

Friedrich-Schiller-Universität Jena
Biologisch-Pharmazeutische Fakultät
Max-Planck-Institut für chemische Ökologie
Abteilung Biochemie
Arbeitsgruppe Biosynthese und Funktion flüchtiger
Stoffe in Gehölzpflanzen und Gräsern



seit 1558

Charakterisierung von Diterpensynthesen der Westlichen Balsam-Pappel (*Populus trichocarpa*)

Bachelorarbeit
zur Erlangung des Grades eines
Bachelor of Science (B.Sc.)
vorgelegt von
Andrea Müller
aus Burgkunstadt

Jena, 05.08.2014

Gutachter:

Dr. Tobias Köllner

PD. Dr. Jörg Müller

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
1.1 Überblick über die Terpenbiosynthese	2
1.2 Pflanzliche Diterpensynthesen (DiTPS)	4
1.2.1 Vielfalt der von Diterpensynthesen-vermittelten Reaktionen	4
1.2.2 Struktur- Funktionsbeziehung der Diterpensynthesen	6
1.2.3 Bedeutung der Diterpensynthesen und deren Produkte	8
1.3 Die Westliche Balsam-Pappel (<i>Populus trichocarpa</i>) als Modellorganismus	9
1.4 Zielstellung	10
2 Material und Methoden	11
2.1 Pflanzenmaterial	11
2.2 Chemikalien	11
2.3 Mikrobiologische Arbeiten	11
2.3.1 Bakterienstämme	11
2.3.2 Bakterienkultivierung	12
2.3.3 Transformation von <i>E. coli</i>	12
2.4 Isolierung von Nukleinsäuren	12
2.4.1 Isolierung der Gesamt-RNA aus Pflanzenmaterial	12
2.4.2 Isolierung von Plasmiden aus <i>E. coli</i>	13
2.5 Arbeiten mit DNA	13
2.5.1 Vektoren	13
2.5.2 Oligonukleotide	13
2.5.3 PCR-Techniken	14
2.5.3.1 Phusion-PCR	15
2.5.3.2 Kolonie-PCR	15

2.5.3.3 Mutagenese-PCR.....	16
2.5.3.4 Sequenzierung.....	17
2.5.3.5 quantitative Realtime-PCR (qRT-PCR)	18
2.5.4 Agarosegelelektrophorese.....	19
2.5.5 DNA-Isolierung aus Agarosegelen.....	20
2.5.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	20
2.5.7 Ligation von DNA-Fragmenten	20
2.5.8 Restriktionsverdau	21
2.5.9 cDNA-Synthese	22
2.6 Genexpression und Proteinbiochemie	23
2.6.1 Heterologe Genexpression von Diterpensynthesesequenzen	23
2.6.2 Gewinnung des Proteinrohextraktes.....	23
2.6.3 Bioassay zur Aktivitätsbestimmung	24
2.7 chemische Analyse	25
2.7.1 Hexanextraktion apolarer Stoffe aus verschiedenen Organen	25
2.7.2 SPME zur Analyse volatiler Stoffe aus verschiedenen Organen	25
2.7.3 Gaschromatographische Analyse der Naturstoffe (GC-MS)	25
2.7.4 Qualitative und Quantitative Auswertung der GC-MS-Auftrennung	26
2.8 Computergestützte Analytik.....	27
2.8.1 Phylogenetische Analyse	27
2.8.2 Proteinsequenzanalyse	27
2.8.3 Modelling dreidimensionaler Proteinstrukturen	28
3 Ergebnisse.....	29
3.1 Sequenzanalyse putativer Kaurensynthasen der Pappel	29
3.2 Funktionelle Charakterisierung der putativen KS(L).....	32
3.3 Mutation-basierte Untersuchung der Produktspezifität von PtKS1a und PtKS1b	33
3.4 organspezifische Expressionsraten der <i>DiTPS</i>	35

3.5 Diterpene in Geweben von <i>P. trichocarpa</i>	36
4 Diskussion	37
4.1 <i>Potri.008G082400</i> und <i>Potri.008G082700</i> sind durch Genduplikation entstandene Gene für monofunktionale <i>ent</i> -Kaurensynthasen und Kaurensynthase- ähnliche Proteine	37
4.2 Es ist unklar, ob es sich bei <i>PtKS1a</i> und <i>PtKS1b</i> um Allele oder Gene handelt .	38
4.3 <i>PtKS1a</i> und <i>PtKS1b</i> weisen unterschiedliche Produktspezifität auf und die codierenden Gene werden organspezifisch exprimiert	39
4.3.1 Das Produkt von <i>PtKS1a</i> <i>ent</i> -Kaur-16-en ist vermutlich in die Gibberellinbiosynthese involviert.....	40
4.3.2 16 α -Hydroxy- <i>ent</i> -Kauran ist vermutlich auf noch unbekannte Weise in der Rhizosphäre aktiv	41
4.4 Die Produktspezifität von <i>PtKS1a</i> und <i>PtKS1b</i> wird von einer einzelnen Aminosäure bestimmt	43
5 Zusammenfassung	45
6 Literaturverzeichnis	46
7 Anhang	51
7.1 cDNA-Sequenzen	51
7.1.1 <i>PtKS1a</i>	51
7.1.2 <i>PtKS1b</i>	51
7.1.3 <i>PtKS2</i>	52
7.2 Daten der SPME-Extraktion	53
7.3 Daten der Hexanextraktion	56
7.4 Relative Expressionsraten von <i>PtKS1a,b</i> und <i>PtKS2</i>	59
Danksagung.....	60
Selbstständigkeitserklärung.....	61

TABELLENVERZEICHNIS

TAB. 2.1: Liste aller Vektoren unter Angabe des Verwendungszwecks und der vermittelten Resistenz.....	13
TAB. 2.2: Liste der Namen und Sequenzen aller verwendeten Oligonukleotide.....	14
TAB. 2.3: Pipettierschema für Phusion-PCR.....	15
TAB. 2.4: Thermocycler-Programm für Phusion-PCR.....	15
TAB. 2.5: Pipettierschema für Kolonie-PCR.....	15
TAB. 2.6: Thermocycler-Programm für Kolonie-PCR.....	16
TAB. 2.7: Pipettierschema für Mutagenese-PCR.....	16
TAB. 2.8: Thermocycler-Programm für Mutagenese-PCR.....	16
TAB. 2.9: Pipettierschema für Sequenzierungs-PCR.....	17
TAB. 2.10: Thermocycler-Programm für Sequenzierungs-PCR.....	17
TAB. 2.11: Pipettierschema für qRT-PCR.....	19
TAB. 2.12: Programm für Fast-2-Step-qRT-PCR und Dissoziationskurve.....	19
TAB. 2.13: Ansatz Kontrollverdau für Expressionsvektoren.....	21
TAB. 2.14: Ansatz Kontrollverdau für Sequenzierungsvektoren.....	21
TAB. 2.15: Ansatz DNase I-Verdau.....	22
TAB. 2.16: Pipettierschema und Inkubationsparameter der cDNA-Synthese.....	22
TAB. 2.17: Ansatz Assay zur Aktivitäts- und Produktbestimmung.....	24
TAB. 2.18: Temperaturprofile der GC-Programme.....	26
TAB. 2.19: Herkunft und Zugangsnr. der zur phylogenetischen Untersuchung verwendeten Proteinsequenzen.....	27
TAB. 7.1: Identifizierte Naturstoffe von SPME-Extrakten aus Stängeln von <i>P. trichocarpa</i>	53
TAB. 7.2: Identifizierte Naturstoffe von SPME-Extrakten aus Wurzeln von <i>P. trichocarpa</i>	54
TAB. 7.3: Identifizierte Naturstoffe von SPME-Extrakten aus Blättern von <i>P. trichocarpa</i>	54
TAB. 7.4: Identifizierte Naturstoffe von SPME-Extrakten aus Knospen von <i>P. trichocarpa</i>	56
TAB. 7.5: Identifizierte Naturstoffe aus Hexanextrakten aus Stängeln von <i>P. trichocarpa</i>	56

TAB. 7.6: Identifizierte Naturstoffe aus Hexanextrakten aus Wurzeln von <i>P. trichocarpa</i>	57
TAB. 7.7: Identifizierte Naturstoffe aus Hexanextrakten aus Blättern von <i>P. trichocarpa</i>	58
TAB. 7.8: Identifizierte Naturstoffe aus Hexanextrakten aus Knospen von <i>P. trichocarpa</i>	58
TAB. 7.9: Prozentuale Anteile von <i>PtKS1a,b</i> und <i>PtKS2</i> an der Transkriptmenge der KS(L)-Gene in den einzelnen Organen.....	59

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1.1: Überblick über die Terpenbiosynthese (modifiziert nach Tholl, 2006).....	3
Abb. 1.2: Raumstruktur der bifunktionalen Diterpensynthase PpCPS/KS aus <i>Physcomitrella patens</i> ..	6
Abb. 3.1: Phylogenetische Analyse der putativen Kaurensynthasen (KS) und Copalylpyrophosphatsynthasen (CPS) der Westlichen Balsam-Pappel (<i>Populus trichocarpa</i>).....	29
Abb. 3.2: Proteinsequenzvergleich von PtKS1a, PtKS1b und PtKS2 mit bereits charakterisierten CPS und KS aus <i>P. trichocarpa</i> und <i>A. thaliana</i>	31
Abb. 3.3: Bildung von <i>ent</i> -Kaur-16-en und 16 α -Hydroxy- <i>ent</i> -Kauran durch PtKS1a beziehungsweise PtKS1b.....	32
Abb. 3.4: Modellierung der Raumstruktur von PtKS1a.....	33
Abb. 3.5: Produktspezifität von PtKS1b und mutPtKS1b _(T→M)	34
Abb. 3.6: Relative Expressionsraten von <i>PtCPS1</i> , <i>PtCPS2</i> und <i>PtKS1a,b + PtKS2</i>	35
Abb. 4.1: Die KS(L)-Gene auf Chromosomen 8.....	37
Abb. 4.2: Modell zur Bildung von <i>ent</i> -Kaur-16-en und 16 α -Hydroxy- <i>ent</i> -Kauran aus dem <i>ent</i> -Kauranylkatation (modifiziert nach Kawaide et al., 2011).....	43

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<i>aqua bidest.</i>	bidestilliertes Wasser
<i>aqua dest.</i>	destilliertes Wasser
BD	BigDye™ Terminator Cycle Sequencing v2.0 Ready Reaction DNA Sequencing Kit
bp	base pair(s)
cDNA	<i>complementary</i> DNA
CPP	Copalylpyrophosphat
CPS	Copalylidiphosphatsynthase(n)
Ct	<i>threshold Cycle</i>
DiTPS	Diterpensynthase(n)
DMAPP	Dimethylallylpyrophosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleintriphosphat
DOXP	Deoxy-D-xylulose-5-phosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FPP	Farnesylpyrophosphat
fwd	<i>forward</i>
GAs	Gibberelline
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
GPP	Geranylpyrophosphat
GGPP	Geranylgeranylpyrophosphat
IPP	Isopentenylpyrophosphat
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
HCl	Salzsäure
HF	High Fidelity
HMG	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA
HP	Hewlett-Packard
kb	<i>kilobase pairs</i>
KS	<i>ent</i> -Kaurensynthasen
KSL	Kaurensynthase-ähnliche Proteine
LB	Luria- Bertani
Mb	<i>mega base pairs</i>
Met	Methionin
Mg ²⁺	Magnesiumion(en)
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MUSCLE	<i>multiple sequence comparison by log-expectation</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NEB	New England Biolabs
NH ₄ HCO ₃	Ammoniumhydrogencarbonat
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerasekettenreaktion
qRT-PCR	<i>quantitative real time-PCR</i>
rev	<i>reverse</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease

RT	<i>Reverse Transcriptase</i>
S.O.C.	<i>Super Optimal broth with Catabolite repression</i>
SPME	<i>solid phase microextraction</i>
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
Thr	Threonin
TPS	Terpensynthase
UV	ultraviolett

1 EINLEITUNG

Naturstoffe kommen in allen lebenden Organismen vor, wobei die meisten bisher aus Pflanzen isoliert wurden. Pflanzliche Naturstoffe lassen sich im Wesentlichen in drei große Untergruppen einteilen: Stickstoff-haltige Verbindungen, phenolische Substanzen und Terpene (Bartwal et al., 2013). Dabei stellen Terpene mit mehr als 22000 verschiedenen Strukturen die größte Gruppe von pflanzlichen Naturstoffen dar (Connolly and Hill, 1991).

Terpene spielen eine wichtige Rolle in der Medizin und Industrie. So weisen einige von ihnen pharmakologische Eigenschaften auf. Beispielsweise erwiesen sich Derivate von Artemisinin, einem aus *Artemisia annua* isoliertem Sesquiterpen, wirksam gegen Malaria (Klayman, 1985). In der Krebstherapie wird das Terpenoid Taxol als Cytostatikum eingesetzt (Köksal et al., 2011b) und Carotinoide gelten im Allgemeinen als Antioxidantien und sollen vor verschiedenen Krebsarten schützen (Dillard und German, 2000). Auch die Vitamine A, E und K gehen auf Terpene zurück (Sell, 2006). Neben dem medizinischen Nutzen finden viele Terpene in der Kosmetikindustrie Verwendung. Geraniol dient beispielsweise zur Generierung eines Rosenduftes (Sell, 2006) und Menthol ist in Zahncreme und Salben zu finden. (Gusevskaya, 2014).

Auch für die Pflanze selbst spielen Terpene eine wichtige Rolle. So besitzen Hormone, photosynthetische Pigmente (z.B. Carotinoide), Elektronenüberträger (z.B. Ubichinon), und Membrankomponenten (Phytosterole) der Pflanzen terpenoide Grundstrukturen (McGarvey und Croteau, 1995). Terpene sind somit essentiell für das Überleben einer Pflanze, daher in jeder lebenden Zelle zu finden und dem sogenannten Grund- bzw. Primärmetabolismus zuzuordnen (Bartwal et al., 2013). Darüber hinaus sind Terpene auch im Sekundärmetabolismus von Pflanzen als sogenannte Sekundärmetabolite von Bedeutung. Sekundärmetabolite sind Stoffe, welche im Gegensatz zu beispielsweise Membrankomponenten, nicht zwingend notwendig für das Überleben einer Pflanze sind, ihr jedoch einen evolutiven Vorteil verschaffen. So können Terpene zur Abwehr von Herbivoren dienen oder als sogenannte Phytoalexine antimikrobielle Eigenschaften zeigen (Xu et al., 2004). Auch die Kommunikation in der Pflanze und zwischen benachbarten Pflanzen kann über Terpene gesteuert werden (Bartwal et al., 2013). Ein Beispiel für ein Terpenoid, das eine Rolle im Sekundärmetabolismus spielt, ist (*S*)-Linalool, welches von Blüten abgegeben wird und an der Anlockung von Bestäubern beteiligt ist (Pichersky und Gershenzon, 2002).

Die ökonomische Relevanz der Terpene und deren Bedeutung für Pflanze und Mensch machen die Analyse der Terpenbiosynthese sowie die Suche nach weiteren bioaktiven Terpenen zu einem wichtigen Forschungsgebiet.

1.1 ÜBERBLICK ÜBER DIE TERPENBIOSYNTHESE

Die Stoffklasse der Terpene ist über ihre biologischen Vorläufer definiert. Alle Terpene sind aus einer oder mehreren Isopreneinheiten (C_5 -Körper) aufgebaut, das heißt, sie werden aus Isopentenylpyrophosphat (IPP) und dessen Isomer Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) synthetisiert (McGarvey und Croteau, 1995). Diese C_5 -Vorläufer können in Pflanzen über zwei unterschiedliche Stoffwechselwege gewonnen werden, den cytosolischen Mevalonatweg und den plastidären 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat-Weg (DOXP-Weg) (Lichtenthaler, 1999). Beide Wege gehen dabei von unterschiedlichen Stoffwechselprodukten aus. Im Cytosol werden drei Einheiten AcetylCoA zu 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) umgesetzt. Die Reduktion von HMG-CoA zu Mevalonat durch das Schlüsselenzym HMG-CoA-Reduktase ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des Mevalonatweges (Lichtenthaler, 1999). In den Plastiden wird dagegen aus Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat der Zucker DOXP gebildet. Dieser wird von der DOXP-Reduktoisomerase zu 2-C-Methylerythritol-4-phosphat reduziert, was den Schlüsselschritt des DOXP-Weges darstellt (Takahashi et al., 1998). Anschließend wird aus 2-C-Methylerythritol-4-phosphat bzw. Mevalonat über weitere Zwischenstufen IPP und DMAPP synthetisiert. Da IPP für die Initiierung der nachfolgenden Reaktionen nicht reaktiv genug ist, erfolgt zum Teil eine Isomerisierung zu dem allylischen DMAPP (McGarvey und Croteau, 1995).

IPP und DMAPP werden von Prenyltransferasen sukzessive durch Kopf-zu-Schwanz- Additionen zu den linearen Prenylpyrophosphaten Geranylpyrophosphat (GPP, C_{10}), Farnesylpyrophosphat (FPP, C_{15}) und Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP, C_{20}) umgesetzt (Chen et al., 2011; Abbildung 1.1). Als Kopf wird dabei die Pyrophosphatgruppe bezeichnet, als Schwanz das aliphatische Ende des Moleküls. Der Syntheseort der einzelnen Prenylpyrophosphate ist dabei verschieden. GPP und GGPP werden hauptsächlich in den Plastiden gebildet wohingegen die Synthese von FPP vorwiegend im Cytosol stattfindet (Lichtenthaler, 1999).

Die Prenylpyrophosphate einschließlich DMAPP sind Ausgangsverbindungen für Hemiterpene (C_5 -Körper aus DMAPP), Monoterpene (C_{10} , aus GPP), Sesquiterpene (C_{15} , aus FPP) und Diterpene (C_{20} , aus GGPP) (Abbildung 1.1). Die Ausgangsverbindung aller Triterpene, das Squalen (C_{30}), wird aus einer Kopf-zu-Kopf-Kondensation zweier Moleküle FPP unter Verlust beider Pyrophosphatreste gewonnen und die Tetraterpenausgangsverbindung Phytoen (C_{40}) analog dazu aus zwei Molekülen GGPP (Chen et al., 2011). Die zusätzliche Addition von mehreren IPP-Einheiten an eines der Prenylpyrophosphate ermöglicht die Bildung von Polyterpenen (Gershenzon und Croteau, 1993).

Die Umsetzung der Prenylpyrophosphate zu Hemi-, Mono-, Sesqui-, und Diterpenen wird durch sogenannte Terpensynthasen katalysiert. Diesen Enzymen ist die enorme Vielfalt an Terpenen zu

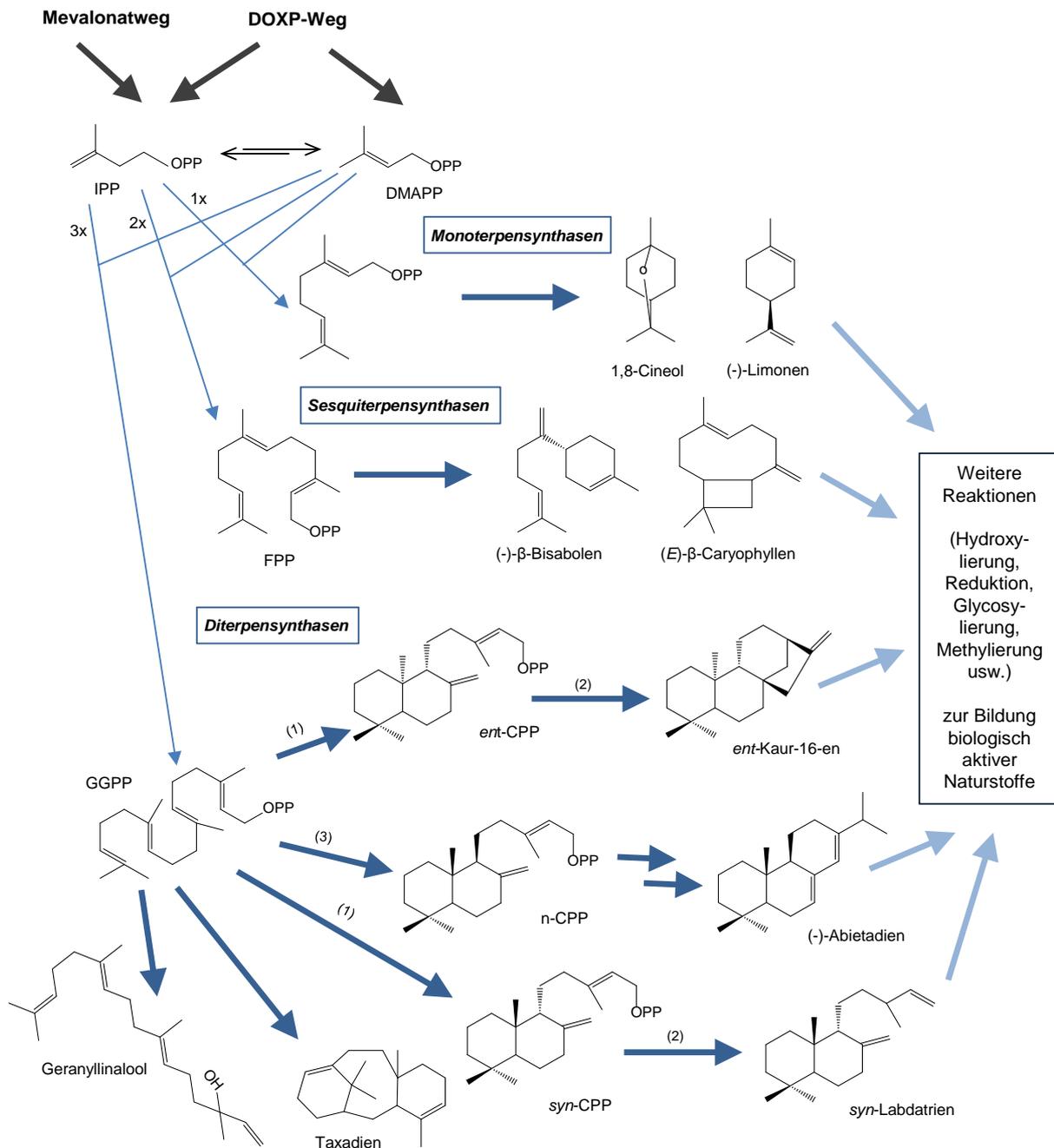


Abb. 1.1: Überblick über die Terpenbiosynthese (modifiziert nach Tholl, 2006). Die C_5 -Grundbausteine Isopentenylpyrophosphat (IPP) und Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) können aus zwei unterschiedlichen Stoffwechselwegen gewonnen werden, dem Mevalonat- und dem DOXP- (Deoxy-D-xylulose-5-phosphat-) Weg. Aus ihnen werden die Prenylpyrophosphate Geranylpyrophosphat (GPP), Farnesylpyrophosphat (FPP) und Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) synthetisiert. Terpensynthasen setzen diese zu Mono-, Sesqui- beziehungsweise Diterpenen um. Als Substrat für die Bildung von Diterpenen kann GGPP aber auch Copalylpyrophosphat (CPP) verwendet werden. Erfolgt die Reaktion über das Zwischenprodukt CPP gibt es 2 Möglichkeiten: Klasse II-Diterpensynthasen katalysieren die Reaktion von GGPP zu CPP (1), welches von Klasse I-Diterpensynthasen in das Diterpen umgewandelt wird (2) oder eine bifunktionale Klasse I/II-Diterpensynthase katalysiert beide dieser Reaktionen, in denen CPP jedoch nur als Intermediat auftritt (3). Alle Terpene können anschließend durch weitere Modifikationen zu einer Vielzahl von Terpenoiden umgewandelt werden.

verdanken. Durch eine Vielzahl an möglichen Reaktionen (vgl. 1.2.1) entstehen aus den linearen Prenylpyrophosphaten GPP, FPP und GGPP hunderte verschiedene acyclische und cyclische Mono-, Sesqui- beziehungsweise Diterpene (Bohlmann et al., 1998). Dabei gibt es in jeder Pflanze viele verschiedene Terpensynthesen. Im Genom des Weins (*Vitis vinifera*) wurden beispielsweise 69 verschiedene putative Terpensynthasegene gefunden (Chen et al., 2011). Zusätzlich sind Terpensynthesen oft auch in der Lage, aus einem spezifischen Substrat mehrere Produkte zu bilden (Degenhardt et al., 2009). Ein Beispiel für ein solches sogenanntes Multiproduktenzym ist die Sesquiterpensynthase PtTPS1 aus der Balsampappel (*Populus trichocarpa*) welche das Substrat FPP zu 8 Hauptprodukten und mehr als 30 Nebenprodukten umwandelt (Danner et al., 2011).

Alle bisher charakterisierten Terpensynthesen lassen sich ihrer phylogenetischen Verwandtschaft nach in 8 Unterfamilien (TPS-a-h) einteilen, wobei Mono- und Sesquiterpensynthesen (TPS-a, TPS-b, TPS-g) aus Angiospermen sich separat von den entsprechenden Synthesen in Gymnospermen (Tps-d) gruppieren lassen (Bohlmann et al., 1998). Die Klassen TPS-c und TPS-e/f enthalten vor allem Diterpensynthesen (vgl. 1.2.1) und stellen die ältesten Terpensynthasegruppen dar (Chen et al., 2011). TPS-h umfasst putative Diterpensynthesen aus *Selaginella moellendorffii* (Chen et al., 2011).

1.2 PFLANZLICHE DITERPENSYNTHESEN (DiTPS)

1.2.1 VIELFALT DER VON DITERPENSYNTHESEN-VERMITTELTEN REAKTIONEN

Pflanzliche DiTPS sind für Bildung von Diterpenen aus dem Vorläufermolekül GGPP verantwortlich. In Abbildung 1.1 sind Beispiele für die strukturelle Vielfalt der gebildeten Produkte verschiedener DiTPS dargestellt. Trotz der Vielzahl der Strukturen von Diterpenen kann die Umsetzung von GGPP zu diesen im Wesentlichen auf zwei unterschiedliche Reaktionsmechanismen zurückgeführt werden, genauer gesagt auf zwei mögliche, grundlegend verschiedene, chemische Startreaktionen.

Nach Bohlmann et al. (1998) katalysieren als Klasse II- Terpensynthesen bezeichnete Enzyme Reaktionen, welche mit der Protonierung einer Doppelbindung des Prenylpyrophosphats starten. Dieser Mechanismus wurde bisher nur bei DiTPS und Triterpensynthesen beobachtet (Köksal et al., 2011a) und ist vor allem für die Synthese von Copalylpyrophosphat (CPP) von Bedeutung. CPP wird aus GGPP durch Protonierung der terminalen C_{14,15}- Doppelbindung (Peters et al., 2001), zwei anschließenden intramolekularen Additionsreaktionen zur Cyclisierung und einer terminalen Eliminierung des Protons gebildet (Bohlmann et al., 1998). Die meisten DiTPS, wie auch alle bekannten Mono- und Sesquiterpensynthesen, katalysieren die Synthese von Terpenen über den

Klasse I- Mechanismus. Als Substrat für Klasse I-DiTPS kann CPP oder GGPP dienen. Die Reaktion wird durch die Ionisation der Pyrophosphatgruppe initiiert. Das entstehende, reaktive allylische Carbokation ermöglicht verschiedene elektrophile Cyclisierungs- und Umlagerungsreaktionen, sowie verschiedene Terminationen durch Deprotonierung oder nukleophilen Angriff (Bohlmann et al., 1998).

