleich zu B73 keine größeren Unterschiede. Die Terpenspektren adulter Pflanzen der Kultivare Delprim und B73 unterscheiden sich jedoch signifikant voneinander. Während in B73 die Verbindung 7-*epi*-Sesquithujen das Terpenspektrum dominiert, wurde in Delprim das Diastereomer Sesquithujen als Hauptkomponente identifiziert.

Die Charakterisierung von Terpensynthasen aus Mais ergab, dass für die Bildung der Hauptterpenkomponenten adulter Pflanzen in B73 das Enzym TPS4-B73 und in Delprim das Enzym TPS5-Del1 verantwortlich ist. Erstaunlicherweise sind die Proteine trotz ihrer hohen Aminosäureidentität von 98% nicht das Resultat zweier Allele eines Locus. So konnten beide Sequenzen, *tps4-B73* und *tps5-B73*, aus einer cDNA-Bank von B73 amplifiziert werden. Da in einer Inzuchtlinie naturgemäß keine unterschiedlichen Allele vorhanden sein sollten, repräsentieren *tps4-B73* und *tps5-B73* zwei unterschiedliche Gene. Das durch heterologe Expression in *E. coli* hergestellte Protein TPS5-B73 besitzt im Vergleich zu TPS4-B73 nur eine äußerst geringe katalytische Aktivität. Es wird zwar exprimiert, was die Amplifikation aus der cDNA-Bank beweist, die geringe Aktivität steht jedoch in Übereinstimmung mit dem Fehlen der TPS5-Produkte in B73.

**Tab. 4.2 Die Variabilität im Sesquiterpenspektrum adulter Maispflanzen der Kultivare B73 und Delprim beruht auf unterschiedlichen Allelen der Gene *tps4* und *tps5*.** Die Inzuchtlinie B73 bildet TPS4-Produkte. Das heterolog in *E. coli* exprimierte *tps4*-Allel kodiert ein aktives Enzym. TPS5-B73 zeigt hingegen nach heterologer Expression praktisch keine Aktivität. Im Gegensatz dazu bildet die Hybridlinie Delprim TPS5-Produkte und besitzt ein *tps5*-Allel, welches ein aktives Enzym kodiert und ein zweites *tps5*-Allel, welches ein inaktives Enzym kodiert. Das einzige bisher aus Delprim isolierte Allel von *tps4* enthält eine Leserastermutation.

Kultivar	<i>tps4</i>	<i>tps5</i>
Inzuchtlinie B73	Allel kodiert ein aktives Enzym	Allel kodiert ein inaktives Enzym
Hybridlinie Delprim	Allel enthält eine Leserastermutation	Allel 1 kodiert ein aktives Enzym Allel 2 kodiert ein inaktives Enzym

Aus einer cDNA-Bank der Hybridlinie Delprim konnten zwei *tps5*-Sequenzen und eine *tps4*-Sequenz amplifiziert werden. Die heterologe Expression zeigte, dass nur eines der *tps5*-Allele ein katalytisch aktives Enzym kodiert. Das isolierte Gen *tps4-Del* enthält eine Leserastermutation, die ab Rest 441 zu einer veränderten Aminosäuresequenz und schließlich am Rest 461 zum Abbruch der Translation führt. Da somit ein großer Teil der das aktive Zentrum enthaltenden C-terminalen Domäne fehlt, sollte das Protein inaktiv sein. Ein zweites *tps4*-Allel, welches theoretisch in der Hybridlinie vorhanden sein muss, konnte nicht aus der cDNA-Bank isoliert oder in EST-Bibliotheken gefunden werden und wird daher vermutlich nicht transkribiert. Alle diese Resultate, zusammen mit den Ergebnissen der Analyse der Segregation einer Transposoninsertion in *tps5-B73*, sind schlüssige Hinweise für die Existenz zweier separater Gene.

#### 4.6 Zwei Aminosäureaustausche beeinflussen die Funktionalität von *tps5*-Allelen

Die Inaktivierung der nicht-funktionellen *tps4*- und *tps5*-Allele beruht auf Leserastermutationen oder auf der Verringerung der katalytischen Aktivität der entsprechenden Proteine. Um letzteren Mechanismus verstehen zu können, wurde durch *in vitro*-Mutagenese der Einfluss einzelner Aminosäuren auf die katalytische Aktivität von TPS5 untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass zwei Mutationen für den Verlust der Aktivität verantwortlich sind. Der Austausch von Valin 455 zu Glutamat verringert die Enzymaktivität auf 60% und führt zur signifikanten Erhöhung des azyklischen Produktes

(*E*)- $\beta$ -Farnesen. Die Modellierung der dreidimensionalen Struktur von TPS5 ergab, dass sich der Rest 455 im Eingangsbereich des aktiven Zentrums befindet, jedoch keinen direkten Kontakt zum Substrat hat. Das in der Nähe lokalisierte „DDxxD“-Motiv ist in die Bindung von Magnesiumionen involviert [STARKS *et al.*, 1997]. Interessanterweise resultierte der Austausch des Cofaktors von Magnesiumionen zu Manganionen ebenfalls in einer Erhöhung von (*E*)- $\beta$ -Farnesen (Daten nicht gezeigt). Offensichtlich beeinflussen beide Veränderungen die Isomerisierung des Farnesylikations und führen damit zur erhöhten (*E*)- $\beta$ -Farnesen-Bildung.

Die zweite Mutation, die die Aktivität von TPS5 beeinflusst, ist der Austausch von Arginin zu Tryptophan an Position 163 in der N-terminalen Domäne des Proteins. Die Bedeutung der N-terminalen Domäne an sich ist bereits durch Deletionsuntersuchungen [WILLIAMS *et al.*, 1998] und Domänenaustausch-Experimente [BACK & CHAPPELL, 1996] gezeigt worden. Die spezifische Funktion ist jedoch immer noch unklar. Möglicherweise vermittelt diese Domäne die korrekte Faltung des restlichen Proteins. Da Arginin 163 einen Teil der Oberfläche der N-terminalen Domäne bildet, welcher mit der C-terminalen Domäne interagiert, könnte der Austausch von Arginin zu Tryptophan zu sterischen Behinderungen der Interaktion beider Domänen und damit zur inkorrekten Faltung der C-terminalen Domäne führen.

#### 4.7 Die gegensätzliche Stereoselektivität von TPS4 und TPS5 wird durch vier Aminosäuren im aktiven Zentrum bestimmt

Die Vielfalt an unterschiedlichen Terpenen in Pflanzen ist zum großen Teil auf die Eigenschaft von Terpensynthasen zurückzuführen, mehrere Produkte aus einem Substrat herstellen zu können. Die Enzyme TPS4 und TPS5 synthetisieren jeweils mehr als 20 verschiedene Sesquiterpene und bestimmen die Diversität der Sesquiterpenemission adulter Maispflanzen. Weiterhin geben sie aber auch neue Einblicke in die Mechanismen der Variabilität von natürlichen Terpensynthasen. Beide Proteine produzieren zwar ein qualitativ identisches Sesquiterpengemisch, besitzen aber eine unterschiedliche Stereoselektivität. In den Produktspektren von TPS4 und TPS5 konnten die Stereoisomerenpaare 7-*epi*-Sesquithujen und Sesquithujen, (*E*)- und (*Z*)- $\alpha$ -Bergamoten, Sesquisabinen A und Sesquisabinen B, (*S*)- und (*R*)- $\beta$ -Curcumen sowie (*S*)- und (*R*)- $\gamma$ -Curcumen identifiziert werden. Während nun TPS4 die jeweils erstere Verbindung bevorzugt bildet, sind die Verhältnisse im Produktspektrum von TPS5 umgekehrt. Für *Pinus taeda* und *Solidago canadensis* ist bereits die Existenz von Terpensynthasen beschrieben worden, die Produkte mit gegensätzlicher Stereochemie synthetisieren [PHILLIPS *et al.*, 2003; SCHMIDT *et al.*, 1999]. Das Enzympaar (-)- $\alpha$ -Pinensynthase und (+)- $\alpha$ -Pinensynthase aus *P. taeda* besitzt aber im Gegensatz zu TPS4 und TPS5 nur 66% Identität auf Aminosäureebene. Angaben zur Sequenzverwandtschaft der (-)-Germacren D-Synthase und (+)-Germacren D-Synthase aus *S. canadensis* sind bisher nicht veröffentlicht worden. Ein weiterer Unterschied zu TPS4 und TPS5 ist, dass sowohl die zwei Pinensynthasen als auch die zwei Germacren D-Synthasen jeweils nur ein Hauptprodukt bilden.

Aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeit von TPS4 und TPS5 war es möglich, durch *in vitro*-Mutagenese die Aminosäuren, die für die unterschiedliche Stereoselektivität verantwortlich sind, zu identifizieren. Aus Strukturmodellen konnte geschlossen werden, dass die Aminosäuren eines für TPS4 und TPS5 charakteristischen Sequenzmotivs (TPS4: „TIATI“; TPS5: „SIGAN“) am Aufbau des aktiven Zentrums beteiligt sind. Tatsächlich führte die Umwandlung des „SIGAN“-Motivs von TPS5 zum „TIATI“-Motiv zu einer mit TPS4 vergleichbaren Produktspezifität. Die Aminosäuren 407, 409, 410 und 411 bestimmen demnach die Stereoselektivität beider Enzyme. Werden diese Aminosäuren jeweils einzeln umgewandelt, so führt nur der Austausch an Position 409 (TPS5: Glycin; TPS4: Alanin) zu einer signifikanten Veränderung im Produktspektrum. Die Modelle zeigen, dass sich der Rest 409 in einem hochkonservierten Knick einer Helix befindet, welche den Boden des aktiven Zentrums bildet und in der Kristallstruktur der 5-*epi*-Aristolochensynthase aus *Nicotiana tabacum* [STARKS et al., 1997] als Helix G bezeichnet wird. Die Mutation von Glycin zu Alanin an Position 409 könnte einerseits über die Methylgruppe des Alanin die Form der Wand des aktiven Zentrums verändern, aber andererseits auch den Abstand zweier Helices beeinflussen, die die Seitenwände der Tasche bilden. Eine weitere Vergrößerung der Aminosäureseitenkette an Position 409 führt zur völligen Inaktivierung des Enzyms.

#### 4.8 Die Gene *tps4* und *tps5* sind vermutlich durch Genverdopplung aus einem zu *tps5* ähnlichen Ursprungsgen entstanden

Eine Kartierung von Terpensynthasegenen aus Mais ergab, dass *tps4* und *tps5* sehr nah beieinander auf Chromosom 10 liegen [SCHNEE, 2004]. Dies und die hohe Sequenzidentität von über 98% lassen den Schluss zu, dass beide Gene durch Genverdopplung und anschließende Divergenz aus einem gemeinsamen Vorläufer entstanden sind. Mit der Annahme einer Mutationsrate von  $6,5 \times 10^{-9}$  synonymen Substitutionen pro synonymen Positionen pro Jahr für Mais [GAUT et al., 1996] kann nach GAUT und DOEBLY (1997) eine Divergenzzeit von ca. 3 Millionen Jahren berechnet werden. Das Verhältnis von nicht-synonymen Substitutionen pro nicht-synonymer Positionen zu synonymen Substitutionen pro synonymer Positionen von  $\omega = 0,25$  lässt vermuten, dass *tps4* und *tps5* nur unter geringem Selektionsdruck stehen.

Die Genduplikation ist eine der Grundlagen für die Ausbildung der hohen Diversität der Terpenbiosynthese [AUBORG et al., 2002; FACCHINI & CHAPPELL, 1992; van der HOEVEN, 2000]. Viele weiteren Gene des Sekundärmetabolismus scheinen ebenfalls durch Genverdopplung entstanden zu sein [PICHERSKY & GANG, 2000; KLIEBENSTEIN et al., 2001; REINTANZ et al., 2001; KROYMANN et al., 2002; CLAUSS & MITCHELL-OLDS, 2003].

Über die Funktion der von TPS4 und TPS5 gebildeten Produkte kann derzeit nur spekuliert werden. Daher ist es eher von theoretischem Interesse, welchen Phänotyp das Ursprungsgen ausgeprägt hat. Die Terpenanalyse in Sämlingen verschiedener Süßgräserarten der Gattungen *Tripsacum*, *Sorghum*, *Pennisetum* und *Setaria* ergab, dass, mit einer Ausnahme, keine Produkte gebildet werden, die auf ein aktives TPS4 oder TPS5

hinweisen (unveröffentlichte Ergebnisse). In der Wurzel von *Setaria verticillata* kann jedoch ein zu TPS5 ähnliches Terpenmuster durch die Applikation eines künstlichen Elicitors induziert werden (unveröffentlichte Ergebnisse). Da die Divergenzzeit der Gattungen *Setaria* und *Zea* auf etwa 28 Millionen Jahre geschätzt wird [GAUT, 2002], die Genverdopplung, die zur Bildung von *tps4* und *tps5* führte, wahrscheinlich aber erst vor ca. 3 Millionen Jahren stattfand, ist anzunehmen, dass das ursprüngliche Gen den *tps5*-Phänotyp besaß.

#### 4.9 Die Diversität der Produktbildung von TPS4 und TPS5 lässt sich durch hypothetische Reaktionsmechanismen erklären

Studien zum Reaktionsmechanismus der Limonensynthese in *Mentha* [COLBY *et al.*, 1993], der 5-*epi*-Aristolochensynthese in *Piper* [RISING *et al.*, 2000] und einiger anderer Terpensynthesen zeigen, dass die enzymkatalysierte Bildung von Terpenen über eine Serie hochreaktiver carbokationischer Intermediate verläuft [CANE, 1990]. Die vielfältigen Reaktionsmöglichkeiten (Hydridverschiebungen, Zyklisierungen, Deprotonierung) dieser Intermediate auf jeder Ebene der gesamten Reaktion können die Fähigkeit von Terpensynthesen erklären, aus einem Substrat mehrere Produkte zu bilden.

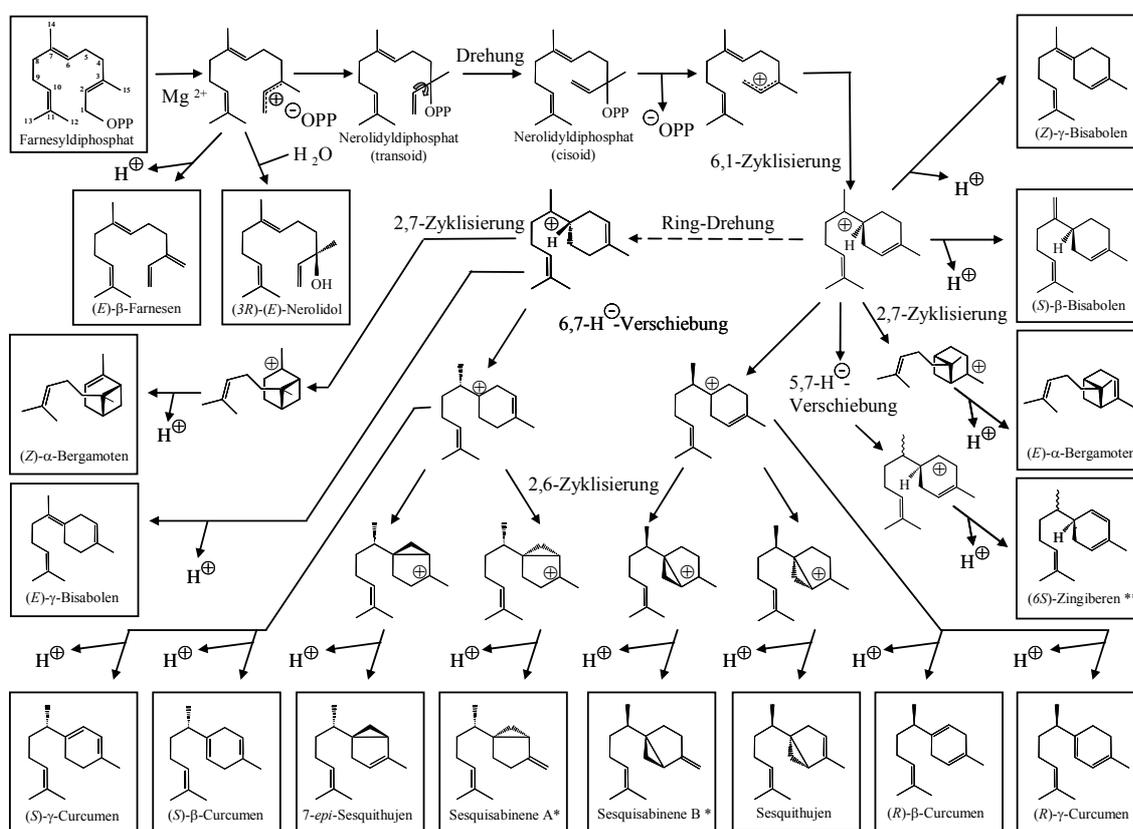
Um die unterschiedliche Stereoselektivität von TPS4 und TPS5 verstehen zu können, wurde, basierend auf den allgemeinen carbokationischen Mechanismen der Terpenbildung [CANE 1999], ein für beide Enzyme zutreffendes hypothetisches Reaktionsschema entworfen (s. Abb. 3.19). Nach der Ionisierung des Substrates durch Abspaltung der Pyrophosphatgruppe kann das resultierende Carbokation zum (*E*)- $\beta$ -Farnesen deprotoniert werden. Der Hauptteil wird jedoch über das Nerolidyldiphosphat und durch anschließende 1,6-Zyklisierung zum Bisabolylkation umgewandelt. Dieses Intermediat entsteht sowohl in der (*6S*)- als auch (*6R*)-Konfiguration. Ausgehend von beiden Bisabolylkationen führen verschiedene Hydridverschiebungen und Zyklisierungen zu den von TPS4 und TPS5 gebildeten Terpengrundgerüsten. Eine Deprotonierung der Intermediate zu den entsprechenden olefinischen Produkten der Enzyme erfolgt auf jeder Ebene der Reaktion.

