

**Friedrich-Schiller-Universität Jena**

Biologisch-Pharmazeutische Fakultät

**Max-Planck-Institut für chemische Ökologie**

Abteilung Biochemie



---

seit 1558

Vergleichende Analyse von Enzymen der Terpenoidbiosynthese aus  
*Erythroxylum coca* und *Ulmus minor* – Isolierung und  
Charakterisierung von Isoprenyldiphosphatsynthasen und  
Terpensynthasen

**Bachelorarbeit**

zur Erlangung des Grades eines

Bachelor of Science (B.Sc.)

vorgelegt von

Tom Floßmann

aus Jena

Jena, den 27.09.2012

Gutachter:

Dr. Axel Schmidt

PD Dr. Klaus J. Appenroth

# Inhaltsverzeichnis

<b>A) Einleitung</b> .....	1
1. Pflanzlicher Sekundärmetabolismus .....	1
2. Isoprenoide .....	1
3. Pflanzlicher Terpenoidstoffwechsel .....	2
3.1 Isopentenylidiphosphat- und Dimethylallyldiphosphat-Biosynthese .....	3
3.1.1 Mevalonatweg .....	3
3.1.2 Methylerythritolphosphatweg .....	4
3.2 Terpenbiosynthese.....	5
3.2.1 Isoprenylidiphosphatsynthasen .....	5
3.2.2 Terpensynthasen .....	6
4. Isoprenoide in <i>Ulmus minor</i> und <i>Erythroxylum coca</i> .....	7
5. Zielstellung der Arbeit .....	9
<b>B) Material und Methoden</b> .....	11
1. Material .....	11
1.1 Kits.....	11
1.2 Bakterienstämme .....	11
1.3 Medien .....	12
1.4 Antibiotika .....	12
1.5 Puffer und Lösungen.....	12
1.6 Chemikalien .....	14
1.7 Pflanzenmaterial .....	14
1.8 Geräte.....	14
2. Molekularbiologische Methoden .....	15
2.1 RNA-Isolation.....	15
2.2 RT-PCR .....	15
2.3 RACE-PCR .....	15
2.4 TOPO-Cloning .....	16
2.5 Transformation mittels chemisch kompetente Zellen.....	16
2.6 Plasmid-Minipräparation.....	17
2.7 Sequenzierung.....	17
2.8 Gateway-Cloning .....	17
2.8.1 attB-PCR .....	17
2.8.2 BP-Reaktion .....	18
2.8.3 LR-Reaktion .....	18
2.9 Expression .....	18
2.10 Proteinaufreinigung via GST-Tag .....	19
3. Datenanalyse .....	19
4. Analytik .....	20
4.1 Enzymassay.....	20
4.2 HPLC-MS/MS .....	21

<b>C) Ergebnisse</b> .....	22
1. Isoprenyldiphosphatsynthesen.....	23
1.1 Geranyl- und Geranylgeranyl- Diphosphatsynthesen .....	23
1.2 Farnesyldiphosphatsynthesen.....	24
1.3 Solanesyldiphosphatsynthesen.....	24
2. Terpensynthesen .....	25
2.1 Mono- und Sesqui- Terpensynthesen .....	25
2.2 Diterpensynthesen .....	25
3. Enzymaktivitäten.....	26
<b>D) Diskussion</b> .....	29
1. Isoprenyldiphosphatsynthesen.....	29
2. Terpensynthesen .....	35
3. Zusammenfassung und Aussicht .....	37
<b>E) Literaturverzeichnis</b> .....	38
<b>F) Anhang</b> .....	I
1. Primer .....	I-II
2. Alignments.....	III-X
3. Abkürzungsverzeichnis .....	XI-XIII

# Einleitung

## 1. Pflanzlicher Sekundärmetabolismus

Sekundäre Naturstoffe bilden eine große strukturell vielfältige Gruppe von Metaboliten, die häufig keine überlebenswichtige Funktion für den Organismus haben [1]. Dennoch erfüllen Sekundärmetaboliten in Pflanzen wichtige Aufgaben, wie ökologische Interaktionen oder die Abwehr von Herbivoren und Pathogenen [1, 2]. Sie finden ebenfalls Anwendung als Duftstoffe oder Pigmente zur Verteidigung gegen Parasiten, [3] oder dienen der Anlockung von Symbionten [4]. Weitere Beispiele sind den Haushalt der Pflanze regulierende Phytohormone, Antibiotika [5] oder strukturgebende Moleküle, wie Polysaccharide. Diese vielfältigen Funktionen und die daraus resultierenden Vorteile für den Organismus sind der Grund für die hohe Diversität sekundärer Metaboliten [6].

## 2. Isoprenoide

Die größte Klasse sekundärer Stoffwechselprodukte ist die der Isoprenoide, die sich formal von ihrem Monomer Isopren ableiten. Durch die strukturelle Vielfalt und Individualität der Isoprenoide einzelner Organismen ist die Vielzahl an ökologischen Interaktionen überhaupt erst möglich [7]. Synthetisiert werden diese sowohl von Eubakterien und Eukaryoten [8], als auch von Archaeen [9, 10], was für eine frühe phylogenetische Entwicklung des Isoprenoidstoffwechsels spricht. Bei Untersuchungen von 2,5 Milliarden Jahre alten Sedimenten wurden von Summons *et al.* (1999) Hopanoide (membranständige Triterpenoide) identifiziert, die dies bestätigen [11, 12].

Nicht alle Isoprenoide können zu den sekundären Metaboliten gezählt werden, da einige für das Überleben des Organismus essentiell sind. Wichtige und in vielen Organismen etablierte Isoprenoide sind zum Beispiel Ubichinone, die den Elektronentransport in der Atmungskette übernehmen [13]. Ebenfalls weit verbreitet sind Carotinoide, die beispielsweise im Light Harvesting Complex von Protozoen [14] und höheren Pflanzen [15] den Photoenergietransfer vermitteln oder bei zahlreichen Spezies dem Schutz vor photooxidativem Stress dienen [16, 17]. Auch Gibberelline und Abszissinsäure sind wichtige Vertreter der Isoprenoide. Sie regulieren als Phytohormone das Wachstum der Pflanze [18, 19].

### 3. Pflanzlicher Terpenoidstoffwechsel

Abgeleitet von den Isoprenoiden werden mit über 55 000 bisher bekannten Vertretern die Terpene [8]. Ihre Biosynthese erfolgt aus dem universellen Edukt Isopentenyl-diphosphat (IDP) und dessen Isomer Dimethylallyldiphosphat (DMADP) [20]. Zulieferer der C<sub>5</sub>-Körper für den Isoprenoidstoffwechsel sind der cytosolische Mevalonatweg (MVA-Weg) und der plastidäre Methylerythritolphosphatweg (MEP-Weg) [21].

Aus diesen C<sub>5</sub>-Einheiten werden durch sequentielle Kondensationsreaktionen die Ausgangsverbindungen für Terpene, Geranyl-diphosphat (GDP, C<sub>10</sub>), Farnesyl-diphosphat (FDP, C<sub>15</sub>) oder Geranylgeranyl-diphosphat (GGDP, C<sub>20</sub>), gebildet [22]. Katalysiert wird die Synthese durch die Enzymklasse der Isoprenyldiphosphatsynthasen (IDS). Die Terpen-Vorläufer werden unter Beteiligung von Terpensynthasen (TPS) durch intramolekulare Umlagerungen zyklisiert und durch Oxidation und Reduktion weiter modifiziert. In Abhängigkeit von ihrer Anzahl an Kohlenstoffatomen bzw. ihrem Edukt werden die so gebildeten Terpene als Mono- (C<sub>10</sub>), Sesqui- (C<sub>15</sub>) und Di- (C<sub>20</sub>) Terpene bezeichnet. Kleine Terpene, die direkt aus IDP synthetisiert werden, bezeichnet man als Hemiterpene (C<sub>5</sub>). Neben den oben genannten kurzkettigen können auch langkettige (C<sub>25</sub> – C<sub>50</sub>) und polymere (bis ca. C<sub>5000</sub>) Isoprenyldiphosphate synthetisiert werden [23]. (siehe Abb. 1)

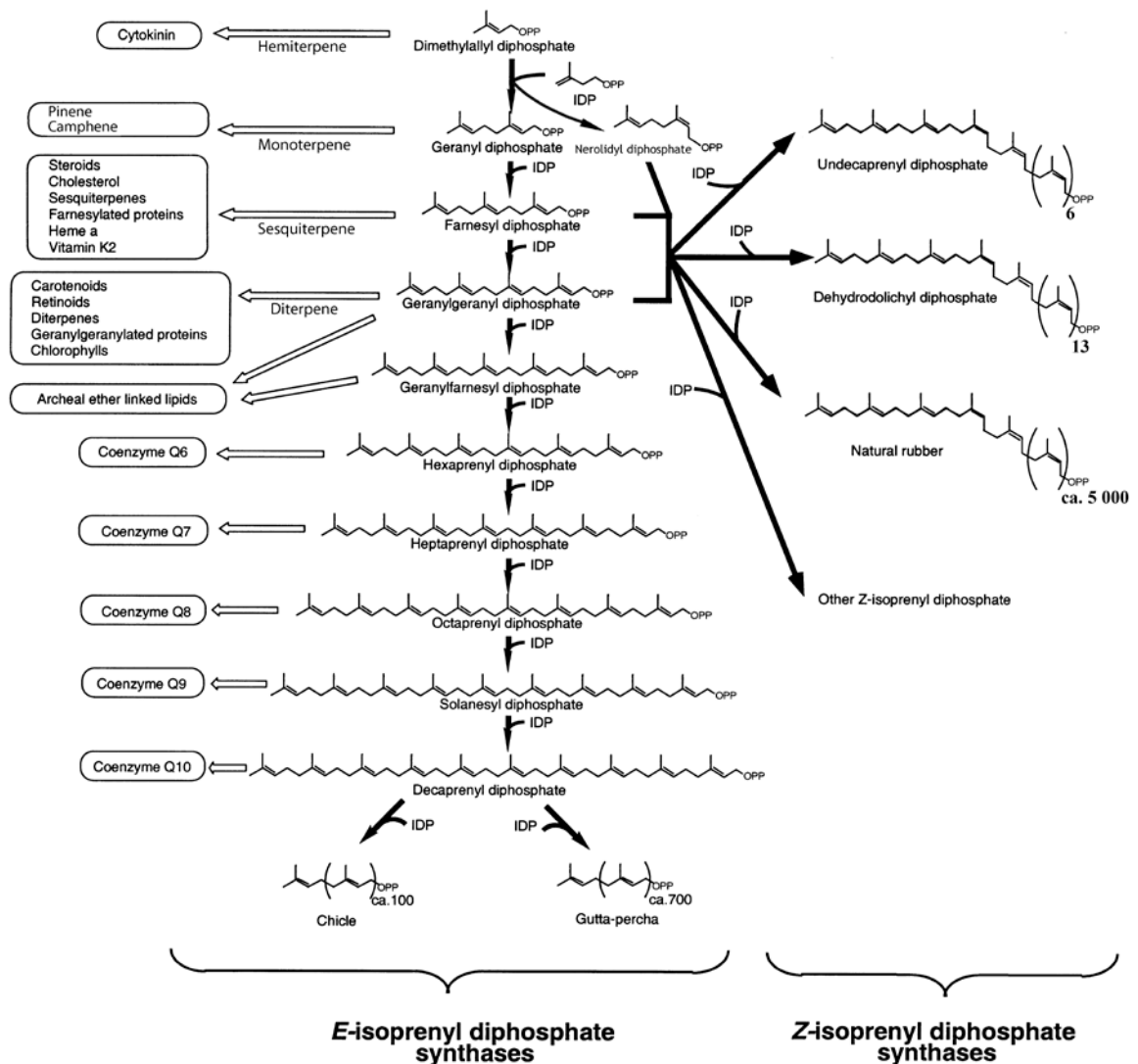


Abb. 1: Übersicht der Isoprenyldiphosphat-Synthesewege und einiger ausgewählter Terpene, ausgehend von den universellen Edukten Isopentenylidiphosphat (IDP) und Dimethylallyldiphosphat (DMADP). (verändert nach [23])

### 3.1 Isopentenylidiphosphat- und Dimethylallyldiphosphat-Biosynthese

#### 3.1.1 Mevalonatweg

Die IDP-Synthese nach dem MVA-Weg erfolgt im Cytoplasma durch die Kondensation von drei Einheiten Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) über Acetoacetyl-CoA zu 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA (HMG-CoA). Anschließend wird HMG-CoA weiter zu Mevalonat (MVA) reduziert und sukzessive zu Mevalonat-5-Diphosphat phosphoryliert [24]. Durch Decarboxylierung und Eliminierung von Wasser entsteht IDP. (siehe Abb. 2) Eine in verschiedenen Kompartimenten lokalisierte Isomerase katalysiert die Reaktion zum chemisch stabileren 3,3-DMADP [25, 26].

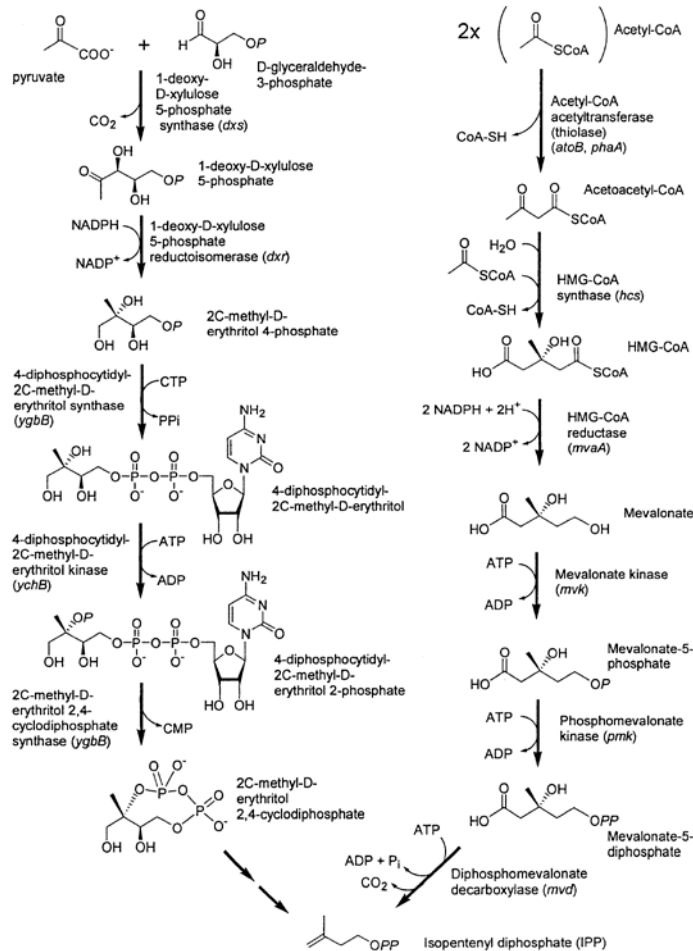


Abb. 2: Plastidärer Methylethritolphosphatweg (links) und cytosolischer Mevalonatweg (rechts) zur Synthese von Isopentenyl diphosphat (IPP), ausgehend von den Edukten Pyruvat und D-Glyceraldehyd-3-Phosphat im MEP-Weg und 2 Einheiten Acetyl-CoA im MVA-Weg. (Bild: [27])

### 3.1.2 Methylethritolphosphatweg

Nachdem der MVA-Weg lange Zeit als universeller und einziger Biosyntheseweg für IPP galt, wurden durch Rohmer *et al.* (1993) frühe Schritte einer alternativen Synthese im Cytosol von Bakterien aufgedeckt bei dem 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat (DXP) entsteht [28]. Aus den beiden Zwischenprodukten des Citratzyklus, Pyruvat und D-Glyceraldehyd-3-Phosphat wird zunächst DXP gebildet, welches dann isomerisiert und durch Kopplung an Cytidinmonophosphat (CMP) aktiviert wird. Nach einer Phosphorylierung entsteht das für die Biosynthese namensgebende Zwischenprodukt 2C-Methyl-D-Erythritol-2-Phosphat (MEP)-CMP. Unter Abspaltung von CMP wird das Molekül zyklisiert. (siehe Abb. 2) Durch eine Reduktion unter Beteiligung von zwei Einheiten Ferredoxin am C2 und C3, sowie der Folgereduktion durch NAD(P)H entsteht ein Racemat aus IPP und DMADP [29-31].



## 3.2 Terpenbiosynthese

Ausgehend von DMADP wird durch eine Kopf-Schwanz-Kondensation mit IDP, unter Abspaltung von Pyrophosphat, GDP gewonnen. Durch Addition von IDP und in Abhängigkeit von der Prenyltransferase wird die Isoprenyldiphosphatkette um je eine Isoprenyleinheit erweitert. Die Synthese von kurzkettigen Terpenen erfolgt durch für ihr Hauptprodukt spezifische Short-Chain IDS: GDP-Synthasen (GDPS; EC2.5.1.1), FDP-Synthasen (FDPS; EC 2.5.1.10) und GGDP-Synthasen (GGDPS; EC 2.5.1.29). Diese Enzyme gehören nach der Konformation ihrer Produkte zur Klasse der all-trans/(E)-IDS. Neben diesen sind auch einige cis/(Z)-IDS bekannt, die aufgrund großer Unterschiede in ihrer Sequenz nicht zur gleichen Gruppe gehören [32]. Ein Beispiel dafür ist die Neryldiphosphatsynthase (NDPS), die Neryldiphosphat (NDP), ein 2-cis-Isomer von GDP, bildet [7].

Terpenoide sind in Pflanzen ubiquitär und damit auch die Enzyme, von denen sie gebildet werden, die IDS und TPS. Beispielhaft dafür sind die Sterole, die aus Squalen ( $C_{30}$ ) gebildet werden. Dieses wird von einer Squalensynthase via Kopf-Kopf-Kondensation der Diphosphatgruppen von zwei Einheiten FDP synthetisiert. Auch die Vorstufe der Carotenoide, Phytoen ( $C_{40}$ ) wird durch die TPS Phytoensynthase über eine gleichartige Kondensationsreaktion von zwei Molekülen GGDP gebildet [7].

### 3.2.1 Isoprenyldiphosphatsynthasen

Ein charakteristisches Merkmal der Short-Chain IDS ist das Auftreten zweier Aspartatreicher Motive, dem ersten und dem zweiten Motiv (first/second aspartat rich motif), abgekürzt mit FARM bzw. SARM. Die Konsensussequenz vom FARM ist DDXX(X)D, während für das SARM nur DDXXD bekannt ist [33]. Beide hochkonservierten Bereiche sind an der Katalyse beteiligt. Sie binden bivalente Kationen wie  $Mg^{2+}$  und beeinflussen damit die Bindungsaffinität des Enzyms zu den Substraten in der hydrophoben Tasche [23, 34]. Der Mechanismus der Katalyse beginnt mit der Cofaktor-vermittelten Bindung von IDP am SARM und einer allylischen Einheit (DMADP, GDP, FDP) am FARM [35]. Die Dephosphorylierung des allylischen Substrats am C1 führt zum Carbokation. Dieses greift nukleophil an der C4-Position des IDP an, wobei eine C-C-Bindung geknüpft wird. Der Prozess wiederholt sich bis zur von der Bindungstasche determinierten Maximallänge des Produkts [36, 37]. Nicht immer produziert eine IDS auch nur ein Produkt. Manche IDS, wie die G/GGDPS von *Picea abies* haben sich als bifunktionell herausgestellt [38].

Als einzigartig erwies sich bisher auch die tierische GDPS aus *Coleoptera scolytidae*, die zusätzlich zu GDP auch dessen Produkt Myrcen synthetisiert und damit eine TPS-Aktivität zeigt [39]. Bedingt wird die Produktgröße stark von den Aminosäuren in der 4., 5., 8. und 11. Position vor dem FARM, im als Chain Length Determination (CLD) Region bezeichneten Bereich [23]. Aus der Röntgenkristallstruktur von FDPS aus *Gallus gallus* und *Trypanosoma brucei* ist bekannt, dass die CLD-Region auf einer von 10  $\alpha$ -Helices lokalisiert ist [35, 40]. Während IDS häufig Homodimere bilden, finden sich unter einigen GDPS und GGDPS auch Heterodimere [23, 41].

Die Synthese von Produkten aus mehr als 8 C<sub>5</sub>-Einheiten erfolgt durch die Long-Chain IDS. Diese tragen kein DDXX(XX)D-Motiv, vielmehr sind die negativ geladenen Aminosäuren über die Primärsequenz verteilt. So wurden Asp 26, Asp 150 und Glu 213 als konservierte Reste bei der Undecaprenyldiphosphat-Synthase (UDP-Synthase) aus *Escherichia coli* identifiziert [33, 42]. Polyisoprenoide sind ebenfalls weit über Eukaryoten und Prokaryoten verbreitet. Sie finden sich in der Form von Dolicholen (mit Z- und E-Konjugation) und Polyprenolen, deren Doppelbindung vor der Alkoholgruppe reduziert wurde. Polyisoprenoide sind Bestandteil von Naturkautschuk, Modifikatoren der Membranfluidität oder posttranslationale Modifikationen von Proteinen (bakterielle Peptidoglykane, Glykoproteine etc.) [43].

Während GDP und GGDP-Synthasen ausschließlich in Plastiden und Mitochondrien lokalisiert sind, findet man FDP-Synthasen im Cytosol, in Mitochondrien und Peroxisomen [44-47].

