

Friedrich-Schiller-Universität Jena
Biologisch-Pharmazeutische Fakultät
Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie, Jena
Abteilung Biochemie



seit 1558

„Klonierung und Expression einer putativen Geranylinalool-
Synthase der Pappel“

Bachelorarbeit
zur Erlangung des Grades eines
Bachelor of Science
vorgelegt von
Sarah Köhler
aus Halle-Saale

Jena, September 2012

Gutachter:

Dr. Tobias G. Köllner

PD Dr. Klaus-J. Appenroth

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis

Abbildungs- & Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1 Abwehrmechanismen der Pflanzen und die Rolle von Terpenen..... | 1 |
| 1.2 Terpen-Biosynthese | 3 |
| 1.3 Duftstoff-Induktion | 5 |
| 1.4 Die Pappel als Versuchsorganismus..... | 6 |
| 1.5 Zielsetzung | 7 |
| 2. Material und Geräte..... | 8 |
| 2.1 Geräte | 8 |
| 2.2 Chemikalien..... | 8 |
| 2.3 Primer..... | 9 |
| 2.4 Organismen | 9 |
| 2.4.1 Pflanzenmaterial | 9 |
| 2.4.2 Bakterien | 9 |
| 3. Methoden | 10 |
| 3.1 Anzucht und Kultivierung von Organismen | 10 |
| 3.1.1 Pflanzenmaterial | 10 |
| 3.1.2 Pflanzenmaterial | 10 |
| 3.1.3 Bakterien | 10 |
| 3.2 Molekularbiologische Methoden..... | 10 |
| 3.2.1 cDNA Synthese | 10 |
| 3.2.2 Polymerase Kettenreaktion | 11 |
| 3.2.3 DNA-Extraktion | 12 |
| 3.2.4 TOPO Klonierung..... | 12 |
| 3.2.5 Transformation | 12 |
| 3.3 Plasmidpräparation..... | 13 |

| | |
|---|----|
| 3.4 Konzentrationsbestimmung..... | 14 |
| 3.5 DNA-Sequenzierung..... | 14 |
| 3.6 Gel Nachweise..... | 15 |
| 3.7 Expression und Proteinreinigung..... | 17 |
| 3.8 Proteinassay..... | 18 |
| 3.9 Pflanzenbehandlung..... | 19 |
| 3.10 Duftstoffsammlung..... | 19 |
| 3.11 Analyse mittels Gaschromatographie (GC) mit Massenspektrometrie (MS) und Flammenionisationsdetektion (FID)..... | 20 |
| 3.12 Statistische Auswertung..... | 21 |
| 4. Ergebnisse..... | 22 |
| 4.1 Identifikation und Klonierung des Terpensynthasengens <i>PtTPS10</i> | 22 |
| 4.2 Expression und Aktivitätstest der Geranylinalool-Synthase..... | 24 |
| 4.3 Duftstoffemission nach Induktion mit Alamethicin, Jasmonsäure und Auxin in <i>Populus trichocarpa</i> | 27 |
| 5. Diskussion..... | 32 |
| 5.1 Das Terpensynthase Gen <i>PtTPS10</i> | 32 |
| 5.2 Aktivität von <i>PtTPS10</i> | 33 |
| 5.3 Elicitoren für die TMTT-Produktion..... | 35 |
| Literatur- und Quellenverzeichnis..... | 38 |
| Anhang..... | i |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------|---|
| APS | Ammoniumpersulfat |
| BLAST | Basic Local Alignment Search Tool |
| cDNA | copy DNA |
| dest. Wasser | destilliertes (desionisiertes) Wasser |
| DMAPP | Dimethylallyldiphosphat |
| DMNT | (3, <i>E</i>)-4,8-Dimethyl-1,3,7-Nonatrien |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxynukleotidtrisphosphat |
| DTT | Dithiothreitol |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| eV | Elektrovolt |
| FPP | Farnesyldiphosphat |
| fwd. Primer | forward Primer |
| GC-MS | Gaschromatographie-Massenspektrometrie |
| GGPP | Geranylgeranylpyrophosphat |
| GPP | Geranylpyrophosphat |
| IPP | Isopentenylidiphosphat |
| IPTG | Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid |
| kDa | Kilo Dalton |
| MEP | 2-C-Methylerythritol-4-phosphat |
| mRNA | Messenger Ribonukleinsäure |
| OD | Optische Dichte |
| PAGE | Polyacrylamidgelelektrophorese |
| PCR | Polymerasekettenreaktion |
| PEG | Polyethylenglykol |
| rev. Primer | reverse Primer |

| | |
|-------|------------------------------------|
| RNA | Ribonukleinsäure |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| ssDNA | einzelsträngige DNA |
| TAE | Tris-Acetat-EDTA |
| TEMED | N, N,N', N'-Tetramethylethyldiamin |
| TRIS | Tris(hedroxymethyl)aminomethan |
| TPS | Terpensynthase |
| UV | ultraviolett |

Abbildungs- & Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abb. 1.1: Chemische Strukturen einiger wichtiger induzierter Pflanzenduftstoffe nach Herbivorie (nach Holopainen & Gershenzon, 2010). | 2 |
| Abb. 1.2: Biosynthese von Terpenen in der Pflanze. (nach Bohlmann et al. 1998) | 4 |
| Abb. 3.1: Exsikkatorensystem | 19 |
| Abb. 4.1: Vergleich der Aminosäuresequenzen von <i>PtTPS10-1</i> , <i>PtTPS10-2</i> und der Datenbanksequenz | 24 |
| Abb. 4.2: Kontrolle des exprimierten Proteins <i>PtTPS10-1</i> (A) und <i>PtTPS10-2</i> (B). | 25 |
| Abb. 4.3: GC-MS Analyse der Enzymreaktion von <i>PtTPS10</i> aus <i>Populus trichocarpa</i> . | 27 |
| Abb. 4.4.: Gaschromatographisches Spektrum der volatilen Stoffe von Pappelblättern nach der Behandlung mit Wasser (A), Alamethicin (B), Jasmonsäure (C) und Auxin (D). | 30 |
| Abb. 5.1: Angenommene Biosynthese des Homoterpens TMTT. GES: Geranylinalool-Synthase nach (Herde et al. 2008) | 34 |
| Abb. 5.2: Mittelwerte einiger volatilen Duftstoffe (Mittelwert $\text{ng h}^{-1} \text{g}^{-1}$ Blatt mit Standarderror für 5 Replikate) von Kontrolle und Alamethicin im Vergleich. | 35 |
| Tabelle 1: Freigesetzte flüchtige Verbindungen der Pappel (<i>Populus trichocarpa</i>) nach 16-stündiger Behandlung mit Wasser (=Kontrolle), Alamethicin, Auxin und Jasmonsäure. | 32 |

1. Einleitung

1.1 Abwehrmechanismen der Pflanzen und die Rolle von Terpenen

Pflanzen sind in ihrer Umwelt einer Vielzahl von Gefährdungen ausgesetzt. Durch ihre Rolle als Primärproduzenten stehen sie am Anfang jeder Nahrungskette und werden vor allem von herbivoren Fressfeinden bedroht. Zu ihrem Schutz haben Pflanzen eine Reihe von Verteidigungsstrategien entwickelt (Walling 2000; Baldwin & Preston 1999). Neben anatomischen Strukturen wie Kutikula, Dornen und Lignin-Einlagerungen werden auch Sekundärmetabolite zur Abwehr gebildet. Diese artspezifischen Stoffe haben auf das Wachstum und die Entwicklung der Pflanze keinen direkten Einfluss.

Stoffe zur Abwehr sind unter anderem Alkaloide, Glucosinolate, Flavonoide, Phenylpropanoide und Terpene (Dicke & Poecke 2002). Diese Verbindungen können sowohl einen direkten, wie auch einen indirekten Einfluss auf den betreffenden Schädling haben. Die Produktion von Verteidigungssubstanzen kann fraßhemmend, toxisch oder abschreckend auf Herbivoren wirken (Abdelgaleil 2010). Dies stellt eine Form der direkten Abwehr von Pathogenen und Herbivoren dar. Solche Verbindungen sind unter anderem Nikotin, Tannine und Alkaloide, die Geruch und Geschmack der Pflanze beeinflussen und diese somit abstoßend oder giftig für Herbivoren werden (Mazid et al. 2011). Die in die Umwelt abgegebenen flüchtigen Stoffe können auch eine indirekte Abwehr bilden, indem sie z.B. die Fressfeinde des Schädling anlocken (Dicke & Loon 2000; Dicke 2009).

Bei den abgegebenen volatilen Stoffen spielen vor allem Terpene in tritrophischen Interaktionen eine entscheidende Rolle, da diese erst durch Schädlingsbefall verstärkt gebildet werden (Loon et al. 2000; Mooney et al. 2012). Zusätzlich schützen Terpenoide auch gegen Pathogene und oxidativen Stress (Holopainen & Gershenzon 2010). Terpene haben vielfältige Wirkungen in pflanzlichen Organismen. Sie können Insekten durch Monoterpene wie Linalool, Citronellol, Campher, Myrcen und α/β -Pinen zur Bestäubung anlocken (Knudsen et al. 1993). Weiterhin spielen sie auch eine wichtige Rolle im Primärmetabolismus. Dort sind Carotinoide und Chlorophyll mit Phytolseitenkette an der Photosynthese beteiligt. Weitere Terpenseitenketten können in Ubichinonen und Plastochinonen gefunden werden. Als Phytosterole sind Terpene zudem am Aufbau der Zellmembran beteiligt. Zur Wachstumsregulation kommen Gibberellane als Phytohormone zum Einsatz (Köllner 2004).

Bislang sind etwa 35000 Terpene bekannt (Laupitz et al. 2004), welche den Hauptbestandteil der pflanzlichen ätherischen Öle bilden. Sie dienen durch ihre toxische oder fraßhemmende Wirkung der direkten chemischen Verteidigung und haben auch indirekte Funktionen, indem sie Entomophagen (Fressfeinde der Herbivoren) anlocken. Ein viel untersuchtes Beispiel des indirekten Schutzes durch Terpene ist die Kulturpflanze Mais. Diese emittiert direkt nach Raupenfraß ein komplexes Gemisch flüchtiger Verbindungen, das von der Schlupfwespe *Cortesia marginiventris* wahrgenommen wird und die Anwesenheit eines Wirtes zur Eiablage signalisiert (Turlings et al. 1990).

Die Pappel gibt nach Fraß z.B. von Raupen des Schwammspinners (*Lymantria dispar*), ein Gemisch an flüchtigen Stoffen ab, die ebenfalls Schlupfwespenarten anlocken können (Danner et al. 2011). Dadurch wird indirekt der Befall mit Fressfeinden vermindert und die Pflanze geschützt.

Das emittierte Stoffgemisch besteht aus Substanzen verschiedener Biosynthesewege wie Nitrilen, C₆-Volatilen, Aldoximen und Terpenen. Durch Herbivorie induzierte Duftstoffgemische enthalten dabei meist ähnliche Hauptkomponenten, sind aber in ihrer Zusammensetzung von der Pflanzenart und den Stressoren abhängig (Holopainen & Gershenzon 2010).

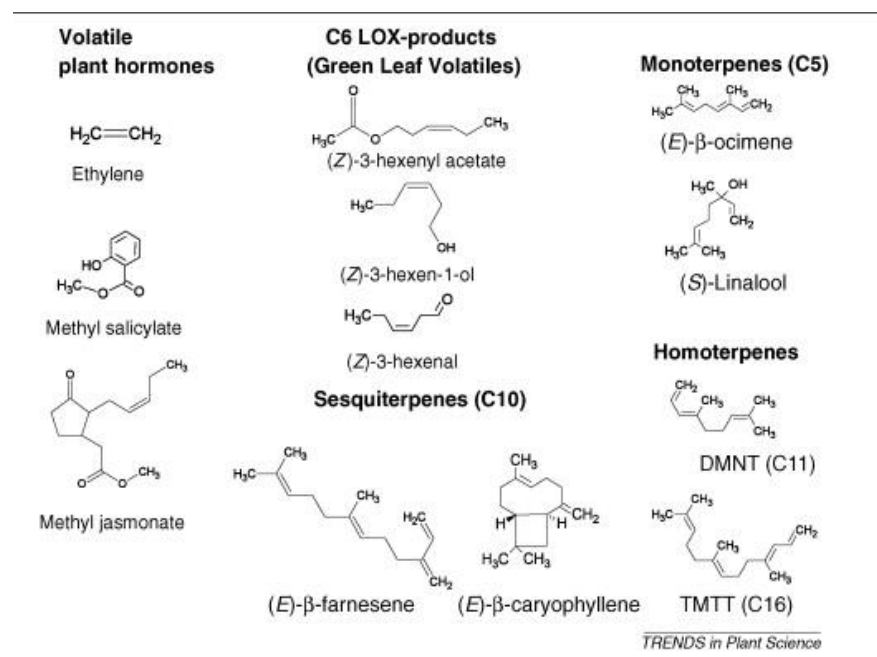


Abb.1.1: Chemische Strukturen einiger wichtiger induzierter Pflanzenduftstoffe nach Herbivorie (nach Holopainen & Gershenzon, 2010).

In *Populus trichocarpa*, der westlichen Balsam-Pappel und weiteren Pappelarten, wird nach Insektenbefall vor allem (*Z*)-3-Hexenylacetat, „green leaf volatiles“ (GLV) und die Sesquiterpene (*E,E*)- α -Farnesen und (*E*)- β -Caryophyllen abgegeben (Arimura et al. 2004; Frost et al. 2007). Einige der Herbivor-induzierten Duftstoffe sind in Abbildung 1.1 dargestellt.

Das C_{16} -Homoterpen (*E,E*)-4,8,12-Trimethyltrideca-1,3,7,11-tetraene (TMTT) wird in vielen Pflanzen wie Baumwolle, Tomate und *Arabidopsis thaliana* nach Befall freigesetzt (Hegde et al. 2012; Ament et al. 2006; Herde 2006) und lässt demnach eine Funktion als Abwehrkomponente vermuten. Zudem konnte TMTT als Bestandteil der indirekten Abwehr in der Lima-Bohne (*Phaseolus lunatus*) bei Spinnmilbenbefall (*Tetranychus urticae*) nachgewiesen werden. Die Emissionsstoffe dienen der Raubmilbe *Phytoseiulus persimilis*, einem Fressfeind der Milbe, als Orientierungshilfe. Die beschädigten Pflanzen geben bei Befall mit Spinnmilben deutlich mehr TMTT als unbeschädigte Pflanzen oder als Pflanzen mit anderem Herbivoren-Befall ab (de Boer et al. 2004).

1.2 Terpen-Biosynthese

Terpene sind eine große und sehr vielfältige organische Stoffklasse, bestehend aus Isopreneinheiten mit 5 Kohlenstoffatomen. Das Isopentenylidiphosphat (IPP) und das Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) sind die Ausgangsstoffe vielfältiger Biosynthesen. Die Einteilung erfolgt aufgrund der Anzahl der C_5 -Einheiten in Hemi- (C_5 , 1 Isopreneinheit), Mono- (C_{10} , 2 Isopreneinheiten), Sesqui- (C_{15} , 3 Isopreneinheiten), Di- (C_{20} , 4 Isopreneinheiten), Tri- (C_{30} , 6 Isopreneinheiten), Tetra- (C_{40} , 8 Isopreneinheiten) und Homoterpene (C_{16}).

Die Vielfalt der Terpene ergibt sich dabei nicht nur aus der unterschiedlichen Anzahl der C_5 -Einheiten, sondern auch durch deren Zyklisierung und andere Derivatisierungen (Habermehl et al. 2008). Die Biosynthesewege für IPP und DMAPP sind der Mevalonat-Weg im endoplasmatischen Retikulum und Cytosol und der 2-C-Methylerythritol-4-phosphat -Weg (MEP) in den Plastiden (McGarvey & Rodney Croteau 1995). Der Mevalonat-Weg ist auch in Archaeen, Pilzen und dem Menschen vorhanden. Es wurde zunächst angenommen, dass dies der einzige Syntheseweg in Pflanzen ist. Der Mevalonat-Weg synthetisiert über sechs Schritte IPP und DMAPP aus Acetyl-CoA und bildet damit den Ausgangspunkt für die Synthese von Sterolen, Brassinosteroiden, Polyprenol (ungesättigte Isoprenoidalkohole), Dolichole, Sesquiterpene und Farnesyl- oder Geranylgeranyl-Gruppen für die Proteinmodifikation.

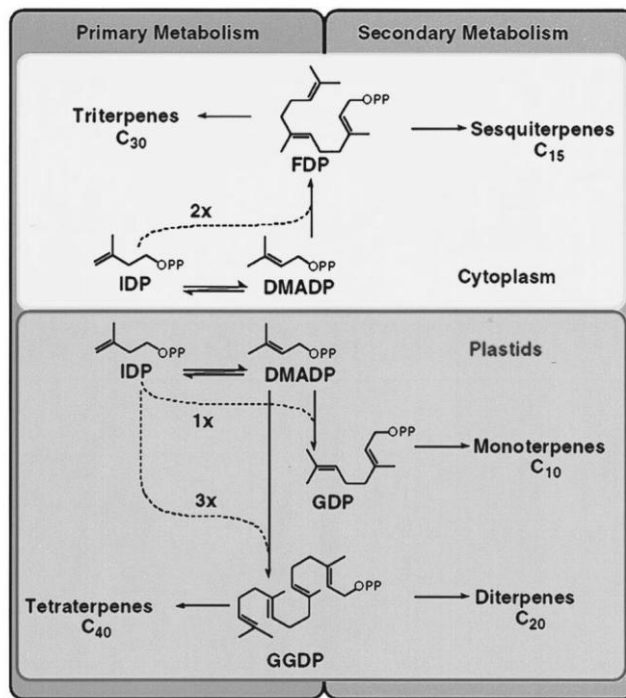


Abb. 1.2: Biosynthese von Terpenen in der Pflanze. (nach Bohlmann et al. 1998)

Bei dem MEP-Weg sind Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-phosphat die Ausgangsstoffe der Biosynthese (McGarvey & Croteau 1995; Adam et al. 2001).

Die drei zentralen Intermediate der Terpenbiosynthese sind Geranyl-diphosphat (GPP), Farnesyl-diphosphat (FPP) und Geranylgeranyl-diphosphat (GGPP), die durch die Anlagerung von IPP-Molekülen an ein DMAPP-Molekül entstehen (Bohlmann et al. 1998). Spezifische Terpensynthasen (TPS) bilden

aus ihnen die Grundgerüste aller Terpene (Abb.1.2). Hemiterpene

entstehen aus DMAPP, Monoterpene werden aus GPP gebildet, Sesquiterpene entstehen aus FPP Einheiten und Diterpene mit 20 Kohlenstoffatomen werden aus GGPP gebildet.