Ein Beispiel für Klasse I- DiTPS, welche GGPP als Substrat verwenden, sind (*E,E*)-Geranylinaloolsynthasen. Sie katalysieren die Bildung des acyclischen Alkohols Geranylinalool durch Hydrolyse der Pyrophosphatgruppe und allylische Umlagerungen (Abbildung 1.1). Das Produkt ist als Ausgangsstoff für die Synthese des flüchtigen Homoterpens TMTT nach Herbivorie von Bedeutung (Tholl, 2011). Des Weiteren gibt es Klasse I-DiTPS, welche aus GGPP cyclische Produkte bilden. Ein Beispiel hierfür ist die Taxadiensynthese aus der Pazifischen Eibe (*Taxus brevifolia*), die die Bildung des makrocyclischen Taxadien aus GGPP katalysiert (Abbildung 1.1). Dieses ist der Vorläufer von Taxol, einem in der Krebstherapie angewandtem Cytostatikum (Köksal et al., 2011b). Die mit über 5000 beschriebenen Verbindungen (Xu et al., 2004) größte Untergruppe der Produkte von DiTPS, wird von Klasse II-DiTPS synthetisiert, welche CPP als Substrat verwenden. Stoffe dieser Gruppe weisen als gemeinsames Strukturmerkmal den Bicyclus der Labdanklasse auf (vgl. Struktur von *syn*-Labdatrien in Abbildung 1.1), weshalb sie als Labdan-ähnliche Diterpene bezeichnet werden (Xu et al., 2004). Die parallele Umsetzung der drei Stereoisomere des CPP (auch Labda-8(17),13-dien-15-ylpyrophosphat genannt), *ent*-, *syn*- und *n*-CPP, führt unter anderem zu der großen Anzahl an Labdan-ähnlichen bi- (z.B. *syn*-Labda-8(17),12E,14-trien), tri- ((-)-Abietadien) und tetracyclischen (*ent*-Kaur-16-en) Diterpenen (Abbildung 1.1) (Peters, 2010).

Die meisten DiTPS sind, wie in den Beispielen beschrieben, monofunktional, also nur einer der beiden Klassen zuzuordnen. So wird auch die Diterpenbildung von Angiospermen über CPP stets von zwei verschiedenen DiTPS katalysiert (Chen et al., 2011). Die Bildung von Labdan-ähnlichen Diterpenen über das Intermediat CPP kann aber auch von einer einzelnen DiTPS katalysiert werden, wie beispielsweise die Bildung von (-)-Abietadien durch die Abietadiensynthese der Küsten-Tanne (*Abies grandis*). Solche Enzyme weisen Klasse I und Klasse II- Aktivität auf und werden daher als bifunktional bezeichnet. Bisher wurden bifunktionale DiTPS jedoch nur aus Gymnospermen beschrieben (Keeling et al., 2010).

1.2.2 STRUKTUR- FUNKTIONSBEZIEHUNG DER DITERPENSYNTHASEN

DiTPS bestehen in der Regel aus einer α -, β - und γ -Domäne, sowie einem N-terminalen Transitpeptid für den Transport in die Plastiden (Chen et al., 2011). Die γ - Domäne wurde früher als „*insertional element*“ bezeichnet, da diese nur in DiTPS, jedoch nicht in Mono- oder Sesquiterpensynthasen gefunden wurde und lange Zeit keine Bedeutung dieser Sequenz für die Synthasen bekannt war (Xu et al., 2004). Spezifische Motive in den einzelnen Domänen sind für die katalytische Aktivität

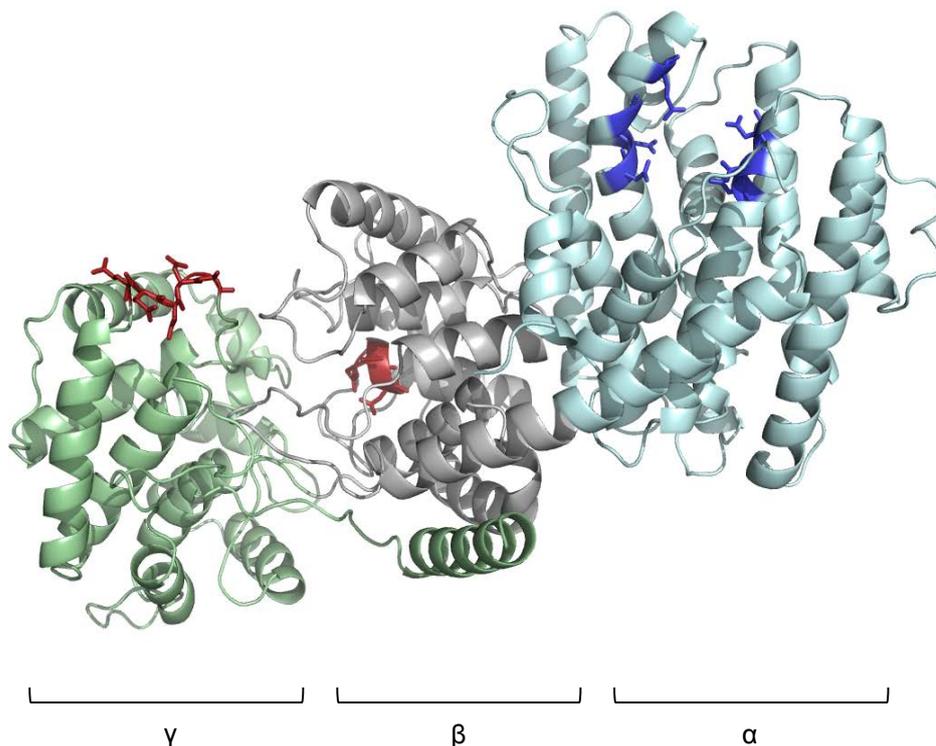


Abb. 1.2: Raumstruktur der bifunktionalen Diterpensynthase PpCPS/KS aus *Physcomitrella patens*. Für die auf Homologie beruhende Modellierung der PpCPS/KS (Zugangsnr.: BAF61135.1) mittels des Programmes SwissModel wurde die Abietadiensynthase aus *Abies grandis* (PDB -Code: 3S9V) als Vorlage verwendet. Die Struktur wurde anschließend mittels PyMOL visualisiert. Die drei Domänen α , β und γ sind blau, grau beziehungsweise grün dargestellt. Das EDXXD-ähnliche Motiv (γ -Domäne) und das DXDD-Motiv (β -Domäne), welche wichtig für die Klasse II- Aktivität sind, sind rot gefärbt. Die Klasse I-Aktivität vermittelnden DDXXD- und NSE/DTE-Motive in der α -Domäne sind durch dunkelblaue Färbung hervorgehoben.

entscheidend. In Abhängigkeit der Aktivität der Domänen können DiTPS Reaktionen der Klasse I, der Klasse II oder der Klasse I/II vermitteln. Die Aktivität der Klasse I- Synthasen wird mit der α - Domäne assoziiert, die Aktivität von Klasse II- Terpensynthasen mit der β - und γ -Domäne (Cao et al., 2010). Ursprüngliche DiTPS konnten vermutlich Klasse I/II- Reaktionen katalysieren, das heißt, sie waren bifunktionell. Monofunktionale DiTPS entstanden folglich durch Mutationen dieser DiTPS und dem damit einhergehenden Verlust einer der beiden Aktivitäten (Hillwig et al., 2011).

Zur Veranschaulichung der Struktur- Funktionsbeziehung von DiTPS ist in Abbildung 1.2 ein Modell der 3D-Struktur der bifunktionellen DiTPS PpCPS/KS aus dem Kleinen Blasenmützenmoos (*Physcomitrella patens*) dargestellt. Das Enzym katalysiert die Umsetzung von GGPP über *ent*-CPP (Klasse II-Reaktionsmechanismus) zu *ent*-Kaur-16-en (Klasse I- Mechanismus) und weist alle charakteristischen Strukturen der beiden Terpensynthaseklassen auf (Chen et al., 2011).

Die Klasse II- Aktivität von DiTPS ist im Wesentlichen auf zwei charakteristische Motive in der β - und γ -Domäne zurückzuführen. Die Substratbindung (GGPP) erfolgt durch zwei von β - und γ -Domäne gebildeten $(\alpha/\alpha)_6$ - Fässern. Die Bindung der Pyrophosphatgruppe des GGPP wird dabei durch ein Magnesiumion (Mg^{2+}) erreicht. Dieses wird durch das EDXXD-ähnliche Motiv gebunden, welches sich in der γ -Domäne befindet (Cao et al., 2010). Das katalytische Zentrum zur Synthese von CPP befindet sich in der β -Domäne. Das DXDD-Motiv ist hier für die initiale Säure-Base-katalysierte Protonierung einer Doppelbindung des GGPP verantwortlich. Der mittlere der Asparaginsäurereste des Motivs wird dabei deprotoniert (Köksal et al., 2011a).

Die Klasse I- Aktivität von DiTPS ist dagegen hauptsächlich auf zwei Motive in der α -Domäne zurückzuführen, welche dort das katalytische Zentrum zur Synthese von Diterpenen bilden. Das streng konservierte DDXXD-Motiv befindet sich an dem Ende der Tasche, welche der Bindung von GGPP bzw. CPP dient. Zusammen mit dem gegenüberliegenden (N,D)DXX(S/T)XXXE - Motiv (kurz: NSE/DTE; auch: $NDX_6(D/E)$ (Cao et al., 2010)) ist es für die Bindung von drei Mg^{2+} -Ionen verantwortlich (Zhou et al., 2012). Die gebundenen Ionen dienen der Ionisierung der Pyrophosphatgruppe des GGPP oder CPP und somit zur Bildung eines Carbokations der Prenyleinheit (Köksal et al., 2011a). Im Fall der PpCPS/KS führt dies in weiteren Cyclisierungs- und Umlagerungsreaktionen und einer abschließenden Deprotonierung zur Bildung von *ent*-Kaur-16-en.

Die trotz Sequenzähnlichkeit verschiedenen Funktionen des DDXXD-Motivs der Klasse I und des EDXXD-ähnliche Motivs der Klasse II lassen sich auf zwei Ursachen zurückführen. Zum einen liegen unterschiedliche räumliche Bedingungen vor, welche die jeweilige Funktion des Motivs begünstigen. So befindet sich das EDXXD-ähnliche Motiv außerhalb einer Helix, während sich das DDXXD-Motiv innerhalb einer Helix befindet (Cao et al., 2010). Zum anderen werden für die Ionisierung der Pyrophosphatgruppe vermutlich die insgesamt drei, von DDXXD- und NSE/DTE- Motiv gebundenen, Mg^{2+} benötigt, wohingegen das EDXXD-ähnliche lediglich die Bindung eines Mg^{2+} Ions ermöglicht (Cao et al., 2010).

Neben diesen, mit dem Reaktionsmechanismus zusammenhängenden charakteristischen Sequenzmotiven weisen alle DiTPS des Weiteren unmittelbar nach dem Signalpeptid das N-terminale Motiv SXYDT(A/S)W auf (Aubourg et al., 2002).

1.2.3 BEDEUTUNG DER DITERPENSYNTHESEN UND DEREN PRODUKTE

Die Stoffklasse der Diterpenoide ist die zweitgrößte der Terpenoide und umfasst über 12000 verschiedene Substanzen (Peters, 2010) mit etwa 130 verschiedenen Grundgerüsten (Dev, 1989). Diterpenoide entstehen durch weitere Modifizierung der von DiTPS gebildeten Diterpene. Die weitere Transformation Labdan-ähnlicher Diterpene wird z.B. durch die Oxidation der Terpene durch Cytochrom P450- Enzyme ermöglicht. Die so entstehenden funktionellen Gruppen können zusätzlich mit weiteren reaktiven Gruppen reagieren und so zum Beispiel methyliert oder hydroxyliert werden (Peters, 2010).

Die für die Pflanze wichtigsten Produkte von DiTPS sind *ent*-CPP und das daraus gebildete *ent*-Kaur-16-en. Dieses wird von einem als Kaurenxygenase bezeichneten Cytochrom P450 zu 7- α -OH-Kaurensäure oxidiert (Schopfer und Brennicke, 2006) und ist damit der Vorläufer für die Phytohormonklasse der Gibberelline (Sun und Kamiya, 1994).

Die Gibberelline (GAs) gehören dem pflanzlichen Grund- oder Primärmetabolismus an und umfassen mehr als 120 Komponenten (Schopfer und Brennicke, 2006). GAs steuern eine Vielzahl von Entwicklungen in der Pflanze. Am bekanntesten sind sie für die Induktion des Stängelwachstums. So sind GAs-defiziente *Arabidopsis thaliana*- Mutanten vor allem an ihrem Zwergwuchs erkennbar (Sun und Kamiya, 1994). Generell korreliert das Auftreten von GAs in pflanzlichen Geweben mit den aktiven Wachstumsphasen der entsprechenden Gewebe (Schopfer und Brennicke, 2006). Neben der Wachstumsförderung der Organe induzieren GAs auch das Auskeimen und Aufblühen von Pflanzen und verzögern die Seneszenz von Früchten und Blättern (Buchanan et al., 2000).

Die essentielle Funktion von GAs für die pflanzliche Entwicklung ist der Grund, warum alle höheren Pflanzen funktionelle *ent*-Copalylpyrophosphatsynthasen (*ent*-CPS) und *ent*-Kaurensynthasen (KS) mit relativ konservierten Sequenzen besitzen (Bohlmann et al., 1998).

Diese Ubiquität von *ent*-CPS und KS brachte ein hohes Potential für die Entwicklung pflanzlicher Sekundärmetabolite mit sich (Peters, 2010). Durch Genduplikationen und Sub- bzw. Neofunktionalisierung entstanden aus den DiTPS des Primärmetabolismus DiTPS des Sekundärmetabolismus (Hillwig et al., 2011). Neben den für die GA-Synthese benötigten Enzymen wurden zum Beispiel im Reis (*Oryza sativa*) mehrere CPS und Kaurensynthase-ähnliche Proteine (KSL) gefunden (Xu et al., 2007a). Die charakterisierten KSL ähneln KS in der Proteinsequenz, ihre Produkte sind jedoch von *ent*-Kaur-16-en verschieden und somit dem Sekundärmetabolismus zuzuordnen. Sie wirken unter anderem als Phytoalexine, welche bei Pilzbefall gebildet werden, oder als allelopathische Substanzen (Xu et al., 2004). Reis gilt daher als Modellsystem für den Übergang der Funktion der DiTPS vom Primärmetabolismus zum Sekundärmetabolismus (Peters, 2010).

Auf Basis dieser und weiterer Studien von DiTPS wurde eine Theorie zur Evolution der Terpensynthasen entworfen. Man geht davon aus, dass alle pflanzlichen Terpensynthasen von einer bifunktionalen DiTPS abstammen, welche *ent*-Kaur-16-en für die GA-Synthese gebildet hat (Keeling et al., 2010). Diese wiederum entstand vermutlich durch die Fusion bakterieller, monofunktionaler *ent*-CPS und KS (Cao et al., 2010). Genduplikationen und Mutationen der bifunktionellen DiTPS-Sequenz führten zur Inaktivierung von Domänen und zum Verlust einer der Aktivitäten, sodass in höheren Pflanzen die *ent*-Kaur-16-ensynthese von zwei monofunktionalen DiTPS katalysiert wird (Keeling et al., 2010), die im Vergleich zu bakteriellen KS und *ent*-CPS aber deutlich größer sind (Cao et al., 2010). Nach Hillwig et al. (2011) waren diese KS bzw. *ent*-CPS in Angiospermen nicht nur der Ausgangspunkt für die Evolution von KSL des Sekundärmetabolismus, sondern auch Ursprung aller Mono- und Sesquiterpensynthasen. Extensive Genduplikationen der monofunktionalen DiTPS, einhergehend mit Mutationen und dem mehrfachen Verlust der γ -Domäne, führten zur konvergenten Entwicklung der heutigen Terpensynthasen (Hillwig et al., 2011; Trapp und Croteau, 2001; Chen et al., 2011).

1.3 DIE WESTLICHE BALSAM-PAPPEL (*POPULUS TRICHOCARPA*) ALS MODELLORGANISMUS

Die Westliche Balsam-Pappel ist ein im Westen Nordamerikas heimischer Laubbaum (Roloff et al., 1994), welcher zu den zweikeimblättrigen Angiospermen zählt. Sie ist diözisch, das heißt eine Pflanze besitzt ausschließlich männliche oder weibliche Blüten, und vermehrt sich durch Windbestäubung (Tuskan et al., 2006). Charakteristisch ist der schnelle und hohe Wuchs dieser Pappelart. So erreicht sie in 10 Jahren eine Baumhöhe von 17 m und kann insgesamt über 50 m in die Höhe wachsen, was sie zur größten Pappel des Subkontinents macht (Roloff et al., 1994). Wegen der schnellen Zunahme an Biomasse wurde die Pappel in den letzten Jahren als nachwachsender Rohstoff entdeckt. In Europa wurde beispielsweise das Projekt ENERGYPOPLAR gestartet, welches Hybride zur Gewinnung von Bioethanol generiert (<http://www.energypoplar.eu/>). In der Papier- und Zellstoffindustrie ist *P. trichocarpa* dagegen schon lange etabliert, wie auch als Bau- und Sperrholz in der Werkstoffbranche (Taylor, 2002). Auch in der Textilindustrie findet sie Verwendung. So werden mittlerweile die wolligen Bestandteile der Samen für Oberbetten genutzt (Roloff et al., 1994).

Aufgrund ihrer Bedeutung für die Industrie, des relativ kleinen Genoms (ca 500 Mb), den vorhandenen einfachen Möglichkeiten der Transformation und der einfachen Vermehrung über Steckhölzer wurde *P. trichocarpa* als Modellorganismus zur Forschung an Laubbäumen gewählt, und das Genom 2006 vollständig sequenziert (Tuskan et al., 2006). Spätestens seit diesem Zeitpunkt wurde *P. trichocarpa* auch auf molekularer Ebene extensiv erforscht. Ein besonderes Augenmerk lag

auf der Untersuchung der Cellulosesynthese, da diese die Ausbeute an Bioethanol aus *P. trichocarpa* bedingt (Suzuki et al., 2006). Aber auch die Erforschung anderer Stoffwechselwege des Primär- und Sekundärmetabolismus von *P. trichocarpa* wurde stark vorangetrieben. Ein wichtiger Aspekt ist dabei die Suche nach molekularen Mechanismen und Botenstoffen, welche Schädlingsresistenz vermitteln. Schädlingsbefall von *P. trichocarpa* ist ein weitverbreitetes, ernstzunehmendes Problem, da die Pappel überwiegend in Monokulturen angebaut wird (Roloff et al., 1994). Unter den Sekundärmetaboliten sind daher die Terpene als größte Untergruppe besonders bedeutsam, da für andere Pflanzen bereits deren Wirkung gegen Herbivoren oder als Phytoalexine beschrieben ist (Chen et al., 2011). Eine Charakterisierung der Terpene und deren Biosynthesewege in *P. trichocarpa* kann daher dazu beitragen, Verteidigungsmechanismen aufzuklären und durch geeignete Züchtung oder Gentechnik die Resistenz der Pappel zu erhöhen. Da Terpene zudem wichtige Funktionen im Primärmetabolismus, wie etwa die Bildung der Wachstumshormone GAs, erfüllen, ist die Charakterisierung der Biosynthese auch von dieser Seite aus interessant für die Pappelzucht.

1.4 ZIELSTELLUNG

Das vollständig sequenzierte Genom von *P. trichocarpa* eröffnete die Möglichkeit der gezielten Suche nach bestimmten Enzymen bzw. Genen eines Stoffwechselweges durch einen Sequenzvergleich mit bekannten Gensequenzen ähnlicher Enzyme aus anderen Organismen. Auf diese Weise konnten im Pappelgenom 38 putative Terpensynthasegene identifiziert werden (Irmisch et al., eingereicht bei BMC Plant Biology). Da dies im Zuge einer Charakterisierung der Emission flüchtiger Stoffe nach Herbivorie geschah, wurden lediglich die Terpensynthasen näher untersucht, die volatile Terpene synthetisieren. In weiteren, noch nicht veröffentlichten Arbeiten konnten zwei CPS-Gene isoliert und charakterisiert werden. PtCPS1 katalysierte die Bildung von *ent*-CPP aus GGPP, während für PtCPS2 keine Aktivität nachgewiesen werden konnte (persönliche Mitteilung Sandra Irmisch).

Ziel dieser Bachelorarbeit war es, die Untersuchung der Terpensynthasen aus *P. trichocarpa* durch die Charakterisierung putativer KS-Gene zu vervollständigen. Die Gene sollten amplifiziert, kloniert, exprimiert und anschließend auf ihre Aktivität untersucht werden. Ein weiteres Ziel war die Analyse der organspezifischen Expressionsraten der CPS- und putativen KS-Gene. Die Ergebnisse sollten eine Grundlage schaffen, welche die Einschätzung der Bedeutung der gefundenen Enzyme für die Pflanze ermöglicht.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 PFLANZENMATERIAL

Es wurde ausschließlich mit der Westlichen Balsam-Pappel (*Populus trichocarpa*) des Genotyps 625 (Nordwestdeutsche Forstliche Versuchsanstalt, Hann. Münden, Deutschland) gearbeitet. Die monoklonalen Stecklinge wurden unter Sommerverhältnissen im Gewächshaus (24 °C, 60% relative Luftfeuchtigkeit, 16 h/8 h Licht/Dunkel-Zyklus) in einer 1:1 Mixtur aus Sand und Erde (Klasmann Kultursubstrat, Klasmann-Deilmann, Geeste, Deutschland) bis zum Erreichen einer Höhe von ca. 1 m kultiviert. Es wurden Wurzeln, Stängel und Blätter von sieben Steckhölzern geerntet. Die Wurzeln wurden mit einigen Millimetern Abstand zum Stängelansatz geerntet. Die Blätter wurden nach dem LPI (*leaf plastochron index*) – System nummeriert (Frost et al., 2007) und die Blätter LPI 2-7 sowie dieser Teil des Stängels verwendet.

Des Weiteren wurden 10 Steckhölzer gesteckt und nach 13 Tagen die gerade aufgegangenen Knospen geerntet. Das Material wurde, bevor es gemörsert wurde, in flüssigem Stickstoff Schock gefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.2 CHEMIKALIEN

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders vermerkt, von der Firma Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

2.3 MIKROBIOLOGISCHE ARBEITEN

2.3.1 BAKTERIENSTÄMME

Zur Sub-/Klonierung und Sequenzierung wurde mit den chemisch kompetenten *Escherichia coli*-Zellen OneShot® TOP10 (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland; Genotyp: F⁻ *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *araD139* Δ (*ara-leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* (Str^R) *endA1* *nupG*) gearbeitet. *E. coli* OneShot® BL21StarTM (DE3) Chemically Competent Cells (Invitrogen; Genotyp: F⁻ *ompT* *hsdS_B* (*r_Bm_B*) *gal* *dcm* *rne131* (DE3)) wurden für die heterologe Expression der Diterpensynthasogene genutzt. DE3 steht für das in den *E. coli*-Zellen enthaltene Lambda DE3 Lysogen. Dieses trägt das Gen für die T7-RNA-Polymerase und ermöglicht daher eine Expression von

durch den T7-Promotor regulierten Genen. Da das Gen der T7-RNA-Polymerase unter Kontrolle des *lacUV5*-Promotors steht, kann die Genexpression gezielt durch Zugabe von IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid) induziert werden.

2.3.2 BAKTERIENKULTIVIERUNG

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte auf LB-Agarplatten (35 g LB-Agar (Lennox) (Roth) in 1 l *aqua dest.*) bei 37 °C im Brutschrank B6120 Kendro (Heraeus, Hanau, Deutschland) oder in flüssigem LB-Medium (20 g LB-Medium (Lennox) (Roth) in 1 l *aqua dest.*) bei 37 °C und 220 rpm im Inkubations-Schüttelschrank CERTOMAT® BS-1 (B. Braun Biotech International, Melsungen, Deutschland) für 12-16 h. Zur Selektion enthielten die Medien 50 μ g/ml Kanamycin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) oder 100 μ g/ml Ampicillin (Sigma-Aldrich). Das Antibiotikum wurde in Abhängigkeit der vermittelten Antibiotikaresistenz des transformierten Plasmid (siehe Tabelle 2.1) gewählt.

2.3.3 TRANSFORMATION VON *E. COLI*

Für Klonierungsexperimente mit den *E. coli*- Zellen wurde ein Tube (50 μ l) der Zellen auf Eis aufgetaut, 1-5 μ l Plasmid-DNA hinzugegeben und 10 – 20 min auf Eis inkubiert, sodass sich die Plasmide an die Zellen anlagern konnten. Durch einen anschließenden Hitzeschock für 45 sec bei 42 °C im Wasserbad Typ 1002 (GFL, Burgwedel, Deutschland) sollte die Aufnahme der Plasmide in die Bakterienzellen begünstigt werden. Nach erneuter Inkubation auf Eis für ca. 2 min wurde 150 μ l S.O.C. – Medium (Invitrogen) zugesetzt und das Tube zur Expression der Antibiotikaresistenzgene für 30 - 60 min bei 37 °C im Schüttelschrank inkubiert. Der gesamte Ansatz wurde im Anschluss mittels steriler Kügelchen auf einer Agarplatte ausplattiert, welche das entsprechende Antibiotikum enthielt.

2.4 ISOLIERUNG VON NUKLEINSÄUREN

2.4.1 ISOLIERUNG DER GESAMT-RNA AUS PFLANZENMATERIAL

Die Isolation der Gesamt-RNA aus den verschiedenen Organen von *P. trichocarpa* erfolgte mittels InviTrap® Spin Plant RNA Mini Kit (50) (Strattec molecular, Berlin) nach Herstellerprotokoll. Es wurden von grünen Organen 50 – 80 mg der pulverisierten Proben eingesetzt, von Wurzelproben 100 - 150 mg. Das abgewogene Pulver wurde bis zur Zugabe des Lysispuffers RP in flüssigem Stickstoff aufbewahrt, um ein Auftauen und dadurch einen Abbau der RNA durch RNasen zu verhindern.

Die RNA wurde mit 50 µl RNase freiem Wasser eluiert und die Konzentration bestimmt (vgl. 2.5.10). Bei Konzentrationen unter 140 ng/µl fand ein Eindampfen der Proben mittels des Concentrator 5301 (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) zur Konzentrationserhöhung statt.

2.4.2 ISOLIERUNG VON PLASMIDEN AUS *E. COLI*

Aus ca. 4 ml *E. coli*- Übernachtskultur wurden Plasmide mittels des NucleoSpin®Plasmid DNA Purification Kits (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) nach Herstellerangaben zum analytischen Restriktionsverdau (2.5.8) bzw. für nachfolgende Sequenzierungs- und Klonierungsexperimente (2.5.7) isoliert.

2.5 ARBEITEN MIT DNA

2.5.1 VEKTOREN

Alle in dieser Arbeit verwendeten Vektoren wurden von Invitrogen bezogen und sind mit Verwendungszweck und Antibiotikaresistenz in der nachfolgenden Tabelle 2.1 aufgelistet. Die verwendeten Expressionsvektoren enthielten den T7lac-Promotor, der eine Expression der inserierten Gene in den *E. coli*- BL21Star- Zellen (vgl. 2.3.1) ermöglichte.