### 3.2.2 Terpensynthasen

Die bisher identifizierten TPS werden unter phylogenetischen Gesichtspunkten in sieben Klassen unterteilt, die mit den Buchstaben a-h gekennzeichnet sind. Dabei bilden die TPS-e und TPS-f eine gemeinsame Klasse (TPS-e/f). Die Anzahl funktioneller TPS in Pflanzen variiert zwischen einem (*Physcomitrella patens*) und 69 putativen Genen (*Vitis vinifera*). In Abhängigkeit vom zugrundeliegenden Reaktionsmechanismus, werden ihre aktiven Domänen in zwei Klassen unterteilt. Die meisten identifizierten TPS sind Enzyme der Klasse I, in welcher das Substrat (Isoprenyldiphosphat) ionisiert wird und ein Carbokation als Intermediat entsteht. Die Enzyme sind daher häufig in der Lage durch die stereochemische Verschiebung der positiven Ladung aus einem Edukt mehrere Produkte zu bilden [48, 49]. Ein Beispiel dafür liefert die 1,8-Cineol-Synthase aus *Arabidopsis thaliana*, die neben der Synthese ihres Hauptprodukts die Bildung von 9 weiteren Monoterpenen katalysiert [50]. Als Prototyp der Klasse I gilt die Ent-Kaurensynthase (KS).

Diese Diterpensynthese produziert Ent-Kauren, den Präkursor pflanzlicher Gibberelline, aus Copalylidiphosphat (CDP).

Die Klasse II-TPS enthalten ebenfalls ein DDXXD-Motiv, das dort jedoch die Protonierung und die darauf folgende Zyklisierung unterstützt. Es sind einige bifunktionelle Enzyme bekannt, die sowohl eine aktive Domäne der Klasse I, als auch der Klasse II tragen [51, 52]. Eine dritte bisher kaum charakterisierte Domäne von etwa 200 Aminosäuren nahe dem N-Terminus enthält verschiedene Varianten eines EDXXD-Motivs und weist ebenfalls eine Klasse II Diterpen-Synthase-Aktivität auf [7]. Das N-terminale RRX<sub>8</sub>W-Motiv ist eine weitere konservierte Region, die an der Katalyse von Monoterpenzyklisierungen beteiligt ist und auch in den meisten Sesqui- und Diterpensynthasen vorkommt [53].

Viele Terpenoide (Mono-, Sesqui- und einige Diterpene) und Isoprene sind in ihrem natürlichen Umfeld volatile Substanzen und daher für die Kommunikation mit anderen Organismen gut geeignet. Ihnen kommen ökologische Rollen zu, wie die Anlockung von Bestäubern und Fraßfeinden ihrer Herbivoren oder als chemische und physikalische Barriere für Pathogene und parasitäre Insekten [2]. An *A. thaliana* konnte beispielsweise gezeigt werden, dass volatile Terpenoide, wie Myrcen oder Ocimen die Konzentration des Phytohormons Jasmonsäure im Gewebe erhöhen. Dadurch werden ähnliche Mechanismen, wie bei mechanischer Verletzung oder Fraßverletzungen durch Insekten induziert [54]. An *Zea mays* konnte zum Beispiel erwiesen werden, dass bei Befall durch eine *Lepidoptera*-Larve, eine positive Stimulierung verschiedener TPS die Freisetzung eines komplexen Terpengemisches verursacht. Dieses erhöht die Attraktivität für die Wespe *Cotesia marginiventris*, einen Parasiten der *Lepidoptera*-Larve [55]. Auch nichtvolatile Diterpene, wie Abietinsäure, spielen als sekundäre Messenger in Signalkaskaden, die eine Antwort auf Insektenbefall vermitteln, eine wichtige Rolle [3].

#### **4. Isoprenoide in *Ulmus minor* und *Erythroxylum coca***

Die Feldulme (*Ulmus minor*) und der Coca-Strauch (*Erythroxylum coca*) zählen zu den Bedecktsamern bzw. Angiospermen (*Magnoliophyta*). Bis heute wurden aus der GDPS/GGDPS-Familie ca. 77 Enzyme unter dieser Pflanzen-Klasse identifiziert und charakterisiert. Weitere 52 FDPS vervollständigen die Short-Chain IDS. (Quelle: <http://www.brenda-enzymes.info/> Stand: 08.09.2012)



Der Coca-Strauch ist eine Kulturpflanze, deren Wirkung schon vor mehr als 5 000 Jahren unter der indigenen Bevölkerung bekannt war und die über einige Tausend Jahre kultiviert wurde [59]. Nicht nur die Zucht auf einen hohen Alkaloidgehalt in den Blättern unterscheidet den Coca-Strauch von der Feldulme, auch die Größe (Coca: bis 2,5 m, Feldulme: bis 30 m) und das Alter (Coca: 100 Jahre, Feldulme: 600 Jahre) sind sehr unterschiedlich. Andere Formen der ökologischen Interaktion und des Umgangs mit Stress sind demnach wahrscheinlich. Die Arbeitsgruppe von John D’Auria am Max Planck Institut für chemische Ökologie in Jena arbeitet an der Aufklärung der Alkaloid-Biosynthese in *E. coca*. Bisherige Extraktionen aus Blatt und Wurzel zeigten, dass die Pflanze Alkaloide ausschließlich im Blatt synthetisiert, während Terpene dort nur in Spuren und in den Wurzeln in großen Mengen (v. a.  $\alpha$ -Pinen,  $\beta$ -Pinen, Acorenon-B,  $\beta$ -Acoradien, Curcumen, ent-Kauren) vorkommen (pers. Mitt. Raimund Nagel; siehe Abb. 3). Durch die Zucht wurde die Pflanze aus ihrem natürlichen ökologischen Kontext entfernt und unter neuen Bedingungen gehalten. Daher sind mutmaßlich auch einige Abwehrmechanismen gegen Herbivoren und Pathogene verändert worden.

Um den veränderten Sekundärmetabolismus zu verstehen, ist es von Interesse die Funktionalität von TPS und IDS in *E. Coca* zu untersuchen. Auch von Coca-Blättern wurde eine EST-Datenbank erstellt, die gruppenintern zugänglich war. Über Alignments mit dem Regular-BLAST Serverprogramm am Max Planck Institut für chemische Ökologie (Altschul *et al.*, 1997) konnten durch Eingabe bekannter IDS- und TPS-Sequenzen ähnliche ESTs aus der Coca-Datenbank identifiziert werden. Die so erhaltenen 22 Fragmente sind die Basis für die Identifizierung, vollständige Sequenzierung, Klonierung und heterologe Expression der Enzyme.

## 5. Zielstellung der Arbeit

Um einen Zusammenhang zwischen den in Blättern von *U. minor* gefundenen Enzymen und dem durch die Eiablage induzierten Terpengemisch herstellen zu können, muss die Funktion der Enzyme charakterisiert werden, die für die Synthese der Vorläufer und schließlich auch der Terpene zuständig sind. Auch um weitere Untersuchungen am Terpenoidstoffwechsel in *E. coca* vornehmen zu können, müssen identifizierte Isoprenyldiphosphatsynthasen und Terpensynthasen auf ihre Funktion getestet werden. Da nicht zwingend aus der Sequenz Rückschluss auf das Produkt gezogen werden kann, ist dazu ein Enzym-Assay nötig.



**Abb. 4: Erythroxylum coca mit Blüte auf einer Coca-Plantage. [60]**

Daher ist es Ziel der Arbeit die TPS und IDS aus den EST-Datenbanken zu identifizieren, vollständig zu sequenzieren, in einen Expressionsvektor zu subklonieren und nach heterologer Expression in einem geeigneten System aufzureinigen. Ein Alignment mit Sequenzen bekannter Funktion, gibt Hinweise auf die Art des Enzyms. Das Protein kann dann über geeignete Assays charakterisiert und die Ergebnisse mit der Literatur verglichen werden.

# Material und Methoden

## 1. Material

### 1.1 Kits

Tab. 1: Kits mit Hersteller und Verwendung im Rahmen der Bachelorarbeit.

Bezeichnung	Hersteller	Verwendung
Spin Plant RNA Mini	Invitex <sup>®</sup>	RNA-Isolation aus Pflanzengewebe
SMARTer <sup>™</sup> RACE	Clontech <sup>®</sup>	3'/5'-Amplifikation von cDNA Sequenzen
TOPO <sup>®</sup> TA Cloning <sup>®</sup>	Life technologies <sup>™</sup>	TOPO-Klonierung von PCR-Fragmenten
QUIAEX II <sup>®</sup> Gel Extraction	QIAGEN <sup>®</sup>	DNA-Gelextraktion
Plasmid Mini <i>Two</i>	Invitex <sup>®</sup>	Plasmid-Minipräparation
BigDye <sup>®</sup> Direct	Life technologies <sup>™</sup>	Sequenzier-PCR
DyEx 2.0 Spin	QIAGEN <sup>®</sup>	Aufreinigung der Sequenzierung
SuperScript <sup>™</sup> III RT	Life technologies <sup>™</sup>	Reverse Transkription von mRNA
GoTaq <sup>®</sup> Polymerase	Promega <sup>®</sup>	Colony & Standard PCR
FastStart High Fidelity Polymerase	La Roche <sup>®</sup>	attB-PCR für Gateway <sup>®</sup> Cloning
Gateway <sup>®</sup> pDONR 207	Life technologies <sup>™</sup>	Donor-Vektor für BP-Reaktion
Gateway <sup>®</sup> BP Clonase <sup>®</sup> II	Life technologies <sup>™</sup>	Rekombinase für BP-Reaktion
Gateway <sup>®</sup> pDEST 15	Life technologies <sup>™</sup>	Ziel-Vektor für LR-Reaktion
Gateway <sup>®</sup> LR Clonase <sup>®</sup> II	Life technologies <sup>™</sup>	Rekombinase für LR-Reaktion
Overnight Express <sup>™</sup> Autoinduction System 1	Novagen <sup>®</sup>	Autoinduktionsmedium für IPTG-regulierte Expressionskultur
Pierce <sup>®</sup> GST Spin Purification	Thermo Scientific <sup>®</sup>	Proteinaufreinigung via GST-tag und Glutathion-gekoppelter Säule
Quick Start Protein Assay	Bio-Rad <sup>®</sup>	Protein-Konzentrationsbestimmung
Mini-PROTEAN <sup>®</sup> Precast Gels	Bio-Rad <sup>®</sup>	SDS-Proteingele

### 1.2 Bakterienstämme

Tab. 2: Für Transformationen verwendete Bakterienstämme, deren Spezies, Hersteller und Einsatz.

Bezeichnung	Spezies	Hersteller	Anwendung
One Shot <sup>®</sup> TOP10	<i>E. coli</i>	Life technologies <sup>™</sup>	Standard-Transformation
BL21 (DE3) AI <sup>™</sup>	<i>E. coli</i>	Life technologies <sup>™</sup>	Expression via L-Arabinose
One Shot <sup>®</sup> BL21 (DE3) pLysS	<i>E. coli</i>	Life technologies <sup>™</sup>	Expression via IPTG

### 1.3 Medien

Tab. 3: LB-Medium nach Miller mit Mengenangaben für 1l Gesamtvolumen.

Komponente	Menge (l <sup>-1</sup> )
Trypton	10 g
NaCl	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaOH	(pH = 7)
Agar (nur für Festmedien)	15 g

### 1.4 Antibiotika

Tab. 4: Zur Selektion positiver Klone verwendete Antibiotika-Konzentrationen.

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonzentration
Carbenicillin	50 mg ml <sup>-1</sup> ddH <sub>2</sub> O	50 µg ml <sup>-1</sup>
Gentamycin	50 mg ml <sup>-1</sup> ddH <sub>2</sub> O	50 µg ml <sup>-1</sup>
Kanamycin	50 mg ml <sup>-1</sup> ddH <sub>2</sub> O	50 µg ml <sup>-1</sup>
Chloramphenicol	34 mg ml <sup>-1</sup> abs. Ethanol	34 µg ml <sup>-1</sup>

### 1.5 Puffer und Lösungen

Tab. 5: Konzentrationen eingesetzter Komponenten für TEB-Puffer

Komponente	Endkonzentration
Tris	10 mM
EDTA	1 mM
HCl	(pH = 8)
ddH <sub>2</sub> O	(Lösungsmittel)

Tab. 6: Konzentrationen eingesetzter Komponenten für MOPSO-Puffer

Komponente	Endkonzentration
MOPSO-Natriumsalz	25 mM
Glycerol	10% (V/V)
DTT	5 mM
HCl	(pH = 7,2)
ddH <sub>2</sub> O	(Lösungsmittel)



Tab. 7: Konzentrationen eingesetzter Komponenten für Equilibrierpuffer-Puffer, pH 7,5

Komponente	Endkonzentration
MOPSO-Natriumsalz	25 mM
Glycerol	10% (V/V)
NaCl	150 mM
DTT	5 mM
ddH <sub>2</sub> O	(Lösungsmittel)

Tab. 8: Konzentrationen eingesetzter Komponenten für 10x-SDS-Laufpuffer

Komponente	Endkonzentration
Tris	30,3 g l <sup>-1</sup>
Glycin	144 g l <sup>-1</sup>
SDS	10 g l <sup>-1</sup>
ddH <sub>2</sub> O	(Lösungsmittel)

Tab. 9: Konzentrationen eingesetzter Komponenten für Sammelgelpuffer

Komponente	Endkonzentration
Tris	60,5 g l <sup>-1</sup>
HCl	(pH = 6,8)
ddH <sub>2</sub> O	(Lösungsmittel)

Tab. 10: Mengen eingesetzter Komponenten für 3x-SDS-Probenpuffer

Komponente	Menge
SDS	1 g
DTT	75 mg
Bromphenolblau	21 mg
Sammelgelpuffer	6,25 ml
Glycerol	5 ml
ddH <sub>2</sub> O	4,4 ml

Tab. 11: Konzentrationen eingesetzter Komponenten für Coomassie-Färbelösung

Komponente	Konzentration
Ethanol	50 %
Essigsäure	10 %
Coomassie Brilliant Blue R250	0,5 g l <sup>-1</sup>
ddH <sub>2</sub> O	(Lösungsmittel)

Tab. 12: Konzentrationen eingesetzter Komponenten für SDS-Entfärbelösung

Komponente	Konzentration
Ethanol	30 % (V/V)
Essigsäure	10 % (V/V)
ddH <sub>2</sub> O	(Lösungsmittel)

## 1.6 Chemikalien

Sofern nicht anders vermerkt, wurden alle Medienzusätze, Chemikalien, Lösungsmittel und Antibiotika von Carl Roth® (Deutschland, Karlsruhe), Sigma-Aldrich® (Deutschland, Seelze) oder Bio-Rad (Deutschland, München) bezogen.

## 1.7 Pflanzenmaterial

Startmaterial für die Amplifizierung und Klonierung von TPS und IDS waren Blätter von *U. minor*, nach Eiablage des Ulmenblattkäfers *X. luteola*, sowie ausgewachsene Blätter und Wurzeln des Coca-Strauchs. Des Weiteren stand aus den Coca-Blättern isolierte mRNA zur Verfügung. Alle Biomaterialien wurden bei - 80 °C gelagert und während der Verwendung im Labor in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

## 1.8 Geräte

**Tab. 13: Folgende Geräte wurden zur Durchführung molekularbiologischer Arbeiten und zur Analytik verwendet. Schüttler, Heizplatten, Magnetrührer, Waagen, Vortexer, Gelelektrophorese-Geräte, Autoklaven, Sterilbänke und Wasserbäder sind nicht separat aufgeführt.**

Gerät	Serie	Hersteller
Eppendorfcentrifuge	5417 R, 5415 D	Eppendorf
Thermocycler	T-personal Combi	Biometra®
Nano-Photospektrometer	NanoDrop 2000c	Thermo® Scientific
Sonifikator	Sonopuls UW 2070	Bandelin electronic
Gas-Chromatograph	Agilent 6890 Series GC System	Agilent Technologies
Massenspektrometer	5973 Network Mass Selective Detector	Agilent Technologies
Hochleistungsflüssigkeitschromatograph (HPLC)	Agilent 1260 Series HPLC	Agilent Technologies
Tandem-Massenspektrometer (MS/MS)	API 5000™ Series MS/MS	AB Sciex™
AAA-Sequencer	ABI Prism® - Gen- Analysator 3130xl	Applied Biosystems

## 2. Molekularbiologische Methoden

### 2.1 RNA-Isolation

Für die RNA-Isolation aus *U. minor* wurde das Spin Plant RNA Mini Kit verwendet. Unter flüssigem Stickstoff wurden die Blattproben (4 Tage nach Eiablage durch *X. luteola*) gemörsert. Es wurden 100 mg Probe eingesetzt. Die Isolation erfolgte nach den Angaben des Herstellers. In Abweichung vom Protokoll wurde die RNA mit 30 µl ddH<sub>2</sub>O eluiert. Die Güte der gewonnenen RNA wurde über ein Nanodrop-Photospektrometer verifiziert.

### 2.2 RT-PCR

Zur Generierung von cDNA wurde das SuperScript™ III RT Kit verwendet. Mit der aus *U. minor* und *E. coca* isolierten RNA wurde nach dem Protokoll des Herstellers verfahren. Für die Reaktion wurden jeweils 2 µg RNA eingesetzt. Der Erfolg der Transkription wurde für *U. minor* über eine Standard-PCR mit den Primerpaaren von Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (RuBisCO), Ubiquitin und einer identifizierten GDPS aus *U. minor* überprüft. (Primer: Um\_RubisCO\_fw, Um\_RubisCO\_rv, Um\_Ubiq\_fw, Um\_Ubiq\_rv, Um-GGPPS\_fw3, Um-GGPPS\_rw3)

### 2.3 RACE-PCR

Aus den EST-Datenbanken von *U. minor* und *E. coca* gewonnene Sequenzen wurden verglichen und auf Vollständigkeit überprüft. Sequenzen mit fehlenden 5' oder 3'-Enden wurden über eine RACE-PCR (Rapid Amplification of cDNA-ends with Polymerase Chain Reaction) amplifiziert. Die Fragmente wurden dann über eine Topoisomerase zur Sequenzierung in einen pCR4-Vektor kloniert. Die RACE-PCR erfolgt für 5'- und 3'-RACE unterschiedlich. Dabei wurde nach den Angaben des Herstellers vorgegangen. Nach der Generierung der RACE Ready cDNA wurde die RACE-PCR jeweils mit der Hälfte der im Protokoll angegebenen Volumina durchgeführt. Das angegebene PCR-Programm wurde wie folgt abgewandelt:

94 °C	2 min	30 – 40 Zyklen
94 °C	30 s	
68 °C	30 s	
72 °C	3 min	
72 °C	10 min	
4 °C	∞	

Die verwendeten Primer sind in den entsprechenden Tabellen angegeben. (siehe Anhang S. I) Zur Überprüfung der Amplifikation wurden die Ansätze über Agarose-Gele elektrophoretisch getrennt und durch Ethidiumbromid mittels UV-Licht sichtbar gemacht. Charakteristische Banden mit hoher Intensität wurden ausgeschnitten, extrahiert und für die TOPO-Klonierung verwendet. Durch Wiederholung mit höherer Zyklenzahl oder mit *nested* Primern wurde der Vorgang optimiert.

## **2.4 TOPO-Cloning**

Die Klonierung der RACE-PCR-Amplifikate in einen pCR4-Vektor erfolgte mit Hilfe des TOPO® TA Cloning® Kits nach Anleitung des Herstellers, wiederum mit halben Volumina. Durch das Zählen der Klone nach erfolgter Transformation wurde die Klonierung durch Veränderung der Inkubationszeit optimiert.

## **2.5 Transformation mittels chemisch kompetenter Zellen**

Bei der Transformation wurde nach folgenden Schritten vorgegangen:

- chemisch kompetenten Zellen (siehe S. 11, Tab. 2) auf Eis von -80 °C bis zur Schmelze inkubiert
- in 1,5 ml Eppendorfgefäßen je 25 µl auf die Plasmidlösungen (3-10 µl) aliquotiert
- nach 30 min Inkubationszeit für 30 s bei 42 °C Hitzeschock im Wasserbad
- 2 min Inkubation auf Eis
- Zugabe von 120 µl auf 42 °C vorgewärmtem SOC-Medium (Super Optimal Broth with Catabolize repression; mit chemisch kompetenten Zellen mitgeliefert)
- Schütteln bei 37 °C für 1 h

Nach der Transformation wurden die Zellen auf LB-Agaroseplatten mit den Antibiotikakonzentrationen (siehe S. 12 Tab. 4), entsprechend der Plasmide (siehe Angaben des Herstellers) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

## 2.6 Plasmid-Minipräparation

Für die Isolation der Plasmide aus transformierten Zellen wurde das Plasmid Mini *Two* Kit verwendet. Alle Schritte erfolgten nach Anleitung. Eluiert wurde mit 60 µl ddH<sub>2</sub>O. Mittels Nano-Photospektrometrie wurde der DNA-Gehalt für folgende Applikationen gemessen.