Auffällig ist eine Symmetrie im Reaktionsmechanismus. Sowohl das (*R*)- als auch das (*S*)-Bisabolylkation führen zu einer nahezu analogen Mischung von Produkten. So gibt es, mit Ausnahme des (*S*)- $\beta$ -Bisabolens, für jedes der aus dem (*S*)-Bisabolylkation entstandenen Produkte einen entsprechenden, aus dem (*R*)-Bisabolylkation gebildeten Gegenpart. Die gegensätzliche Stereoselektivität von TPS4 und TPS5 kann durch die unterschiedliche Bildung der (*R*)- bzw. (*S*)-Form des Bisabolylkations im aufgestellten Reaktionsmechanismus erklärt werden. So stammen im Falle von TPS5 knapp 95% der Produkte, die aus dem Bisabolylkation entstehen von der (*S*)-Form und nur ca. 5% von der (*R*)-Form ab. Die entsprechenden von TPS4 synthetisierten Produkte werden hingegen zu 50% aus der (*S*)-Form und 50% aus der (*R*)-Form gebildet.

Im Gegensatz zur großen Produktvielfalt von TPS4 und TPS5 steht aber die Tatsache, dass beide Enzyme ausschließlich (*S*)- $\beta$ -Bisabolen bilden. Dies ist um so überraschender, da ansonsten auf fast allen Stufen der Reaktion durch die Deprotonierung der verschiedenen Intermediate Produkte entstehen. Es wurde daher versucht, einen alternativen

Reaktionsmechanismus aufzustellen, der das stereoselektive Verhalten beider Enzyme auch ohne die Bildung des (*R*)-Bisabolykations erklären kann.

In Abbildung 4.2 ist ein alternativer Reaktionsmechanismus für die Enzyme TPS4 und TPS5 dargestellt. Die Isomerisierung des Nerolidyldiphosphates und die 1,6-Zyklisierung führen ausschließlich zur Bildung des (*S*)-Bisabolykations. Aus diesem entstehen, wie oben schon diskutiert, durch Hydridverschiebungen, Zyklisierungen und Deprotonierung die TPS5-Hauptprodukte (*S*)- $\beta$ -Bisabolen und Sesquithujen sowie die entsprechenden Nebenprodukte. Die Rotation des Methylcyclohexenylrests um die C6-C7-Bindung im (*S*)-Bisabolykation resultiert in einer Konformation dieses Intermediates, aus der die Produkte wie z.B. 7-*epi*-Sesquithujen entstehen können, die sich im zuerst vorgeschlagenen Mechanismus vom (*R*)-Bisabolykation ableiten. Die unterschiedliche Stereoselektivität von TPS4 und TPS5 kann man dadurch erklären, dass im Fall von TPS4 ca. 50% des Bisabolykations über die Ringdrehung in die alternative Konformation überführt werden, während in TPS5 die Ringdrehung fast vollständig behindert ist.



**Abb. 4.2** Ein alternativer Reaktionsmechanismus für die Enzyme TPS4 und TPS5. Für die mit (\*) gekennzeichneten Verbindungen ist die absolute Konfiguration nicht bekannt. Die in diesem Schema vorgeschlagenen Konfigurationen ergeben sich aus dem Reaktionsmechanismus. Mit (\*\*) markierte Stereoisomere wurden nicht voneinander getrennt.

Die beiden vorgeschlagenen Reaktionsmechanismen sind rein hypothetischer Natur. Im ersten Falle ist es schwierig, die angenommene Reaktion über das Intermediat (*R*)-Bisabolykation mit der Tatsache in Übereinstimmung zu bringen, dass sowohl TPS4 als auch TPS5 kein (*R*)- $\beta$ -Bisabolen bilden. Andererseits ist die im alternativen Mechanismus

stattfindende Drehung des Methylcyclohexenylrests, d.h. die Rotation um die C6-C7-Bindung, durch das Carbokation an C7 behindert und kann somit nur durch zusätzliche Hydridverschiebungen oder über eine der Isomerisierung des Farnesylkations am Beginn der katalytischen Kaskade analogen Reaktion stattfinden.

#### **4.10 Die Modellierung von Enzym-Substrat- und Enzym-Intermediat-Komplexen gibt einen Einblick in das aktive Zentrum von TPS4**

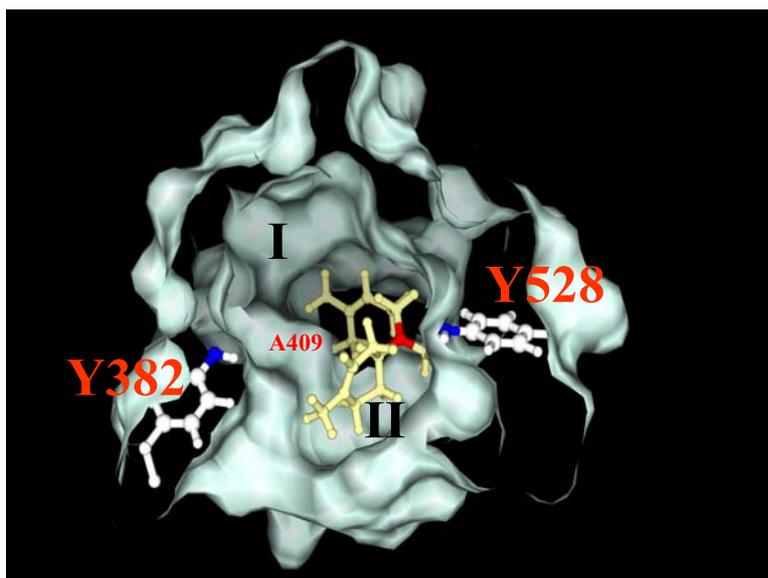
Durch die Modellierung von Enzym-Substrat- und Enzym-Intermediat-Komplexen ist es möglich, Aussagen zu Struktur-Funktionsbeziehungen einzelner Aminosäurereste im aktiven Zentrum von Terpensynthasen zu erhalten. Basierend auf Kristallstrukturen wurden solche Experimente bereits an der Aristolochensynthase aus *Penicillium roqueforti* [CARUTHERS *et al.*, 2000; DELIGEORGOPPOPOULOU & ALLEMANN, 2003], der Trichodiensynthase aus *Fusarium sporotrichioides* [RYNKIEWICZ *et al.*, 2001; RYNKIEWICZ *et al.*, 2002], der Pentalenensynthase aus *Streptomyces* UC5319 [LESBURG *et al.*, 1998], der Bornyldiphosphatsynthase aus *Salvia officinalis* [WHITTINGTON *et al.*, 2002] und der 5-*epi*-Aristolochensynthase aus *Nicotiana tabacum* [STARKS *et al.*, 1997] durchgeführt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die strukturellen Grundlagen der Produktspezifität von TPS4 und TPS5 mittels *in silico*-Modellierungsexperimenten analysiert und die erhaltenen Modelle durch *in vitro*-Mutagenese verifiziert werden.

Da der Versuch der Kristallisierung von TPS4 und TPS5 bisher zu keinem Resultat führte (Daten nicht gezeigt), konnten zur Erzeugung von Proteinstrukturmodellen nur homologiebasierende Modellierungsverfahren angewendet werden. Der Vergleich von *in silico*- und *in vitro*-Mutagenesergebnissen am Beispiel der Aminosäuren Threonin 301 und Leucin 413 zeigt aber, dass die erhaltenen Modelle wahrscheinlich die reale Struktur des aktiven Zentrums abbilden. Der Austausch von Threonin 301 zu Tryptophan führt zur fast vollständigen Inaktivierung von TPS4. Die Computeranalyse dieser Mutation ergab, dass es für die große Tryptophanseitenkette aufgrund sterischer Behinderungen keine energetisch günstige Konformation im aktiven Zentrum gibt. Wird jedoch die Seitenkette einer benachbarten Aminosäure verkleinert (Umtausch Leucin 413 zu Alanin), so kann durch den entstehenden Platz die Tryptophanseitenkette energetisch günstig positioniert werden. Tatsächlich resultierte der gemeinsame Austausch von Threonin 301 zu Tryptophan und Leucin 413 zu Alanin in einem Protein mit identischer Aktivität im Vergleich zur Einzelmutante Leucin 413 Alanin.

Im Strukturmodell von TPS4 befinden sich die an der Katalyse beteiligten Aminosäuren des „DDxxD“-Motivs und des „TIATI“-Motivs in der Wand eines großen Hohlraums, in dem es rein räumlich betrachtet mehrere Möglichkeiten zur Aufnahme des Substrates gibt. Die genaue Lokalisierung des aktiven Zentrums erfolgte daher durch *in vitro*-Mutagenese. Diese ergab, dass das Substrat mit großer Wahrscheinlichkeit im Bereich zwischen dem „DDxxD“-Motiv, dem „TIATI“-Motiv und Threonin 301 bindet. Aufbauend auf diesen Daten war es möglich, die Konformation und Lage einzelner Intermediate und Produkte im aktiven Zentrum zu modellieren (Abb. 4.3).

Am Boden des aktiven Zentrums bilden die Aminosäuren des „TIATI“-Motivs eine Art Grat, der das aktive Zentrum in zwei etwa gleich große Taschen teilt. Während der Reaktion vom FPP zum (*S*)- $\beta$ -Bisabolen über das Intermediat (*S*)-Bisabolylkation befindet sich das Kohlenstoffskelett des Substrates bzw. das der Intermediate ausschließlich in Tasche II. Eine Konformationsänderung des (*S*)-Bisabolylkations kann jedoch dazu führen, dass der Kopf des Intermediates mit dem Methylcyclohexenylrest in die Tasche I des aktiven Zentrums verschoben wird und hier die Reaktion zum Sesquithujangrundgerüst stattfindet.



**Abb. 4.3 Strukturmodell des aktiven Zentrums von TPS4-B73 mit dem Intermediat (*S*)-Bisabolylkation.** Die beiden Taschen des aktiven Zentrums (Tasche I und II) werden durch einen Grat voneinander getrennt, welcher von den Aminosäuren des „TIATI“-Motivs gebildet wird (Alanin 409 ist gezeigt). Die Seitenketten der Tyrosinreste Y382 und Y528 sind dargestellt.

In den Seitenwänden beider Taschen befindet sich unter anderem je ein Tyrosinrest. Eine Stabilisierung der Carbokationen über Kation- $\pi$ -Komplexe mit den Tyrosinseitenketten ist zwar auf Grund der ungünstigen Geometrie dieser Seitenketten zu den Carbokationen relativ unwahrscheinlich [LESBURG *et al.*, 1998], die zum Substrat hin ausgerichteten Tyrosin-Hydroxylgruppen könnten jedoch die Carbokationenbildung beeinflussen. Der Austausch von Tyrosin 528 in Tasche II zu Phenylalanin oder Leucin beeinflusst die Produktspezifität von TPS4 nicht wesentlich, führt aber zu einer im Vergleich zum Wildtyp verringerten Enzymaktivität (ca. 2%). Daher kann man spekulieren, dass die Hydroxylgruppe von Tyrosin 528 möglicherweise schon an der Stabilisierung des durch die Abspaltung der Pyrophosphatgruppe entstehenden Farnesylkations beteiligt ist und damit unmittelbar die gesamte Produktbildung beeinflusst. Eine eventuelle Kation- $\pi$ -Komplex-Interaktion kann durch die Tatsache ausgeschlossen werden, dass sich der Phänotyp der Mutante TPS4 (Y528L) trotz Fehlens des aromatischen Ringsystems nicht wesentlich vom Phänotyp der Mutante TPS4 (Y528F) unterscheidet. Ob Tyrosin 528 nun auch, wie angenommen, das (*S*)-Bisabolylkation stabilisiert, ist unklar. Die in Relation zu

7-*epi*-Sesquithujen leicht erhöhte Bildung von (*S*)- $\beta$ -Bisabolen durch die Mutanten TPS4 (Y528L) und TPS4 (Y528F) spricht allerdings eher dagegen. Die Ergebnisse der Mutationen von Tyrosin 382 in Tasche I zu Phenylalanin oder Leucin bestärken die Vermutungen, dass die 2,6-Zyklisierung zum Sesquithujangrundgerüst in Tasche I stattfindet und dass die Hydroxylgruppe von Tyrosin 382 die beteiligten Carbokationen stabilisieren kann. So ist die Bildung der Sesquithujane stark verringert, während die Synthese von (*S*)- $\beta$ -Bisabolen nicht beeinflusst ist.

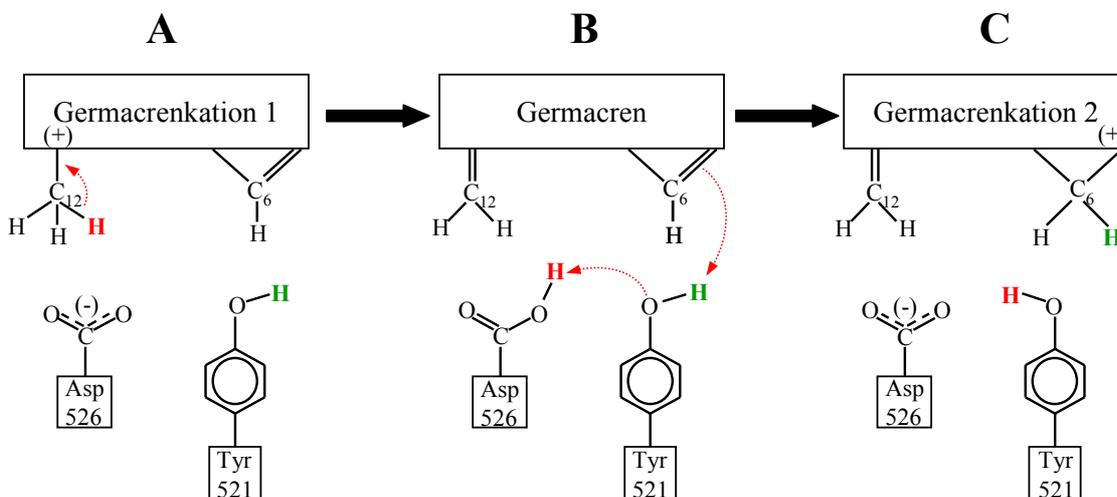
Die Stereoselektivität von TPS4 und TPS5 wird durch die vier Aminosäuren im „TIATI“- bzw. „SIGAN“-Motiv bestimmt. Durch *in vitro*-Mutagenese konnte gezeigt werden, dass sich hierbei offensichtlich Alanin 409 (TPS4) bzw. Glycin 409 (TPS5) in einer Schlüsselposition befinden. Da die Methylgruppe von Alanin 409 in das aktive Zentrum von TPS4 hineinragt, ist zu vermuten, dass die unterschiedliche Stereoselektivität auf sterischen Behinderungen im aktiven Zentrum beruht. Aus den im Kapitel 4.9 diskutierten Reaktionsmechanismen geht hervor, dass im Fall von TPS4 entweder zusätzlich zum (*S*)-Bisabolylkation auch das (*R*)-Bisabolylkation entstehen müsste, oder aber es zu einer Konformationsänderung des (*S*)-Bisabolylkations kommt. In beiden Fällen sollte dafür im aktiven Zentrum von TPS4 rein theoretisch mehr Platz benötigt werden als in TPS5. Der sich daraus ergebende Widerspruch, der größere Platzbedarf auf der einen Seite und eine zusätzliche platzbeanspruchende Methylgruppe auf der anderen Seite, konnte durch die Modellierungsexperimente nicht geklärt werden. Es bleibt zu hoffen, dass zukünftige analoge Modellierungsexperimente mit TPS5 und der sorgfältige Vergleich der Modelle von TPS4 und TPS5 hier zu mehr Klarheit führen werden.