Die Vielfalt der Stoffklasse der Terpene lässt sich auf die große Anzahl von TPS zurückführen. Dazu kommt, dass viele TPS Multiproduktenzyme sind, die mehrere Produkte synthetisieren können (Degenhardt et al. 2009). Die anschließenden Modifikationen, wie Zyklisierung oder teilweise Degradation der Kohlenstoffgerüste, erhöht die strukturelle Komplexität der Terpene entscheidend (Habermehl et al. 2008). Terpensynthasen sind die zentralen Enzyme der Terpenbiosynthese und bestehen meist aus 550-850 Aminosäuren (Molekulargewicht 50-100 kDa) (Schnitzler & Steinbrecher 1999). Hoch konserviert ist ein DDxxD-Motif in der C-terminalen Domäne dieser Enzyme, welches den essentiellen metallischen Cofaktor bindet (z.B. Mg²⁺ oder Mn²⁺) (Degenhardt et al. 2009). Monoterpensynthasen besitzen am N-terminalen Ende ein Signalpeptid, welches für den Transport des Proteins in die Plastiden notwendig ist. Dieses Signalpeptid kann strukturell sehr unterschiedlich sein, zeichnet sich aber meist durch einen hohen Gehalt an Threonin und Serin und wenigen sauren Aminosäuren aus (Bohlmann 1999). Das C₁₆-Homoterpen TMTT wurde in früheren Versuchen als Produkt des Diterpenalkohols (*E,E*)-Geranylinalool angenommen, welcher aus GGPP synthetisiert wird (Boland et al. 1998; Herde et al. 2008; Lee et al. 2010). In *Arabidopsis* konnte die für diesen Schritt zuständige TPS und das kodierende Gen bereits als eine Geranylinalool-Synthase identifiziert werden (Herde et al. 2008).

1.3 Duftstoff-Induktion

Elicitoren sind Substanzen, die als Botenstoffe in Pflanzen Abwehrreaktionen gegen Fressfeinde, Pilze, Bakterien und andere Krankheitserreger auslösen. Es sind ca. 250 Elicitoren bekannt (die meisten in Pilzen), die Pflanzen einen Pathogenbefall signalisieren (Arimura et al. 2011). Die Reaktionen von Pflanzen auf verschiedene Stressoren können hoch spezifisch sein. Mechanische Verletzungen aktivieren andere biochemische Antworten als Schädigungen durch Fraß. Selbst unterschiedliche Insektenarten und die Dauer des Fraßes verändern die Pflanzenreaktion (McCormick et al. 2012).

Alamethicin (Ala) wird von dem Pilz *Trichoderma viride* hergestellt. Es ist ein Peptidantibiotikum, das Ionenkanäle in Membranen bildet (Engelberth et al. 2001). In der Lima Bohne (*Phaseolus lunatus*) und *Arabidopsis thaliana* konnte die TMTT-Synthese bereits erfolgreich mithilfe von Alamethicin induziert werden (Herde et al. 2008). Die Hauptkomponenten der Emission waren Methylsalicylate, (*E,E*)- α -Farnesen und das Homoterpen TMTT. Der durch Ala induzierte Signaltransduktionsweg behindert den Oktadekanoiden-Syntheseweg, sodass die Emission der typischerweise durch Jasmonsäure induzierten Duftstoffe verhindert wird. Dies ist wahrscheinlich auf ein erhöhtes Salicylsäure-Level zurückzuführen (Engelberth 2000). In Rosenkohlpflanzen (*Brassica oleracea* var. *gemmifera*) konnte nach Ala-Behandlung, ein erhöhtes Interesse der parasitoiden Schlupfwespe *Cotesia glomerata* an den Versuchspflanzen festgestellt werden (Bruinsma et al. 2009).

Eines der wichtigsten Phytohormone in der Abwehr gegen Herbivoren ist die Jasmonsäure (JA). Sie wird aus α -Linolensäure über den Oktadekanoid-Syntheseweg synthetisiert. Nach einer Herbivoren-Attacke steigt der Level von JA in der Pflanze stark an und löst die Produktion weiterer Proteine für den Pflanzenschutz aus. Es kommt zur Bildung von Lektinen, Proteaseinhibitoren und toxischen Sekundärmetaboliten. Zudem werden Gene induziert, die für die Schlüsselenzyme der Biosynthesen sekundärer Metabolite kodieren. JA muss allerdings zunächst aktiviert werden indem es mithilfe von JA-Konjugat-Synthasen (JAR) zu einer Bindung mit Aminosäuren kommt. Das Enzym JAR1 zeigt eine hohe Substratspezifität für Isoleucin und Jasmonsäure und scheint eine besonders große Bedeutung für die JA-abhängige Pflanzenverteidigung zu haben (Fonseca et al. 2009; Taiz & Zeiger 2010). Die durch Jasmonsäure induzierten Duftstoffe enthalten „green leaf volatiles“ und Terpenoide (Dicke & Poecke 2002).

Auxin ist das erste Wachstumshormon, das in Pflanzen nachgewiesen werden konnte und viele Studien wurden zu seiner Funktionsweise erstellt. Signale von Auxin spielen in allen Aspekten der Pflanzenentwicklung eine Rolle und Auxin interagiert häufig mit weiteren Phytohormonen. Es fördert das Streckungswachstum, die Adventiv- und Seitenwurzelbildung, die apikale Dominanz und die kambialer Zellteilungsaktivität. Zudem werden photo- sowie gravitrope Bewegungen, die Fruchtentwicklung und Seneszenz koordiniert. Das natürliche Hauptauxin ist Indol-3-Essigsäure (IAA) und kommt in geringen Mengen (1-100 µg/kg Pflanzenmaterial) in allen höheren Pflanzen vor (Taiz & Zeiger 2010). Die Signaltransduktion von Auxin ist bereits gut untersucht (Delker et al. 2008). Auxin ist in die Abwehr von Pflanzenkrankheiten involviert. In Tomaten wurden hohe Level des Hormons gefunden, wenn ein Befall mit *Pseudomonas solanaceraumand* vorhanden war (Kazan & Manners 2009). Werden Goldruten (*Solidago altissima*) von Pflanzengalle-fressenden Insekten, wie den Raupen von *Gnorimoschema gallaesolidaginis* angefressen, steigt das Level der Indol-3-Essigsäure stark an. Zudem veränderte sich die Verteilung des Phytohormons in der Pflanze (Tooker & Moraes 2011). Im Gegensatz dazu sank der IAA-Pegel in wildem Tabak (*Nicotiana attenuata*) nach herbivorer Stimulation (Onkokesung et al. 2010). Es konnte nachgewiesen werden, dass sich Jasmonsäure und Auxin auch in Aspekten der Herbivor-induzierten Pflanzenprotektion stark gegenseitig beeinflussen (Erb et al. 2012).

1.4 Die Pappel als Versuchsorganismus

Die westliche Balsam-Pappel *Populus trichocarpa* gehört zu der Gattung der Pappel und damit zu der Familie der Weidengewächse (Salicaceae). Pappeln haben eine große ökologische Bedeutung und sind zudem zunehmend für die Wirtschaft interessant. Die Bäume werden zur Holz- und Papiergewinnung, als Energielieferanten und als natürlicher Wind- und Erosionsschutz genutzt (Wang et al. 2012). Ihr schnelles Wachstum, ihre Anspruchslosigkeit hinsichtlich des Nährstoffangebotes und ihre einfache Vermehrung sind Eigenschaften, die sie für diese Nutzung prädestinieren. Als Pionierpflanzen finden sie zudem Anwendung in der Rekultivierung und Bodensanierung von industriell genutztem Gelände (Minogue et al. 2012).

Die Pappel ist für die biotechnische und biochemische Forschung von großer Bedeutung und eine Vielzahl an Studien, im Besonderen zu gentechnischen Veränderungen, werden an ihr durchgeführt (Marchadier & Sigaud 2005). Die genetische Diversität der Art, die einfache Hybrid-Erzeugung, die gleichbleibende Anzahl an Chromosomen ($2n=38$), sowie die schnelle und einfache Vermehrung machen die Pappel zu einem beliebten Modellorganismus (Settler et al. 1996; OECD 2001; Jansson & Douglas 2007).

Populus trichocarpa war der erste Baum mit vollständig sequenziertem Genom, welches mit ca. 480 Millionen Basenpaaren für einen Baum relativ klein ist (Tuskan et al. 2006). Zudem sind „expressed sequence tags“ und Genexpressionsmuster nach Herbivorie bekannt (Danner et al. 2011; Ralph et al. 2006). Dies ermöglicht es das Wissen um den Sekundärmetabolismus der Pappel zu erweitern. Genfamilien können identifiziert und die molekulare Regulation der Terpenexpression untersucht werden. Im Genom der Pappel sind viele putative Terpensynthasen bereits lokalisiert (Cheng et al. 2007) und einige bestätigt worden (Martin & Bohlmann 2004; Danner et al. 2011).

Insektenschädlinge können eine Gefahr für (Nutz-) Wälder darstellen und die Larven mehrerer Herbivoren können Schäden in Pappelpopulationen verursachen. Dazu gehören unter anderem *Malacosoma disstria* (Rinnkeltner), *Lymantria dispar* (Schwammkeltner), *Phyllonorycter tremuloidiella* (Miniermotte) und *Choristoneura conflictana* (Wickler) (Ralph et al. 2006). Um neues Wissen über die Abwehr der Pappel gegenüber Herbivoren, zu erhalten ist die Identifikation weiterer Komponenten des Schutzmechanismus' und somit weiterer TPS nötig.

1.5 Zielsetzung

TMTT ist ein wichtiges Terpen für Interaktionen von Pflanzen mit der Umwelt und für die indirekte Abwehr (Herde et al. 2008; de Boer et al. 2004). In *A. thaliana* ist es bereits gelungen, die für die Herbivor-induzierte TMTT-Synthese verantwortliche Terpensynthase zu identifizieren (Herde et al. 2008). In der folgenden Arbeit soll versucht werden, die putative Geranylinalool-Synthase (*PtTPS10*) der Pappel zu klonieren, zu exprimieren und deren Funktionalität zu ermitteln. Welche Elicitoren die Induktion der TMTT-Emission im Pappelblatt hervorrufen können ist bisher ungeklärt. Durch den Einsatz von Alamethicin, Auxin und Jasmonsäure sollte ein möglicher Auslöser gefunden werden.

2. Material und Geräte

2.1 Geräte

| Geräte | Modell | Hersteller |
|-----------------------------------|--|-------------------------------|
| GC-MS | 6890 Series/ 5973 Series | Agilent Technologies |
| Geldokumentationsstation | GeneGenius Bio Imagine System | Syngene |
| Gelelektrophoresekammern | Mupid ^R –One/ i-Mupid | Advance |
| Inkubationsschrank | Heraeus B6120 Incubator | Kendro Laboratory Products |
| PCR-Maschinen | Primus 25/ Primus 96 ^{plus} | MWG-Biotech AG |
| Pipetten | Pipetman | Gilson |
| Pipettierhelfer | Micro Pipettierhelfer | BRAND GmbH |
| Photometer | Spectronic ^R 20 Genesys TM | Spectronic Industries |
| RNA-/DNA-Konzentrationsbestimmung | NanoDrop 2000C | PEQLAB Biotechnologie GmbH |
| Schüttelapparat | Typ 3011 | GFL ^R |
| Sequenzanalysegerät | ABI PRISM Gene Sequenzer 3100 | Applied Biosystems |
| Shaker 37°C | Ceromat ^R BS-1 | B.Braun Biotech International |
| Sterile Arbeitsbank | Hera safe | Kendro Laboratory Products |
| Sterilisierungsofen 200°C | Heraeus | Kendro Laboratory Products |
| SuperQ Fallen | 30 mg | ARS Inc. |
| Tischzentrifugen | PicoFuge TM / Centrifuge 5415R | Stratagene/ Eppendorf |
| Vortexer | Vortex Genie2 | Scientific Industries |
| Wasseraufbereitungssystem | Milli-Q synthesis | Merck |
| Wasserbad | Typ 1002 | GFL ^R |

2.2 Chemikalien

Soweit nicht anders vermerkt, wurden alle Chemikalien, Lösungsmittel, Medien und Antibiotika von Roth (Karlsruhe, Deutschland), Sigma-Aldrich (Seelze, Deutschland) und Bio-Rad (München, Deutschland) bezogen.

2.3 Primer

Alle aufgeführten Primer wurden von Sigma-Aldrich bezogen.

| Name | Sequenz (5'→3') | T _m [°C] | Verwendung |
|------------|-------------------------------|---------------------|----------------------------|
| PtTPS10-5 | CACCATGGTTCCGGATATGTCCGAACC | 76,8 | PCR, fwd. Primer |
| PtTPS10-8 | TCACATGAAACAGAATTTTAACTTCGGTG | 68,9 | PCR, rev. Primer |
| PtTPS10-7 | CACCATGGCACAAATTAATGGTCTGGAG | 73,5 | Sequenzierung, fwd. Primer |
| PtTPS10-9 | GGATGAAGAGCTATTAAGCTTTG | 65,8 | Sequenzierung, fwd. Primer |
| PtTPS10-10 | ATGCCAGTCTCAAGATACTCTTC | 66,2 | Sequenzierung, rev. Primer |

2.4 Organismen

2.4.1 Pflanzenmaterial

Verwendet wurden Proben von *Populus trichocarpa* (Klon 625) aus Experimenten von Danner und Mitarbeitern (2011).

2.4.2 Bakterien

Zur Klonierung wurden folgende *Escherichia coli* Stämme verwendet.

| Stamm | Genotyp |
|--|--|
| <i>E. coli</i> (TOP10, Invitrogen) | F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(araleu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG |
| <i>E. coli</i> (BL21 Star, Invitrogen) | F- ompT hsdSB (rB-mB-) gal dcm rne131 (DE3) |

3. Methoden

3.1 Anzucht und Kultivierung von Organismen

3.1.2 Pflanzenmaterial

Die bereitgestellte RNA wurde aus den Blättern von *P. trichocarpa* (Klon 625) gewonnen. Die Bäume wurden unter Sommerbedingungen im Gewächshaus bis zu einer Höhe von 1 m gezogen (24°C, 60% Luftfeuchtigkeit und 16 h/ 8 h Belichtungsrythmus).

Genauere Angabe zu den Wachstumsbedingungen, RNA-Extraktion und Induktion der Terpenbildung durch Herbivorie (*Lymantria dispar*) in „Four terpene synthases produce major compounds of the gypsy moth feeding-induced volatile blend of *Populus trichocarpa*“ (Danner et al. 2011).

3.1.3 Bakterien

E. coli wurde bei 37°C über Nacht auf LB-Festmedium inkubiert. Das Medium enthielt Kanamycin in einer Konzentration von 100 µg ml⁻¹, wodurch das Wachstum von resistenten Bakterien unter Selektionsdruck gewährleistet werden konnte. Flüssigkulturen wurden im Schüttler bei 250 rpm inkubiert (18°C oder 37°C).

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 cDNA Synthese

Die verwendete RNA (100 ng µl⁻¹) war bereits in vorangegangenen Experimenten der Arbeitsgruppe von Dr. Tobias Köllner extrahiert und bei -80°C gelagert worden (Danner et al. 2011). Um einen DNA-Einzelstrang zu erhalten, wurde eine Reverse Transkriptionsreaktion mit 1 µg RNA angesetzt. Dabei wurde wie folgt vorgegangen:

1. Schritt

| Komponente | Volumen |
|---------------------------|---------|
| RNA | 4 µl |
| Oligo-dt ₁₂₋₁₈ | 1 µl |
| dNTPs | 1 µl |
| dest. Wasser | 7 µl |

Der Ansatz wurde anschließend 5 min im Thermocycler bei 65°C inkubiert und mit folgenden Komponenten versetzt:

2. Schritt

| Komponente | Volumen |
|------------------------|---------|
| 5x first strand Puffer | 4 µl |
| DTT (0,1M) | 1 µl |
| RNAse Out | 1 µl |
| SuperScript III RT | 1 µl |

Die Reaktion erfolgte für 5 min bei 25°C, 60 min bei 50°C und anschließend 15 min bei 70°C im Thermocycler.

3.2.2 Polymerase Kettenreaktion

Bei der Durchführungen der PCR wurde der folgende 50 µl Reaktionsansatz verwendet:

| Komponente | Volumen |
|------------------------|---------|
| Puffer | 10 µl |
| dNTPs | 1 µl |
| forward Primer | 2,5 µl |
| reverse Primer | 2,5 µl |
| cDNA | 1 µl |
| Phusion® High-Fidelity | |
| DNA Polymerase | 0,5 µl |
| dest. Wasser | 32,5 µl |

Die Reagenzien wurden durchmischt und im Thermocycler inkubiert. Dabei wurde das aufgelistete Grundprogramm in verschiedenen Variationen genutzt.

| | Zeit [s] | Temperatur [°C] | |
|---------------|----------|-----------------|-------|
| Denaturierung | 30 | 98 | |
| Denaturierung | 10 | 98 | } 35x |
| Annealing | 30 | 55 | |
| Amplifikation | 45 | 72 | |
| Extension | 300 | 72 | |

Die Höhe der Annealing-Temperatur wurde in Abhängigkeit von der Länge und der Sequenz des Primers modifiziert. Die Temperatur der Amplifikation wurde von der verwendeten Polymerase bestimmt. Die Amplifikationszeit wurde zudem aufgrund der Länge des zu untersuchenden Gens auf 75 s verlängert.

3.3.3 DNA-Extraktion

Zur Kontrolle der erfolgreichen Amplifikation der Fragmente wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt und eine klare Bande auf der erwarteten Höhe (ca. 2500 bp) erhalten. Der restliche Reaktionsansatz wurde ebenfalls per Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und ohne längere UV-Belichtung eine Gel-Extraktion durchgeführt. Dazu wurde das QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) verwendet. Das ausgeschnittene Agarosestück wurde gewogen und in 3 Volumina QG-Puffer in 10 min bei 50°C aufgelöst. Nachdem das DNA-Fragment an die Silikalgel-Membran gebunden hatte, wurde mit vorgewärmten EB-Puffer (70°C) eluiert.

3.3.4 TOPO Klonierung

Die heterologe Expression in *E. coli* wurde mit dem Champion pET Directional TOPO Expression Kit (Vektor pET102/D-TOPO) durchgeführt (Invitrogen). Für die erfolgreiche Klonierung von *PtTPS10* wurden verschiedene Ansätze getestet und schließlich mit folgendem Reaktionsansatz ein befriedigendes Ergebnis erzielt:

| Komponente | Volumen |
|-------------|---------|
| PCR-Produkt | 4 µl |
| Salzlösung | 1 µl |
| Vektor | 1 µl |

Die Reaktion wurde für 2,5 h bei Raumtemperatur belassen. Danach fand sofort die Transformation bzw. das Einlagern bei -20°C statt.

3.3.5 Transformation

Die Transformation von *E. coli* wurde durch die Hitzeschockmethode erreicht. 50 µl kompetente OneShot TOP 10 Zellen wurden langsam auf Eis aufgetaut, mit 1 µl des TOPO Cloning Ansatzes versetzt und weitere 20 min auf Eis inkubiert. Den darauf folgenden Hitzeschock erreichte man durch das Eintauchen des Reaktionsansatzes in ein 42°C heißes Wasserbad für 45 s. Nach einminütiger Abkühlung auf Eis wurden 125 µl SOC-Medium (Invitrogen) zugegeben und 45 min bei 37°C geschüttelt.

Nach dem Auftragen mit Glaskugeln auf selektive Kanamycin-LB-Platten, folgte die Inkubation (37°C) über Nacht. Positive *E. coli*-Klone wurden per Kolonie-PCR mit folgendem Ansatz ausgewählt.

| Komponente | Volumen |
|---------------------------------|-----------|
| 5X Green GoTaq® Reaktionspuffer | 5 µl |
| dNTPs | 0,5 µl |
| fwd. Primer | 0,5 µl |
| rev. Primer | 0,5 µl |
| Go-Taq® Polymerase | 0,125 µl |
| dest. H ₂ O | 18,375 µl |

Mit sterilen Zahnstochern wurde eine *E. coli*-Kolonie auf der Platte angestochen und in das PCR-Gefäß übertragen. Für die Reaktion im Thermocycler wurden die Primer der PCR verwendet.

| | Zeit | Temperatur [°C] | |
|---------------|--------|-----------------|-------|
| Denaturierung | 10 min | 94 | |
| Denaturierung | 30 s | 94 | } 35x |
| Annealing | 30 s | 55 | |
| Amplifikation | 1,5 h | 72 | |
| Extension | 10 min | 72 | |

3.2 Plasmidpräparation

Mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kits (Qiagen) wurde die Isolierung der Plasmid-DNA aus Bakterienzellen erreicht. Dabei wurde das Prinzip der alkalischen Lyse modifiziert nach Birnboim & Doly (1979) genutzt.

Nach dem Animpfen von 4 ml LB-Kanamycin-Medium mit einem Bakterienklon, wurden die Kulturen über Nacht bei 37°C und 180 rpm geschüttelt, zentrifugiert (3800*g, 15 min, 4°C) und das Pellet in 250 µl Puffer 1 resuspendiert. Phospholipide und Proteinkomponenten der Zellwand wurden durch 250 µl Puffer 2 (mit SDS) gelöst und die DNA/Proteine durch NaOH denaturiert. Anschließend wurde die Probe mit 350 µl N3-Puffer neutralisiert und kleine Plasmidmoleküle renaturiert. Durch die folgende Zentrifugation (13000*g, 10 min, 4°C) wurden Proteine und nicht-renaturierte DNA von den anderen Bestandteilen abgetrennt und der plasmidhaltige Überstand auf eine Silicagelsäule aufgetragen. Diese wurde mit 500 µl PB- und 750 µl PE-Puffer gewaschen und anschließend mit 50 µl EB-Puffer eluiert.

3.3 Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der erhaltenen DNA-Konzentrationen erfolgte mit Hilfe eines NanoDrop-Gerätes. Dabei handelt es sich um eine photometrische Messmethode, basierend auf dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren bei 260 nm. Durch die Berechnung des Quotienten OD_{260}/OD_{280} kann eine Aussage über die Reinheit einer Lösung gemacht werden. Bei reinen DNA-Lösungen liegt dieser Quotient zwischen 1,8 und 2 (Wilfinger et al. 1997).

3.4 DNA-Sequenzierung

Zur Sequenzbestimmung der klonierten Fragmente wurde das BigDye™-Kit (Perkin-Elmer) genutzt. Dabei erfolgt die Ermittlung der Sequenz nach Sanger per fluoreszenzmakierter Didesoxymethode.

| Komponente | Volumen |
|------------------------|---------|
| BigDye™-Mix | 2 µl |
| BD-Puffer | 2 µl |
| Plasmid (20-100ng/ µl) | x µl |
| Primer | 1 µl |
| dest.Wasser | 5-x µl |

Im Thermocycler wurde folgendes Programm ausgeführt:

| | Zeit [s] | Temperatur [°C] | |
|---------------|----------|-----------------|-------|
| Denaturierung | 300 | 96 | |
| Denaturierung | 10 | 96 | } 35x |
| Annealing | 20 | variabel | |
| Amplifikation | 240 | 60 | |

Der Reaktionsansatz wurde von nicht eingebauten Nukleotiden gereinigt und auf eine Sequenziermaschine aufgetragen. Die Analyse folgte mit dem Programm SeqMan Pro 8.02 von DNASTar™ (Lasergene® 1988-2008), Sequenzvergleiche wurden mit BioEdit Version 7.0.9 (Bioedit Sequence Alignment Editor 1997–2007; T.A. Hall Software, Raleigh, NC, USA) durchgeführt.

3.5 Gel Nachweise

Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte über eine Agarose-Gelelektrophorese. Dabei wurde zunächst Agarose in 0,5x TAE-Puffer erwärmt und gelöst. Ethidiumbromid wurde in einer Endkonzentration von 1 ng ml^{-1} zugegeben. Es interkaliert mit den Basen der DNA und ermöglicht auf diese Art und Weise das Sichtbarmachen der Nukleisäurebanden unter UV-Licht. Die zu untersuchenden Proben wurden vor dem Auftragen mit Ladepuffer versetzt und anhand eines 1kb-Markers verglichen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 100 V über einem Zeitraum von 0,5-1,5 Stunden. Der Bandenverlauf wurde mit dem UV Transilluminator (302 nm) sichtbar gemacht und mithilfe der Geldokumentationsanlage dokumentiert.

10x TAE-Puffer

| Komponente | Konzentration |
|----------------------------|---------------|
| TRIS | 0,4 M |
| EDTA-Na ₂ -Salz | 0,01 M |
| Essigsäure | 0,2 M |

Ladepuffer

| Komponente | Konzentration |
|----------------|---------------|
| Glycerin | 50% [v/v] |
| Bromphenolblau | 0,05% [g] |
| EDTA | 100 mM |

Um Proteinlösungen aufzutrennen wurden SDS-Polyacrylamidgelelektrophoresen (SDS-PAGE) durchgeführt. Die zu untersuchenden Proben wurden in Puffer aufgenommen und anschließend bei 95°C für 5 min denaturiert. Unter einer konstanten Spannung von 70 V wurden die Proben im Sammelgel konzentriert und bei 150 V im Trenngel aufgetrennt. Als Marker diente der BenchMark™ Pre-stained Proteinmarker von Invitrogen und der Ladepuffer war ein 1x SDS-Puffer. Im nächsten Schritt wurden die Proteine mit Coomassie-Blau unter Schütteln eingefärbt und im Folgenden über mehrere Stunden entfärbt.

2x Probenpuffer

| Komponente | Konzentration |
|-------------------|---------------|
| Tris-HCl pH 6,0 | 100 mM |
| SDS | 4% [g/v] |
| 2-Mercaptoethanol | 10% |
| Glycerol | 20% [v/v] |
| Bromphenolblau | 0,1% [g/v] |

Sammelgel 4%

| Komponente | Konzentration |
|------------------------|---------------|
| Tris-HCl pH 6,8 | 125 mM |
| Acrylamid/Bisacrylamid | 4% (29:1) |
| SDS | 0,1% [g/v] |
| APS | 0,075% [g/v] |
| TEMED | 0,05% [v/v] |

Trenngel 12%

| Komponente | Konzentration |
|------------------------|---------------|
| Tris-HCl pH 8,8 | 375 mM |
| Acrylamid/Bisacrylamid | 12% (29:1) |
| SDS | 0,1% [g/v] |
| APS | 0,075% [g/v] |
| TEMED | 0,05% [v/v] |

10x SDS-Puffer

| Komponente | Konzentration |
|------------|---------------|
| Tris | 200 mM |
| Glycin | 1,9 M |
| SDS | 10% [g/v] |

Coomassie-Färbelösung

| Komponente | Konzentration |
|------------|---------------|
| Methanol | 45% [v/v] |
| Essigsäure | 7% [v/v] |

3.6 Expression und Proteinreinigung

Die gewünschten PCR-Produkte im pET-102D Vektor wurden in *E. coli* BL21 Star-Zellen transformiert und auf Kanamycin-haltige LB-Platten aufgetragen. Die gewachsenen Kulturen wurden zum Animpfen von 20 ml flüssigem LB-Kanamycin-Medium als Vorkulturen genutzt. Diese wurden bei 18°C und 250 rpm über das Wochenende (ca. 72 h) inkubiert. Sobald ein ausreichendes Wachstum der Zellen per OD-Messung ermittelt werden konnte, wurde eine Hauptkultur von 100 ml angelegt und bei 20°C inkubiert. Die Messung der optischen Dichte erfolgte mit dem Photometer Spectronic^R 20 GenesysTM von Spectronic Industries. Als eine optische Dichte (OD₆₀₀) von 0,6-0,7 erreicht wurde, folgte die Induktion der Expression. Dazu wurden der Hauptkultur 100 µl IPTG [2 mM] beigemischt und über Nacht im 18°C-Schüttler inkubiert. Im Folgenden wurde eine Proteinreinigung bei 4°C durchgeführt. Zunächst erfolgte die Zentrifugation der Zellen bei 5000 xg für 10 min. Das erhaltene Pellet wurde mit 3 ml Lysepuffer versetzt und die Zellen mittels Sonikator (3 Zyklen à 30 s bei 65% Leistung) aufgeschlossen. Es folgt eine weitere Zentrifugation bei 16000 rpm für 20 min.

Für die folgende His-Tag-Aufreinigung wurde 1 ml entnommen, während der Rest der Lösung auf Entsalzungssäulen geladen wurde. Eluiert wurde mit 4 ml TPS-Assaypuffer und das gereinigte Protein wurde bei -20°C gelagert.

TPS-Assaypuffer

| Komponente | Konzentration |
|-----------------|---------------|
| Tris-HCl pH 7,5 | 10 mM |
| DTT | 1 mM |
| Glycerol | 10% [v/v] |

Zur Abtrennung der heterolog mit His-Tag exprimierten Proteine wurden Ni-NTA Spinsäulchen (Qiagen) bei 4°C mit 600 µl Lysepuffer equilibriert (2 min, 900 xg), 600 µl Proteinlösung aufgetragen (5 min, 300 xg), zweifach mit 600 µl Waschpuffer gespült (2 min, 900 xg) und zweifach mit 200 µl Elutionspuffer eluiert.

Lysepuffer

| Komponente | Konzentration |
|---------------|---------------|
| Tris-HCl pH 8 | 50 mM |
| NaCl | 500 mM |
| Imadizol pH 8 | 20 mM |
| Tween20 | 1% [v/v] |
| Glycerol | 10% [v/v] |

Waschpuffer

| Komponente | Konzentration |
|---------------|---------------|
| Tris-HCl pH 8 | 50 mM |
| NaCl | 500 mM |
| Imadizol pH 8 | 20 mM |
| Glycerol | 10% [v/v] |

Elutionspuffer

| Komponente | Konzentration |
|---------------|---------------|
| Tris-HCl pH 8 | 50 mM |
| NaCl | 500 mM |
| Imadizol pH 8 | 250 mM |
| Glycerol | 10% [v/v] |

3.7 Proteinassay

Zur Aktivitätsbestimmung der in *E. coli* exprimierten Terpensynthase PtTPS10 wurden folgende Ansätze (V= 100 µl) in Glasgefäßen hergestellt:

| Ansatz 1 | Ansatz 2 | Kontrolle |
|------------------------|------------------------|------------------------|
| 40 µl Proteinlösung | 40 µl Proteinlösung | Kontrolle: |
| 2 mM MgCl ₂ | 2 mM MgCl ₂ | 20 µl HCl |
| 4 µl GGPP (1mg/ml) | 8 µl FPP (1 mg/ml) | 5 µl GGPP (1 mg/ml) |
| 54 µl Assaypuffer | 50 µl Assaypuffer | 75 µl H ₂ O |

Die Lösungen wurden mit einer Hexan-Schicht (100 µl) überdeckt und 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach mehrminütigen Vortexen wurden die Gefäße in flüssigen Stickstoff eingetaucht, leicht aufgetaut, die organische Phase abgenommen und mittels GC analysiert (3.10).

3.8 Pflanzenbehandlung

Jeweils fünf Blätter der Pappel *P. trichocarpa* Klon 625 wurden von mehreren ca. 150 Tage alten Individuen entfernt. Die mittelgroßen Blätter wurden mit dem frisch abgeschnittenen Stiel in Lösungen mit Alamethicin (Ala), Auxin (IAA) und Jasmonsäure (JA) gestellt. Dabei waren die Blätter nur zu einem Drittel in die Lösung eingetaucht um die Respiration und Emission an der restlichen Blattoberfläche nicht zu behindern. Als Kontrolle diente ein Ansatz mit reinem Wasser. Lösungen mit Ala bestanden aus 15,2 mg/ml ($\approx 50 \mu\text{M}$) und 0,1% Ethanol. Bei der Herstellung der Auxin- ($57 \mu\text{M}$) und der JA-Behandlung ($200 \mu\text{M}$) wurden 100 mg/ml und 0,1% Ethanol verwendet. Mit diesem Versuch sollte untersucht werden, ob die Zugabe von Auxin, Jasmonsäure und Alamethicin Auswirkungen auf die Zusammensetzung und Menge, der abgegebenen Duftstoffe hat.

3.9 Duftstoffsammlung

Die Duftstoffsammlung der abgetrennten Blätter von *P. trichocarpa* erfolgte im Exsikkator mit Hilfe der „Closed-Loop-Stripping“-Methode über mehrere Stunden (Lorbeer, Mayr, Hausmann, & Kratzl, 1984; Tholl, Boland, & Hansel, 2006). Je 1-2 g Blattmaterial der 150 Tage alten Pflanzen



Abbildung 3.2: Exsikkatorensystem

wurden zunächst über Nacht für 16 h in Falcontubes mit Wasser und Induktor gestellt (siehe Kapitel 3.9). Dabei wurden pro Behandlung fünf Blätter vermessen. Das Falcontube wurde dann im gläsernen Exsikkator platziert. Bei diesen Exsikkatoren handelte es sich um Glasbehälter mit 3 l Fassungsvermögen, die mit einem Glasdeckel und speziellen Teflonstopfen luftdicht verschlossen waren. Die Schläuche des genutzten Druckluftverteilers wurden mit den Stopfen verbunden und ermöglichten so einen kontinuierlichen Luftdurchfluss ($0,2 \text{ ml/l}$). Die Luft wurde dabei passiv durch einen weiteren Stopfen gedrückt, der eine Duftfalle mit Filtermaterial (30 mg Super Q) enthielt.

Alle flüchtigen Substanzen wurden von der Aktivkohle über einen Zeitraum von 5h absorbiert. Während dieses Zeitraumes befanden sich die Exsikkatoren mit Blattmaterial in einer Klimakammer mit $1 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ photosynthetisch aktiver Strahlung, einer Temperatur von 24°C und 60%iger relativer Luftfeuchtigkeit.

Die Fallen wurden zur Probengewinnung mit 0,2 ml Dichlormethan gespült welches als internen Standard Nonylacetat (~ 10 ng/ μ l) enthielt. Die erhaltenen Proben konnten dann ohne weitere Behandlung einer gaschromatographischen Analyse unterworfen werden.

3.10 Analyse mittels Gaschromatographie (GC) mit Massenspektrometrie (MS) und Flammenionisationsdetektion (FID)

Die Kopplung eines Gaschromatographen (GC) an ein Massenspektrometer (MS) ermöglicht die Trennung gasförmiger Stoffgemische in ihre Reinstoffe und deren Identifikation. GC-MS beschreibt eine Möglichkeit zur Analyse der während des „Closed-Loop-Strippings“ emittierten und mittels Elution herausgelösten Duftstoffe.

In dem Gaschromatographen der Firma Agilent Technologies wurden die Proben zu Beginn im Autosampler platziert und anschließend einzeln per „Splittless“- Injektion (bei 220°C) auf eine Chrompack CP-SIL-5 CB-MS Säule ((5%-phenyl)-methylpolysiloxa, 25 m x 0,25 mm i.d. x 0,25 μ m Filmdicke; Varian) gegeben. Die Flüssigkeit der Probe verdampfte und wurde mittels Trägergas (Helium, 1 ml/min) in die Trennsäule des GC –Ofens befördert. Die Ausgangstemperatur der Säule lag bei 40 °C (3 min konstant) und wurde um 5°C pro Minute, schrittweise auf 240°C (3 min konstant) erhöht. Das gekoppelte Massenspektrometer wurde mit folgenden Einstellungen betrieben: Transferlinien-Temperatur: 230°C, Quelle: 230°C, Quadrupol-Temperatur: 150°C, Ionisationspotential: 70 eV.

Als Chromatographie-Säulen wurde eine DB-WAX-Säule (Polyethylenglycerol, 30 m x 0,25 mm (Innendurchmesser) x 0,25 μ m (Filmdicke),) und eine DB5-MS-Säule (30 m x 0,25 mm (Innendurchmesser) x 0,25 μ m (Filmdicke)) von Agilent genutzt. Zur Bestimmung der quantitativen Mengen der Substanzen wurde ein GC-Gerät mit gekoppeltem Flammenionisationsdetektor (FID) verwendet. Dabei quantifiziert das FID bei einer Detektortemperatur von 250°C, während die GC mit denselben Einstellungen und dem Trägergas Wasserstoff (2 ml/min) betrieben wurde.

Für die Identifizierung der Duftstoffe wurden die Datenauswertungsprogramme „MSD ChemStation Build 75(1989-2003)“ (MS-Daten) und „HP ChemStation for LC 3D (1990-2000)“ (FID-Daten) der Reihe „Enhanced ChemStation“ von Agilent Technologies verwendet. Um die Daten in Microsoft Office weiter bearbeiten zu können wurde das Haus-interne DataTrans Programm genutzt. Die Retentionszeiten der erhaltenen Daten wurden mit den Zeiten bereits identifizierten Substanzen verglichen.

Der Abgleich des Massenspektrogramms mit den Referenzspektren der *Whiley* Bibliothek ermöglichte die Identifikation der emittierten Stoffe. Dabei entsprachen, die aus der FID erhaltenen Flächeneinheiten der Peaks, der Quantität des untersuchten Stoffes.

3.11 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm SigmaPlot 12.0 und Microsoft Excel. Es wurden Mittelwerte, Standardfehler der Mittelwerte und Signifikanz (p) der bestimmt. Der p -Wert wurde mithilfe des t -Tests errechnet, solange Varianzgleichheit und Normalverteilung gegeben war. War dies nicht der Fall (Shapiro-Wilk $P < 0,05$), wurde der Kruskal-Wallis- Test für eine One Way Anova on Ranks verwendet. In einigen Fällen wurden die Daten logarithmiert um eine Normalverteilung zu erhalten. Lag das Signifikanzniveau (α) unter 5% ($p < 0,05$), wurde der Unterschied als signifikant angenommen. Die signifikanten Unterschiede innerhalb einer Behandlung wurden mit dem Tukey-Test ermittelt und als F- oder H-Wert angegeben.

4. Ergebnisse

4.1 Identifikation und Klonierung des Terpensynthesengens *PtTPS10*

Um die molekularen Hintergründe für Pflanzen-Insekten Interaktionen mittels flüchtiger Verbindungen in der Pappel besser verstehen zu können, sollte das Gen für die Bildung von 4,8,12-Trimethyltrideca-1,3,7,11-Tetraen (TMTT) identifiziert werden. TMTT ist ein Terpen, das durch den Fraß an Blättern in vielen Pflanzen erhöht produziert wird. Aus der Literatur ist bekannt, dass in *Arabidopsis thaliana* nach Herbivorie eine Induktion der Emission von TMTT stattfindet (R. M. Van Poecke et al. 2001). Danner und Mitarbeiter (2011) konnten bereits Gene der Pappel bestimmen, die nach Herbivorie höhere Transkriptionslevels aufwiesen.

Zur Identifizierung des Terpensynthesengens in *Populus trichocarpa* (Klon 625) konnte auf einen Sequenzvergleich der Geranylinalool-Synthase aus *A. thaliana* mit potentiellen Kandidatengenen der Pappel zurückgegriffen werden. Dadurch konnte ein mögliches Geranylinalool-Synthasegen *PtTPS10* (4734 Nukleotide) ermittelt werden (Herde et al. 2008). Um die Funktion des Gens zu bestätigen wurde cDNA aus Herbivor-induzierten Proben gewonnen (siehe 3.2.1). Der komplette „open reading frame“ (ORF) wurde mithilfe einer PCR amplifiziert und mittels Agarosegel überprüft. Es folgte die Extraktion aus dem Gel und die Klonierung in *E. coli* mit Vektor pET102/D-TOPO. Die Transformation erfolgte in OneShot TOP 10 Zellen, welche auf Kanamycin-LB-Platten inkubiert wurden. Zur Selektion positiver Transformanten wurde eine Kolonie-PCR angewendet. Positive Klone wurden dann zur Plasmidpräparation im Flüssig-Medium inkubiert, bevor das aufgereinigte Plasmid zur Sequenzierung genutzt wurde (siehe 3.5).

Das sequenzierte Gen war 2502 Nukleotide lang und hatte ein ungefähres Molekulargewicht von 83 kDa. Dies liegt im Bereich der Molekulargewichte anderer pflanzlicher Diterpensynthesen. Die Aminosäuresequenz der Terpensynthase zeigte zwei verschiedene allelische Ausprägungen (*PtTPS10-1* und *PtTPS10-2*). Dabei entsprach eine Sequenz der Datenbanksequenz, während es in der Anderen zu zwei Basenabweichungen kam (siehe Anhang), die eine Aminosäurenveränderung an Position 647 bedeutete (Abb. 4.1). Zudem wurden für Terpensynthesen typische, hoch konservierte Sequenzmotive gefunden. Die Aspartat-reiche „DDxxD“-Region und das „NDxxSxxxE“-Motiv sind in die Bindung von Cofaktoren involviert und können beispielsweise Magnesium-Bindestelle kennzeichnen (Green et al. 2009).

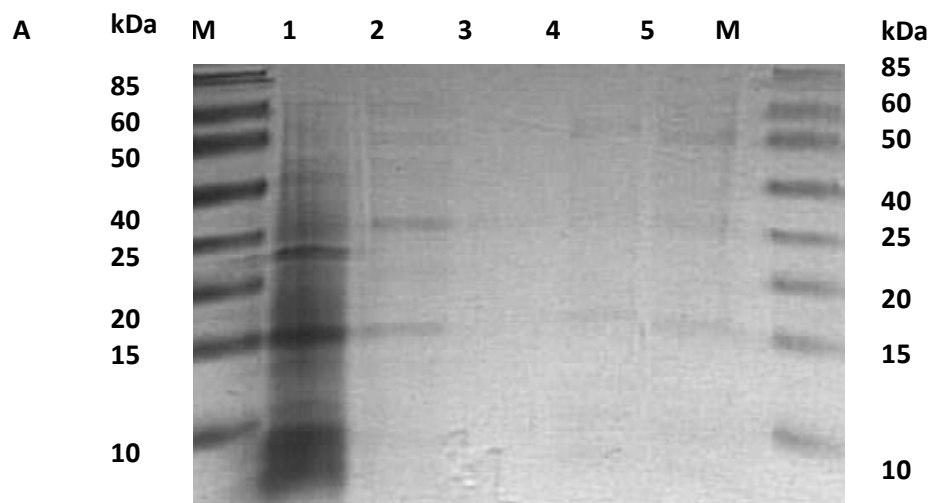
| | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80 |
|-----------------|-------------------|-------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| POPTR_004s03810 | MVPDMSEPCQ | PMFKNCLDWV | LNNQNVEGFW | GEYDGHGMP | IECLPATIAC | MIALKRWNAG | EMIDKGMFAF | IEANAELKLG |
| PtTPS10-1 | MVPDMSEPCQ | PMFKNCLDWV | LNNQNVEGFW | GEYDGHGMP | IECLPATIAC | MIALKRWNAG | EMIDKGMFAF | IEANAELKLG |
| PtTPS10-2 | MVPDMSEPCQ | PMFKNCLDWV | LNNQNVEGFW | GEYDGHGMP | IECLPATIAC | MIALKRWNAG | EMIDKGMFAF | IEANAELKLG |
| | 90 | 100 | 110 | 120 | 130 | 140 | 150 | 160 |
| POPTR_004s03810 | <u>EIYDSNCPRW</u> | <u>FAIVFPAMVE</u> | MAQINGLEI | FDPRIKRVEM | SIFYKREQIL | EREELVDKYH | YPPLLSYLEA | LPALYNFDQE |
| PtTPS10-1 | <u>EIYDSNCPRW</u> | <u>FAIVFPAMVE</u> | MAQINGLEI | FDPRIKRVEM | SIFYKREQIL | EREELVDKYH | YPPLLSYLEA | LPALYNFDQE |
| PtTPS10-2 | <u>EIYDSNCPRW</u> | <u>FAIVFPAMVE</u> | MAQINGLEI | FDPRIKRVEM | SIFYKREQIL | EREELVDKYH | YPPLLSYLEA | LPALYNFDQE |
| | 170 | 180 | 190 | 200 | 210 | 220 | 230 | 240 |
| POPTR_004s03810 | DALKHLHADG | SLFQSPSATA | SAFMATGNKD | CLNYLQTLVQ | KCTNGVPQTY | PMDEELLKLC | MVNQLQRLGL | AEHFNQEIIE |
| PtTPS10-1 | DALKHLHADG | SLFQSPSATA | SAFMATGNKD | CLNYLQTLVQ | KCTNGVPQTY | PMDEELLKLC | MVNQLQRLGL | AEHFNQEIIE |
| PtTPS10-2 | DALKHLHADG | SLFQSPSATA | SAFMATGNKD | CLNYLQTLVQ | KCTNGVPQTY | PMDEELLKLC | MVNQLQRLGL | AEHFNQEIIE |
| | 250 | 260 | 270 | 280 | 290 | 300 | 310 | 320 |
| POPTR_004s03810 | LLEQVYRNYM | NRESWPKWTN | SMATQLYKDS | LAFCLLRMHG | FRVSPCMMVL | NYASTYKHCV | FLLLHSFFFP | GMFCWFLLEE |
| PtTPS10-1 | LLEQVYRNYM | NRESWPKWTN | SMATQLYKDS | LAFCLLRMHG | FRVSPCMMVL | NYASTYKHCV | FLLLHSFFFP | GMFCWFLLEE |
| PtTPS10-2 | LLEQVYRNYM | NRESWPKWTN | SMATQLYKDS | LAFCLLRMHG | FRVSPCMMVL | NYASTYKHCV | FLLLHSFFFP | GMFCWFLLEE |
| | 330 | 340 | 350 | 360 | 370 | 380 | 390 | 400 |
| POPTR_004s03810 | EVQDQIESNH | EYFSSVILNV | YRATDLMFPG | DHELEEARSF | SRKLEKTTS | MGNEDQHTVP | FPSFHSVIKH | ELRFPWMARL |
| PtTPS10-1 | EVQDQIESNH | EYFSSVILNV | YRATDLMFPG | DHELEEARSF | SRKLEKTTS | MGNEDQHTVP | FPSFHSVIKH | ELRFPWMARL |
| PtTPS10-2 | EVQDQIESNH | EYFSSVILNV | YRATDLMFPG | DHELEEARSF | SRKLEKTTS | MGNEDQHTVP | FPSFHSVIKH | ELRFPWMARL |
| | 410 | 420 | 430 | 440 | 450 | 460 | 470 | 480 |
| POPTR_004s03810 | DHLEHRMWE | EKNSSSEKEN | VKHWNIWMMW | TNIQRFDTCR | LSCLHNDKLK | QLAVKNYEFR | QTTYKSELEE | LTRWSKSWGL |
| PtTPS10-1 | DHLEHRMWE | EKNSSG--- | -----LW | MGKTSFH--R | LSCLHNDKLK | QLAVKNYEFR | QTTYKSELEE | LTRWSKSWGL |
| PtTPS10-2 | DHLEHRMWE | EKNSSG--- | -----LW | MGKTSFH--R | LSCLHNDKLK | QLAVKNYEFR | QTTYKSELEE | LTRWSKSWGL |
| | 490 | 500 | 510 | 520 | DDxxD | 530 | 540 | 550 |
| POPTR_004s03810 | SDMGFGREKT | AYCYFAVAAS | TSLPQDSEIR | MMVAKSAIVI | TVADDFYDME | GSLDDLEKIT | DAVQRWDATG | LSGHSKTIFD |
| PtTPS10-1 | SDMGFGREKT | AYCYFAVAAS | TSLPQDSEIR | MMVAKSAIVI | TVADDFYDME | GSLDDLEKIT | DAVQRWDATG | LSGHSKTIFD |
| PtTPS10-2 | SDMGFGREKT | AYCYFAVAAS | TSLPQDSEIR | MMVAKSAIVI | TVADDFYDME | GSLDDLEKIT | DAVQRWDATG | LSGHSKTIFD |
| | 570 | 580 | 590 | 600 | 610 | 620 | 630 | 640 |
| POPTR_004s03810 | ALDSLNVNELA | RKYFRQHGTD | ITNSLRDIWS | ETFASWFTEA | KWSKSGFIPA | AEEYLETGMT | SIASHTLVLP | ASCFLSPSIP |
| PtTPS10-1 | ALDSLNVNELA | RKYFRQHGTD | ITNSLRDIWS | ETFASWFTEA | KWSKSGFIPA | AEEYLETGMT | SIASHTLVLP | ASCFLSPSIP |
| PtTPS10-2 | ALDSLNVNELA | RKYFRQHGTD | ITNSLRDIWS | ETFASWFTEA | KWSKSGFIPA | AEEYLETGMT | SIASHTLVLP | ASCFLSPSIP |
| | 650 | 660 | NDxxSxxxE | 670 | 680 | 690 | 700 | 710 |
| POPTR_004s03810 | DYKLNPAQYE | SITKLLMVIP | RLLNDIQSYK | KEQKEGKTNF | VLLHLKENPE | ADIEDSIAYA | REILDKKKKE | LLEHALMDGF |
| PtTPS10-1 | DYKLNPAQYE | SITKLLMVIP | RLLNDIQSYK | KEQKEGKTNF | VLLHLKENPE | ADIEDSIAYA | REILDKKKKE | LLEHALMDGF |
| PtTPS10-2 | DYKLNPAQYE | SITKLLMVIP | RLLNDIQSYK | KEQKEGKTNF | VLLHLKENPE | ADIEDSIAYA | REILDKKKKE | LLEHALMDGF |
| | 730 | 740 | 750 | 760 | 770 | 780 | 790 | 800 |
| POPTR_004s03810 | NDFSKPCRHL | HLSCVKVFQM | FFDSSNRYDS | NTEMFQDIQK | AFYIPVEVGA | PKPLPPHGS | KQRYPTVVAS | YHFNQRYKNR |
| PtTPS10-1 | NDFSKPCRHL | HLSCVKVFQM | FFDSSNRYDS | NTEMFQDIQK | AFYIPVEVGA | PKPLPPHGS | KQRYPTVVAS | YHFNQRYKNR |
| PtTPS10-2 | NDFSKPCRHL | HLSCVKVFQM | FFDSSNRYDS | NTEMFQDIQK | AFYIPVEVGA | PKPLPPHGS | KQRYPTVVAS | YHFNQRYKNR |
| | 810 | 820 | 830 | | | | | |
| POPTR_004s03810 | IIRLAANSVV | SHPIGPNPYM | KMPMAPKLF | CFM | | | | |
| PtTPS10-1 | IIRLAANSVV | SHPIGPNPYM | KMPMAPKLF | CFM | | | | |
| PtTPS10-2 | IIRLAANSVV | SHPIGPNPYM | KMPMAPKLF | CFM | | | | |

Abb. 4.1: Vergleich der Aminosäuresequenzen von PtTPS10-1, PtTPS10-2 und der Datenbanksequenz. Die Abbildung zeigt ein Alignment der zwei gefundenen Allele aus *Populus trichocarpa* und der Datenbanksequenz. Abweichungen sind auf grauem Hintergrund eingerahmt, während identische Sequenzen schwarz auf weißem Hintergrund abgebildet sind. Das N-terminale Signalpeptid dient der Lokalisation der Proteine an der Plastidenmembran und ist unterstrichen. Grau hinterlegte und mit „DDxxD“ und „NDxxSxxE“ beschriftete Aminosäuren sind hoch konservierte Motive, an denen metallische Cofaktoren binden. Das Alignment wurde mit MegAlign erstellt.

In *Arabidopsis thaliana* wurde die Geranylinalool-Synthase als Diterpensynthase charakterisiert (Herde 2006). Im Allgemeinen haben Mono- und Diterpensynthasen ein N-terminales Signalpeptid, das den Transport und Lokalisation an die Plastiden ermöglicht. Da diese als Syntheseort für die GPP- und GGPP-Biosynthese dienen (Bohlmann et al. 1998). Auch die untersuchte Sequenz wies ein aus 33 Aminosäuren bestehendes Signal-Peptid auf (Abb. 4.1).

4.2 Expression und Aktivitätstest der Geranylinalool-Synthase

Für die biochemische Charakterisierung wurde das Gen in den pET-102D Expressions-Vektor in *E.coli* inseriert. Der verwendete Vektor ermöglichte die induzierbare Expression von PtTPS10 mit His-Tag in den Bakterienzellen durch die Zugabe von IPTG. Am Ende der Induktionsphase wurden die Bakterien durch Ultraschallaufschluss lysiert und das rekombinante Protein über eine Nickel-NTA-Säule aufgereinigt (3.7). Die Analyse der Reinigungsschritte erfolgte mit Hilfe einer SDS-Page (3.6) dargestellt in Abbildung 4.2.



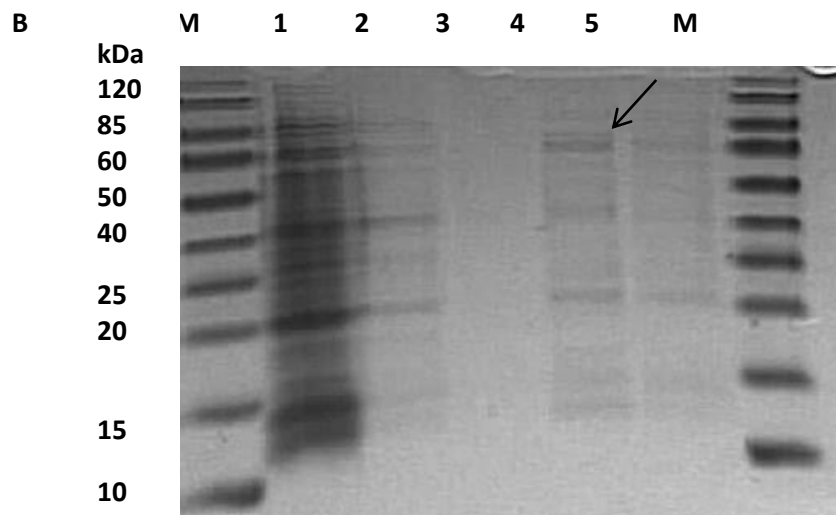


Abb. 4.2: Kontrolle des exprimierten Proteins PtTPS10-1 (A) und PtTPS10-2 (B). Das in *E. coli* BL21 Star überexprimierte Protein wurde über eine Nickel-NTA-Säule gereinigt. Dargestellt ist das mit Coomassie angefärbte SDS-Gel der einzelnen Fraktionen. Der Pfeil kennzeichnet die Bande des überexprimierten Enzyms bei ca. 80 kDa. M: Vorgefärbter Proteinmarker; 1: Proteinrohextrakt nach der Zentrifugation; 2: Durchlauf nach Zugabe des Lysepuffers; 3: Durchlauf nach Zugabe des Waschpuffers; 4: eluiertes Protein nach erster Elution; 5: eluiertes Protein nach zweiter Elution

Die SDS-Gele bzw. Proteine wurden mit Coomassie-blue angefärbt und mit UV-Licht belichtet. Der Enzym-Rohextrakt von *E. coli* (Abb. 4.2) zeigte noch keine klaren Banden und wurde über Nickel-NTA-Säulen gereinigt. Im Vergleich dazu zeigten die Eluate deutlich weniger Banden von sehr geringer Intensität. Im SDS-Gel A sind nur sehr schwache Banden bei 15, 30 und 55 kDa sichtbar. Diese entsprachen nicht der erwarteten Größe des Proteins (ca. 83 kDa). PtTPS10-2 hingegen zeigte eine schwache Bande bei ca. 80 kDa, die dem Protein entsprechen könnte. Die SDS-Polyacrylamidgele zeigten somit, dass das Konstrukt in nur sehr geringen Mengen (*PtTPS10-2*) bzw. nicht erfolgreich (*PtTPS10-1*) in *E. coli* exprimiert werden konnte.

Zum Testen der Enzymaktivität des vorhandenen aufgereinigten Proteins wurden PtTPS10-1 und PtTPS10-2 mit dem potentiellen Substrat Geranylgeranyldiphosphat (GGPP) und dem Cosubstrat Magnesiumchlorid inkubiert und das erhaltene Produkt mittels GC-MS analysiert (Abb. 4.3). Zusätzlich wurde PtTPS10-2 auch mit FPP als Substrat inkubiert, um eine mögliche andere Enzymfunktion zu testen bzw. ausschließen zu können.

Als Kontrolle diente eine Probe mit HCl. Die Zugabe der Säure protonierte den Carbonylsauerstoff und erhöhte somit die Elektrophilie des Kohlenstoffatoms. So wurde der Angriff eines Wassermoleküls gefördert und die Reaktion auch ohne Enzym katalysiert (Müller-Esterl 2004).

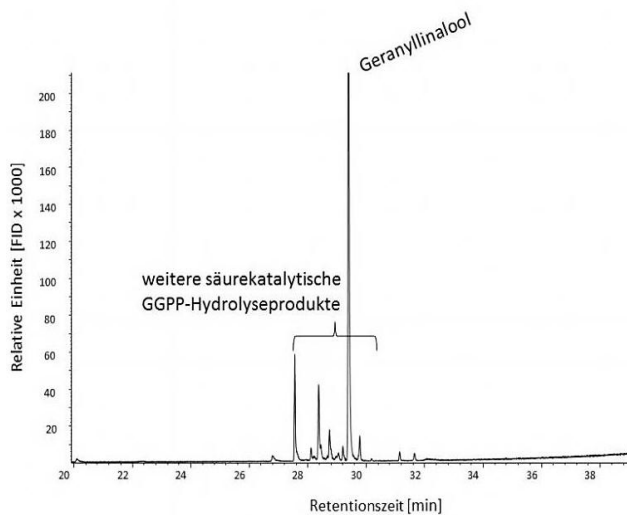
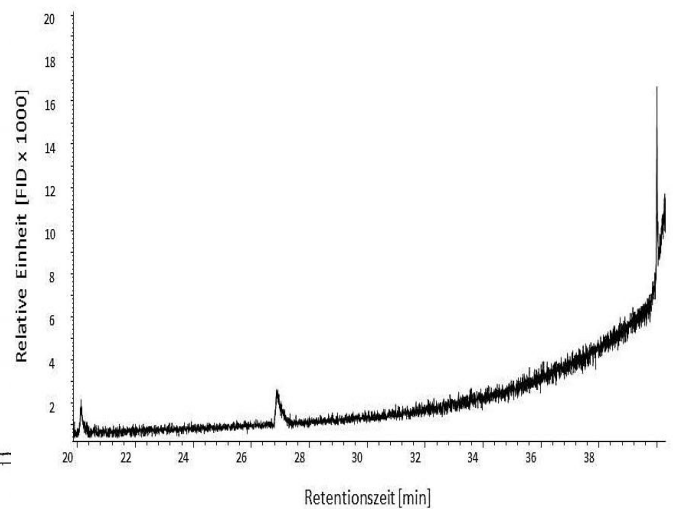
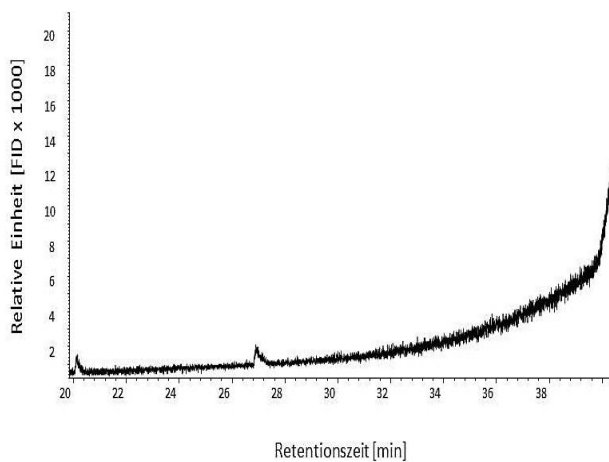
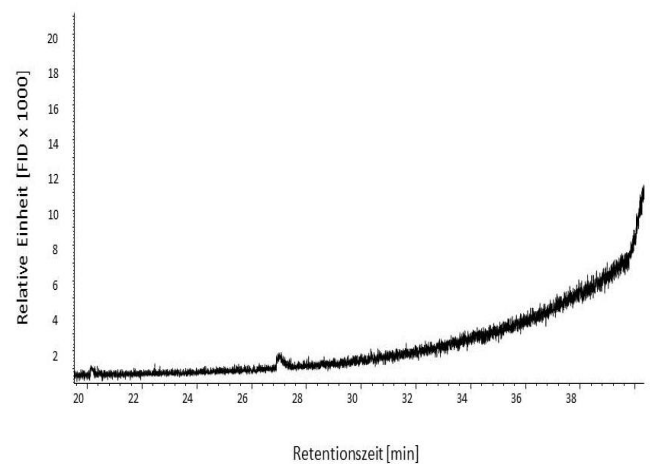
A Säurekatalytische Kontrolle mit HCl**B PtTPS10-1 mit GGPP****C PtTPS10-2 mit GGPP****D PtTPS10-2 mit FPP**

Abb. 4.3: GC-MS Analyse der Enzymreaktion von Pt TPS10 aus *Populus trichocarpa*. Das Protein wurde heterolog in *E. coli* BL21 Star-Zellen exprimiert und über Ni-NTA Spinsäulchen von Qiagen gereinigt. Protein, Substrat (GGPP/FPP), Magnesiumchlorid und Essaypuffer wurden 2 h mit Hexan überdeckt bei Raumtemperatur inkubiert. Die organische Phase der Proben wurde abgenommen und die Enzymprodukte per GC-MS analysiert. Zur Identifikation der einzelnen Substanzen wurden die Massenspektren und Retentionszeiten mit Standards aus Spektrenbibliotheken verglichen. A: zeigt die Kontrolle mit HCl und dem erwartetem Hauptprodukt Geranylinalool; B: PtTPS10-1 mit GGPP; C: PtTPS10-2 mit GGPP; & D: PtTPS10-2 mit FPP, zeigten keine Enzymaktivität

Die erhaltenen Spektren wurden soweit möglich mit Spektrenbibliotheken verglichen (*Whiley*). Als Hauptprodukt der gereinigten und enzymatisch aktiven Terpensynthese wurde (*E,E*)-Geranylinalool erwartet.

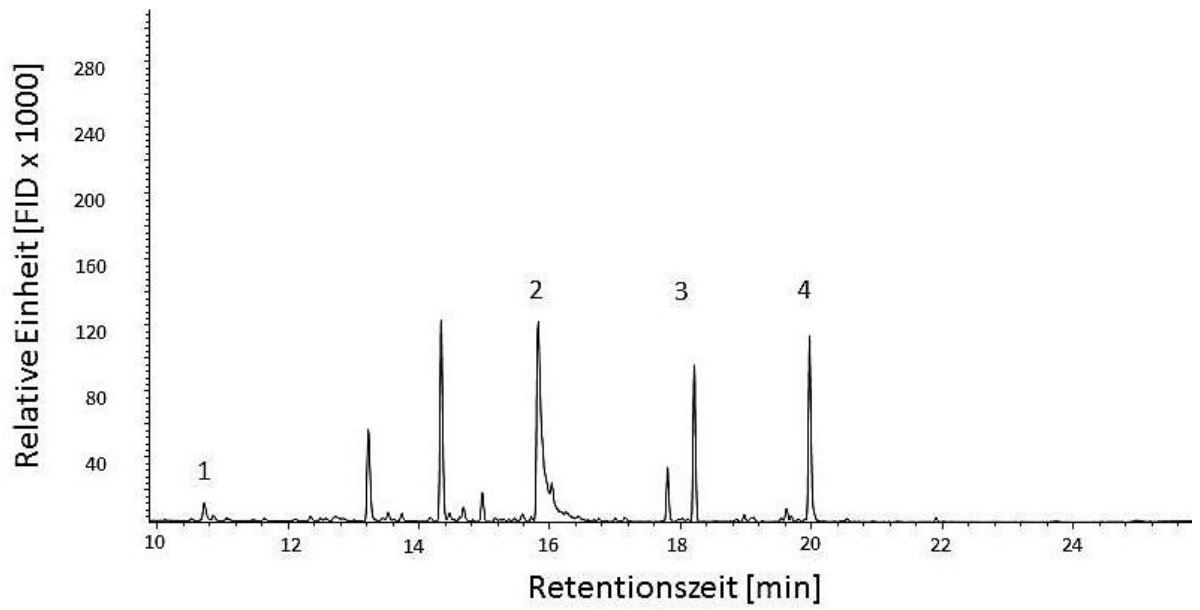
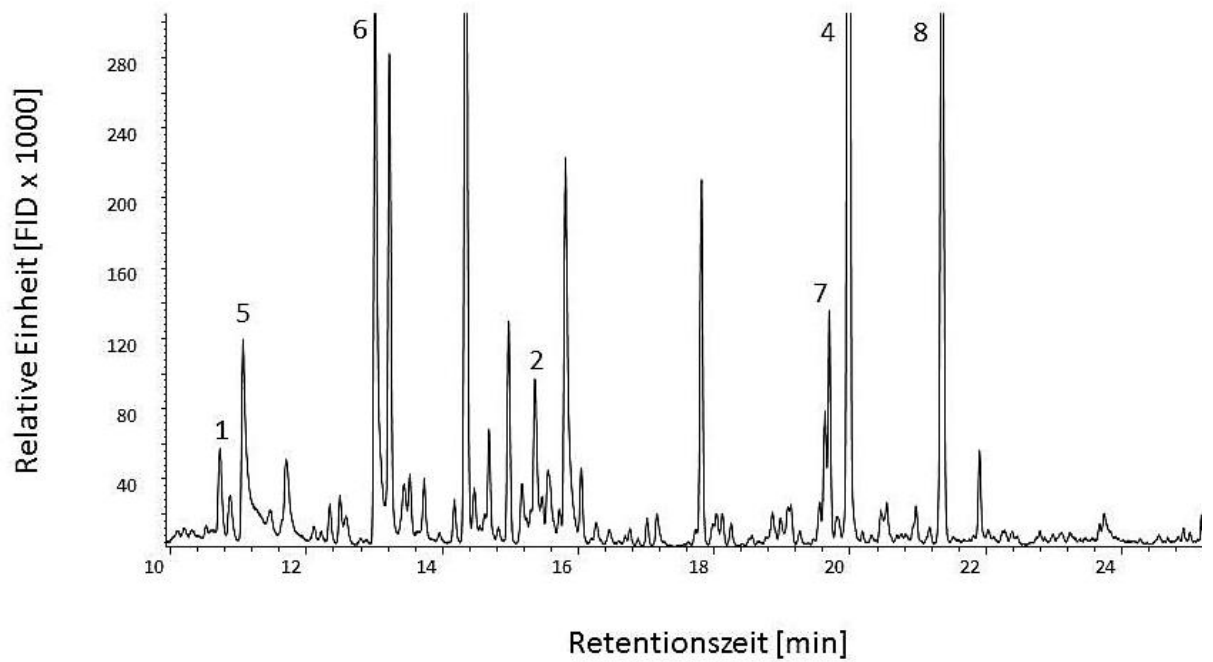
Allerdings ist deutlich zu sehen, dass sowohl bei Inkubation mit GGPP, als auch mit FPP keine Enzymaktivität aufgezeichnet werden konnte. Nur in der Kontrolle konnte das Produkt aufgezeichnet werden. Wie bereits das SDS-Gel (Abb. 4.2) vermuten lässt, ist die nicht vorhandene Enzymaktivität auf die geringe Menge an gereinigtem Protein zurückzuführen.

4.3 Duftstoffemission nach Induktion mit Alamethicin, Jasmonsäure und Auxin in *Populus trichocarpa*

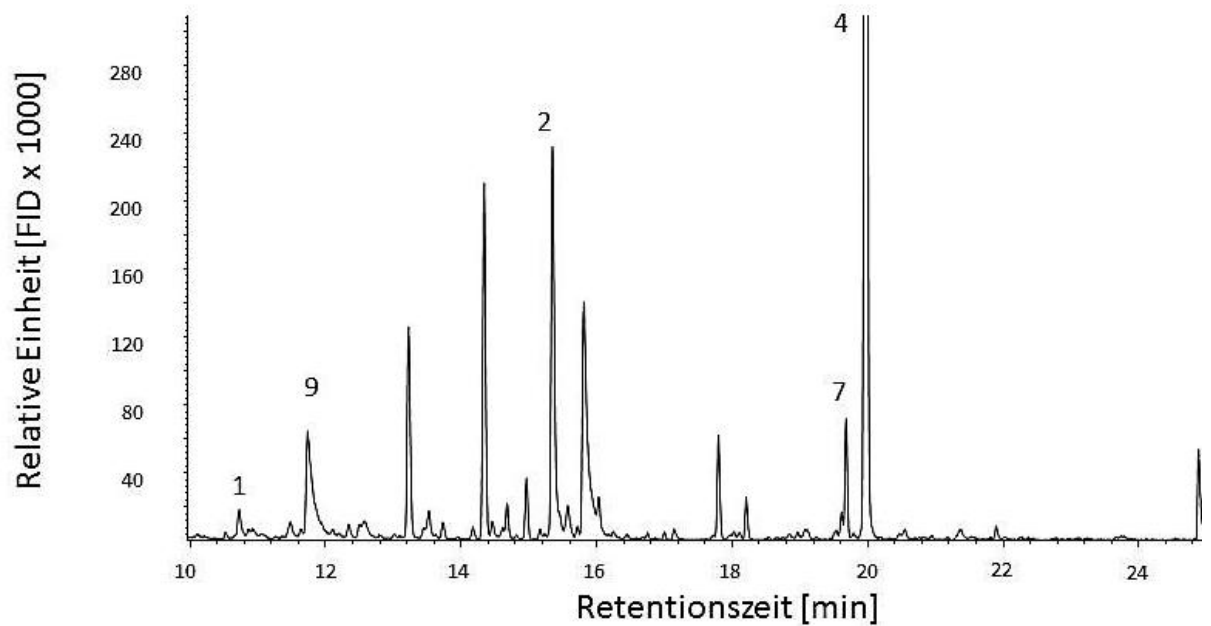
Pappelblätter von ca. 150 Tage alten Pflanzen wurden für 16 h in Lösungen mit Alamethicin (Ala), Jasmonsäure (JA), Auxin (IAA) und zur Kontrolle mit Wasser gestellt. Die Duftstoffe wurden über fünf Stunden in Exsikkatoren mit Hilfe von Aktivkohlefallen gesammelt. Die absorbierten Verbindungen wurden mit Dichlormethan aus den Fallen gespült und die erhaltenen Proben mittels GC-MS analysiert (Abb. 4.4).

Die GC-Analyse der induzierten Proben (mit Ala, JA, IAA) und der Kontrolle (Wasser) ergab 36 volatile Bestandteile von denen 23 näher identifiziert werden konnten (Tabelle 1). Darunter waren vier Monoterpenoide, vier Sesquiterpenoide, drei Homoterpenoide und drei grüne Blattstoffe („green leaf volatiles“). Die restlichen Verbindungen konnten hauptsächlich als Aromaten oder Aldoxime klassifiziert werden. Die Emission der abgegebenen Stoffe unterschied sich in den verschiedenen Behandlungen qualitativ und quantitativ. Insgesamt wurden von der Kontrolle 24 Duftstoffe abgegeben. Bei der Behandlung mit Alamethicin wurden 26 Verbindungen, bei Auxin- und Jasmonsäure-Behandlung je 25 Verbindungen verzeichnet. Signifikante Unterschiede sind in Tabelle 1 dargestellt.

Alamethicin induzierte die Abgabe von (*E*)-TMTT, während in der Kontrolle nur Spuren des Terpens festzustellen war. Auch 2-Phenylethanol, Methylsalicylat und Aldoxim 2 traten in deutlich größeren Mengen als bei der Kontrolle auf. Mit Auxin behandelte Proben emittierten signifikant mehr (*E*)- β -Ocimen und (*Z*)-Epoxyocimen als die Kontrolle. Allerdings konnte keine (*E*)-TMTT Emission verzeichnet werden. Auch bei der Induktion mit Jasmonsäure gab es keine (*E*)-TMTT Emission, jedoch deutlich gesteigerte Abgaben von 1-Hexanol und Benzylcyanid, Aldoxim 1 und Aldoxim 2. (*E,E*)- α -Farnesen und (*E*)- β -Ocimen wurden von allen Behandlungen stark emittiert und waren auch in der Kontrolle vorhanden. Dies deutet auf eine konstitutive Emission und leichte Induzierbarkeit hin.

A Kontrolle**B Alamethicin**

C Jasmonsäure



D Auxin

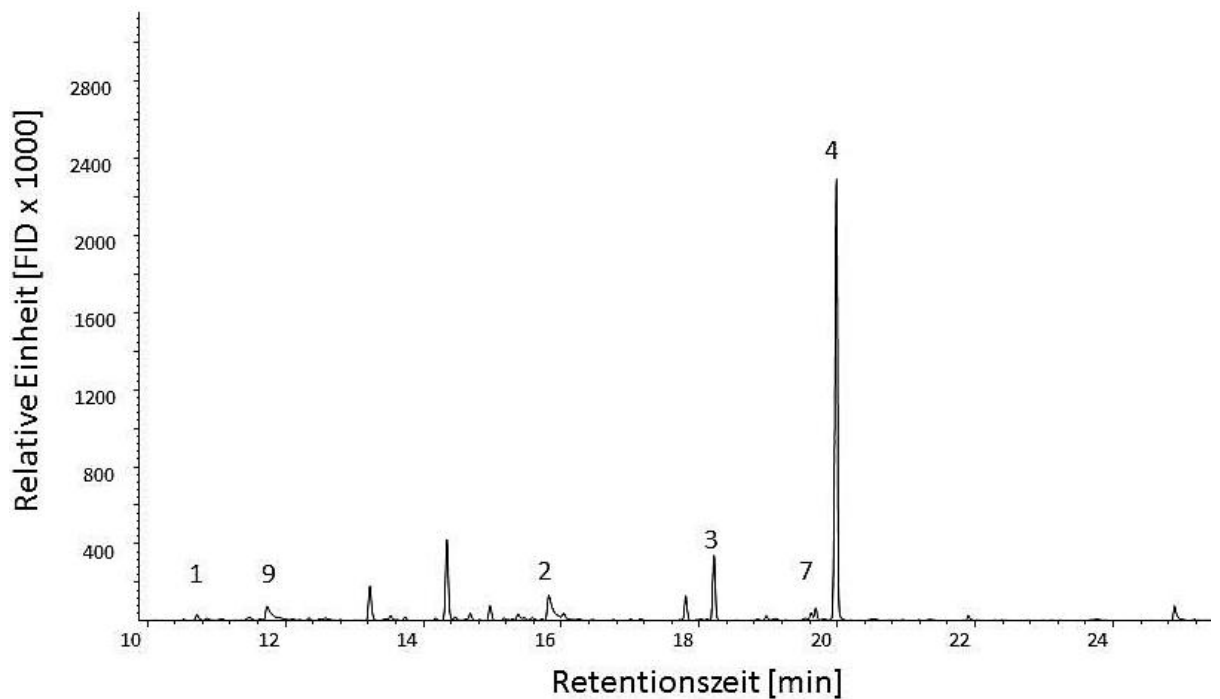


Abb. 4.4.: Gaschromatographisches Spektrum der volatilen Stoffe von Pappelblättern nach der Behandlung mit Wasser (A), Alamehacin (B), Jasmonsäure (C) und Auxin (D). Die Blätter wurden von 150 Tage alten Bäumen gewonnen und für 16 h in die entsprechenden Lösungen gestellt. Die Duftstoffsammlung erfolgte für 5 h in Exsikkatoren. Die Fallen der Exsikkatoren wurden nach Spülung mit Dichlormethan per Gaschromatographie und Massenspektrometrie ausgewertet und mithilfe von FID quantifiziert. Die mit unterschiedlichen Lösungen induzierten Pflanzen gaben dabei unterschiedliche volatile Stoffe ab: 1: Linalool (10,9 min); 2: Interner Standard (15,6 min); 3: (*E*)- β -Caryophyllene (18,1 min); 4: (*E,E*)- α -Farnesen; 5: DMNT (11,1 min); 6: Methylsalicylat (13 min); 7: Ui-C15 (19,6 min); 8: (*E*)-TMTT (21,2 min); 9: (*Z*)-Epoxyocimen (11,8 min).