## 2.7 Sequenzierung

Für die Sequenzierung wurden 200 ng der aufgereinigten DNA mit 2 µl Big Dye Puffer Mix aus dem BigDye® Direct Kit versetzt. Es wurden weiterhin 1 µl 10 mM Lösung des genspezifischen Primers eingesetzt und mit ddH<sub>2</sub>O auf 10 µl aufgefüllt. Die Proben wurden nach kurzem Vortexen ca. 2 s zentrifugiert und nach folgendem PCR-Programm im Thermocycler inkubiert:

96 °C	5 min	35 Zyklen
96 °C	20 s	
55 °C	20 s	
60 °C	4 min	
4 °C	∞	

Die Ansätze wurden nach Anleitung des DyEx 2.0 Spin Kits gereinigt und im Fluoreszenz-Sequenzierer (ABI Prism® - Gen- Analysator 3130xl) sequenziert.

## 2.8 Gateway-Cloning

### 2.8.1 attB-PCR

Für die Klonierung in Gateway-Vektoren, wurde zunächst das entsprechende Gen aus der cDNA der Probe mit Gateway-Primern amplifiziert. Dabei wurden attB-Sites eingeführt, die von einer Rekombinase (BP-Clonase® II) erkannt werden und mit den entsprechenden Sites im Donor-Vektor rekombiniert werden. Die Einführung der attB-Sites erfolgte mittels PCR durch die FastStart High Fidelity-Polymerase von La Roche®. Es wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren.

Das PCR-Programm wurde je nach Güte der Banden auf dem Agarosegel in Zyklenzahl und Annealing-Temperatur modifiziert:

94 °C	2 min	30-40 Zyklen
94 °C	30 s	
52-55 °C	30 s	
72 °C	3 min	
72 °C	7 min	
4 °C	∞	

### 2.8.2 BP-Reaktion

Das attB-PCR-Produkt wurde nach Anleitung des Herstellers mit der BP-Clonase<sup>®</sup> II und dem Vektor pDONR207 über Nacht inkubiert. Der Ansatz wurde anschließend in TOP10-Zellen transferiert und die Transformation auf LB-Agar mit Gentamycin selektiert. Die positiven Klone wurden in über Nacht bei 37 °C geschüttelt und nach Minipräparation sequenziert. Im Anschluss konnte mit den Plasmiden in der LR-Reaktion weiterverfahren werden.

### 2.8.3 LR-Reaktion

Die Plasmide wurden nach Angaben des Herstellers mit der LR Clonase<sup>®</sup> II und pDEST15 über Nacht inkubiert und in One Shot<sup>®</sup> BL21 (DE3) pLysS Zellen transformiert. Der Ansatz wurde mit halbierten Volumina pipettiert. Die Selektion erfolgte über Chloramphenicol und Carbenicillin.

## 2.9 Expression

Die Expression erfolgte mit dem Overnight Express<sup>™</sup> Autoinduction System 1 von Novagen<sup>®</sup> nach Angaben des Herstellers. Es wurde zuvor von der Platte je eine Kolonie gepickt und in 10 ml LB-Medium (mit Chloramphenicol und Carbenicillin) über zwei Tage bei 18 °C und 225 rpm auf dem Schüttler inkubiert. 5 ml der Kultur wurden mit 95 ml Autoinduktionsmedium versetzt und über Nacht erneut bei gleichen Bedingungen gehalten. Die Induktion erfolgte auf Basis von IPTG.

## 2.10 Proteinaufreinigung via GST-Säule

Um die exprimierten Proteine zu reinigen, wurde wie folgt vorgegangen:

- 100 ml der Expressionskultur auf 50 ml Falcon-Gefäße aufgeteilt
- 15 min Zentrifugation bei 4200 rpm in Avanti™ J-20 XP Zentrifuge
- Resuspension des Pellets in je 1,5 ml Equilibrierpuffer und Überführung in ein 10 ml Falcon-Gefäß
- Sonifikation mit Sonopuls UW 2070 bei pulse 2 und 60 % Intensität für 4 min
- Aliquotierung in zwei 2 ml Eppendorfgefäße und Zentrifugation für 30 min bei 10 000 rpm in Eppendorfszentrifuge 5417R
- Abnahme des Überstands als Rohenzymextrakt

Mit dem Rohenzymextrakt wurden die Säulen des Pierce® GST Spin Purification Kits nach Angaben des Herstellers beladen. Es wurden 0,2 ml und 1 ml Säulen verwendet. Dabei wurde 2 h mit Rohenzymextrakt inkubiert. Anstelle des mitgelieferten Equilibrierpuffers wurde der eigene Puffer verwendet. (siehe S. 13, Tab. 7) Die Elution erfolgte ebenfalls mit in eigenem Equilibrierpuffer suspendiertem Glutathion (30,67 mg ml<sup>-1</sup>).

## 3. Datenanalyse

Die Alignments zur Identifizierung der Transkripte wurden mit dem Basic Local Alignment Tool (BLAST) von NCBI (National Center for Biotechnology Information) auf deren Homepage (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) durchgeführt. Dabei wurden die Nukleotidsequenzen über die BLASTx-Funktion mit Proteinsequenzen aus diversen Datenbanken (nr: Non-redundant GenBank CDS translations, PDB, SwissProt, PIR, PRF) verglichen. Auf diese Weise wurden die ESTs identifiziert und deren Sequenzierung bewertet.

Die Auswertung der Sequenzierung erfolgte auf Basis der Sequenzierdaten (inklusive Fluoreszenz-Detektionsdiagramme) mit dem Programm *SeqMan* von der DNASTAR Lasergene 9 Core Suite. Darin wurden die Sequenzen verglichen und konnten als Konsensussequenz weiterverwendet werden.

Durch erneute Alignments mittels BLASTx wurden die aus der Datenbank gewonnenen charakterisierten Sequenzen, mit dem höchsten Score, für die weiteren Alignments verwendet. Die vollständig sequenzierten Open Reading Frames (ORF) der Transkripte wurden mit dem Programm *SeqBuilder* (DNASTAR Lasergene 9) in die

Aminosäuresequenz übersetzt. Sie wurden dann durch das Programm *MegAlign* (DNASTAR Lasergene 9) mit den identifizierten übersetzten Nukleotidsequenzen im Alignment nach der Clustal W Methode dargestellt. Diese Alignments sind im Anhang (siehe S. III-X) aufgeführt.

Vollständige Aminosäuresequenzen wurden über den ChloroP 1.1 Server des CBS (Center for Biological Sequence Analysis) auf ein chloroplastidäres Transitpeptid (cTP) analysiert [61]. Es wurden sowohl Transkripte mit, als auch ohne cTP kloniert, exprimiert und charakterisiert.

## 4. Analytik

### 4.1 Enzymassay

Da bei der Bradford-Proteinbestimmung jedoch weder für Eluate aus den 0,2 ml Säulen noch aus der 1 ml Säule ein aussagekräftiges Ergebnis erzielt werden konnte, wurden von diesen jeweils 50 µl im Assay eingesetzt. Andernfalls wäre ein quantitativer Vergleich zwischen den Ansätzen möglich gewesen. Als Substratlösung wurden 6 µl (IDP, DMADP, je 0,5 µg µl<sup>-1</sup>) pro Ansatz eingesetzt und nach folgender Tabelle mit dem jeweiligen Zusatz und Puffer auf 200 µl aufgefüllt. Für die Funktions-Assays (von den Eluaten der 0,2 ml Säule) wurde MgCl<sub>2</sub> eingesetzt, während in einem Vergleichsassay (vom Eluat der 1 ml Säule) zusätzlich mit Mn<sup>2+</sup> und Co<sup>2+</sup> gearbeitet wurde. Die Ansätze wurden für 2 h im Wasserbad bei 30 °C inkubiert, anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Analyse bei -20 °C gelagert.

**Tab. 14:** Tabelle mit Mg<sup>2+</sup>-haltiger Lösungen für qualitative Assays (0,2 ml Säule) und Mg<sup>2+</sup>/Mn<sup>2+</sup>/Co<sup>2+</sup> für die vergleichende Analyse (1 ml Säule)

Bezeichnung	Puffer	Zusätze
Magnesium(II)assay	MOPSO-Puffer	10 mM MgCl <sub>2</sub>
Mangan(II)assay	MOPSO-Puffer	10 mM MnCl <sub>2</sub>
Cobalt(II)assay	MOPSO-Puffer	10 mM CoCl <sub>2</sub>



## 4.2 HPLC-MS/MS

Die Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie (HPLC-MS/MS) lief zur Auswertung der Enzym-Assays unter Bedingungen nach Nagel *et al.* [62]. Das HPLC-System wurde durch Agilent 1260 (Agilent) und das MS/MS-System durch API 5000™ (AB Sciex) ausgetauscht. Injektionsvolumen war je 1 µl mit 20 °C Injektionstemperatur aus der auf 4 °C gekühlten Probenvorrichtung. Der Elutionsgradient wurde, wie folgt, verändert:

Tab. 15: Laufprotokoll der HPLC-MS/MS

<b>t [min]</b>	<b>V/t [µl min<sup>-1</sup>]</b>	<b>A [%]</b>	<b>B [%]</b>
0	1200	95	5
5	1200	30	70
6	1200	0	100
6,5	1200	0	100
7	1200	95	5
8	1200	95	5

## Ergebnisse

Von 7 Expressed Sequence Tags (EST) aus *Ulmus minor* und 21 ESTs aus *Erythroxylum coca* wurden zwei Sequenzen (*EcG/GGDPS3* und *EcGGDPS2*) in den Datenbanken als vollständig identifiziert. Im Rahmen der vorliegenden Bachelorarbeit konnten zusätzlich 4 von 5 Transkripten aus *U. minor* und 7 von 10 verbleibende Sequenzen aus *E. coca* vollständig sequenziert werden. Der phylogenetische Baum des Alignments ist in Abb. 5 zu sehen.

Tab. 16: Folgende Isoprenyldiphosphatsynthasen (IDS) und Terpensynthasen (TPS) wurden aus den Contigs der EST-Datenbanken identifiziert und durch 5'- oder 3'-RACE-PCR amplifiziert und sequenziert. (FDPS = Farnesyldiphosphatsynthase; GDPS = Geranyldiphosphatsynthase; GGDPS = Geranylgeranyldi-phosphatsynthase; SDPS = Solanesyldiphosphatsynthase; X = amplifiziert und sequenziert; Ø = unvollständig; O = ohne RACE vollständig)

	Bezeichnung	5'-RACE	3'-RACE	Contigs
<i>U. minor</i>	FDPS	O	X	elm_11860
	GDPS	X	X	elm_12845
	GGDPS	X	X	elm_01667
	TPS 1	X	X	elm_06078, elm_13376, elm_17661
	TPS 5	Ø	X	elm_04820
<i>E. coca</i>	FDPS	X	X	c_6419, c_9513, c_10628, c_20826, c_29815
	G/GGDPS 1	X	X	c_8233
	G/GGDPS 3	O	O	c_1597
	GGDPS 1	X	X	c_2098, c_17811, c_27476
	GGDPS 2	O	O	c_3233
	SDPS	X	O	c_9095
	TPS 1	X	X	c_498, c_6432
	TPS 2	X	X	c_753
	TPS 3	O	X	c_12159
	TPS 5	Ø	X	c_21391, c_38342
	TPS 6	X	O	c_YL_503, c_20909
	TPS 7	X	X	c_YL_5100

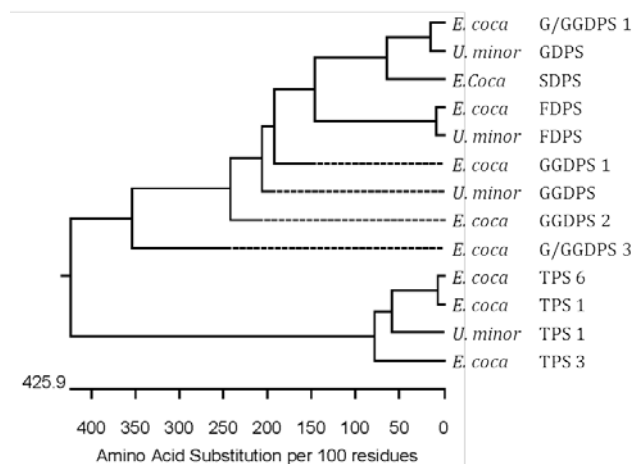


Abb. 5: Der phylogenetische Baum aller identifizierten und vollständig sequenzierten TPS und IDS in *U. minor* und *E. coca*. Horizontale durchgezogene Linien von den offenen Enden zu den Verzweigungen sind proportional zu den prozentualen Aminosäuresubstitutionen zwischen den Sequenzen.

# 1. Isoprenyldiphosphatsynthesen

Die putativen Sequenzen der Isoprenyldiphosphatsynthesen (IDS) wurden mit denen charakterisierter Enzyme in einem Alignment verglichen. In Tab. 17 ist dargestellt, welche Enzyme, laut BLASTx-Alignment, welchen Sequenzen zuzuordnen sind und welche charakteristischen Motive identifiziert wurden.

**Tab. 17: Transkripte mit charakteristischen Motiven, wie chloroplastidärem Transitpeptid (cTP), CXXXC-Motiv und First/Second Aspartat Rich Region (FARM, SARM), und dem Zugriffscode der beiden BLASTx-Sequenzen mit dem höchsten Score. (Um = *Ulmus minor*, Ec = *Erythroxylum coca*, X = A, L, I, V, G oder S; Ø = nicht vorhanden; [A-B] = Position A bis B in der Aminosäuresequenz; \* diese Sequenzen wurden aus Publikationen entnommen, da BLASTx keine charakterisierten Ergebnisse erbrachte; SSU = Small Subunit; LSU = Large Subunit)**

Transkript	cTP	CXXXC-Motive	FARM	SARM	BLASTx
<b>EcFDPS</b>	Ø	Ø	[93-97]	[232-236]	FDPS (FJ755465.1) [63] FDPS (DQ087959.1) [64]
<b>EcG/GGDPS 1</b>	[1-32]	Ø	[179-183]	[306-310]	GDPS (NM_001247160.1) [65] GDPS (JN831107.1) [66]
<b>EcG/GGDPS 3</b>	[1-29]	[82-86] [224-228]	Ø	Ø	GDPS SSU (JN831108.1) [66] GDPS SSU (AF182827.1) [67]
<b>EcGGDPS 1</b>	[1-41]	[128-132]	[161-166]	[299-303]	GGDPS (Q94ID7.1) [68] GGDPS (EF553534.1) [69]
<b>EcGGDPS 2</b>	[1-42]	[99-103] [231-235]	[131-137]	[265-269]	GDPS SSU (JN831110.1) [66] GDPS SSU (JN831109.1) [66]
<b>EcSDPS</b>	Ø	Ø	[186-190]	[313-317]	SDPS (AB071514.2) [70]* SDPS (Q75HZ9.2) [71]*
<b>UmFDPS</b>	Ø	Ø	[93-97]	[232-236]	FDPS (FJ755465.1) [63] FDPS (DQ087959.1) [64]
<b>UmGDPS</b>	Ø	Ø	[181-185]	[308-312]	GDPS (NM_001247160.1) [65] GDPS (JN831107.1) [66]
<b>UmGGDPS</b>	[1-62]	[126-130]	[158-164]	[296-300]	G/GGDPS LSU(FJ455407.1) [72] GGDPS (EF553534.1)[69]

## 1.1 Geranyl- und Geranylgeranyl- Diphosphatsynthesen

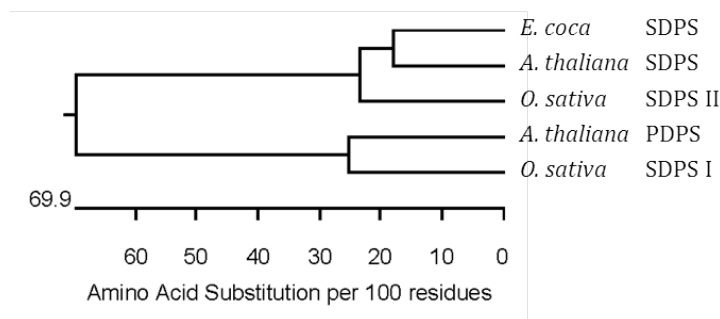
Die Geranyl- und Geranylgeranyl- Diphosphatsynthesen (GDPS, GGDPS) wurden in eigenen Gruppen nach phylogenetischen Kriterien mit den BLASTx-Sequenzen der höchsten Homologie verglichen (*MegAlign*). Die Alignments sind im Anhang aufgeführt. Identifiziert wurden zwei putative kleine Untereinheiten (SSU) von GDPS in *E. coca* (*EcG/GGDPS 3*, *EcGGDPS 2*) und eine putative große Untereinheit (LSU) von G/GGDPS in *U. minor*. Es wurde je eine GDPS (*EcG/GGDPS*, *UmGDPS*) in beiden Organismen vorhergesagt. Als putative GGDPS wurde eine Sequenz aus *E. coca* identifiziert (*EcGGDPS 1*).

## 1.2 Farnesyldiphosphatsynthasen

Es wurde je eine Farnesyldiphosphatsynthase (FDPS) in Feldulme und Coca-Strauch identifiziert und sequenziert (*EcFDPS*, *UmFDPS*). Die beiden FDPS wurden mit anderen IDS höchster Homologie (siehe Tab. 17) verglichen (*MegAlign*). Die Abbildungen finden sich im Anhang. (siehe S. III)

## 1.3 Solanesyldiphosphatsynthasen

Es wurde eine putative Solanesyldiphosphatsynthase (*EcSDPS*) in *E. coca* gefunden. Sie wurde mit anderen SDPS und einer Polyprenyldiphosphatsynthase (PDPS) aus *Arabidopsis thaliana* verglichen (*MegAlign*). Die Sequenzen wurden manuell aus Publikationen ausgewählt, da mit NCBI BLASTx keine homologe und Sequenz eines bereits charakterisierten Enzyms gefunden wurde. Das Alignment findet sich im Anhang. (siehe S. VIII) Im phylogenetischen Baum (Abb. 6) ist zu sehen, dass die SDPS aus *A. thaliana* (AB071514.2) [70] und die SDPS II (Q75HZ9.2) aus *Oryza sativa* [71] jeweils die höchsten Homologien zu *EcSDPS* aufweisen.



**Abb. 6: Phylogenetischer Baum des Alignments von ausgewählten Solanesyldiphosphatsynthasen (SDPS) und einer Polyprenyldiphosphatsynthase (PDPS) aus *A. thaliana* und *O. sativa* mit der SDPS von *E. coca*. Horizontale durchgezogene Linien von den offenen Enden zu den Verzweigungen sind proportional zu den prozentualen Aminosäuresubstitutionen zwischen den Sequenzen.**

## 2. Terpensynthesen

Die Sequenzen der putativen Terpensynthesen (TPS) wurden mit denen von charakterisierten Enzymen verglichen (*MegAlign*). In Tab. 18 ist dargestellt, welche Enzyme, laut BLASTx-Alignment, welchen Sequenzen zuzuordnen sind und welche charakteristischen Motive vorkommen.