TAB. 2.1: Liste aller Vektoren unter Angabe des Verwendungszwecks und der vermittelten Resistenz

Vektor	Verwendungszweck	Resistenz
pET100/D-TOPO®	Genexpression	Ampicillin
pET200/D-TOPO®	Genexpression	Kanamycin
pCR® Blunt-II TOPO®	Subklonierung, Sequenzierung von <i>blunt-end</i> -PCR-Produkten	Kanamycin
pCR® 4 TOPO®	Subklonierung, Sequenzierung von qRT-PCR-Produkten mit 3'-A-Überhang	Kanamycin

2.5.2 OLIGONUKLEOTIDE

Alle genspezifischen Oligonukleotide wurden von Sigma-Aldrich synthetisiert. Die Oligonukleotide wurden in der vom Hersteller angegebenen Menge *aqua bidest.* resuspendiert um eine Endkonzentration von 100 µM zu erreichen. Gearbeitet wurde stets mit einem 1:10 (10 µM) verdünnten Aliquot dieser Stammlösungen.

TAB. 2.2: Liste der Namen und Sequenzen aller verwendeten Oligonukleotide. Die für die Punktmutation verantwortliche Base in den Mutageneseprimern ist jeweils unterstrichen. Die Sequenz für einen 5'-Überhang, über den ein Genfragment gerichtet in einen TOPO®-Vektor mit entsprechend komplementärem Überhang eingebaut wird (vgl. 2.5.7), ist fett gedruckt.

Name	Sequenz	Zielgen/-vektor
<i>Oligonukleotide zur Amplifikation der Diterpensynthasegene</i>		
PtKS-fwd	CACCATGTCTTGCATTCGTCCTGGTTCTG	<i>PtKS1a,b; PtKS2</i>
PtKS fwd – kurz	CACCATCAAGAAGATGTTTGATAAGATTG	<i>PtKS1a,b; PtKS2</i>
PtKS rev	TTATAATTCATCTAGAGAGATGGGTTC	<i>PtKS1a,b; PtKS2</i>
<i>Oligonukleotide zur Sequenzierung von Plasmiden</i>		
PtKS seq – fwd	GCAGGGGGAGGAAGAGATAT	<i>PtKS1a,b; PtKS2</i>
PtKS seq – rev	GCCCATGACATGCGTGCATCA	<i>PtKS1a,b; PtKS2</i>
T7 promotor primer	TAATACGACTCACTATAGGG	pET100, pET200
T7 rev	TAGTTATTGCTCAGCGGTGG	pET100/D-TOPO®
M13 fwd	GTAAAACGACGGCCAG	pCR® Blunt-II, pCR® 4
M13 rev	GTAAAACGACGGCCAG	pCR® Blunt-II, pCR® 4
<i>Oligonukleotide für qRT-PCR</i>		
CPS1 QRT 1	TAGCATGTGTTGTCGCATTG	<i>PtCPS1</i>
CPS1 QRT 2	TTAGCTATCTCGAGAAGTGAAGG	<i>PtCPS1</i>
CPS2 QRT 1	TCACTTCTTGCATAGCCAAA	<i>PtCPS2</i>
CPS2 QRT 2	TCCTTGAAATCCTTTTCAGC	<i>PtCPS2</i>
KS1 QRT 3	CGGCAATTCACAGCACTATAAG	<i>PtKS1a,b; PtKS2</i>
KS1 QRT 4	GCACTGATTTGTTACTTGACCAT	<i>PtKS1a,b; PtKS2</i>
Ubi fwd	GTTGATTTTTGCTGGGAAGC	<i>housekeeping-Gen</i>
Ubi rev	GATCTTGGCCTTCACGTTGT	<i>housekeeping-Gen</i>
<i>Oligonukleotide für Mutagenese-PCR</i>		
KS1a M – T fwd	GATTTGCTCAAATCCAC <u>G</u> TGACAGAAGCACAATG	<i>PtKS1a</i>
KS1a M – T rev	CATTGTGCTTCTCTCAAC <u>G</u> TGGATTTGAGCAAATC	<i>PtKS1a</i>
KS1b T – M fwd	GATTTGCTCAAATCCA <u>T</u> GTTGACAGAGGCACAATG	<i>PtKS1b</i>
KS1b T – M rev	CATTGTGCCTCTGTCAAC <u>A</u> TGGATTTGAGCAAATC	<i>PtKS1b</i>

2.5.3 PCR-TECHNIKEN

Die Amplifikation von spezifischen Sequenzen aus Plasmiden oder cDNA erfolgte mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) im PeqStar 2x Gradient Thermocycler (Peqlab, Erlangen, Deutschland). Die Oligonukleotide wurden in Abhängigkeit des Vektors bzw. Zielgens gemäß Tabelle 2.2 gewählt. Die Annealing-Temperaturen lagen im Allgemeinen etwa 5 °C unter der Schmelztemperatur der Oligonukleotide.

2.5.3.1 Phusion-PCR

Spezifische Sequenzen aus cDNA oder Plasmiden (ca. 100 ng/μl) wurden mittels Phusion High Fidelity Polymerase (Thermo Scientific, Darmstadt/Schwerte, Deutschland) amplifiziert. Der Reaktionsansatz für eine Phusion-PCR, sowie das zugehörige Programm sind den Tabellen 2.3 und 2.4 zu entnehmen.

TAB. 2.3: Pipettierschema für Phusion-PCR

	Volumen
5x Phusion HF Buffer	10 μl
Primer forward (10 μM)	2,5 μl
Primer reverse (10 μM)	2,5 μl
dNTPs (je 10 mM)	1 μl
DNA-Template	1 μl
Phusion High Fidelity Polymerase (2 U/μl)	0,5 μl
<i>aqua bidest.</i>	32,5 μl

TAB. 2.4: Thermocycler-Programm für Phusion-PCR

Phase	Zeit	Temperatur	
Initiale Denaturierung der DNA-Doppelstränge	30 sec	98 °C	
Denaturierung der Doppelstränge	10 sec	98 °C	} 35 Zyklen
Primerhybridisierung mit Matrizenstrang (Annealing)	30 sec	64 °C	
Synthese des neuen Strangs (Elongation)	60 sec	72 °C	
Finale Elongation	5 min	72 °C	

2.5.3.2 Kolonie-PCR

Um zu überprüfen, ob die transformierten *E. coli*-Zellen das gewünschte Insert besitzen, wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Für diese wurde mit der GoTaq® DNA Polymerase (Promega, Mannheim, Deutschland) und dem zugehörigen Puffersystem gearbeitet. Diese Polymerase erzeugt DNA-Fragmente mit 3'-A-Überhang. Es wurden je 1-2 Kolonien einer Transformantenplatte gepickt und einem Reaktionsansatz hinzugefügt. Die Zusammensetzung des Ansatzes und das entsprechende Programm sind in den Tabellen 2.5 und 2.6 dargestellt.

TAB. 2.5: Pipettierschema für Kolonie-PCR

	Volumen
5x Green GoTaq Reaction Buffer	5 μl
Primer forward (10 μM)	0,5 μl
Primer reverse (10 μM)	0,5 μl
dNTPs (je 10 mM)	0,5 μl
GoTaq® DNA Polymerase (5 U/μl)	0,3 μl
<i>aqua bidest.</i>	18 μl

TAB. 2.6: *Thermocycler-Programm für Kolonie-PCR*

Phase	Zeit	Temperatur	
Bakterienlyse und Initiale Denaturierung der DNA-Doppelstränge	10 min	95 °C	
Denaturierung der Doppelstränge	30 sec	95 °C	} 35 Zyklen
Annealing	30 sec	55 °C	
Elongation	2 min	72 °C	
Finale Elongation	5 min	72 °C	

2.5.3.3 Mutagenese-PCR

Zur Mutation von PtKS1a und PtKS1b wurde die Phusion High Fidelity Polymerase (Thermo Scientific) mit dem zugehörigen Puffersystem verwendet. Das Pipettierschema für den PCR-Ansatz sowie das zugehörige Thermocycler-Programm sind den nachfolgenden Tabellen 2.7 und 2.8 zu entnehmen. Da die Phusionpolymerase eine Extensionsgeschwindigkeit von 15 to 30 s/kb aufweist (siehe Herstellerinformation), wurde die Elongationsdauer auf 4,5 Minuten eingestellt, um eine vollständige Synthese des ca. 8000 bp langen Stranges zu ermöglichen.

Im Anschluss an die PCR wurden die Template-Plasmide durch Restriktionsverdau abgebaut (vgl. 2.5.8) und die mutierten Plasmide gemäß 2.3.3 transformiert.

TAB. 2.7: *Pipettierschema für Mutagenese-PCR*

	Volumen
5x Phusion HF Buffer	10 µl
Primer forward (10 µM)	2,5 µl
Primer reverse (10 µM)	2,5 µl
dNTPs (je 10 mM)	2 µl
Phusion High Fidelity Polymerase	1 µl
DMSO	0,5 µl
Template (ca. 100 ng/µl)	0,7 µl
<i>aqua bidest.</i>	31 µl

TAB. 2.8: *Thermocycler-Programm für Mutagenese-PCR*

Phase	Zeit	Temperatur	
Initiale Denaturierung der DNA-Doppelstränge	30 sec	98 °C	
Denaturierung	10 sec	98 °C	} 20 Zyklen
Annealing	30 sec	65 °C	
Elongation	4,5 min	72 °C	
Finale Elongation	5 min	72 °C	

2.5.3.4 Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA wurde mit fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden gemäß der Sanger-Methode (Sanger et al., 1977) durchgeführt. Dazu wurde das BigDye™ Terminator Cycle Sequencing v2.0 Ready Reaction DNA Sequencing Kit (PE Biosystems, Foster City, USA; kurz: BD) verwendet. Die jeweiligen Primer und deren Zielgene/-vektoren sind in Tabelle 2.2 aufgeführt. Im Gegensatz zu allen anderen in dieser Arbeit ausgeführten PCRs wurde bei dieser Synthese stets nur ein Primer einem Reaktionsansatz hinzugefügt. Daher wird in jeder Runde dasselbe Template verwendet und dazu komplementäre Stränge mit variierendem 3'-Ende durch Einbau von Didesoxynukleotiden synthetisiert.

Das Pipettierschema für Sequenzierungsansätze ist in Tabelle 2.9, das entsprechende Programm in Tabelle 2.10 zu finden. Die DNA wurde anschließend mit dem „DyeEx® Spin Column“ Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Protokoll des Herstellers aufgereinigt. Die Analyse der Sequenzen erfolgte über Kapillargelelektrophorese und Fluoreszenzdetektion auf einem ABI Prism®-Gen-Analysator 3130xl (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland).

TAB. 2.9: Pipettierschema für Sequenzierungs-PCR

	Volumen
BD	2 µl
BigDye® Terminator 5X Sequencing Buffer	2 µl
Primer (10 µM)	1 µl
Plasmid-DNA (ca. 100 ng/µl)	2 µl
<i>aqua bidest.</i>	3 µl

TAB. 2.10: Thermocycler-Programm für Sequenzierungs-PCR

Phase	Zeit	Temperatur	
Initiale Denaturierung der DNA-Doppelstränge	5 min	96 °C	
Denaturierung der Doppelstränge	10 sec	96 °C	} 35 Zyklen
Annealing	20 sec	50 °C	
Elongation	4 min	60 °C	

2.5.3.5 quantitative Realtime-PCR (qRT-PCR)

Eine quantitative Realtime-PCR (qRT-PCR) wurde durchgeführt, um die organspezifische Expression der Diterpensynthasegene zu untersuchen. Die als Template verwendete cDNA wurde gemäß Abschnitt 2.5.9 aus der isolierten Gesamt-RNA der verschiedenen Organe gewonnen.

Die Expressionraten von *PtCPS1*, *PtCPS2*, *PtKS1a,b* und *PtKS2* wurden in Wurzeln, Stängeln, Knospen und Blättern von sechs biologischen Replikaten untersucht. Das für Ubiquitin codierende Gen wurde als *housekeeping*-Gen verwendet (Ramírez-Carvajal et al., 2008). Die qRT-PCR-Primer wurden so konstruiert, dass kleine Fragmente (ca. 200 bp) amplifiziert wurden. Für die Expressionsanalyse von *PtKS1a,b* und *PtKS2* wurden auf Grund der hohen Sequenzidentität dieselben Primer verwendet. Dabei war der zu vervielfältigende Sequenzabschnitt so gewählt, dass die drei Gensequenzen im Nachhinein durch Sequenzierung der amplifizierten DNA-Fragmente unterscheidbar waren. Hierfür wurden je 20 Klone von je drei biologischen Replikaten der Amplikons aus allen Organen sequenziert.

Zur Etablierung der Oligonukleotide wurden je drei Standardkurven mit sechs Verdünnungsstufen (1:2) erstellt. Als Template für diese dienten cDNA-Pools aus Wurzel, Blatt, Stängel und Knospe (vgl. 2.5.9). Die Standardkurven für alle für die qRT-PCR verwendeten Primer lieferten Effizienzen zwischen 90 - 110%. Die Effizienz der KSL-Primer KS1 QRT 3/4 betrug $101,97 \pm 2,48\%$. Für das Primerpaar CPS1 QRT 1/2 ergab sich eine Effizienz von $104,33 \pm 0,67\%$ und für die Primer CPS2 QRT 1/2 für *PtCPS2* eine Effizienz von $100,27 \pm 3,22\%$. Die spezifische Bindung der Primer wurde zusätzlich durch das Erstellen von Schmelzkurven nach der PCR und durch das Klonieren und Sequenzieren der amplifizierten Fragmente sichergestellt.

Die qRT-PCR ermöglicht eine relative Quantifizierung von DNA in einzelnen PCR-Zyklen durch Fluoreszenzsignale. Der in dieser Arbeit verwendete Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies, Foster City, USA; kurz: SYBR-Green III) enthält SYBR Green I. Dieses interkaliert mit dsDNA (doppelsträngiger DNA) und kann in diesem Zustand zur Fluoreszenz angeregt werden. Das Fluoreszenzsignal ist proportional zur Konzentration an dsDNA in der Probe. Die Stärke des Fluoreszenzsignals wird am Ende jeder Amplifikationsrunde vom PCR-System gemessen und damit indirekt die Änderung des DNA-Gehalts über die Zyklen bestimmt.

Für die Durchführung und Auswertung der qRT-PCR wurde das MX3000P™ Real-Time PCR System (Stratagene®, La Jolla, USA) genutzt. Der Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies, Foster City, USA; kurz: SYBR-Green III) wurde nach Herstellerangaben verwendet, inklusive des ebenso im Kit enthaltenen Reference Dye ROX (1 mM). Das allgemeine Pipettierschema für einen qRT-PCR-Ansatz ist aus Tab. 2.11 ersichtlich. Es wurden mit einer cDNA-Probe stets drei technische qRT-PCR-Replikate erstellt. Des Weiteren wurden drei Proben ohne cDNA je Primerpaar gemessen, um Verunreinigungen festzustellen. Für die Normalisierung von Messunterschieden

zwischen einzelnen Platten wurde zudem ein Pool aus cDNA aller Organe stets mitanalysiert. Das qRT-PCR-Programm inklusive Schmelzkurvenerstellung ist in Tabelle 2.12 dargestellt. Da das Temperaturoptimum der enthaltenen Polymerase der Annealing-Temperatur entspricht, konnte ein sog. Fast-2-Step-Programm verwendet werden.

TAB. 2.11: Pipettierschema für qRT-PCR

	Volumen
SYBR Green III	10 µl
Primer fwd (10 µM)	1 µl
Primer rev (10 µM)	1 µl
ROX (1:500)	0,3 µl
cDNA	1-4 µl
aqua bidest. (RNase frei)	auf 20 µl

TAB. 2.12: Programm für Fast-2-Step-qRT-PCR und Dissoziationskurve

Phase	Zeit	Temperatur	
Initiale Denaturierung	3 min	95 °C	
Denaturierung	20 sec	95 °C	} 40 Zyklen
Annealing und Elongation	20 sec	60 °C	
<i>Schmelzkurvenerstellung</i>			
Denaturierung	60 sec	95 °C	
Renaturierung der Doppelstränge	30 sec	55 °C	
Ermittlung der Dissoziationstemperatur		↓	0,5 °C/ 5 sec
	30 sec	95 °C	

Die Datenanalyse erfolgte mit dem zugehörigen Programm MxPro. Das Programm ermittelte automatisch den Ct (*threshold cycle*)- Wert der einzelnen Proben, das heißt, den Zyklus, in welchem das Fluoreszenzsignal signifikant höher ist als der Hintergrund und am Anfang der exponentiellen Phase steht. Der Wert ist umgekehrt proportional zur cDNA-Konzentration.

2.5.4 AGAROSEGELELEKTROPHORESE

Die Agarosegelelektrophorese ermöglicht zum einen die relative Größenbestimmung von DNA-Fragmenten, zum anderen wird die präparative Gelelektrophorese genutzt, um die gewünschten Amplifikations-Produkte nach einer PCR von Nebenprodukten und Primern zu trennen.

Die Auftrennung erfolgte in der mit 0,5x TAE-(TRIS-Acetat-EDTA)-Puffer (0,5 mM EDTA, 20 mM TRIS, 10 mM Eisessig) gefüllten Gelelektrophoreseapparatur Mupid® One (Advance, Tokio, Japan) durch eine an das Agarosegel (1,5% Agarose (w/v), 0,5x TAE-Puffer, 0,25 µl Ethidiumbromid auf 100 ml Gel) für 15 – 20 min angelegte Spannung (135 V). Alle DNA-Lösungen wurden vor dem Auftragen mit der

entsprechenden Menge 6x DNA Loading Dye (Thermo Scientific) versetzt. Als Größenstandard wurde zudem stets eine Tasche mit 4-6 μl 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific) beladen. Durch das im Gel enthaltene DNA-interkalierende Ethidiumbromid liessen sich anschließend entstandene Banden von DNA-Fragmenten gleicher Größe durch Anregung des Ethidiumbromids unter UV-Licht (254 nm) mittels des Geldokumentationssystems Gene Genius (SYNGENE, Cambridge, UK) visualisieren.

2.5.5 DNA-ISOLIERUNG AUS AGAROSEGELEN

Die Banden mit den benötigten DNA-Fragmenten werden im Geldokumentationssystem Gene Genius (SYNGENE) unter UV-Licht (254 nm) mittels eines Skalpells ausgeschnitten und die DNA mithilfe des Kits NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel) nach Herstellerprotokoll isoliert.

2.5.6 KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON NUKLEINSÄUREN

Das Nukleinsäuregehalt von Proben wurde mittels NanoDrop 2000c Spectrophotometer (Thermo Scientific) durch Messung der Absorption von 1 μl Lösung bei 260 nm ermittelt. Das Programm errechnete daraus automatisch die entsprechende Konzentration RNA ($1 A_{260\text{nm}} = 40 \text{ ng}/\mu\text{l}$) oder DNA ($1 A_{260\text{nm}} = 50 \text{ ng}/\mu\text{l}$). Die Bestimmung der Absorption bei 230 nm bzw. bei 280 nm diente der Reinheitskontrolle. Der automatisch berechnete Quotient $A_{260\text{nm}/280\text{nm}}$ sollte bei einer DNA-Probe bei etwa 1,8 liegen, bei einer RNA-Probe dagegen bei 2,0-2,2. Niedrigere Werte weisen auf Verunreinigungen durch Proteine oder im Falle von RNA-Proben auf DNA-Kontamination hin.

2.5.7 LIGATION VON DNA-FRAGMENTEN

Alle verwendeten Kits arbeiten mit dem TOPO®-System, das heißt, die Topoisomerase I ist kovalent über eine Phosphodiesterbindung an das 3'-Phosphat des geöffneten Vektors gebunden. Die in der Bindung gespeicherte Energie wird genutzt, um ein DNA-Fragment über dessen 5'-Hydroxylreste in den Vektor zu klonieren, unter Freisetzung der Topoisomerase I. Ein 5'-Überhang des Vektors und entsprechend designte Primer für die der Klonierung vorausgehende Genamplifikation ermöglichen bei den verwendeten TOPO®-Expressionsvektoren zudem die Insertion in der richtigen Orientierung. Je nach Art des Klonierungsexperiments wurde mit verschiedenen Vektoren gearbeitet. Zur Sequenzierung von *blunt-end*-DNA-Fragmenten wurde das ZeroBlunt® TOPO® PCR Cloning Kit (Invitrogen) genutzt, zur Sequenzierung von DNA-Fragmenten mit 3'-A-Überhang dagegen TOPO TA Cloning® Kit (Invitrogen). Zur Expression von Diterpensynthasegenen wurde dagegen entweder Champion™ pET100 Directional TOPO® Expression Kit (Invitrogen) oder Champion™ pET200

Directional TOPO® Expression Kit (Invitrogen) je nach Verfügbarkeit verwendet. Letztere unterscheiden sich lediglich in der vermittelten Antibiotikaresistenz (vgl. 2.5.1).

Die Ligation wurde mit dem halben Ansatz nach Herstellerprotokoll durchgeführt und einer Inkubationszeit von 30 min.

2.5.8 RESTRIKTIONSVERDAU

Die aus *E. coli* isolierten Plasmide (vgl. 2.4.2) wurden durch Restriktasen (New England BioLabs (NEB), Frankfurt am Main, Deutschland) verdaut um zu überprüfen, ob sie das gewollte Insert enthalten. Aufgrund unterschiedlicher Restriktionsschnittstellen der Vektoren gab es zwei Ansätze für diesen Verdau. Sie sind Tabelle 2.13 und 2.14 zu entnehmen. Die Inkubation der Ansätze erfolgte im Thermocycler (Peglab) für 0,5 – 1,5 h bei 37 °C. Zur Analyse des Kontrollverdau wurden die Proben im Anschluss gelelektrophoretisch aufgetrennt.

TAB. 2.13: Ansatz Kontrollverdau für Expressionsvektoren

	Volumen
NEB1-Puffer	1 µl
<i>SacI</i> (20 U/µl)	0,3 µl
<i>NheI</i> (10 U/µl)	0,3 µl
Plasmid-DNA (ca. 100 ng/µl)	5 µl
<i>aqua bidest.</i>	3 µl

TAB. 2.14: Ansatz Kontrollverdau für Sequenzierungsvektoren

	Volumen
NEB1-Puffer	1 µl
<i>EcoRI</i> (20 U/µl)	0,3 µl
Plasmid-DNA (ca. 100 ng/µl)	3 µl
<i>aqua bidest.</i>	5,7 µl

Neben der analytischen Restriktion von Plasmiden wurden Restriktionsenzyme genutzt, um im Anschluss an die Mutagenese-PCR die Template-Plasmide abzubauen. Die verwendeten *E. coli*-Stämme besitzen *dam*-Methylasen, welche Adenosin an der N6-Position in der Sequenz GATC methylieren. Die Restriktionsendonuklease *DpnI* (Thermo Scientific) erkennt nur auf diese Art methylierte DNA-Sequenzen und baut folglich spezifisch die aus *E. coli* isolierten Template-Plasmide ab. Die durch die PCR erzeugten mutierten Plasmide dagegen blieben bestehen. Für den Verdau wurden zu 10 µl des PCR-Ansatzes 1µl *DpnI* (10 U/µl) hinzugefügt und für 1 Stunde bei 37 °C im

Thermocycler inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inaktivierung des Enzyms durch eine Erhöhung der Temperatur auf 80 °C für weitere 20 min.

2.5.9 cDNA-SYNTHESE

Vor der eigentlichen Synthesereaktion musste in der GesamtRNA-Probe (vgl. 2.4.1) möglicherweise vorhandene DNA durch Verdau mit DNase I (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) im entsprechenden Puffersystem abgebaut werden. Die Zusammensetzung des Ansatzes ist Tabelle 2.15 zu entnehmen. Die Probe wurde bei 37 °C im Thermocycler für 30 min inkubiert und die Reaktion dann durch Zugabe von 1 µl EDTA (Fermentas) und Inkubation bei 65 °C für 10 min abgestoppt.

Für die cDNA-Synthese stand ein System der Firma Invitrogen zur Verfügung, dieses arbeitet mit der SuperScript™ II Reverse Transcriptase (RT). Der Ablauf der Synthese wurde nach Herstellerangaben durchgeführt, er ist Tabelle 2.16 zu entnehmen.

TAB. 2.15: Ansatz DNase I-Verdau

	Masse/ Volumen
isolierte GesamtRNA	1000 ng
DNase I (1 U/ µl)	1 µl
10x Reaction Buffer with MgCl ₂	1 µl
aqua bidest. (RNase frei)	auf 10 µl

TAB. 2.16: Pipettierschema und Inkubationsparameter der cDNA-Synthese

	Volumen	
<i>Annealing</i> Oligo(dT) ₁₂₋₁₈ Primer an mRNA		
RNA aus DNaseI- Verdau	11 µl	
Oligo(dT) ₁₂₋₁₈ Primer (0,5 µg/µl)	1 µl	
dNTPs (je 10 mM)	1 µl	
<i>Inkubation (65 °C, 5 min)</i>		
5x First Strand Buffer	4 µl	
RNaseOUT™ Recombinant		
Ribonuclease Inhibitor (40 U/µl)	1 µl	
DTT (0,1 M)	2 µl	
<i>Inkubation (42 °C, 2 min)</i>		
SuperScript II RT	1 µl	
<i>Thermocyclerprogramm</i>		
	Zeit	Temperatur
Inkubation)	10 min	25 °C
cDNA-Synthese	50 min	42 °C
Hitzeinaktivierung	15 min	70 °C

2.6 GENEXPRESSION UND PROTEINBIOCHEMIE

2.6.1 HETEROLOGE GENEXPRESSION VON DITERPENSYNTHASESEQUENZEN

Etwa 95 ml antibiotikahaltiges LB-Medium wurden mit 5 ml Übernachtskulturen *E. coli* OneShot® BL21Star (DE3), welche das jeweilige Konstrukt enthielten, inokuliert. Die Bakteriensuspensionen wurden im Schüttler Innova 4230 3/4“ Stroke (New Brunswick Scientific, Enfield, USA) bei 37 °C und 220 rpm inkubiert, bis zum Erreichen eines OD-Werts von 0,6 – 0,8. Die Bestimmung des OD-Wertes erfolgte mithilfe des VIS Spektralphotometers Spectronic® 20 Plus Genesys™ (Spectronic Instruments, Leeds, UK). Die Zugabe von IPTG zu einer Endkonzentration von 1 mM induzierte indirekt die Biosynthese der Diterpensynthasen. Primär inaktivierte IPTG den *lac*-Repressor des T7-Polymerasegens und führte so zur Produktion der T7-Polymerase in *E. coli*. Diese erkannte den Promotor der Gensequenz und führte so zu dessen Expression. Da Überexpression und Zellwachstum starke Stressfaktoren für *E. coli* darstellen, wurden die Kulturen nach Induktion bei 18 °C und 160 rpm für weitere 20 h gehalten.