#### **4.11 Das Produktspektrum von TPS7 kann durch Mutagenese gezielt verändert werden**

Die durch die 5-*epi*-Aristolochensynthase (TEAS) aus *Nicotiana tabacum* katalysierte Umwandlung von FPP zu 5-*epi*-Aristolochen verläuft über das enzymgebundene, stabile Intermediat Germacren A [CANE, 1990]. Eine Protonierung von Germacren A an C6 führt zu einem Carbokation, aus welchem über eine Hydridverschiebung und anschließende Zyklisierung das Eudesman- oder Guajangrundgerüst entsteht. Ausgehend von der TEAS-Kristallstruktur vermuten STARKS und Mitarbeiter (1997), dass die Hydroxylgruppe von Tyrosin 520 im Zusammenwirken mit den zwei Aspartatseitenketten Asp 444 und Asp 525 als Protonendonator an der Aktivierung von Germacren A beteiligt ist. Diese drei Aminosäuren bilden die sogenannte „katalytische Triade“ von TEAS [STARKS *et al.*, 1997]. Obwohl die Maisterpensynthase TPS7 nur 32% Identität auf Aminosäureebene zu TEAS besitzt, sind die beiden entsprechenden Aspartatreste in TPS7 (Asp 446, Asp 526) konserviert. An Stelle des Tyrosins befindet sich allerdings der Phenylalaninrest 521, eine, bis auf das Fehlen der Hydroxylgruppe, zu Tyrosin identische Aminosäure. Da das Hauptprodukt von TPS7 ein Germacren-Alkohol ist, war zu vermuten, dass im Reaktionsverlauf ein Germacrenkation entsteht und dass eine Protonierung dieses Intermediates auf Grund der fehlenden Hydroxylgruppe an Position 521 nicht stattfinden kann. Durch *in vitro*-Mutagenese sollte daher versucht werden, eine zu TEAS homologe

katalytische Triade in TPS7 zu erzeugen und die Funktion beider Aspartatreste zu untersuchen.

Der Austausch von Phenylalanin 521 zu Tyrosin führte tatsächlich zu einem Protein, welches offenbar Germacrenintermediate protonieren kann und dadurch Produkte mit Eudesman- und Guajangrundgerüst bildet. Durch die Mutation von Aspartat 526 zu Asparagin konnte weiterhin gezeigt werden, dass das Aspartat an dieser Position essentiell für die Protonierungsreaktion ist. In dem von STARKS und Mitarbeitern (1997) vorgeschlagenen Mechanismus für TEAS fungiert Asp 525 als Protonenakzeptor der Deprotonierung vom Germacrenkation zum Germacren A. Nachdem die Carboxylgruppe von Aspartat 444 das Proton der Hydroxylgruppe von Tyrosin 520 gebunden hat, akzeptiert der phenolische Sauerstoff das Proton von Aspartat 525. Von hier erfolgt schließlich die Protonierung des Germacren A-Intermediates. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass in TPS7 die Seitenkette von Aspartat 446, entgegen den Erwartungen, offenbar nicht in diesen Prozess involviert ist. Daher wurde ein Modell für einen vereinfachten Mechanismus entworfen (Abb. 4.4). Nach diesem Modell fungiert die Carboxylgruppe von Aspartat 526 wie auch in TEAS als Protonenakzeptor und bindet das Proton vom C12 des Germacrenkation (Abb. 4.4.A). In einer konzertierten Aktion wird dieses Proton nun auf den Sauerstoff des Tyrosins übertragen und das Hydroxylgruppenproton kann an die C6-C7-Doppelbindung des Germacren angelagert werden (Abb. 4.4.B und C).



**Abb. 4.4 Mechanistisches Modell der Protonierung von Germacrenintermediaten durch die Terpensynthase TPS7-B73 (F521Y).** Ein Proton vom Kohlenstoffatom 12 des Germacrenkation 1 wird durch die Carboxylgruppe der Seitenkette von Aspartat 526 aufgenommen (A) und auf das Sauerstoffatom der Seitenkette von Tyrosin 521 übertragen (B). Gleichzeitig wird das Hydroxylgruppenproton von Tyrosin 521 an das Kohlenstoffatom 6 des Germacrens angelagert (C). Dies resultiert in der Bildung des Germacrenkation 2.

Der Aktivitätsverlust der Einzelmutanten TPS7 (D446N) und TPS7 (D525N) ist nicht erklärbar. Da im Prinzip alle Produkte betroffen sind, kann spekuliert werden, dass die Carboxylgruppen der Aspartate eventuell über Ladungsinteraktionen das Farnesylierung

als erstes Intermediat der katalytischen Kaskade stabilisieren. Dagegen spricht aber die hohe katalytische Aktivität der beiden Doppelmутanten TPS7 (D446N, F521Y) und TPS7 (D525N, F521Y). Die Tatsache, dass TPS7 als Hauptprodukt einen Alkohol bildet, lässt vermuten, dass im aktiven Zentrum ein Wassermolekül gebunden ist. Dieses könnte z.B. über Wasserstoffbrücken durch die Carboxylgruppen der Aspartate fixiert sein und somit einen Teil der Oberfläche des aktiven Zentrums bilden. Der Austausch der Aspartate zu Asparagin würde diese Wechselwirkungen stören und damit auch zur verringerten Aktivität der Mutanten führen können.

Neuere Studien an TEAS zeigen, dass neben der katalytischen Triade auch die Aminosäure Cystein 440 in Verbindung mit einem Wassermolekül an der Protonierung des Germacren A-Intermediates beteiligt ist [O'MAILLE & NOEL, 2003]. Anstelle von Cystein befindet sich in TPS7 ein Serin, das aufgrund des hohen pK-Wertes der Hydroxylgruppe (pK ~ 13) im Gegensatz zur Thiolgruppe des Cysteins (pK 8.3) nicht als Protonendonator agieren kann. Da nun die Mutation von Serin 442 zu Cystein oder zu Alanin (Daten nicht gezeigt) das Produktspektrum von TPS7 nicht wesentlich verändert, ist ein zu TEAS analoger Mechanismus eher unwahrscheinlich. Die im Vergleich zu TPS7 (F521Y) verdoppelte katalytische Aktivität der Mutante TPS7 (S442C, F521Y) weist zwar auf eine zusätzliche Protonierungsaktivität hin, kann aber auch durch eventuelle Änderungen der Konformation und/oder der Oberfläche des aktiven Zentrums, die auf dem Serin-Cystein-Austausch beruhen, erklärt werden.

AAC39431 (Germacren C)	441	ARAMNDIVGHED ...	516	VADTLYKEK.	DTYTNAKG ...
CAC36896 (Germacren A)	442	SRIMNDIVGHKE ...	517	VMDMLYKNG.	DNLKNVGO ...
AAM11627 (Germacren A)	450	SRLQDDVMTYQF ...	525	MIDVVYRYD.	DGFTFP GK ...
AAM11626 (Germacren A)	452	SRLQDDVMTYQF ...	527	MIDVVYRYD.	DGFTFP GK ...
AAM21659 (Germacren A)	451	SRLQDDVMTYQF ...	526	MIDVVYRYD.	DGFTFP GK ...
AAM21658 (Germacren A)	473	SRLQDDVMTFQF ...	548	MIDVVYKFD.	DGFTFP GK ...
AAG41892 (Germacren D)	439	GRAMDDIVGHEV ...	514	VIDTLYQEE.	DEYTNAKG ...
AAG41891 (Germacren B)	437	ARAMNDIVGHEV ...	512	AAEPLYKEK.	DAYTNAKG ...
A56118 ( <u>Vetispiradien</u> )	412	CRVVDIATYEV ...	487	IIDVTYKHNQD	DGYTHPEK ...
AAO85555 ( <u>5-epi-Aristol.</u> )	440	CRVIDDTATYEV ...	515	IVEVTYIHNLD	DGYTHPEK ...
Q40577 ( <u>5-epi-Aristol.</u> )	440	CRVIDDTATYEV ...	515	IVEVTYIHNLD	DGYTHPEK ...
AAK83561* (Germacren B)	469	GRITDDLKDFED ...	545	GLQFLYKYR.	DGLYISDK ...
AAC05727* (Germacren B)	471	GRIADDLKDFED ...	547	GLQFIYKYR.	DGLYISDK ...
TPS7-B73 (Germacrenalkohol)	442	SRFMDMSAFKN ...	516	SMTLLFLDKR	DAYTYSKD ...

**Abb. 4.5** Ausschnitt aus dem Aminosäuresequenzvergleich aller bisher veröffentlichten pflanzlichen Sesquiterpensynthasen, in deren Reaktionsmechanismus Germacrenintermediate vorkommen. Der Zugriffscode (accession number) für die NCBI-Proteindatenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) und das jeweilige Sesquiterpenhauptprodukt der Proteine sind angegeben. Die Positionen der Aminosäuren der katalytischen Triade von TEAS (Q40577) sind mit einem „▼“ markiert. Die Reaktion von FPP zu den unterstrichen dargestellten Produkten verläuft über ein Germacren A-Intermediat. Die beiden mit \* gekennzeichneten Enzyme wurden ursprünglich als  $\delta$ -Selinensynthasen identifiziert [STEELE *et al.*, 1998A]. Sie bilden aber nach neueren Erkenntnissen als Hauptprodukt Germacren B und als Nebenprodukt  $\delta$ -Selinin [LITTLE & CROTEAU, 2002].

In Abbildung 4.5 ist ein Ausschnitt aus einem Aminosäuresequenzvergleich aller bisher veröffentlichten pflanzlichen Terpensynthasen dargestellt, die ein Germacrangrundgerüst oder davon abgeleitete Grundgerüste herstellen. Auffällig ist, dass in den meisten

Germacrensynthasen die Aminosäuren für eine katalytische Triade vorhanden sind. Da diese Enzyme aber offensichtlich nicht in der Lage sind, Germacrenintermediate zu protonieren, müssen noch andere Faktoren für einen funktionsfähigen Protonierungsmechanismus existieren. So könnte beispielsweise die räumliche Lage der beteiligten Aminosäureseitenketten dieser Enzyme im Vergleich zu TEAS verändert sein. Das Fehlen einer Aminosäure zwischen dem Tyrosin und dem zweiten Aspartat in allen betrachteten Enzymen, mit Ausnahme der 5-*epi*-Aristolochensynthasen, der Vetispiradiensynthase und TPS7, deutet auf solch einen Fall hin.

Ob im Gegensatz zur Hypothese der katalytischen Triade von STARKS und Mitarbeitern (1997) in die Protonierung von Germacrenintermediaten im allgemeinen nur zwei Aminosäuren involviert sind, lässt sich heute noch nicht sagen. Da die kürzlich aus Mais isolierte Selinenalkohol-Synthase TPS16 [BARTSCH & DEGENHARDT, unveröffentlicht] an Stelle des ersten Aspartats (D444 in TEAS) ein Asparagin besitzt, ist es denkbar, dass sich in dieser Maisterpensynthase eine „katalytische Diade“, wie für TPS7 (F521Y) angenommen, entwickelt hat. Ebenso gut könnte aber auch ein Wassermolekül im aktiven Zentrum von TPS16 und TPS7 (F521Y) die Funktion der Carboxylgruppe des Aspartats übernehmen. Beide Enzyme produzieren als Hauptprodukte Sesquiterpenalkohole und sollten daher mindestens ein Wassermolekül im aktiven Zentrum binden.

#### 4.12 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass für die komplexe Terpenbiosynthese in Mais offenbar nur wenige Typen von katalytisch aktiven Terpensynthasen verantwortlich sind. Im Gegensatz dazu steht jedoch die Tatsache, dass Mais eine große Terpensynthase-Genfamilie besitzt. Dass funktionelle und nicht-funktionelle Allele eine wichtige Rolle in der Regulation der Terpenbiosynthese spielen, wird am Beispiel verschiedener Allele der zwei Proteine TPS4 und TPS5 deutlich. Eine differentielle Transkription der Mitglieder der Genfamilie in den einzelnen Maiskultivaren ist aber vermutlich ebenfalls von Bedeutung. Durch Messung der Transkriptakkumulation mittels Northern Blot oder quantitativer PCR sollte es möglich sein, die Transkriptionsmuster in unterschiedlichen Kultivaren zu analysieren und mit den entsprechenden Terpenemissionsspektren zu vergleichen. Aus den Ergebnissen könnte gefolgert werden, mit welchen Anteilen die funktionell unterschiedlichen Allele auf der einen Seite und die differentielle Transkription auf der anderen Seite die Komplexität der Terpenbiosynthese in Mais bestimmen.

Neben den genetischen Aspekten der Regulation der Terpenbiosynthese wurden im Rahmen dieser Arbeit auch die molekularen Mechanismen der Produktbildung von Terpensynthasen untersucht. Die beschriebenen Proteine sind Multiprodukt-Enzyme und bilden mit dieser Eigenschaft die Grundlage der Terpendiversität in Mais. Durch Modellierung der dreidimensionalen Strukturen und *in vitro*-Mutagenese konnten Einblicke in einzelne Schritte der Reaktionsmechanismen erhalten werden. Es sind aber auch die Grenzen dieser Methoden deutlich geworden. Die Mutation einer Aminosäure im aktiven Zentrum führt nicht nur zum Austausch einer funktionell wichtigen Gruppe, sie verändert auch immer die Form der Oberfläche des aktiven Zentrums. Die beobachteten

Effekte können daher auf komplexen Veränderungen beruhen und sind nicht leicht zu interpretieren. Im Fall von TPS7 ist geplant, das aufgestellte mechanistische Modell der Protonierung von Germacrenintermediaten durch den Einsatz von unterschiedlich deuterierten Substraten zu untersuchen. Die massenspektrometrische Analyse der Reaktionsprodukte soll hierbei Aufschluss darüber geben, ob ein vom Intermediat abgespaltenes Deuterium am Protein verbleibt oder aber, wie für TEAS postuliert [STARKS *et al.*, 1997], wieder an anderer Position an das Germacren angelagert wird. Analog dazu kann eine eventuelle Beteiligung eines Wassermoleküls durch Einsatz von Deuteriumoxid analysiert werden. Letztliche Gewissheit über die Vorgänge im aktiven Zentrum wird aber nur die Cokristallisierung der Terpensynthesen mit nicht hydrolysierbaren Substratanaloga oder Intermediaten erbringen.

Ein weites Feld für zukünftige Arbeiten ist die Vorhersage von Produktprofilen aus den Aminosäuresequenzen von Terpensynthesen und, eng damit verbunden, die gezielte Konstruktion neuer Terpensynthesen für wissenschaftliche und kommerzielle Anwendungen. Die Arbeiten an TPS7 zeigen, dass dies in Einzelfällen bereits möglich ist. Über die konkrete biologische Funktion von Maisterpenen ist derzeit wenig bekannt. Die nach Raupenbefall abgegebenen Stoffgemische können parasitische Schlupfwespen anlocken, enthalten neben vielen Terpenen aber auch andere Bestandteile. Das Ausschalten einzelner Terpensynthasegene in der Pflanze und die olfaktometrische Analyse der entsprechenden Phänotypen ist ein Weg, die eventuelle Funktion von Terpenen in diesem tritrophischen System zu untersuchen. Da die Transformation von Mais aber sehr zeitaufwendig und schwierig durchzuführen ist, könnten als Alternative Terpensynthasegene aus Mais in *Arabidopsis*-Pflanzen heterolog exprimiert werden und die Attraktivität der Duftspektren transgener Pflanzen im Olfaktometer analysiert werden. Das dies praktisch möglich ist, zeigt die in dieser Arbeit erzeugte transgene *Arabidopsis*-Mutante.

## 5 Zusammenfassung

Mais produziert wie die meisten Pflanzen eine Vielzahl unterschiedlicher Terpene. Die qualitative und quantitative Zusammensetzung des hauptsächlich durch Sesquiterpene dominierten Gemisches ist zum einen vom jeweiligen Maiskultivar, zum anderen aber auch vom Entwicklungsstand der einzelnen Pflanze sowie von biotischen und abiotischen Faktoren abhängig. Da die molekularen und genetischen Mechanismen dieser Komplexität erst wenig verstanden sind, sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit verschiedene Aspekte dieser Diversität am Beispiel der Sesquiterpensynthese untersucht werden.

Die Maisinzuchtlinie B73 bildet mehr als zwanzig unterschiedliche Sesquiterpene. Charakteristische Terpenmuster lassen vermuten, dass nur fünf Typen von Multiprodukt-Terpensynthasen an der Biosynthese dieser Verbindungen beteiligt sind. Im Gegensatz zu Sämlingen unterscheiden sich adulte B73-Pflanzen in ihrem Terpenspektrum von anderen Kultivaren. So produzieren die Kultivare B73 und Delprim zwar identische Sesquiterpene, jedoch sind die quantitativen Verhältnisse der einzelnen Komponenten zueinander völlig verschieden.