**Tab. 18: Transkripte mit charakteristischen Motiven, wie chloroplastidärem Transitpeptid (cTP), RRX<sub>8</sub>W- und DDXX(XX)D- Motiv, und dem Zugriffscode der beiden BLASTx-Sequenzen mit dem höchsten Score.** (*Um* = *Ulmus minor*; *Ec* = *Erythroxylum coca*; X = beliebige Aminosäure; Ø = nicht vorhanden; [A-B] = Position A bis B; STS = Sesquiterpensynthase; DTS = Diterpensynthase; GDS = (-)-Germacren-D-Synthase; GAS = Germacren-A-Synthase; αTS = (-)-α-Terpineol-Synthase; O/MS = (E)-β-Ocimicen/Myrcen-Synthase; VS = Valencen-Synthase)

Transkript	cTP	RRX <sub>8</sub> W-Motiv	DDXX(XX)D-Motiv	BLASTx
<i>Ec</i> TPS 1	Ø	Ø	[310-314]	GDS (STS) (Q6Q3H3.1) [73] GAS (STS) (HQ326230.1) [74]
<i>Ec</i> TPS 3	[1-40]	[52-62]	[343-347]	αTS (DTS) (AY572987.1) [75] O/MS (DTS) (HM807387.1) [74]
<i>Ec</i> TPS 6	Ø	Ø	[310-314]	VS (STS) (AF441124.1) [76] GDS (STS) (Q6Q3H3.1) [73]
<i>Um</i> TPS 1	Ø	[23-33]	[315-319]	GDS (STS) (Q6Q3H3.1) [73] GDS (STS) (AY438099.1) [77]

### 1.1 Mono- und Diterpen- Synthesen

Es wurde eine putative Diterpensynthase in *E. coca* identifiziert (*Ec*TPS 3). Die TPS wurde mit den drei Sequenzen der höchsten Homologie verglichen (*MegAlign*). Nicht in Tab. 18 aufgeführt ist die drittstärkste Entsprechung der Sequenz, eine (+)-α-Phellandren-Synthase (ADR74201.1) aus *A. thaliana* [74]. Das Alignment findet sich im Anhang. (siehe S. IX)

### 1.2 Sesquiterpensynthesen

Beim BLASTx-Alignment wurde in *U. minor* eine (*Um* TPS 1) und in *E. coca* zwei (*Ec*TPS 1, *Ec*TPS 6) putative Sesquiterpensynthesen identifiziert. Die drei TPS wurden mit der Germacren-D- (Q6Q3H3.1) und Germacren-A- Synthase (HQ326230.1) aus *A. thaliana* verglichen (*MegAlign*). Die Alignments sind im Anhang zu finden. (siehe S. X)

### 3. Enzymaktivitäten

Im Funktionsassay mit Doppelbestimmung wurden einige IDS analysiert. Dabei wurden sowohl exprimierte Proteine mit als auch ohne chloroplastidärem Transitpeptid (cTP) getestet. Dies resultiert aus der Beobachtung, dass in vergangenen Funktionsassays Proteine mit cTP in *E. coli* nur schlecht exprimiert wurden oder inaktiv waren. In Abb. 7 sind die HPLC-Daten der aktiven Enzyme aufgeführt. Es sind die Assays abgebildet, in denen eine eindeutige Aktivität sichtbar wurde. Des Weiteren wurden getestet:

Tab. 19: Die Ergebnisse der nicht in Abb. 7 aufgeführten Funktionsassays und die Anzahl an technischen Replikaten (Tests). (-cTP = ohne chloroplastidäres Transitpeptid; + = positiv; - = nicht signifikant)

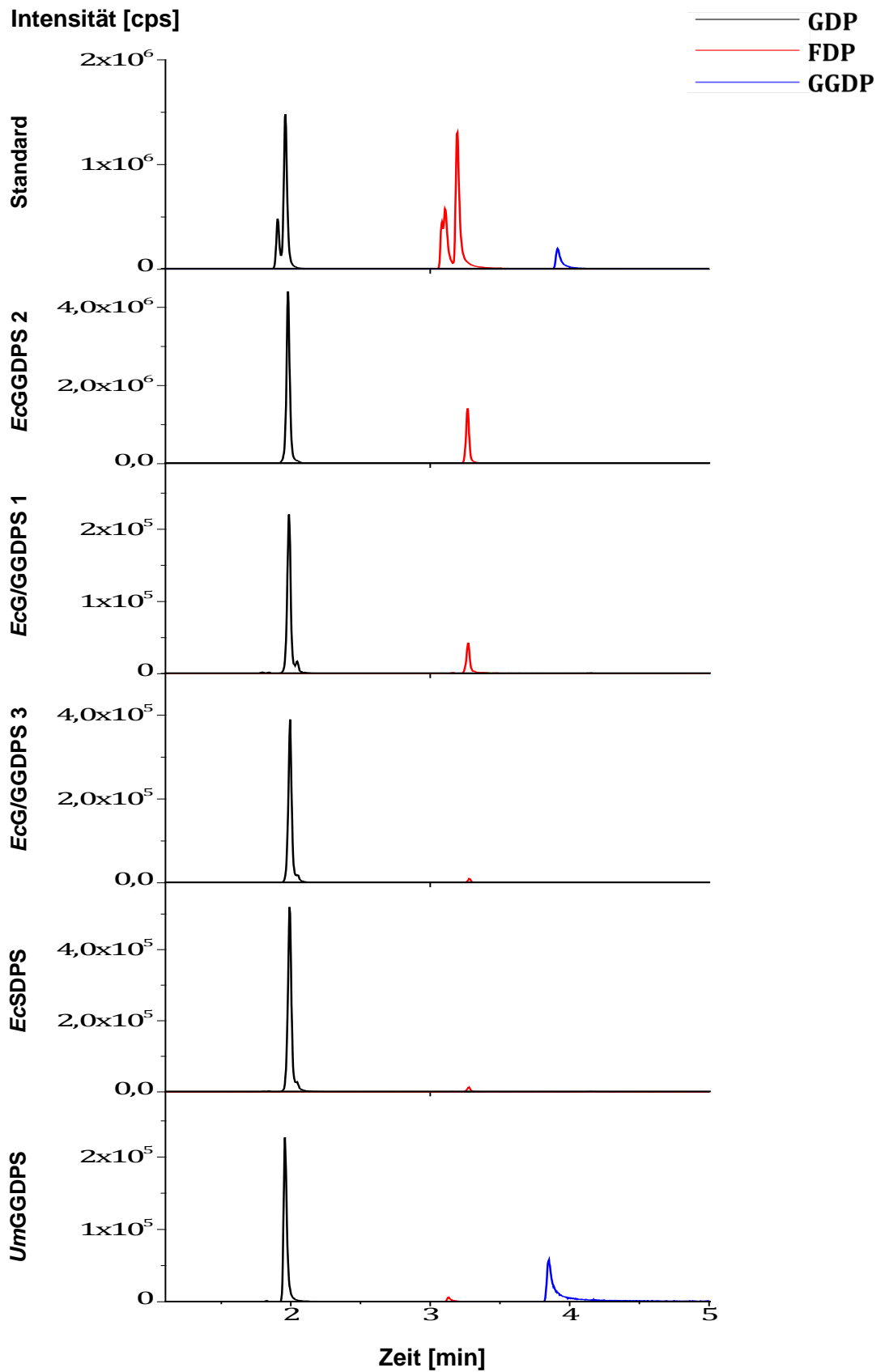
Bezeichnung	GPP	FPP	GGPP	Tests
<i>nicht induzierte Kontrolle</i>	-	-	-	4
<i>Ec G/GGDPS 1 –cTP</i>	-	-	-	2
<i>Ec G/GGDPS 1 –cTP</i>	-	-	-	2
<i>Um GDPS</i>	-	-	-	1
<i>Um GGDPS –cTP</i>	+	-	-	2

Für *Um* GGDPS wurde ein Vergleichsassay mit dem Eluat einer 1 ml Säule mit zwei weiteren bivalenten Kationen ( $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ) in Doppelbestimmung wiederholt. Beim Einsatz von  $Co^{2+}$  wurde im Assaypuffer aufgrund der Anwesenheit von Dithiothreitol (DTT) eine gelbe Verfärbung beobachtet. Aus dem Verhältnis der arithmetisch gemittelten Peakflächen wurde das Produkt-Verhältnis errechnet:

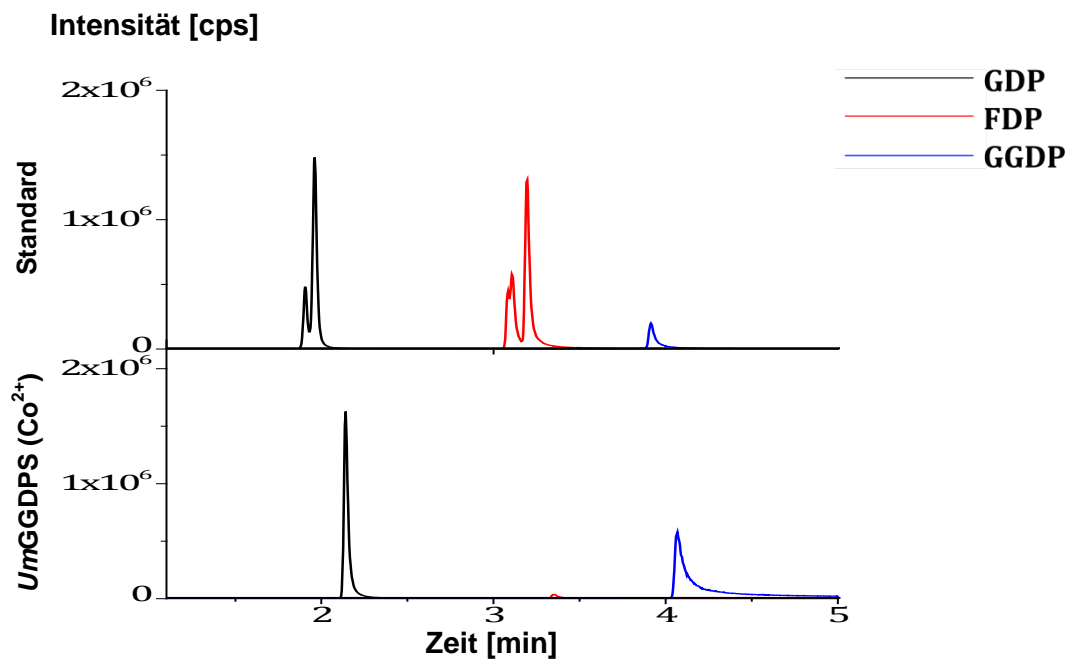
Tab. 20: Die in der HPLC-MS/MS ermittelten Peakflächen für die Produkte GDP, FDP und GGDP im Enzymassay von *Um* GGDPS und das daraus ermittelte Produktverhältnis. Aufgrund des geringen Anteils an FDP (< 5 %) wurde dieses nicht in das Produktverhältnis einberechnet.

Kationenzusatz	Fläche GDP	Fläche FDP	Fläche GGDP	Verhältnis (GDP:FDP:GGDP)
$Mg^{2+}$	503 000	9 590	2 140 000	20:0:80
$Mn^{2+}$	1 470 000	40 500	3 400 000	30:0:70
$Co^{2+}$	1 700 000	49 700	3 750 000	35:0:65
	3 170 000	165 000	5 550 000	
	3 180 000	151 000	5 600 000	

Die relative Menge zwischen  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  und  $Co^{2+}$ , die an GDP gebildet wurde beträgt 10:30:60. Das Verhältnis der GGDP-Mengen zwischen diesen Ionen beträgt hingegen 20:30:50. Beispielhaft wurden die Daten des Assays mit  $Co^{2+}$  in Abb. 8 dargestellt.



**Abb. 7:** Abgebildet sind die HPLC-Daten der Funktionsassays. Das oberste Chromatogramm zeigt den molekularen Standard: GDP (dominanter Peak) und sein Isomer Neryldiphosphat (NDP) schwarz dargestellt, (E,E)-FDP (dominanter Peak) und seine Isomere (E,Z)/(Z,E)/(Z,Z) rot dargestellt; GGDP blau dargestellt



**Abb. 8:** HPLC-Daten des Co<sup>2+</sup>-Assays aus dem Eluat der 1 ml Säule von *Um* GGDPS (hier mit 10 mM Co<sup>2+</sup>) im Vergleich mit dem molekularen Standard: GDP (dominanter Peak) und sein Isomer Neryldiphosphat (NDP) schwarz dargestellt, (E,E)-FDP (dominanter Peak) und seine Isomere (E,Z)/(Z,E)/(Z,Z) rot dargestellt; GGDP blau dargestellt. (cps = counts per second)



# Diskussion

## 1. Isoprenyldiphosphatsynthasen

Die identifizierten putativen Isoprenyldiphosphatsynthasen, die als mögliche Schlüsselenzyme des Terpenmetabolismus die Vorläufer für Terpene bilden, wurden phylogenetisch in 6 Gruppen unterteilt. Darunter befinden sich homodimere Geranyldiphosphat- (GDP) bzw. Geranylgeranyldiphosphat- (GGDP) Synthasen, die kleinen und großen Untereinheiten (SSU und LSU) der heterodimeren GDP- und GGDP-Synthasen, sowie Farnesyldiphosphat- (FDP) und Solanesyldiphosphat- (SDP) Synthasen. Die Gruppen werden im Folgenden bezüglich ihrer möglichen Funktionen in *Erythroxylum coca* und *Ulmus minor* diskutiert.

### ***Putative Geranyl- und Geranylgeranyl- Diphosphatsynthasen – Gruppe I***

Die erste Gruppe der prognostizierten Geranyl- bzw. Geranylgeranyl-Diphosphatsynthasen (G/GGDPS), bestehend aus *EcGGDPS 1* und *UmGGDPS*, weist untereinander mit 33,2 Aminosäuresubstitutionen pro 100 Positionen (ASS) eine hohe Homologie auf. Das Protein von *UmGGDPS* wurde in einem Enzymassay charakterisiert und zeigt im Chromatogramm die Produkte Geranyldiphosphat (GDP) und Geranylgeranyldiphosphat (GGDP), deren Peaks mit denen des molekularen Standards übereinstimmen (siehe S. 27, Abb. 7). Die ebenfalls detektierte Menge an FDP ist im Verhältnis zu den anderen Produkten so gering (< 5 %), dass sie entweder von von FDP-Synthasen aus dem Expressionssystem *Escherichia coli* stammt [78] oder frühzeitig als Zwischenprodukt aus der hydrophoben Tasche diffundiert. Zwar wurden unspezifische Bindungen durch den Einsatz von 5 mM Dithiothreitol (DTT) im Enzymassay verringert, doch kann eine Verschleppung anderer Enzyme aus *E. coli* nicht ausgeschlossen werden. Die Charakterisierung von *EcGGDPS 1* in einem Funktionsassay steht noch aus.

*EcGGDPS 1* und *UmGGDPS* verfügen beide über ein chloroplastidäres Transitpeptid, ein CXXXC-Motiv (essentiell zur Heterodimerbildung [72]), sowie das erste und zweite Aspartat-reiche Motiv FARM und SARM. (siehe Anhang, S. IV) Die nach Wang *et al.* (2009) beschriebenen Aminosäuren, die für „X“ in „CXXXC“ stehen sind die hydrophoben Aminosäuren Alanin, Leucin, Isoleucin, Valin, Glycin und Serin. Dieses Motiv taucht in fast allen kleinen Untereinheiten (SSU = Small Subunit) von GDP-Synthasen, dafür nicht unbedingt in den großen Untereinheiten (LSU = Large Subunit) auf. Die beiden Aspartat-reichen Motive machen eine katalytische Aktivität denkbar. Das N-terminale

chloroplastidäre Transitpeptid ist ein möglicher Hinweis auf die plastidäre Lokalisierung der Proteine. Überprüft werden könnte dies zum Beispiel durch immunhistologische Untersuchungen an den Blättern von Feldulme und Coca-Strauch zur subzellulären Detektion der Proteine. Die Aminosäuresequenz von *EcGGDPS 1* liegt nur 28,6 ASS von der GGDPS aus *Corylus avellana* entfernt, was für eine mögliche GGDPS-Aktivität spricht.

Das CXXXC-Motiv in *UmGGDPS* und die hohe Homologie (16,1 ASS) zur LSU von G/GGDPS (*Humulus lupulus*: FJ455407.1) legen nahe, dass dieses Enzym durch Bindung an eine andere Untereinheit ein Heterodimer bildet. Durch Mutationsstudien am CXXXC-Motiv und den Einsatz bereits bekannter SSUs oder einer noch zu identifizierenden SSU in *U. minor* könnten die unterschiedlichen Effekte der Heterodimerbildung sichtbar gemacht werden. Die GDPS-LSU von *Antirrhinum majus* zeigt beispielsweise in Abwesenheit einer SSU eine GGDPS- und erst in Anwesenheit dieser eine GDPS-Aktivität [79]. Ein ebenfalls interessanter Effekt wurde in an einer bifunktionellen G/GGDPS aus Hopfen (*Humulus lupulus*) gezeigt. Dessen LSU allein zeigte Aktivität als GDP-, FDP- und GGDP-Synthase, und in Anwesenheit einer SSU vom Typ I eine wesentlich verstärkte GDPS- und GGDPS-, aber keine FDPS-Aktivität [72]. Die Gegenwart der allein häufig nicht katalytisch aktiven SSU [67, 72, 79] beeinflusst also die Katalyse der LSU. Die Möglichkeiten zur Kombination der putativen LSU *UmGGDPS* mit anderen SSUs ist zur Regulation des Terpenstoffwechsels über verschiedene Expressionsmuster geeignet. Das Expressionsmuster könnte sich zum Beispiel induziert durch die Eiablage des Ulmenblattkäfers (*Xanthogaleruca luteola*) verändern. Als G/GGDPS könnte die *UmGGDPS* ein Schlüsselenzym für die Synthese von volatilen Monoterpenen, wie  $\alpha$ - und  $\beta$ -Pinen sein.

In einem Vergleichsassay mit dem Einsatz unterschiedlicher bivalenter Kationen, die an das FARM und SARM von *UmGGDPS* binden können, wurden Hinweise darauf erhalten, dass sich sowohl mit  $Mn^{2+}$  als auch mit  $Co^{2+}$  das Produktverhältnis gegenüber  $Mg^{2+}$  verändert. (siehe S. 28, Abb. 8) Der stärkste Effekt wurde in Gegenwart von  $Co^{2+}$  erzielt. Hier nahm die allgemeine Aktivität um das 2 ½ fache zu, und das Produktverhältnis zwischen GDP und GGDP verschob sich von 20:80 auf 35:65. Diese Beobachtung ist ein Hinweis auf Möglichkeiten zur Regulierung dieses bifunktionellen Enzyms über andere Kationen-Konzentrationen in verschiedenen Kompartimenten bzw. Organen. Für die gemeine Fichte (*Picea abies*) ist ebenfalls eine bifunktionelle G/GGDPS beschrieben. Diese ist an der Synthese des Baumharzes beteiligt, dass sowohl konstitutiv, als auch induzierbar der Abwehr von Herbivoren dient [38, 80]. Eine ähnliche Funktion in der

Verteidigung von *U. minor* durch die Synthese volatiler Terpene gegen den Ulmenblattkäfer ist somit denkbar.

Der Funktionsassay von *Um* GGDPs ohne cTP zeigte nur GDPS-Aktivität und keine signifikante GGDPs-Aktivität (siehe S. 26, Tab. 19), obwohl das Produktverhältnis im Assay mit chloroplastidärem Transitpeptid GGDP zeigt. (siehe S. 27, Abb. 7) Eine mögliche Erklärung ist, dass durch das Entfernen der 62 Aminosäuren langen Sequenz die Enzymaktivität direkt verändert wurde indem die größere räumliche Nähe des N-terminalen GST-Tags zur Chain Length Determination (CLD) Region diese beeinflusst. Versetzung des Tags zum C-Terminus oder das Ersetzen durch einen His-Tag können in wiederholten Assays darüber Klarheit schaffen.

### ***Putative Geranyl- und Geranylgeranyl- Diphosphatsynthasen – Gruppe II***

Das Alignment der Aminosäuresequenz von *Ec*GGDPs 2 mit BLASTx ergab die höchste Homologie zu den beiden kleinen Untereinheiten vom Typ II, die GDP-Synthasen in *Salvia miltiorrhiza* bilden (SSU II.2: JN831110.1; SSU II.1: JN831109.1). (siehe Anhang, S. V) Dabei zeigte sich, dass die SSU II.2 mit einer Entfernung von 32,9 ASS dem Enzym aus dem Coca-Strauch näher verwandt ist. *Ec*GGDPs 2 weist sowohl FARM, als auch SARM auf, welches in den beiden Enzymen aus *S. miltiorrhiza* fehlt. Damit sind eine korrekte Substratbindung und die Funktion als homodimere GDP- oder GGDP- Synthase theoretisch möglich. Zudem verfügt *Ec*GGDPs 2, wie auch SSU II.2 nicht jedoch SSU II.1, über zwei CXXXC-Motive, die für die Bildung eines Heterodimers nötig sind. Ein geeigneter Kandidat für die LSU zur Bildung eines Heterodimers oder Heterotetramers (ebenfalls mit SSU vom Typ II) aus zwei Dimeren (Chang *et al.* [81]) ist aus den Sequenzen der EST-Datenbank von Coca-Blättern noch ersichtlich. Durch Proteininteraktions-Assays könnten die bisher identifizierten Sequenzen auf eine LSU-Funktion hin untersucht werden. Die LSU sind im Gegensatz zu den SSU anderen GDP- oder GGDP-Synthasen gegenüber sehr homolog. Die phylogenetische Entfernung zur nächsthomologen charakterisierten homodimeren Synthase aus der kanadischen Eibe (GGDPs *Taxus canadensis*: AF081514.1 [82]) ist mit 85,6 ASS (Daten nicht gezeigt) relativ hoch, was die Heterodimerbildung wahrscheinlicher macht.

Die Bildung von Heterodimeren ist, wie bereits weiter oben erwähnt, eine Möglichkeit den Isoprenoid-Metabolismus über Expressionsmuster zu regulieren. Im Enzymassay wurde für *Ec*GGDPs 2 Aktivität als GDP- und (E,E)-FDP- Synthase gefunden, wobei wesentlich mehr GDP gebildet wurde. Durch Assays mit heterolog exprimierten Enzymen aus einem anderen Expressionssystem kann überprüft werden, ob die GDPS eine geringe FDPS-

Aktivität aufweist, falls es sich dabei auch um ein Artefakt handelt bei dem FDP-Synthesen aus *E. coli* [78] in das Eluat verschleppt wurden.

SSUs haben in der Regel keine enzymatische Aktivität [67, 72, 79], so auch die SSUs aus *S. miltiorrhiza*, was *EcGGDPS 2* zu einem Interessanten Kandidaten für die Regulation und Produktbildung in Kombination mit einer LSU macht. Ein möglicher Interaktionspartner könnte die weiter oben diskutierte *EcGGDPS 1* sein, die ebenfalls ein CXXXC-Motiv beinhaltet und zur LSU von *H. lupulus* homolog ist. Auch die SSUs der Klasse II aus *S. miltiorrhiza* interagieren nur mit LSUs, die ein CXXXC-Motiv tragen. Das chloroplastidäre Transitpeptid ist ein Hinweis auf die Lokalisierung des Proteins in den Plastiden und findet sich auch bei anderen SSU [67, 79]. Proteininteraktionsassays, Expressionsstudien in Wurzeln und Blättern, die Identifizierung von IDS-Genen, immunhistologische Untersuchungen und weitere Enzymassays könnten darüber Klarheit verschaffen.