2.6.2 GEWINNUNG DES PROTEINROHEXTRAKTES

Durch Zentrifugation für 7 min bei 5000g mit Avanti™ J-25 Centrifuge (Beckman) und zugehörigem Rotor (JLA 16.250) fand eine Abtrennung der Bakterien vom Kulturmedium statt. Das entstandene Pellet wurde mit 3 ml Extraktionspuffer (50 mM TrisHCl (pH = 7,5), 10% Glycerol, 5 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 5 mM Natrium-L-Ascorbat (Sigma-Aldrich) mit 10⁻³ v/v Proteaseinhibitor Mix HP (SERVA, Heidelberg, Deutschland), 10⁻⁵ v/v Novagen® Benzonase® Nuclease (Merck, Darmstadt, Deutschland) resuspendiert und die Zellen durch Ultraschallbehandlung (4x 20 sec, Power ca. 65%) mithilfe des Ultraschall-Homogenisators Sonopuls HD2070 (Bandelin, Berlin, Deutschland) aufgeschlossen. Ab dem Zellaufschluss wurden alle Arbeitsschritte bei höchstens 4 °C durchgeführt, um einen Abbau der Proteine durch Proteasen zu vermeiden.

Die Zentrifugation der Suspension für 30 min und 16200 rpm diente der Abtrennung der unlöslichen Zellbestandteile. Der Überstand wurde durch Auftragung auf mit TPS-Assaypuffer (10% Glycerol, 10 mM TrisHCl (pH = 7,5), 1 mM DTT) äquilibrierte Econo-Pac® 10 DG Säulen (Bio-Rad, München, Deutschland) und anschließender Elution mit 4 ml TPS(Terpensynthase)-Assaypuffer umgepuffert.

2.6.3 BIOASSAY ZUR AKTIVITÄTSBESTIMMUNG

Das Grundschemata für die Zusammensetzung des Assays ist Tabelle 2.17 zu entnehmen. Copalylpyrophosphatsynthasen (CPS) (vgl. 1.2) bilden die potentiellen Substrate *ent*-, *syn*- oder *n*-Copalylpyrophosphat (CPP) für PtKS1a,b und PtKS2. Zur Untersuchung der putativen Kaurensynthasen wurden sequenzoptimierte *ent*-CPS, *n*-CPS und *syn*-CPS (Plasmide bereitgestellt von Reuben Peters, Iowa-State-University, USA) verwendet, um die Produktausbeute zu steigern. Die CPS benötigen ihrerseits Geranylgeranylpyrophosphat (Sigma-Aldrich; GGPP; vorliegend als Ammoniumsalz, 1:2 mit NH_4HCO_3 (5 mM) verd.) als Substrat. Magnesiumionen (Mg^{2+}) sind essentiell für die Aktivität aller Diterpensynthasen im Bioassay.

TAB. 2.17: Ansatz Assay zur Aktivitäts- und Produktbestimmung

	Volumen
MgCl ₂ (200 mM)	5 µl
GGPP (500 ng/µl)	7 µl
CPS-Rohextrakt	44 µl
PtKS1a/b/PtKS2-Rohextrakt	44 µl

Der Ansatz wurde mit 100 µl *n*-Hexan (VWR International) überschichtet und bei 30 °C ca. 4 h im Thermomixer *comfort* (Eppendorf) inkubiert. Um das Überführen der hydrophoben Produkte in die Hexanphase zu erleichtern, wurden alle Proben etwa 5 min mit dem Vortexer Vortex-Genie 2TM (Scientific Industries, Bohemia, USA) durchmischt; eine erneute Phasentrennung wurde durch Zentrifugation (5 min, 5000 g) erreicht. Einfrieren der Probe in flüssigem Stickstoff und langsames Auftauen der Probe erleichterte eine Abnahme der reinen Hexanphase, welche zur Analyse auf eine GC-MS (siehe 2.7.3) aufgetragen wurde.

2.7 CHEMISCHE ANALYSE

2.7.1 HEXANEXTRAKTION APOLARER STOFFE AUS VERSCHIEDENEN ORGANEN

Zur Analyse der weniger flüchtigen, hydrophoberen/apolaren Naturstoffe in den Organen der Pappel wurden je 100 mg Knospenspulver, bzw. ca. 200 mg der gemörserten Stängel-, Wurzel- und Blattproben (vgl. 2.1) von sieben Stecklingen mit 1 ml Hexan-Lösung (n-Hexan mit 20,17 ng/µl Nonylacetat als interner Standard) versetzt und die Ansätze nach Durchmischung für 4 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Hexanphase wurde abgenommen und mittels GC-MS analysiert (siehe 2.7.3).

2.7.2 SPME ZUR ANALYSE VOLATILER STOFFE AUS VERSCHIEDENEN ORGANEN

Die Extraktion flüchtiger Naturstoffe aus je 100 mg Proben von allen Organen gelang durch Inkubation der Proben bei 40 °C im Wasserbad für 1 h. Die in den Gasraum über den Proben entwichenen Stoffe wurden von einer, dort platzierten, SPME (*solid phase microextraction*)-Faser (100 µm PDMS, Supelco, Bellafonte, USA) gebunden. Die isolierten Stoffe konnten anschließend mittels GC-MS analysiert (2.7.3) werden.

2.7.3 GASCHROMATOGRAPHISCHE ANALYSE DER NATURSTOFFE (GC-MS)

Die Gaschromatographie (GC) ist eine Methode zur Trennung von relativ flüchtigen Stoffen. Der Injektor, welcher heiß genug ist, um die Substanzen aus den flüssigen Proben in die Gasphase zu überführen, überträgt die Substanzen in eine Säule. Diese wird mit einem Trägergas gespült. Je nach Polarität und Dampfdruck der aufgetragenen Proben wechselwirken diese unterschiedlich mit der stationären und mobilen Phase und unterscheiden sich daher im Zeitpunkt des Austritts aus der Säule. Anschließend können die Substanzen durch nachgeschaltete Detektoren genauer charakterisiert werden.

Die gaschromatographische Trennung und Identifizierung der Stoffgemische erfolgte mit dem Gaschromatographen 6890N Network GC-System (Agilent Technologies) mit 7683 Series Injektor und dem daran gekoppelten Quadrupol-Massenspektrometer 5973inert Mass Selective Detector (Agilent Technologies). Für die Hexanextrakte aus Pappelorganen wurde 1 µl Probe injiziert (*splitless*) und von den Extrakten der Bioassays wurden 2 µl (*splitless*) Probe injiziert. Die an die SPME-Faser gebundenen volatilen Stoffe wurden durch direkte Injektion der Faser aufgetragen. Die Injektionstemperatur betrug 240 °C, Helium diente als Trägergas (1,5-2 ml/min). Als

Chromatographiesäulen wurden DB-5MS-Säulen [30 m x 0,25 mm (Innendurchmesser) x 0,25 µm (Filmdicke); J&W Scientific, Folsom, USA) genutzt. Die jeweils verwendeten Temperaturprofile sind der Tabelle 2.18 zu entnehmen. Nach der Probentrennung erfolgte zur Identifizierung der Stoffe die Analyse mittels Massenspektrometer. Da jede Substanz ein spezifisches Fragmentierungsmuster aufweist, können diese durch Datenbankabgleich identifiziert werden.

Das Massenspektrometer wurde mit folgenden Einstellungen betrieben: Transferlinien-Temperatur: 230 °C, Quelle: 230 °C, Quadrupol-Temperatur: 150 °C, Ionisierungspotential: 70 eV, Scan-Bereich: 50-400 Atommasseneinheiten.

TAB. 2.18: Temperaturprofile der GC-Programme

	Hexanextrakt		Bioassay		SPME	
Anfangstemperatur	45 °C	(2 min)	90 °C	(3 min)	50 °C	(3 min)
	↓	(6 °C/min)	↓	(7 °C/min)	↓	(6 °C/min)
Stufe	270 °C		280 °C		260 °C	
	↓	(60 °C/min)	↓	(100 °C/min)	↓	(100 °C/min)
Endtemperatur	340 °C	(2 min)	320 °C	(1 min)	330 °C	(1 min)

2.7.4 QUALITATIVE UND QUANTITATIVE AUSWERTUNG DER GC-MS-AUFTRENNUNG

Zur Identifikation der aus den Organen isolierten Stoffe anhand deren Massenspektren wurde mit dem Datenauswertungsprogramm „Data Analysis“ der HP ChemStation Software (Hewlett-Packard) gearbeitet. Als Massenspektrendatenbanken dienten Wiley 275, Nist 98 und Adams 2205 (Hewlett-Packard). Zur relativen Quantifizierung der Stoffe wurden die einzelnen Peakflächen durch Integration mittels des Softwareprogramms ermittelt.

Zur Identifikation der Produkte der Bioassays wurden neben den genannten Datenbanken auch authentische Standards (freundlicherweise bereit gestellt durch Reuben Peters, Iowa-State University) genutzt, um die Zuordnung durch Abgleich der Retentionszeiten und Massenspektren zu bestätigen.

2.8 COMPUTERGESTÜTZTE ANALYTIK

2.8.1 PHYLOGENETISCHE ANALYSE

Zur Einordnung der in der Internetdatenbank Phytozome v9.1 (www.phytozome.net) gefundenen Proteinsequenzen für Diterpensynthesen aus *P. trichocarpa* (Potri.008G082400, Potri.008G082700, Potri.002G052100, Potri.005G210300) wurden diese Sequenzen mit ausgewählten, bereits annotierten Diterpensynthesen anderer Pflanzenspezies, welche der Datenbank „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov) entnommen wurden, verglichen. Hierzu wurde ein Alignment aller im FASTA-Format gespeicherten Sequenzen mittels des Programms MEGA 5.05 (Tamura et al., 2011) über den MUSCLE-Algorithmus (Edgar, 2004) durchgeführt. Die Zugangsnummern der Proteine befinden sich in Tabelle 2.19. Das Alignment diente zur Generierung eines phylogenetischen Baums nach der *neighbor-joining*-Methode und anschließendem „Bootstrapping“ mit 1000 Wiederholungen. Dies wurde ebenfalls mit dem Programm MEGA 5.05 ausgeführt.

TAB. 2.19: Herkunft und Zugangsnr. der zur phylogenetischen Untersuchung verwendeten Proteinsequenzen

Sequenzname	Spezies	Zugangsnummer
<i>CmKS</i>	<i>Cucurbita maxima</i>	Q39548
<i>OsKS1</i>	<i>Oryza sativa Japonica Group</i>	Q0JA82
<i>RcKS</i>	<i>Ricinus communis</i>	XP_002533694
<i>PgKS</i>	<i>Picea glauca</i>	D2X8G1
<i>AtKS</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AAC39443.1
<i>OsCPS2_{ent}</i>	<i>Oryza sativa Indica Group</i>	AAT11021
<i>An2</i>	<i>Zea mays</i>	AAT70083
<i>AtCPS</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q38802.1
<i>PcCPS</i>	<i>Picea sitchensis</i>	ADB55709

2.8.2 PROTEINSEQUENZANALYSE

Mittels des Programms BioEdit (T. Hall, 2013) wurden die abgeleiteten Aminosäuresequenzen PtKS1a, PtKS1b und PtKS2 mit den Datenbanksequenzen für *ent*-CPS aus *P. trichocarpa* sowie Diterpensynthesesequenzen von *Arabidopsis thaliana* durch ClustalW multiples Alignment verglichen. Die Namen der *ent*-CPS von *P. trichocarpa* Potri.002G052100 und Potri.005G210300 entsprechen den Zugangsnummern in der Onlinedatenbank „Phytozome.net“. Die Zugangsnummern für die Proteine aus *A. thaliana* sind in Tab. 2.19 aufgelistet.

2.8.3 MODELLING DREIDIMENSIONALER PROTEINSTRUKTUREN

Die auf Homologie beruhende Modellierung wurde mittels des Onlineprogramms SwissModel (swissmodel.expasy.org) durchgeführt. Als *template* verwendete dieses die Abietadiensynthase aus *Abies grandis* (PDB (Protein Data Bank)-Code: 3S9V) um die Raumstrukturen von PtKS1a und PpCPS/KS zu ermitteln. Die erhaltenen Strukturmodelle wurden mit PyMOL (DeLano Scientific) visualisiert.

3 ERGEBNISSE

3.1 SEQUENZANALYSE PUTATIVER KAURENSYNTHASEN DER PAPPEL

Die phylogenetische Untersuchung der in der Datenbank Phytozome.net gefundenen putativen Diterpensynthasen aus *Populus trichocarpa* zeigte eine nahe Verwandtschaft der beiden Protein-

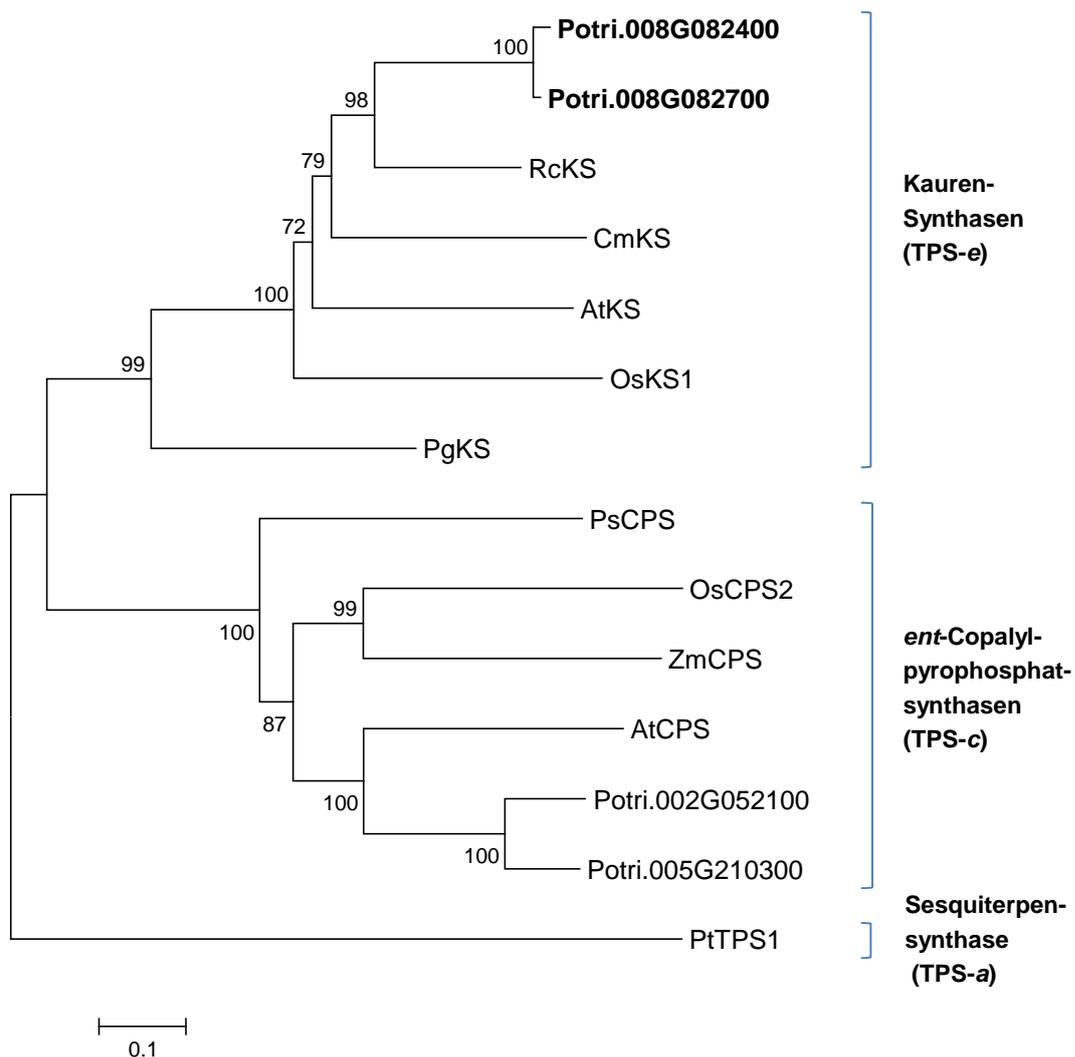


Abb. 3.1: Phylogenetische Analyse der putativen Kaurensynthasen (KS) und Copalylpyrophosphatsynthasen (CPS) der Westlichen Balsam-Pappel (*Populus trichocarpa*). Es wurden bereits charakterisierte KS und CPS von anderen Pflanzen mit den putativen KS und CPS, welche im Pappelgenom codiert sind, verglichen. Der phylogenetische Baum wurde durch das Programm MEGA Version 5 (Tamura et al., 2011) mit dem „Neighbor-Joining“-Algorithmus unter Verwendung eines MUSCLE-Alignments erstellt. Das Bootstrap-Verfahren erfolgte mit 1000 Iterationen. Als *outgroup* wurde die Germacren D Synthase (PtTPS1) von *P. trichocarpa* gewählt (Danner et al., 2011). Die Einteilung in die TPS-Unterfamilien ist vermerkt (Bohlmann et al., 1998). Rc: *Ricinus communis*, Cm: *Cucurbita maxima*, At: *Arabidopsis thaliana*, Os: *Oryza sativa*, Pg: *Picea glauca*, Ps: *Picea sitchensis*, Zm: *Zea mays*, Pt: *P. trichocarpa*.

sequenzen Potri.008G082400 und Potri.008G08270 zu *ent*-Kaurensynthasen (KS) von Angiospermen (Abb. 3.1). Eine TBLASTN- Suche der Proteinsequenzen von Potri.008G082400/700 mittels der Datenbank NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) ergab, dass die engste Verwandtschaft zu der putativen KS RcKS aus *Ricinus communis* besteht (Identität: 70%)(Abb. 3.1). Die Proteinsequenzen wurden daher der Unterfamilie TPS-*e* der KS und Kaurensynthase-ähnlichen Proteine (KSL) nach der Aufteilung der Terpensynthasen von Bohlmann et al. (1998) zugeordnet. Die weiterhin gefundenen möglichen Diterpensynthasen Potri.002G052100 und Potri.005G210300 weisen dagegen eine höhere Verwandtschaft zu *ent*-Copalyldiphosphatsynthasen (*ent*-CPS) der Unterfamilie TPS-*c* auf und wurden daher als solche eingeordnet (Abb. 3.1).

Aus cDNA von Blättern, Stängeln und Wurzeln von *P. trichocarpa* konnten drei verschiedene KS(L)-Sequenzen amplifiziert werden. Diese Sequenzen wurden durch unabhängiges erneutes Amplifizieren bestätigt. Die abgeleiteten putativen KS(L) erhielten ihre Bezeichnung als PtKS1a, PtKS1b und PtKS2 in Abhängigkeit ihres Differenzierungsgrades. Sie weisen untereinander eine sehr hohe Ähnlichkeit auf. Auf Aminosäureebene entsprechen sich PtKS1a und PtKS1b zu 99,1%, PtKS1b und PtKS2 zu 97,8%, sowie PtKS1a und PtKS2 zu 97,7%. Auf DNA-Ebene ergaben sich ähnlich hohe Übereinstimmungen (*PtKS1a/PtKS1b* 99,4%, *PtKS1a/PtKS2* 98,7%, *PtKS1b/PtKS2* 98,7%).

Zur Identifikation charakteristischer Motive wurden die abgeleiteten Proteinsequenzen durch ClustalW-Alignment mit den in der Datenbank Phytozome v9.1 gefundenen *ent*-CPS Potri.002G052100 (PtCPS1) und Potri.005G210300 (PtCPS2) aus der Pappel und mit einer bekannten KS (AtKS) und einer *ent*-CPS (AtCPS) aus *Arabidopsis thaliana* verglichen (Abb. 3.2).

N-Terminal weisen alle Sequenzen das für Diterpensynthasen charakteristische Motiv SXYDT(A/S)W auf (Abb. 3.2). Dieses entspricht dem N-terminalen Ende der γ -Domäne unmittelbar nach dem N-terminalen Signalpeptid (Aubourg et al., 2002). Weiterhin ist in der N-terminalen Hälfte der *ent*-CPS das für CPS charakteristische Motiv DXDD zu finden, welches für die anfängliche Protonierung einer Doppelbindung und damit für die Aktivität der *ent*-CPS entscheidend ist. Auch das EDXXD-like Motiv der Klasse II-Terpensynthasen (Cao et al., 2010) zur Bindung von Mg^{2+} /Pyrophosphat ist in den CPS-Sequenzen zu finden. Beide Motive fehlen in den untersuchten putativen KS(L) (Abb. 3.2).

Dagegen ist C-terminal in allen putativen KS(L) das DDXXD-Motiv und das „NSE/DTE“-Motiv (NDXXS/GXXXE) zu finden. Die Motive sind für die Bindung von insgesamt drei Mg^{2+} -Ionen und damit für die von Klasse I-Terpensynthasen katalysierte Ionisation des Prenylpyrophosphats notwendig. Die *ent*-CPS enthalten keines dieser beiden Motive (Abb. 3.2).

PtKs1a -----MSCSRPWFPCSSISATLTD 20
 PtKs1b -----MSCSRPWFPCSSISATLTD 20
 PtKs2 -----MSCSRPWFPCSSISATLTD 20
 AtKs -----MSINLRSSGCSPIISATL 21
 PtCPS1 MAS-----FSIGVWLYGARGKQDNFHAHSRCSAISKPRTOGYADLFHQOGLPLINWPHDVEDDT 61
 PtCPS2 MSSHYSSIHLLSTVPSTPRSSFTSNNIHLPLFPAGVWLYGAKDKD--NIHTRCSAISKPRTOGYADLFHQOGLPLINWPHDIVEDDA 88
 AtCPS MSLQYHVLN--SIPSTFLSSTKTTISSSFLTISGSPLNVARDKSR----SGSIHCSKLRTOEYINSQEVQHDLLPLIHEWQQLQGEDA 82

SxYDTAW

PtKs1a ASKLVTFGEFKTSLNLFHGTKERIKKMFDKIELSVSSYDTAWVAVMPSPDCPETPCFPECTKWILENQLGDGWSLPHGNPLLVKDALSS 109
 PtKs1b ASKLVTFGEFKTSLNLFHGTKERIKKMFDKIELSVSSYDTAWVAVMPSPDCPETPCFPECTKWILENQLGDGWSLPHGNPLLVKDALSS 109
 PtKs2 ASKLVTFGEFKTSLNLFHGTKERIKKMFDKIELSVSSYDTAWVAVMPSPDCPETPCFPECTKWILENQLGDGWSLPHGNPLLVKDALSS 109
 AtKs LDSEVQTRAN--NVSEEQTKERIKKMLEKVELSVSYDTAWVAVMPSPSSQNAFLPFCQVWLLDNCHEDGWSGLDNHDKQSLKQVLLSS 109
 PtCPS1 EEDAARVVAKEIDEHVKIKAMLEMDGGEISISAYDTAWVALVEDINGSGLPQFPSSLQWIANQLPDGWSGDA--EIFLAHRLIN 148
 PtCPS2 EEDAARVVAKEISKRVRIKAMLEMDGGEISISAYDTAWVALVEDINGSGLPQFPSSLQWIANQLPDGWSGDA--GIFLAHRLIN 175
 AtCPS PQISVG--SNSNAFKEAVKSVKTLRLNLTGDEITISAYDTAWVALID--AGDKLPAFPAVWIAENQLSDGWSGDA--YLFYHDLRLIN 166

EDxxD

PtKs1a TLACILALRWGIGEEQINKGLRFIELNSASVTD-NEQHKPIGFDIIFPGMIEYADLDLNLPLKPTDINSMLHRRALLETSGGGKNEG 198
 PtKs1b TLACILALRWGIGEEQINKGLRFIELNSASVTD-NEQHKPIGFDIIFPGMIEYADLDLNLPLKPTDINSMLHRRALLETSGGGKNEG 198
 PtKs2 TLACILALRWGIGEEQINKGLRFIELNSASVTD-NEQHKPIGFDIIFPGMIEYADLDLNLPLKPTDINSMLHRRALLETSGGGKNEG 198
 AtKs TLASLILALKKGI GERQINKGLRFIELNSALVTD-ETIQKPIGFDIIFPGMIKYARDLNLTIPLGSEVDDMRKRDLDDKCKSEKFSK 198
 PtCPS1 TLACVVALKSNWNLHQCKBKGMFFRDNLCKLEDENAEHMPGFEVAFPSLLAIKAKLDIEVPYDSEVLEIYASRNKLRTRIPKDIMHN 238
 PtCPS2 TLACVVALKSNWNLHQCKBKGMFFRDNLCKLEDENAEHMPGFEVAFPSLLAIKAKLDIEVPDDSTFLOEYIARRNKLKRISKDIMHN 265
 AtCPS TLACVVALKSNWNLHQCKBKGMFFRDNLCKLEDENAEHMPGFEVAFPSLLAIKAKLDIEVPYDSEVLEIYARINIDVYDSEVLEIYAKKELKLRTRIPKEIMHK 256

PtKs1a RRAYLAYVSEGIKLODWEMAMKYQRKNGSLFNSPSTTAAAFIHIQDAECLHYIRSLLOKFGNAVPTIYPLDIYARLSMVDALERLCIDR 288
 PtKs1b RRAYLAYVSEGIKLODWEMAMKYQRKNGSLFNSPSTTAAAFIHIQDAECLHYIRSLLOKFGNAVPTIYPLDIYARLSMVDALERLCIDR 288
 PtKs2 RRAYLAYVSEGIKLODWEMAMKYQRKNGSLFNSPSTTAAAFIHIQDAECLHYIRSLLOKFGNAVPTIYPLDIYARLSMVDALERLCIDR 288
 AtKs REAYLAYVLEGRNLDKWDLIYKQRKNGSLFNSPSTTAAAFIHIQDAECLHYIRSLLOKFGNAVPTIYPLDIYARLSMVDALERLCIDR 288
 PtCPS1 VPTTLHLSLEGMPGL--EWKRLIKLQSQDGSFLSPSSTAFALSTQDKDKNCEYLNKAVORFEGGVNPNVYVDLFEHIAWDRLOQLGISR 327
 PtCPS2 VPTTLHLSLEGMRGL--DWKQLIKLQSQDGSFLSPSSTAFALSTQDKDKNCEYLNKAVORFEGGVNPNVYVDLFEHIAWDRLOQLGISR 354
 AtCPS IPTTLHLSLEGMRDL--DWEKLIKLQSQDGSFLSPSSTAFALSTQDKDKNCEYLNKAVORFEGGVNPNVYVDLFEHIAWDRLOQLGISR 345

DxDD

PtKs1a HRKERKFLVDETYRFLWLOG----EEEI FSNATQALAFRIILRLNGYDVSILTLNQFS EDH-FSNLSGGYLKDSGAALBLRYALQLSYP 372
 PtKs1b HRKERKFLVDETYRFLWLOG----EEEI FSNATQALAFRIILRLNGYDVSILTLNQFS EDH-FSNLSGGYLKDSGAALBLRYALQLSYP 372
 PtKs2 HRKERKFLVDETYRFLWLOG----EEEI FSNATQALAFRIILRLNGYDVSILTLNQFS EDH-FSNLSGGYLKDSGAALBLRYALQLSYP 372
 AtKs DRKTIKISILDETYRFLWLRG----DEELCLDLATQALAFRIILRLNGYDVSILTLNQFS EDH-FSNLSGGYLKDSGAALBLRYALQLSYP 372
 PtCPS1 YFESQIDECVNYIHRMWTEDGICWARNSEVHDDIDTAMGFRVRLNQHVSADVFKHFEKGGEFFCFAGQSTAAVTGMFNLYRASQLLFP 417
 PtCPS2 YFVSLINECVDYIHRMWTENGICWARNSEVHDDIDTAMGFRVRLNQHVSADVFKHFEKGGEFFCFAGQSTAVTGMFNLYRASQLLFP 444
 AtCPS YFEEELKECLDYVHRMWTEDGICWARNSEVHDDIDTAMGFRVRLNQHVSADVFKHFEKGGEFFCFAGQSTAAVTGMFNLYRASQLLFP 435