Tabelle 1: Freigesetzte flüchtige Verbindungen der Pappel (*Populus trichocarpa*) nach 16-stündiger Behandlung mit Wasser (=Kontrolle), Alamethicin, Auxin und Jasmonsäure. Dargestellt ist die Emissionsrate als Mittelwert \pm SEM in ng/g Frischgewicht pro h (n=5). Die ermittelten p-Werte beziehen sich auf einen Vergleich aller Werte mittels One-Way Anova. Nicht-normalverteilte Werte (Shapiro-Wilk $P < 0,050$) wurden per Kruskal-Wallis One Way Anova on Ranks* untersucht. In einigen Fällen wurden die Daten logarithmiert, um eine Normalverteilung zu erhalten (~). Zusätzlich sind die signifikanten Unterschiede innerhalb der Behandlungen (Tukey Test) und die ermittelten F- oder H-Werte angegeben.

| Bestandteile | Alamethicin | Auxin | Jasmon- säure | Kontrolle | p-Wert | F-Wert; H-Wert | Signifikante Unterschiede |
|---------------------------------|----------------|--------------------|-------------------|-------------------|--------|-------------------|--|
| <u>Monoterpenoide</u> | | | | | | | |
| (Z)- β -Ocimen | 311 \pm 80 | 264 \pm 73 | 119 \pm 28 | 69 \pm 46 | 0,036 | 3,615 | Ala-Ctr nein |
| (E)- β -Ocimen | 1641 \pm 450 | 5036 \pm 1436 | 2245 \pm 474 | 1197 \pm 798 | 0,031 | 3,8056 | IAA-Ctr ja IAA-Ala nein JA-Ctr nein |
| (Z)- Epoxyocimen~ | 13 \pm 5 | 148 \pm 52 | 83 \pm 31 | 26 \pm 23 | 0,024 | 4,150 | IAA-Ctr ja IAA-Ala nein JA-Ctr nein |
| Linalool~ | 21 \pm 5 | 20 \pm 5 | 26 \pm 8 | 23 \pm 7 | 0,889 | 0,208 | - |
| Ui-C10 | 15 \pm 5 | 29 \pm 7 | 14 \pm 3 | 8 \pm 5 | 0,07 | 2,860 | - |
| <u>Homoterpenoide</u> | | | | | | | |
| DMNT~ | 95 \pm 25 | 49 \pm 31 | 86 \pm 36 | 28 \pm 10 | 0,087 | 2,614 | - |
| (Z)-TMTT* | 8 \pm 6 | 0 \pm 0 | 0 \pm 0 | 0 \pm 0 | 0,097 | 6,31 | - |
| (E)-TMTT* | 126 \pm 52 | 0 \pm 0 | 0 \pm 0 | 0 \pm 0 | <0,001 | 18,506 | Ala-JA ja Ala-IAA ja Ala-Ctr ja Ctr-JA nein |
| <u>Sesquiterpenoide</u> | | | | | | | |
| α -Humulen | 20 \pm 5 | 17 \pm 4 | 22 \pm 6 | 15 \pm 5 | 0,845 | 0,271 | - |
| (E)- β - Caryophyllen* | 15 \pm 7 | 152 \pm 69 | 27 \pm 7 | 192 \pm 115 | 0,174 | 4,966 | - |
| Germacrene D* | 11 \pm 6 | 11 \pm 3 | 11 \pm 6 | 14 \pm 6 | 0,948 | 0,360 | - |
| (E,E)- α -Farnesen | 1530 \pm 388 | 1375 \pm 342 | 1416 \pm 381 | 436 \pm 280 | 0,142 | 2,087 | - |
| Ui-C15~ | 82 \pm 29 | 60 \pm 14 | 83 \pm 25 | 38 \pm 16 | 0,202 | 1,728 | - |
| <u>Grüne Blattduftstoffe</u> | | | | | | | |
| (E)-2-Hexenol~ | 46 \pm 7 | 37 \pm 13 | 68 \pm 20 | 34 \pm 9 | 0,214 | 1,667 | - |
| (E)-2-Hexenal* | 123 \pm 28 | 68 \pm 66 | 195 \pm 102 | 15 \pm 15 | 0,022 | 9,678 | Ala-Ctr nein |
| 1-Hexanol~ | 149 \pm 42 | 240 \pm 214 | 556 \pm 363 | 27 \pm 13 | 0,047 | 3,318 | JA-Ctr ja JA-IAA nein Ala-Ctr nein |

Aromaten und Aldehyde

| | | | | | | | |
|----------------------------|---------|--------|----------|--------|--------|--------|---|
| Hexenyl-benzoate* | 0 ±0 | 12 ±9 | 29 ±28 | 6 ±4 | 0,184 | 4,834 | - |
| Benzaldehyd~ | 23 ±4 | 28 ±10 | 47 ±24 | 25 ±7 | 0,752 | 0,404 | - |
| Benzaldehyd, 3,4-dimethyl* | 14 ±14 | 2 ±1 | 2 ±2 | 25 ±23 | 0,893 | 0,615 | - |
| 2-Phenylethanol~ | 87 ± 24 | 11 ±3 | 10 ±2 | 16 ±7 | <0,001 | 11,232 | Ala-IAA ja Ala-JA ja Ala-Ctr ja Ctr-IAA nein |
| Benzylbenzoat | 1 ±1 | 20 ±8 | 16 ±6 | 0 ±0 | 0,026 | 4,017 | IAA-Ctr nein |
| Benzylcyanid | 34 ±9 | 26 ±9 | 56 ±19 | 2 ±2 | 0,013 | 10,750 | JA-Ctr ja JA-IAA nein Ala-Ctr nein |
| 1H-Indol* | 27 ±10 | 24 ±8 | 55 ±15 | 21 ±8 | 0,140 | 5,476 | - |
| (Z)-3-Hexenylbenzoate* | 5 ±4 | 7 ±2 | 11 ±9 | 4 ±2 | 0,595 | 1,891 | - |
| Methylsalicylat~ | 190 ±58 | 17 ±12 | 10 ±4 | 6 ±2 | <0,001 | 12,334 | Ala-Ctr ja Ala-IAA ja Ala-JA ja JA-Ctr nein |
| <u>Andere</u> | | | | | | | |
| Aldoxim 1~ | 20 ±7 | 72 ±69 | 291 ±132 | 7 ±2 | 0,029 | 3,886 | JA-Ctr ja JA-IAA nein Ala-Ctr nein |
| Aldoxim 2~ | 115 ±21 | 72 ±42 | 89 ±11 | 23 ±7 | 0,005 | 6,419 | Ala-Ctr ja Ala-IAA nein JA-Ctr ja IAA-Ctr nein |
| Unknown 1* | 10 ±5 | 0 ±0 | 2 ±2 | 4 ±3 | 0,305 | 3,627 | - |
| Unknown 3* | 18 ±7 | 3 ±2 | 9 ±2 | 12 ±6 | 0,035 | 8,587 | Ala-IAA ja Ala-Ctr nein JA-IAA nein |
| Unknown 2 | 9 ±4 | 30 ±10 | 8 ±2 | 16 ±9 | 0,174 | 1,878 | - |

5. Diskussion

Die durch Herbivorie induzierte Abgabe von flüchtigen Substanzen ist ein weitverbreiteter Mechanismus der pflanzlichen Abwehr. Er dient zur Anlockung von Prädatoren oder Parasitoiden der angreifenden Insekten. Die Duftstoff-Bouquet-Zusammensetzung ist abhängig von der Art des Angreifers. Dies macht die Funktion der einzelnen Bestandteile und deren Synthese zu einer interessanten Fragestellung. Um die biosynthetischen Prozesse verstehen zu können, müssen die korrespondierenden Gene identifiziert werden. In der Limabohne, Tomate und weiteren Pflanzen wurde eine erhöhte Abgabe von (*E,E*)-4,8,12-Trimethyltrideca-1,3,7,11-tetraen (TMTT) nach Herbivorie festgestellt (Kant et al. 2004; Kost & Heil 2006). In dieser Arbeit ist es gelungen das *PtTPS10*-Gen der Pappel zu klonieren und zu sequenzieren. Es wurde angenommen, dass dieses Gen für eine Geranylinalool-Synthase kodiert und demzufolge die Synthese von (*E,E*)-Geranylinalool, einer Vorstufe von TMTT, ermöglicht. Die Induktion der TMTT-Synthese kann über verschiedene Elicitoren erfolgen. In den durchgeführten Experimenten stellte sich dabei Alamethicin als besonders geeignet heraus.

5.1 Das Terpensynthase Gen *PtTPS10*

Die induzierte TMTT-Emission aufgrund von biotischen Faktoren wurde bereits in mehreren Pflanzenarten beschrieben (Williams et al. 2005; Ament et al. 2006). Dies deutet darauf hin, dass diese Art von Abwehrreaktion weit verbreitet und von evolutionärem Vorteil ist. Es ist zu vermuten, dass Geranylinalool-Synthasen auch in vielen anderen Pflanzenarten präsent sind. Ament und Mitarbeiter (2006) beschrieben eine, durch Insektenfraß hervorgerufene erhöhte Aktivität einer Geranylinalool-Synthase in der Tomate, die auch mit einer erhöhten Emission vom TMTT einherging.

Das *PtTPS10*-Gen der Pappel wurde durch den Vergleich mit bekannten Genen aus *Arabidopsis thaliana* als eine putative Geranylinalool-Synthase identifiziert. Die experimentell ermittelte Sequenz von 833 Aminosäuren entsprach der Datenbanksequenz (94%), wurde allerdings in zwei allelischen Varianten gefunden. Eine BLAST Analyse (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) mit der Sequenz des Pappelproteins ergab, dass *PtTPS10* sehr große Ähnlichkeiten zu einer putativen (*E,E*)-Geranylinalool-Synthase (61%) aus *Vitis vinifera* und einer Ent-Kaurensynthase von *Ricinus communis* (62%) hat. Die Kaurensynthase ist eine Diterpensynthase und katalysiert den ersten Syntheseschritt von GGPP zur Gibberellinsäure (Bensen et al. 1995).

Vergleiche von Aminosäuresequenzen pflanzlicher Terpensynthasen und weitere Untersuchungen an Terpensynthasen haben mehrere konservierte Bereiche bestimmt (Chen et al. 1994). Die in der durchgeführten Sequenzierung erhaltenen Genmotive „DDxxD“ und „NDxxSxxxE“ sind solche hochkonservierte Aminosäuresequenzen, die als Bindungsorte für metallische Cofaktoren dienen. Über diese Mg^{2+} -Kationen wird die Bindung zur Diphosphatgruppe des Substrates hergestellt.

Im Wunderbaum (*Ricinus communis*) konnte eine Diterpensynthase (Casbenesynthase) gereinigt und vollständig sequenziert werden. Ein Vergleich mit anderen Zyklasen ermöglichte die Identifizierung eines typischen N-terminalen Plastidentransportpeptids' (Mau & West 1994). Während Sesquiterpensynthasen hauptsächlich im Cytosol und am endoplasmatischen Retikulum wirken, sind Mono- und Diterpensynthasen an Plastiden aktiv. Die Plastidenmembran ist der Ort der GPP- und GGPP-Biosynthese (Bohlmann et al. 1998). Demnach benötigen die meisten Mono- und Diterpensynthase eine Transitpeptidsequenz. Die aus *P. trichocarpa* isolierte Synthase besitzt ein N-terminales Signalpeptid und lässt sich damit den Mono- oder Diterpensynthasen zuordnen. Auch die Geranylinalool-Synthase in *Arabidopsis thaliana* wurde als Diterpensynthase klassifiziert (Herde 2006). Daher kann festgehalten werden, dass die Primärstruktur der Geranylinalool-Synthase ihrer angenommenen Funktion als Diterpensynthase entspricht.

5.2 Aktivität von PtTPS10

Es wurde erwartet, dass das untersuchte Enzym hauptsächlich GGPP zu (*E,E*)-Geranylinalool umsetzt. Durch Experimente mit der Limabohne wurde die These aufgestellt, dass Geranylinalool in einem enzymatischen Schritt in TMTT umgewandelt wird (Boland et al. 1998). Geranylinalool wird wiederum aus Geranylgeranyldiphosphat gebildet (Abb. 5.1).

Die heterologe Expression von PtTPS10 als aktives rekombinantes Protein, sollte die vermutete Geranylinaloolsynthese-Funktion bestätigen. Mittels GC-MS Produkte der enzymatischen Reaktion identifiziert werden. Daraus können Rückschlüsse auf die Proteinfunktion gezogen werden. Das eingesetzte Protein zeigte keine katalytischen Fähigkeiten, was vor allem durch zu geringe Menge an eingesetztem Enzym zu erklären ist (Abb. 4.2). Die Synthese von (*E,E*)-Geranylinalool aus dem C₂₀-Substrat GGPP konnte nicht experimentell bestätigt werden.

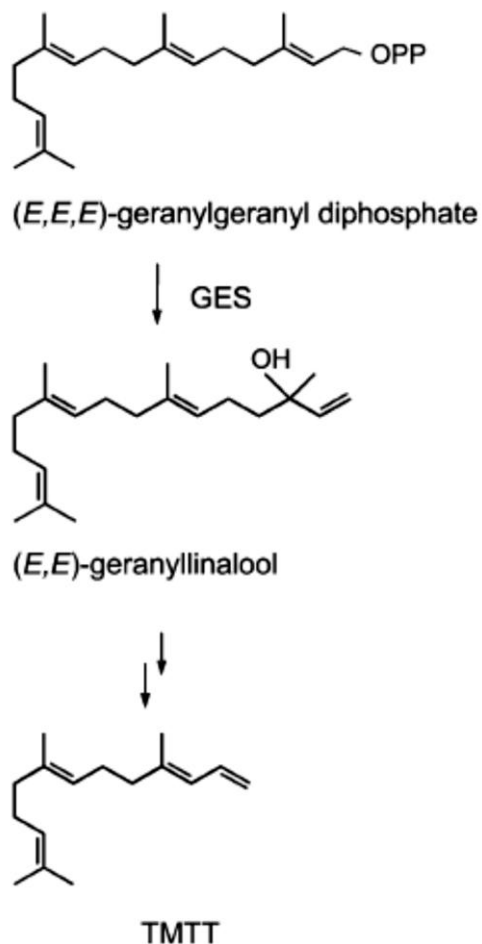


Abbildung 5.1: Angenommene Biosynthese des Homoterpens TMTT. GES: Geranylinalool-Synthase nach (Herde et al. 2008)

Bei der Expression der *Arabidopsis thaliana* Geranylinalool-Synthase *in-planta* konnte die Emission von Geranylinalool und TMTT nachgewiesen werden (Herde 2006). Auch bei diesen Untersuchungen gab es Schwierigkeiten das Gen heterolog in *E. coli* und Hefe zu exprimieren. In keinem der beiden Organismen konnte eine Geranylinalool-Synthase-Aktivität im Proteinextrakt gemessen werden. Möglicherweise könnte durch die Verbesserung der Wachstumsbedingungen der Expression eine Überexpression erreicht werden. Die Länge des Gens und der komplexe Aufbau könnten die Klonierung erschwert haben. Das N-Terminale Signalpeptid dient zur Lokalisation an den Chloroplasten und könnte durch seine Struktur eine Bildung als lösliches Protein in *E. coli* behindern. Des Weiteren könnten zusätzliche Cofaktoren, wie z.B. Kalium für die Aktivität des Enzyms benötigt werden (Green et al. 2009). Für

zukünftige Experimente wären Versuche mit trunkierten Varianten des Enzyms empfehlenswert um dessen Aktivität bestätigen zu können. Die Ermittlung weiterer Cofaktoren wäre eine Möglichkeit die Erfolgchancen des Experimentes zu erhöhen. Die Kontrolle zeigte ein deutliches Geranylinalool-Signal, dass durch die saure Hydrolyse von GGPP synthetisiert wurde.

Es konnte nicht eindeutig nachgewiesen werden, dass *PtTPS10* tatsächlich ein Enzym mit den Eigenschaften einer die Geranylinalool-Synthase in der Pappel repräsentiert. Die Tatsache, dass das Gen aus cDNA amplifiziert werden konnte und eine Sequenzierung möglich war, zeigt aber, dass es unter Herbivorie transkribiert wurde.

5.3 Elicitoren für die TMTT-Produktion

Die Analyse des Duftstoff-Bouquets' aus den Blättern von *Populus trichocarpa* sollte klären, unter welchen Bedingungen die Geranylinalool-Synthase exprimiert und möglichst viel TMTT abgegeben wird. Zu diesem Zweck wurde mit drei verschiedenen Verbindungen als Elicitoren gearbeitet.

Alamethicin ist ein bekannter Induktor der TMTT-Synthese in *A. thaliana* und induziert auch die Synthese der verantwortlichen Geranylinalool-Synthase (Herde 2006). In der Limabohne wurde dies bereits 2000 von Engelberth und Mitarbeitern berichtet. Alamethicin stammt aus dem Pilz *Trichoderma viride* und aktiviert Abwehrgene, indem es die Öffnung von Ionenkanälen bewirkt (Engelberth et al. 2001; Jabs et al. 1997). Ähnlich wie in *A.thaliana* (Herde et al. 2008) erhöhten sich bei der Alamethicin-Behandlung Methylsalicylat und TMTT gegenüber der Kontrolle (Abb.5.1).

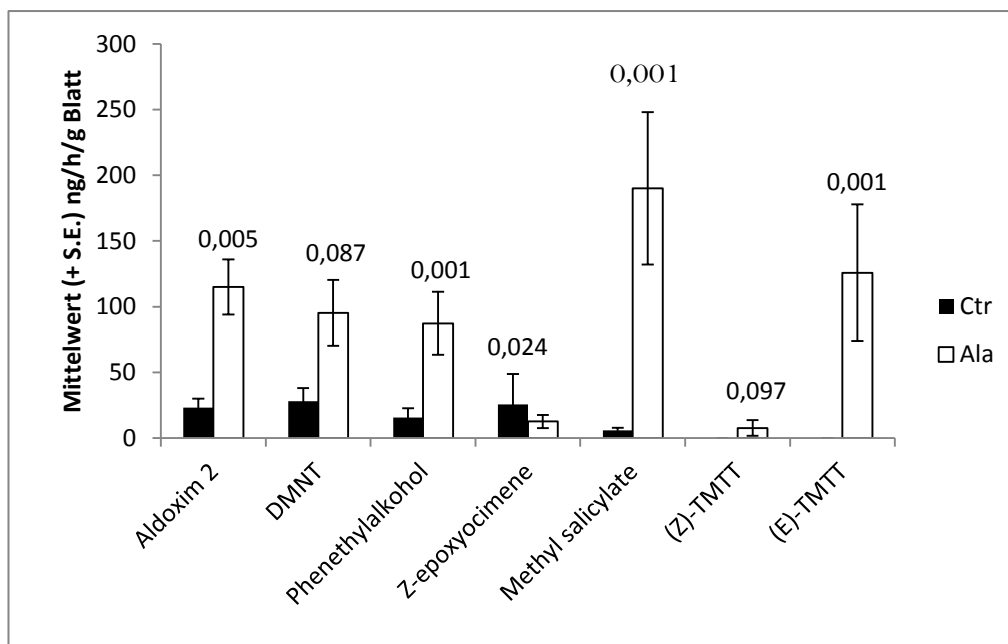


Abb.5.2: Mittelwerte einiger volatilen Duftstoffe (Mittelwert $\text{ng h}^{-1} \text{g}^{-1}$ Blatt mit Standarderror für 5 Replikate) von Kontrolle und Alamethicin im Vergleich. Pappelblätter wurden für 16 h mit Alamethicin behandelt indem sie in wässrige Lösungen platziert wurden. Mithilfe von Exsikkatoren wurden Duftstoffe über 5 h gesammelt. Dichlormethan diente zur Gewinnung der Proben aus den genutzten Aktivkohlefiltern. Die Volatiles wurden per GC-MS und Datenbank Abgleich identifiziert und mit FID quantifiziert. Die Berechnung der Mittelwerte und Standardfehler, sowie die Erstellung des Balkendiagramms erfolgten mit Microsoft Excel 2010. Die Zahlen über den Säulenpaaren zeigen die p-Werte eines t-Tests, der die Emission des genannten Stoffes zwischen Kontrolle und Alamethicin-Probe vergleicht. Werte unter 0,05 gelten dabei als signifikant.

In der Kontrolle waren Spuren von Methylsalicylat enthalten. Allerdings konnte auch hier ein großer Anstieg der Methylsalicylat-Emission nach Alamethicin-Behandlung beobachtet werden.

Alamethicin kann somit als ein effizienter Induktor der Geranylinalool- bzw. TMTT-Produktion in *P. trichocarpa* angesehen werden. In *Brassica oleracea* konnte nachgewiesen werden, dass Alamethicin eine deutlich stärkere Abwehrreaktion hervorruft als Jasmonsäure (Bruinsma et al. 2009). Methylsalicylat wird in vielen Pflanzen nach pathogenem Befall emittiert und könnte einen positiven Effekt (z.B. als Salicylsäure) in der indirekten Abwehr haben (Shulaev et al. 1997). In der Lima-Bohne wurde bereits belegt, dass Alamethicin die Salicylat-Biosynthese erhöht (Engelberth et al. 2001). Allerdings wurde die Untersuchungen die Repression der Jasmonsäuresynthese durch Salicylsäure in mehreren Untersuchungen belegt (Doares et al. 1995). Es wurde vorgeschlagen, dass Salicylsäure den Oktadekanoiden-Syntheseweg inhibiert, welcher entscheidende Abwehrsignale synthetisiert. Alamethicin eignet sich demnach nur bedingt zum Schutz vor Herbivoren.