### ***Putative Geranyl- und Geranylgeranyl- Diphosphatsynthesen – Gruppe III***

Im Alignment über BLASTx stellten sich *EcG/GGDPS 1* und *UmGDPS* als putative GDP-Synthesen heraus. *UmGDPS* ist mit einer Entfernung von 30,7 ASS und *EcG/GGDSP 1* mit 32 ASS der GDPS (NM\_001247160.1) aus *Solanum lycopersicum* am ähnlichsten. (siehe Anhang, S. VI) Untereinander sind sie mit einem Abstand von 29 ASS ebenfalls sehr homolog. Während *EcG/GGDPS 1* in Plastiden vorzuliegen scheint, verfügt *UmGDPS* über keine solche cTP-Sequenz. Beide Substratbindestellen FARM und SARM sind vorhanden und exakt deckungsgleich zu den verglichenen Sequenzen. Die hohe Homologie im Bereich der CLD spricht dafür, dass die Enzyme auch GDPS-Aktivität zeigen. Im Assay bestätigt sich dies nur für *EcG/GGDPS 3* in der Formation von GDP und (E,E)-FDP als Produkt, für *Um GDPS* nicht, was jedoch erst durch Wiederholung mit anderen Expressionssystemen und Veränderungen der heterologen Expression bestätigt werden muss. Die Produktverteilung zwischen GDP und FDP ist bei *EcGGDPS 2* und *EcG/GGDPS 1* ähnlich, auch dort entsteht wesentlich mehr GDP, als FDP. Auch hier kann durch Veränderung des Expressionssystems überprüft werden, ob es sich um eine GDPS mit geringer FDPS-Aktivität handelt oder ob (E,E)-FDP als Artefakt des Expressionssystems detektiert wird. Da kein CXXXC-Motiv vorhanden ist, handelt es sich bei *EcG/GGDPS 1* und *UmGDPS* wahrscheinlich um homodimere GDPS. Beide Enzyme könnten als Schlüsselenzym für die Synthese von Monoterpenen dienen ( $\alpha$ - und  $\beta$ -Pinen in *E. coca* und *U. minor*), wie sie bei der Alarmierung von Fraßfeinden von *X. luteola* von der Ulme freigesetzt werden [58]. Es empfiehlt sich, aufgrund der hohen Homologie mit

funktionellen Enzymen, die putative GDPS aus *U. minor* erneut und, wenn nötig, mit einem C-terminalen GST-Tag und längeren Expressionszeiten aufzureinigen, um ihre Aktivität zu testen.

#### ***Putative Geranyl- und Geranylgeranyl- Diphosphatsynthasen – Gruppe IV***

Die putative SSU des Typs I *EcG/GGDPS 3* von *E. coca* trägt eine cTP-Sequenz, welche, wie bereits erwähnt, auch in anderen SSUs vorkommt, und die für eine Heterodimerbildung essentiellen CXXXC-Motive. (siehe Anhang, S. VII) Die höchste Homologie zeigt *EcG/GGDPS 3* mit 77,6 ASS gegenüber der SSU Typ I von *S. miltiorrhiza* (JN831108.1). Sie liegt phylogenetisch in relativ großer Entfernung zu anderen charakterisierten Sequenzen, was auch innerhalb der GDPS- und GGDPS-artigen Enzyme in *E. coca* sichtbar wird. Dort knüpft sie an der weit entferntesten gemeinsamen Abzweigung der IDS an (siehe S. 22, Abb. 5). Weder der konservierte Bereich FARM noch SARM ist im Alignment zu finden, weshalb sie keine IDS-Aktivität aufweisen sollte. Eine SSU-ähnliche Sequenz aus *Phalaenopsis bellina* ist bekannt, die ohne DDXX(X)D-Motive GDPS-Aktivität zeigt [83]. Da im Funktionsassay eine GDPS-Aktivität gemessen wurde und ein Alignment mit der GDPS aus *P. bellina* (EU023907.1) ein phylogenetisch großer Abstand von 142,2 ASS berechnet wurde, muss davon ausgegangen werden, dass es sich dabei um ein Artefakt handelt. Wahrscheinlich wurde durch die Interaktion mit den CXXXC-Sites von *EcG/GGDPS 3* eine GDPS-LSU aus *E. coli* in das Eluat überführt. Ein Wechsel des Expressionssystems mit IDS ohne große Untereinheiten könnte die Charakterisierung erleichtern. So könnte dann die Heterodimerisierung zwischen der putativen kleinen Untereinheit *EcG/GGDPS 3* und anderen großen Untereinheiten (z.Bsp. der putativen LSU *EcGGDPS 1*) getestet werden.

#### ***Putative Farnesyldiphosphatsynthasen***

Die putativen Farnesyldiphosphatsynthasen (FDPS) *EcFDPS* und *UmFDPS* konnten nicht in einem Funktionsassay auf ihre Aktivität hin getestet werden, weshalb keine absolute Aussage über ihr Produkt und ihre Funktionalität getroffen werden kann. Im phylogenetischen Baum (siehe S. 24, Abb. 4) liegen die beiden FDPS nur 19,2 ASS voneinander entfernt. Beide FDPS zeigen die spezifischen Motive FARM und SARM, die für die Bindung des Substrats essentiell sind [35]. Es liegen keine chloroplastidären Transitpeptide vor, was zu erwarten ist, da bisher keine plastidäre FDPS in der Literatur beschrieben wurde. *EcFDPS* hat mit 17 ASS beim Alignment die höchste

Sequenzhomologie zur FDPS des Wolfsmilchgewächses *Euphorbia pekinensis* (*EpFDPS*: FJ755465.1). (siehe Anhang S. III) Dieses ist, wie *E. coca*, eine Pflanze aus der Familie der Angiospermen und gehört zur Ordnung der Malpighienartigen. Die *EpFDPS* erreicht die höchste Expression in den Wurzeln [63], was mit der Beobachtung eines hohen Terpenegehalts in den Wurzeln des Coca-Strauchs korreliert (pers. Mitt. Nagel *et al.*). Für *UmFDPS* wies die *EpFDPS* ebenfalls eine hohe Homologie von 18,9 ASS auf. Diese fällt geringer als für *E. coca* aus, was mit der entfernteren Verwandtschaft zu *E. pekinensis* übereinstimmt. Die Feldulme gehört zur Ordnung der Rosenartigen.

*UmFDPS* könnte in der Feldulme als Schlüsselenzym der Sesquiterpensynthese eine wichtige Rolle bei der Freisetzung des Terpengemischs bei Eiablage durch *X. luteola* spielen. Die Katalyse der in diesem Gemisch besonders dominanten Sesquiterpene (E,E)- $\alpha$ -Farnesen und (E)- $\beta$ -Caryophyllen [58] könnten auf Basis des Isoprenoidstoffwechsels reguliert werden. Auch die in der Wurzel von *E. coca* vorkommenden Sesquiterpene Acoren B,  $\beta$ -Acoradien und Curcumen könnten aus FDP von der *EcFDPS* gebildet werden. Knock-out-Experimente, Immunhistochemie und Expressionsstudien können diese Annahmen verifizieren.

### ***Putative Solanesyldiphosphatsynthasen***

Das Alignment der putativen Solanesyldiphosphatsynthase (SDPS) aus *E. coca* mit charakterisierten SDPS ergab die höchste Homologie zur SDPS aus *A. thaliana* (*AtSDPS*: AB071514.2) mit 35,7 ASS, was im phylogenetischen Baum (siehe S. 24, Abb. 6) zu sehen ist. Die relativ hohe Homologie der beiden Sequenzen zeigt sich vor allem in den konservierten Bereichen 100 Aminosäuren vom N-Terminus entfernt bis zum C-Terminus. (siehe Anhang, S. VIII) Die Motive FARM und SARM sind bei beiden SDPS deckungsgleich. Die *AtSDPS* wurde von Hirooka *et al.* im Assay mit vier verschiedenen Substraten (DMADP, GDP, FDP, GGDP) als Startereinheit getestet [70]. Dabei lag die höchste relative Aktivität bei der Substratzugabe von FDP (100 %) und GGDP (111 %) vor, während GDP nicht, DMADP hingegen schon (0,34 % relative Aktivität) als Substrat umgesetzt wurde. Im Funktionsassay wurde *EcSDPS* mit DMADP getestet und ergab eine GDPS-Aktivität. Dass kein FDP und GGDP gebildet wurde, korreliert mit der Beobachtung aus *A. thaliana* in der GDP nicht weiter umgesetzt wurde. Andererseits können auch keine größeren Produkte detektiert werden, da die in der vorliegenden Arbeit verwendete nichtradioaktive Methode bisher keine Produkte größer als GGDP sichtbar macht.

SDP-Synthasen dienen der Synthese von C<sub>30</sub> – C<sub>50</sub> Prenyldiphosphateinheiten, die in Ubichinonen und Prenylchinonen eingebaut werden, welche im Reich der Pflanzen ubiquitär als Elektronentransporter vorkommen [84-86]. Eine SDPS in *E. coca* ist also essentiell für die Synthese dieser überlebenswichtigen Isoprenoide.

## 2. Terpensynthasen

Die putativen Terpensynthasen wurden nach ersten Alignments mit BLASTx in die beiden Gruppen der Synthasen von Mono- und Diterpenen, sowie die Gruppe der Sesquiterpensynthasen unterteilt. Der phylogenetische Baum (siehe S. 22, Abb. 5) zeigt diese Unterteilung deutlich. Die putative Diterpensynthase *EcTPS 3* ist wenig homolog zu der Gruppe vorhergesagter Sesquiterpensynthasen aus *UmTPS 1*, *EcTPS 1* und *EcTPS 6*. Im Folgenden werden die putativen Sequenzen auf ihre Bedeutung für die Synthese, der in *Ulmus minor* und *Erythroxyllum coca* beobachteten Terpene, diskutiert.

### ***Putative Mono- und Diterpensynthasen***

Eine putative Diterpensynthase wurde für den Coca-Strauch identifiziert (*EcTPS3*), deren höchste Sequenzhomologie zur  $\alpha$ -Terpineol-Synthase aus *Vitis vinifera* mit 68 ASS berechnet wurde. (siehe Anhang, S. IX) Da im BLASTx-Alingment für die vier Sequenzen charakterisierter Enzyme mit dem höchsten Score ausnahmslos Diterpensynthasen beobachtet wurden, und zudem der Abstand zu den Gruppe der putativen Sesquiterpensynthasen im phylogenetischen Baum (siehe S. 24, Abb. 6) relativ hoch ist, handelt es sich bei *EcTPS 3* wahrscheinlich um eine Diterpensynthase. Über das Produkt kann allerdings keine genauere Aussage getroffen werden, da Terpensynthasen trotz großer Homologien untereinander in ihren Produkten stark variieren [7, 87]. Das vorhandene DDXXD-Motiv ist ein Hinweis darauf, dass das katalytische Zentrum noch intakt ist. An einer Diterpensynthase (ent-Kaurensynthase) von *Picea glauca* wurde gezeigt, dass dieses für die Stabilisierung des Carbokations nötig ist [88]. Des Weiteren konnte ein RRX<sub>8</sub>W-Motiv ausgemacht werden, welches für die Zyklisierungsreaktion bei Monoterpensynthasen essentiell, aber auch unter Di- und Sesquiterpensynthasen weit verbreitet ist [53]. Eine chloroplastidäre Transitsequenz deutet auf die plastidäre Lokalisierung hin. Da Gibberelline als wichtige Vertreter der Diterpene in Chloroplasten gebildet werden, könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass es sich bei *EcTPS 3* um ein

Enzym mit Gibberellinsynthase-Aktivität handelt [89]. Im Gegensatz zu cytosolischen Sesquiterpensynthasen, haben die meisten Mono- und Diterpensynthasen ein N-terminales Transitpeptid für den Transport vom endoplasmatischen Retikulum (ER) oder Golgi-Apparat zu den Plastiden. Dieses wird wahrscheinlich nach oder während des Transports vor dem RRX<sub>8</sub>W-Motiv abgeschnitten [7]. Naheliegender wäre auch, dass *EcTPS 3* die Synthese von Diterpenen in der Wurzel des Coca-Strauchs katalysiert (z.Bsp. ent-Kauren). Durch eine HPLC-MS/MS Analyse von Assays mit GGDP als Substrat könnte die Funktion des Enzyms charakterisiert werden.

### ***Putative Sesquiterpensynthasen***

In *E. coca* und *U. minor* wurden drei putative Sesquiterpensynthasen identifiziert, *EcTPS1*, *EcTPS 6* und *UmTPS 1*. Die drei TPS bilden eine Gruppe mit relativ geringer Homologie, wie man dem phylogenetischen Baum entnehmen kann. (siehe S. 22, Abb. 5) Dabei sind sich *EcTPS 1* und *EcTPS 6* mit nur 14 ASS sehr ähnlich. *UmTPS 1* ist dahingegen weniger homolog mit durchschnittlich 76 ASS zu den beiden Terpensynthasen aus dem Coca-Strauch.

*EcTPS 1* ist mit 67,8 ASS homolog zur (-)-Germacren-D-Synthase aus *Vitis vinifera* (Q6Q3H3.1) und *EcTPS 6* mit 68,3 ASS zur Valencen-Synthase aus *Citrus sinensis* (AF441124.1). *UmTPS 1* zeigt die größte Ähnlichkeit ebenfalls gegenüber derselben (-)-Germacren-D-Synthase aus *V. vinifera* mit nur 41,9 ASS. (siehe Anhang, S. X) Die Übereinstimmung der Alignments in den Sesquiterpen-Produkten der charakterisierten Enzyme ist ein Hinweis darauf, dass es sich bei den Enzymen tatsächlich um Sesquiterpensynthasen handelt. Wie zu erwarten, tragen alle putativen Enzyme kein chloroplastidäres Transitpeptid, da Sesquiterpene nicht in Plastiden, sondern im Cytosol synthetisiert werden [90]. Alle Enzyme enthalten ein DDXX(XX)D-Motiv, welches in einigen Sesquiterpensynthasen als katalytisch aktiv beschrieben wurde, und dessen Aminosäuren die Produktspezifität beeinflussen [91, 92]. Auch bei diesen Enzymen kann keine klare Prognose zu ihren Produkten getroffen werden, weshalb ein Assay mit FDP, dem Präkursor der Sesquiterpene, und eine Analyse über HPLC-MS/MS zur Charakterisierung durchgeführt werden sollte.

Die putativen Sesquiterpensynthasen aus *E. coca* sind mögliche endständige Enzyme für die Bildung typischer Sesquiterpene in den Wurzeln, wie Acoren B,  $\beta$ -Acoradien und Curcumen. Für die Synthese der volatilen Sesquiterpene in *U. minor* nach der Eiablage durch *X. luteola*, könnte hingegen die *UmTPS 1* ein Kandidat sein. Durch



gewebespezifische Expressionsstudien und Knock-Out Experimente könnte dies überprüft werden.

### **3. Zusammenfassung und Aussicht**

Im Rahmen der vorliegenden Bachelorarbeit konnten einige Isoprenyldiphosphat- und Terpen- Synthasen aus den EST-Datenbanken der Feldulme und des Coca-Strauchs identifiziert, vollständig sequenziert, in *E. coli* heterolog exprimiert und durch einen Enzymassay in ihrer Funktion charakterisiert werden. Diese Arbeit bildet die Grundlage für zahlreiche weitere Studien zur Aktivität, Regulation, Expression und Lokalisation der Enzyme, sowie ihre Rolle im Terpenoidstoffwechsel der Pflanze.

Noch nicht sequenzierte ESTs aus *U. minor* und *E. coca* (siehe S. 22, Tab. 16) sollten in Zukunft noch vervollständigt werden. Sie könnten dann mit den anderen noch nicht heterolog exprimierten Sequenzen in ihrer Aktivität analysiert werden. Die Funktion der Enzyme sollte dann in biologischen und technischen Replikaten der bereits getätigten Vorversuche bestätigt oder widerlegt werden.

## Literaturverzeichnis

1. Hartmann, T., *From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism*. Phytochemistry, 2007. **68**(22-24): p. 2831-46.
2. Pichersky, E. and J. Gershenzon, *The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense*. Curr Opin Plant Biol, 2002. **5**(3): p. 237-43.
3. Bodenhausen, N. and P. Reymond, *Signaling pathways controlling induced resistance to insect herbivores in Arabidopsis*. Mol Plant Microbe Interact, 2007. **20**(11): p. 1406-20.
4. Yuan, J.S., et al., *Elucidation of the genomic basis of indirect plant defense against insects*. Plant Signal Behav, 2008. **3**(9): p. 720-1.
5. Morel, C., et al., *Isoflavones as potentiators of antibacterial activity*. J Agric Food Chem, 2003. **51**(19): p. 5677-9.
6. Firn, R.D. and C.G. Jones, *Natural products--a simple model to explain chemical diversity*. Nat Prod Rep, 2003. **20**(4): p. 382-91.
7. Chen, F., et al., *The family of terpene synthases in plants: a mid-size family of genes for specialized metabolism that is highly diversified throughout the kingdom*. Plant J, 2011. **66**(1): p. 212-29.
8. Christianson, D.W., *Unearthing the roots of the terpenome*. Curr Opin Chem Biol, 2008. **12**(2): p. 141-50.
9. Sugiyama, Y. and Y. Mukohata, *Archae-opsin expressed in Escherichia coli and its conversion to purple pigment in vitro*. J Biochem, 1994. **115**(5): p. 1021-6.
10. Fukusaki, E.I., et al., *Introduction of the archaeobacterial geranylgeranyl pyrophosphate synthase gene into Chlamydomonas reinhardtii chloroplast*. J Biosci Bioeng, 2003. **95**(3): p. 283-287.
11. Brocks, J.J., et al., *Archean molecular fossils and the early rise of eukaryotes*. Science, 1999. **285**(5430): p. 1033-6.
12. Summons, R.E., et al., *2-Methylhopanoids as biomarkers for cyanobacterial oxygenic photosynthesis*. Nature, 1999. **400**(6744): p. 554-7.
13. Fernandez-Ayala, D.J., et al., *Specificity of coenzyme Q10 for a balanced function of respiratory chain and endogenous ubiquinone biosynthesis in human cells*. Biochimica Et Biophysica Acta, 2005. **1706**(1-2): p. 174-83.
14. Durchan, M., et al., *Role of Carotenoids in Light-Harvesting Processes in an Antenna Protein from the Chromophyte Xanthonema debile*. Journal of Physical Chemistry B, 2012. **116**(30): p. 8880-9.
15. Croce, R., et al., *Carotenoid-to-chlorophyll energy transfer in recombinant major light-harvesting complex (LHCII) of higher plants. I. Femtosecond transient absorption measurements*. Biophysical Journal, 2001. **80**(2): p. 901-15.
16. Mortensen, A. and L.H. Skibsted, *Importance of carotenoid structure in radical-scavenging reactions*. J Agric Food Chem, 1997. **45**(8): p. 2970-2977.
17. Armstrong, G.A. and J.E. Hearst, *Carotenoids 2: Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis*. FASEB J, 1996. **10**(2): p. 228-37.
18. Cleland, C.F. and J.A. Zeevaart, *Gibberellins in Relation to Flowering and Stem Elongation in the Long Day Plant Silene armeria*. Plant Physiol, 1970. **46**(3): p. 392-400.
19. Stowe, B.B. and T. Yamaki, *Gibberellins: stimulants of plant growth*. Science, 1959. **129**(3352): p. 807-16.
20. Sacchettini, J.C. and C.D. Poulter, *Creating isoprenoid diversity*. Science, 1997. **277**(5333): p. 1788-9.
21. Lange, B.M., et al., *Isoprenoid biosynthesis: the evolution of two ancient and distinct pathways across genomes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(24): p. 13172-7.

22. Chen, A., P.A. Kroon, and C.D. Poulter, *Isoprenyl diphosphate synthases: protein sequence comparisons, a phylogenetic tree, and predictions of secondary structure*. *Protein Sci*, 1994. **3**(4): p. 600-7.
23. Wang, K.C. and S. Ohnuma, *Isoprenyl diphosphate synthases*. *Biochim Biophys Acta*, 2000. **1529**(1-3): p. 33-48.
24. Qureshi, N. and J.W. Porter, *Conversion of acetyl-coenzyme A to isopentenyl pyrophosphate*. *Biosynthesis of Isoprenoid Compounds*, John Wiley & Sons New York, 1981. **1**: p. 47-94.
25. Bruenger, E., L. Chayet, and H.C. Rilling, *Isopentenyl pyrophosphate isomerase: dimethylallyl pyrophosphate isomerase: isolation from *Claviceps* sp. SD 58 and comparison to the mammalian enzyme*. *Arch Biochem Biophys*, 1986. **248**(2): p. 620-5.
26. Phillips, M.A., et al., *The Arabidopsis thaliana type I Isopentenyl Diphosphate Isomerases are targeted to multiple subcellular compartments and have overlapping functions in isoprenoid biosynthesis*. *Plant Cell*, 2008. **20**(3): p. 677-96.
27. Berry, A.A., CH), Bretzel, Werner (Loerrach, DE), Hümbelin, Markus (Basel, CH), Lopez-ulibbarri, Rual (Sisseln, CH), Mayer, Anne Françoise (Basel, CH), Yeliseev, Alexei A. (Lafayette, CA, US),, *Isoprenoid production*, 2006, DSM IP Assets B.V. (TE Heerlen, NL): United States.
28. Rohmer, M., et al., *Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate*. *Biochem J*, 1993. **295 ( Pt 2)**: p. 517-24.
29. Schwender, J., et al., *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**. *Biochem J*, 1996. **316 ( Pt 1)**: p. 73-80.
30. Wanke, M., K. Skorupinska-Tudek, and E. Swiezewska, *Isoprenoid biosynthesis via 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate/2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate (DOXP/MEP) pathway*. *Acta Biochim Pol*, 2001. **48**(3): p. 663-72.
31. Lichtenthaler, H.K., M. Rohmer, and J. Schwender, *Two independent biochemical pathways for isopentenyl diphosphate and isoprenoid biosynthesis in higher plants*. *Physiologia Plantarum*, 1997. **101**(3): p. 643-652.
32. Apfel, C.M., et al., *Use of genomics to identify bacterial undecaprenyl pyrophosphate synthetase: cloning, expression, and characterization of the essential *uppS* gene*. *J Bacteriol*, 1999. **181**(2): p. 483-92.
33. Wang, K. and S. Ohnuma, *Chain-length determination mechanism of isoprenyl diphosphate synthases and implications for molecular evolution*. *Trends Biochem Sci*, 1999. **24**(11): p. 445-51.
34. Tarshis, L.C., et al., *Crystal structure of recombinant farnesyl diphosphate synthase at 2.6-Å resolution*. *Biochemistry*, 1994. **33**(36): p. 10871-7.
35. Liang, P.H., T.P. Ko, and A.H. Wang, *Structure, mechanism and function of prenyltransferases*. *Eur J Biochem*, 2002. **269**(14): p. 3339-54.
36. Poulter, C.D. and H.C. Rilling, *Prenyltransferase: the mechanism of the reaction*. *Biochemistry*, 1976. **15**(5): p. 1079-83.
37. Laskovics, F.M. and C.D. Poulter, *Prenyltransferase; determination of the binding mechanism and individual kinetic constants for farnesylpyrophosphate synthetase by rapid quench and isotope partitioning experiments*. *Biochemistry*, 1981. **20**(7): p. 1893-901.
38. Schmidt, A., et al., *A bifunctional geranyl and geranylgeranyl diphosphate synthase is involved in terpene oleoresin formation in *Picea abies**. *Plant Physiol*, 2010. **152**(2): p. 639-55.
39. Gilg, A.B., C. Tittiger, and G.J. Blomquist, *Unique animal prenyltransferase with monoterpene synthase activity*. *Naturwissenschaften*, 2009. **96**(6): p. 731-5.
40. Tarshis, L.C., et al., *Regulation of product chain length by isoprenyl diphosphate synthases*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(26): p. 15018-23.