Durch Sequenzvergleiche mit bereits bekannten pflanzlichen Terpensynthasegenen war es möglich, in einer EST-Datenbank der Inzuchtlinie B73 fünf offene Leseraster (*tps4-B73*, *tps5-B73*, *tps6-B73*, *tps7-B73*, *tps9-B73*) zu identifizieren, die Proteine mit für Terpensynthasen charakteristischen Merkmalen kodieren. Eine heterologe Expression dieser Gene in *E. coli* sowie die anschließende Charakterisierung der rekombinanten Proteine ergab, dass TPS4-B73, TPS6-B73 und TPS7-B73 Sesquiterpensynthaseaktivität besitzen. TPS9-B73 ist *in vitro* inaktiv und die für TPS5-B73 gemessene Aktivität beträgt weniger als 1% der katalytischen Aktivität des mit 98% Aminosäureidentität nahverwandten TPS4-B73. Ein Vergleich der in *E. coli* und *A. thaliana* exprimierten Enzymaktivitäten mit den Terpenprofilen von B73 lässt den Schluss zu, dass *in planta* die Synthese der dominanten Terpene adulter Pflanzen durch TPS4-B73 katalysiert wird und TPS6-B73 an der Synthese der in Wurzeln gebildeten Terpene beteiligt ist.

Die Isolierung und heterologe Expression verschiedener Allele von *tps4* und *tps5* aus B73 und Delprim ergab, dass sich die beobachtete Variabilität in der Terpenemission adulter B73- und Delprim-Pflanzen auf die unterschiedliche Aktivität der von diesen Allelen kodierten Enzyme zurückführen lässt. Im Gegensatz zu B73 kodiert Delprim ein aktives Allel von *tps5*, welches die Terpene adulter Pflanzen bildet, während *tps4-Del* durch eine Leserastermutation inaktiv ist. Durch *in vitro*-Mutagenese konnten zwei Aminosäuren identifiziert werden, die für die geringe katalytische Aktivität von TPS5-B73 verantwortlich sind. Eine dieser Aminosäuren befindet sich im Eingangsbereich des aktiven Zentrums. Die zweite ist überraschenderweise in der N-terminalen Domäne des Proteins lokalisiert.

Trotz der hohen Sequenzidentität besitzen TPS4 und TPS5 eine unterschiedliche Stereoselektivität. Für diesen Effekt sind vier Aminosäuren verantwortlich, die ein für das jeweilige Enzym charakteristisches Sequenzmotiv (TPS4: „TIATI“, TPS5: „SIGAN“) bilden. Durch *in vitro*-Mutagenese und Strukturmodelle war es möglich, das aktive Zentrum von TPS4 zu bestimmen. Die fünf Aminosäuren des „TIATI“-Motivs sind am Boden des aktiven Zentrums lokalisiert und unterteilen es durch die Bildung eines Grates in zwei Taschen. Sowohl die Ergebnisse des Austausches zweier Tyrosine zu Phenylalanin als auch die Modellierung von Enzym-Substrat- und Enzym-Intermediat-Komplexen deuten darauf hin, dass das am Anfang der Reaktion in einer Tasche des aktiven Zentrums lokalisierte Substrat im Verlauf der Reaktionskaskade durch eine Konformationsänderung teilweise in die zweite Tasche hineinragen kann. Während das Hauptprodukt (S)- $\beta$ -Bisabolon vollständig in der ersten Tasche gebildet wird, führt die Konformationsänderung zu bityklichen und trityklichen Produkten. Die Aminosäuren des „TIATI“- bzw. „SIGAN“-Motivs könnten diesen Vorgang beeinflussen und damit die Stereoselektivität der Enzyme bestimmen.

Die hohe Anzahl von in Mais gebildeten Sesquiterpenen ist zum großen Teil darauf zurückzuführen, dass die in dieser Arbeit identifizierten Terpensynthasen Multiproduktenzyme sind. Ein für TPS4 und TPS5 aufgestellter Reaktionsmechanismus verdeutlicht die Entstehung mehrerer Produkte aus einem Substrat. Die Stereoselektivität beider Enzyme kann durch das Verhältnis der Bildung von (R)- und (S)-Bisabolykationintermediaten erklärt werden. Während im Fall von TPS4 das (R)- und das (S)-Enantiomer als Racemat entsteht, bildet TPS5 beide Enantiomere im Verhältnis 95:5. In einem zweiten, alternativen mechanistischen Modell leiten sich alle Produkte vom (S)-Bisabolykation ab. Die Stereoselektivität ist hierbei von Konformationsänderungen dieses Intermediates abhängig.

Die Untersuchung der Terpensynthase TPS7 zeigte, dass das Produktprofil dieses Enzyms durch den Austausch einzelner Aminosäuren vorhersagbar manipuliert werden kann. Schon die Mutation von ein oder zwei Resten im aktiven Zentrum führte zu einem Protein, das ein völlig neues Produktspektrum aufweist. Im Hinblick auf die Diversität der Terpenbiosynthese in Mais ergibt sich die theoretische Möglichkeit von funktionell unterschiedlichen Alloenzymen, die beispielsweise für Unterschiede zwischen einzelnen Kultivaren verantwortlich sein könnten.

## 6 Literaturverzeichnis

- Alonso, W. R., Rajaonarivony, J. I. M., Gershenzon, J. & Croteau, R. (1992). Purification of 4*S*-limonene synthase, a monoterpene cyclase from the glandular trichomes of peppermint (*Mentha X piperita*) and spearmint (*Mentha spicata*). *Journal of Biological Chemistry* **15**, 7582-7587.
- Arimura, G., Ozawa, R., Shimoda, T., Nishioka, T., Boland, W. & Takabayashi, J. (2000). Herbivory-induced volatiles elicit defence genes in lima bean leaves. *Nature* **406**, 512-515.
- Arimura, G., Ozawa, R., Nishioka, T., Boland, W., Koch, T., Kuhnemann, F. & Takabayashi, J. (2002). Herbivore-induced volatiles induce the emission of ethylene in neighboring lima bean plants. *Plant Journal* **29**, 87-98.
- Aubourg, S., Lecharny, A. & Bohlmann, J. (2002). Genomic analysis of the terpenoid synthase (AtTPS) gene family of *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Genetics & Genomics: MGG* **267**, 730-745.
- Back, K. W. & Chappell, J. (1996). Identifying functional domains within terpene cyclases using a domain-swapping strategy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 6841-6845.
- Bennett, M. H., Mansfield, J. W., Lewis, M. J. & Beale, M. H. (2002). Cloning and expression of sesquiterpene synthase genes from lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Phytochemistry* **60**, 255-261.
- Bensen, R. J., Johal, G. S., Crane, V. C., Tossberg, J. T., Schnable, P. S., Meeley, R. B. & Briggs, S. P. (1995). Cloning and characterization of the maize *an1* gene. *Plant Cell* **7**, 75-84.
- Birnboim, H. C. & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* **7**, 1513-1523.
- Bohlmann, J., Steele, C. L. & Croteau, R. (1997). Monoterpene synthases from grand fir (*Abies grandis*) – cDNA isolation, characterization, and functional expression of myrcene synthase, (-)(4*S*)-limonene synthase, and (-)-(1*S*,5*S*)-pinene synthase. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 21784-21792.
- Bohlmann, J., Meyergauen, G. & Croteau, R. (1998A). Plant terpenoid synthases - molecular biology and phylogenetic analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 4126-4133.
- Bohlmann, J., Crock, J., Jetter, R. & Croteau, R. (1998B). Terpenoid-based defenses in conifers - cDNA cloning, characterization, and functional expression of wound-inducible (*E*)-alpha-bisabolene synthase from grand fir (*Abies grandis*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 6756-6761.
- Bohlmann, J., Stauber, E. J., Krock, B., Oldham, N. J., Gershenzon, J. & Baldwin, I. T. (2002). Gene expression of 5-*epi*-aristolochene synthase and formation of capsidiol in roots of *Nicotiana attenuata* and *N. sylvestris*. *Phytochemistry* **60**, 109-116.
- Bouwmeester, H. J., Kodde, J., Verstappen, F. W. A., Altug, I. G., de Kraker, J. W. & Wallaart, T. E. (2002). Isolation and characterization of two germacrene A synthase cDNA clones from chicory. *Plant Physiology* **129**, 134-144.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254.
- Browse, J. A. & Spychalla, J. P. (2001). Omega-3 fatty acid desaturase. In *United States Patent 6,194,167*. United States of America: Washington State University Research Foundation (Pullman, WA).
- Buckingham, J. (1998). Dictionary of natural products on CD-ROM Vers. 6.1. *Chapman & Hall, London*.
- Buttery, R. G., Ling, L. C. & Chan, B. G. (1978). Volatiles of corn kernels and husks: possible corn ear worm attractants. *Journal of Agricultural & Food Chemistry* **26**, 866-869.
- Buttery, R. G. & Ling, L. C. (1984). Corn leaf volatiles - identification using tenax trapping for possible insect attractants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **32**, 1104-1106.
- Cai, Y., Jia, J. W., Crock, J., Lin, Z. X., Chen, X. Y. & Croteau, R. (2002). A cDNA clone for beta-caryophyllene synthase from *Artemisia annua*. *Phytochemistry* **61**, 523-529.
- Cane, D. E. (1990). Enzymatic Formation of Sesquiterpenes. *Chemical Reviews* **90**, 1089-1103.

- Cane, D. E., Xue, Q. & Fitzsimons, B. C. (1996). Trichodiene synthase - probing the role of the highly conserved aspartate-rich region by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* **35**, 12369-12376.
- Cane, D.E. (1999). Sesquiterpene biosynthesis: cyclization mechanisms. *Comprehensive Natural Products Chemistry*, Vol. 2, Isoprenoids Including Carotenoids and Steroids, D.D. Cane, 155-200, Amsterdam: Elsevier.
- Caruthers, J. M., Kang, I., Rynkiewicz, M. J., Cane, D. E. & Christianson, D. W. (2000). Crystal structure determination of aristolochene synthase from the blue cheese mold, *Penicillium roqueforti*. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 25533-25539.
- Chaintreau, A. (2001). Simultaneous distillation-extraction: from birth to maturity - review. *Flavour & Fragrance Journal* **16**, 136-148.
- Chappell, J. (1995). Biochemistry and molecular-biology of the isoprenoid biosynthetic-pathway in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **46**, 521-547.
- Chaykin, S., Law, J., Phillips, A. H., Tchen, T. T. & Bloch, K. (1958). Phosphorylated intermediates in the synthesis of squalene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **44**, 998-1004.
- Chen, X. Y., Chen, Y., Heinstein, P. & Davisson, V. J. (1995). Cloning, expression, and characterization of (+)-delta-cadinene synthase - a catalyst for cotton phytoalexin biosynthesis. *Archives of Biochemistry & Biophysics* **324**, 255-266.
- Chen, X. Y., Wang, M. S., Chen, Y., Davisson, V. J. & Heinstein, P. (1996). Cloning and heterologous expression of a second (+)-delta-cadinene synthase from *Gossypium arboreum*. *Journal of Natural Products* **59**, 944-951.
- Chen, F., Tholl, D., D'Auria, J. C., Farooq, A., Pichersky, E. & Gershenzon, J. (2003). Biosynthesis and emission of terpenoid volatiles from *Arabidopsis* flowers. *Plant Cell* **15**, 481-494.
- Clauss, M.J., & Mitchell-Olds, T. (2003). Population genetics of tandem trypsin inhibitor genes in *Arabidopsis* species with contrasting ecology and life history. *Molecular Ecology* **12**, 1287-1299.
- Clough, S. J. & Bent, A. F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal: for Cell & Molecular Biology* **16**, 735-743.
- Colby, S. M., Alonso, W. R., Katahira, E. J., McGarvey, D. J. & Croteau, R. (1993). 4S-limonene synthase from the oil glands of spearmint (*Mentha spicata*): cDNA isolation, characterization, and bacterial expression of the catalytically active monoterpene cyclase. *Journal of Biological Chemistry* **5**, 23016-23024.
- Connolly, J. D. & Hill, R. A. (1991) Dictionary of terpenoids. Chapman & Hall, London
- Corpet, F. (1988). Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Research* **16**, 10881-10890.
- Crock, J., Wildung, M. & Croteau, R. (1997). Isolation and bacterial expression of a sesquiterpene synthase cDNA clone from peppermint (*mentha x piperita*, L.) that produces the aphid alarm pheromone (*E*)- $\beta$ -farnesene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 12833-12838.
- Croteau, R. (1987). Biosynthesis and catabolism of monoterpenoids. *Chemical Reviews* **87**, 929-954.
- de Kraker, J. W., Franssen, M. C. R., Degroot, A., Konig, W. A. & Bouwmeester, H. J. (1998). (+)-Germacrene A biosynthesis - the committed step in the biosynthesis of bitter sesquiterpene lactones in chicory. *Plant Physiology* **117**, 1381-1392.
- de Kraker, J. W., Schurink, M., Franssen, M. C. R., Konig, W. A., de Groot, A. & Bouwmeester, H. J. (2003). Hydroxylation of sesquiterpenes by enzymes from chicory (*Cichorium intybus* L.) roots. *Tetrahedron* **59**, 409-418.
- Deligeorgopoulou, A. & Allemann, R. K. (2003). Evidence for differential folding of farnesyl pyrophosphate in the active site of aristolochene synthase: A single-point mutation converts aristolochene synthase into an (*E*)-beta-farnesene synthase. *Biochemistry* **42**, 7741-7747.
- Dicke, M. (1994). Local and systemic production of volatile herbivore-induced terpenoids - Their role in plant-carnivore mutualism. *Journal of Plant Physiology* **143**, 465-472.

- Donath, J. & Boland, W. (1994).** Biosynthesis of acyclic homoterpenes in higher plants parallels steroid hormone metabolism. *Journal of Plant Physiology* **143**, 473-478.
- Donath, J. & Boland, W. (1995).** Biosynthesis of acyclic homoterpenes: Enzyme selectivity and absolute configuration of the nerolidol precursor. *Phytochemistry* **39**, 785-790.
- Dudareva, N., Cseke, L., Blanc, V. M. & Pichersky, E. (1996).** Evolution of floral scent in *Clarkia* - novel patterns of *S*-linalool synthase gene expression in the *C. breweri* flower. *Plant Cell* **8**, 1137-1148.
- Dudareva, N., Martin, D., Kish, C. M., Kolosova, N., Gorenstein, N., Faldt, J., Miller, B. & Bohlmann, 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 terpene synthase subfamily. *Plant Cell* **15**, 1227-1241.
- Eisenreich, W., Rohdich, F. & Bacher, A. (2001).** Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids. *Trends in Plant Science* **6**, 78-84.
- El Tamer, M. K., Lucker, J., Bosch, D., Verhoeven, H. A., Verstappen, F. W. A., Schwab, W., van Tunen, A. J., Voragen, A. G. J., de Maagd, R. A. & Bouwmeester, H. J. (2003).** Domain swapping of *Citrus limon* monoterpene synthases: impact on enzymatic activity and product specificity. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **411**, 196-203.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H. & Von Heijne, G. (1999).** ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Protein Science* **8**, 978-984.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S. & von Heijne, G. (2000).** Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *Journal of Molecular Biology* **300**, 1005-1016.
- Facchini, P. J. & Chappell, J. (1992).** Gene family for an elicitor induced sesquiterpene cyclase in tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 11088-11092.
- Fahn, A. (1979).** Secretory tissues in plants. pp. 162-164. London: Academic Press.
- Flath, R. A., Forrey, R. R., John, J. O. & Chan, B. G. (1978).** Volatile components of corn silk (*Zea mays* L.): possible *Heliothis zea* (boddie) attractants. *Journal of Agricultural & Food Chemistry* **26**, 1290-1293.
- Gai, X. W., Lal, S., Xing, L. Q., Brendel, V. & Walbot, V. (2000).** Gene discovery using the maize genome database ZmDB. *Nucleic Acids Research* **28**, 94-96.
- Gaut, B. S., Morton, B. R., McCaig, B. M., & Clegg, M. T. (1996).** Substitution rate comparisons between grasses and palms: Synonymous rate differences at the nuclear gene *Adh* parallel rate differences at the plastid gene *rbcl*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 10274-10279.
- Gaut, B. S. & Doebley, J. F. (1997).** DNA sequence evidence for the allotetraploid origin of maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 6809-6814.
- Gaut, B. S. (2002).** Evolutionary dynamics of grass genomes. *New Phytologist* **154**, 15-28.
- Gershenzon, J., McCaskill, D., Rajaonarivony, J. I. M., Mihaliak, C., Karp, F. & Croteau, R. (1992).** Isolation of secretory cells from plant glandular trichomes and their use in biosynthetic studies of monoterpenes and other gland products. *Analytical Biochemistry* **200**, 130-138.
- Gershenzon, J. & Croteau, R. (1993).** Terpenoid biosynthesis: The basic pathway and formation of monoterpenes, sesquiterpenes, and diterpenes. In *Lipid Metabolism in Plants*, pp. 339-388. Edited by T. C. J. Moore: CRC Press.
- Gouinguene, S., Degen, T. & Turlings, T. C. J. (2001).** Variability in herbivore-induced odour emissions among maize cultivars and their wild ancestors (teosinte). *Chemoecology* **11**, 9-16.
- Gouinguene, S. P. & Turlings, T. C. J. (2002).** The effects of abiotic factors on induced volatile emissions in corn plants. *Plant Physiology* **129**, 1296-1307.
- Gouinguene, S., Alborn, H. & Turlings, T. C. J. (2003).** Induction of volatile emissions in maize by different larval instars of *Spodoptera littoralis*. *Journal of Chemical Ecology* **29**, 145-162.
- Greenhagen, B. T., Griggs, P., Takahashi, S., Ralston, L. & Chappell, J. (2003).** Probing sesquiterpene hydroxylase activities in a coupled assay with terpene synthases. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **409**, 385-394.

- Guex, N. & Peitsch, M. C. (1997).** Swiss-model and the swiss-pdbviewer - an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* **18**, 2714-2723.
- Harrison, P. H. M., Oliver, J. S. & Cane, D. E. (1988).** Pentalenene biosynthesis and the enzymatic cyclization of farnesyl pyrophosphate - Inversion at C-1 during 11-membered-ring formation. *Journal of the American Chemical Society* **110**, 5922-5923.
- Hartmann, T. (1996).** Diversity and variability of plant secondary metabolism - a mechanistic view. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **80**, 177-188.
- 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.
- Helsper, J., Davies, J. A., Bouwmeester, H. J., Krol, A. F. & Vankampen, M. H. (1998).** Circadian rhythmicity in emission of volatile compounds by flowers of *Rosa hybrida* l. cv. honesty. *Planta* **207**, 88-95.
- Hoballah, M. E. F., Tamo, C. & Turlings, T. C. J. (2002).** Differential attractiveness of induced odors emitted by eight maize varieties for the parasitoid *Cotesia marginiventris*: Is quality or quantity important? *Journal of Chemical Ecology* **28**, 951-968.
- Höfgen, R. & Willmitzer, L. (1988).** Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. *Nucleic Acids Research* **16**, 9877.
- Joulain, D. & Laurent, R. (1989).** Two closely related sesquiterpenols: 1-endo-bourbonanol and 1,6-germacradien-5-ol. *Journal of Essential Oil Research: Jeor* **1**, 299-301.
- Joulain, D. & König, W. A. (1998).** *The atlas of spectral data of sesquiterpene hydrocarbons*. Hamburg: EB-Verlag.
- Kliebenstein, D.J., Lambrix, V.M., Reichelt, M., Gershenzon, J., & Mitchell-Olds, T. (2001).** Gene duplication in the diversification of secondary metabolism: Tandem 2-oxoglutarate-dependent dioxygenases control glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **13**, 681-693.
- Kreuzwieser, J., Schnitzler, J. P. & Steinbrecher, R. (1999).** Biosynthesis of organic compounds emitted by plants. *Plant Biology* **1**, 149-159.
- Kroymann J., Textor, S., Tokuhisa, J.G., Falk, K.L., Bartram, S., Gershenzon, J., & Mitchell-Olds, T. (2001).** A gene controlling variation in *Arabidopsis* glucosinolate composition is part of the methionine chain elongation pathway. *Plant Physiology*. **127**, 1077-1088.
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Langenheim, J. H. (1994).** Higher-plant terpenoids - a phytocentric overview of their ecological roles. *Journal of Chemical Ecology* **20**, 1223-1280.
- Lesburg, C. A., Zhai, G. Z., Cane, D. E. & Christianson, D. W. (1997).** Crystal structure of pentalenene synthase - mechanistic insights on terpenoid cyclization reactions in biology. *Science* **277**, 1820-1824.
- Lesburg, C. A., Caruthers, J. M., Paschall, C. M. & Christianson, D. W. (1998).** Managing and manipulating carbocations in biology: terpenoid cyclase structure and mechanism. *Current Opinion in Structural Biology* **8**, 695-703.
- Lichtenthaler, H. K., Schwender, J., Disch, A. & Rohmer, M. (1997).** Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathway. *FEBS Letters* **400**, 271-274.
- Little, D. B. & Croteau, R. B. (2002).** Alteration of product formation by directed mutagenesis and truncation of the multiple-product sesquiterpene synthases delta-selinene synthase and gamma-humulene synthase. *Archives of Biochemistry & Biophysics* **402**, 120-135.
- Loughrin, J. H., Hamilton-Kemp, T. R., Andersen, R. A. & Hildebrand, D. F. (1991).** Circadian-rhythm of volatile emission from flowers of *Nicotiana sylvestris* and *N. suaveolens*. *Physiologia Plantarum* **83**, 492-496.
- Loughrin, J. H., Manukian, A., Heath, R. R., Turlings, T. C. J. & Tumlinson, J. H. (1994).** Diurnal cycle of emission of induced volatile terpenoids herbivore-injured cotton plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 11836-11840.

- Lu, S., Xu, R., Jia, J. W., Pang, J. H., Matsuda, S. P. T. & Chen, X. Y. (2002). Cloning and functional characterization of a beta-pinene synthase from *Artemisia annua* that shows a circadian pattern of expression. *Plant Physiology* **130**, 477-486.
- Lynen, F., Eggerer, H., Henning, U. & Kessel, I. (1958). Farnesyl-pyrophosphat und 3-Methyl-butenyl-1-pyrophosphat, die biologischen Vorstufen des Squalens. *Angewandte Chemie* **70**, 738-742.
- Lynen, F. & Henning, U. (1960). Über den biologischen Weg zum Naturkautschuk. *Angewandte Chemie* **72**, 820-829.
- Marschner, H. (1998). *Mineral nutrition of higher plants.*, 2 edn. San Diego: Academic Press.
- Martin, G. S., Liu, J. G., Benedict, C. R., Stipanovic, R. D. & Magill, C. W. (2003). Reduced levels of cadinane sesquiterpenoids in cotton plants expressing antisense (+)-delta-cadinene. *Phytochemistry* **62**, 31-38.
- McCall, P. J., Turlings, T. C. J., Loughrin, J., Proveaux, A. T. & Tumlinson, J. H. (1994). Herbivore-induced volatile emissions from cotton (*Gossypium hirsutum* L.) seedlings. *Journal of Chemical Ecology* **20**, 3039-3050.
- McCaskill, D., Gershenzon, J. & Croteau, R. (1992). Morphology and monoterpene biosynthetic capabilities of secretory cell clusters isolated from glandular trichomes of peppermint (*Mentha piperita* L.). *Planta* **187**, 445-454.
- McGarvey, D. J. & Croteau, R. (1995). Terpenoid metabolism. *Plant Cell* **7**, 1015-1026.
- Mercke, P., Crock, J., Croteau, R. & Brodelius, P. E. (1999). Cloning, expression, and characterization of *epi*-cedrol synthase, a sesquiterpene cyclase from *Artemisia annua* L. *Archives of Biochemistry & Biophysics* **369**, 213-222.
- Morikava, K. & Hirose, Y. (1971). Biosynthesis of Germacrene-C. *Tetrahedron Letters* **16**, 1131-1132.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S. & Vonheijne, G. (1997). Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Engineering* **10**, 1-6.
- O'Maille, P. & Noel, J. P. (2003) posterpresentation, 6<sup>th</sup> European Symposium on Plant Isoprenoids, Lexington, Kentucky
- Page, R.D.M. (1996). TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences*. **12**, 357-358
- Pandit, J., Danley, D. E., Schulte, G. K., Mazzalupo, S., Pauly, T. A., Hayward, C. M., Hamanaka, E. S., Thompson, J. F. & Harwood, H. J., Jr. (2000). Crystal structure of human squalene synthase. A key enzyme in cholesterol biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 30610-30617.
- Peters, R. J. & Croteau, R. B. (2003). Alternative termination chemistries utilized by monoterpene cyclases: chimeric analysis of bornyl diphosphate, 1,8-cineole, and sabinene synthases. *Archives of Biochemistry & Biophysics* **417**, 203-211.
- Pezzuto, J. M. (1997). Plant-derived anticancer agents. *Biochemical Pharmacology* **53**, 121-133.
- Phillips, M. A., Savage, T. J. & Croteau, R. (1999). Monoterpene synthases of loblolly pine (*Pinus taeda*) produce pinene isomers and enantiomers. *Archives of Biochemistry & Biophysics* **372**, 197-204.
- Phillips, M. A., Wildung, M. R., Williams, D. C., Hyatt, D. C. & Croteau, R. (2003). cDNA isolation, functional expression, and characterization of (+)-alpha-pinene synthase and (-)-alpha-pinene synthase from loblolly pine (*Pinus taeda*): Stereocontrol in pinene biosynthesis. *Archives of Biochemistry & Biophysics* **411**, 267-276.
- 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 & Biophysics* **316**, 803-807.
- Pichersky, E. & Gang, D. R. (2000). Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. *Trends in Plant Science* **5**, 439-445.
- Pichersky, E. & Gershenzon, J. (2002). The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. *Current Opinion in Plant Biology* **5**, 237-243.

- Raguso, R. A. & Pichersky, E. (1995).** Floral volatiles from *Clarkia Breweri* and *C. Concinna* (*Onagraceae*) - Recent evolution of floral scent and moth pollination. *Plant Systematics and Evolution* **194**, 55-67.
- Reintanz, B., Lehnen, M., Reichelt, M., Gershenzon, J., Kowalczyk, Sandberg, G., Godde, M., Uhl, R., & Palme, K. (2001).** *bus*, a bushy *Arabidopsis CYP79F1* knockout mutant with abolished synthesis of short-chain aliphatic glucosinolates. *Plant Cell* **13**, 351-367.
- Rising, K. A., Starks, C. M., Noel, J. P. & Chappell, J. (2000).** Demonstration of germacrene A as an intermediate in 5-*epi*-aristolochene synthase catalysis. *Journal of the American Chemical Society* **122**, 1861-1866.
- Rodriguez-Concepcion, M. & Boronat, A. (2002).** Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics. *Plant Physiology* **130**, 1079-1089.
- Rohmer, M., Knani, M., Simonin, P., Sutter, B. & Sahn, H. (1993).** Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochemical Journal* **295**, 517-524.
- Röse, U. S. R., Manukian, A., Heath, R. R. & Tumlinson, J. H. (1996).** Volatile semiochemicals released from undamaged cotton leaves - a systemic response of living plants to caterpillar damage. *Plant Physiology* **111**, 487-495.
- Ruzicka, L. (1953).** The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds. *Experientia* **9**, 357-367.
- Rynkiewicz, M. J., Cane, D. E. & Christianson, D. W. (2001).** Structure of trichodiene synthase from *Fusarium sporotrichioides* provides mechanistic inferences on the terpene cyclization cascade. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 13543-13548.
- Rynkiewicz, M. J., Cane, D. E. & Christianson, D. W. (2002).** X-ray crystal structures of D100E trichodiene synthase and its pyrophosphate complex reveal the basis for terpene product diversity. *Biochemistry* **41**, 1732-1741.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989).** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edition edn: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**, 5463-5467.
- Saritas, Y., Bulow, N., Fricke, C., König, W. A. & Muhle, H. (1998).** Sesquiterpene hydrocarbons in the liverwort *Dumortiera hirsuta*. *Phytochemistry* **48**, 1019-1023.
- Schenk, P. M., Baumann, S., Mattes, R. & Steinbiss, H.-H. (1995).** Improved high-level expression system for eukaryotic genes in *Escherichia coli* using T7 RNA polymerase and rare ArgRNAs. *Biotechniques* **19**, 196-200.
- Schmelz, E. A., Alborn, H. T. & Tumlinson, J. H. (2001).** The influence of intact-plant and excised-leaf bioassay designs on volicitin- and jasmonic acid-induced sesquiterpene volatile release in *Zea mays*. *Planta* **214**, 171-179.
- Schmelz, E. A., Alborn, H. T., Banchio, E. & Tumlinson, J. H. (2003).** Quantitative relationships between induced jasmonic acid levels and volatile emission in *Zea mays* during *Spodoptera exigua* herbivory. *Planta* **216**, 665-673.
- Schmidt, C. O., Bouwmeester, H. J., Franke, S. & König, W. A. (1999).** Mechanisms of the biosynthesis of sesquiterpene enantiomers (+)- and (-)-germacrene D in *Solidago canadensis*. *Chirality* **11**, 353-362.
- Schnee, C., Kollner, T. G., Gershenzon, J. & Degenhardt, J. (2002).** The maize gene *terpene synthase 1* encodes a sesquiterpene synthase catalyzing the formation of (*E*)-beta-farnesene, (*E*)-nerolidol, and (*E,E*)-farnesol after herbivore damage. *Plant Physiology* **130**, 2049-2060.
- Schnee, C. (2004).** Terpene synthases and the regulation of herbivore-induced terpene emission in maize. Dissertation, Universität Jena
- Schwender, J., Seemann, M., Lichtenthaler, H. K. & Rohmer, M. (1996).** Biosynthesis of isoprenoids (carotenoids, sterols, prenyl side-chains of chlorophylls and plastoquinone) via a novel pyruvate/glyceraldehyde 3-phosphate non-mevalonate pathway in the green alga *Scenedesmus obliquus*. *Biochemical Journal* **316**, 73-80.

- Shah, F. H. & Cha, T. S. (2000).** A mesocarp-and species-specific cDNA clone from oil palm encodes for sesquiterpene synthase. *Plant Science* **154**, 153-160.
- Shen, B. Z., Zheng, Z. W. & Dooner, H. K. (2000).** A maize sesquiterpene cyclase gene induced by insect herbivory and volicitin: Characterization of wild-type and mutant alleles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 14807-14812.
- Starks, C. M., Back, K. W., Chappell, J. & Noel, J. P. (1997).** Structural basis for cyclic terpene biosynthesis by tobacco 5-*epi*-aristolochene synthase. *Science* **277**, 1815-1820.
- Steele, C. L., Crock, J., Bohlmann, J. & Croteau, R. (1998A).** Sesquiterpene synthases from grand fir (*Abies grandis*) - comparison of constitutive and wound-induced activities, and cDNA isolation, characterization and bacterial expression of delta-selinene synthase and gamma-humulene synthase. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 2078-2089.
- Steele, C. L., Katoh, S., Bohlmann, J. & Croteau, R. (1998B).** Regulation of oleoresinosis in grand fir (*Abies grandis*) - differential transcriptional control of monoterpene, sesquiterpene, and diterpene synthase genes in response to wounding. *Plant Physiology* **116**, 1497-1504.
- Stipanovic, R. D., Bell, A. A. & Benedict, C. R. (1999).** Cotton pest resistance: The role of pigment gland constituents. In *Biologically Active Natural Products: Agrochemicals.*, pp. 211-220. Edited by H. G. Cutler & S. Cutler. Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Sun, T. P. & Kamiya, Y. (1994).** The *Arabidopsis* Gal1 locus encodes the cyclase ent-kaurene synthetase-a of gibberellin biosynthesis. *Plant Cell* **6**, 1509-1518.
- Surburg, H. & Köpsel, M. (1989).** New naturally occurring sesquiterpenes from scotch spearmint oil (*Mentha cardiaca* Ger.). *Flavour and Fragrance Journal* **4**, 143-147.
- Takabayashi, J., Takahashi, S., Dicke, M. & Posthumus, M. A. (1995).** Developmental stage of herbivore *pseudaletia separata* affects production of herbivore-induced synomone by corn plants. *Journal of Chemical Ecology* **21**, 273-287.
- Tan, X. P., Liang, W. Q., Liu, C. J., Luo, P., Heinstein, P. & Chen, X. Y. (2000).** Expression pattern of (+)-delta-cadinene synthase genes and biosynthesis of sesquiterpene aldehydes in plants of *Gossypium arboreum* L. *Planta* **210**, 644-651.
- Tarshis, L. C., Yan, M., Poulter, C. D. & Sacchettini, J. C. (1994).** Crystal structure of recombinant farnesyl diphosphate synthase at 2.6-Å resolution. *Biochemistry* **33**, 10871-10877.
- Theis, N. & Lerda, M. (2003).** The evolution of function in plant secondary metabolites. *International Journal of Plant Sciences* **164**, S93-S102.
- Trapp, S. C. & Croteau, R. B. (2001).** Genomic organization of plant terpene synthases and molecular evolutionary implications. *Genetics* **158**, 811-832.
- Turlings, T. C. J., Tumlinson, J. H. & Lewis, W. J. (1990).** Exploitation of herbivore-induced plant odors by host-seeking parasitic wasps. *Science* **30**, 1251-1253.
- Turlings, T. C. J., Bernasconi, M., Bertossa, R., Bigler, F., Caloz, G. & Dorn, S. (1998A).** The induction of volatile emissions in maize by three herbivore species with different feeding habits - possible consequences for their natural enemies. *Biological Control* **11**, 122-129.
- Turlings, T. C. J., Lengwiler, U. B., Bernasconi, M. L. & Wechsler, D. (1998B).** Timing of induced volatile emissions in maize seedlings. *Planta* **207**, 146-152.
- Turner, G., Gershenzon, J., Nielson, E. E., Froehlich, J. E. & Croteau, R. (1999).** Limonene synthase, the enzyme responsible for monoterpene biosynthesis in peppermint, is localized to leucoplasts of oil gland secretory cells. *Plant Physiology* **120**, 879-886.
- Udayagiri, S. & Jones, R. L. (1992A).** Role of plant odor in parasitism of European corn borer by braconid specialist parasitoid *Macrocentrus grandii* Goidanich: isolation and characterization of plant synomones eliciting parasitoid flight response. *Journal of Chemical Ecology* **18**, 1841-1855.
- Udayagiri, S. & Jones, R. L. (1992B).** Flight behavior of *Macrocentrus grandii* Goidanich (Hymenoptera: Braconidae), a specialist parasitoid of European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae): factors influencing response to corn volatiles. *Environmental Entomology* **21**, 1448-1456.