Auxin ist ein bedeutendes Phytohormon, das in eine Vielzahl von Prozessen in der Pflanze involviert ist. In *P. trichocarpa* wurden nach Behandlung mit Auxin mehr (*E*)- β -Ocimen und (*Z*)-Epoxyocimen als in der Kontrolle abgegeben. Allerdings scheint seine Bedeutung in der indirekten Abwehr in der Pappel auf den ersten Blick marginal, da entscheidende Abwehrstoffe nicht stärker emittiert werden (signifikante Induktion nur von (*E*)- β -Ocimen). Allerdings ist es an vielen weiteren Signalkaskaden beteiligt und reguliert so indirekt die Abwehr mit. Auxin hat in Untersuchungen gezeigt, dass es die Abwehrantworten von Salicylsäure unterdrückt. Auch Interaktionen mit der Jasmonsäure sind für die pflanzliche Abwehr wichtige Prozesse (Erb et al. 2012).

Jasmonsäure ist ein Signalmolekül das die Reaktionen der Pflanze auf Verletzungen, Herbivorie und Pathogene induziert. Die durch Jasmonsäure geregelten Signalwege gehören zu den Hauptregulatoren der pflanzlichen Abwehr gegen Arthropoden und Pathogene. Die Zerstörung von Pflanzenzellen löst die Synthese des Phytohormones Jasmonoyl-L-Isoleucin aus und aktiviert Signalkaskaden, die die Aktivierung von Abwehrgenen bewirken (Koo & Howe 2009; Taiz & Zeiger 2010).

Herbivorie und mechanische Verletzungen lösen unterschiedliche Reaktionen in einer Pflanze aus. In der hybriden Pappel (*Populus trichocarpa x deltoides*) wurde bei beiden Arten von Angriffen Linalool, Benzylcyanid, DMNT, (*E*)- β -Ocimen, Germacrene D und (*E,E*)- α -Farnesene abgegeben. Bei Raupenfraß an der Pappel wurden deutlich größere Mengen an DMNT, (*E*)- β -Ocimen und Germacrene D emittiert, als bei mechanischen Verletzungen der Blätter (Arimura et al. 2004).

In dem vorliegenden Versuch konnte durch die Behandlung mit Jasmonsäure keine (*E*)-TMTT Emission induziert werden. Vergleicht man durch Herbivorie induzierte Proben (Danner et al. 2011) mit Jasmonsäure-behandelten Proben fällt auf, dass bei (*Z*)- β -Ocimen und (*E*)- β -Ocimen nur eine geringe, 2-5-fache Erhöhung der Emission mit Jasmonsäure erfolgt. Bei Herbivorie treten die Stoffe 20-30 Mal so stark auf wie in ihrer Kontrolle.

Auch die DMNT-Emission wurde mit JA nur verdreifacht, während es bei Insektenfraß zu einem hundertfachen Wert kam. Auffällig ist, dass es bei JA-behandelten Proben sowohl bei den Mono-, Homo- und Sesquiterpenen meist nur zur Verdopplung der Emissionen kommt. Bei Herbivorie kommt es dagegen z.T. zu 100-fachen Abgaben bei Benzylcyanid und Germacrene D. 1-Hexanol und Benzylcyanid werden in 20-facher Menge nach JA Behandlung abgegeben und auch Aldoxime treten verstärkt auf (40x). Insgesamt erhöhen sich die Emissionen bei Herbivorie deutlicher und bei mehr Verbindungen gibt es klare Abgrenzungen zur Emission der Kontrollpflanze.

Literatur- und Quellenverzeichnis

- Abdelgaleil, S. a. M., 2010. Molluscicidal and insecticidal potential of monoterpenes on the white garden snail, *Theba pisana* (Muller) and the cotton leafworm, *Spodoptera littoralis* (Boisduval). *Applied Entomology and Zoology*, 45(3), pp.425–433.
- Ament, K., Van Schie, C.C. & Bouwmeester, H.J., 2006. 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*, 224(5), pp.1197–208.
- Arimura, G., Huber, D.P.W. & Bohlmann, J., 2004. Forest tent caterpillars (*Malacosoma disstria*) induce local and systemic diurnal emissions of terpenoid volatiles in hybrid poplar (*Populus trichocarpa* × *deltoides*): cDNA cloning, functional characterization, and patterns of gene expression of (-)-germacr. *The Plant Journal*, 37(4), pp.603–616.
- Arimura, G.-I., Ozawa, R. & Maffei, M.E., 2011. Recent advances in plant early signaling in response to herbivory. *International journal of molecular sciences*, 12(6), pp.3723–39.
- Baldwin, I.T. & Preston, C.A., 1999. The eco-physiological complexity of plant responses to insect herbivores. *Planta*, 208, pp.137–145.
- Bimboim, H. & Doly, J., 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids research*, 1, p.1983.
- de Boer, J.G., Posthumus, Maarten a & Dicke, Marcel, 2004. Identification of volatiles that are used in discrimination between plants infested with prey or nonprey herbivores by a predatory mite. *Journal of chemical ecology*, 30(11), pp.2215–30.
- Bohlmann, J., 1999. MONOTERPENE SYNTHASES FROM GRAND FIR (*ABIES GRANDIS*). *WO Patent WO/1999/002,030, 272(35)*, pp.21784–21792.
- Bohlmann, J., Meyer-Gauen, G. & Croteau, R., 1998. Plant terpenoid synthases: molecular biology and phylogenetic analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(8), pp.4126–33.
- Boland, W., Gäbler, A. & Gilbert, M., 1998. Biosynthesis of C 11 and C 16 homoterpenes in higher plants; stereochemistry of the C¹–C-bond cleavage reaction. *Tetrahedron*, 54, pp.14725–14736.
- Bruinsma, M., Pang, B. & Mumm, R., 2009. Comparing induction at an early and late step in signal transduction mediating indirect defence in *Brassica oleracea*. *Journal of experimental botany*, 60(9), pp.2589–99.
- Chen, a, Kroon, P. a & Poulter, C.D., 1994. Isoprenyl diphosphate synthases: protein sequence comparisons, a phylogenetic tree, and predictions of secondary structure. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 3(4), pp.600–7.
- Cheng, A., Lou, Y. & Mao, Y., 2007. Plant terpenoids: biosynthesis and ecological functions. *Journal of Integrative Plant Biology* 2007, 49(2), pp.179–186.
- Clavijo McCormick, A., Unsicker, S.B. & Gershenzon, J., 2012. The specificity of herbivore-induced plant volatiles in attracting herbivore enemies. *Trends in plant science*, 17(5), pp.303–10.

- Danner, H., Boeckler, G.A. & Irmisch, S., 2011. Four terpene synthases produce major compounds of the gypsy moth feeding-induced volatile blend of *Populus trichocarpa*. *Phytochemistry*, 72(9), pp.897–908.
- Degenhardt, J., Köllner, T.G. & Gershenzon, J., 2009. Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. *Phytochemistry*, 70(15-16), pp.1621–37.
- Delker, C., Raschke, A. & Quint, M., 2008. Auxin dynamics: the dazzling complexity of a small molecule's message. *Planta*, 227(5), pp.929–41.
- Dicke, Marcel, 2009. Behavioural and community ecology of plants that cry for help. *Plant, cell & environment*, 32(6), pp.654–65.
- Dicke, Marcel & Loon, J.J. a., 2000. Multitrophic effects of herbivore-induced plant volatiles in an evolutionary context. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 97(3), pp.237–249.
- Dicke, Marcel & Poecke, R.M.P.V., 2002. Signaling in plant-insect interactions : signal transduction in direct and indirect plant defence. *Oxford University Press*, 3(Plant Signal Transduction), pp.289–316.
- Doares, S., Narváez-vpsquez, J. & Conconi, A., 1995. Salicylic Acid Inhibits Synthesis of Proteinase Inhibitors in Tomato Leaves Induced by Systemin and Jasmonic Acid. *Plant physiology*, 108(4), pp.1741–1746.
- Engelberth, J, Koch, T & Schüler, G., 2001. Ion channel-forming alamethicin is a potent elicitor of volatile biosynthesis and tendrill coiling. Cross talk between jasmonate and salicylate signaling in lima bean. *Plant physiology*, 125(1), pp.369–77.
- Engelberth, J., 2000. Differential signalling and plant-volatile biosynthesis. *Biochemical Society transactions*, 28(6), pp.871–2.
- Engelberth, Jürgen, Koch, Thomas & Boland, W., 2000. Channel-Forming Peptaibols Are Potent Elicitors of Plant Secondary Metabolism and Tendril Coiling **. , 140363(10), pp.1860–1862.
- Erb, M., Meldau, S. & Howe, GA, 2012. Role of phytohormones in insect-specific plant reactions. *Trends in plant science*, 17(5), pp.250–259.
- Fonseca, S., Chini, A. & Hamberg, M., 2009. (+)-7-iso-Jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. *Nature chemical biology*, 5(5), pp.344–50.
- Frost, C.J., Appel, H.M. & Carlson, J.E., 2007. Within-plant signalling via volatiles overcomes vascular constraints on systemic signalling and primes responses against herbivores. *Ecology letters*, 10(6), pp.490–8.
- Green, S., Squire, C.J. & Nieuwenhuizen, N.J., 2009. Defining the potassium binding region in an apple terpene synthase. *The Journal of biological chemistry*, 284(13), pp.8661–9.
- Habermehl, G., Hammann, P. & Krebs, H.C., 2008. *Naturstoffchemie: Eine Einführung* 3rd ed., Springer Verlag.
- Hegde, M., Oliveira, J.N. & da Costa, J.G., 2012. Aphid antixenosis in cotton is activated by the natural plant defence elicitor cis-jasmone. *Phytochemistry*, 78(2012), pp.81–8.
- Herde, M., 2006. *Identifikation und Regulation einer durch Insektenfraß induzierbaren Geranylinalool-Synthase in Arabidopsis thaliana*, Göttingen.

- Herde, M., Gärtner, K. & Köllner, T.G., 2008. Identification and regulation of TPS04/GES, an Arabidopsis geranylinalool synthase catalyzing the first step in the formation of the insect-induced volatile C16-homoterpene TMTT. *The Plant cell*, 20(4), pp.1152–68.
- Holopainen, J.K. & Gershenzon, J., 2010. Multiple stress factors and the emission of plant VOCs. *Trends in plant science*, 15(3), pp.176–84.
- Jabs, T., Tschöpe, M. & Colling, C., 1997. Elicitor-stimulated ion fluxes and O₂- from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(9), pp.4800–5.
- Jansson, Stefan & Douglas, C.J., 2007. Populus: a model system for plant biology. *Annual review of plant biology*, 58, pp.435–58.
- Kant, M.R., Ament, K. & Sabelis, M.W., 2004. Differential Timing of Spider Mite-Induced Direct and Indirect Defenses in Tomato Plants 1 [w]. , 135(May), pp.483–495.
- Kazan, K. & Manners, J.M., 2009. Linking development to defense: auxin in plant-pathogen interactions. *Trends in plant science*, 14(7), pp.373–82.
- Knudsen, J., Tollsten, L. & Bergström, L., 1993. Floral scents—a checklist of volatile compounds isolated by head-space techniques. *Phytochemistry*, 33(2), pp.253–280.
- Koo, A.J.K. & Howe, G., 2009. The wound hormone jasmonate. *Phytochemistry*, 70(13-14), pp.1571–80.
- Kost, C. & Heil, M., 2006. Herbivore-induced plant volatiles induce an indirect defence in neighbouring plants. *Journal of Ecology*, 94(3), pp.619–628.
- Kreuzwieser, J., Schnitzler, J. & Steinbrecher, R., 2008. Biosynthesis of organic compounds emitted by plants. *Plant Biology*, 1, pp.149–159.
- Köllner, T., 2004. Molekulare und genetische Aspekte der Biosynthese von komplexen Sesquiterpengemischen in Mais.
- Laupitz, R., Gräwert, T. & Rieder, C., 2004. Stereochemical studies on the making and unmaking of isopentenyl diphosphate in different biological systems. *Chemistry & biodiversity*, 1(9), pp.1367–76.
- Lee, S., Badieyan, S. & Bevan, D.R., 2010. Herbivore-induced and floral homoterpene volatiles are biosynthesized by a single P450 enzyme (CYP82G1) in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(49), pp.21205–10.
- Loon, J.J. a., Boer, J.G. & Dicke, Marcel, 2000. Parasitoid-plant mutualism: parasitoid attack of herbivore increases plant reproduction. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 97(2), pp.219–227.
- Lorbeer, E., Mayr, M. & Hausmann, B., 1984. Zur Identifizierung flüchtiger Substanzen aus biologischem Material mit Hilfe der CLSA (Closed Loop Stripping Apparatus). *Monatshefte für Chemie/ ...*, 1112, pp.1107–1112.
- Marchadier, H. & Sigaud, P., 2005. Poplars in biotechnology research. *Gene*, 55, pp.2003–2004.
- Martin, D.M. & Bohlmann, J., 2004. Identification of *Vitis vinifera* (-)-alpha-terpineol synthase by in silico screening of full-length cDNA ESTs and functional characterization of recombinant terpene synthase. *Phytochemistry*, 65(9), pp.1223–9.

- Mau, C.J. & West, C. a, 1994. Cloning of casbene synthase cDNA: evidence for conserved structural features among terpenoid cyclases in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(18), pp.8497–501.
- Mazid, M., Khan, T. & Mohammad, F., 2011. Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. *Biol. Med*, 3(2), pp.232–249.
- McGarvey, D. & Croteau, Rodney, 1995. Terpenoid metabolism. *The Plant Cell*, 7(July), pp.1015–1026.
- Minogue, P.J., Miwa, M. & Rockwood, D.L., 2012. Removal of nitrogen and phosphorus by Eucalyptus and Populus at a tertiary treated municipal wastewater sprayfield. *International journal of phytoremediation*, 14(10), pp.1010–23.
- Mooney, K. a, Pratt, R.T. & Singer, M.S., 2012. The tri-trophic interactions hypothesis: interactive effects of host plant quality, diet breadth and natural enemies on herbivores. *PloS one*, 7(4), p.e34403.
- Müller-Esterl, W., 2004. *Biochemie: Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler* 1. Auflage., München: Elsevier Ltd.
- OECD, 2001. CONSENSUS DOCUMENT ON THE BIOLOGY OF POPULUS L. (POPLARS). *Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology No.*, (16).
- Onkokesung, N., Gális, I. & von Dahl, C.C., 2010. Jasmonic acid and ethylene modulate local responses to wounding and simulated herbivory in *Nicotiana attenuata* leaves. *Plant physiology*, 153(2), pp.785–98.
- Van Poecke, R.M., Posthumus, M a & Dicke, M, 2001. Herbivore-induced volatile production by *Arabidopsis thaliana* leads to attraction of the parasitoid *Cotesia rubecula*: chemical, behavioral, and gene-expression analysis. *Journal of chemical ecology*, 27(10), pp.1911–28.
- Ralph, S., Oddy, C. & Cooper, D., 2006. Genomics of hybrid poplar (*Populus trichocarpax deltoides*) interacting with forest tent caterpillars (*Malacosoma disstria*): normalized and full-length cDNA libraries, expressed sequence tags, and a cDNA microarray for the study of insect-induced defences. *Molecular ecology*, 15(5), pp.1275–97.
- Rohdich, F. & Hecht, S., 2002. Studies on the nonmevalonate terpene biosynthetic pathway: metabolic role of IspH (LytB) protein. *PNAS*, 99(3), pp.1158–1163.
- Settler, R.F., Bradshaw, H.D. & Heilman, P.E., 1996. *Biology of Populus and its implications for management and conservation*, NRC Research Press.
- Shulaev, V., Silverman, P. & Raskin, I., 1997. Airborn signalling by methyl salicylate in plant pathogen resistance. *Nature*, 385(20), pp.718–721.
- Taiz, L. & Zeiger, E., 2010. *Plant Physiology* 5th ed., Sinauer.
- Tholl, D., Boland, W. & Hansel, A., 2006. Practical approaches to plant volatile analysis. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 45(4), pp.540–60.
- Tooker, J.F. & Moraes, C.M., 2011. Feeding by a gall-inducing caterpillar species alters levels of indole-3-acetic and abscisic acid in *Solidago altissima* (Asteraceae) stems. *Arthropod-Plant Interactions*, 5(2), pp.115–124.
- Turlings, T.C., Tumlinson, J.H. & Lewis, W.J., 1990. Exploitation of herbivore-induced plant odors by host-seeking parasitic wasps. *Science (New York, N.Y.)*, 250(4985), pp.1251–3.

- Tuskan, G. a, Difazio, S. & Jansson, S, 2006. The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science (New York, N.Y.)*, 313(5793), pp.1596–604.
- Walling, L., 2000. The myriad plant responses to herbivores. *Journal of Plant Growth Regulation*, pp.195–216.
- Wang, K., Yang, H. & Guo, S., 2012. Organosolv fractionation process with various catalysts for improving bioconversion of triploid poplar. *Process Biochemistry*, 47(10), pp.1503–1509.
- Wilfinger, W., Mackey, K. & Chomczynski, P., 1997. Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques*.
- Williams, L., Rodriguez-Saona, C. & Paré, P.W., 2005. The piercing-sucking herbivores *Lygus hesperus* and *Nezara viridula* induce volatile emissions in plants. *Archives of insect biochemistry and physiology*, 58(2), pp.84–96.

Anhang

Genomische Nukleotidsequenz von *PtTPS10-1* und *PtTPS10-2*.

| | | | | | | | | |
|-----------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|------------|------------|
| | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80 |
| POPTR_004s03810 | ATGGTTCGG | ATATGTCCGA | ACCATGTCAA | CCCATGTTCA | AGAAGTCTT | GGATTGGGTG | CTCAACAACC | AGAACGTAGA |
| PtTPS10-1 | ATGGTTCGG | ATATGTCCGA | ACCATGTCAA | CCCATGTTCA | AGAAGTCTT | GGATTGGGTG | CTCAACAACC | AGAACGTAGA |
| PtTPS10-2 | ATGGTTCGG | ATATGTCCGA | ACCATGTCAA | CCCATGTTCA | AGAAGTCTT | GGATTGGGTG | CTCAACAACC | AGAACGTAGA |
| | 90 | 100 | 110 | 120 | 130 | 140 | 150 | 160 |
| POPTR_004s03810 | AGGGTTCTGG | GGAGAGTATG | ATGGCCATGG | CATGCCCACT | ATTGAATGCC | TTCTGCAAC | AATTGCTTGC | ATGATTGCAC |
| PtTPS10-1 | AGGGTTCTGG | GGAGAGTATG | ATGGCCATGG | CATGCCCACT | ATTGAATGCC | TTCTGCAAC | AATTGCTTGC | ATGATTGCAC |
| PtTPS10-2 | AGGGTTCTGG | GGAGAGTATG | ATGGCCATGG | CATGCCCACT | ATTGAATGCC | TTCTGCAAC | AATTGCTTGC | ATGATTGCAC |
| | 170 | 180 | 190 | 200 | 210 | 220 | 230 | 240 |
| POPTR_004s03810 | TCAAACGGTG | GAATGCAGGA | GAATGATTA | TTGATAAAGG | TATGGCCTTC | ATTGAAGCTA | ACGCAGAGAA | GCTTATTGGA |
| PtTPS10-1 | TCAAACGGTG | GAATGCAGGA | GAATGATTA | TTGATAAAGG | TATGGCCTTC | ATTGAAGCTA | ACGCAGAGAA | GCTTATTGGA |
| PtTPS10-2 | TCAAACGGTG | GAATGCAGGA | GAATGATTA | TTGATAAAGG | TATGGCCTTC | ATTGAAGCTA | ACGCAGAGAA | GCTTATTGGA |
| | 250 | 260 | 270 | 280 | 290 | 300 | 310 | 320 |
| POPTR_004s03810 | GAGATATATG | ACTCTAACTG | TCCTCGTTGG | TTTGCCATCG | TTTTCCCTGC | AATGGTTGAG | ATGGCACAAA | TTAATGGTCT |
| PtTPS10-1 | GAGATATATG | ACTCTAACTG | TCCTCGTTGG | TTTGCCATCG | TTTTCCCTGC | AATGGTTGAG | ATGGCACAAA | TTAATGGTCT |
| PtTPS10-2 | GAGATATATG | ACTCTAACTG | TCCTCGTTGG | TTTGCCATCG | TTTTCCCTGC | AATGGTTGAG | ATGGCACAAA | TTAATGGTCT |
| | 330 | 340 | 350 | 360 | 370 | 380 | 390 | 400 |
| POPTR_004s03810 | GGAGATCATT | TTTCTGATC | GGATAAAGAG | GGTTGAGATG | AGCATATTCT | ACAAAAGGGA | ACAAATTCTT | GAAAGGGAAG |
| PtTPS10-1 | GGAGATCATT | TTTCTGATC | GGATAAAGAG | GGTTGAGATG | AGCATATTCT | ACAAAAGGGA | ACAAATTCTT | GAAAGGGAAG |
| PtTPS10-2 | GGAGATCATT | TTTCTGATC | GGATAAAGAG | GGTTGAGATG | AGCATATTCT | ACAAAAGGGA | ACAAATTCTT | GAAAGGGAAG |
| | 410 | 420 | 430 | 440 | 450 | 460 | 470 | 480 |
| POPTR_004s03810 | AACTTGTGGA | CAAGTATCAT | TATCCTCCAT | TACTATCATA | TCTTGAAGCA | TTGCCCTGCTC | TATATAATTT | TGATCAAGAA |
| PtTPS10-1 | AACTTGTGGA | CAAGTATCAT | TATCCTCCAT | TACTATCATA | TCTTGAAGCA | TTGCCCTGCTC | TATATAATTT | TGATCAAGAA |
| PtTPS10-2 | AACTTGTGGA | CAAGTATCAT | TATCCTCCAT | TACTATCATA | TCTTGAAGCA | TTGCCCTGCTC | TATATAATTT | TGATCAAGAA |
| | 490 | 500 | 510 | 520 | 530 | 540 | 550 | 560 |
| POPTR_004s03810 | GATGCACTTA | AGCACTTGCA | TGCCGATGGT | TCATTATTC | AATCCCCTC | TGCTACAGCA | AGTGCCTTCA | TGGCTACTGG |
| PtTPS10-1 | GATGCACTTA | AGCACTTGCA | TGCCGATGGT | TCATTATTC | AATCCCCTC | TGCTACAGCA | AGTGCCTTCA | TGGCTACTGG |
| PtTPS10-2 | GATGCACTTA | AGCACTTGCA | TGCCGATGGT | TCATTATTC | AATCCCCTC | TGCTACAGCA | AGTGCCTTCA | TGGCTACTGG |
| | 570 | 580 | 590 | 600 | 610 | 620 | 630 | 640 |
| POPTR_004s03810 | AAACAAAGAC | TGCTTGAATT | ACCTTCAAAC | TTTAGTTCAA | AAATGTACTA | ATGGAGTCCC | ACAAACTTAT | CCTATGGATG |
| PtTPS10-1 | AAACAAAGAC | TGCTTGAATT | ACCTTCAAAC | TTTAGTTCAA | AAATGTACTA | ATGGAGTCCC | ACAAACTTAT | CCTATGGATG |
| PtTPS10-2 | AAACAAAGAC | TGCTTGAATT | ACCTTCAAAC | TTTAGTTCAA | AAATGTACTA | ATGGAGTCCC | ACAAACTTAT | CCTATGGATG |
| | 650 | 660 | 670 | 680 | 690 | 700 | 710 | 720 |
| POPTR_004s03810 | AAGAGCTATT | AAAGCTTTGT | ATGGTTAACC | AATTGCAAAG | GTTGGGTTTG | GCTGAGCATT | TTAACCAAGA | GATTGAAGAA |
| PtTPS10-1 | AAGAGCTATT | AAAGCTTTGT | ATGGTTAACC | AATTGCAAAG | GTTGGGTTTG | GCTGAGCATT | TTAACCAAGA | GATTGAAGAA |
| PtTPS10-2 | AAGAGCTATT | AAAGCTTTGT | ATGGTTAACC | AATTGCAAAG | GTTGGGTTTG | GCTGAGCATT | TTAACCAAGA | GATTGAAGAA |
| | 730 | 740 | 750 | 760 | 770 | 780 | 790 | 800 |
| POPTR_004s03810 | CTGCTGGAAC | AAGTTTACAG | GAATTACATG | AACCGAGAGT | CATGGCCAAA | ATGGACAAAT | TCGATGGCAA | CACAGCTATA |
| PtTPS10-1 | CTGCTGGAAC | AAGTTTACAG | GAATTACATG | AACCGAGAGT | CATGGCCAAA | ATGGACAAAT | TCGATGGCAA | CACAGCTATA |
| PtTPS10-2 | CTGCTGGAAC | AAGTTTACAG | GAATTACATG | AACCGAGAGT | CATGGCCAAA | ATGGACAAAT | TCGATGGCAA | CACAGCTATA |

| | 810 | 820 | 830 | 840 | 850 | 860 | 870 | 880 |
|-----------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|------------|------------|
| POPTR_004s03810 | | | | | | | | |
| PtTPS10-1 | CAAAGACTCT | TTGGCATTTC | GTCTACTGAG | GATGCATGGA | TTTCGTGTAT | CTCCATGTAT | GATGGTTCTT | AACTATGCCA |
| PtTPS10-2 | CAAAGACTCT | TTGGCATTTC | GTCTACTGAG | GATGCATGGA | TTTCGTGTAT | CTCCATG--- | ----- | ----- |
| | 890 | 900 | 910 | 920 | 930 | 940 | 950 | 960 |
| POPTR_004s03810 | | | | | | | | |
| PtTPS10-1 | GTACTTACAA | GCACTGCGTC | TTCTTACTCC | TTCATTCCCT | TTTTTTTCCA | GGGATGTTTT | GTTGGTTCTT | ACTTGAAGAA |
| PtTPS10-2 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ---GATGTTTT | GTTGGTTCTT | ACTTGAAGAA |
| | 970 | 980 | 990 | 1000 | 1010 | 1020 | 1030 | 1040 |
| POPTR_004s03810 | | | | | | | | |
| PtTPS10-1 | GAAGTTCAAG | ATCAAATAGA | AAGCAACCAT | GAATATTTCT | CAAGTGTAAT | TCTTAATGTT | TATCGAGCTA | CCGATCTTAT |
| PtTPS10-2 | GAAGTTCAAG | ATCAAATAGA | AAGCAACCAT | GAATATTTCT | CAAGTGTAAT | TCTTAATGTT | TATCGAGCTA | CCGATCTTAT |
| | 1050 | 1060 | 1070 | 1080 | 1090 | 1100 | 1110 | 1120 |
| POPTR_004s03810 | | | | | | | | |
| PtTPS10-1 | GTTTCCTGGA | GACCATGAAC | TTGAGGAGGC | AAGGTCATTT | TCAAGGAAGT | TGCTTGAGAA | AACCACATCA | ATGGGAAACG |
| PtTPS10-2 | GTTTCCTGGA | GACCATGAAC | TTGAGGAGGC | AAGGTCATTT | TCAAGGAAGT | TGCTTGAGAA | AACCACATCA | ATGGGAAACG |
| | 1130 | 1140 | 1150 | 1160 | 1170 | 1180 | 1190 | 1200 |
| POPTR_004s03810 | | | | | | | | |
| PtTPS10-1 | AAGACCAACA | TACTGTTCTT | TTTCCAAGTT | TCCACTCGGT | GATTAAGCAT | GAGTTGAGGT | TTCCATGGAT | GGCTCGACTG |
| PtTPS10-2 | AAGACCAACA | TACTGTTCTT | TTTCCAAGTT | TCCACTCGGT | GATTAAGCAT | GAGTTGAGGT | TTCCATGGAT | GGCTCGACTG |
| | 1210 | 1220 | 1230 | 1240 | 1250 | 1260 | 1270 | 1280 |
| POPTR_004s03810 | | | | | | | | |
| PtTPS10-1 | GATCACCTGG | AGCATAGAAT | GTGGATGGAA | GAAAAGAATA | GCTCCGAAAG | AAAAGAAAAT | GTCACACACT | GGAACATAGT |
| PtTPS10-2 | GATCACCTGG | AGCATAGAAT | GTGGATGGAA | GAAAAGAATA | GCTCCG--- | ----- | GTC----- | -----T |
| | 1290 | 1300 | 1310 | 1320 | 1330 | 1340 | 1350 | 1360 |
| POPTR_004s03810 | | | | | | | | |
| PtTPS10-1 | AATGATGTTG | ACTAATATTC | AAAGTTTGA | TACCTGCAGG | TTATCATGCC | TTCATAATGA | CAAACCTAAG | CAACTGGCTG |
| PtTPS10-2 | ATGGATGGG- | ----- | AAAGACCTCC | TTCC-ATAGG | TTATCATGCC | TTCATAATGA | CAAACCTAAG | CAACTGGCTG |
| | 1370 | 1380 | 1390 | 1400 | 1410 | 1420 | 1430 | 1440 |
| POPTR_004s03810 | | | | | | | | |
| PtTPS10-1 | TGAAAACTA | CGAGTTTCGA | CAAACGACAT | ACAAGAGTGA | ATTGGAAGAA | CTGACAAGGT | GGTCTAAGAG | CTGGGGCCTT |
| PtTPS10-2 | TGAAAACTA | CGAGTTTCGA | CAAACGACAT | ACAAGAGTGA | ATTGGAAGAA | CTGACAAGGT | GGTCTAAGAG | CTGGGGCCTT |
| | 1450 | 1460 | 1470 | 1480 | 1490 | 1500 | 1510 | 1520 |
| POPTR_004s03810 | | | | | | | | |
| PtTPS10-1 | AGTGACATGG | GGTTCGGCCG | AGAGAAAAC | CGGTATTGCT | ACTTTGCCGT | TGCTGCTAGC | ACATCACTAC | CTCAGGATTC |
| PtTPS10-2 | AGTGACATGG | GGTTCGGCCG | AGAGAAAAC | CGGTATTGCT | ACTTTGCCGT | TGCTGCTAGC | ACATCACTAC | CTCAGGATTC |
| | 1530 | 1540 | 1550 | 1560 | 1570 | 1580 | 1590 | 1600 |
| POPTR_004s03810 | | | | | | | | |
| PtTPS10-1 | TGAGATCAGA | ATGATGGTAG | CAAAGAGTGC | TATAGTTATC | ACAGTTGCTG | ATGATTTTTA | TGATATGGAA | GGCTCTCTTG |
| PtTPS10-2 | TGAGATCAGA | ATGATGGTAG | CAAAGAGTGC | TATAGTTATC | ACAGTTGCTG | ATGATTTTTA | TGATATGGAA | GGCTCTCTTG |
| | 1610 | 1620 | 1630 | 1640 | 1650 | 1660 | 1670 | 1680 |
| POPTR_004s03810 | | | | | | | | |
| PtTPS10-1 | ATGATTTGGA | AAAAATCACA | GATGCAGTTC | AGAGATGGGA | TGCTACGGGC | TTGAGTGGCC | ACAGTAAGAC | TATCTTTGAT |
| PtTPS10-2 | ATGATTTGGA | AAAAATCACA | GATGCAGTTC | AAAGATGGGA | TGCTACGGGC | TTGAGTGGCC | ACAGTAAGAC | TATCTTTGAT |
| | 1690 | 1700 | 1710 | 1720 | 1730 | 1740 | 1750 | 1760 |
| POPTR_004s03810 | | | | | | | | |
| PtTPS10-1 | GCCCTTGACA | GCCTTGTA | CGAATTAGCA | AGAAAATACT | TCCGGCAACA | CGGAACCGAT | ATAACAAACA | GTCTCCGAGA |
| PtTPS10-2 | GCCCTTGACA | GCCTTGTA | CGAATTAGCA | AGAAAATACT | TCCGGCAACA | CGGAACCGAT | ATAACAAACA | GTCTCCGAGA |
| | 1770 | 1780 | 1790 | 1800 | 1810 | 1820 | 1830 | 1840 |
| POPTR_004s03810 | | | | | | | | |
| PtTPS10-1 | TATATGGAGT | GAAACATTTG | CTTCCTGGTT | TACGGAAGCT | AAATGGAGTA | AAAGTGGATT | CATACCTGCA | GCTGAAGAGT |
| PtTPS10-2 | TATATGGAGT | GAAACATTTG | CTTCCTGGTT | TACGGAAGCT | AAATGGAGTA | AAAGTGGATT | CATACCTGCA | GCTGAAGAGT |

```

      1850      1860      1870      1880      1890      1900      1910      1920
POPTR_004s03810  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
PtTPS10-1       ATCTTGAGAC TGGCATGACA TCTATTGCTT CACACACCTT GTTCTTCCA GCTTCATGTT TCTTGAGTCC AAGCATACCA
PtTPS10-2       ATCTTGAGAC TGGCATGACA TCTATTGCTT CACACACCTT GTTCTTCCA GCTTCATGTT TCTTGAGTCC AAGCATACCA

      1930      1940      1950      1960      1970      1980      1990      2000
POPTR_004s03810  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
PtTPS10-1       GATTACAAAC TAAATCCAGT CCAATATGAA AGCATTACCA AATTATTAAT GGTTCATCCCT CGTTTGTGTA ATGACATACA
PtTPS10-2       GATTACAAAC TAAATCCAGC CCAATATGAA AGCATTACCA AATTATTAAT GGTTCATCCCT CGTTTGTGTA ATGACATACA

      2010      2020      2030      2040      2050      2060      2070      2080
POPTR_004s03810  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
PtTPS10-1       GAGTTATAAG AAGGAACAAA AGGAAGGGAA AACCAACTTT GTTTTGCTCC ACTTGAAGA AAATCCAGAG GCAGACATCG
PtTPS10-2       GAGTTATAAG AAGGAACAAA AGGAAGGGAA AACCAACTTT GTTTTGCTCC ACTTGAAGA AAATCCAGAG GCAGACATCG

      2090      2100      2110      2120      2130      2140      2150      2160
POPTR_004s03810  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
PtTPS10-1       AAGATTCAAT TGCCTACGCC AGAGAGATTC TTGACAAAAA GAAGAAAGAG CTGCTGGAAC ATGCTCTAAT GGATGGTTTT
PtTPS10-2       AAGATTCAAT TGCCTACGCC AGAGAGATTC TTGACAAAAA GAAGAAAGAG CTGCTGGAAC ATGCTCTAAT GGATGGTTTT

      2170      2180      2190      2200      2210      2220      2230      2240
POPTR_004s03810  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
PtTPS10-1       AATGATTTCT CTAAACCTTG CAGGCATCTC CACTTATCTT GTGTGAAAGT TTTTCAGATG TTCTTTGATT CCAGCAATAG
PtTPS10-2       AATGATTTCT CTAAACCTTG CAGGCATCTC CACTTATCTT GTGTGAAAGT TTTTCAGATG TTCTTTGATT CCAGCAATAG

      2250      2260      2270      2280      2290      2300      2310      2320
POPTR_004s03810  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
PtTPS10-1       ATATGACTCC AACACAGAAA TGTTCGAAGA CATTCAAAAA GCATTTTATA TTCCTGTAGA AGTTGGAGCA CCAAAGCCTC
PtTPS10-2       ATATGACTCC AACACAGAAA TGTTCGAAGA CATTCAAAAA GCATTTTATA TTCCTGTAGA AGTTGGAGCA CCAAAGCCTC

      2330      2340      2350      2360      2370      2380      2390      2400
POPTR_004s03810  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
PtTPS10-1       TGCCTCCTCA TCCCGGATCA AACAGAGAT ATCCAACAGT AGTAGCCAGC TATCACTTCA ATCAGCGGTA CAAAATCGA
PtTPS10-2       TGCCTCCTCA TCCCGGATCA AACAGAGAT ATCCAACAGT AGTAGCCAGC TATCACTTCA ATCAGCGGTA CAAAATCGA

      2410      2420      2430      2440      2450      2460      2470      2480
POPTR_004s03810  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
PtTPS10-1       ATCATTAGAT TGGCTGCAA CAGTGTGTT TCTCATCCTA TTTCAGGAAA TCCATACATG AAGATGCCTA TGGCACCGAA
PtTPS10-2       ATCATTAGAT TGGCTGCAA CAGTGTGTT TCTCATCCTA TTTCAGGAAA TCCATACATG AAGATGCCTA TGGCACCGAA

      2490      2500
POPTR_004s03810  ....|....| ....|....| ..
PtTPS10-1       GTTAAAATTC TGTTCATGT A-
PtTPS10-2       GTTAAAATTC TGTTCATGT GA

```

Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Vor allem möchte ich Herrn Dr. Tobias Köllner für die Bereitstellung des interessanten Themas, für die Begutachtung dieser Bachelorarbeit und für die Möglichkeit die vorliegende Arbeit in der Abteilung Biochemie am Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie durchzuführen zu können, herzlich danken. Besonders dankbar bin ich für die gute Betreuung und die vielen hilfreichen Hinweise im Labor und zum Verfassen dieser Arbeit.

Bei Sandra Irmisch, Vinzenz Handrick und Philipp Zeltner möchte ich mich für die vielen Hilfestellungen und ihre Geduld bei der Beantwortung meiner Fragen bedanken.

Des Weiteren gilt mein Dank PD Dr. Klaus-J. Appenroth vom Institut für Pflanzenphysiologie der FSU Jena für die Bereitschaft zur Erstellung eines Gutachtens dieser Arbeit.

Den Mitgliedern der Abteilung Biochemie danke ich für die nette Zusammenarbeit und angenehme Arbeitsatmosphäre im Labor.

Ein ganz spezieller Dank gilt meiner Familie für ihre Unterstützung und ihr Vertrauen. Meiner Schwester möchte ich besonders für die Unterstützung bei der Korrektur der Arbeit danken.

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich,

dass die vorliegende Arbeit ohne fremde Hilfe angefertigt wurde und dass die Übernahme wörtlicher Zitat aus der Literatur sowie die Verwendung der Gedanken anderer Autoren gekennzeichnet wurden. Zudem erkläre ich, dass diese Bachelorarbeit zu keiner anderen Prüfung vorgelegt wurde.

Ich bin mir bewusst, dass eine falsche Erklärung rechtliche Folgen haben wird.

Ort, Datum

Unterschrift