41. Burke, C.C., M.R. Wildung, and R. Croteau, *Geranyl diphosphate synthase: cloning, expression, and characterization of this prenyltransferase as a heterodimer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(23): p. 13062-7.
42. Pan, J.J., L.W. Yang, and P.H. Liang, *Effect of site-directed mutagenesis of the conserved aspartate and glutamate on E-coli undecaprenyl pyrophosphate synthase catalysis*. Biochemistry, 2000. **39**(45): p. 13856-13861.
43. Swiezewska, E. and W. Danikiewicz, *Polyisoprenoids: structure, biosynthesis and function*. Prog Lipid Res, 2005. **44**(4): p. 235-58.
44. Laule, O., et al., *Crosstalk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis in Arabidopsis thaliana*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(11): p. 6866-71.
45. Krisans, S.K., et al., *Farnesyl-diphosphate synthase is localized in peroxisomes*. J Biol Chem, 1994. **269**(19): p. 14165-9.
46. Okada, K., et al., *Five geranylgeranyl diphosphate synthases expressed in different organs are localized into three subcellular compartments in Arabidopsis*. Plant Physiol, 2000. **122**(4): p. 1045-56.
47. Martin, D., et al., *Mitochondrial targeting of farnesyl diphosphate synthase is a widespread phenomenon in eukaryotes*. Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research, 2007. **1773**(3): p. 419-426.
48. Christianson, D.W., *Structural biology and chemistry of the terpenoid cyclases*. Chem Rev, 2006. **106**(8): p. 3412-42.
49. Degenhardt, J., T.G. Kollner, and J. Gershenzon, *Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants*. Phytochemistry, 2009. **70**(15-16): p. 1621-37.
50. Chen, F., et al., *Characterization of a root-specific Arabidopsis terpene synthase responsible for the formation of the volatile monoterpene 1,8-cineole*. Plant Physiol, 2004. **135**(4): p. 1956-66.
51. Zerbe, P., et al., *Bifunctional cis-abienol synthase from Abies balsamea discovered by transcriptome sequencing and its implications for diterpenoid fragrance production*. J Biol Chem, 2012. **287**(15): p. 12121-31.
52. Zhou, K., et al., *Insights into diterpene cyclization from structure of bifunctional abietadiene synthase from Abies grandis*. J Biol Chem, 2012. **287**(9): p. 6840-50.
53. Hyatt, D.C., et al., *Structure of limonene synthase, a simple model for terpenoid cyclase catalysis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(13): p. 5360-5.
54. Godard, K.A., R. White, and J. Bohlmann, *Monoterpene-induced molecular responses in Arabidopsis thaliana*. Phytochemistry, 2008. **69**(9): p. 1838-49.
55. Fontana, A., et al., *Attractiveness of constitutive and herbivore-induced sesquiterpene blends of maize to the parasitic wasp Cotesia marginiventris (Cresson)*. J Chem Ecol, 2011. **37**(6): p. 582-91.
56. Buchel, K., et al., *An elm EST database for identifying leaf beetle egg-induced defense genes*. BMC Genomics, 2012. **13**(1): p. 242.
57. Wegener, R., et al., *Analysis of volatiles induced by oviposition of elm leaf beetle Xanthogaleruca luteola on Ulmus minor*. J Chem Ecol, 2001. **27**(3): p. 499-515.
58. Büchel, K., et al., *How plants give early herbivore alert: Volatile terpenoids attract parasitoids to egg-infested elms*. Basic and Applied Ecology, 2011. **12**(5): p. 403-412.
59. Wyk, B.-E.v., *Handbuch der Arzneipflanzen*. 2004: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH.
60. Covington, B., *Erythroxylum coca*, [http://www.altoona.psu.edu/academics/www/mns/plants/foto\\_40.jpg](http://www.altoona.psu.edu/academics/www/mns/plants/foto_40.jpg), Editor, Pennsylvania State University.
61. Emanuelsson O, N.H., von Heijne G, *ChloroP*, Center for Biological Sequence Analysis.
62. Nagel, R., J. Gershenzon, and A. Schmidt, *Nonradioactive assay for detecting isoprenyl diphosphate synthase activity in crude plant extracts using liquid*

- chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Anal Biochem*, 2012. **422**(1): p. 33-8.
63. Cao, X., et al., *Molecular characterization and expression analysis of a gene encoding for farnesyl diphosphate synthase from Euphorbia pekinensis Rupr.* *Mol Biol Rep*, 2012. **39**(2): p. 1487-92.
64. Kim, O.T., et al., *Molecular characterization of ginseng farnesyl diphosphate synthase gene and its up-regulation by methyl jasmonate.* *Biologia Plantarum*, 2010. **54**(1): p. 47-53.
65. Ament, K., et al., *Induction of a leaf specific geranylgeranyl pyrophosphate synthase and emission of (E,E)-4,8,12-trimethyltrideca-1,3,7,11-tetraene in tomato are dependent on both jasmonic acid and salicylic acid signaling pathways.* *Planta*, 2006. **224**(5): p. 1197-1208.
66. Ma, Y.M.A., et al., *Genome-wide identification and characterization of novel genes involved in terpenoid biosynthesis in Salvia miltiorrhiza.* *Journal of Experimental Botany*, 2012. **63**(7): p. 2809-2823.
67. Burke, C.C., M.R. Wildung, and R. Croteau, *Geranyl diphosphate synthase: Cloning, expression, and characterization of this prenyltransferase as a heterodimer.* *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999. **96**(23): p. 13062-13067.
68. Takaya, A., et al., *Cloning, expression and characterization of a functional cDNA clone encoding geranylgeranyl diphosphate synthase of Hevea brasiliensis.* *Biochimica Et Biophysica Acta-Gene Structure and Expression*, 2003. **1625**(2): p. 214-220.
69. Wang, Y.C., Z.Q. Miao, and K.X. Tang, *Molecular cloning and functional expression analysis of a new gene encoding geranylgeranyl diphosphate synthase from hazel (Corylus avellana L. Gasaway).* *Molecular Biology Reports*, 2010. **37**(7): p. 3439-3444.
70. Hirooka, K., et al., *Cloning and kinetic characterization of Arabidopsis thaliana solanesyl diphosphate synthase.* *Biochem J*, 2003. **370**(Pt 2): p. 679-86.
71. Ohara, K., K. Sasaki, and K. Yazaki, *Two solanesyl diphosphate synthases with different subcellular localizations and their respective physiological roles in Oryza sativa.* *J Exp Bot*, 2010. **61**(10): p. 2683-92.
72. Wang, G. and R.A. Dixon, *Heterodimeric geranyl(geranyl)diphosphate synthase from hop (Humulus lupulus) and the evolution of monoterpene biosynthesis.* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(24): p. 9914-9.
73. Lucker, J., P. Bowen, and J. Bohlmann, *Vitis vinifera terpenoid cyclases: functional identification of two sesquiterpene synthase cDNAs encoding (+)-valencene synthase and (-)-germacrene D synthase and expression of mono- and sesquiterpene synthases in grapevine flowers and berries.* *Phytochemistry*, 2004. **65**(19): p. 2649-59.
74. Martin, D.M., et al., *Functional Annotation, Genome Organization and Phylogeny of the Grapevine (Vitis vinifera) Terpene Synthase Gene Family Based on Genome Assembly, FLcDNA Cloning, and Enzyme Assays.* *Bmc Plant Biology*, 2010. **10**.
75. Martin, D.M. and J. Bohlmann, *Identification of Vitis vinifera (-)-alpha-terpineol synthase by in silico screening of full-length cDNA ESTs and functional characterization of recombinant terpene synthase.* *Phytochemistry*, 2004. **65**(9): p. 1223-1229.
76. Sharon-Asa, L., et al., *Citrus fruit flavor and aroma biosynthesis: isolation, functional characterization, and developmental regulation of Cstps1, a key gene in the production of the sesquiterpene aroma compound valencene.* *Plant J*, 2003. **36**(5): p. 664-74.
77. Arimura, G., D.P.W. Huber, and J. Bohlmann, *Forest tent caterpillars (Malacosoma disstria) induce local and systemic diurnal emissions of terpenoid volatiles in hybrid poplar (Populus trichocarpa x deltoides): cDNA cloning, functional*

- characterization, and patterns of gene expression of (-)-germacrene D synthase, *PtdTPS1*. *Plant Journal*, 2004. **37**(4): p. 603-616.
78. Leyes, A.E., J.A. Baker, and C.D. Poulter, *Biosynthesis of isoprenoids in Escherichia coli: stereochemistry of the reaction catalyzed by farnesyl diphosphate synthase*. *Org Lett*, 1999. **1**(7): p. 1071-3.
  79. Tholl, D., et al., *Formation of monoterpenes in Antirrhinum majus and Clarkia breweri flowers involves heterodimeric geranyl diphosphate synthases*. *Plant Cell*, 2004. **16**(4): p. 977-92.
  80. Schmidt, A., et al., *Induction of isoprenyl diphosphate synthases, plant hormones and defense signalling genes correlates with traumatic resin duct formation in Norway spruce (Picea abies)*. *Plant Mol Biol*, 2011. **77**(6): p. 577-90.
  81. Chang, T.H., et al., *Structure of a heterotetrameric geranyl pyrophosphate synthase from mint (Mentha piperita) reveals intersubunit regulation*. *Plant Cell*, 2010. **22**(2): p. 454-67.
  82. Hefner, J., R.E.B. Ketchum, and R. Croteau, *Cloning and functional expression of a cDNA encoding geranylgeranyl diphosphate synthase from Taxus canadensis and assessment of the role of this prenyltransferase in cells induced for Taxol production*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1998. **360**(1): p. 62-74.
  83. Hsiao, Y.Y., et al., *A novel homodimeric geranyl diphosphate synthase from the orchid Phalaenopsis bellina lacking a DD(X)2-4D motif*. *Plant J*, 2008. **55**(5): p. 719-33.
  84. Ogura, K. and T. Koyama, *Enzymatic Aspects of Isoprenoid Chain Elongation*. *Chem Rev*, 1998. **98**(4): p. 1263-1276.
  85. Hope, A.B., *The chloroplast cytochrome *bc* complex: a critical focus on function*. *Biochim Biophys Acta*, 1993. **1143**(1): p. 1-22.
  86. Casey, R.P., *Membrane reconstitution of the energy-conserving enzymes of oxidative phosphorylation*. *Biochim Biophys Acta*, 1984. **768**(3-4): p. 319-47.
  87. Tholl, D., *Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism*. *Curr Opin Plant Biol*, 2006. **9**(3): p. 297-304.
  88. Zerbe, P., A. Chiang, and J. Bohlmann, *Mutational analysis of white spruce (Picea glauca) ent-kaurene synthase (PgKS) reveals common and distinct mechanisms of conifer diterpene synthases of general and specialized metabolism*. *Phytochemistry*, 2012. **74**: p. 30-9.
  89. van Schie, C.C., et al., *Geranyl diphosphate synthase is required for biosynthesis of gibberellins*. *Plant J*, 2007. **52**(4): p. 752-62.
  90. Aharoni, A., et al., *Terpenoid metabolism in wild-type and transgenic Arabidopsis plants*. *Plant Cell*, 2003. **15**(12): p. 2866-84.
  91. Little, D.B. and R.B. Croteau, *Alteration of product formation by directed mutagenesis and truncation of the multiple-product sesquiterpene synthases delta-selinene synthase and gamma-humulene synthase*. *Arch Biochem Biophys*, 2002. **402**(1): p. 120-35.
  92. Prosser, I., et al., *Enantiospecific (+)- and (-)-germacrene D synthases, cloned from goldenrod, reveal a functionally active variant of the universal isoprenoid-biosynthesis aspartate-rich motif*. *Arch Biochem Biophys*, 2004. **432**(2): p. 136-44.

# Anhang

## 1. Primer

Hier gezeigt sind die designten und eingesetzten Primer mit Schmelztemperatur nach Angaben des Lieferanten (Eurofins MWG Operon, Deutschland, Ebersberg).

**Tab. 1: Primer für die Sequenzierung und Standard-PCR. (\*<sup>1</sup> = Quantitative Real Time PCR-Primer von Kerstin Büchel et al.; \*<sup>2</sup> = Primer aus TOPO<sup>®</sup> TA Cloning<sup>®</sup> Kit)**

Name	Sequenz (5' -> 3')	T <sub>m</sub>
Um_RubisCO_fw	CGAGGTTGAGAGCTCCGACACC	65,8 °C
Um_RubisCO_rv	CCTAATAGGGGGCGGCCATACTTG	66,1 °C
Um_Ubiq_for * <sup>1</sup>	CGAGGTTGAGAGCTCCGACACC	65,8 °C
Um_Ubiq_rev * <sup>1</sup>	CGGCCAAAGTCCTTCCATCCTCC	66,0 °C
Um-GGPPS_fw3	CTGTGAATCTGGGTTTCAT	64,4 °C
Um-GGPPS_rv3	GACGGTTGAGACGGCGA	65,8 °C
M13_fw (-20) * <sup>2</sup>	GTAAAACGACGGCCAG	51,7 °C
M13_rv * <sup>2</sup>	CAGGAAACAGCTATGAC	50,4 °C
T3 * <sup>2</sup>	ATTAACCCTCACTAAAGGGA	53,2 °C
T7_prom * <sup>2</sup>	TAATACGACTCACTATAGGG	53,2 °C
T7_term * <sup>2</sup>	TATGCTAGTTATTGCTCAGS	50,2 °C
Ec_TPS1_Start	ATGCCTTCTCAAGTTTCTGCTGTTTC	63,2 °C
Ec_TPS3_Start	ATGTCCCTTCCCTTGGTTGCTTCATC	64,8 °C
Ec_TPS6_Start	ATGCCTTCTCAAGTTTCTGCTGTTCC	63,2 °C
Ec_FPPS_Start	ATGGCGGATCTGAAGTCTACGTTCTTG	65,0 °C
Ec_G_GGPPS1_Start	ATGCTAGTCTGCTGGGATTTCGAG	64,8 °C
Ec_G_GGPPS3_Start	ATGGCAGGAGCTCTTTCTGCTTGC	64,4 °C
Ec_GGPPS1_Start	ATGACTTCTGCGAGCCTCGGTTTC	64,2 °C
Ec_GGPPS2_Start	ATGGTTTTTCTACGGTAATACCCCTCG	61,9 °C
Ec_SDPS1_Start	ATGATGTCAATGACATGCCATGGTCTG	63,4 °C
Um_FPPS_Start	ATGGCGGATCTGAAGTCAAAGTTTCG	63,0 °C
Um_GPPS_Start	ATGATATTTTCTCGGGATTTCGTCGG	63,4 °C
Um_GGPPS_StartN	ATGAGTTCTGTGAATCTGGGTTTCATGG	63,4 °C
Um_TPS1_Start	ATGTCTATTCTAGTCATATCAGATCCATCTC	62,9 °C

**Tab. 2: Primer und nested Primer für die 5'-RACE-PCR**

5'-RACE-Primer	Sequenz (5' -> 3')	T <sub>m</sub>
Ec_FPPS_rv1	GCCATTCAATACACCATCCAAGAGCAC	65,0 °C
Ec_TPS1_rv1	CGTATCCCAAGATGTGCTGCCTC	64,2 °C
Ec_TPS2_rev	CCCATAAAGCAGGTTGGTAGTTCCC	64,6 °C
Ec_TPS2_rv_new	CCCAAGCATCGCTCTCACATCTTCC	64,4 °C
Ec_TPS5_rev	CGGCTTCTGTCTGGTTGTTGAGC	64,2 °C
Ec_TPS6_rev	CGTGTGGGATACGATGTCATTTCATGAG	65,0 °C
Ec_TPS7_rev	CTTCAAAGATGGTCTTGCTATGGCCG	64,8 °C
Ec_TPS7_rev_nes	GCCTTTGCCATCCATCTTTGAACAAC	65,0 °C
Ec_G_GGPPS1_rv1	CGTAGTCATTTGCATGGTTTCACCTG	63,2 °C
Ec_G_GGPPS2_rev	CACCTGTTACAAGATGCTCTACAACAG	63,4 °C
Ec_G_GGPPS2_rev_nes	CAACTTATAGGCACGTGAGATCAGTCAC	65,1 °C
Ec_GGPPS1_rv1	GAGGCATTGACAAGTCCAGAGAGG	64,6 °C
ECoca_SPPS_rev	GACTCGACAACCTGGATGTTTCTCGG	64,6 °C
Um_GPPS_rv1b	CAATGATGCAGTTTGTAGTACGCTTTTGC	64,2 °C
Um_GPPS_rv_nes1b	CCATGCTACAACGTTGATCAGATGTAG	63,4 °C
Um_GGPPS_rv1	GACGGTTGAGACGGCGATGTGC	65,8 °C
Um_TPS1_rv2	GTATTCCGGGAGCTGATCAATGGC	64,4 °C
Um_TPS2_rv2b	CCTCCAGTATATCCTCTCCATGTGTTTC	65,0 °C
Um_TPS2_rev_nes	GATTCCTTAAATTTCCCTTCGTTGTCTTG	64,0 °C
Um_TPS3_rv1b	GCCTGGAACACTACTGCTGAAGCC	64,2 °C
Um_TPS5_rv2a	CTCGGAAAGCTTGGACTCAGAAAGC	64,6 °C
Um_TPS5_rv_new	GTTGTGAACACCAACGGATATAATGCC	63,4 °C

**Tab. 3: Primer und nested Primer für die 3'-RACE-PCR**

3'-RACE-Primer	Sequenz (5' -> 3')	T <sub>m</sub>
Ec_FPPS_fw1	GGCTTTGGAACCTTTGTACCGAAGAGC	64,8 °C
Ec_TPS1_fw1	GCTTCAGCGGTAGAAATGTTACTTGAAG	63,4 °C
Ec_TPS2_fw	CAACAGGCTTCAGGCAGTTCATGTAG	64,8 °C
Ec_TPS2_fw_new	CAATCAACCATGCACAGACAATCGAC	63,2 °C
Ec_TPS3_fw	GAGTACGCAATGGAGCCTCAACATAG	64,8 °C
Ec_TPS4_fw	GCAACTGTTGCCTGCATGATAGCAC	64,6 °C
Ec_TPS5_fw	GCTCAACAACCAGACAGAAGCCG	64,2 °C
Ec_TPS7_fw	GACTCACAATTCAAGCCACCCAAG	64,6 °C
Ec_TPS7_fw_nes	CACTAGGCTTCTCATGCTTATTCTCTC	63,2 °C
Ec_G_GGPPS1_fw1	CTGGGATTGGCATTCAACTGATAGATG	63,6 °C
Ec_G_GGPPS2_fw	CACTTCTTGCTGGGCAAACCTACAGAAG	65,0 °C
Ec_GGPPS1_fw1	CGCTGCTGTTTCACTAAGAGACTCTG	64,8 °C
Um_FPPS_fw2b	GAAGGAAAGGAATTGACTGAAGAGGAAATC	64,0 °C
Um_FPPS_for_new1	CTGATCCTGAAGTCTTGGTAAGATTG	63,4 °C
Um_GPPS_fw2b	GTCTGTTGCCCTCCTTGTCTGGG	65,8 °C
Um_GPPS_fw_nes2b	GAAGTTGCTCTATTGGCATTGAGTATGG	63,9 °C
Um_GPPS_fw3	CGCGGAATACAGAGAACAAGGAAAC	64,6 °C
Um_GGPPS_fw2	CTGTGAATCTGGGTTTCATGGGTCC	64,4 °C
Um_GGPPS_fw2	GGATTCTCCGGGCAGTGGCG	65,5 °C
Um_TPS1_fw1b	CAGAGAAGCTACCATTGCAAGAGACAG	65,1 °C
Um_TPS1_for_new1	GGTCCACCAGCAATACACACAAC	64,6 °C
Um_TPS2_fw3	GGAATCCCTTGTCTCAGCGACATTCG	64,4 °C
Um_TPS2_for_new1	GCTCTTACTGAAGCAGCAGAAAGGTG	64,9 °C
Um_TPS3_fw2	GGACATGTTGCTTCTGCTGTGGAG	66,0 °C
Um_TPS3_fw2	GACGAAGATGGATATACATGCTGG	63,2 °C
Um_TPS5_fw2b	CTCCGGCCAGTCCAATACGAAAGC	66,1 °C
Um_TPS5_fw2	GTATCACTCTGGTCGATCCTCCAAG	64,6 °C