- van der Hoeven, R. S., Monforte, A. J., Breeden, D., Tanksley, S. D. & Steffens, J. C. (2000). Genetic control and evolution of sesquiterpene biosynthesis in *Lycopersicon esculentum* and *L. hirsutum*. *Plant Cell* **12**, 2283-2294.
- Verdonk, J. C., de Vos, C. H. R., Verhoeven, H. A., Haring, M. A., van Tunen, A. J. & Schuurink, R. C. (2003). Regulation of floral scent production in petunia revealed by targeted metabolomics. *Phytochemistry* **62**, 997-1008.
- Wallach, O. (1885). Zur Kenntnis der Terpene und der ätherischen Oele. *Annalen der Chemie* **227**, 277-302.
- Whittington, D. A., Wise, M. L., Urbansky, M., Coates, R. M., Croteau, R. B. & Christianson, D. W. (2002). Bornyl diphosphate synthase: Structure and strategy for carbocation manipulation by a terpenoid cyclase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 15375-15380.
- Williams, D. C., McGarvey, D. J., Katahira, E. J. & Croteau, R. (1998). Truncation of limonene synthase preprotein provides a fully active pseudomature form of this monoterpene cyclase and reveals the function of the amino-terminal arginine pair. *Biochemistry* **37**, 12213-12220.
- 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.
- Wust, M., Little, D. B., Schalk, M. & Croteau, R. (2001). Hydroxylation of limonene enantiomers and analogs by recombinant (-)-limonene 3- and 6-hydroxylases from mint (*Mentha*) species: Evidence for catalysis within sterically constrained active sites. *Archives of Biochemistry & Biophysics* **387**, 125-136.
- Yin, S. H., Mei, L., Newman, J., Back, K. & Chappell, J. (1997). Regulation of sesquiterpene cyclase gene expression - characterization of an elicitor- and pathogen-inducible promoter. *Plant Physiology* **115**, 437-451.
- Yuba, A., Yazaki, K., Tabata, M., Honda, G. & Croteau, R. (1996). CDNA cloning, characterization, and functional expression of 4S(-)-limonene synthase from *Perilla frutescens*. *Archives of Biochemistry & Biophysics* **332**, 280-287.
- Zeng, G. (1998). Sticky-end PCR - new method for subcloning. *Biotechniques* **25**, 206-208.
- Zeringue Jr., H. J. (2000). Identification and effects of maize silk volatiles on cultures of *Aspergillus flavus*. *Journal of Agricultural & Food Chemistry* **48**, 921-925.

## 7 Anhang

### 7.1 DNA-Sequenzen

#### *tps4-B73* (Accession-Nummer: AY518310)

ATGGCGTCTCCTCCAGCACATCGTTCCAGCAAGGCAGCTGATGAGGAGCTGCCAAAGGCTTCTTCGACCTTTC  
 ACCCAAGTCTGTGGGGCAGTTTCTTCCTGACCTACCAGCCGCCAACTGCACCTCAGCGAGCAAACATGAAAGA  
 ACGAGCTGAGGTTTTAAGAGAACGTGTTAGGAAGTTTTGAAGGGCTCGACGACTGATCAACTACCAGAAACA  
 GTGAATCTTATATTAACATTGCAAAGACTTGGACTGGGTTACTACTACGAGAACGAGATAGACAAGTTGCTGC  
 ACCAAATTTACAGCAACTCCGATTACAATGTGAAAGATCTTAACTTGGTTTTCGCAGCGGTTCTACCTTCTTCG  
 AAAGAACGGCTACGATGTGCCATCAGATGTATTTCTGAGCTTCAAACAGAAGAAGGCGGGCTTCGCCTGTGCT  
 GCTGCTGACACGAGAAGCTTGTAAAGCTTATATAACGCAGCATATCTGAGGAAGCATGGAGAGGAGGTACTAG  
 ACGAAGCGATTTTCATCGACTAGACTCCGCTCCAAGATCTCCTTGGACGACTTCTTCCAGAATCGCCATTTGC  
 AAAGGAGGTGTCTTCTTCCCTTCGTACCCCTCTCTTCCAGAAGGGTTGGGATACTAGAAGCGAGAAACTACATA  
 CCCATTTACGAAACGGAGGCGACGCGAAACGAAGCCGTATTGGAGCTTGCGAAACTGAATTTAACCTTCAGC  
 AACTTGATTTCTGTGAAGAGCTAAAGCATTGCTCAGCGTGGTGGAAACGAGATGATAGCCAAATCAAAGCTGAC  
 CTTTGTAGAGATAGAATTGTAGAGGAGTATTTCTGGATGAATGGAGCATGCTATGATCCGCCGTACTCCCTT  
 TCCCGAATTATACTGACAAAGATCACGGGACTTATTACAATAATCGATGATATGTTTGATACACATGGTACCA  
 CTGAAGATTGCATGAAATTCGCTGAAGCGTTTGGCAGATGGGACGAAAGTGCAATACATCTCCTTCCAGAGTA  
 CATGAAGGATTTCTACATATTTGATGTTGGAGACATTTCACTCATTGAGGATGCTTTAGGGCCAGAGAAGAGC  
 TACCGTGTGCTTTACCTAAAACAGGCGATGGAGCGTTTTAGTTGAGCTATACTCCAAGGAAATAAAATGGCGTG  
 ATGATGATTATGTGCCACAATGAGTGAACACCTCCAGTTTTAGCAGAGACCATCGCAACCATTGCTCTAAC  
 ATGTTCTGCATATGCTGGGATGGGTGATATGTCGATAAGAAAGGAGACCTTCGAGTGGGCTTTGAGCTTTCTT  
 CAATTTATAAGAATTTTGGTTCAATTTGTACGGCTCTCCAACGATGTGCTATCGACCAAGCGTGAGCAAACAA  
 AAGACCATAGTCCCTCCACTGTCCATTGTTACATGAAGGAGCATGGAACGACCATGGACGATGCATGTGAAAA  
 GATAAAGGAGCTTATCGAAGATTCATGGAAGGATATGCTAGAGCAATCCCTTGCCTGAAAGGGCTCCCAAAG  
 GTTGTGCCACAGCTAGTGTGTTGACTTCTCAAGAACCACGGATAATATGTACAGGGATCGTGACGCATTGACCT  
 CTTCCGAAGCACTCAAGGAAATGATACAGCTACTGTTTGTGGAGCCAATACCCGAATGA

#### *tps4-Del* (Accession-Nummer: AY518312)

ATGGCGTCTCCTCCAGCACATCGTTCCAGCAAGGCAGCTGATGAGGAGCTGCCAAAGGCTTCTTCGACCTTCC  
 ACCCAAGTCTGTGGGGCAGTTTCTTCCTGACCTACCAGCCGCCAACTGCACCCCAGCGAGCAAACATGGAAGA  
 ACGAGCTGAGGTTTTAAGAGAACGTGTTAGGAAGTTTTGAAGGGCTCGACGACTGATCAACTACCAGAAACA  
 GTGAATCTTATATTAACATTGCAAAGGCTTGGACTGGGTTACTACTACGAGAACGAGATAGACAAGTTGCTGC  
 ACCAAATTTACAGCAACTCCGATTACAATGAGAAAGATCTTAACTTGGTTTTCGCAGCGGTTCTACCTTCTTCG  
 AAAGAACGGCTACGATGTGCCATCAGATGTATTTCTGAGCTTCAAACAGAAGAAGGCGGGCTTCGCCTGTGCT  
 GCTGCTGACACGAGAAGCTTGTAAAGCTTATATAACGCAGCACATCTGAGGAAGCATGGAGAGGAGGTACTAG  
 ACGAAGCGATTTTCATCGACTAGACTCCGCTCCAAGATCTTCTTGGACGACTTCTTCCAGAATCGCCATTTGC  
 AAAGGAGGTGTCTTCTTCCCTTCGTACCCCTCTCTTCCAGAAGGGTTGGGATACTAGAAGCGAGAAACTACATA  
 CCCATTTACGAAAAGGAGGCGACGCGAAATGAAGCCGTATTGGAGCTTGCGAAACTGAATTTAACCTTCAGC  
 AACTTGATTTCTGTGAAGAGCTAAAGCATTGCTCAGCGTGGTGGAAACGAGATGATAGCCAAATCAAAGCTGAC  
 CTTTGTAGAGATAGAATTGTAGAGGAGTATTTCTGGATGAATGGAGCATGCTATGATCCGCCATACTCCCTT  
 TCCCGAATTATACTGACAAAGATCACGGGACTAATTACAATAATCGATGATATGTTTCGATAACACATGGTACCA  
 CTGAAGATTGCATGAAATTCGCTGAAGCGTTTGGCAGATGGGACGAAAGTGCAATACATCTCCTTCCAGAGTA  
 CATGAAGGATTTCTACATATTTGATGTTGGAGACATTTCACTCATTGAGGATGCTTTAGGGCCAGAGAAGAGC  
 TACCGTGTGCTGTACCTAAAACAGGCGATGGAGCGTTTTAGTTGAGCTATACTCCAAGGAAATAAAATGGCGTG  
 ATGATGATTATGTGCCACAATGAGTGAACACCTCCAGTTTTAGCAGAGACCATCGCAACCATTGCTCTAAC  
 ATGTTCTGCATATGCTGGGATGGGTGATATGTCGATAACAAAGGAGACCTTCGAGTGGGCTTTGAGCTTTCTT  
 CAATTTAATTATAAGAATTTTGGTTCAATTTGTACGGCTCTCCAACGATGTGCTATCGACCAAGCGTGAGCAA  
 ACAAAGACCATAGTCCCTCCACTGTCCATTGTTACATGAAGGAGCATGGAACGACCATGGACGATGCATGTG  
 AAAAGATAAAGGAGCTTATCGAAGATTCATGGAAGGATATGCTAGAGCAATCCCTTGCCTGAAAGGGCTCCC  
 AAAGGTTGTGCCACAGCTAGTGTGTTGACTTCTCAAGAACCACGGATAATATGTACAGGGATCGTGACGCATTG  
 ACCTCTTCGGAAGCACTCAAGGAAATGATACAGCTACTGTTTGTGGAGCCAATACCCGAATGA

***tps5-B73* (Accession-Nummer: AY518311)**

ATGGCGTCTCCTCCAGCACATCGTTCCAGCAAGGCAGCTGATGAGGAGCTGCCAAAGGTTTCTTCGACCTTCC  
 ACCCAAGCCTGTGGGGCAGTTTCTTCTGACCTACCAGCCGCCAACTGCACCCAGCGAGCAAACATGAAAAGA  
 ACGAGCTGAGGTTTTAAGAGAACGTGTTAGGAAGGTTTTGAAGGGCTCGACGACTGATCAACTACCAGAAAACA  
 GTGAATCTTATATTAACATTGCAAAGACTTGGACTGGGTTACTACTACGAGAACGAGATAGACAAGTTGCTGC  
 ACCAAATTTACAGCAACTCCGATTACAATGTGAAAGATCTTAACTTGGTTTTCGCAGCGGTTCTACCTTCTTCG  
 AAAGAACGGCTACGATGTGCCATCAGATGTATTTCTGAGCTTCAAACAGAAGAAGGCGGCTTCGCCTGTGCT  
 GCTGCTGACACGAGAAGCTTGTAAAGCTTATATAACGCAGCATATCTGTGGAAGCATGGAGAGGAGGTTACTGG  
 ACGAAGCGATTTTCATCGACTAGACTCCGCCTCCAAGATCTCCTTGGACGACTTCTTCCAGAATCGCCATTTGC  
 AAAGGAGGTGTCTTCTTCCCTTCGTACCCCTCTCTTCCAGAAGGGTTGGGATACTAGAAGCGAGAACTACATA  
 CCCATTTACGAAACGGAGGCGACGCGAAACGAAGCCGTATTGGAGCTTGGCGAACTGAATTTTAACTTCAGC  
 AACTTGATTTCTGTGAAGAGCTAAAGCATTGCTCAGCGTGGTGGAACGAGATGATAGCCAAATCAAAGCTGAC  
 CTTTGTAGAGATAGAATTGTAGAGGAGTATTTCTGGATGAATGGAGCATGCTATGATCCGCCATACTCCCTT  
 TCCCGAATTATACTGACAAAGATCACGGGACTTATTACAATAATCGATGATATGTTTGATACACATGGTACCA  
 CTGAAGATTGCATGAAATTCGCTGAAGCGTTTGGCAGATGGGACGAAAGTGAATAACATCTCCTTCCAGAGTA  
 CATGAAGGATTTCTACATATTGATGTTGGAGACATTTTCAGTCATTTGAGGATGCTTTAGGGCCAGAGAAGAGC  
 TACCGTGTGCTTACCTAAAACAGGCGATGGAGCGTTTAGTTGAGCTATAACCAAGGAAATAAAATGGCGTG  
 ATGAGGATTATGTGGCGACAATGAGTGAACACCTCAAGGTTTCAGCAGAGTCCATCGGAGCCAATGCTCTAAC  
 ATGTTCTGCATATGCTGGGATGGGTGATATGTCGATAACAAAGGAGACCTTCGAGTGGGCTTTGAGCTTTCCA  
 CAATTTATAAGAACTTTTGGTTTCAATTTGTACGGCTCTCCAACGATGTGCAATCGACCAAGCGTGAGCAAAACA  
 AAGACCATAGTCCCTCCACTGTCCATTGTTACATGAAGGAGCATGGAATAACAATGGATGATGCATGTGAAAA  
 GATAAAGAGCTTATCGAAGATTTCATGGAAGGATATGCTGGAGCAATCCCTTGCCTGAAAGGGCTCCCAAAG  
 GTTGTGCCACAGCTAGTGTGACTTCTCAAGAACCACGGATAATATGTACAGGGATCGTGACGCATTGACTT  
 CTTCCAGAAGCACTCAAGGAAATGATACAGCTACTGTTTGTGGAGCCAATACCCGAATGA

***tps5-Del1* (Accession-Nummer: AY518313)**

ATGGCGTCTCCTCCAGCACATCGTTCCAGCAAGGCAGCTGATGAGGAGCTGCCAAAGGCTTCTTCGACCTTCC  
 ACCCAAGCCTGTGGGGCAGTTTCTTCTGACCTACCAGCCGCCAACTGCACCCAGCGAGCAAACATGAAAAGA  
 ACGAGCTGAGGTTTTAAGAGAACGTGTTAGGAAGGTTTTGAAGGGCTCGACGACTGATCAACTACCAGAAAACA  
 GTGAATCTTATATTAACATTGCAAAGACTTGGACTGGGTTACTACTACGAGAACGAGATAGACAAGTTGCTGC  
 ACCAAATTTACAGCAACTCCGATTACAATGAGAAAGATCTTAACTTGGTTTTCGCAGCGGTTCTACCTTCTTCG  
 AAAGAACGGCTACGATGTGCCATCAGATGTATTTCTGAACTTCAAACAGAAGAAGGCGGCTTTGCCTGTGCT  
 GCTGCTGACACGAGAAGCTTGTAAAGCTTATATAACGCAGCATATCTGAGGAAGCATGGAGAGGAGGTTACTAG  
 ACGAAGCGATTTTCATCGACTAGACTCCGCCTCCAAGATCTCCTTGGACGACTTCTTCCAGAATCGCCATTTGC  
 AAAGGAGGTGTCTTCTTCCCTTCGTACCCCTCTCTTCCAGAAGGGTTGGGATACTAGAAGCGAGAACTACATA  
 CCCATTTACGAAAAGGAGGCGACGCGAAATGAAGCCGTATTGGAGCTTGGCGAACTGAATTTTAACTTCAGC  
 AACTTGATTTCTGTGAAGAGCTAAAGCATTGCTCAGCGTGGTGGAACGAGATGATAGCCAAATCAAAGCTGAC  
 CTTTGTAGAGATAGAATTGTAGAGGAGTATTTCTGGATGAATGGAGCATGCTGTGATCCGCCGACTCCCTT  
 TCCCGAATTATACTGACAAAGATCACGGGGCTTATTACAATAATCGATGATATGTTTGATACACATGGTACCA  
 CTGAAGATTGCATGAAATTCGCTGAAGCATTGTCAGATGGGACGAAAGTGAATAACATCTCCTTCCAGAGTA  
 CATGAAGGATTTCTACATATTGATGTTGGAGACATTTTCAGTCATTTGAGGATGCTTTAGGGCCAGAGAAGAGC  
 TACCGTGTGCTTTACCTAAAACAGGCGATGGAGCGTTTAGTTGAGCTATACTCCAAGGAAATAAAATGGCGTG  
 ATCAGGATTATGTGGCGACAATGAGTGAACACCTCCAGTTTCAGCAGAGTCCATCGGAGCCAATGCTCTAAC  
 ATGTTCTGCATATGCTGGGATGGGTGATATGTCGATAACAAAGGAGACCTTCGAGTGGGCTTTGAGCTTTCTCCT  
 CAATTTATAAGAACTTTTGGTTTCAATTTGTACGGCTCTCCAACGATGTGCGTATCGACCAAGCGTGAGCAAAACA  
 AAGACCATAGTCCCTCCACTGTCCATTGTTACATGAAGGAGCATGGAACAACCATGGACGATGCATGTGAAAA  
 GATAAAGGAGCTTATCGAAGATTTCATGGAAGGATATGCTAGAGCAATCCCTTGCCTGAAAGGGCTCCCAAAG  
 GTTGTGCCACAGCTAGTGTGACTTCTCAAGAACCACGGATAATATGTACAGGGATCGTGACGCATTGACCT  
 CTTCCGAAGCACTCAAGGAAATGATACAGCTACTGTTTGTGGAGCCAATACCCGAATGA

***tps5-Del2* (Accession-Nummer: AY518314)**

ATGGCGTCTCCTCCAGCACATCGTTCCAGCAAGGCAGCTGATGAGGAGCTGCCAAAGGCTTCTTCGACCTTCC  
 ACCCAAGCCTGTGGGGCAGTTTCTTCTGACCTACCAGCCGCCAACTGCACCCAGCGAGCAAACATGAAAAGA  
 ACGAGCTGAGGTTTTAAGAGAACGTGTTAGGAAGGTTTTGAAGGGCTCGACGACTGATCAACTACCAGAAAACA  
 GTGAATCTTATATTAACATTGCAAAGACTTGGACTGGGTTACTACTACGAGAACGAGATAGACAAGTTGCTGC  
 ACCAAATTTACAGCAACTCCGATTACAATGTGAAAGATCTTAACTTGGTTTTCGCAGCGGTTCTACCTTCTTCG  
 AAAGAACGGCTACGATGTGCCATCAGATGTATTTCTGAGCTTCAAACAGAAGAAGGCGGCTTCGCCTGTGCT  
 GCTGCTGACACGAGAAGCTTGTAAAGCTTATATAACGCAGCATATCTGTGGAAGCATGGAGAGGAGGTTACTAG  
 ACGAAGCGATTTTCATCGACTAGACTCCGCCTCCAAGATCTCCTTGGACGACTTCTTCCAGAATCGCCATTTGC  
 AAAGGAGGTGTCTTCTTCCCTTCGTACCCCTCTCTTCCAGAAGGGTTGGGATACTAGAAGCGAGAACTACATA  
 CCCATTTACGAAAAGGAGGCGACGCGAAATGAAGCCGTATTGGAGCTTGGCGAACTGAATTTTAACTTCAGC  
 AACTTGATTTCTGTGAAGAGCTAAAGCATTGCTCAGCGTGGTGGAACGAGATGATAGCCAAATCAAAGCTGAC  
 CTTTGTAGAGATAGAATTGTAGAGGAGTATTTCTGGATGAATGGAGCATGCTGTGATCCGCCGACTCCCTT  
 TCCCGAATTATACTGACAAAGATCACGGGGCTTATTACAATAATCGATGATATGTTTGATACACATGGTACCA  
 CTGAAGATTGCATGAAATTCGCTGAAGCATTGTCAGATGGGACGAAAGTGAATAACATCTCCTTCCAGAGTA  
 CATGAAGGATTTCTACATATTGATGTTGGAGACATTTTCAGTCATTTGAGGATGCTTTAGGGCCAGAGAAGAGC  
 TACCGTGTGCTTTACCTAAAACAGGCGATGGAGCGTTTAGTTGAGCTATACTCCAAGGAAATAAAATGGCGTG  
 ATCAGGATTATGTGGCGACAATGAGTGAACACCTCCAGTTTCAGCAGAGTCCATCGGAGCCAATGCTCTAAC  
 ATGTTCTGCATATGCTGGGATGGGTGATATGTCGATAACAAAGGAGACCTTCGAGTGGGCTTTGAGCTTTCTCCT  
 CAATTTATAAGAACTTTTGGTTTCAATTTGTACGGCTCTCCAACGATGTGCGTATCGACCAAGCGTGAGCAAAACA  
 AAGACCATAGTCCCTCCACTGTCCATTGTTACATGAAGGAGCATGGAACAACCATGGACGATGCATGTGAAAA  
 GATAAAGGAGCTTATCGAAGATTTCATGGAAGGATATGCTAGAGCAATCCCTTGCCTGAAAGGGCTCCCAAAG  
 GTTGTGCCACAGCTAGTGTGACTTCTCAAGAACCACGGATAATATGTACAGGGATCGTGACGCATTGACCT  
 CTTCCGAAGCACTCAAGGAAATGATACAGCTACTGTTTGTGGAGCCAATACCCGAATGA

AAAGGAGGTGTCTTCTCCCTTCGTACCCCTCTCTTCAGAAGGGTTGGGATACTAGAAGCGGAAACTACATA  
 CCCATTTACGAAACGGAGGCGACGCGAAACGAAGCCGATTGGAGCTTGCGAAACTGAATTTTAACTTCAGC  
 AACTTGATTTCTGTGAAGAGCTAAAGCATTGCTCAGCGTGGTGGAAACGAGATGATAGCCAAATCAAAGCTGAC  
 CTTTGTAGAGATAGAATTGTAGAGGAGTATTTCTGGATGAATGGAGCATGCTATGATCCGCCATACTCCCTT  
 TCCCGAATTATACCTGACAAAGATCACGGGACTTATTACAATAATCGATGATATGTTTGATACACATGGTACCA  
 CTGAAGATTGCATGAAATTCGCTGAAGCGTTTGGCAGATGGGACGAAAGTGCAATACATCTCCTTCCAGAGTA  
 CATGAAGGATTTCTACATATTGATGTTGGAGACATTTTCAGTCATTTGAGGATGCTTTAGGGCCAGAGAAGAGC  
 TACCGTGTGCTCTACCTAAAACAGGCGATGGAGCGTTTAGTTGAGCTATACACCAAGGAAATAAAATGGCGTG  
 ATGAGGATTTATGTGGCGACAATGAGTGAACACCTCCAGGTTTCAGCAGAGTCCATCGGAGCCAATGCTCTAAC  
 ATGTTCTGCATATGCTGGGATGGGTGATATGTCGATAACAAAGGAGACCTTCGAGTGGGCTTTGAGCTTTCCA  
 CAATTTATAAGAACTTTTGGTTCATTTGTACGGCTCTCCAACGATGTCGTATCGACCAAGCGTGAGCAAACAA  
 AAGACCATAGTCCGCTCCACTGTCCATTGTTACATGAAGGAGCATGGAATAACAATGGATGATGCATGTGAAAA  
 GATAAAAAGAGCTTATCGAAGATTGGAAGGATATGCTGGAGCAATCCCTTTCGCGTGAAGGGCTCCCAAAG  
 GTTGTGCCACAGCTAGTGTGTTGACTTCTCAAGAACCACGGATAATATGTACAGGGATCGTGACGCATTGACTT  
 CTTTCAGAAGCACTCAAGGAAATGATACAGCTACTGTTTGTGGAGCCAATACCCGAATGA

### ***tps6-B73* (Accession-Nummer: AY518315)**

ATGGCTGCCCAACACTAAGTGCAGATGGTCCCTCGCCTCGGCCAGCAGGAGATGAAGAAGATGTCTCCCTCCT  
 TCCATCCAACCTCTGTGGGGAGATTTCTTTCTTTCTTACGAGGCTCCGACCGAGGCACAGGAAGCTCAAATGAG  
 AGAAAAGGCTGCAGTGTAAAGGAAGAAGTGAGAAACATGATTAAAGGTTACATGATGTGCCAGAAATAGTG  
 GACCTTATTATCACCTGCAGCGACTAAATCTGGACTACCCTACGAGGATGAGATAAATGAAAAGTTGACTG  
 TTGTTTACAAAATCCAATTATGATGGTGGTAATTTGGACTTAGTTTACGCTCGATTCTATCTTCTGCGTAAATG  
 TGGCTACGATGTTTTCATCTGATGTATTCCATAAAATCAAAGACCAACTTGGGAATTTTGTGAGGCTGATACC  
 AGGAGCTTGTAAAGCTTATACAATGCAGCATTCTGAGGATTCATGGAGAGACAGTGCTTGACGAGGCAATTT  
 CTTTTACTATGAGAGTTCTTCAAGATAGATTAGAACATTTGGAATCGCCATTAGCAGAGGAAGTGTCTTCTGC  
 TCTTGACACACCCTTTTTCGAAGGGTTGGAACCTTTGGAATGAAGGATTACATTCCTATCTACGAAAAGGAC  
 GCTAAACAAAATAAATCAATATTAGAGTTTGCGAACTAAACTTCAACCTTTTACAACCTTCGTTATTCATCAG  
 AGCTAAAAGAGTGCACAACCTGGTGGAAAGAAGTTCGCGTCAATCAAACCTTGAGTTTCGTCAGGGATAGGAT  
 AGTAGAGGTGTACTTTTGGATGAGTGGGGGATGCTATGATCCTCAATATTCTCATTCTCGAATTATACTTACA  
 AAGATAGTTGCTTTCATCACGATTCATAGATGATACCCTTGACTCACATGCTACTTCTTGTGAGAGTATGCAAC  
 TTGCAGAAGCAATCGAAAGGTGGGATGAAAGTGCAGTCTCTACTCCCAGAATACATGAAGGATTTCTACAT  
 GTATTTGTTGAAGACATTTTCATCGTTTGAAGATGAGTTAGGACCAGACAAGAGCTACCGAGTGTCTACTTA  
 AAAGAAGCGGTGAAGGAATTAGTTCGGGAATATACCAAGGAAATAAAATGGCGTGATGAGGATTATGTGCCCA  
 AACATTGAAAGAGCACCTTAAAGTTTCACTCATAAGCATTGGAGGCACCTCTGGTGTATGTTCTGCGTTTTGT  
 TGGAATGGGTGATGTAGTAACAAAGAAGATCATGAAATGGGTTATGAGTGATGCTGAACTTGTTAAGTCTTTT  
 GGTATATTTGTACGGCTCTCCAATGATATTGTATCAACCAAGCGTGAACAAAGAGAGAAGCATTGTGTCTCCA  
 CTGTTCAAGTGTACATGAAGCAGCATGAAATAACAATGGATGAAGCGTGTGAGCAGATAAAAAGAACTTACAGA  
 AGATTCATGGAAGTTCATGATTGAACAAGGCCTTGACTAAAAGAATAACCCGATAAATTGTGCCACGAACGGTA  
 CTAGATTTGCACGAACGTAGACTACATGTACAAGGAAGCTGATAAGTACACTGTCTCACATACAATCAAAG  
 ACATGTTAACGTGCTTTATGTGAAGCCGGTACTCATGTGA

### ***tps7-B73* (Accession-Nummer: AY518316)**

ATGGCTACTACGGGCACAACATCTATGCCAGCACCTGTGTTTTACCCACCGGTGTGGGGGGACTACTTTCATCA  
 AATTTGTCCCAGAGCCATTGCAGGTTTTCAGATGAAACGATGGCAGAGAGAATCAGGCATTTGAGAGAGGAGGT  
 AAGTGGTATGTTCCAGGCTTGAAGAAGCTTGTGGACAAAACGAACCTAGTAGACGTGGTACAACGTCTTGGA  
 ATAGATCACCATTTTCGAGGAACAGATAGCCACTGCCCTAGCCAGCATCCACAGCGCTGGATTATTCAATAGCT  
 CAAGCCTACACGAGGCTGCCCTTCGGTTTCGCTTGTAGGCAGCAGGGGTTTTGGGTTTCTGCAGATGAACT  
 TGTCAAGTTCATCAAGAACGAAGACGGGAGCTTATCGATGGTATAACCAATGACCCAAAGGGCCTGTTGAGC  
 TTATACAACGCAGCTCACCTTGTACTCACGACGAGGGGACACGACACTTGAAGATGCCATCGCATTTGCAA  
 GGCAGCATCTGGAAGCTGCTAGAGATGTAGTCTCAAGTCCCCTCTAGCTGAACAAGTCGGCCGTGCCCTTGG  
 TATCCCCTGCCAAGGACCTTAAAGAGGGGAGGAAGCAATAGCTTTTATCCCGAGTATAGCTCACAACAAGAT  
 CAACAAGTGTACAGCCCCGTGATACCTAGAGCTTGCCAAGCTAGACTTCAACCTCCTTACGATCTCCATCAAG  
 AAGAACTCAAGGAGATTTCTCAATGGTGGAAAGACCTCTCTGGAGAAATCGGATTAGGCTACGTCAGGGACCG  
 CATCGTCGAGTGTACTTTTGGTTCGTATACTGTGCACTACGAGCGAGGGCAAGCGCGTGCACGGATGATACTT  
 GCCAAGGTATTCATGTTAACGTCTTTGTTAGATGACTTACGATGTGCATGCAACTTTGGAGGAGGGCCAGGG  
 AGCTCAACAAGGCTATTCAAAGATGGGATGAGAGTGTGTTTCTCTTCTACCCGAGTACCTAAAGAAATTTCTT  
 TGTCAAGGTGATAAGTAACTTCAAGGAGTTTGGAGTGTGTTTGGAGTACATGAAAAGTATCGTAATGTTTAC  
 AATATTAAGGGTTCCAACATTTATCCAACATTTATCTCCAAGAAGCAGAATGGTTTTCATCATGGCTGCACCTC  
 CAAGCTTCAAAGATCAAGTGAATGTTTCTGTACATAACGGGGGGCGCTCAGGTAAGCATTGGTTTGTGTTGT

TGGCATGGGTCATGAGGCAACCAGAGAGGCATTGAGTGGGCCATCGGTGACACTGATGCTATATGGGCTTGT  
GGAGAGGTGTCACGTTTCATGGATGACATGTCAGCGTTCAAGAATGGTAGGAACAAAATGGATGTCGCCAGTT  
CTGTGGAGTGTACATCAAGGAGCACAATGTCCCTAGCGAGGTCGCCCTGGCAAGGATAAAATTCCTTGGTTGA  
AGATGCATGGAAGACCATAAATCAAGCACCATTTAAGTACCCTGCTCTATTCCCGGTTGTGCAACGAGTTACC  
AGCCTAGCAAAGAGCATGACACTGCTGTTCCCTCGATAAGAGGGATGCGTACACATACAGCAAGGACTTTCAA  
CGACACTGGAGACCATTTCGTAAGACATATTCCGCTATGA

***tps9-B73* (Accession-Nummer: AY518317)**

ATGGCGCCTCCTCCTCCAGCGCTGGCAGAGGAGACTGCTGCCTTCCACCCAAGCCTGTGGGGCGATTTCTTCC  
TGACTTACCAGCCGCCAACTGCGCCTCAGCAAGCATGCATGAAAGAACGAGCTGAGGTTTTAAGAGAAGATGT  
CAGGAAGATTTTGATGGGGCCATGTGAGTTACCAGAGACACTGGGTCTTATATTGACGTTGCAACGCTTTGCA  
CTGGATTACTACTACGAAAACGAGATCGACAAGTTACTCCACTGTATTTACGACGACGACGACTCTGATTACG  
ATGATAAAGATCTAAACCTAGTTTCCCTGCGCTTTTATCTTCTTCGAAAGAATGGTTACGATGTGTCATCAGA  
TGTATTTCTAGTCTTCAAACAGAAGAAGGGAGCTTCGCTTATGCTGATGACACGGCAAGCTTGTTAAGCTTG  
TACAATGCAGCGTACTTGAGGAAGCATGGAGAGGAGGTAAGGACGAGGCAATTTCCCTTCGCTAGACGACGTT  
GCCTTGAAGCAGGTATCCTTTCGCACCCCTCTTTTTCAGAAGGGTTGGGATACTAGAGGCGAGAAATACATAACC  
CATCTACGAGAAGGAGGCGGCAAGAAATGACGCCGTGTTGGAGCTTGCCAAACTGAACTTTAACCTTCAGCAA  
ATTGCCTTCTGTGAAGAGCTAAAGCATTGCACATTGTGGTGGAAAGGATTTCCCTTGCCAAATCAAAGATGGCTT  
TTGTTAGGGATAGAATAGTGGAGGTGATTTCTGGATGAACGGGGCATGCTATGATCCCCGACTCTCGTTC  
CCGAATCATACTAACGAAGATCACATCTCTCGTAACAATAATCGATGACATGTTTCGACACATATGGTACCCT  
GAAGACTGCACCAAGTTCATGAAGCAATTGGCAGATGGGATGAAAGCGCCCTACCTCTTCTCCACAGTATA  
TGAAGGTTTTCTACTTATTTTCAGTTGGAGACATTTTCGTTTCAATTTGAAGATGAGTTGGGGCCCCGAGAACAGCTA  
TCGTGTCCATTACCTAAAAAATCGATGGAGCGTCTAGTTTCAGCAATACTACAGGGAAATAAAGTGGCGTGAC  
GAAAACATATGTGCCGAAAACAATGACCGAACACCTTCAAGTGTCAATGGAAAGCATAGGATCCGTTGCTCTAG  
CATGTGCTGCATATGTTGGAATGGGTGACGTATAACAAAGGAGACCCCTTGACTGGGTTTTGAGCTATCCTCA  
GTTTCTGACGACTTACGGTATCGTACGACTGTCTAACGATGTTGTATCAACAAAGCGTGAGCAAACAAAAGAC  
CATAGTCCCTCCACTGTCCATTGTTACATGAAGGAGCATGGAACGACCATGGACGATGCATGTGAAAAGATAA  
AGGAGCTTATCGAAGATTCATGGAAGGATATGCTACAGCAATCCCTTTCGCTGAAAGGGCTCCCAAAGGCTGT  
GCCACGAACAGTGTGACTTTTTAAGAACCAGATAATATGTACAAGAATTGCGATGCGTTCACTTCTTCA  
GAAGTACTCCGAGAAATGATACGACTACTGTTTCGTGGAGCCAATACCTGAATAA

***tps5-B73* (genomischer Klon, Introns sind unterstrichen dargestellt)**

ATGGCGTCTCCTCCAGCACATCGTTCCAGCAAGGCAGCTGATGAGGAGCTGCCAAAGGCTTCTTCGACCTTCC  
ACCCAAGCCTGTGGGGCAGTTTTCTTCCCTGACCTACCAGCCGCCAACTGCACCCAGGTAGTAGAATTTTCGTCA  
GGGGATAAACTTTGCTCGCATATATATGTAGATGAAACTAACATTGATCTGGGAATATATGTGACGAAATAAT  
TGACCTATATATATACTTTTGTCCTCTGCAGCGAGCAAACATGAAAGAACGAGCTGAGGTTTTAAGAGAACG  
TGTTAGGAAGGTTTTGAAGGGCTCGACGACTGATCAACTACCAGAAACAGTGAATCTTATATTAACATTGCAA  
AGACTTGGACTGGGTTACTACTACGAGAACGAGATAGACAAGTTACTGCACCAAATTTACAGCAACTCCGATT  
ACAATGTGAAAGATCTTAACTTGGTTTTCGCAGCGGTTCTACCTTCTTCGAAAGAACGGCTACGATGTGCCATC  
GGGTATATATAAACATCGTATATCTTCCACTATTTAAATTTGAAACAAATATTTTAAATTTGAAACAGGAC  
ATATAATATAACTACTATTCTTCGTATGACCCAAATTTTGCAGATGTATTTCTGAGCTCAAACAGAAAGCG  
GCGGCTTCGCCCTGTGCTGCTGCTGACACGAGAAGCTTGTAAAGCTTATATAACGACGATATCTGTGGAAGCA  
TGGAGAGGAGGTACTAGACGAAGCGATTTTCATCGACTAGACTCCGCCTCCAAGATCTCCTTGGACGACTTCTT  
CCAGAATCGCCATTTGCAAAGGAGGTGCTTCTTCCCTTCGTACCCCTCTCTTCAGAAGGGTTGGGATACTAG  
AAGCGAGAACTACATACCCATTTACGAAACGGAGGCGACGCGAAACGAAGCCGTATCGGAGCTTGCAGAACT  
GAATTTAACCTTCAGCAACTTGATTTCTGTGAAGAATAAAGCATTGCTCAGCTAAGATTGTTTTCATCTC  
TCACTTCGAATTAAGTGGTGCTCTCTCTCTCTCATGTTTTAATTGGCTTATTAATTGTTATCTGAACA  
TGCATGTGGTAGTGGTGGAAACGAGATGATAGCCAAATCAAAGCTGACCTTTGTTAGAGATAGAATTTAGAG  
GAGTATTTCTGGATGAATGGAGCATGCTATGATCCGCCATACTCCCTTTCCCGAATTATACTGACAAAGATCA  
CGGGACTTATTACAATAATCGATGATATGTTTGATACACATGGTACCCTGAAGATTGCATGAAATTCGCTGA  
AGCGTTTGGCAGGTAACGGTTTTTGCAAACCACACATGTGAGATATATATATATATAGTTTTGTGTTTTAGAAA  
TAGTACTTGTATTAACATTTTAAACACATAGGCATATAAGCCTGATGTACACATAGGCATGTGCCTTCTTGCAT  
CATTTTACATTGGTTTTCCGGTAAAATAAAAGGGGACAAAAGGTTTCATGGTGTAGAACAAATGTTAACCATAGAA  
ATCATTGAAATATATTTTTATAATGCAATATGTAAAGTAAGGAAAGCATTAAACAAAATTTATGTACCCTCAA  
TGATAATATTTGTTCAATGAAAGTTAGAGATCAGTCGTGAGTATTTGAATACTGCAGCTTTAATACTATATAGG  
ACACAATGTTCTCATTGTTGTAATGCAAGTGGGACGAAAGTGAATACATCTCCTTCCAGAGTACATGAAGG  
ATTTCTACATATTGATGTTGGAGACATTTTCAGTCATTTGAGGATGCTTTAGGGCCAGAGAAGAGCTACCGTGT  
GCTCTACCTAAAACAGGCGCAAGTATTCTACATATTATATACCCTCTTATGAGTGCCTTATATGTGCATGAG  
AGCATCTCAAAGAACACACAGTCATTGTAATCATCTAGAAATTAATAAACACTGTGCTCTATAATGAATTAT

GCCACAGTCGTGAAAAACACAAAAATATAATATCTTAATATTAAAACCATTCCATGGCTTGGATACATGTGG  
TGTTGAGTTAGCTATTCATGAGATGCCTTATTTCCCTATTAATTGTTTCCTTGTAAGTGTATTGCTCATAAAGA  
TGCAAAACAAAACAGAATTGTTTTTTTACAAGCAGTGGAACTTAAGGAAACAGTCTTTGTGTTTTTTTTTTGA  
GTTATTGCATATTACGTGTTCCCTCGGTTCTTTTTTACTTGTTATGTTTTAGTTCAAAAATAAACTAAGGGAC  
GACAGATTATTGGAGGATGGAGGTAGTATATCTGACAGCAACAATATCATGATCATAAGTAACACGTACGTTT  
CCGTGTTTCATACAGATGGAGCGTTTTAGTTGAGCTATACACCAAGGAAATAAAATGGCGTGATGAGGATTATG  
TGGCGACAATGAGTGAACACCTCCAGGTTTTAGCAGAGTCCATCGGAGCCAATGCTCTAACATGTTCTGCATA  
TGCTGGGATGGGTGATATGTCGATAACAAAGGAGACCTTCGAGTGGGCTTTGAGCTTTCCACAATTTATAAGA  
ACTTTTGGTTCATTTGTACGGCTCTCCAACGATGTCGTATCGACCAAGGTGGAATTTCTCTATCCTTAAACAA  
GCTATGCGTGTTTCGCTTTATATTAAGCCGGCTGTTTAAATTATTGTAGCTACAATACATAGGGAAAAAAAT  
ACTCCGGTACGGATTAAGCCAAACGAACAATATTGCGCTTGTTTCGAGAAAGTGTATTACTTTGTGCAAAATC  
TGTATATTTGAGTTCCTTTTAACTGTCGATTTGGCAGGCATGTATAATGAATTCGGTAGATTCCATTCGTG  
GTATTTATGATAATATGTTTACATCTGCAATCAAGCATGCATGCACACACCTGACAATTCCTTCTCACTAATT  
AATGACGCAGCGTGAGCAAACAAAAGACCATAGTCCGTCCACTGTCCATTGTTACATGAAGGAGCATGGAACG  
ACCATGGACGATGCATGTGAAAAGATAAAGGAGCTTATCGAAGATTCATGGAAGGATATGCTAGAGCAATCCC  
TTGCGCTGAAAGGGCTCCCAAAGGTTGTGCCACAGCTAGTGTGACTTCTCAAGAACCACGGATAATATGTA  
CAGGGATCGTGACGCATTGACCTCTTCGGAAGCACTCAAGGAAATGATACAGCTACTGTTTGTGGAGCCAATA  
CCCGAATGA

## Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Dr. Jörg Degenhardt für die Überlassung des Themas sowie die gute Betreuung und die vielen hilfreichen Diskussionen bedanken. Für die kritische Durchsicht des Manuskriptes während der Weihnachtsfeiertage, aber auch für die kleine Einführung in die kalifornische Lebensweise sei ihm ebenfalls herzlichst gedankt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. J. Gershenzon für die Möglichkeit, die vorliegende Arbeit in der Abteilung „Pflanzenbiochemie“ am Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie“ durchzuführen, und für die motivierenden Diskussionen sowie die Begutachtung dieser Dissertationsschrift.

Den Mitgliedern der Abteilung „Pflanzenbiochemie“ danke ich für die gute Zusammenarbeit und die schöne Arbeitsatmosphäre im Labor. Die netten, oft auch nicht wissenschaftlichen Plaudereien mit Christiane, Sabrina und Nadine trugen wesentlich dazu bei, den Laboralltag zu meistern.

Bei Christiane möchte ich mich im besonderen dafür bedanken, dass sie sich alle spontanen und oftmals reichlich wirren Ideen und Theorien geduldig anhörte und hilfreich diskutierte.

I would like to thank Joe Noel (The Salk Institute, San Diego) for the opportunity to do the modeling and docking work in his department. Special thanks to Paul O'Maille for his patient help with this work and for the great 'brats'.

Bei Herrn Prof. Dr. G. Theißen und Herrn Prof. Dr. W. A. König bedanke ich mich für ihre Bereitschaft zur Erstellung eines Gutachtens zu dieser Arbeit.

Herrn Prof. W. A. König danke ich für die Zusendung von Terpenstandards.

Weiterhin danke ich auch meiner Kollegin Meike Burow. Ohne ihre vielen Ratschläge zur Textverarbeitung hätte ich kapituliert und dieses Werk per Hand geschrieben.

Tobias Köllner



## Wissenschaftliche Publikationen und Vorträge

### Publikationen:

**Köllner, T.G., Schnee, C., Gershenzon, J. & Degenhardt, J.** The emission of sesquiterpene hydrocarbons from maize (*Zea mays*) follows a distinct developmental and spatial pattern. *Phytochemistry*, in press

**Köllner, T.G., Schnee, C., Gershenzon, J. & Degenhardt, J. (2004).** The variability of sesquiterpenes emitted from two *Zea mays* cultivars is controlled by allelic variation of two terpene synthase genes encoding stereoselective, multiple product enzymes. *The Plant Cell* 16, 1115-1131

**Hoballah, M.E., Köllner, T.G., Degenhardt, J. & Turlings, T.C.J. (2004).** Costs of induced volatile production in maize. *Oikos* 105, 168-180.

**Köllner, T.G., Schnee, C., Gershenzon, J. & Degenhardt, J. (2003).** Terpene formation in maize and its ecological and evolutionary significance. *Chemische listy* 97, 324-326.

**Schnee, C., Köllner, T.G., Gershenzon, J. & Degenhardt, J. (2002).** The maize gene *terpene synthase 1* encodes a sesquiterpene synthase catalyzing the formation of (*E*)- $\beta$ -farnesene, (*E*)-Nerolidol, and (*E,E*)-Farnesol after herbivore damage. *Plant Physiology* 130, 2049-2060.

### Posterpräsentationen:

**Köllner, T.G., Schnee, C., Gershenzon, J. & Degenhardt, J. (2002).** The stereospecificity of two maize sesquiterpene synthases is dependent on four amino acids in the active centre. *Botanikertagung*, Freiburg i. Br.

**Köllner, T.G., Schnee, C., Gershenzon, J. & Degenhardt, J. (2002).** The evolution of terpene structural diversity in maize. *Botanikertagung*, Freiburg i. Br.

**Köllner, T.G., Schnee, C., Gershenzon, J. & Degenhardt, J. (2002).** The in vitro products of the maize terpene synthase TPS4 and TPS5 are characteristic constituents of the maize volatiles. *19<sup>th</sup> Annual Meeting of the International Society of Chemical Ecology*, Hamburg.

**Schnee, C., Köllner, T.G., Gershenzon, J. & Degenhardt, J. (2002).** Identification of maize terpene synthase genes involved in the indirect defense against lepidopteran herbivores. *19<sup>th</sup> Annual Meeting of the International Society of Chemical Ecology*, Hamburg.

**Köllner, T.G., Schnee, C., Gershenzon, J. & Degenhardt, J. (2001).** Characterization of substrate specificity and reaction products of maize terpene synthases. *5<sup>th</sup> European Symposium on Plant Isoprenoids*, Bonn.

**Degenhardt, J., Schnee, C., Köllner, T.G. & Gershenzon, J. (2000).** The terpene synthase gene family in *Zea mays* and its role in defense against herbivory. *Botanikertagung*, Jena.

**Degenhardt, J., Schnee, C., Köllner, T.G. & Gershenzon, J. (2000).** Biochemical characterization of three terpene synthases from *Zea mays*. *Botanikertagung*, Jena.

### Vorträge:

**Köllner, T.G., Schnee, C., Gershenzon, J. & Degenhardt, J. (2002).** The stereospecificity of two maize sesquiterpene synthases is dependent on four amino acids in the active centre. *14<sup>th</sup> International Symposium on Chirality*, Hamburg.

**Köllner, T.G., Schnee, C., Gershenzon, J. & Degenhardt, J. (2000).** Isolation and characterization of terpene synthase genes in *Zea mays*. *3. Kurt-Mothes-Doktoranden-Workshop*, Halle (Saale).



# Lebenslauf

## Angaben zur Person:

Name: Köllner  
Vorname: Tobias Gerhard  
Geburtsdatum: 30.10.1971  
Geburtsort: Eisenach  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: deutsch

## Schulausbildung:

1978-1988 Polytechnische Oberschule, Ruhla  
1988-1991 Berufsausbildung (Werkzeugmacher) mit Abitur, Ruhla

## Studium:

03/1993-08/1994 Studium der Medizintechnik (Vordiplom), Fachhochschule Jena  
09/1994-08/1999 Studium der Biochemie, Friedrich-Schiller-Universität Jena  
Diplomarbeit zum Thema: „Charakterisierung neuer Targetingkomponenten des bakteriellen Proteintransports“

## Tätigkeiten:

09/1999- Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie, Jena, Dissertation zum Thema: „Molekulare und genetische Aspekte der Biosynthese von komplexen Sesquiterpengemischen in Mais“

Jena, im Januar 2004



## **Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass:

- mir die geltende Promotionsordnung der Fakultät bekannt ist,
- ich die vorliegende Dissertation selbst angefertigt habe und alle benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in der Arbeit angegeben sind,
- ich alle Personen, die mich bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben, benannt habe,
- ich nicht die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen habe,
- Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,
- ich die vorliegende Arbeit nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe,
- ich diese Arbeit, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, im Januar 2004

Tobias Köllner