PtKs1a DBSLEKQNSRSTYFLKQGLSNVSLCGDRLR--KNIIGEVDALNFPDHANLQRLAIRRRIKH-YATDDTRILKTSYRCSSTIGNQDFLKL 460
 PtKs1b DBSLEKQNSRSTYFLKQGLSNVSLCGDRLR--KNIIGEVDALNFPDHANLQRLAIRRRIKH-YATDDTRILKTSYRCSSTIGNQDFLKL 460
 PtKs2 DBSLEKQNSRSTYFLKQGLSNVSLCGDRLR--KNIIGEVDALNFPDHANLQRLAIRRRIKH-YATDDTRILKTSYRCSSTIGNQDFLKL 460
 AtKs HBSALKKQCCWTKQYLEMELS--SVWTKSVRDKYLKLEVEDALAFPSYASLERSDHRKLLNGSAVENTRVTKTSYRLHNICTSDDLKLA 460
 PtCPS1 GBKILFKAKEFYFKLREKQAANELLDKWIIKDLPGVGFALIEIPWYASLPRVETRFYIEQYGGEDDVWIGKTLRYMPSYVNNNGYVLELA 507
 PtCPS2 GBKILFKAKEFYFKLREKQAANELLDKWIIKDLPGVGFALIEIPWYASLPRVETRFYIEQYGGEDDVWIGKTLRYMPSYVNNNGYVLELA 534
 AtCPS RBEILFKNAKEFYSYVLEKREEREELDKWIIKDLPGVGFALIEIPWYASLPRVETRFYIEQYGGEDDVWIGKTLRYMPSYVNNNGYVLELA 525

DDxxD

PtKs1a VDDFNICQSIQREBEFKHIERWVVERRLDKLKFARQKEAYCYFSAATLFAPELSDARMSWAKNGVLTIVVDDFDVGV--GSEELVNLI 547
 PtKs1b VDDFNICQSIQREBEFKHIERWVVERRLDKLKFARQKEAYCYFSAATLFAPELSDARMSWAKNGVLTIVVDDFDVGV--GSEELVNLI 547
 PtKs2 VDDFNICQSIQREBEFKHIERWVVERRLDKLKFARQKEAYCYFSAATLFAPELSDARMSWAKNGVLTIVVDDFDVGV--GSEELVNLI 547
 AtKs VDDFNICQSIQREBEFKHIERWVVERRLDKLKFARQKEAYCYFSAATLFAPELSDARMSWAKNGVLTIVVDDFDVGV--GSEELVNLI 547
 PtCPS1 RLDYNNCCALHRIEAWNFQKWEENLDRDFGISRRTLIFSYFLAAASIEPERSKBRLLAWATTTLVLDIVGSYFENHNNSSEQRRAFIH 597
 PtCPS2 KLDYNNCCALHRIEAWNFQKWEENLDRDFGISRRTLIFSYFLAAASIEPERSKBRLLAWATTTLVLDIVGSYFENHNNSSEQRRAFIH 624
 AtCPS KQDYNNCCAQHQLWDFIQKWEENLDRDFGISRRTLIFSYFLAAASIEPERSKBRLLAWATTTLVLDIVGSYFENHNNSSEQRRAFIH 611

PtKs1a ELIERWDVNGS-----ADFCSEVEI IYSAIHSITISEIGKSFGWQGRDVKSOVIKIWLDDLKSMLEAQAWSNKSVP TLD 623
 PtKs1b ELIERWDVNGS-----ADFCSEVEI IYSAIHSITISEIGKSFGWQGRDVKSHVIKIWLDDLKSMLEAQAWSNKSVP TLD 623
 PtKs2 ELIERWDVNGS-----ADFCSEVEI IYSAIHSITISEIGKSFGWQGRDVKSHVIKIWLDDLKSMLEAQAWSNKSVP TLD 623
 AtKs HLVEKWDLVNGV-----PEYSSEHVEI IYSAIHSITISEIGKSFGWQGRDVKSHVIKIWLDDLKSMLEAQAWSNKSVP TLD 623
 PtCPS1 EFSTGISINGR-----RSGTKTRKELVKMLLGLNLQSLFGALVHGRDISHSRHRHAWERWLIWLELGDRRRGEAE 669
 PtCPS2 EFSYGISINGREENDYLCILVCCRSGRKKTRQELVKLLGLNLQSLFGALVHGRDISHSRHRHAWERWLIWLELGDRRRGEAE 710
 AtCPS QFHEYIANARRSDHFNDRNMLDRPGSVQASR--LAGVLIIGLNLQSLFGALVHGRDVNNLILYLSWGDWMEKWKLYGD--EGEGE 693

NDxxS/GxxxE

PtKs1a EYMTTAHVSAFALGPIVLPALYFVGPKLSEEVAGHPPELLNLYKVTSTCGRLLDNRWSFKRESEEGKLNNAVSLYMIHSGGASTEETIEHFK 713
 PtKs1b EYMTTAHVSAFALGPIVLPALYFVGPKLSEEVAGHPPELLNLYKVTSTCGRLLDNRWSFKRESEEGKLNNAVSLYMIHSGGASTEETIEHFK 713
 PtKs2 EYMTTAHVSAFALGPIVLPALYFVGPKLSEEVAGHPPELLNLYKVTSTCGRLLDNRWSFKRESEEGKLNNAVSLYMIHSGGASTEETIEHFK 713
 AtKs DYMENAYISFALGPIVLPALYFVGPKLSEEVAGHPPELLNLYKVTSTCGRLLDNRWSFKRESEEGKLNNAVSLYMIHSGGASTEETIEHFK 713
 PtCPS1 -----LLVQTHLITAGYKVEEL---LVYHPQYEQADLTNRICYQLGHYQKNKVDHNGS-----YSTITGSTRIT 734
 PtCPS2 -----LLVQTHLITAGYKVEEL---LAHPQYEQADLTNRICYQLGHYQKNKVDHNGS-----YSTITGSTRIT 775
 AtCPS -----LMVKMILMKNNDLTN-----FTHTHFVRLAEIINRICKLPR-QYLKARNDI-----KEKTI 745

PtKs1a GLIDSQRQLLQVLQEKDSIIPRPCKDLFWNMIKLHHTFYMKDDGFTSNEMRNVVKAIINEPI SLDL--- 782
 PtKs1b GLIDSQRQLLQVLQEKDSIIPRPCKDLFWNMIKLHHTFYMKDDGFTSNEMRNVVKAIINEPI SLDL--- 782
 PtKs2 VLIDSQRQLLQVLQEKDSIIPRPCKDLFWNMIKLHHTFYMKDDGFTSNEMISVVKAIINEPI SLDL--- 782
 AtKs GLAEKRREELHRLVLEEKGSVVPRECKEAFRLMSKVLNLFYRKDDGFTSNEMLSLVKSVIYEBVSLQKESLT 785
 PtCPS1 PQIESDMQELMQLVQKTSKSDGIDPKIKQIFLQVAKSFYIYAFCDPQITINYHIAKVLFTVA----- 795
 PtCPS2 PQIESDMQELVQVQNPSDGLDSNIKQIFLQVAKSFYIYSAICDPQITINYHIAKVLFTVA----- 836
 AtCPS KSMEREMGMVBLALSE--SDTFR--DVSIITFLDVAKAFYIFALCG--DHLQTHISKVLFQKV----- 802

Abb. 3.2: Proteinsequenzvergleich von PtKS1a, PtKS1b und PtKS2 mit bereits charakterisierten CPS und KS aus *P. trichocarpa* und *A. thaliana*. Das Alignment wurde mit dem Programm BioEdit unter der Verwendung des ClustalW Algorithmus erstellt. Schwarz unterlegte Aminosäuren sind in allen Sequenzen identisch, dunkelgrau Unterlegte in mind. 4 Sequenzen und hellgrau Gefärbte in 3 Sequenzen. Die in Diterpensynthesen der Klasse I und II vorhandenen charakteristischen Motive sind jeweils über dem entsprechenden Sequenzabschnitt vermerkt.

3.2 FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG DER PUTATIVEN KS(L)

Die putativen KS(L)-Gene aus *P. trichocarpa* wurden ohne N-terminales Signalpeptid heterolog exprimiert. Das Signalpeptid dient *in vivo* zum Transport der Enzyme in die Plastiden und wird im Anschluss enzymatisch abgespalten (Chen et al., 2011). *In vitro* könnte es eine fehlerhafte Faltung der Enzyme hervorrufen und dadurch deren Aktivität beeinträchtigen. Nach partieller Aufreinigung der Proteine und Enzymassays mit den drei Stereoisomeren des Copalylpyrophosphats (CPP), *ent*-CPP, *n*-CPP und *syn*-CPP, als potentielle Substrate der Diterpensynthesen, konnten die Reaktionsprodukte gaschromatographisch analysiert werden.

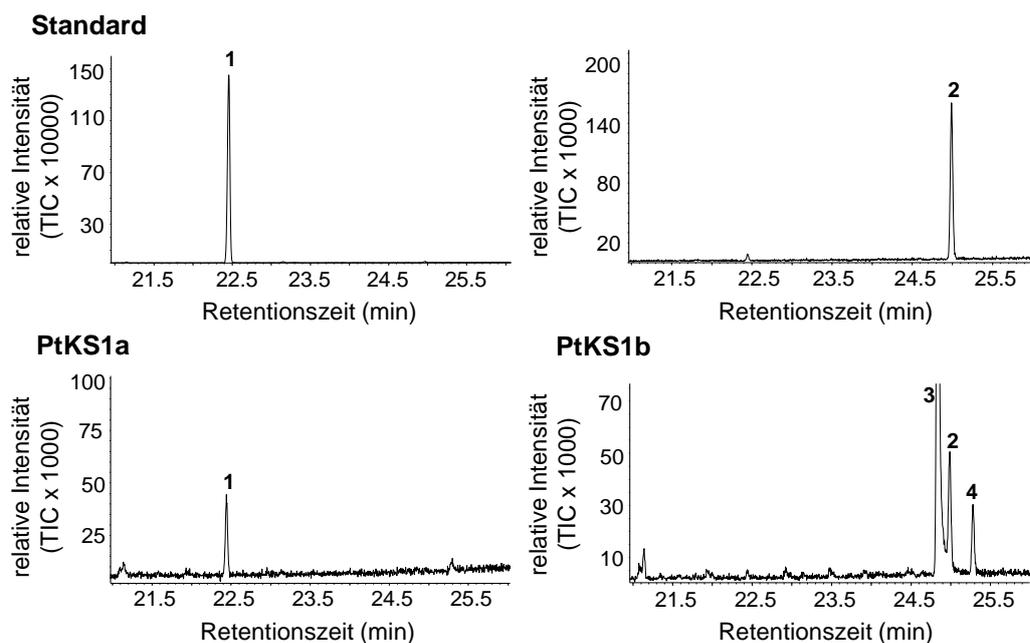


Abb. 3.3: Bildung von *ent*-Kaur-16-en und 16 α -Hydroxy-*ent*-Kauran durch PtKS1a beziehungsweise PtKS1b. *PtKS1a* und *PtKS1b* wurden heterolog in *E. coli* exprimiert, die Enzyme partiell aufgereinigt und mit GGPP und einer *ent*-Copalylpyrophosphatsynthase inkubiert. Die Assays wurden mit Hexan extrahiert und die Produkte mittels GC-MS analysiert. Authentische Standards wurden zur Verifizierung der Produktidentität verwendet. (1): *ent*-Kaur-16-en, (2): 16 α -Hydroxy-*ent*-Kauran, (3): Manoyloxid, (4): Cedrenepoxid.

In *PtKS1a* und *ent*-CPS enthaltenden Ansätzen war *ent*-Kaur-16-en als Produkt nachweisbar (Abb. 3.3). Bioassays von *PtKS1b* mit *ent*-CPS wiesen dagegen als einziges Produkt 16 α -Hydroxy-*ent*-Kauran auf (Abb. 3.3). Daneben waren in beiden Chromatogrammen Spuren unspezifischer Hydrolyse- und

Umlagerungsprodukte der Substrate GGPP und *ent*-CPP (Manoyloxid, Cedrenepoxid) zu finden. Sowohl PtKS1a als auch PtKS1b zeigten nur in Anwesenheit von *ent*-CPP Aktivität. Die ebenfalls als Substrat getesteten Stoffe *n*-CPP und *syn*-CPP wurden nicht umgesetzt (Daten nicht gezeigt). In keinem Ansatz des aus wiederholten, unabhängigen Expressionsexperimenten gewonnenen PtKS2 waren Produkte nachweisbar (Daten nicht gezeigt).

3.3 MUTATION-BASIERTE UNTERSUCHUNG DER PRODUKTSPEZIFITÄT VON PTKS1A UND PTKS1B

Obwohl sich die Aminosäuresequenzen von PtKS1a und PtKS1b nur wenig unterscheiden (vgl. 3.1), katalysierten die Enzyme die Umsetzung von *ent*-CPP zu zwei verschiedenen Produkten (vgl. 3.2). Eine Modellierung der Raumstruktur der Synthasen sollte Aufschluss darüber geben, welche der sieben variierenden Aminosäuren für die unterschiedliche Produktbildung verantwortlich ist. Abbildung 3.4

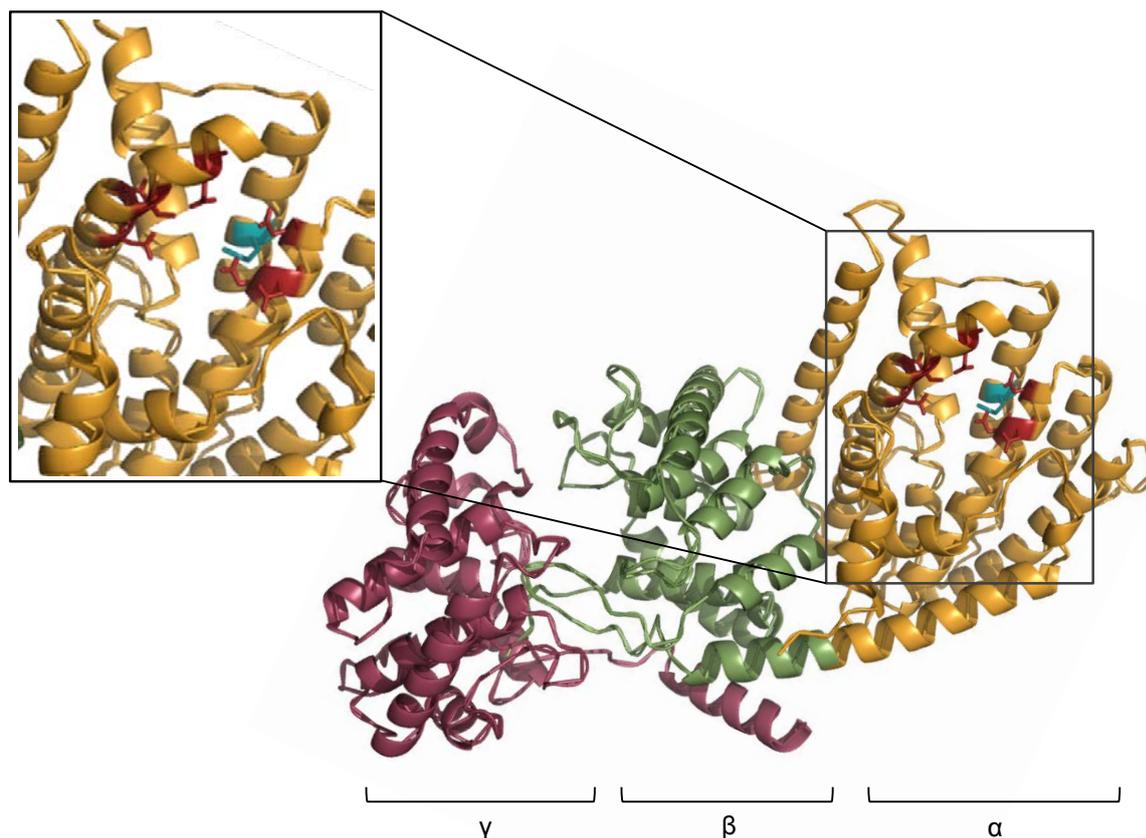


Abb. 3.4: Modellierung der Raumstruktur von PtKS1a. Für die auf Homologie beruhende Modellierung von PtKS1a mittels des Programms SwissModel wurde die Abietadiensynthese aus *Abies grandis* (PDB-Code: 3S9V) als Vorlage verwendet. Das Strukturmodell von PtKS1a wurde mittels PyMOL visualisiert. Die Domänen α , β und γ sind gelb, grün beziehungsweise rot dargestellt. Das DDXXD-Motiv und das NSE/DTE-Motiv sind rot gefärbt, die Aminosäure Methionin (Met₆₀₇) blau.

zeigt ein Modell der PtKS1a. PtKS1a besteht aus den drei, für Diterpensynthesen charakteristischen, Domänen α , β und γ . Die α -Domäne bildet eine Substratbindetasche, an deren Ende die in Klasse I-Terpensynthesen katalytisch aktiven Motive DDXXD und NDXXSXXE zu finden sind (Abb. 3.2). In der Nähe der Motive befindet sich die Seitenkette der Aminosäure Met₆₀₇. Die Lage der Aminosäure im aktiven Zentrum lässt vermuten, dass sie auf noch unbekannte Art an der enzymatischen Umsetzung des Substrats beteiligt ist. In PtKS1b ist an dieser Stelle ein Thr statt Met

in der Aminosäuresequenz vorhanden. Möglicherweise ist dieser Aminosäureunterschied entscheidend für die spezifische Produktbildung der beiden Synthasen.

Die Funktion der mit der Produktspezifität in Verbindung gebrachten Aminosäuren Met₆₀₇ (PtKS1a) bzw. Thr₆₀₇ (PtKS1b) sollte durch ortsgerichtete Mutagenese von PtKS1b herausgefunden werden. Durch Mutation eines Nukleotids wurde die Aminosäure Thr₆₀₇ von PtKS1b zu Met₆₀₇ umgewandelt. Das Konstrukt *mutPtKS1b*_(T→M) wurde in *E. coli* exprimiert, das Enzym partiell aufgereinigt und die Enzymaktivität nach einem Bioassay mittels GC-MS analysiert. Die Mutagenese und nachfolgende Genexpression der mutierten Sequenz wurde zweimal unabhängig durchgeführt.

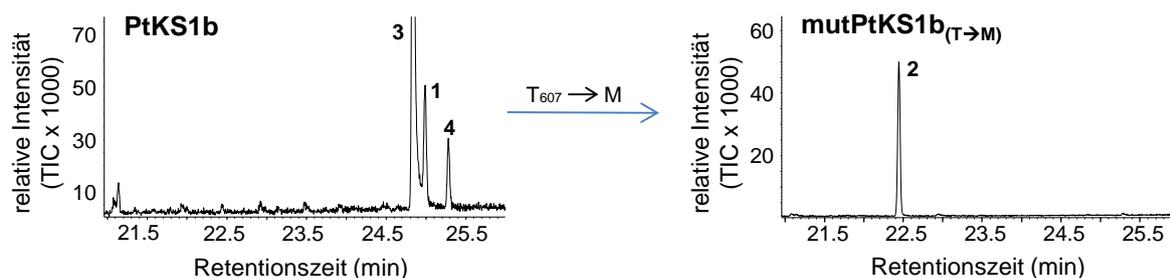


Abb. 3.5: Produktspezifität von PtKS1b und *mutPtKS1b*_(T→M). Die Aminosäure Threonin (T₆₀₇) im aktiven Zentrum der PtKS1b wurde mittels Mutations-PCR gegen ein Methionin (M₆₀₇) ausgetauscht. Beide Sequenzen wurden in *E. coli* heterolog exprimiert, die Enzyme partiell aufgereinigt und mit GGPP und einer *ent*-Copalylypyrophosphatsynthase inkubiert. Die Produkte wurden mit Hexan extrahiert, mittels GC-MS analysiert und durch den Vergleich der Retentionszeiten und Massenspektren mit denen von authentischen Standards identifiziert. (1): 16 α -Hydroxy-*ent*-Kauran, (2): *ent*-Kaur-16-en, (3): Manoyloxid, (4): Cedreneperoxid.

In Abbildung 3.5 ist erkennbar, dass sich das von *mutPtKS1b*_(T→M) gebildete Produktspektrum von dem des Wildtypenzym PtKS1b unterscheidet. Anhand der Retentionszeit und des Massenspektrums (Daten nicht gezeigt) konnte *ent*-Kaur-16-en als Produkt von *mutPtKS1b*_(T→M) identifiziert werden, während der Wildtyp PtKS1b 16 α -Hydroxy-*ent*-Kauran bildete. 16 α -Hydroxy-*ent*-Kauran konnte im Chromatogramm von *mutPtKS1b*_(T→M) nicht nachgewiesen werden.

Der Austausch von Met₆₀₇ im aktiven Zentrum von PtKS1a gegen Thr hatte dagegen zur Folge, dass für diese Enzym gar keine Aktivität mit *ent*-CPP mehr nachgewiesen werden konnte.

3.4 ORGANSPEZIFISCHE EXPRESSIONSRATEN DER *DtTPS*

Zur weiteren Charakterisierung der identifizierten Diterpensynthesen wurde die Transkriptakkumulation von *PtKS1a*, *PtKS1b*, *PtKS2* sowie von den Genen der beiden CPS *PtCPS1* (Potri.002G052100) und *PtCPS2* (Potri.005G210300) in den verschiedenen Organen mittels qRT-PCR (quantitative Real-Time-PCR) untersucht. In Abbildung 3.6 ist erkennbar, dass alle untersuchten

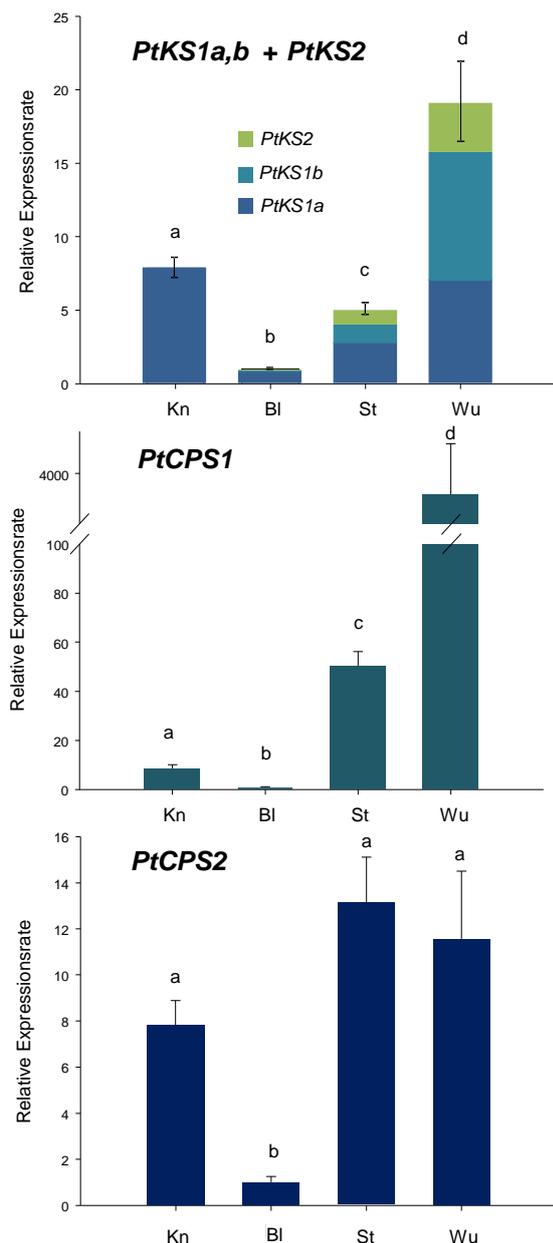


Abb. 3.6: Relative Expressionsraten von *PtCPS1*, *PtCPS2* und *PtKS1a,b* + *PtKS2*. Die organspezifische Expression der CPS- und KS(L)- Gene wurde mittels qRT-PCR analysiert. Es wurden je 6 biologische Replikate von Knospen (Kn), Blättern (Bl), Stängel (St) und Wurzeln (Wu) analysiert, und Mittelwerte und Standardfehler dargestellt. Die Daten wurden log-transformiert und mittels des Programms SigmaPlot über eine ANOVA und einen anschließenden Holm-Sidak Test auf Signifikanz geprüft. Unterschiedliche Buchstaben zeigen $p < 0,05$. Als *housekeeping*-Gen wurde Ubiquitin verwendet. Aufgrund der hohen Sequenz-identität der KS(L)-Gene war es nicht möglich diese separat zu betrachten. Durch anschließendes Klonieren und Sequenzieren der amplifizierten Fragmente aus den Organen von drei biologischen Replikaten wurde das Verhältnis der Transkripte von *PtKS1a*, *PtKS1b* und *PtKS2* errechnet. Dieses Verhältnis wird durch die Säulenfärbung wiedergegeben (die genauen Werte sind der Tabelle 7.9 Im Anhang zu entnehmen).

Diterpensynthesen organspezifisch exprimiert wurden. In den Blättern war die Transkription generell am geringsten, weshalb die Ergebnisse dieser Transkriptionsanalyse als Basis für den Vergleich der anderen Organe dienen (Werte wurden gleich 1 gesetzt). Dagegen wurden in den Wurzeln für alle untersuchten Gene hohe Expressionsraten nachgewiesen (Abb. 3.6). *PtCPS1* zeigte dort die mit

Abstand höchste Transkriptakkumulation, die Konzentration war 3500mal höher als in den Blättern, 71mal höher als im Stängel und 105mal höher als in der Knospe. Auch Die KS(L)-Gene wurden in den Wurzeln insgesamt am stärksten exprimiert. Die gesamte Transkriptrate entsprach dem 20fachen der Blätter, dem 6fachen des Stängels und dem 2,5fachen der Knospen. Die Expression von *PtCPS2* in der Wurzel unterschied sich nicht signifikant von der im Stängel und der in der Knospe.

Interessanterweise zeigte eine Untersuchung des Transkriptverhältnisses der KS(L)-Gene *PtKS1a*, *PtKS1b* und *PtKS2*, dass organspezifisch große Unterschiede in den Expressionraten der einzelnen KS(L) vorhanden waren. So wurde in den Knospen ausschließlich *PtKS1a* transkribiert. Auch in den Blättern bestand das Transkript mit 85% zum größten Teil aus *PtKS1a*-mRNA. Im Gegensatz dazu machte in den Wurzeln die Transkriptmenge von *PtKS1b* mit 45% den größten Teil der exprimierten KS(L)-Gene aus. Auch die Expressionsrate von *PtKS2* war in der Wurzel im Vergleich zu den anderen Organen am höchsten.

3.5 DITERPENE IN GEWEBEN VON *P. TRICHOCARPA*

Um Aufschluss über das Vorkommen der Enzymprodukte von *PtKS1a* und *PtKS1b* in der Pflanze zu erlangen, sollten Diterpene aus Knospe, Stängel, Wurzel und Blättern von *P. trichocarpa*-Stecklingen isoliert werden. Die Produkte von *PtKS1a* und *PtKS1b* wiesen hydrophobe Eigenschaften auf. Freies *ent*-Kaur-16-en und 16 α -Hydroxy-*ent*-Kauran sollten zudem volatil sein (Otsuka et al, 2004; Chen et al., 2011). Daher wurden zur Isolierung der Diterpene Hexanextraktionen von Organproben gewonnen. Die SPME-Methode (*solid phase microextraction*) wurde zusätzlich zur Isolierung von volatilen Stoffen angewandt.

Es konnten allerdings in keiner der Proben Diterpene identifiziert werden. In den Hexanextrakten waren vor allem längerkettige Fettsäuren zu finden. Durch die SPME-Methode liesen sich viele Mono- und Sesquiterpene detektieren, sowie weitere Substanzen anderer Naturstoffklassen. Beispielsweise wurden phenolische Verbindungen wie verschiedene Salicylsäurederivate oder Aldehyde wie *trans*-2-Hexenal oder Nonanal, wie in Yang et al. (2013) beschrieben, nachgewiesen. Die qualitative und quantitative Auswertung der Extraktionen ist dem Anhang zu entnehmen (Tab. 7.1-8).

4 DISKUSSION

4.1 *POTRI.008G082400* UND *POTRI.008G082700* SIND DURCH GENDUPLIKATION ENTSTANDENE GENE FÜR MONOFUNKTIONALE *ENT*-KAURENSYNTHASEN UND KAURENSYNTHASE-ÄHNLICHE PROTEINE

Das Genom von *Populus trichocarpa* besitzt fünf putative Diterpensynthasegene (Irmisch et al., eingereicht bei BMC Plant Biology). In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass *Potri.004G037900* für eine Geranylinalool-Synthase und *Potri.002G05210* für die *ent*-Copalylpyrophosphatsynthase (*ent*-CPS) PtCPS1 codiert. Bei *Potri.005G210300* handelt es sich um eine inaktive Synthase (PtCPS2) mit hoher Ähnlichkeit zu PtCPS1 (Irmisch et al., eingereicht bei BMC Plant Biology, persönliche Mitteilung Sandra Irmisch). Über die beiden Gene *Potri.008G082400* und *Potri.008G082700* war zu Beginn der vorliegenden Arbeit noch nichts bekannt.

Eine phylogenetische Analyse zeigte, dass *Potri.008G082400* und *Potri.008G082700* der Terpensynthaseunterfamilie TPS-*e* zuzuordnen sind (Abbildung 3.1). Diese Gruppe umfasst *ent*-Kaurensynthasen (KS) und Kaurensynthase-ähnliche Diterpensynthasen (KSL) der Klasse I aus Angiospermen und Gymnospermen (Bohlmann et al., 1998). Zur genaueren Vorhersage der Aktivität der codierten Enzyme erfolgte ein Alignment der isolierten Sequenzen. Dieses zeigte, dass alle für Klasse I charakteristischen Motive (DDXXD, NDXXS/GXXXE; Zhou et al., 2012) in den abgeleiteten Aminosäuresequenzen vorhanden waren, während die für Klasse II essentiellen Motive (EDXXD, DXDD; Cao et al., 2010) fehlten (Abb. 3.2). Aus dieser funktionellen Genanalyse ließ sich schließen, dass die Gene *Potri.008G082400* und *Potri.008G082700* für putative monofunktionale KS(L) codieren.

Chromosom 8

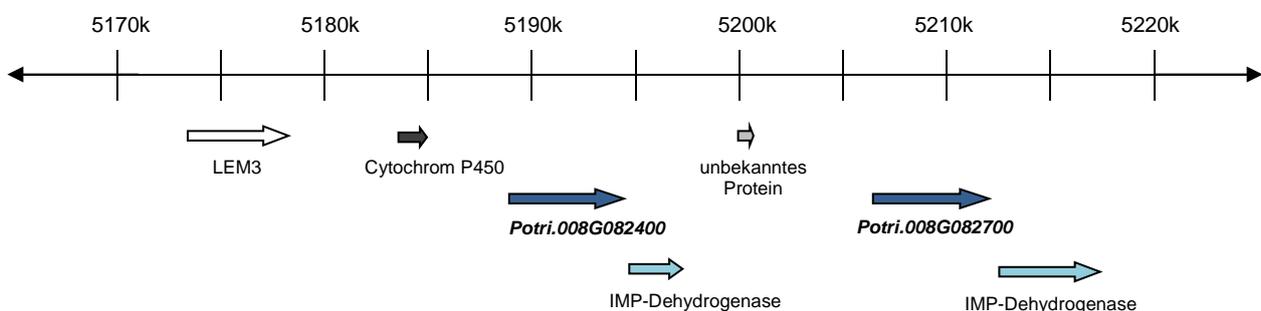


Abb. 4.1: Die KS(L)- Gene auf Chromosomen 8. Der Ausschnitt des Chromosoms 8 von *Populus trichocarpa* zeigt die putativen KS(L)-Gene *Potri.008G082400* und *Potri.008G082700* und die Gene bzw. Genfragmente in Nachbarschaft zu diesen. Die Pfeile stellen die Gene in ihrer ungefähren Länge und Leserichtung dar. Die Genloci und -größen sind der Datenbank Phytozome.org entnommen. k: Kilobasenpaare.

Interessanterweise sind *Potri.008G082400* und *Potri.008G082700* beide auf Chromosom 8 lokalisiert, genauer gesagt befinden sich die Gene in einem Cluster von zwei unmittelbar aufeinanderfolgenden Gensegmenten (Abb. 4.1). Auf beide Gene folgt jeweils ein Gen für eine Inosin-5'-Monophosphat-Dehydrogenase. Zwischen den zwei putativen KS(L)-Genen bzw. zwischen den Inosin-5'-Monophosphat-Dehydrogenasegenen des Clusters besteht eine hohe Sequenzähnlichkeit. Daher ist anzunehmen, dass die KS(L)-Gene durch Genduplikation entstanden sind. In der Literatur (Aubourg et al., 2002) werden sich wiederholende Chromosomenabschnitte, bestehend aus zwei oder mehr Genen, als *tandem repeats* bezeichnet. Es handelt sich um Genduplikationen als Ergebnis eines ungleichen *Crossing-over*. In *P. trichocarpa* sind nachweislich 59% aller Terpensynthasegene in auf diese Weise entstandenen Clustern im Genom angeordnet (Chen et al., 2011).

4.2 ES IST UNKLAR, OB ES SICH BEI *PTKS1A* UND *PTKS1B* UM ALLELE ODER GENE HANDELT

Die Analyse des Genoms von *P. trichocarpa* zeigte die Existenz von zwei Genen, welche für putative KS(L) codieren. Interessanterweise konnten drei unterschiedliche Gensequenzen für putative KS(L) aus der cDNA von *P. trichocarpa* isoliert werden. Die Sequenzen von *PtKS1a* und *PtKS1b* weisen hierbei die größte Ähnlichkeit zueinander auf.

P. trichocarpa ist eine diözische Pflanze, das heißt, es ist keine Selbstbefruchtung möglich (Tuskan et al., 2006). Daher sind sehr viele Gene von *P. trichocarpa* heterozygot, und jeder Genotyp enthält eine Vielzahl an *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) (Tuskan et al., 2006). Die wenigen Unterschiede zwischen *PtKS1a* und *PtKS1b* könnten auf die beschriebenen Polymorphismen und die Heterozygotie des Genoms zurückzuführen sein. Demnach würde es sich bei den beiden Sequenzen um allelische Varianten des Datenbankgens *Potri.008G082400* handeln.

Interessanterweise zeigte die heterologe Expression der Gene, dass die abgeleiteten Enzyme eine unterschiedliche Produktspezifität aufweisen. Eine veränderte Aktivität der auf einem Genlocus codierten Enzyme (Allele) ist bereits für viele Organismen nachgewiesen. Sogenannte Allozyme sind auf allelische Varianten eines Gens zurückzuführen und zeigen Unterschiede in Substrataffinität und Aktivität. Ein Beispiel hierfür sind Alkoholdehydrogenasen aus *Drosophila melanogaster* (Eisses et al., 1985). Eine veränderte Produktspezifität, wie im Fall von *PtKS1a* und *PtKS1b*, wurde allerdings noch nicht beschrieben. Ein zweiter interessanter Aspekt ist die unterschiedliche organspezifische Expression von *PtKS1a* und *PtKS1b* welche vermuten lässt, dass beide Sequenzen unterschiedliche Promotorregionen aufweisen.

Zusammengenommen deuten die beschriebenen Differenzen der Produktspektren und der organspezifischen Expressionsraten darauf hin, dass es sich bei *PtKS1a* und *PtKS1b* trotz der hohen Sequenzidentität eher um zwei verschiedene Gene handelt. Damit würde *P. trichocarpa* drei KS(L)-Gene besitzen. Die Diskrepanz zum bereits veröffentlichten Pappelgenom kann mit der relativ schlechten Qualität desselben erklärt werden. So wird in der Originalveröffentlichung (Tuskan et al., 2006) darauf hingewiesen, dass es gerade bei sehr ähnlichen Genomabschnitten zu Fehlassemblierungen gekommen sein könnte. In zukünftigen Experimenten könnte mittels Southern Blot herausgefunden werden, wie viele KS(L)-Gene *P. trichocarpa* des Genotyps 625 besitzt. Weiterhin ist es möglich durch *genome walking* die genomische Sequenz dieses Genotyps zu analysieren. Auf jeden Fall muss überprüft werden, ob die Bildung des Produktes 16 α -Hydroxy-*ent*-Kauran charakteristisch für *P. trichocarpa* ist, oder ob die in dieser Arbeit identifizierte Synthase *PtKS1b* für den untersuchten Genotyp spezifisch ist. Dafür sollten entsprechende Klonierungsexperimente mit einem anderen Genotyp oder einer anderen *Populus sp.* durchgeführt werden.

4.3 PTKS1A UND PTKS1B WEISEN UNTERSCHIEDLICHE PRODUKTSPEZIFITÄT AUF UND DIE CODIERENDEN GENE WERDEN ORGANSPEZIFISCH EXPRIMIERT

Die zwei aus *P. trichocarpa* klonierten Gensequenzen *PtKS1a* und *PtKS1b* codieren für aktive Diterpensynthasen. *PtKS1a* und *PtKS1b* wiesen untereinander nur wenige Aminosäuresequenzunterschiede auf. Die Untersuchung der Enzymaktivität in einem Bioassay zeigte jedoch signifikante Unterschiede in der Produktspezifität der Enzyme. *PtKS1a* setzte das Substrat *ent*-Copalylpyrophosphat (*ent*-CPP) zu *ent*-Kaur-16-en um (Abb. 3.3), und ist folglich eine KS. KS wurden bereits aus vielen Pflanzen isoliert, wie beispielsweise aus Reis (*Oryza sativa*) (Xu et al., 2007a), Fichte (*Picea glauca*) (Keeling et al., 2010) und Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*) (Chen et al., 2011). Generell sind sie in allen höheren Pflanzen zu finden, da sie essentiell für die Bildung von Gibberellinen (GAs) sind (Bohlmann et al., 1998). *PtKS1b* katalysierte dagegen die Synthese von 16 α -Hydroxy-*ent*-Kauran aus *ent*-CPP (Abb. 3.3). Das Enzym zählt daher zu der Gruppe der KSL. In der Literatur wurden viele weitere Enzyme dieser Gruppe beschrieben, wie etwa zwei *ent*-iso-Kaurensynthasen und eine *ent*-Cassadiensynthase aus Reis (Xu et al., 2007a). Eine weitere KSL, welche auch 16 α -Hydroxy-*ent*-Kauran bildet, ist jedoch nur aus dem Kleinen Blasenmützenmoos (*Physcomitrella patens*) bekannt.

Zur weiteren Charakterisierung der beiden Enzyme wurden die gewebsspezifischen Transkriptionsraten von *PtKS1a* und *PtKS1b*, sowie die Expressionsrate von *PtCPS1*, welche das

Substrat für PtKS1a und PtKS1b bildet, untersucht. Für eine *ent*-CPS aus Arabidopsis und eine KS aus dem Kürbis (*Cucurbita maxima*), welche an der Synthese von GAs beteiligt sind, wurden bereits organspezifische Expressionsraten gezeigt (Sun und Kamiya, 1997). Auch die hier untersuchten Sequenzen für *ent*-CPS und KS(L) zeigten organspezifische Expressionsraten (Abb. 3.6).

Die höchste Transkriptakkumulation war für alle drei Gene in den Wurzeln nachweisbar (Abb. 3.6). Ähnliche Ergebnisse wurden auch für andere Diterpensynthesen des Sekundärmetabolismus beschrieben. So wurde beispielsweise in *A. thaliana* das Gen *tps08* für eine Rhizathalen bildende Diterpensynthase ausschließlich in den Wurzeln exprimiert (Vaughan et al., 2013). Da PtCPS1 das Substrat für die KS bildet, war zu erwarten, dass die Transkriptmuster der Gene übereinstimmen. Dies bestätigte sich allerdings nicht, was auf einen Transport des *ent*-CPP von der Wurzel in die anderen Organe hindeuten könnte.

4.3.1 DAS PRODUKT VON PTKS1A ENT-KAUR-16-EN IST VERMUTLICH IN DIE GIBBERELLINBIOSYNTHESE INVOLVIERT

Ent-Kaur-16-en ist die obligatorische Vorstufe aller Gibberelline (GAs) (vgl. 1.2.3). Nach Smith et al. (1998) führt die erhöhte Bildung von *ent*-Kaur-16-en auch zu einer gesteigerten Synthese von GAs in den entsprechenden Organen. Dabei soll die *ent*-Kaur-16-en-Bildung vor allem über die Expression der *ent*-CPS reguliert sein. Diese Hypothese wurde allerdings unter der Annahme aufgestellt, dass KS nicht organspezifisch exprimiert werden (Smith et al., 1998). Die in dieser Arbeit beobachteten organspezifischen Transkriptraten von *PtKS1a* in *P. trichocarpa* widerlegen jedoch diese Annahme und es kann vermuten werden, dass die *ent*-Kaur-16-en-Synthese zumindest teilweise auch auf die Regulierung der *PtKS1a*-Transkription in der Pappel zurückzuführen ist.

Nach Schopfer und Brennicke (2006) korreliert die Konzentration an GAs mit aktiven Wachstums- und Differenzierungsphasen der Organe. Von der Annahme ausgehend, dass die Expressionsraten von *PtKS1a* mit einer entsprechenden Bildung von GAs in der Pappel einhergehen, konnte dies auch in diese Arbeit gezeigt werden. So scheinen Knospen, aus welchen die Blätter der Stecklinge gebildet werden, sowie Wurzeln und Stängel im Gegensatz zu nahezu ausgewachsenen Blättern vermehrt GAs zu synthetisieren. Die Akkumulation von GAs in Blattknospen bzw. jungen Blättern wurde bereits mehrfach beschrieben, ebenso die Bedeutung von GAs für das Stängelwachstum, unter anderem in Hinblick auf sekundäres Dickenwachstum (Kozłowski und Pallardy, 1997; Schopfer und Brennicke, 2006; Dayan et al., 2012).

Interessant ist dagegen die hohe *PtKS1a*-Expression und die damit vermutete hohe GA-Konzentration in den Wurzeln der Pflanze. Die Rolle der GAs in der Regulation des Wurzelwachstums ist weitgehend unerforscht. Dass GAs das Wurzelwachstum steuern, wurde aber bereits durch eine *A. thaliana*-Mutante gezeigt, welche keine *ent*-CPS bildete und somit auch kein *ent*-CPP bzw. *ent*-Kaur-16-en, die

Vorstufe aller GAs. Die Mutante wies deutlich verkürzte Wurzeln auf, was durch die Zugabe von exogenen GAs aufgehoben werden konnte (Fu und Harberd, 2003). Für *O. sativa* wurde außerdem nachgewiesen, dass GAs zusammen mit Ethylen verantwortlich für die Entstehung und das Wachstum von Adventivwurzeln sind (Steffens et al., 2006). Für *P. trichocarpa* ist die Ausbildung von Wurzeln für die Wasser- und Nährstoffaufnahme, aber auch für eine langfristige feste Verankerung im Boden von großer Bedeutung. Die Pflanzen bilden daher neben einer Hauptwurzel viele plagiotrope Seitenwurzeln (Roloff et al., 1994) und Adventivwurzeln (Schier und Campbell, 1976) aus. Das Wachstum in den einzelnen Wurzeln begrenzt sich zwar auf eine kleine Zone hinter der Wurzelspitze (Schopfer und Brennicke, 2006), insgesamt existiert aber eine große Menge an wachstumsaktiven Wurzeln. In *A. thaliana* dagegen spielt die Ausbildung von Adventivwurzeln eine untergeordnete Rolle in der Entwicklung (Osmont et al., 2007). Dies könnte eine Erklärung sein, warum für diesen Modellorganismus nichts über eine starke Akkumulation von GAs in den Wurzeln bekannt ist.

Zusätzlich muss bedacht werden, dass der Ort der GA-Synthese nicht unbedingt dem Verwendungsort entsprechen muss. Nach Schopfer und Brennicke (2006) sind GAs leicht transportierbar und sowohl im Xylem als auch im Phloem nachweisbar. Möglicherweise werden die in den Wurzeln gebildeten GAs zum Teil über das Xylem acropetal in die Stängel der Pflanze transportiert. Dies würde mit Berichten über erhöhte GAs-Konzentrationen in der Wurzel nach Entfernung des Epikotyls in der Erbse (*Pisum sativum*) (Sebanek, 1966) übereinstimmen. Über den Transport von GAs innerhalb der Pflanze ist jedoch wenig bekannt. Möglicherweise sind diese Ergebnisse ein erster Schritt zum Verständnis der Regulation der organspezifischen Wachstumsprozesse über die GA-Synthese in *P. trichocarpa*. Um die hier aufgestellten Hypothesen weiter zu verfolgen, muss in zukünftigen Experimenten die Akkumulation der GAs in verschiedenen Organen untersucht werden.

4.3.2 16 α -HYDROXY-*ENT*-KAURAN IST VERMUTLICH AUF NOCH UNBEKANNTE WEISE IN DER RHIZOSPHERE AKTIV

Die spezifische Akkumulation des *PtKS1b*-Transkriptes in den Wurzeln weist darauf hin, dass dort auch 16 α -Hydroxy-*ent*-Kauran gebildet wird, wenngleich dieses in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden konnte. Die Identifizierung von 16 α -Hydroxy-*ent*-Kauran in Wurzelproben anderer Pflanzen wie *Isoetes macrospora* und *Xylocopa langsdorffiana* (Hernandez et al., 2012; dos Santos et al., 2013) scheinen diese Vermutung zu unterstützen. Bisher wurde die Funktion von 16 α -Hydroxy-*ent*-Kauran in der Pflanze jedoch noch nicht beschrieben. Unter der Annahme, dass 16 α -Hydroxy-*ent*-Kauran spezifisch in Wurzeln gebildet wird, können allerdings Vermutungen über dessen Funktion in der Pflanze angestellt werden.

Da es sich bei dem von *PtKS1b* gebildeten Produkt um ein flüchtiges Diterpen handelt (vgl. Kawaide et al., 2011), kann vermutet werden, dass dieses in die Rhizosphäre abgegeben wird. Dort könnte es beispielsweise antimikrobiell oder antifungal als Phytoalexin wirken. Dass Diterpene als Phytoalexine wirken können, wurde z.B. für *ent*-Sandaracopimaradien gezeigt (Xu et al., 2007a). In bisherigen Studien konnte allerdings keine solche Aktivität für 16α -Hydroxy-*ent*-Kauran nachgewiesen werden (Hernandez et al., 2012). Nach Sun und Tang (2013) werden auch bei symbiotischen Beziehungen zur Kommunikation volatile Stoffe durch Wurzeln emittiert. Das heißt, es wäre ebenso denkbar, dass 16α -Hydroxy-*ent*-Kauran ein Signalstoff für die Ausbildung von Mykorrhiza ist. Auch allelopathische Substanzen, welche das Auskeimen und Wachstum benachbarter Pflanzen inhibieren, können von Pflanzenwurzeln emittiert werden (Dudareva et al., 2006). So werden in Reiswurzeln konstitutiv Diterpensynthesen, welche für die Bildung von allelopathisch wirkenden Momilactonen verantwortlich sind, exprimiert (Xu et al., 2004). Da *PtKS1b* in den Wurzeln konstitutiv exprimiert wird, wäre eine solche Wirkung für das Diterpen 16α -Hydroxy-*ent*-Kauran ebenso denkbar. Weiterhin ist eine Funktion als Abwehrstoff gegen Herbivoren in Betracht zu ziehen, da aus *Oyedaea verbesinoides* isoliertes 16α -Hydroxy-*ent*-Kauran eine inhibitorische Wirkung auf die Kontraktion glatter Gefäßmuskulzellen von Ratten zeigte (Müller et al., 2003). Das Diterpen könnte in ähnlicher Weise auch auf die Muskelkontraktion von Herbivoren wirken. Dass Terpene in die Abwehr gegen Herbivoren involviert sein können, wurde bereits für das Sesquiterpen (*E*)- β -Caryophyllen, welches von Maiswurzeln emittiert wird, gezeigt (Rasmann et al., 2005). Desweiteren könnte es sich bei 16α -Hydroxy-*ent*-Kauran aber auch nur um ein Zwischenprodukt handeln, welches weiter verstoffwechselt wird. Oxidationen und andere *downstream*-Prozessierungen sollten in Betracht gezogen werden. In den Wurzeln von *Acanthopanax koreanum* (Cai et al., 2003) wurde beispielsweise 16α -Hydroxy-*ent*-Kauran-19-säure identifiziert. Hierbei könnte es sich um ein von 16α -Hydroxy-*ent*-Kauran abgeleitetes Diterpenoid handeln, welches durch Oxidation des Diterpens entsteht.

Bevor eine konkrete Aussage über die Funktion von 16α -Hydroxy-*ent*-Kauran gemacht werden kann, muss zunächst dieses, oder ein abgeleitetes Diterpenoid, in der Wurzel nachgewiesen werden. In zukünftigen Experimenten müssen hierzu Methoden entwickelt werden. Weiterhin sollte im Hinblick auf eine mögliche Wirkung gegen Fraßfeinde die Herbivorie-Induzierbarkeit der Gene getestet werden.

4.4 DIE PRODUKTSPEZIFITÄT VON PTKS1A UND PTKS1B WIRD VON EINER EINZELNEN AMINOSÄURE BESTIMMT

P. trichocarpa besitzt sowohl eine KS für die GA-Bildung als auch eine organspezifisch exprimierte KSL. Diese KSL katalysiert die Bildung von 16 α -Hydroxy-*ent*-Kauran als einziges Produkt und hat sich vermutlich durch Genduplikation und Neofunktionalisierung aus der KS entwickelt. Die KS PtkS1a und die KSL PtkS1b der Pappel unterscheiden sich im aktiven Zentrum durch eine Aminosäure an der Position 607 (Abb. 3.4). Ein Austausch des Threonins der KSL gegen Methionin, die Aminosäure, welche die KS an dieser Stelle besitzt, ändert die Produktspezifität und PtkS1b bildet *ent*-Kaur-16-en anstelle von 16 α -Hydroxy-*ent*-Kauran (Abb. 3.5). In der Literatur ist bereits beschrieben, dass die Mutation einer einzelnen Aminosäure ausreicht, um einen Wechsel in der Produktspezifität einer KSL hervorzurufen (Xu et al., 2007b). Zusätzlich kann hierdurch aber auch theoretisch eine KS des Primärmetabolismus zu einer KSL des Sekundärmetabolismus werden (Xu et al., 2007b; Zerbe et al., 2012).

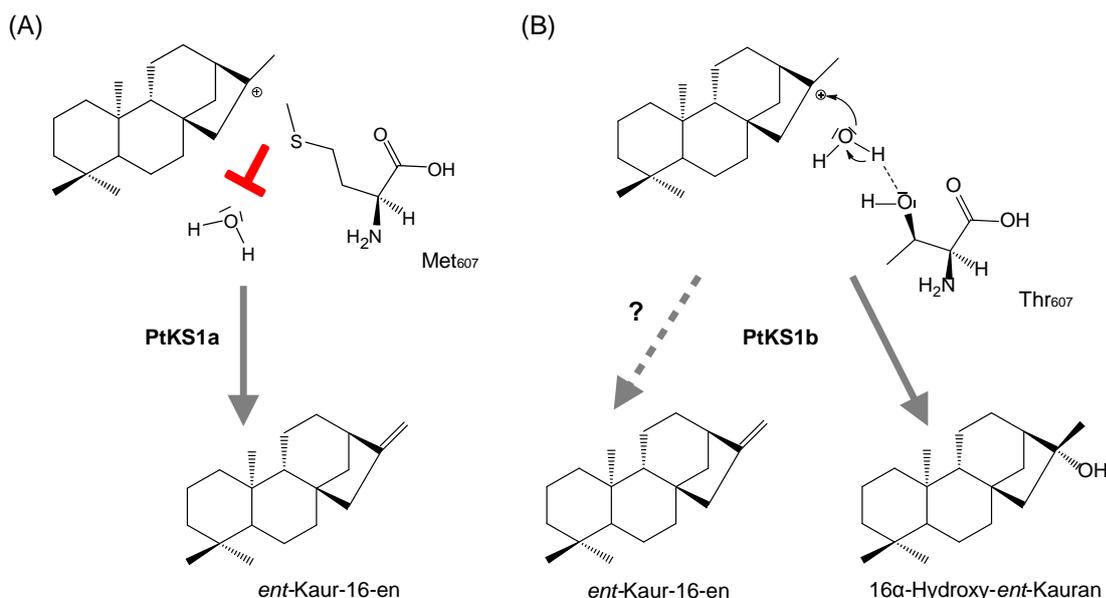


Abb. 4.2: Modell zur Bildung von *ent*-Kaur-16-en und 16 α -Hydroxy-*ent*-Kauran aus dem *ent*-Kauranyl kation (modifiziert nach Kawaide et al., 2011). Die Produktbildung aus dem *ent*-Kauranyl kation verläuft bei PtKS1a über eine Deprotonierung (A), während ein Wassermolekül zur Termination der Reaktion in PtKS1b führt (B). Im aktiven Zentrum der PtKS1b ermöglicht ein Threonin an Position 607 (Thr₆₀₇) den nukleophilen Angriff eines Wassermoleküls, welcher vermutlich zusätzlich durch die Ausbildung von Wasserstoffbrücken begünstigt wird (B). Dagegen verhindert die lange Aminosäureseitenkette des Methionins an Position 607 (Met₆₀₇) von PtKS1a eine räumliche Nähe des Wassermoleküls zum Kation, weshalb ausschließlich *ent*-Kaur-16-en gebildet wird (A).

Zur Aufklärung der Reaktionsmechanismen von KS und 16 α -Hydroxy-*ent*-Kauransynthesen wurden bereits ähnliche Mutationsexperimente wie in dieser Arbeit an der zur Position 607 korrespondierenden Aminosäureposition der bifunktionalen Diterpensynthase PpCPS/KS aus *P.*

patens durchgeführt (Kawaide, H. et al., 2011). Das Enzym bildet normalerweise *ent*-Kaur-16-en und 16 α -Hydroxy-*ent*-Kauran im Verhältnis 1:3 und hat an der, für die Produktbildung entscheidenden Position ein Alanin. Nach den Ergebnissen dieser Studie ist 16 α -Hydroxy-*ent*-Kauran das Produkt des nukleophilen Angriffs eines Wassermoleküls an das *ent*-Kauranylkatation (Abb. 4.2). Die aufgestellte Hypothese besagt, dass große, hydrophobe Seitenketten an Position 607, wie etwa die von Methionin, Wassermoleküle von dem katalytischen Zentrum ausschließen und so die Bildung von 16 α -Hydroxy-*ent*-Kauran inhibieren. Stattdessen kommt es zur Bildung von *ent*-Kaur-16-en. Kleine, polare Seitenketten lassen Raum für ein Wassermolekül im aktiven Zentrum, was die Bildung beider Produkte ermöglicht (Kawaide et al., 2011).

Die in dieser Arbeit durchgeführten Mutationsexperimente scheinen das vorgeschlagene Modell der inhibitorischen Wirkung des Methionins zu bestätigen. PtKS1a und mutPtKS1b_(T→M) mit einem M₆₀₇ im aktiven Zentrum bildeten ausschließlich *ent*-Kaur-16-en (Abb. 3.3, Abb. 3.5). Interessanterweise bildete PtKS1b in seiner Wildtypform ausschließlich 16 α -Hydroxy-*ent*-Kauran und es war kein *ent*-Kaur-16-en nachweisbar, während bei Kawaide und Mitarbeitern (2011) stets beide Produkte in verschiedenen Verhältnissen gebildet wurden. Möglicherweise bewirkt die Aminosäure Threonin im aktiven Zentrum von PtKS1b eine Erhöhung der Wahrscheinlichkeit der durch Wassermoleküle bedingten Termination durch die Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung (Abb. 4.2).

Der Austausch des Methionins gegen ein Threonin im aktiven Zentrum der KS PtKS1a erzeugte ein vermutlich inaktives Protein. Für die Inaktivität gibt es mehrere Erklärungsansätze. Da sich PtKS1a und PtKS1b auch an anderen Positionen in der Aminosäuresequenz unterscheiden, könnte das Threonin einen negativen Effekt auf die Proteinstruktur ausüben und zu einer Inaktivierung des Enzyms führen. Geht man davon aus, dass *PtKS1b* durch Genduplikation und anschließende Neofunktionalisierung aus *PtKS1a* entstanden ist, führte dies höchstwahrscheinlich zuerst zu einer Verminderung der Aktivität (Xu et al., 2007b). Diese konnte dann durch das Einbringen zusätzlicher Mutationen zurückgewonnen werden. Hat nun das Einbringen des Threonins in die ursprüngliche KS-Sequenz auch einen Aktivitätsverlust zur Folge, könnte es durchaus sein, dass aufgrund der geringen Aktivität kein Produkt detektiert werden konnte. Zusätzlich sollte auch die Möglichkeit bedacht werden, dass die Codonänderung Probleme bei der Expression in *E. coli* verursacht haben könnte und kein Protein synthetisiert wurde. In zukünftigen Experimenten sollte mutPtKS1a_(M→T) nochmals auf Aktivität getestet werden und mittels eines Western Blots die Proteinsynthese überprüft werden.

Eine Mutagenese der Aminosäuresequenz von PtKS1a und PtKS1b zu Alanin im aktiven Zentrum könnte ebenfalls der Aufklärung des evolutiven Hintergrunds der Synthasen dienen. Außerdem könnte dadurch die Bedeutung von Threonin an Position 607 für die katalytische Aktivität von PtKS1b weiter charakterisiert werden. Entsprechende Experimente werden im Moment bereits durchgeführt (persönliche Mitteilung Sandra Irmisch).

5 ZUSAMMENFASSUNG

Im Genom von *P. trichocarpa* sind zwei Gene, welche für putative KS(L) codieren, zu finden. Im Rahmen dieser Arbeit gelang es, drei KS(L)-Gensequenzen aus der cDNA von *P. trichocarpa* zu isolieren. Diese wiesen auf Aminosäureebene alle charakteristischen Motive für monofunktionale KS(L)-Diterpensynthesen auf. Die drei *KS(L)* wurden heterolog in *E. coli* exprimiert, die Enzyme partiell aufgereinigt und auf ihre Aktivität getestet. Zur Analyse der Enzymprodukte wurde die GC-MS genutzt.

Es zeigte sich, dass die Enzyme PtKS1a und PtKS1b spezifisch das Substrat *ent*-CPP umsetzten. Der Nachweis des Produktes *ent*-Kaur-16-en ermöglichte die Klassifizierung von PtKS1a als eine *ent*-Kaur-16-ensynthase. Dagegen stellte sich PtKS1b als eine KSL heraus, welche 16 α -Hydroxy-*ent*-Kauran bildete. PtKS2 wurde auf Basis dieser Experimente als inaktiv eingestuft. Aufgrund der geringen Sequenzunterschiede von PtKS1a und PtKS1b gelang es, durch Mutagenese die für die Produktspezifität der Diterpensynthesen verantwortliche Aminosäure zu identifizieren und einen möglichen Katalysemechanismus aufzustellen. Demnach inhibiert M₆₀₇ im aktiven Zentrum von PtKSa den nukleophilen Angriff eines Wassermoleküls an das *ent*-Kauranyl-Kation, und unterbindet damit die Bildung von 16 α -Hydroxy-*ent*-Kauran.

Weiterhin wurde mittels qRT-PCR die organspezifische Expression von *PtKS1a*, *PtKS1b* und *PtKS2* sowie der beiden Copalylpyrophosphatsynthasen der Pappel nachgewiesen. Interessanter Weise war die Expression von PtKS1b und PtCPS1 besonders stark in den Wurzeln. Die mit Abstand niedrigsten Transkriptionsraten aller Gene waren dagegen in den Blättern zu finden.

Da die Produkte der KS PtKS1a und der KSL PtKS1b in der Pappel in dieser Arbeit nicht detektiert werden konnten, können nur Hypothesen über die Funktion der Enzyme und die Bedeutung der nachgewiesenen organspezifischen Transkriptakkumulation der Diterpensynthasegene aufgestellt werden. *Ent*-Kaur-16-en ist der obligatorische Vorläufer aller Gibberelline und damit essentiell für die Pflanze. Von 16 α -Hydroxy-*ent*-Kauran wird vermutet, dass es in die Rhizosphäre abgegeben wird und dort als allelopathische Substanz, Phytoalexin oder Abwehrstoff gegen Herbivoren wirkt.

Die Untersuchung des Wirkspektrums von 16 α -Hydroxy-*ent*-Kauran und die Überprüfung der vermuteten organspezifischen Akkumulation von GAs in *P. trichocarpa* sollten zukünftiger Forschungsgegenstand sein.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Aubourg, S., Lecharny, A. and Bohlmann, J.** (2002) Genomic analysis of the terpenoid synthase (AtTPS) gene family of *Arabidopsis thaliana*. *Molecular genetics and genomics: MGG*, **267**, 730-745.
- Bartwal, A., Mall, R., Lohani, P., Guru, S.K. and Arora, S.** (2013) Role of Secondary Metabolites and Brassinosteroids in Plant Defense Against Environmental Stresses. *Journal of Plant Growth Regulation*, **32**, 216-232.
- 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**, 4126-4133.
- Buchanan, B.B., Gruissem, W. and Jones, R.L.** (2000) *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. Rockville, Maryland, USA: American Society of Plant Physiologists.
- Cai, X., Shen, G. and Dat, N.e.a.** (2003) Inhibitory Effect of Kaurane Type Diterpenoids from *Acanthopanax koreanum* on TNF- α Secretion from Trypsin-Stimulated HMC-1 Cells. *Archives of Pharmacal Research*, **26**, 731-734.
- Cao, R., Zhang, Y., Mann, F.M., Huang, C., Mukkamala, D., Hudock, M.P., Mead, M.E., Prisic, S., Wang, K., Lin, F.Y., Chang, T.K., Peters, R.J. and Oldfield, E.** (2010) Diterpene cyclases and the nature of the isoprene fold. *Proteins*, **78**, 2417-2432.
- Chen, F., Tholl, D., Bohlmann, J. and Pichersky, E.** (2011) The family of terpene synthases in plants: a mid-size family of genes for specialized metabolism that is highly diversified throughout the kingdom. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, **66**, 212-229.
- Conolly, J.D. and Hill, H.A.** (1991) *Dictionary of terpenoids*. London: Chapman & Hall.
- Danner, H., Boeckler, G.A., Irmisch, S., Yuan, J.S., Chen, F., Gershenzon, J., Unsicker, S.B. and Kollner, T.G.** (2011) Four terpene synthases produce major compounds of the gypsy moth feeding-induced volatile blend of *Populus trichocarpa*. *Phytochemistry*, **72**, 897-908.
- Dayan, J., Voronin, N., Gong, F., Sun, T.P., Hedden, P., Fromm, H. and Aloni, R.** (2012) Leaf-induced gibberellin signaling is essential for internode elongation, cambial activity, and fiber differentiation in tobacco stems. *The Plant cell*, **24**, 66-79.
- Degenhardt, J., Köllner, T.G. and Gershenzon, J.** (2009) Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. *Phytochemistry*, **70**, 1621-1637.
- Dev, S.** (1989) Isoprenoids. In *Natural Products in Woody Plants Chemical Extraneous to the Lignocellulosic Cell Wall* (Rowe, J.W. ed.). Berlin, Germany: Springer Verlag, pp. 746-766.
- Dillard, C. and German, J.** (2000) Phytochemicals: nutraceuticals and human health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **80**, 1744-1756.
- dos Santos, P.F., Duarte, M.C., Bezerra, D.A.C., Agra, M.d.F., Barbosa Filho, J.M., da Silva, M.S. and Tavares, J.F.** (2013) Diterpenes from *Xylopija langsdorffiana*. *Helvetica Chimica Acta*, **96**, 1085-1092.

- Dudareva, N., Negre, F., Nagegowda, D.A. and Orlova, I.** (2006) Plant Volatiles: Recent Advances and Future Perspectives. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **25**, 417-440.
- Eisses, K., Schoonen, W., Scharloo, W. and Thörig, G.E.W.** (1985) Evidence for a multiple function of the alcohol-dehydrogenase allozyme-ADH71K of *Drosophila-melanogaster*. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology*, **82**, 863-868.
- Frost, C.J., Appel, H.M., Carlson, J.E., De Moraes, C.M., Mescher, M.C. and Schultz, J.C.** (2007) Within-plant signalling via volatiles overcomes vascular constraints on systemic signalling and primes responses against herbivores. *Ecology letters*, **10**, 490-498.
- Fu, X. and Harberd, N.** (2003) Auxin promotes Arabidopsis root growth by modulating gibberellin response. *Nature*, **421**, 740-743.
- Gershenzon, J. and Croteau, R.B.** (1993) *Terpenoid biosynthesis: The basic pathway and formation of monoterpenes, sesquiterpenes, and diterpenes*. Boca Raton, Florida, USA: CRC Press, Inc.,.
- Gusevskaya, E.V.** (2014) Reactions of Terpenes Catalyzed by Heteropoly Compounds: Valorization of Biorenewables. *ChemCatChem*, **6**, 1506-1515.
- Hernandez, D.M., Diaz-Ruiz, G., Rivero-Cruz, B.E., Bye, R.A., Aguilar, M.I. and Rivero-Cruz, J.F.** (2012) Ent-trachyloban-19-oic acid isolated from *Iostephane heterophylla* as a promising antibacterial agent against *Streptococcus mutans* biofilms. *Fitoterapia*, **83**, 527-531.
- Hillwig, M.L., Xu, M., Toyomasu, T., Tiernan, M.S., Wei, G., Cui, G., Huang, L. and Peters, R.J.** (2011) Domain loss has independently occurred multiple times in plant terpene synthase evolution. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, **68**, 1051-1060.
- Irmisch, S., Jiang, Y., Chen, F., Gershenzon, J. and Köllner, T.** The terpene synthase gene family in poplar and its contribution to herbivore-induced volatile emission. *eingereicht bei BMC Plant Biology*.
- Kawaide, H., Hayashi, K., Kawanabe, R., Sakigi, Y., Matsuo, A., Natsume, M. and Nozaki, H.** (2011) Identification of the single amino acid involved in quenching the ent-kauranyl cation by a water molecule in ent-kaurene synthase of *Physcomitrella patens*. *Febs Journal*, **278**, 123-133.
- Keeling, C.I., Dullat, H.K., Yuen, M., Ralph, S.G., Jancsik, S. and Bohlmann, J.** (2010) Identification and functional characterization of monofunctional ent-copalyl diphosphate and ent-kaurene synthases in white spruce reveal different patterns for diterpene synthase evolution for primary and secondary metabolism in gymnosperms. *Plant physiology*, **152**, 1197-1208.
- Klayman, L.D.** (1985) Qinghaosu (Artemisinin): An Antimalarial Drug from China. *Science*, **228**, 1049-1055.
- Koksal, M., Hu, H., Coates, R.M., Peters, R.J. and Christianson, D.W.** (2011) Structure and mechanism of the diterpene cyclase ent-copalyl diphosphate synthase. *Nature chemical biology*, **7**, 431-433.
- Koksal, M., Jin, Y., Coates, R.M., Croteau, R. and Christianson, D.W.** (2011) Taxadiene synthase structure and evolution of modular architecture in terpene biosynthesis. *Nature*, **469**, 116-120.

- Kozlowski, T.T. and Pallardy, S.G.** (1997) *Growth control in woody plants* San Diego, California, USA: Academic Press, Inc.,.
- Lichtenthaler, H.K.** (1999) The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **50**, 47-65.
- McGarvey, D.J. and Croteau, R.** (1995) Terpenoid Metabolism. *The Plant cell*, **7**, 1015-1026.
- Müller, S., Tirapelli, C.R., de Oliveira, A.M., Murillo, R., Castro, V. and Merfort, I.** (2003) Studies of ent-kaurane diterpenes from *Oyedaea verbessinoides* for their inhibitory activity on vascular smooth muscle contraction. *Phytochemistry*, **63**, 391-396.
- Osmont, K.S., Sibout, R. and Hardtke, C.S.** (2007) Hidden branches: developments in root system architecture. *Annual review of plant biology*, **58**, 93-113.
- Otsuka, M., Kenmoku, H., Ogawa, M., Okada, K., Mitsuhashi, W., Sassa, T., Kamiya, Y., Toyomasu, T. and Yamaguchi, S.** (2004) Emission of ent-Kaurene, a Diterpenoid Hydrocarbon Precursor for Gibberellins, into the Headspace from Plants. *Plant And Cell Physiology*, **45**, 1129–1138.
- Peters, R., Ravn, M. and Coates, R. and Croteau, R.B.** (2001) Bifunctional Abietadiene Synthase: Free Diffusive Transfer of the (+)-Copalyl Diphosphate Intermediate between Two Distinct Active Sites. *Journal of the American Chemical Society*, **123**, 8974-8978.
- Peters, R.J.** (2010) Two rings in them all: the labdane-related diterpenoids. *Natural product reports*, **27**, 1521-1530.
- Pichersky, E. and Gershenzon, J.** (2002) The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. *Current Opinion in Plant Biology*, **5**, 237-243.
- Ramirez-Carvajal, G.A., Morse, A.M. and Davis, J.M.** (2008) Transcript profiles of the cytokinin response regulator gene family in *Populus* imply diverse roles in plant development. *New Phytologist*, **177**, 77-89.
- Rasmann, S.K., TG; Degenhardt, J; Hiltbold, I., Toepfer, S., Kuhlmann, U., Gershenzon, J. and Turlings, T.C.J.** (2005) Recruitment of entomopathogenic nematodes by insect-damaged maize roots. *Nature*, **434**, 732-737.
- Roloff, A., Weisgerber, H., Lang, U.M. and Stimm, B.** (1994) *Enzyklopädie der Holzgewächse Handbuch und Atlas der Dendrologie*. Weinheim: Wiley-Vch.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R.** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **74**, 5463-5467.
- Schier, G.A. and Campbell, R.B.** (1976) Differences among *Populus* species in ability to form adventitious shoots and roots. *Canadian Journal of Forest Research*, **6**, 253-261.
- Schopfer, P. and Brennicke, A.** (2006) *Pflanzenphysiologie* 6 edn. München: Spektrum Akademischer Verlag.
- Sebanek, J.** (1966) The Effect of Amputation of the Epicotyl on the Level of Endogenous Gibberellins in the Roots of Pea Seedlings. *Biologia Plantarum*, **53**, 470-475.

- Sell, C.** (2006) Ingredients for the modern perfumery industry. In *Chemistry of Fragrances: From Perfumer to Consumer* (Sell, C. ed): Quest International, pp. 52-131.
- Smith, M., Yamaguchi, S., Ait-Ali, T. and Kamiya, Y.** (1998) The First Step of Gibberellin Biosynthesis in Pumpkin Is Catalyzed by at Least Two Copalyl Diphosphate Synthases Encoded by Differentially Regulated Genes. *Plant physiology*, **118**, 1411-1419.
- Steffens, B., Wang, J.X. and Sauter, M.** (2006) Interactions between ethylene, gibberellin and abscisic acid regulate emergence and growth rate of adventitious roots in deepwater rice. *Planta*, **223**, 604-612.
- Sun, T. and Kamiya, Y.** (1994) The Arabidopsis GAI Locus Encodes the Cyclase ent-Kaurene Synthetase A of Gibberellin Biosynthesis. *The Plant cell*, **6**, 1509-1518.
- Sun, T. and Kamiya, Y.** (1997) Regulation and cellular localization of ent-kaurene synthesis. *Physiologia Plantarum*, **101**, 701-708.
- Sun, X.-G. and Tang, M.** (2013) Effect of arbuscular mycorrhizal fungi inoculation on root traits and root volatile organic compound emissions of *Sorghum bicolor*. *South African Journal of Botany*, **88**, 373-379.
- Suzuki, S., Li, L., Sun, Y.H. and Chiang, V.L.** (2006) The cellulose synthase gene superfamily and biochemical functions of xylem-specific cellulose synthase-like genes in *Populus trichocarpa*. *Plant physiology*, **142**, 1233-1245.
- Takahashi, S., Kuzuyama, T. and Watanabe, H. and Seto, H.** (1998) A 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase catalyzing the formation of 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate in an alternative nonmevalonate pathway for terpenoid biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**, 9879-9884.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S.** (2011) MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, **28**, 2731-2739.
- Taylor, G.** (2002) *Populus*: Arabidopsis for forestry. Do we need a model tree? *Annals of Botany*, **90**, 681-689.
- Tholl, D.** (2006) Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism. *Curr Opin Plant Biol*, **9**, 297-304.
- Tholl, D., Sohrabi, R., Huh, J.H. and Lee, S.** (2011) The biochemistry of homoterpenes--common constituents of floral and herbivore-induced plant volatile bouquets. *Phytochemistry*, **72**, 1635-1646.
- Trapp, S.C. and Croteau, R.B.** (2001) Genomic Organization of Plant Terpene Synthases and Molecular Evolutionary Implications. *Genetics*, **158**, 811-832.
- Tuskan, G.A., DiFazio, S., Jansson, S., Bohlmann, J., Grigoriev, I., Hellsten, U., Putnam, N., Ralph, S., Rombauts, S., Salamov, A., Schein, J., Sterck, L. et al.** (2006) The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science*, **313**, 1596-1604

- Vaughan, M.M., Wang, Q., Webster, F.X., Kiemle, D., Hong, Y.J., Tantillo, D.J., Coates, R.M., Wray, A.T., Askew, W., O'Donnell, C., Tokuhisa, J.G. and Tholl, D. (2013) Formation of the unusual semivolatile diterpene rhizathalene by the Arabidopsis class I terpene synthase TPS08 in the root stele is involved in defense against belowground herbivory. *The Plant cell*, **25**, 1108-1125.
- Xu, M., Hillwig, M.L., Prisic, S., Coates, R.M. and Peters, R.J. (2004) Functional identification of rice syn-copalyl diphosphate synthase and its role in initiating biosynthesis of diterpenoid phytoalexin/allelopathic natural products. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, **39**, 309-318.
- Xu, M., Wilderman, P.R., Morrone, D., Xu, J., Roy, A., Margis-Pinheiro, M., Upadhyaya, N.M., Coates, R.M. and Peters, R.J. (2007) Functional characterization of the rice kaurene synthase-like gene family. *Phytochemistry*, **68**, 312-326.
- Xu, M., Wilderman, P.R. and Peters, R.J. (2007) Following evolution's lead to a single residue switch for diterpene synthase product outcome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 7397-7401.
- Yang, C., Wang, J. and Li, D. (2013) Microextraction techniques for the determination of volatile and semivolatile organic compounds from plants: a review. *Analytica chimica acta*, **799**, 8-22.
- Zerbe, P., Chiang, A. and Bohlmann, J. (2012) Mutational analysis of white spruce (*Picea glauca*) ent-kaurene synthase (PgKS) reveals common and distinct mechanisms of conifer diterpene synthases of general and specialized metabolism. *Phytochemistry*, **74**, 30-39.
- Zhou, K., Gao, Y., Hoy, J.A., Mann, F.M., Honzatko, R.B. and Peters, R.J. (2012) Insights into diterpene cyclization from structure of bifunctional abietadiene synthase from *Abies grandis*. *The Journal of biological chemistry*, **287**, 6840-6850.

7 ANHANG

7.1 cDNA-SEQUENZEN

7.1.1 *PTKS1A*

ATGTCCTTGCAAGTCGTCCTGGTTCTGCCCTTCTCTATATCAGCAACCCTGACAGACCCTGCATCAAAATTAGTCACAGGAGAATTC AAG
 ACAACCAGTCTGAACCTTTCATGGAACCTAAGGAAAGGATCAAGAAGATGTTTGATAAGATTGAATTGTCAGTGTCTTCATATGACTGCT
 TTGGGTGGCAATGGTCCCATCTCCAGATTGTCGGGAAACTCCTGTTTTCCAGAGTGCACAAAATGGATTTTGGAAAATCAACTGGTG
 ATGGCTCCTGGAGTCTTCTCATGGCAATCCATTATTAGTTAAGGATGCTCTTTCATCTACATTAGCGTGCATCCTTGCATTGAAGCGAT
 GGGGTATCGGTGAAGAACAATAAATAAAGGCCTTCGATTTATTGAGTTGAATCCGCTTCAGTTACGGATAACGAGCAACATAAACC
 AATTGGATTTGATATAATATTTCTGGCATGATTGAATATGCCATAGATTTGGATTTGAACCTCCCTTTGAAGCCGACAGATATAAATTC
 CATGCTCCACAGGAGGGCTTTGGAGCTTACAAGTGGCGGTGGCAAGAACTTGGAGGGAAGAAGAGCCTACTTAGCATATGTTTCGGA
 AGGAATTGGAAAATTACAGGATTGGGAAATGGCCATGAAATATCAAAGAAAGAATGGATCACTGTTCAATTCACCATCCACCACAGCA
 GCTGCCTTATTATCATATTCAAGATGCTGAGTGTCTCCATTATATTGTTCACTCTTACAGAAGTTTGGGAATGCAGTTCCAACCATTTATC
 CTTGGATATATATGCTCGTCTTCTATGTTGATGCTCTTGAAAGGTTGGGAATCGATCGGCATTTTAGGAAGGAAAGAAAATTTGTT
 TTGGACGAAACATACCGATTTTGGTTGCAGGGGGAGGAAGAGATATTTCTGATAATGCCACTTGTGCTTTGGCATTAGGATATTACG
 TTTGAACGGATATGATGTCTCTAGATACACTAAACCAATTTTCTGATAATGCTTCTAATTCAGTGGGAGGATATTTGAAGGATTC
 GGGAGCTGCCTTAGAGTTGTACAGAGCTCTGCAGCTAAGTTATCCAGATGAATCACTTCTGGAAAAACAAAATTCCTGGACAAGCTAT
 TTCTGAAACAGGGATTATCCAACGTTTCACTTTGTGGAGATAGGCTTCGTAATAATTATTCGGAGAGGTGCATGATGCTCTCAATTT
 TTCTGACCATGCAAAATTTGCAACGCTTAGCTATCAGAAGAAGAATTAACATTATGCTACAGATGATACGAGGATTTTGAAGGATTCG
 ATCGTTGTTGACTATTGGTAACAGGATTTTCTCAAATGGCTGTAGAAGACTTCAATATCTGCCAATCAATACAGCGTGAAGAATTTA
 AACATATCGAgaGGTGGGTTGTAgAGAGGAGACTGGACAAGCTAAAGTTTCTAGGCAGAAAGGAGGCCTACTGTTACTTcTCTGCTGC
 AGCAACTCTCTCGCTCCAGAACTATCTGATGCACGCATGTCATGGGCAAAAAATGGTGTGCTTACTACTGTTGTTGATGACTTCTTTGA
 TGGTGGTGGTTCTGAAGAAGAAGTGGTAAACCTTATTGAATTGATTGAGAGGTGGGATGTCAATGGCAGTGTGATTTTTGTTCTGAG
 GAAGTTGAGATCATATATTCGCAATTCACAGCACTATAAGTGAGATAGGAGACAAATCTTTCGGATGGCAAGGACGCGATGTGAAA
 AGTCAGGTTATCAAGATTTGGTTGGATTTGCTCAAATCCATGTTGACAGAAGCACAATGGTCAAGTAACAAATCAGTGGCGACCCTTGA
 TGAATATATGACAACTGCACATGTATCGTCTAGGGCCTATTGTCCTTCCAGCTCTGTATTTTGTGGGGCCTAAGCTTTTCAGAGGA
 GGTGCTGGACATCCTGAATTGCTTAATCTATACAAGTTACGAGCACTTGCAGGCGTCTGCTCAATGACTGGAGAAGCTTTAAGAGA
 GAATCTGAAGAAGGGAAATTGAATGCCGTCTCATTGTACATGATTACAGCGGTGGTGTCTCAACTGAAGAAGAGGCCATCGAACATT
 TAAAGGATTGATCGACAGCCAGAGAAGACAATTGCTTCAATTAGTTTTGCAGGAAAAGGATAGTATAATTCCTAGACCCTGCAAGGA
 TTTGTTTTGGAACATGATAAAATTATTGCACAGTCTACATGAAGGATGATGGATTCACTTCAAACGAGATGAGAAATGTTGTCAAGG
 CAATAATAAATgAACCCATCTCTAGATgAATTATAA

7.1.2 *PTKS1B*

ATGTCCTTGCAAGTCGTCCTGGTTCTGCCCTTCTCTATATCAGCAACCCTGACAGACCCTGCATCAAAATTAGTCACAGGAGAATTC AAG
 ACAACCAGTCTGAACCTTTCATGGAACCTAAGGAAAGGATCAAGAAGATGTTTGATAAGATTGAATTGTCAGTGTCTTCATATGACTGCT
 TGGGTGGCAATGGTCCCATCTCCAGATTGTCGGGAAACTCCTGTTTTCCAGAGTGCACAAAATGGATTTTGGAAAATCAACTGGTG
 TGGCTCCTGGAGTCTTCTCATGGCAATCCATTATTAGTTAAGGATGCTCTTTCATCTACATTAGCGTGCATCCTTGCATTGAAGCGATG
 GGGTATCGGTGAAGAACAATAAATAAAGGCCTTCGATTTATTGAGTTGAATCCGCTTCAGTTACGGATAACGAGCAACATAAACC
 ATTGGATTTGATATAATATTTCTGGCATGATTGAATATGCCAAAGATTTGGATTTGAACCTCCCTTTGAAGCCGACAGATATAAATTC
 ATGCTCCACAGGAGGGCTTTGGAGCTTACAAGTGGCGGTGGCAAGAACTTGGAGGGAAGAAGAGCCTACTTAGCATATGTTTCGGA
 GGAATTGGAAAATTACAGGATTGGGAAATGGCCATGAAATATCAAAGAAAGAATGGATCACTGTTCAATTCACCATCCACCACAGCAG
 CTGCCTTATTATCATATTCAAGATGCTGAGTGTCTCATTATATTGTTCACTCTTACAGAAGTTTGGGAATGCAGTTCAAACCATTTATCC
 TTTGGATATATATGCTCGTCTTCTATGTTGATGCTCTTGAAAGGTTGGGAATCGATCGGCATTTTAGGAAGGAAAGAAAATTTGTT
 TGGACGAAACATACCGATTTTGGTTGCAGGGGGAGGAAGAGATATtTcTGATAATGCCACTTGTGCTTTGGCATTAGGATATtACGTT
 TGAACGGaTATGATGTcTCTcTAGaTACACTAAaccAATtTTCAGAAGATCAATTTCTAATTCAGTGGGAGGATATTTGAAGGATTCGGG

AGCTGCCTTAGAGTTGTACAGAGCTCTGCAGCTAAGTTATCCAGATGAATCACTTCTGGAAAAACAAAATTCTCGGACAAGCTATTTCC
 TGAACAGGGATTATCCAACGTTTCACTTTGTGGAGATAGGCTTCGTAATAAATTATCGGAGAGGTGCATGATGCTCTCAATTTTCT
 GACCATGCAAATTTGCAACGCTTAGCTATCAGAAGAAGAATTAACATTATGCTACAGATGATACGAGGATTTTGAAAACCTCGTATCG
 TTGTTGACTATTGGTAACCAGGATTTTCTCAAATGGCTGTAGAAGACTTCAATATCTGTCAATCAATACAGCGTGAAGAATTTAAACA
 TATCGAGAGGTGGGTTGTAGAGAGGAGACTGGACAAGCTAAAGTTTGTAGGCAGAAGGAGGCCTACTGTTACTTCTCTGCTGCAGC
 AACTCTTTCGCTCCAGAATCTGATGCACGCATGTCATGGGCAAAAAATGGTGTGCTTACTACTGTTGTTGATGACTCTTTGATGT
 TGGTGGTTCTGAAGAAGAACTGGTAAACCTTATTGAATTGATTGAGAGGTGGGATGTCAATGGCAGTGTGATTTTTGTTCTGAGGAA
 GTTGAGATCATATATTGGCAATTCACAGCACTATAAGTGAGATAGGAGAAAAATCTTTCGGATGGCAAGGACGCGATGTAAAAAGC
 CATGTTATCAAGATTTGGTTGGATTGCTCAAATCCACGTTGACAGAGGCACAATGGTCAAGTAACAAATCAGTGCCAAACCTTGATGA
 ATATATGACAACCTGCACATGTATCGTTTCGCCCTAGGGCCTATTGTCCTTCCAGCTCTGTATTTTGTGGGGCCTAAGCTTTCAGAGGAGG
 TTGCTGGACATCCTGAATTGCTTAATCTATACAAGGTTACGAGCACTTGCGGGCGTCTGCTCAATGACTGGAGAAGCTTTAAGAGAGA
 ATCTGAAGAAGGAAATGAATGCCATCTCATTGTACATGATTACAGCGGTGGTCTTCAACTGAAGAAGAGACCATTGAACATTTT
 AAAGGATTGATCGACAGCCAGAGAAGACAATTGCTTCAATTAGTTTTGCAGGAAAAGGATAGTATAATTCCTAGACCCTGCAAGGATT
 TGTTTTGGACATGATAAACTATTGCACACGTTCTACATGAAGGATGATGGATTCACTTCAAACGAGATGAGAAATGTTGTCAAGGC
 AATAATAAATGAACCCATCTCTAGATGAATTATAA

7.1.3 *PTKS2*

ATGTCTTGACATCGTCCCTGGTTCTGCCCTTCTTATATCAGCAACCCTGACAGACCCTGCATCAAAATTAGTCACAGGAGAATTCAAG
 ACAACCAGTCTGAACTTTCATGGAACCTAAGGAAAGGTCAAGAAGATGTTTGATAAGATTGAATTGTCAGTgTCTTcATATGACACTGCT
 TGGGTGGCAATGGTCCCATCTCCAGATTGTCCGAAACTCCTTgTTTTCCAGAGTgCACAAAATGGATTTTGAAAATCAACTTGGTGA
 TGGCTCCTGGAGTCTTCTCATGGCAATCCATTATTAGTTAAGGATGCTCTTTCATCTACATTAGCGTGCATCCTTGCATTGAAGCGATG
 GGGTATCGGTGAAGAACAATAAATAAAGGCCTTCGATTTATTGAGTTGAATTCGCTTCACTTACGATAACgAGCAACATAAACCA
 ATTGATTGATATAAATTTTCTGGCATGATTGAATATGCCAAAGATTGGATTGAACCTCCCTTTGAAGCCgACAGATATAAATTC
 ATGCTCCACAGGAGGGCTTTGGAGCTTACAAGTGGCGGTGGCAAGAACTGGAGGGAAgAaAgAgCCTACTTAgCATATGTTTCGGAAG
 GAATTGgAAAAATTACAGGATTGGgAAATGGCCaTGAAAtATCAAAGAAAGAATGgatcaCTGTTcAaTTCaCcaTCCACCACaGCAGCTGCc
 TTtaTTCATATTCAAgAtGCTGAgTGTCTccaTTataTTCgtTCACTCTtACagaAgTtGGGAATGCGATTCcAaCcaTTTATCCTTtgGAtAtATA
 TGcTcGTCTTTCTATgGttATGCTCTgAAAGGtTgGGAATCGAtcGGCATTTTAGGAAGGAAAGAAAAATTTGTTTTgGaCGAAACAtACC
 GATTTTGGTTGcAGGGGGAGGAAGAGATATTTTcTgATAATGCCACTTGTGCTTTGGCATTAGGATATTACGTTTGAACGGATATGAT
 GTCTCTCTAGATACaTaaACCAATTTTcAGAAGATCATTTCtTAATCACTGGGAGGATATTTGAAGGATTCGGGAGCTGCCTTAGAG
 TTGTACAGAGCTCTGCAGcTAAGTTATCCAGATGAATCACTTCTGGAAAAACAAAATTCTCGGACAAGCTATTTCTGAAACAGGGATT
 ATCCAACGTTTCACTTTGTGGAGATAGGCTTcGTAATAAATATTATCGGAGAGGTGCATGATGCTCTCAATTTTCTGACCATGCAAATTT
 GCAACGCTTAGCTATCAGAGGAAGAATTAACATTATGCTACAGATGATACGAGGATTTTGAAAACCTcgTATCGTTGTTcGACTATTG
 GTAACCAGGATTTTCTCAAATTTGGCTGTAGAAGATTTcAATATCTGCCAATCAATACAGcGTgAAGAACCTTAAACATATCGAGAGGTGG
 GTTGTAGAGAGGAGACTGGACAAGCTAAAGTTTGTAGGCAGAAGGAGGCCTACTGTTACTTCTCTGCTgCAGCAaCTCTcTTCGCTCC
 AgAACTATcTGATGCACgCATGTcATGGgCAAAAAATAgTgTCTTACTGTTGttGttgATGACTTCTTTGATGtTGgTGGtTCTgAAgAAgA
 ACTGgtaaACCTtATTgaATTGATTGagagGTGGGATGtCAATGGCaGtGCTGatTTTgTTCTGAGAAAAGTTGAGATCATatattcgcaattcacA
 GCactataagtgagATAggagaaaaTCTTTcGgAtggcaaggaCgcaTGtaAAAgcCAtGTTAtcAAGAtTTgGttggattgctcAAATcTATGTTgaC
 AGAAGcaCAAtgGtCAAGTAaCAAAATCAGTgcCaAcCCTTGATGAATATATgACAACCTGCACATGTATcAtcTGCTTTAGGGCCTATTGTCC
 TTCCAGctCTcATTTTGTgGGGccTAAGCTTTcAGAGGAGGtTGCTGGACATCCTGAATTGCTTaATCTATACAAGGTTATGAGCACTTG
 CGGGcGTcTGCTCAATGACTGGAGAAGCTTTAAGAGAGAATcTgAAGAAGGGAAATTGAATGCTGTCTCATTGTACATGATTACAGC
 GGTGGTCTTTAACTGAAGAGGAGGCCATTgAACATTTTAAAGTATTGATCGACAGCCAGAGAAGACAATTGCTTCACTTCACTTGTGTTGCA
 GGAAAAGGATAGTATAATTCCTAGACCCTGCAAGGATTTGTTTTGGCACATgATAAAAAATTGCACACGTTCTACATgAAGGATGATG
 GATCACTTCAAACGAGATgATAAGTGTGTCAAGGCAATAATAAATGAACCCATCTCTAGATgAATTATAA

7.2 DATEN DER SPME-EXTRAKTION

TAB. 7.1: Identifizierte Naturstoffe von SPME-Extrakten aus Stängeln von *P. trichocarpa*. Gemörsertes Stängelmaterial wurde mit SPME extrahiert und mittels GC-MS analysiert. Die aufgeführten Verbindungen wurden anhand ihres Massenspektrums und ihrer Retentionszeit über den Abgleich mit Datenbanken identifiziert und über die Integration der Peakflächen relative quantifiziert. Es sind Mittelwert (MW) und Standardfehler (StF) der ermittelten Peakflächen angegeben. Die Daten wurden aus 7 biologischen Replikaten gewonnen.

Retentionszeit	Substanz	relative Werte der Peakfläche	
		MW	StF
5.840	(E)-2-Hexenal	178	50
7.938	α -Pinen	1323	745
9.464	β -Myrcen	213	131
10.497	Limonen	446	264
10.947	Salicylaldehyd	10	5
11.209	Tetradecan	6	3
11.285	γ -Terpinen	47	29
12.351	Linalool	81	41
14.384	γ -Terpineol	22	12
15.468	β -Cyclocitral	61	24
16.005	4-Phenyl-2butanon	5	3
16.334	3-Ethyl-3-methyldecan	3	2
16.714	Docosan	10	3
17.747	Eicosan	6	2
18.603	Eugenol	11	3
20.319	n-Propylbenzoat	11	7
20.650	(E)- β -Farnesen	34	21
21.314	1,5-Pentandiol-dibenzoat	12	7
21.419	(Z,E)- α -Farnesen	19	9
21.544	Junipen	48	25
21.630	α -Selinen	14	6
21.709	(E,E)- α -Farnesen	101	60
21.787	2,6,10-Trimethyl-7,10-epoxy-2,5,11-dodecatrien	167	86
22.846	Nerolidol	1076	601
23.488	Tricyclo[5.4.0.02,8]undec-9-en, 2,6,6,9-tetramethyl-	37	16
26.733	Benzylbenzoat	29	16
28.558	Benzylsalicylat	36	22

TAB. 7.2 : *Identifizierte Naturstoffe von SPME-Extrakten aus Wurzeln von P. trichocarpa.* Gemörsertes Wurzelmaterial wurde mit SPME extrahiert und mittels GC-MS analysiert. Die aufgeführten Verbindungen wurden anhand ihres Massenspektrums und ihrer Retentionszeit über den Abgleich mit Datenbanken identifiziert und über die Integration der Peakflächen relative quantifiziert. Es sind Mittelwert (MW) und Standardfehler (StF) der ermittelten Peakflächen angegeben. Die Daten wurden aus 7 biologischen Replikaten gewonnen.

Retentionszeit	Substanz	relative Werte der Peakfläche	
		MW	StF
10.919	Salicylaldehyd	1013	381
16.198	1,3-Ditertbutylbenzen	23	4
16.336	2,4-Dimethylheptan	3	1
16.716	Octadecan	8	2
17.755	(E)-2-[(N-hydroxy-N-phenyl)-amino]-3-[N-(phenylimino)]-indol	5	2
21.403	3-Methylheneicosan	5	1
21.806	2,4-Ditertbutylphenol	12	1
25.638	Myristylaldehyd	5	2
28.559	Benzylsalicylat	9	4

TAB. 7.3: *Identifizierte Naturstoffe von SPME-Extrakten aus Blättern von P. trichocarpa.* Gemörsertes Blättermaterial wurde mit SPME extrahiert und mittels GC-MS analysiert. Die aufgeführten Verbindungen wurden anhand ihres Massenspektrums und ihrer Retentionszeit über den Abgleich mit Datenbanken identifiziert und über die Integration der Peakflächen relative quantifiziert. Es sind Mittelwert (MW) und Standardfehler (StF) der ermittelten Peakflächen angegeben. Die Daten wurden aus 7 biologischen Replikaten gewonnen.

Retentionszeit	Substanz	relative Werte der Peakfläche	
		MW	StF
5.863	(E)-2-Hexenal	192	21
10.922	Salicylaldehyd	331	98
12.462	Nonanal	96	13
16.717	Octadecan	5	2
21.390	β -Ionon	17	2
21.710	(E,E)- α -Farnesen	22	6
22.829	Nerolidol	15	3
23.043	3-Hexen-1-o-benzoat	11	4
23.372	unbekannt	47	6
23.577	unbekannt	29	4
27.441	Pentadecanal	4	2
37.223	(Z)-9-Tricosen	7	4

TAB. 7.4: *Identifizierte Naturstoffe von SPME-Extrakten aus Knospen von P. trichocarpa.* Gemörsertes Knospenmaterial wurde mit SPME extrahiert und mittels GC-MS analysiert. Die aufgeführten Verbindungen wurden anhand ihres Massenspektrums und ihrer Retentionszeit über den Abgleich mit Datenbanken identifiziert und über die Integration der Peakflächen relative quantifiziert. Es sind Mittelwert (MW) und Standardfehler (StF) der ermittelten Peakflächen angegeben. Die Daten wurden aus 4 biologischen Replikaten gewonnen.

Retentionszeit	Substanz	relative Werte der Peakflächen	
		MW	StF
5.842	(E)-2-Hexenal	204	103
10.914	Salicylaldehyd	569	220
12.346	L-Linalool	58	24
12.761	Phenylethylalkohol	25	17
13.393	Geranylpropanoat	11	7
13.594	Camphor	39	15
13.737	p-Vinylanisol	20	12
15.461	β -Cyclocitral	67	14
16.192	1,4-Ditertbutylbenzen	16	10
16.269	Essigsäure-2-Phenylethylester	38	13
16.916	Methylcaprat	31	3
17.765	Methylnerolat	11	6
18.440	α -Cubeben	45	10
18.641	Eugenol	1366	207
18.784	Styren	281	130
18.968	α -Ylangen	92	29
19.079	α -Copaen	708	178
19.236	β -Elemen	10	6
19.320	14-Methylpentadecansäure-methyl-ester	58	5
19.390	β -Elemen	215	41
19.485	α -Ylangen	7	5
19.709	α -Copaen	118	21
20.116	β -Caryophyllen	3615	721
20.244	β -Cubeben	112	13
20.497	Patchoulen	9	9
20.617	δ -Cadinen	53	10
20.706	α -Cubeben	24	14
20.859	β -Selinen	4750	932
20.977	α -Amorphen	1004	156
21.169	δ -Cadinen	325	135
21.236	α -Amorphen	855	187
21.342	Germacrene-D	257	103
21.486	β -Selinen	474	136
21.586	α -Cubeben	256	90
21.646	Cadinen	303	190
21.668	Valencen	895	585
21.698	α -Muurolen	874	229
21.785	δ -Cadinen	93	16
22.055	α -Amorphen	2123	455
22.188	δ -Cadinen	4450	1104
22.387	Cadina-1,4-dien	135	26
22.489	α -Cadinen	387	99
22.607	α -Calacoren	134	50
22.899	1-Naphthol, 1,2,3,4-tetrahydro-4,5,7-trimethyl-	49	9

22.994	α -Calacoren	24	5
23.233	Junipen	50	4
23.367	Bicyclogermacren	94	21
23.440	Caryophyllenoxid	127	10
23.738	α -Humulen	146	35
23.834	Germacren-B	12	8
23.954	Decalin	272	54
24.016	Carotol	91	30
24.273	Naphthalen, 1,2,3,4,4a,7-hexahydro-1,6-dimethyl-4-(1-methylethyl)-	92	32
24.368	(-)-Elema-1,3,11(13)-trien-12-al	730	147
24.498	α -Cadinol	549	165
24.758	T-Muromol	196	62
24.809	Junipen	24	14
25.082	Valerenol	18	8

7.3 DATEN DER HEXANEXTRAKTION

TAB. 7.5: *Identifizierte Naturstoffe aus Hexanextrakten aus Stängeln von P. trichocarpa.* Gemörsertes Stängelmaterial wurde mit Hexan extrahiert und mittels GC-MS analysiert. Die aufgeführten Verbindungen wurden anhand ihres Massenspektrums und ihrer Retentionszeit über den Abgleich mit Datenbanken identifiziert. Mittels des Standards Nonylacetat (20,17 ng/ μ l) wurde durch die Integration der Peakflächen die Konzentration der Stoffe in μ g/g_{Frishgewicht} errechnet. Es sind Mittelwert (MW) und Standardfehler (StF) der ermittelten Konzentrationen angegeben. Die Daten wurden aus 7 biologischen Replikaten (je 200 mg) gewonnen.

Retentionszeit	Substanz	Konzentration (μ g/g _{Frishgewicht})	
		MW	StF
4.816	(E)-2-Hexenal	4,639	0,867
6.672	α -Pinen	0,556	1,448
9.099	Limonen	0,249	0,510
11.064	Farnesan	0,495	0,033
15.992	Nonylacetat	105,052	1,375
21.324	Nerolidol	0,000	9,920
24.856	Geranylinalool	0,000	1,805
26.986	Benzylsalicylat	0,000	6,209
29.786	4-Nitrotoluen	0,000	0,746
32.589	unbekannt	0,000	0,869
34.621	9-Octadecenamid	3,002	0,405
39.993	2,3,5,8 Tetramethyl-1,5,9-Decatrien	1,254	0,301
40.156	13 Octadecenal	10,481	1,206
41.256	4-Amino-3-methoxypyrazolo[3,4-d]pyrimidin	11,558	0,272
41.970	21-Bromo-20-methyl-(3 β)-Pregn-5-en-3-ol	84,343	3,548

TAB. 7.6: Identifizierte Naturstoffe aus Hexanextrakten aus Wurzeln von *P. trichocarpa*. Gemörsertes Wurzelmaterial wurde mit Hexan extrahiert und mittels GC-MS analysiert. Die aufgeführten Verbindungen wurden anhand ihres Massenspektrums und ihrer Retentionszeit über den Abgleich mit Datenbanken identifiziert. Mittels des Standards Nonylacetat (20,17 ng/μl) wurde durch die Integration der Peakflächen die Konzentration der Stoffe in μg/g_{Frishgewicht} errechnet. Es sind Mittelwert (MW) und Standardfehler (StF) der ermittelten Konzentrationen angegeben. Die Daten wurden aus 7 biologischen Replikaten (je 200 mg) gewonnen.

Retentionszeit	Substanz	Konzentration (μg/g _{Frishgewicht})	
		MW	StF
4.386	2-Octen	0,046	0,020
9.122	Limonen	0,424	0,039
9.218	Benzylalkohol	0,218	0,076
9.459	Salicylaldehyd	18,270	3,441
11.063	Farnesan	0,434	0,013
14.898	2-Butyloctanol	0,458	0,037
15.992	Nonylacetat	99,587	1,115
41.971	21-Bromo-20-methyl-(3β)-Pregn-5-en-3-ol	30,871	2,927

TAB. 7.7 Identifizierte Naturstoffe aus Hexanextrakten aus Blättern von *P. trichocarpa*. Gemörsertes Blattmaterial wurde mit Hexan extrahiert und mittels GC-MS analysiert. Die aufgeführten Verbindungen wurden anhand ihres Massenspektrums und ihrer Retentionszeit über den Abgleich mit Datenbanken identifiziert. Mittels des Standards Nonylacetat (20,17 ng/μl) wurde durch die Integration der Peakflächen die Konzentration der Stoffe in μg/g_{Frishgewicht} errechnet. Es sind Mittelwert (MW) und Standardfehler (StF) der ermittelten Konzentrationen angegeben. Die Daten wurden aus 7 biologischen Replikaten (je 200 mg) gewonnen.

Retentionszeit	Substanz	Konzentration (μg/g _{Frishgewicht})	
		MW	StF
4.803	(E)-2-Hexenal	4,504	0,920
7.848	2-Ethylacrolein	1,054	0,129
9.090	Limonen	1,691	0,070
9.203	7-Oxabicyclo[2.2.1]hept-2-ene, 5-methylene-	2,979	0,211
9.901	Salicylaldehyd	3,780	0,720
11.044	Nonanal	26,868	4,745
13.640	1,2-Benzendiol	1,504	0,430
15.988	Nonylacetat	99,626	1,345
17.414	Ethylbenzoicacid	5,509	2,287
19.648	8-Quinolinmethanol	0,398	0,032
26.419	Neophytadien	1,223	0,213
26.843	3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol	0,360	0,216
26.995	Benzoic acid, 2-hydroxy-, phenylmethyl ester	0,562	0,298
27.149	3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol	0,613	0,139
27.336	2-Pentylphenol	2,745	0,480
29.777	2-Amino-3-benzoyloxyridin	1,868	1,134
30.841	Phytol	110,703	21,092
32.389	Neophytadien	31,991	4,544
33.265	Muscalur	1,788	0,309
34.042	2(1H)-Naphthalenon, octahydro-4a-methyl-7-(1-methylethyl)-, (4a.alpha.,7.beta.,8a.beta.)-	0,584	0,038

36.573	N-methyl-N-[4-[4-methoxy-1-hexahydropyridyl]-2-butyryl]-Acetamid	0,394	0,175
39.020	GeranylLinalool IsomerB	6,092	1,017
39.991	Squalen	3,443	0,434
40.103	Niacin	1,993	0,343
41.255	1-(4-Nitrophenyl)piperazin	39,415	4,312
41.976	21-Bromo-20-methyl-, (3 β)-Pregn-5-en-3-ol	104,016	3,998

TAB. 7.8: Identifizierte Naturstoffe aus Hexanextrakten aus Knospen von *P. trichocarpa*. Gemörsertes Stängelmaterial wurde mit Hexan extrahiert und mittels GC-MS analysiert. Die aufgeführten Verbindungen wurden anhand ihres Massenspektrums und ihrer Retentionszeit über den Abgleich mit Datenbanken identifiziert. Mittels des Standards Nonylacetat (20,17 ng/ μ l) wurde durch die Integration der Peakflächen die Konzentration der Stoffe in μ g/g_{Frischgewicht} errechnet. Es sind Mittelwert (MW) und Standardfehler (StF) der ermittelten Konzentrationen angegeben. Die Daten wurden aus 7 biologischen Replikaten (je 100 mg) gewonnen.

Retentionszeit	Substanz	Konzentration (μ g/g _{Frischgewicht})	
		MW	StF
4.814	(E)-2-Hexenal	29,038	2,151
9.459	Salicylaldehyd	24,525	9,505
15.991	Nonylacetat	214,251	5,870
16.915	Eugenol	40,604	6,583
17.203	Isoeugenol	9,593	2,350
17.472	α -Copaen	1,726	0,818
18.433	β -Caryophyllen	10,176	0,957
19.195	α -Humulen	16,297	2,227
19.587	α -Amorphen	1,925	1,001
20.066	α -Muurolen	7,733	1,000
20.383	α -Amorphen	5,704	0,618
20.474	δ -Cadinen	16,674	1,392
21.761	Caryophyllenoxid	5,280	0,510
22.309	(-)-Humulenepoxid II	8,661	1,326
22.729	(-)-Elema-1,3,11(13)-trien-12-al	10,858	1,137
22.915	δ -Cadinen	13,156	1,236
23.162	α -Cadinol	8,837	0,794
30.827	Phytol	34,920	4,100
32.379	Neophytadien	1,940	0,706
32.790	10-Cyclohexylanthron	18,100	2,655
33.440	unbekannt	10,894	2,932
33.500	4,5-Dimethoxy-2-(2-propenyl)-phenol	14,614	3,553
33.555	unbekannt	11,948	2,073
34.919	2',6'-Dihydroxy-4'-methoxychalcon	51,037	12,904
37.385	Tectochrysin	4,633	2,195
38.722	1,3-Dimethylpyrimido[4,5-c]pyridazine-4,5,7(1H,6H,8H)-trion	8,226	1,167
39.831	3-Methyl-2-butenyl-3-methyl-Butanoat	3,910	0,589
39.987	Methyl-3-cis-7-trans-Homofarnesenat	5,722	0,557
41.251	1-(4-nitrophenyl)-Piperazin	20,095	1,792
41.965	21-Bromo-20-methyl-, (3 β)-Pregn-5-en-3-ol	115,497	6,284

7.4 RELATIVE EXPRESSIONSRATEN VON *PTKS1A,B* UND *PTKS2*

TAB. 7.9: Prozentuale Anteile von *PtKS1a,b* und *PtKS2* an der Transkriptmenge der *KS(L)*-Gene in den einzelnen Organen. In der Tabelle sind die Mittelwerte (MW) der prozentualen Anteile von *PtKS1a*, *PtKS1b* und *PtKS2* an der Transkriptmenge der *KS(L)*-Sequenzen in den einzelnen Organen mit Standardfehler (StF) dargestellt. Die Daten wurden durch Klonierung von amplifizierten putativen *KSL*-Fragmenten aus drei biologischen Replikaten und Sequenzierung von je 20 Kolonien gewonnen.

	<i>PtKS1a</i>		<i>PtKS1b</i>		<i>PtKS2</i>	
	<i>MW</i>	<i>StF</i>	<i>MW</i>	<i>StF</i>	<i>MW</i>	<i>StF</i>
Knospe	100	0	0	0	0	0
Blatt	85,0	6,0	8,6	5,9	6,4	0,3
Stängel	55,6	7,2	25,0	2,0	19,4	7,6
Wurzel	36,8	8,0	45,6	9,3	17,5	4,6

DANKSAGUNG

Hiermit möchte ich mich bei Allen bedanken, die auf irgendeine Art und Weise zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben. Ganz besonders geht der Dank an Dr. Tobias Köllner und Sandra Irmisch, welche mir das Thema zur Verfügung stellten und mich zu jeder Zeit mit Rat und Tat und vor allem viel Geduld unterstützten. Insbesondere Sandra möchte ich für ihre unerschütterliche Geduld in den letzten Wochen und für die vielen anregenden und motivierenden Gespräche danken.

Weiterhin möchte ich mich bei der ganzen Abteilung „Biochemie“ bedanken für die herzliche Aufnahme und die Hilfsbereitschaft zu jeder Zeit. Insbesondere möchte ich Bettina Raguschke danken, welche hunderte Sequenzen von mir sequenzierte und der ganzen Kuchengruppe inklusive Raimund für viele glutenfreie Ermunterungskuchen und –gespräche.

Ich danke auch Prof. Dr. Jonathan Gershenzon, für die Möglichkeit, diese Arbeit in der Abteilung Biochemie anzufertigen und Dr. Jörg Müller, dass er sich dazu bereiterklärt hat, ein Gutachten zu erstellen.

Schließlich möchte ich mich auch bei meinem Freund und bei Maike, Marie, Therese, Matthias und Judith bedanken, die mir stets gut zuredeten und mir die schönen Seiten des Lebens nach Rückschlägen bei der Arbeit zeigten.

SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Jena, den 05.08.2014

(Andrea Müller)