**Tab. 4: Gateway-Primer für Klonierung und Expression**

Name	Sequenz (5' -> 3')	T <sub>m</sub>
ECocaTPS1StartN	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGCCTTCTCAAGTTTCTGCTGTTC	76,0 °C
ECocaTPS1StopN	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCAAAGGATAGAGATTCCACGAGC	77,6 °C
ECocaTPS3_StartN	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGTCCCTTCCCTTGGTTGCTTC	77,0 °C
Ec_TPS3_StartN-T	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGCTGTGGTCAAAGTTTCTG	75,6 °C
ECocaTPS3StopN	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTAGCAATAATTGGGGACTAAC	75,7 °C
Ec_TPS6_StartN	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGCCTTCTCAAGTTTCTG	75,0 °C
Ec_TPS6_StopN	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCAAAGGATACAGATTTCTG	75,7 °C
EC_FPPS_StartN *3	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGCGGATCTGAAGTCTACG	76,5 °C
EC_FPPS_StopN *3	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCACTTCTGTCTTTTGTATATTTAG	74,5 °C
ECoGGGPPS1Start	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGCTAGTCTGCTGCGGATTTCG	76,9 °C
Ec_G_GGPPS1_StartN-T	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGCCGACGGATTTGGTGACG	77,9 °C
ECoGGGPPS1Stop	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTATTTATTTCTGTAATCACTC	74,1 °C
Ec_G_GGPPS3_StartN	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGCAGGAGCTCTTTCTGCTTGC	77,6 °C
Ec_G_GGPPS3_StartN-T	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGCTCTCAGCCAATGCCAAC	76,4 °C
Ec_G_GGPPS3_StopN	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTACTTGACACTAAGCAACAACG	76,9 °C
ECocaGGPPS1Star	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGACTTCTGCGAGCCTCGGTTTC	77,8 °C
ECocaGGPPS1Stop	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCAGTTTTGCCTGTAAGCAATG	76,5 °C
ECocaGGPPS2Start	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGTTTTTCTACGGTAATACC	74,0 °C
Ec_GGPPS2_StartN-T	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGAGCCAATCCACTTCGACCC	77,1 °C
ECocaGGPPS2Stop	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCATGAGCTTGATACACCAACG	77,3 °C
Ec_SPPS1_StartN	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGATGTCAATGACATGCCATGG	75,5 °C
Ec_SPPS1_StopN	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCAATCAATTCTGTTCAAGATTG	74,9 °C
Um_FPPS_StartN *3	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGCGGATCTGAAGTCAAAG	75,7 °C
Um_FPPS_StopN *3	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTATTTATGTCGCTTGTATATC	74,9 °C
Um_GPPS_StartN *3	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGATATTTTCTCGGGGATTTC	74,1 °C
Um_GPPS_StopN *3	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCACTTGGTTCTTGTAAATGAC	75,8 °C
Um_GGPPS_StartN *3	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGAGTCTGTGAATCGGGTTC	75,5 °C
Um_GGPPS_StartN-T *3	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGCAAGAACTGTGAAAGAAG	74,1 °C
Um_GGPPS_StopN *3	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCAATTTCTCTATAAGCTATATAA	73,1 °C
Um_TPS1_StartN *3	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGCTATTCTAGTCATATCAG	73,3 °C
Um_TPS1_StopN *3	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTAACAGGCACAGGATCAATG	76,5 °C



## 2. Alignments

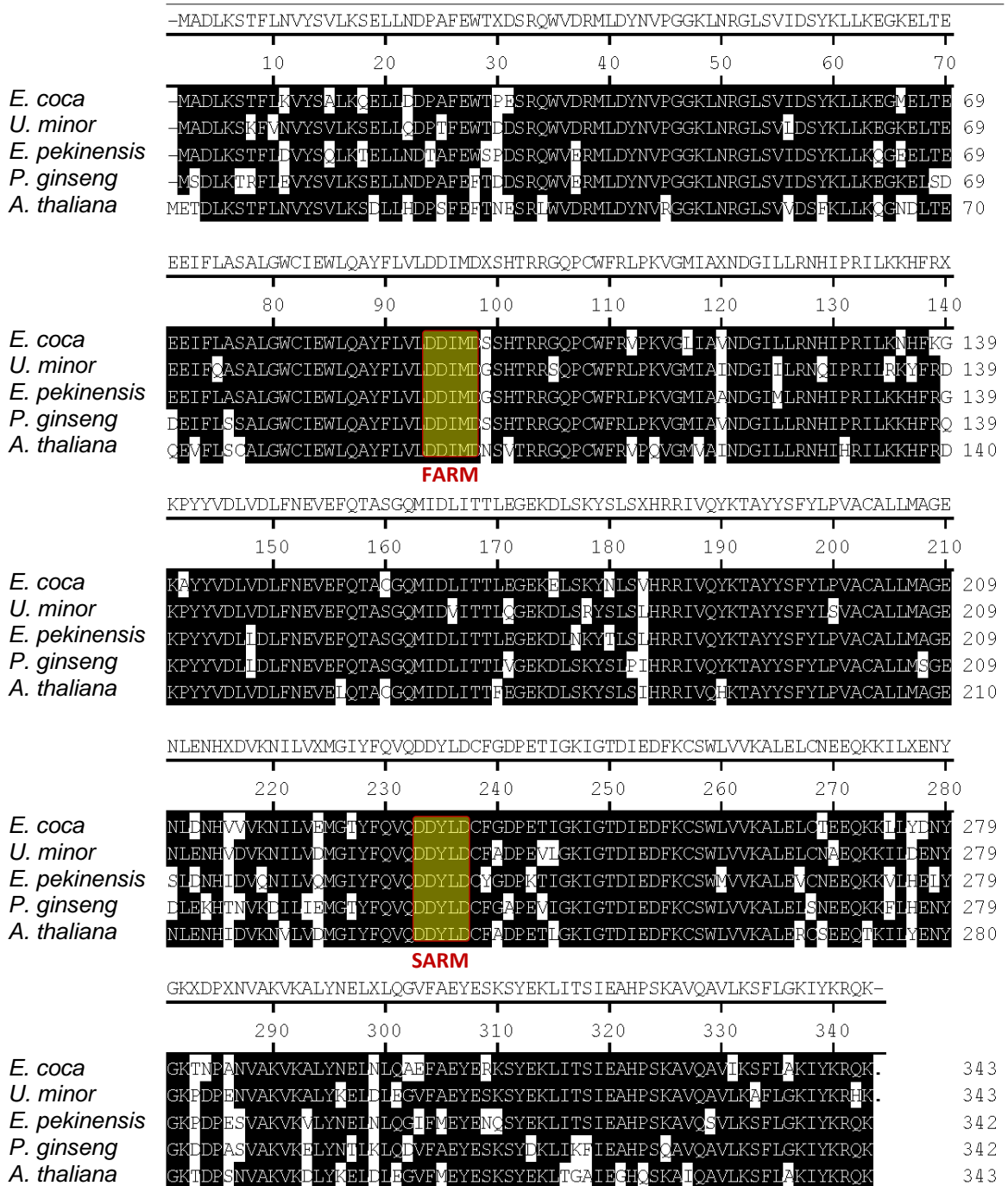


Abb. 1: Alignment der Sequenzen von putativen Farnesyldiphosphatsynthasen (FDPS) aus *Erythroxylum coca* (*EcFDPS*), *Ulmus minor* (*UmFDPS*) mit denen der charakterisierten FDPS von *Euphorbia pekinensis* (FJ755465.1), *Panax ginseng* (DQ087959.1) und *Arabidopsis thaliana* (X75789.1). Über der Skala ist die Konsensussequenz zu sehen. Gelb unterlegt sind die Aspartat-reichen Motive FARM und SARM (First/Second Aspartat Rich Motif).

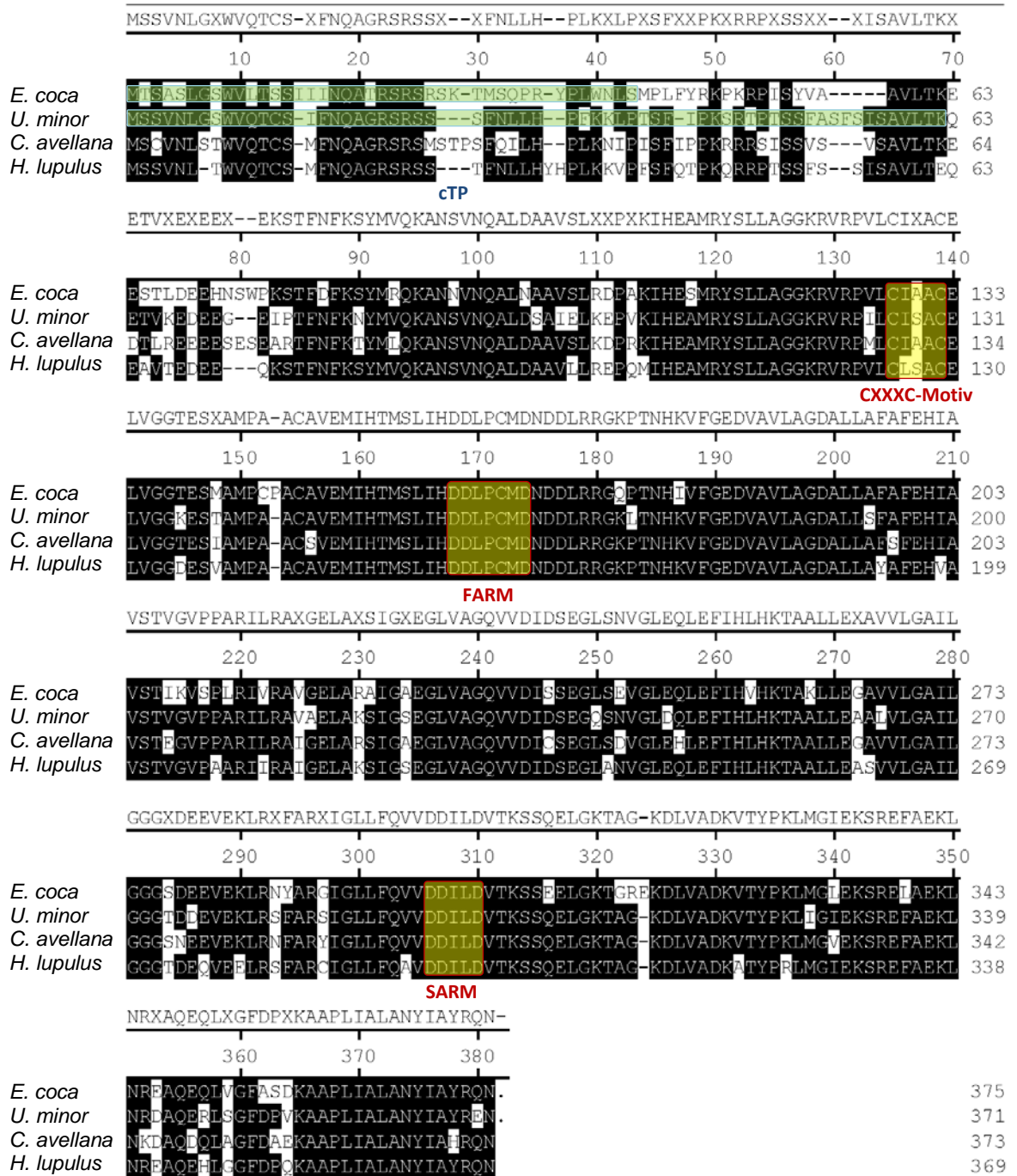
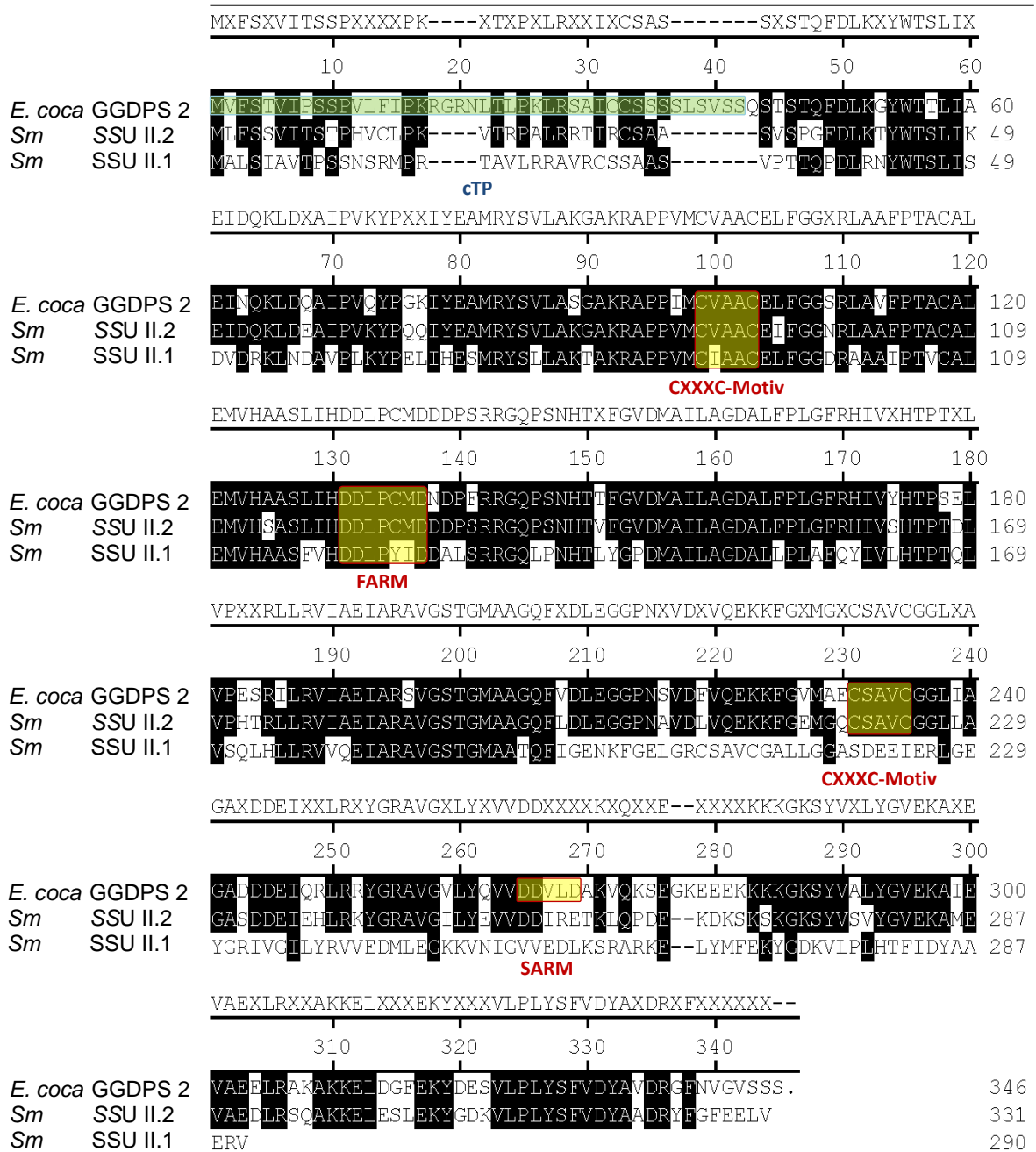


Abb. 2: Das Alignment zeigt Sequenzvergleiche der putativen Geranylgeranyl diphosphatsynthasen (GGDPS) von *E. coca* (*EcGGDPS 1*) und *U. minor* (*UmGGDPS*) mit einer GGDPS von *Corylus avellana* (EF553534.1) und der großen Untereinheit von einer G/GGDPS (Large Subunit = LSU) von *Humulus lupulus* (FJ455407.1). Über der Skala ist die Konsensussequenz zu sehen. Grün unterlegt wurden die chloroplastidären Transitpeptide (cTP), gelb das konservierte CXXXC-Motiv für die Dimerbildung, sowie das FARM und SARM.



**Abb. 3:** Die Sequenz von *EcGGDPS 2* aus *E. coca* wurde in diesem Alignment mit den Sequenzen der kleinen Untereinheiten (SSUs) von einer Geranyldiphosphatsynthase (GDPS) aus *Salvia miltiorrhiza* (*Sm* SSU II.1: JN831109.1; *Sm* SSU II.2: JN831110.1) verglichen. Über der Skala ist die Konsensussequenz zu sehen. Grün unterlegt ist die cTP, gelb die CXXXC-Motive für die Dimerbildung, sowie FARM und SARM.

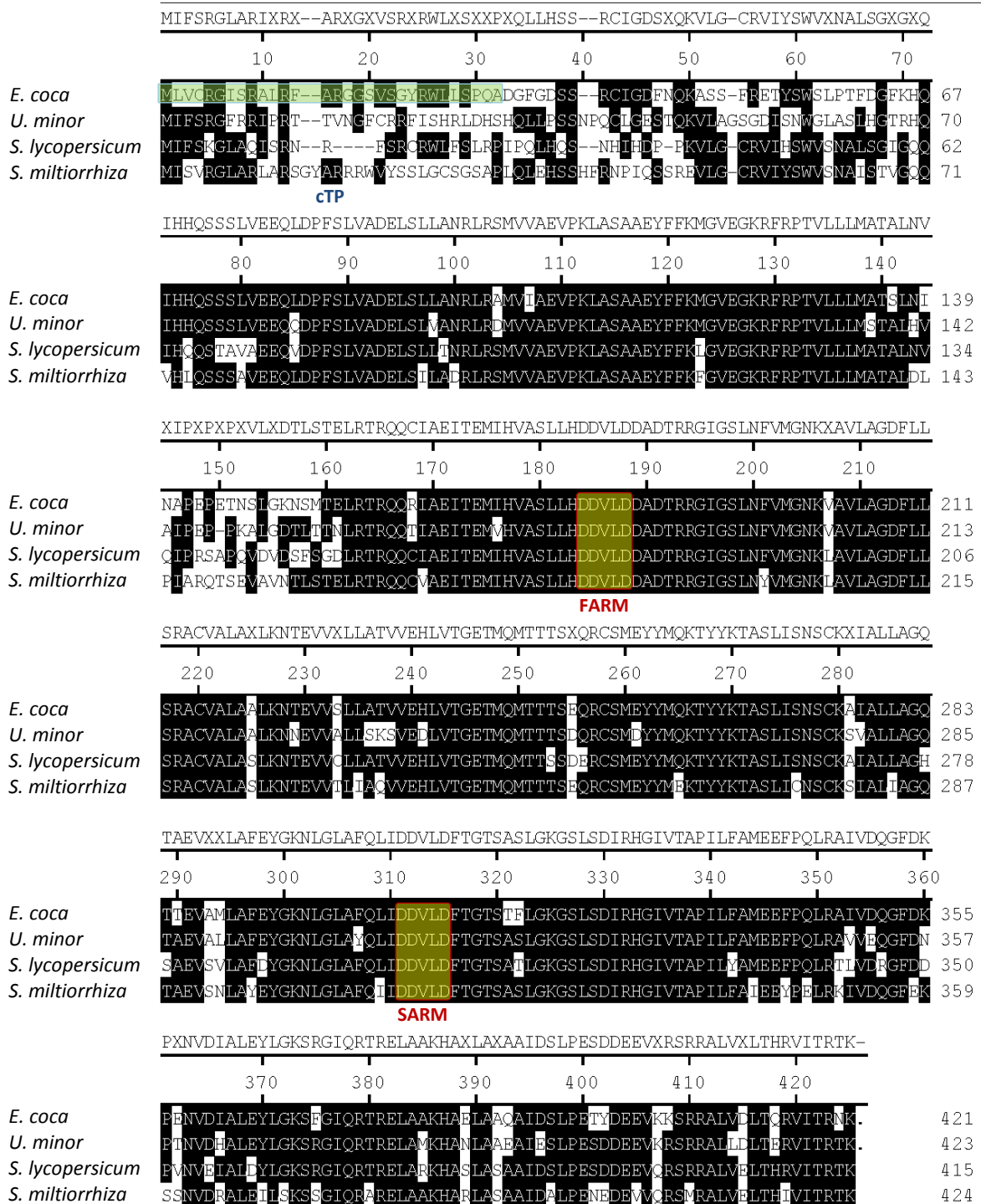


Abb. 4: Im abgebildeten Alignment wurden die Sequenzen von *EcG/GGDPS 1* aus *E. coca* und die der putativen GDPS von *U. minor* (*UmGDPS*) mit denen der charakterisierten GDPS von *Solanum lycopersicum* (NM\_001247160.1) und *Salvia miltiorrhiza* (JN831107.1) verglichen. Über der Skala ist die Konsensussequenz zu sehen. Grün unterlegt ist die cTP, gelb unterlegt das FARM und SARM.

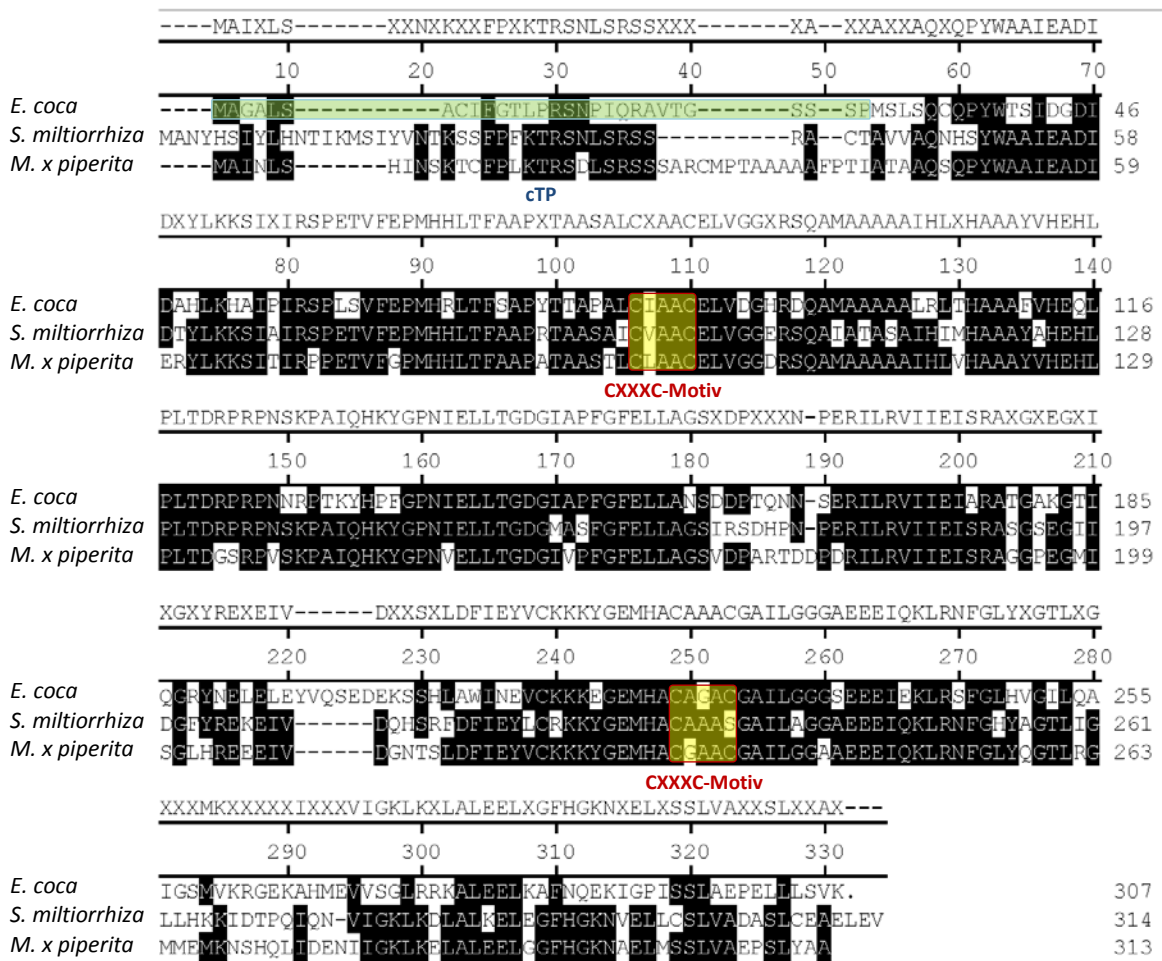


Abb. 5: Im Alignment wurde die Sequenz der EcG/GGDPS 3 aus *E. coca* mit den Sequenzen der charakterisierten kleinen Untereinheiten (SSU) von *Salvia miltiorrhiza* (SSU I: JN831108.1) und *Metha x piperita* (AF182827.1) verglichen. Über der Skala ist die Konsensussequenz zu sehen. Grün unterlegt wurde die cTP, gelb die beiden CXXXC-Motive.



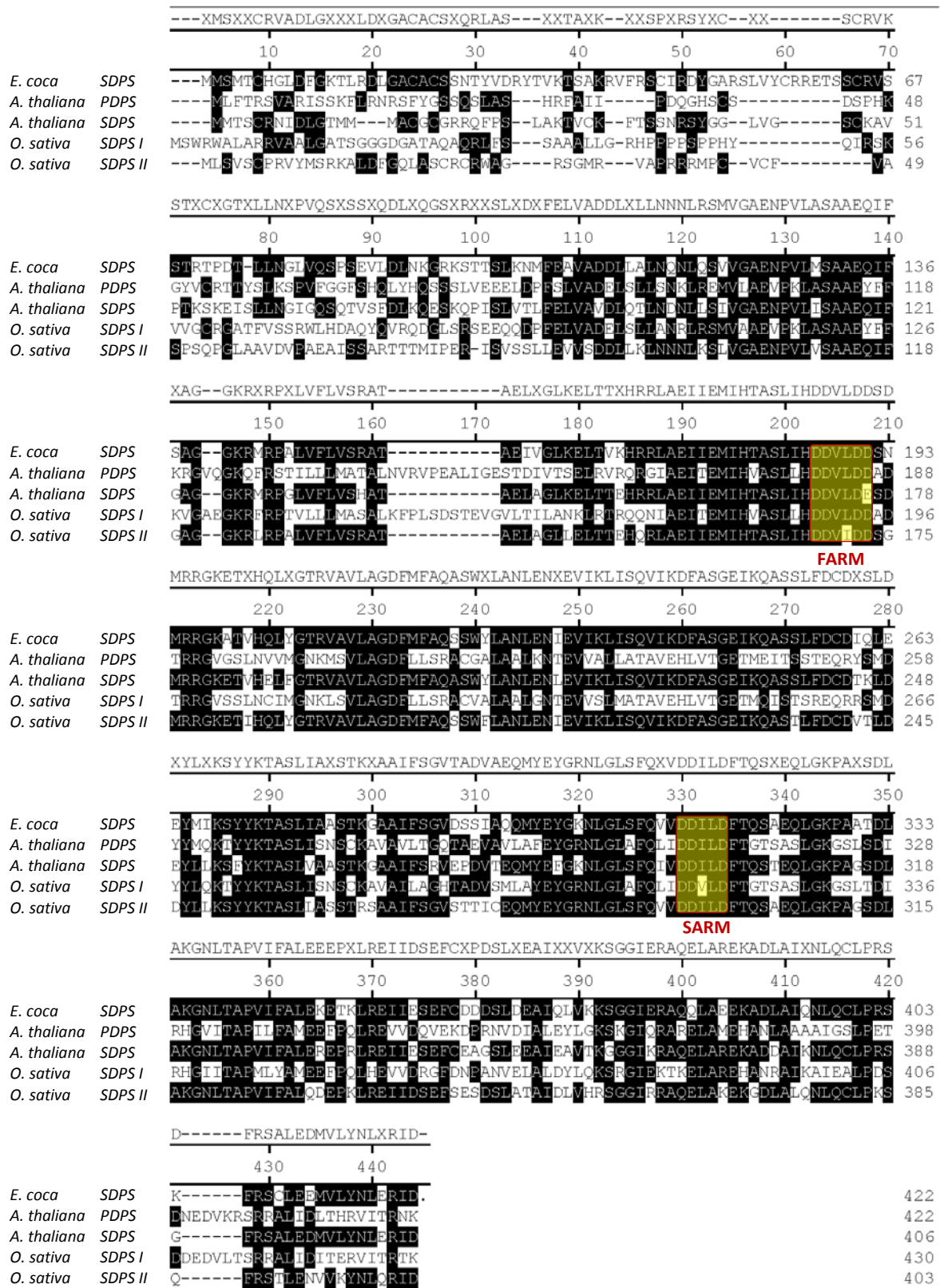


Abb. 6: Die Sequenz der putativen Solanesyldiphosphatsynthase (SDPS) aus *E. coca* (*EcSDPS*) wurde mit den Sequenzen charakterisierter SDPS aus *Arabidopsis thaliana* (AB071514.2) und *Oryza Sativa* (SDPS I: Q653T6.1; SDPS II: Q75HZ9.2), sowie einer Polyprenyldiphosphatsynthase (PDPS) aus *A. thaliana* (Q5HZ00.1) verglichen. Über der Skala ist die Konsensussequenz zu sehen. Gelb markiert wurde jeweils das FARM und SARM.

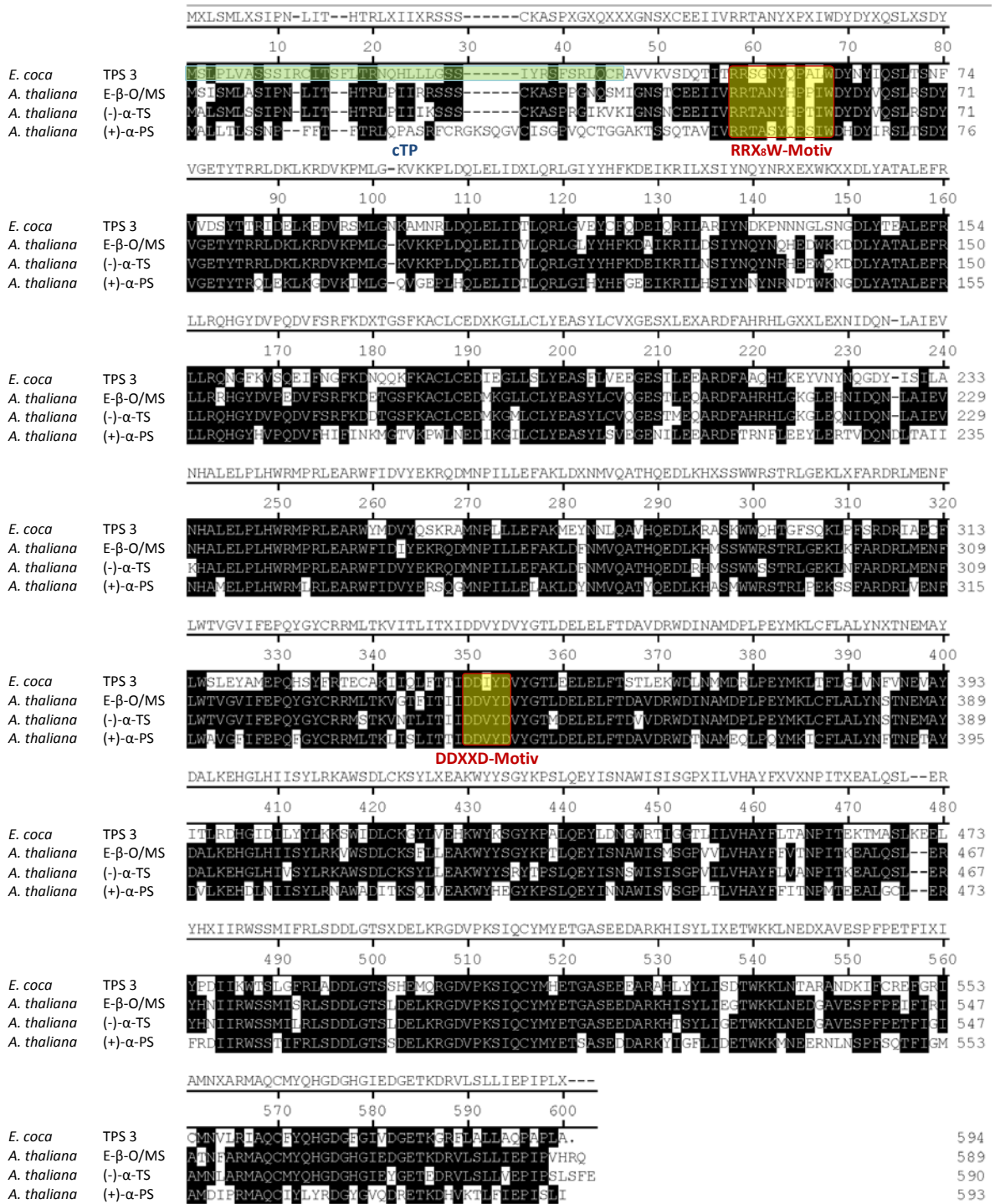


Abb. 7: Im Alignment ist der Vergleich von Sequenzen einer putativen Diterpensynthase aus *E. coca* (*Ec*TPS 3) und charakterisierten Terpensynthasen aus *Arabidopsis thaliana* zu sehen: (E)-β-Ocimen/Myrcen-Synthase (E-β-O/MS: HM807387.1), (-)-α-Terpineol-Synthase ((-)-α-TS: AY572987.1) und (+)-α-Phellandren-Synthase ((+)-α-PS: ADR74201.1). Über der Skala ist die Konsensussequenz zu sehen. Grün markiert wurde die cTP, gelb unterlegt die RR<sub>x</sub>W- und DDXXD-Motive.

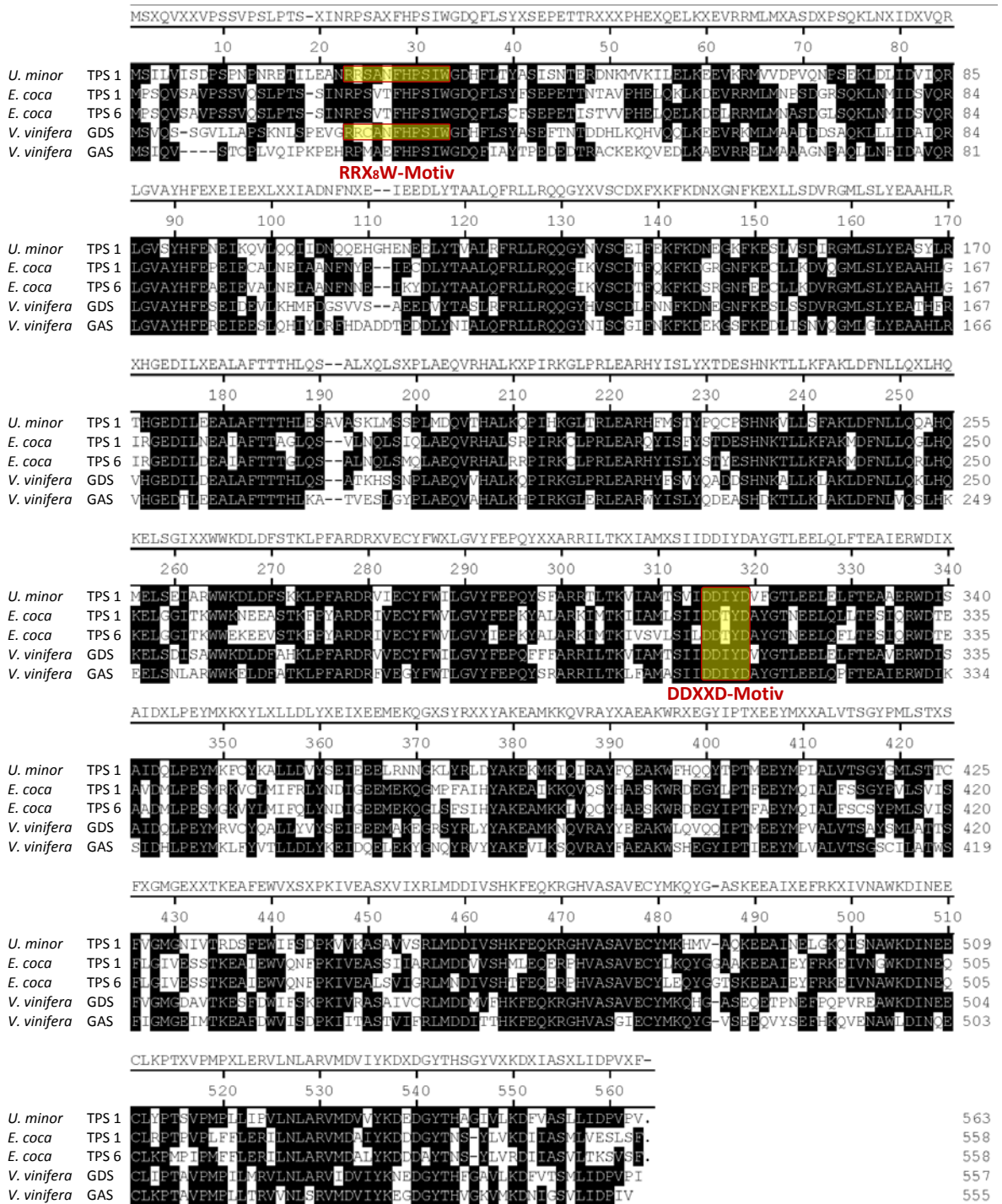


Abb. 8: Die Sequenzen der putativen Sesquiterpensynthasen aus *U. minor* (UmTPS 1) und *E. coca* (EcTPS 1, EcTPS 6) wurden mit denen von charakterisierten TPS aus *Vitis vinifera* verglichen: Germacren-D-Synthase (GDS: Q6Q3H3.1) und Germacren-A-Synthase (GAS: HQ326230.1). Über der Skala ist die Konsensussequenz zu sehen. Gelb markiert wurden jeweils die RRX<sub>6</sub>W- und die DDXXD-Motive.



### 3. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
<i>abs. Ethanol</i>	absolutes Ethanol (99,99 %)
ASS	Aminosäuresubstitutionen je 100 Resten
bp	Basenpaare
BLAST	Basic Local Alignment Tool
ca.	circa
CBS	Center for Biological Sequence Analysis
cDNA	Complementary Deoxyribonucleic Acid (Komplementäre Desoxyribonuklein-säure)
CDP	Copolyldiphosphat
CLD	Chain Length Determination Region
CMP	Cytidinmonophosphat
cps	counts per minute
CPS	Copolyldiphosphatsynthase
cTP	chlorplastidäres Transitpeptid
DCM	Dichlormethan
<i>ddH<sub>2</sub>O</i>	deionisiertes Wasser (Millipore)
DMADP	Dimethylallyldiphosphat
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
DTT	Dithiothreitol
DXP	1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	endoplasmatisches Retikulum

EST	Expressed Sequence Tag
<i>et al.</i>	und andere
FDP	Farnesyldiphosphat
FDPS	Farnesyldiphosphatsynthase
FSARM	First Aspartat Rich Motif
GGDP	Geranylgeranyldiphosphat
GGDPS	Geranylgeranyldiphosphatsynthase
GDP	Geranyldiphosphat
GDPS	Geranyldiphosphatsynthase
GST	Glutathion-S-Transferase
HPLC-MS/MS	High Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (Hochleistungs-Flüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie)
IDS	Isoprenyldiphosphatsynthase
IDP	Isopentenylidiphosphat
k. A.	keine Angabe
KS	Ent-Kaurensynthase
LB	Lysogeny Broth
LSU	Large Subunit
MEP	Methyl-D-Erythritol-4-Phosphat
MOPSO	3-Morpholino-2-Hydroxypropanesulfonic Acid
mRNA	messenger Ribonucleic Acid (Boten-Ribonukleinsäure)
MVA	Mevalonat
NAD(P)H	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-(Phosphat) in reduzierter Form
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NDP	Neryldiphosphat

NDPS	Neryldiphosphatsynthase
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
PDPS	Polyprenyldiphosphatsynthase
pers. Mtt.	persönliche Mitteilung
RNA	Ribonucleic Acid (Ribonukleinsäure)
rpm	rounds per minute
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
S.	Seite
SARM	Second Aspartat Rich Motif
SDP	Solanesyldiphosphat
SDPS	Solanesyldiphosphatsynthase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOC	Super Optimal Broth with Catabolize repression
SSU	Small Subunit
Tab.	Tabelle
TPS	Terpensynthesen
Tris	Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan
UDP	Undecaprenyldiphosphat
UV	Ultra Violet
v. a.	vor allem
z. Bsp.	zum Beispiel

## **Danksagung**

Ich danke meinem Betreuer und Erstgutachter Dr. Axel Schmidt für die Einführung in die spannende Thematik, das Anvertrauen des Projekts und die Hilfe im Laboralltag.

Außerdem danke ich PD Dr. Klaus J. Appenroth für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Für die Finanzierung und Ermöglichung der Bachelorarbeit danke ich Prof. Jonathan Gershenzon.

Besonderer Dank gilt auch Raimund Nagel für die Hilfe beim Auswerten der Assays an der HPCL-MS/MS und anderen Problemen im Labor. Ich danke auch Dr. John D'Auria, Dr. Monika Hilker, Jan Jirschitzka, Katrin Luck, Kerstin Büchel und Nadine Austel für die Bereitstellung der für die Bachelorarbeit notwendigen EST-Daten und Materialien. Mein Dank gilt auch allen Gruppenmitgliedern der Abteilung Biochemie am MPI für chemische Ökologie für die angenehme und lehrreiche Zeit.

Zuletzt danke ich meinen Freunden, Eltern und meinem Bruder Marcel für deren Unterstützung, und insbesondere meiner Oma, Renate, für ihr besonderes Engagement.

# Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift