

**Identifizierung und Charakterisierung einer
Alkoholacyltransferase
in Baumwolle (*Gossypium hirsutum*)**

**Interaktion des Pilzes *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* und des
Herbivoren *Spodoptera littoralis* an Baumwolle**

Diplomarbeit

am

Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie, Jena

vorgelegt der

**Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

im

April, 2006

von

Jana Pastuschek

geboren am 13.08.1978

Gutachter:

Prof. Jonathan Gershenzon

PD Dr. Klaus-J. Appenroth

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
<i>a.dest</i>	destilliertes Wasser
Ap ^r	Ampicillinresistenz
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
<i>A.thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Bis Tris	2,2-bis(hydroxyethyl)iminotris(hydroxymethyl)methan
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
cDNA	kodierende Desoxyribonukleinsäure (<i>coded desoxyribonucleic acid</i>)
CoA	Coenzym A
cv	Kultivar
DEPC-H ₂ O	mit Diethylpyrocarbonat behandeltes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMNT	(<i>E</i>)-4,8-Dimethyl-1,3,7-Nonatrien
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycolbis(beta-aminoethylether)-N,N'-tetraessigsäure
EST	Anfangsfragment (<i>expressed sequence tag</i>)
FPLC	schnelle Flüssigchromatographie (<i>fast performance liquid chromatography</i>)
FOV	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i>
f.sp.	<i>formae speciales</i>
g	Erdbeschleunigung
GC	Gaschromatographie
<i>G. hirsutum</i>	<i>Gossypium hirsutum</i>
g/v	Verhältnis Gewicht zu Volumen
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kD	Kilodalton
Km ^r	Kanamycinresistenz
LB	Luria-Bertani-Medium

MS	Massenspektrometer
N-terminal	Aminoterminal
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PVP	Polyvinylpyrrolidon
qRT-PCR	quantitative real time PCR
RACE	Vervielfältigung von cDNA-Enden (<i>rapid amplification of cDNA ends</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
<i>S. littoralis</i>	<i>Spodoptera littoralis</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Template	Matrize, Vorlage
TMTT	(<i>E,E</i>)-4,8,12-Trimethyl-1,3,7,11-Tridecatetraen
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
UV	ultraviolett
Vol.	Volumen
v/v	Verhältnis Volumen zu Volumen

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Volatile Pflanzendüfte	2
1.2 Volatile Ester und deren Biosynthese	5
1.2.1 Volatile Ester von Früchten, Blüten, vegetativen Geweben und deren Funktionen	5
1.2.2 Esterbiosynthese	7
1.2.2.1 Biosynthese von (Z)-3-Hexenylacetat	7
1.2.2.2 BAHD-Acyltransferasen - die Schlüsselenzyme der Esterbiosynthese	8
1.3 Die Modellpflanze – <i>Gossypium hirsutum</i> (Linné)	11
1.3.1 Beschreibung der Baumwolle	11
1.3.2 Duftstoffe der Baumwolle	12
1.3.3 Schädlinge von <i>G. hirsutum</i> am Beispiel von <i>Spodoptera littoralis</i> und <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>vasinfectum</i>	13
1.4 Zielsetzung	15
2 Material und Methoden	16
2.1 Chemikalien und Reagenzien	16
2.2 Geräteliste	16
2.3 Anzucht und Kultivierung der verwendeten Organismen	18
2.3.1 Anzucht des Pflanzenmaterials – <i>G. hirsutum</i>	18
2.3.2 Anzucht des Herbivoren – <i>S. littoralis</i>	18
2.3.3 Anzucht und Sporenisolation des Pilzes <i>Fusarium. oxysporum</i> f.sp. <i>vasinfectum</i>	19
2.3.4 Anzucht und Kultivierung der Bakterien	20
2.3.4.1 <i>Escherichia coli</i> – Stämme	20
2.3.4.2 Antibiotika	20
2.3.4.3 Medien für Bakterienkulturen	20
2.3.4.4 Kultivierung von Bakterien und Stammhaltung	21
2.4 Sammlung und Analyse von Duftstoffen	21
2.4.1 Duftsammlung mit dem automatischen Duftsammelsystem	21
2.4.2 Duftsammlung mit der „closed-loop stripping“-Methode	22
2.4.3 Analyse der Duftstoffe durch gekoppelte Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS)	22

2.4.4 Quantifizierung flüchtiger Verbindungen über GC-MS mit der „single ion method“ (SIM)	23
2.5 Versuchsabläufe zur Behandlung von Pflanzen	24
2.5.1 Duftanalyse von mechanisch verwundeten Pflanzen	25
2.5.2 Duftanalyse von Herbivor-induzierten Pflanzen	25
2.5.3 Duftanalyse von FOV-infizierten Pflanzen	26
2.6 Isolierung von Nukleinsäuren	26
2.6.1 Isolierung von DNA	26
2.6.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i>	26
2.6.1.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus TAE-Agarosegelen	26
2.6.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>G.hirsutum</i>	27
2.6.2.1 Lithiumchlorid (LiCl)-Methode	27
2.6.2.2 TRIZOL [®] -Methode	28
2.6.2.3 Methode nach Wu <i>et al.</i>	28
2.6.2.4 RNA-Isolierung mit kommerziellen Kits	29
2.7 Synthese von cDNA	29
2.8 Polymerasekettenreaktion (PCR)	29
2.8.1 Oligonukleotide	29
2.8.2 Vervielfältigung von DNA-Fragmenten aus cDNA	31
2.8.3 Kolonie-PCR	32
2.8.4 Vervielfältigung von cDNA-Enden/ RACE-PCR	32
2.8.5 Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)	33
2.9 Klonierungs- und Transformationstechniken	34
2.9.1 Vektoren	34
2.9.2 pCR [®] 4-TOPO [®] -Vektor-Konstrukte in TOP 10 One Shot chemisch kompetenten <i>E.coli</i> Zellen	35
2.9.2.1 Subklonierungen in den pCR [®] 4-TOPO [®] -Vektor	35
2.9.2.2 Transformation der pCR [®] 4-TOPO [®] -Vektor-Konstrukte in TOP 10 One Shot chemisch kompetente <i>E.coli</i> Zellen	35
2.9.3 pET-28a(+)-Vektor/DNA-Konstrukt in BL21(DE3) <i>E.coli</i> Zellen	35
2.9.3.1 Hydrolytische Spaltung von DNA (Restriktionsverdau)	36
2.9.3.2 Ligation in den pET-28a(+)-Expressionsvektor	36
2.9.3.3 Transformation des pET-28a(+)-Vektor/DNA-Konstrukts in BL21(DE3) <i>E.coli</i> Zellen	36
2.10 Sequenzierung von DNA	36
2.11 DNA- und Protein-Sequenzanalyse	37
2.12 Elektrophoretische Verfahren	38

2.12.1 Auftrennung von DNA über TAE-Agarosegele	38
2.12.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)	39
2.12.2.1 Herstellung von SDS-Polyacrylamidgelen	39
2.12.2.2 Aufbereitung der Proben	39
2.12.2.3 Laufbedingungen	39
2.12.2.4 Coomassie-Färbung	40
2.12.2.5 Dokumentation	40
2.12.3 Kapillarelektrophoretische Auftrennung mit dem Bioanalyzer	40
2.13 Expression und Reinigung von Proteinen	41
2.13.1 Heterologe Proteinexpression in <i>E.coli</i>	41
2.13.2 Proteinreinigung durch „Fast Performance Liquid Chromatography“ (FPLC)	42
2.13.3 Konzentration und Umpufferung der Proteinlösung	43
2.13.4 Proteinbestimmungsmethoden	43
2.13.4.1 Quantifizierung nach Bradford	43
2.13.4.2 Quantifizierung mit dem Mikro-BCA-Test	43
2.13.4.3 Berechnung mit der „gene tool“ software	44
2.14 Enzymaktivitätsmessungen und Enzymkinetik	44
2.14.1 Enzym-Substrat-Reaktionen (Assays) zur Aktivitätsbestimmung	44
2.14.1.1 Berechnung der spezifischen Aktivität	45
2.14.1.2 Enzymatische Synthese von Benzoyl-CoA	45
2.14.1.3 Assay für die funktionelle Charakterisierung des Enzyms	45
2.14.1.4 Einfluß von pH-Wert, Temperatur und verschiedenen Metallionen auf die Enzymaktivität	46
2.14.1.5 Bestimmung der relativen Aktivität mit verschiedenen Alkoholen	46
2.14.1.6 Konkurrenzassay	46
2.14.2 Bestimmung der kinetischen Parameter	47
2.14.2.1 Bestimmung des K_m -Wertes	47
2.14.2.2 Berechnung der katalytischen Konstante k_{ca}	47
3 Ergebnisse	49
3.1 Analyse der Duftstoffe von <i>G. hirsutum</i>	49
3.1.1 Qualitative Analyse der Duftstoffe unterschiedlich behandelter Baumwollpflanzen	50
3.1.2 Quantitative Analyse ausgewählter Duftstoffe unterschiedlich behandelter Baumwollpflanzen	52
3.1.2.1 Quantitative Analyse der (<i>Z</i>)-3-Hexenylacetat-Emission	52

3.1.2.2	Quantitative Analyse der Benzylacetat-Emission	56
3.1.3	Analyse des Duftspektrums von Baumwollblüten	59
3.2	Identifizierung und Charakterisierung einer Alkoholacyltransferase in <i>G. hirsutum</i>	60
3.2.1	Identifizierung des <i>GhAAT1</i> -Gens	60
3.2.2	Charakterisierung des GhAAT1-Enzyms	60
3.2.2.1	Analyse der Proteinsequenz von GhAAT1	60
3.2.2.2	Vergleich der AS-Sequenz von GhAAT1 mit anderen Alkoholacyltransferasen	62
3.2.2.3	Heterologe Expression und Reinigung des GhAAT1-Proteins	63
3.2.2.4	Funktionelle Analyse des identifizierten GhAAT1-Enzyms	65
3.2.2.5	Biochemische Charakterisierung des GhAAT1-Enzyms	68
3.3	<i>GhAAT1</i> -Expression in <i>G. hirsutum</i>	72
4	Diskussion	74
4.1	Duftstoffe von <i>G. hirsutum</i>	74
4.1.1	Das Terpen- und GLV-dominierte Duftbouquet von <i>G. hirsutum</i> variiert infolge unterschiedlicher Behandlung	74
4.1.2	Die Emission der Ester (<i>Z</i>)-3-Hexenylacetat und Benzylacetat	76
4.1.2.1	Die Emission von (<i>Z</i>)-3-Hexenylacetat	77
4.1.2.2	Die Emission von Benzylacetat	78
4.1.3	Duftstoffe von Baumwollblüten	79
4.2	Die Alkoholacyltransferase GhAAT1 - Ein Schlüsselenzym der Benzylacetat- Biosynthese von <i>G. hirsutum</i> ?	81
4.2.1	GhAAT1, die erste bekannte Alkoholacyltransferase von <i>G. hirsutum</i> ist ein Mitglied der BAHD-Acyltransferasen-Familie	82
4.2.2	GhAAT1 katalysiert die Synthese des fruchtig-riechenden Esters Benzylacetat aus Benzylalkohol und Acetyl-CoA	85
4.2.3	GhAAT1 <i>in planta</i> nur BEAT-ähnlich?	87
5	Zusammenfassung	89
6	Literatur	90
7	Danksagung	100
8	Anhang	101

1 Einleitung

Unsere Welt ist erfüllt von einer unermesslichen Vielfalt an Gerüchen, Düften und Aromen. Die meisten dieser Duftstoffe werden von Pflanzen, darunter auch der zur Familie der Malvaceae gehörenden Baumwolle *Gossypium hirsutum*, in Form artspezifischer Bouquets an die Atmosphäre abgegeben. Dabei handelt es sich um komplexe Kompositionen aus einer Vielzahl verschiedener flüchtiger, organisch-chemischer Verbindungen, wobei der typische Charakter häufig durch die Dominanz von „fruchtig“, teilweise „grün“ riechenden, volatilen Estern geprägt ist. Die duftenden Gemische, die von vegetativen Geweben, Blüten und Früchten emittiert werden, ermöglichen es Pflanzen, die z.T. über Jahre hinweg an ein und denselben Standort gebunden sind, auf vielfältigste Weise mit ihrer Umwelt zu interagieren.

Um einen erweiterten Einblick in die Interaktion von Pflanzen mit ihrer biotischen Umwelt zu gewinnen und somit unter anderem zu verstehen, wie ein bestimmtes Duftbouquet von Pflanzen zur gezielten Abwehr von Fraßfeinden oder der Anlockung von bestäubenden Insekten eingesetzt werden kann, erfordert neben der Aufklärung der Bouquetzusammensetzung auch ein besseres Verständnis der Duftstoffbiosynthese. Die Identifizierung von Genen und Enzymen, die die Biosynthese volatiler Ester steuern, kann daher Aufschluss geben über die Bedeutung dieser im Pflanzenreich weit verbreiteten Verbindungen für die Kommunikation von Pflanzen mit anderen Organismen. Daher soll im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit eine Ester-bildende Alkoholacyltransferase in der Modellpflanze *Gossypium hirsutum* identifiziert und biochemisch charakterisiert werden.

1.1 Volatile Pflanzendüfte

„... Laß diese Glasglocke liegen! Ich will sie nicht mehr ...“

„Aber der Wind ...“

„Ich bin nicht so stark erkältet, daß ... Die frische Nachtluft wird mir gut tun.

Ich bin eine Blume.“

„Aber die Tiere ...“

„Ich muß wohl zwei oder drei Raupen aushalten, wenn ich die Schmetterlinge kennenlernen will. Auch das scheint sehr schön zu sein. Was aber die großen Tiere angeht, so fürchte ich mich nicht. Ich habe meine Krallen.“

Und sie zeigte treuherzig ihre vier Dornen. ...

„Der kleine Prinz“ von Antoine de Saint-Exupéry

Die kleine Rose, obwohl sie weder fliehen, noch sich verstecken konnte, bedurfte nicht des Schutzes des kleinen Prinzen. Sie und alle anderen Pflanzenarten haben im Laufe von Millionen von Jahren zahlreiche Strategien entwickelt, sich mit vielen verschiedenen Umwelteinflüssen auseinanderzusetzen. Pflanzen müssen sich gegen abiotische Faktoren wie Hitze, Dürre, Nässe oder Nährstoffmangel ebenso wie gegen biotische Faktoren wie Standortkonkurrenten, Mikroorganismen oder Frassfeinde verteidigen und schützen können. So haben sich im Verlauf der Evolution die unterschiedlichsten Verteidigungsstrategien und Schutzmechanismen entwickelt und durchgesetzt. Zu diesen gehört, neben der Ausbildung von mechanischen Barrieren wie der Epidermis, den Dornen und vielen mehr, auch die Bildung spezieller chemischer Verbindungen. Diese Substanzen, die keine offensichtliche Funktion bei Wachstums- und Entwicklungsprozessen haben, werden als sekundäre Pflanzenstoffe bezeichnet. Viele pflanzliche Sekundärstoffe werden als mehr oder weniger flüchtige organisch-chemische Verbindungen an die Atmosphäre abgegeben und „parfümieren“ unsere Welt mit einer unermesslichen Komposition an Düften und Aromen. Diese artspezifischen Bouquets volatiler Duftstoffe, die von vegetativen Geweben, Wurzeln (Steeghs *et al.*, 2004), Blüten (Knudsen *et al.*, 1993) und Früchten (Beekwilder *et al.*, 2004) freigesetzt werden, ermöglichen Pflanzen, auf vielfältigste Art und Weise mit ihrer Umwelt zu interagieren. Einige Duftstoffe wie die von Blüten und Früchten werden direkt, meist entwicklungsphasenabhängig, beispielsweise während der Blütezeit (Shalit *et al.*,

2003) und der Fruchtreife (Beekwilder *et al.*, 2004), an die Umgebung abgegeben und dienen der Anlockung von Pollinatoren und Samenverbreitern. Andere wiederum, die als freie Substanzen im pflanzlichen Gewebe, oft in speziellen Zellstrukturen, Trichomen (Gershenzon *et al.*, 1989) oder wie bei der Baumwolle in subepidermalen Drüsen gespeichert werden (Elzen *et al.*, 1985), können erst durch Beschädigungen d.h. nach dem „Aufbrechen“ von Cuticula, Zellwand oder Membranen freigesetzt werden (Gang, 2005). Das führt dazu, daß beispielsweise durch Herbivorie oder mechanische Verwundung beschädigte Pflanzen weitaus komplexere Mischungen mit deutlich erhöhten Mengen von Duftstoffen freisetzen. Diese sogenannten induzierten, meist speziell auf die jeweilige Situation angepaßten Duftstoffe spielen eine wichtige Rolle bei pflanzlichen Abwehrprozessen. Viele pflanzliche Duftstoffe sind antibakteriell bzw. antifungal wirksame Substanzen (Urbasch, 1984; Karapinar und Aktug, 1987; Linton und Wright, 1993; Andersen *et al.*, 1994) und dienen der Pflanze beispielsweise in Form von Frasshemmstoffen oder Toxinen als direkte Abwehrstoffe. Sie ermöglichen es den Pflanzen aber auch, sich indirekt zu wehren, indem sie die Feinde der Schädlinge anlocken (tritrophische Interaktion, Turlings *et al.*, 1990; Takabayashi und Dicke, 1996; Dicke *et al.*, 2003; Kessler and Baldwin, 2001). Auch konnte gezeigt werden, dass unverwundete Blätter einer von Insekten attackierten Pflanze ebenfalls induzierte Duftstoffe emittieren (systemische Abgabe; Turling und Tumlinson, 1992; Röse *et al.*, 1996; Röse *et al.*, 1998; Mattiacci *et al.*, 2001). Darüberhinaus könnten induzierte Duftstoffe einen positiven Einfluß auf unverwundete Nachbarpflanzen (Baldwin *et al.*, 2006) haben.

Im Allgemeinen können Duftstoffe, die in Folge von Verletzungen freigesetzt werden, in zwei verschiedene Gruppen eingeteilt werden (Röse *et al.*, 1998; Holopainen, 2004). Die erste Gruppe beinhaltet die innerhalb von Sekunden bis wenige Minuten nach dem Verwundungsereignis emittierten konstitutiven (dauerhaft vorhandenen) Terpene und „green leaf volatiles“ (GLVs). Die zweite Gruppe umfasst die „*de novo*“ synthetisierten und erst Stunden nach Beginn der Verletzung freigesetzten Terpene.

Terpene, aus Isopren-Einheiten (C_5) zusammengesetzte Kohlenwasserstoffe bilden mit mehr als 30 000 bekannten Verbindungen die größte und vielfältigste Klasse pflanzlicher Naturstoffe und lassen sich je nachdem wie viele Isopren-Einheiten miteinander verknüpft sind, in verschiedene Klassen einteilen. Terpene, die nur aus einer Isopreneinheit bestehen, werden als Hemiterpene (C_5), die aus zwei Isopreneinheiten als Monoterpene (C_{10}) und die aus drei C_5 -Einheiten als

Sesquiterpene (C_{15}) bezeichnet. Diese Regel (biogenetische Isoprenregel) lässt sich beliebig fortführen bis hin zu den Polyterpenen, die aus bis zu 30 000 Isopren-Einheiten zusammengesetzt sein können. Das C_{11} -Homoterpen (*E*)-4,8-Dimethyl-1,3,7-Nonatrien (DMNT) und das C_{16} -Homoterpen (*E,E*)-4,8,12-Trimethyl-1,3,7,11-Tridecatetraen (TMTT) sind Produkte oxidativer Degradation des Sesquiterpenalkohols Nerolidol bzw. des Diterpenalkohols Geranylinalool (Gäbler *et al.*, 1991; Boland *et al.*, 1998). Die Bildung der Terpenvorstufen wird in höheren Pflanzen über zwei verschiedene Biosynthesewege, den Acetat/Mevalonat-Weg im Cytosol und den 2-C-Methyl-D-Erythritol-4-Phosphat (MEP)-Weg in den Plastiden, realisiert.

Im Gegensatz zu den Terpenen, die oftmals die artspezifischen Bouquets von Pflanzen charakterisieren, werden von den grünen Blättern aller Pflanzenarten unmittelbar nach dem Verletzungsereignis die sogenannten „**green leaf volatiles**“ (GLVs, flüchtige Verbindungen der grünen Blätter) emittiert. Unter dem Begriff GLV werden alle volatilen gesättigten und einfach ungesättigten C_6 -Aldehyde (Hexenal), Alkohole (Hexenol), Ester (Hexenylacetat) und weitere C_6 -Verbindungen, die den charakteristischen „grünen“ Duft der Pflanzen bilden, zusammengefasst (Hatanaka, 1993). Diese in verschiedenen Konfigurationen (*E*- oder *Z*-Isomere) vorkommenden C_6 -Verbindungen entstehen durch enzymatischen Abbau von Linolen- und Linolsäure über den Lipoxygenase-Syntheseweg. Der letzte Schritt dieses Lipoxygenase-Syntheseweges, die Veresterung von Hexenol zu Hexenylacetate, aber auch die Veresterung einer Vielzahl weiterer Alkohole aus anderen Biosynthesewegen, wird durch die sogenannten Alkoholacyltransferasen katalysiert.

1.2 Volatile Ester und deren Biosynthese

1.2.1 Volatile Ester von Früchten, Blüten, vegetativen Geweben und deren Funktionen

Neben dem GLV-Ester (Z)-3-Hexenylacetat, der von vegetativen Geweben, vor allem der grünen Blätter gebildet und freigesetzt wird, emittieren Pflanzen eine Vielzahl weiterer flüchtiger Ester. Diese „fruchtigen“ Ester bestimmen das einzigartige Aroma von vielen Früchten wie Bananen, Äpfeln, Melonen und Erdbeeren. Und obwohl der Duft dieser Ester als „fruchtig“ beschrieben wird, emittieren auch eine Vielzahl pflanzlicher Blüten (der wohl typischste Vertreter ist die Rose) volatile Ester. Die Bildung und Emission volatiler Ester beschränkt sich jedoch nicht auf Pflanzen, sondern ist auch von verschiedenen Mikroorganismen wie Hefen oder Pilzen bekannt. Beispielsweise dienen Isoamyl- und Ethylacetat, welche bei der Bierfermentation gebildet werden, als Qualitätsmerkmal für den typischen Biergeschmack (Verstrepen, 2003 *et al.*).

Das markante Aroma einer reifenden **Frucht** entsteht durch eine Vielzahl verschiedener flüchtiger Duftstoffe, wobei der typische Charakter häufig durch die Dominanz von fruchtig riechenden volatilen Estern geprägt ist. Dieser charakteristisch duftende „Fingerabdruck“ erlaubt uns und den Tieren, sich an die entsprechende „Nahrung“ zu erinnern und verhindert dadurch den Genuß von unverträglichen Nahrungsmitteln (Goff und Klee, 2006). Das typisch „lecker“ und anziehend riechende fruchtig-süße Aroma von fast allen Früchten, daß vor allem während der durch das Hormon Ethylen regulierten Reifung (Flores *et al.*, 2002) freigesetzt wird, dient der Anlockung von samenverbreitenden Organismen und bietet darüberhinaus durch antimikrobielle Eigenschaften einen Schutz vor Pilzen und Bakterien (Hamilton-Kemp *et al.*, 1995). In einigen Früchten wie beispielsweise Äpfeln (*Malus domestica*), Bananen (*Musa sapientum*) und Melonen (*Cucumis melo* cv. *Cantaloupensis*) bilden Ester die Hauptkomponenten des charakteristischen Duftes (Young *et al.*, 1996; Shiota, 1993; Homatidou *et al.*, 1992). So beruht das typische Aroma von Äpfeln (*Malus pumila* cv. *Royal Gala*) hauptsächlich auf Butyl-, Hexyl- und 2-Methylbutylacetat (Young *et al.*, 1996) und das der Banane auf Isoamyl- und Butylacetat (Beekwilder *et al.*, 2004). In anderen Früchten, wie der Erdbeere (*Fragaria ananassa*), entsteht das charakteristische Aroma durch ein komplexes Duftgemisch, an dem neben anderen volatilen Substanzen auch ein großes

Spektrum verschiedener Ester beteiligt ist. So kann bereits eine einzelne reife Erdbeere mehr als 100 verschiedene Ester emittieren (Zabetakis und Holden, 1997).

Blütendüfte, die wir als wohlriechend und „betörend“ empfinden, aber auch jene die auf uns eine abstossende Wirkung haben, werden von der Pflanze zum Zweck der Anlockung von bestäubenden Tieren freigesetzt, was wiederum der Erhöhung der Fertilitätsrate dient (Dudareva und Pichersky, 2000). So duften Bienenpflanzen, wie Veilchen, aber auch Pflanzen, die von nachtaktiven Tieren und Insekten, wie Fledermäusen und Nachtfaltern bestäubt werden, besonders stark. Gerade für die letztere Gruppe von Pollenüberträgern stellt der olfaktorische Reiz oftmals die einzige Orientierungsquelle dar (Harborne, 1995). Diese Düfte sind komplexe Mischungen aus flüchtigen aromatischen Substanzen, die meist von den Kronblättern abgegeben und durch einige wenige Bestandteile, häufig durch volatile Ester (Knudsen *et al.*, 1993), charakterisiert werden. So besteht beispielsweise der Blütenduft von *Clarkia brewerii*, einer von Motten bestäubten, an der Küste Californiens beheimateten Pflanze, zu 40% aus Benzylacetat und zu je 5% aus Benzylbenzoat und Methylsalicylat (Raguso und Pichersky, 1995).

Der für uns bedeutendste und „betörendste“ Blütenduft, der Duft einer Rose (*Rosa hybrida*), eine Komposition aus mehr als 400 flüchtigen Substanzen (Flament *et al.*, 1993), wird ebenso von einigen Estern dominiert. So zeigte Shalit *et al.* (2003), daß ungeöffnete Rosenblüten eine geringe Menge an (*Z*)-3-Hexenylacetat freisetzen. Eine vollständig geöffnete Rosenblüte emittiert jedoch große Mengen an (*Z*)-3-Hexenylacetat und 2-Phenethylacetat, sowie in geringeren Mengen Geranylacetat, Citronellylacetat, 2-Hexenylacetate und Spuren von Benzyl- und Nerylacetat. Damit zeigte Shalit *et al.* (2003), daß die qualitative und quantitative Emission von Estern vom Entwicklungszustand der Blüte abhängig ist.

Flüchtige Ester werden auch von vegetativen pflanzlichen Geweben emittiert. Wichtig sind hier vor allem die **Blätter**, während der Stamm der Pflanze eher eine untergeordnete Rolle spielt. Diese Ester, speziell der GLV-Ester (*Z*)-3-Hexenylacetat, werden sowohl konstitutiv (Dudareva *et al.*, 2004), vor allem aber nach mechanischer Zerstörung des grünen Blattgewebes unabhängig von Einflüssen biotischer Organismen (Fall *et al.*, 1999) freigesetzt.

1.2.2 Esterbiosynthese

1.2.2.1 Biosynthese von (Z)-3-Hexenylacetat

Die Synthese der GLVs erfolgt in grünen Blättern durch enzymatischen Abbau der vielfach ungesättigten Fettsäuren Linolen- und Linolsäure über den Lipoxygenase-Syntheseweg (Feussner und Wasternack, 2002; Hatanaka, 1993) (Abb. 1.1). Die am ersten Schritt beteiligten Lipoxygenasen (LOX) formieren 13(S)-Hydroperoxylinolensäure, ein Zwischenprodukt der Jasmonsäurebiosynthese und zugleich Ausgangsstoff der Hydroperoxidlyasen (HPL)-vermittelten Hexanal- und 12-oxo-cis-9-Dodecanat-Synthese. Das Aldehyd Hexanal wird im nächsten Schritt durch die Alkoholdehydrogenase (ADH) zum entsprechenden Alkohol Hexanol reduziert. Aus 12-oxo-cis-9-Dodecanat entsteht hingegen Traumatin, daß eine wichtige Rolle bei der pflanzlichen Wundantwort spielt. Der letzte Schritt, die Veresterung des Alkohols zu (Z)-3-Hexenylacetat erfolgt durch eine Alkoholacyltransferase (AAT).

Die Alkoholacyltransferase, die in *A. thaliana* die Synthese von (Z)-3-Hexenylacetat katalysiert, wurde von D'Auria *et al.* (2002, 2006) entdeckt und biochemisch als CHAT (Acetyl CoA:(Z)-3-Hexenol Acetyltransferase) charakterisiert.

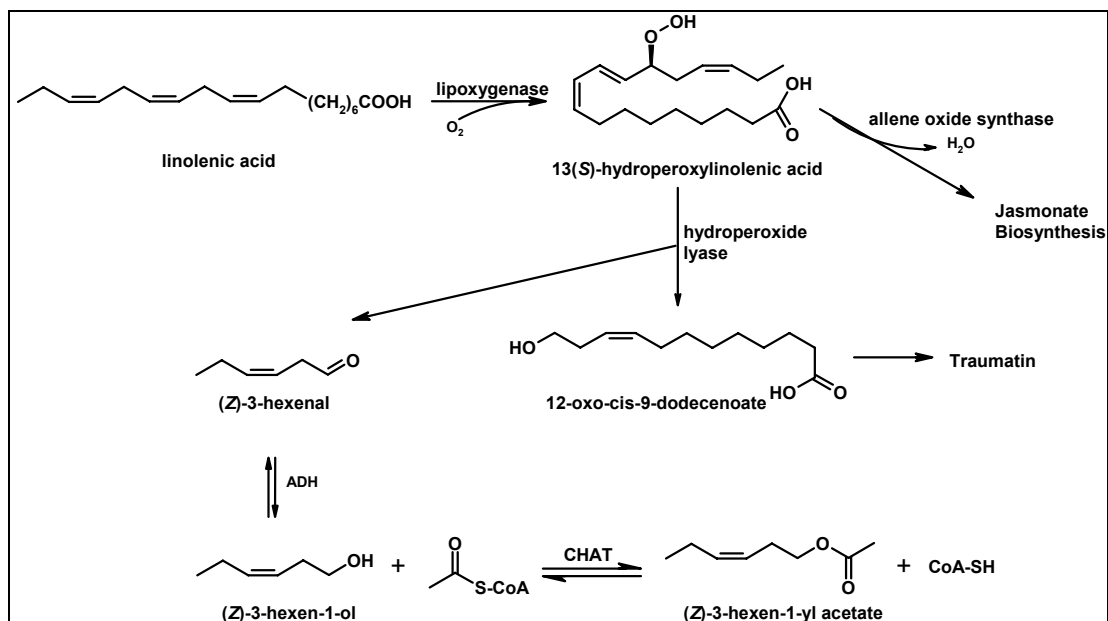


Abb. 1.1: Produktion der GLVs über den Lipoxygenase-Syntheseweg (aus D'Auria *et al.*, 2006). Der letzte Schritt, die Veresterung des Alkohols (Z)-3-Hexenol zu (Z)-3-Hexenylacetat erfolgt in *A. thaliana* durch die BAHD-Alkoholacyltransferase CHAT (Acetyl CoA:(Z)-3-Hexenol Acetyltransferase).

1.2.2.2 BAHD-Acyltransferasen - die Schlüsselenzyme der Esterbiosynthese

Die BAHD-Familie von Acyltransferasen (EC 2.3.1.x) beschreibt eine erst vor wenigen Jahren entdeckte Gruppe von Enzymen (St.Pierre und De Luca, 2000). Der Name „BAHD“ basiert auf den ersten vier Enzymen, die für diese Familie gefunden wurden: **BEAT** (Benzylalkohol O-Acetyltransferase aus *Clarkia brewerii*) (Dudareva *et al.*, 1998), **AHCT** (Anthocyanin O-Hydroxycinnamoyltransferase aus *Gentiana triflora*) (Fujiwara *et al.*, 1997, Fujiwara *et al.*, 1998), **HCBT** (Anthranilat N-Hydroxycinnamoyl CoA Acyltransferase aus *Dianthus caryophyllus*) (Yang *et al.*, 1998), **DAT** (Deacetylvindoline 4-O-Acetyltransferase aus *Clarkia roseus*) (St.Pierre und De Luca, 1998).

Einige BAHD-Acyltransferasen sind an der Synthese von Anthocyanen (Fujiwara *et al.*, 1997; Fujiwara *et al.*, 1998, Suzuki *et al.*, 2002; Suzuki *et al.*, 2004), Aminen (Burhenne *et al.*, 2003), Taxolen (Walker und Croteau, 2000; Walker und Croteau, 2001), Alkaloiden (Okada *et al.*, 2005) und möglicherweise sogar an der Prolongation epicuticulärer Wachse (Negruk *et al.*, 1996; Tacke *et al.*, 1995) beteiligt. Andere, die als Klasse der BAHD-Alkoholacyltransferasen zusammengefasst werden, synthetisieren die von verschiedenen Pflanzenorganen emittierten volatilen Ester. Die verwandschaftlichen Beziehungen aller BAHD-Acyltransferasen vermittelt der von D’Auria (2006) erstellte phylogenetische Stammbaum (Abb. 1.2).

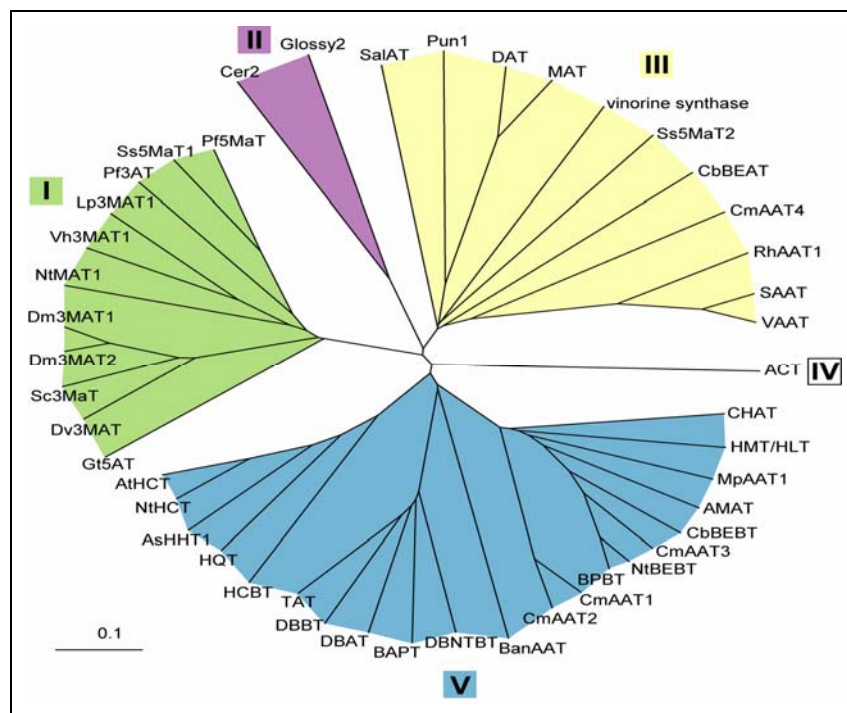


Abb. 1.2: Phylogenetischer Stammbaum aller bekannter pflanzlicher BAHD-Acyltransferasen (aus D’Auria, 2006). Die Klassen III und V enthalten die bekannten Alkoholacyltransferasen.

Die geringste Sequenzähnlichkeit zwischen allen Mitgliedern der BAHD-Familie beträgt etwa 25-34% (Ma *et al.*, 2005). Zwischen funktionell ähnlichen Enzymen aus verschiedenen Pflanzenarten beispielsweise solche, die Benzylbenzoat synthetisieren, kann die Sequenzidentität auch mehr als 90% betragen.

Die zur Klasse der Alkoholacyltransferasen (AATs) gehörenden Enzyme katalysieren den letzten Schritt der Esterbiosynthese durch eine Transacylierung von einem Acyl-CoA-Donor (meist Acetyl-CoA) zu einem Alkohol-Akzeptor (St.Pierre und De Luca, 2000). Ein allgemeiner Mechanismus dieser Acylierungsreaktion ist in Abbildung 1.3 dargestellt. Die Diversität der Ester beruht auf der Kombination verschiedener Alkohole mit verschiedenen Acyl-CoAs. Dabei ist nicht für jede Kombination eine „spezialisierte“ Alkoholacyltransferase nötig. Vielmehr besitzen alle Alkoholacyltransferasen die Fähigkeit, ein breites Spektrum an Substraten, zu nutzen (Beekwilder *et al.*, 2004).

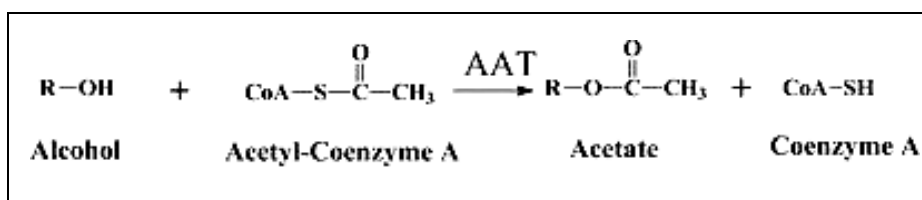


Abb. 1.3: Allgemeiner Reaktionsmechanismus der Alkoholacyltransferasen-vermittelten Esterbiosynthese (aus Shalit, 2003). Alkoholacyltransferasen (AATs) katalysieren die Biosynthese von Estern durch eine Transacylierung von einem Acyl-CoA-Donor (meist Acetyl-CoA) zu einem Alkohol-Akzeptor.

Die Tabelle 1.1 gibt einen Überblick über einige bekannte Alkoholacyltransferasen, die zur Einordnung der im Rahmen dieser Arbeit zu charakterisierenden Alkoholacyltransferase aus *G. hirsutum* dienen. Diese und alle weiteren bekannten, strukturell ähnlichen und evolutionär verwandten monomeren BAHD-Enzyme sind durch den Besitz von zwei evolutionär hochkonservierten Regionen gekennzeichnet. Eins dieser Motive, das „HXXXD“ befindet sich etwa in der Mitte der Aminosäure (AS)-Sequenz und ist für die katalytische Aktivität wichtig. Das zweite, nahe am C-Terminus liegende „DFGWG“-Motiv, spielt eine wichtige Rolle für die Struktur (St.Pierre und De Luca, 2000). Darüberhinaus besitzen alle BAHD-Enzyme ein Molekulargewicht von 48-55 kD und eine durchschnittliche AS-Anzahl von 445 (D’Auria, 2006).

Tab. 1.1: Überblick über einige bekannte Alkoholacyltransferasen und deren synthetisierte Produkte. In Klammern sind die jeweiligen Accessionnummer angegeben.
* bedeutet: bevorzugte Substrate neben einer Reihe weiterer akzeptierter Substrate

BAHD-Enzym	Nähere Beschreibung	Acyl-CoA (Donor)	Alkohol (Akzeptor)	Produkt	Spezies	Referenz
AtCHAT (AAN09797)	Acetyl CoA:(Z)-3-Hexenol Acetyltransferase	Acetyl-CoA	(Z)-3-Hexenol	(Z)-3-Hexenylacetat	<i>Arabidopsis thaliana</i>	D'Auria, 2002 + 2006
CbBEAT (AAC180062)	Acetyl-CoA:Benzyalkohol Acetyltransferase	Acetyl-CoA	Benzyalkohol	Benzylacetat	<i>Clarkia brewerii</i>	Dudareva, 1998
CbBEBT (AAN09796)	Benzoyl-CoA:Benzyalkohol Benzoyltransferase	Benzoyl-CoA	Benzyalkohol	Benzylbenzoat	<i>Clarkia brewerii</i>	D'Auria, 2002
CmAAT1 (CAA94432)	Alkoholacyltransferase	Acetyl-CoA	(Z)-3-Hexenol	(E)-2-Hexenylacetat	<i>Cucumis melo</i>	Yahyaoui, 2002
CmAAT2 (AAL77060)	Alkoholacyltransferase	-	-	-	<i>Cucumis melo</i>	Yahyaoui, 2002
CmAAT3 (AAW51125)	Alkoholacyltransferase	Acetyl-CoA *	Benzyalkohol *	Benzylacetat *	<i>Cucumis melo</i>	Sharkawy, 2005
CmAAT4 (AAW51126)	Alkoholacyltransferase	Acetyl-CoA *	Cinnamoylalkohol *	Cinnamoylacetat *	<i>Cucumis melo</i>	Sharkawy, 2005
MdAAT1 (AAU14879)	Alkoholacyltransferase	C3,6, und 8-CoA	Hexanol	Hexylester	<i>Malus pumila</i>	Souleyre, 2005
MdAAT2 (AAS79797)	Alkoholacyltransferase	-	-	-	<i>Malus pumila</i>	NCBI
NtBEBT (AAN09798)	Benzoyl-CoA:Benzyalkohol Benzoyltransferase	Benzoyl-CoA	Benzyalkohol	Benzylbenzoat	<i>Nicotian tabacum</i>	D'Auria, 2002
PhBEBT (AY611496)	Benzoyl-CoA:Benzyalkohol/ Phenethylalkohol Benzoyltransferase	Benzoyl-CoA	Benzyalkohol	Benzylbenzoat	<i>Petunia hybrida</i>	Boatright, 2004

1.3 Die Modellpflanze - *Gossypium hirsutum* (Linné)

1.3.1 Beschreibung der Baumwolle

Die Stellung der Baumwolle *Gossypium spec.* (Linné) in der Systematik des Pflanzenreiches ist der Abbildung 1.4 zu entnehmen. Die geographische Herkunft von Baumwolle ist nicht eindeutig zu benennen. Es wird jedoch angenommen, dass sie in Gebieten des südlichen Nord- bis Mittelamerikas, des östlichen Südamerikas, aber auch im westlichen Zentralafrika und verschiedenen Bereichen des asiatischen Raumes ihren Ursprung hat .

Der Name „Baumwolle“ leitet sich von den Büscheln langer Fasern in den Früchten der Pflanze ab, welche die Ausbreitung der Samen über größere Distanzen ermöglichen. Diese aus vielen Zellosoeschichten bestehenden Fasern, die zu dünnen Fäden gesponnen und zur Herstellung von Stoffen und Textilien verwendet werden, machen die Baumwolle zu einer wirtschaftlich bedeutenden Kulturpflanze. Baumwolle wird heute auf allen fünf Kontinenten angebaut, wobei China mit etwa 6000 t pro Jahr, gefolgt von den USA mit etwa 5000 t im Jahr 2004 die größten Baumwoll-produzierenden Länder sind. Neben vielen Wildarten sind jedoch nur wenige Kulturarten von Bedeutung. Den größten und wichtigsten Anteil an der Baumwollgewinnung hat die tetraploide ($2n=52$ Chromosomen) Art *Gossypium hirsutum* (<http://wikipedia.org/wiki/Baumwolle>).

Abteilung	-	Spermatophyta
Klasse	-	Rosopsida
Ordnung	-	Malvales
Familie	-	Malvaceae
Gattung	-	Gossypium
Art	-	Gossypium hirsutum

Abbildung 1.4: Systematische Stellung von *Gossypium hirsutum* im Pflanzenreich (aus Frohne und Jensen, 1998).

G. hirsutum ist eine staudenförmige einjährige Pflanze, die eine Größe von bis zu zwei Metern erreichen kann. Sie besitzt handförmig geteilte Blätter, in deren Blattachseln ein bis mehrere kurzstielige Blüten zu finden sind (Abb. 1.5). Die Blütenfarbe variiert von weiß über gelb bis hin zu rötlich-violett. In der Regel findet

Selbstbestäubung statt. In Ausnahmefällen, die Anwesenheit entsprechender Pollinatoren wie Bienen oder Hummeln vorausgesetzt, kann es auch zu einer entomogamen Bestäubung kommen (McGregor, 1976, zitiert aus www.aphis.usda.gov).



Abbildung 1.5: *Gossypium hirsutum*

1.3.2 Duftstoffe der Baumwolle

G. hirsutum emittiert insbesondere nach Induktion durch Herbivorie oder mechanische Verwundung ein von Terpenen und GLVs dominiertes, artspezifisches Bouquet, wobei die genaue Zusammensetzung sowie die Mengen der einzelnen Duftstoffe von der jeweiligen Behandlungsart bestimmt werden.

Unmittelbar nach einer Verletzung beispielsweise zu Beginn des Raupenfraßes oder durch mechanische Verwundung emittieren die Blätter von *G. hirsutum* die GLVs (*Z*)-3-Hexenal, (*Z*)-3-Hexenol und (*Z*)-3-Hexenylacetat, sowie konstitutive Mono- und Sesquiterpene (Röse *et al.*, 1998; Loughrin *et al.*, 1994). Zu den konstitutiven Terpenen, die in Baumwollpflanzen in subepidermalen Drüsen gespeichert werden (Elzen *et al.*, 1985), gehören die zyklischen Terpene α -Pinen, β -Pinen, Limonen, β -Caryophyllen, α -Humulen und das azyklische Monoterpen β -Myrcen (Röse und Tumlinson, 2004). Wenige Stunden, zuweilen bis zu einem Tag nach Beginn der Herbivorie emittieren Baumwollblätter zusätzliche (induzierte) azyklische Terpene wie β -Ocimen, Linalool, (*E*)- β -Farnesen, (*E,E*)- α -Farnesen, die beiden Homoterpene (*E*)-4,8-Dimethyl-1,3,7-Nonatrien (DMNT) und (*E,E*)-4,8,12-Trimethyl-1,3,7,11-Tridecatetraen (TMTT), isomerische Hexenyl- und Methyl-butyrat, Indol oder in signifikant erhöhten Mengen auch den GLV-Ester (*Z*)-3-Hexenylacetat (McCall *et al.*, 1994, Loughrin *et al.*, 1994; Pare und Tumlinson, 1997a; Turlings *et al.*, 1995). Die als spezifische Antwort auf Herbivorie abgegebenen Duftstoffe (β -Ocimen,

Linalool, (*E*)- β -Farnesen, (*E,E*)- α -Farnesen, DMNT, TMTT und (*Z*)-3-Hexenylacetat werden sowohl von beschädigten Blättern und Blütenknospen als auch von unbeschädigten Blättern einer befallenen Pflanze freigesetzt (systemische Abgabe Röse *et al.*, 1996; Pare und Tumlinson, 1998; Röse und Tumlinson, 2004). Darüberhinaus konnte Loughrin *et al.* (1994) zeigen, daß induzierte Terpene einem diurnalen Rhythmus mit Erhöhung am späten Nachmittag bis frühen Abend unterliegen.

1.3.3 Schädlinge von *G. hirsutum* am Beispiel von *Spodoptera littoralis* und *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*

Die von den Babyloniern als „weißes Gold“ bezeichnete Baumwolle steht heute für das landwirtschaftliche Produkt mit dem höchsten Einsatz an Düngemitteln und Insektiziden (<http://wikipedia.org/wiki/Baumwolle>). Einer der Schädlinge, der Ägyptische Baumwollwurm *Spodoptera littoralis* gehört, besonders in dessen Herkunftsland Ägypten, zu den ökonomisch bedeutsamsten Schädlingen von Baumwolle. Ein weiterer Schädling, der zu hohen Ertragsausfällen führt, ist der phytopathogene Pilz *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*.

Der Herbivore *Spodoptera littoralis* (Boisduval) gehört zur Familie der Noctuidae und ist über den gesamten Mittelmeerraum und in Afrika verbreitet. Larven dieses Nachtfalters sind äußerst polyphag und nutzen etwa 100 Pflanzenarten aus 44 Familien als Wirtspflanzen. In Mitteleuropa werden hauptsächlich Glashauskulturen befallen. Jedoch wird es durch zunehmende Resistenz gegenüber Pestiziden schwieriger diesen Schädling zu kontrollieren.

Die 0,6 mm langen Eier werden von den adulten Weibchen in großer Anzahl auf der Wirtspflanze abgelegt und mit abdominalen Haaren bedeckt. Nach dem Schlupf sind die jungen Larven etwa 2-3 mm lang, weiß gefärbt und leben gesellig. Später nehmen sie eine grau-grüne Färbung mit dorsaler Zeichnung an. Ältere Raupen sind bis zu 4,5 cm lang, zunehmend solitär und nachtaktiv. Sie können, wenn sie in großer Anzahl auftreten, die gesamte Pflanze entlauben und selbst die Sproßachse, Knospen und Blüten der Pflanze beschädigen. Nach der Verpuppung schlüpfen im Frühjahr die Motten mit einer Länge von etwa 2 cm und braun gefärbten Flügel mit heller Zeichnung (Müller, 2005)

Aufgrund des hohen Polyphagiegrads der *S.littoralis*-Larven und ihrer problemlosen Kultivierung auf künstlichen Nahrungsgemischen finden diese in wissenschaftlichen

Untersuchungen häufig Verwendung und sollen auch im Rahmen dieser Arbeit als Modellorganismus für Herbivorie dienen.

Der phytopathogene Pilz *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* ist einer von über 120 *formae speciales* (f. sp., Spezialform) der Art *Fusarium oxysporum* (Ascomyceten) und nutzt als bevorzugte Wirtspflanze Baumwolle. Der in der Natur oft mit Nematoden vergesellschaftete Pilz dringt über die Wurzel in das vaskuläre System der Pflanzen ein und befällt durch die Bildung von Mikrokonidien, die im Stamm der Pflanze mit dem Transpirationsstrom aufsteigen und zu einer braunen Färbung führen, die gesamte Pflanze. Im frühen Stadium des Befalls kommt es zur gelben Verfärbung der unteren Blätter, diese beginnen zu welken und anschließend abzufallen („Fusarium-Welke“). Diese „Welke“ setzt sich bis zu den oberen Blättern fort, bis nur noch der Stengel der Pflanze übrig bleibt, was deren Tod zur Folge hat. Infolge dessen kommt es zu hohen Ertragsausfällen (Watkins, 1981).

Aufgrund der hohen Infektanfälligkeit von Baumwollpflanzen und der schnellen Ausprägung der Welkesymptome bietet dieser Pilz eine Möglichkeit den Einfluß von pathogenen Pilzen auf die Duftstoffemission von Baumwollpflanzen zu untersuchen.

1.4 Zielsetzung

Früchte, Blüten und Blätter emittieren eine Vielzahl volatiler Ester. Einer dieser Ester, der von grünen Blättern aller Pflanzen, so auch der Baumwolle *G. hirsutum* infolge der Zerstörung des Gewebes freigesetzt wird, ist der „grün“ riechende GLV-Ester (Z)-3-Hexenylacetat. Die Synthese dieses und auch der anderen volatilen Ester wird durch die Enzyme der BAHD-Familie, die sogenannten Alkoholacyltransferasen katalysiert. D’Auria *et al.* (2002) identifizierte und charakterisierte eine (Z)-3-Hexenylacetat-bildende Alkoholacyltransferase in *A. thaliana*, AtCHAT. Da auch Baumwolle (Z)-3-Hexenylacetat emittiert (Loughrin *et al.*, 1994), sollte in *G. hirsutum* eine dem AtCHAT-ähnliche Alkoholacyltransferase oder zumindest eine andere BAHD-Alkoholacyltransferase existieren. Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der Identifizierung und biochemischen Charakterisierung einer Ester-bildenden Alkoholacyltransferase in *G. hirsutum*.

Da bekannt ist, daß Pflanzen insbesondere nach Verwundung hohe Mengen an (Z)-3-Hexenylacetat sowie volatilen Terpenen emittieren, sollte die Emission flüchtiger Ester und Terpene von Baumwollpflanzen nach Behandlung mit *S. littoralis*, mechanischer Verwundung und Pilzinfektion näher analysiert und quantifiziert werden und mit der unbehandelten Kontrollpflanzen verglichen werden. Besonderes Augenmerk lag dabei auf der Identifizierung und Analyse volatiler Ester. Da die Emission volatiler Ester vor allem aus Blüten bekannt ist und bisher in der Literatur keine Angaben über die Zusammensetzung der Duftstoffe von Baumwollblüten gefunden wurden, sollte darüberhinaus das Duftbouquet von Blüten der Art *G. hirsutum* analysiert werden. Neben der Identifizierung und Charakterisierung der Alkoholacyltransferase, sollte das Auftreten volatiler Ester in den Duftspektren unterschiedlich behandelter Baumwollpflanzen parallel mit der Expression der Alkoholacyltransferase auf Ebene der Transkription untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Reagenzien

Alle verwendeten Laborchemikalien wurden, wenn im Text nicht anders erwähnt, von den Firmen Sigma Chemie (Deisenhofen) und Carl Roth GmbH (Karlsruhe) bezogen und waren von analytischem Reinheitsgrad. Auf Bezugsquellen für spezielle Reagenzien oder Kits wird an der entsprechenden Stelle im Text verwiesen. Wässrige Lösungen wurden, wenn nicht anders erwähnt, mit filtergereinigtem Wasser (Millipore, Grade III) angesetzt.

2.2 Geräteliste

Die bei der Durchführung der hier beschriebenen Versuche verwendeten Geräte sind in Tabelle 2.1 aufgelistet.

Tabelle 2.1: Liste der verwendeten Geräte

Gerät / Hersteller	Verwendungszweck
ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer / Applied Biosystems (Foster City, USA)	Kapillarsequenzierer
Avanti™ J-25 Centrifuge, Avanti™ J-20 XP Centrifuge / Beckman Coulter (Fullerton, USA)	Ultrazentrifugen
AVCS-PLC5-DSU16 / Analytical Research System (Gainesville, USA)	Automatisches Duftsammelsystem
Agilent 2100 Bioanalytiker / Agilent (Palo Alto, USA)	Analyse von RNA und cDNA
Biofuge pico / Heraeus (Hanau)	Standardtischzentrifuge
BP 310S und BP 211 D / Sartorius (Göttingen)	Elektronische Präzisionswaage
Brutschrank B6120 / Heraeus (Hanau)	Anzucht von Bakterienkulturen
CERTOMAT® BS-1 / B. Braun Biotech-Sartorius	Inkubationsschüttler
FPLC® System mit Frac-100, Uvicord VW 2251, 2 x Pump P-500, Controller LCC-501 Plus / Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden)	FPLC-Apparatur für die His-tag-Aufreinigung von Proteinen
Function Line T6 / Heraeus (Hanau)	Hitzesterilisator/Trockenschrank
GeneGenius Bio Imaging System / Merck (Dortmund)	Geldokumentationssystem

Gerät / Hersteller	Verwendungszweck
HSP 12 / Heraeus (Hanau)	Sterilbank
i-Mupid / Eurogentech (Seraing, Belgien)	Elektrophoresekammer
innova™ 4230 / New Brunswick Scientific (Edison, USA)	Gekühlter Inkubationsschüttler
Isotemp 215 / Fisher Scientific (Schwerte)	Wasserbad
LabStyle 602 / Mettler Toledo (Gießen)	Laborwaage
Mini-Protean®3 Cell mit Power Pac 200 / Bio-Rad (Hercules, USA)	Gelelektrophoresesystem für SDS-Page
MultiCal® pH 526 / WTW (Weilheim)	pH-Messgerät
Modell 6890, GC (Hewlett-Packard, Böblingen)	Gaschromatograph
Mx3000P™ / Stratagene (La Jolla, USA)	qRT-PCR-Maschine
Pipetman® / Gilson® (Villiers-le-Bel, Frankreich)	Pipetten
Primus 96 plus / MWG-Biotech (Ebersbach)	PCR-Maschine
Sonopuls HD 2070 / Bandelin (Berlin)	Ultraschall-Homogenisator
SPECTRONIC® 20 GENESYS™ / Spectronic Instruments (Rochester, USA)	UV-Vis-Spektralphotometer (Bakterienkulturen)
Thermomixer comfort / Eppendorf (Hamburg)	Thermomixer
T-Personal / Biometra® (Göttingen)	PCR-Maschine
Tri-Carb 2300 TR (Canberra-Packard, Dreieich)	Scintillationszähler
Typ 5973, MS (Hewlett-Packard, Böblingen)	Massenspektrometer
Ultrospec 2100 pro / Amersham Biosciences (Uppsala, Schweden)	UV-Vis-Spektralphotometer (Plasmid-DNA und RNA)
UV-2501 PC / Shimadzu (Duisburg)	UV-Vis-Spektralphotometer (Proteinmenge)
Varioklav® / H+P Labortechnik (Oberschleißheim)	Dampfsterilisator
VB1014/S Klimakammer / Vötsch (Balingen-Frommern)	Pflanzen-Klimakammer
Vortex-Genie® 2/ Scientific Industries (Bohemia, USA)	Vortexer
York International Klimakammer / York Refrigeration (Orlando, USA)	Anzuchtammer von <i>G. hirsutum</i>
5415 R Zentrifuge / Eppendorf (Hamburg)	Tischkühlzentrifuge

2.3 Anzucht und Kultivierung der verwendeten Organismen

2.3.1 Anzucht des Pflanzenmaterials – *G. hirsutum*

Für die Versuche der vorliegenden Arbeit wurden Baumwollpflanzen (*G. hirsutum* ST474, Bayer Crop Science AG, Monheim am Rhein) verwendet. Diese wurden in einer York-Klimakammer unter folgenden Bedingungen angezogen: 65% Luftfeuchtigkeit, 15:9 h Hell-Dunkel-Rhythmus, Lichtphase 28°C, Dunkelphase 23°C. Die Pflanzen wuchsen in 12,5 cm hohen Töpfen mit einem Durchmesser von 16,5 cm auf einem Nährboden-Gemisch aus Klasmann-Ton-Substrat (Klasmann, Gross-Hesepe) und Torf im Verhältnis von 4:1 und zusätzlichen 2 g Osmocote (Scotts, Nordhorn) pro Liter Gemisch als Dünger.

Für die Versuche zur Analyse der Duftstoffe wurden nur Pflanzen gewählt, die mindestens sechs voll entwickelte Blätter (etwa drei Wochen alt) und keine Anzeichen von Stress, mechanischer Beschädigung oder Befall durch Pilze und andere Schädlinge aufwiesen. Vorversuche zur Reinfektion mit FOV wurden zusätzlich mit zwei und vier Wochen alten Pflanzen durchgeführt. Pflanzen, zur Gewinnung von Blüten, wuchsen mindestens sechs Wochen unter den oben genannten Bedingungen.

2.3.2 Anzucht des Herbivoren – *S. littoralis*

Die Eier des Ägyptischen Baumwollwurms *S. littoralis* wurden von der Firma Syngenta Crop Protection Münchwilen AG (Basel, Schweiz) bezogen und auf einer speziellen Diätahrung auf Bohnenbasis (Inga Mewis, persönliche Mitteilung) gehalten. Die Haltung und Aufzucht der Raupen erfolgte durch Stefan Opitz bei 19 bis 21°C in Plastikbehältern mit luftdurchlässigen Deckeln unter Tageslichteinfluss. Nach 10 bis 15 Tagen erreichten die Raupen das dritte Larvenstadium. Um eine optimale Frassaktivität der Herbivoren bereits zu Beginn des Experimentes zu gewährleisten, wurde die benötigte Anzahl der Raupen des dritten Stadiums für 24 h einzeln und ohne Nahrung gehalten und anschließend für die Versuche benutzt.

2.3.2 Anzucht und Sporenisolation des Pilzes – *Fusarium. oxysporum f. sp. vasinfectum*

Der Stamm DSM 62373 - *Fusarium oxysporum f. sp. vasinfectum* (FOV) wurde von der Deutschen Stammsammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig) bezogen und auf sterilen Agarplatten mit Glucose-armen Erbsenmedium kultiviert (Kerstin Voigt, persönliche Mitteilung). Stammkulturen wurden durch Abschwemmen der Agarplatte mit 0,8 M Natriumchlorid gewonnen und bei -20°C aufbewahrt.

Für die Isolation der FOV-Sporen wurden 14 Tage alte Kulturplatten mit 5 ml Sporenpuffer abgeschwemmt und ein Aliquot für die Auszählung der Sporen abgenommen. Die Bestimmung der Sporenanzahl erfolgte mikroskopisch mit einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer (Mariantal) nach folgender Formel:

$$T / n \times \text{Kammer-Faktor} \times \text{Verdünnung} = \text{Sporenanzahl/ml}$$

dabei galt: T / n war die durchschnittliche Sporenanzahl/Kleinquadrat, es wurden 10 Kleinquadrate ausgezählt, der Kammer-Faktor von $0,8 \times 10^5$ ergab sich aus den Volumen der Zählkammer und die Verdünnung betrug in der Regel 1:100.

Alle Arbeitsschritte wurden steril durchgeführt und verwendete Medien und Puffer vor Gebrauch autoklaviert.

Erbsenmedium: 500 ml Erbsensud, 5 g Glucose, 15 g Agar/1l *a. dest*

Erbsensud: 150 g Tiefkühlerbsen (Spar-Supermarkt, Jena) mit 500 ml *a. dest* 15 min köcheln, Überstand abseihen und auf 500 ml auffüllen

Sporenpuffer: 0,03% (v/v) Triton X-100/1 l *a. dest*

2.3.4 Anzucht und Kultivierung der Bakterien

2.3.4.1 *Escherichia coli* -Stämme

Tabelle 2.2: Beschreibung der in dieser Arbeit verwendeten *E.coli*-Stämme.

Bezeichnung/Herkunft	Genotyp	Verwendung
TOP 10 One Shot chemisch kompetente <i>E.coli</i> Zellen /Invitrogen (Karlsruhe)	$F^- mcrA \Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\Phi 80 lacZ \Delta M15 \Delta lacX74 deoR$ $recA1 araD139 \Delta (ara-leu)7697$ $galU galK rpsL(Str^R) endA1 nupG$	Subklonierungen in TA-Vektor und Sequenzierung
BL21(DE3) <i>E.coli</i> Zellen /Novagen (Madison, USA)	$F^- ompT gal(dcm) (lon) hsdS_B (r_B^-$ $m_B^-; E.coli B strain) DE3$	Proteinüberexpression (für Vektor pET 28a)

2.3.4.2 Antibiotika

Tabelle 2.3: Konzentrationen der verwendeten Antibiotika

Antibiotikum	Stammlösung (mg/ml Lösungsmittel)	Endkonzentration (μ g/ml Medium)
Ampicillin	100	100
Kanamycin	50	50
Chloramphenicol	34	34

Die Stammlösungen für Ampicillin und Kanamycin wurden mit *a. dest* hergestellt. Als Lösungsmittel für Chloramphenicol diente 100%iger Ethanol.

2.3.4.3 Medien für Bakterienkulturen

Alle in dieser Arbeit verwendeten Medien wurden vor dem Gebrauch autoklaviert.

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

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

SOC- Medium: 2% (g/v) Trypton, 0,5% (g/v) Hefeextrakt (Duchefa, Haarlem, Niederlande, 0,5% (g/v) Glucose, 10 mM Natriumchlorid, 2,55 mM Kaliumchlorid, 21,6 mM Magnesiumchlorid, 20 mM Magnesiumsulfat

2.3.4.4 Kultivierung von Bakterien und Stammhaltung

Die Kultivierung von *E.coli* erfolgte, soweit nicht anders beschrieben, unter folgenden Bedingungen bei 37°C:

Flüssigkultur: LB-Flüssigmedium, im Inkubationsschüttler bei 220 rpm

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

Zur Stammhaltung wurden 750 µl Flüssigkultur mit 250 µl Glycerol versetzt und bei -20°C eingefroren.

Für eine Übernachtskultur wurden 5 ml LB-Medium mit dem entsprechendem Antibiotikum in ein steriles Glasröhrchen gefüllt. Das Animpfen erfolgte entweder durch Übertragen einer Kolonie mittels eines sterilen Zahnstochers oder durch Zugabe von etwa 10 µl einer Glycerolkultur zu dem Glasröhrchen, welches dann über Nacht im Schüttler inkubiert wurde.

2.4 Sammlung und Analyse von Duftstoffen

2.4.1 Duftsammlung mit dem automatischen Duftstoffsammelsystem

Die Sammlung von Duftstoffen erfolgte mit dem automatischen Duftstoffsammelsystem des Typs AVCS-PLC5-DSU16 (Analytical Research System, ARS) nach Heath und Manukian (1994), welches an ein Luftumwälzsystem des Typs VCS-HADS4-DFM (ARS) gekoppelt war. Weiterhin gehörten zwei 50 cm hohe zylindrische Glasbehälter mit einem Durchmesser von 20 cm zu diesem System. Die Blätter und die Sproßachse der Baumwollpflanze befanden sich hierbei in jeweils einem dieser Zylinder, welcher mit zwei verschiebbaren Teflon-Platten nach unten zum Topf verschlossen wurde. Die nahezu vollständige Isolierung wurde dadurch gewährleistet, dass der restliche offen stehende Bereich um den Stängel der Pflanze herum manuell mit Watte abgedichtet wurde. Befeuchtete und über Aktivkohlefilter gereinigte Luft strömte mit einer Flussrate von 4 l/min über Teflonschläuche von oben in den Glaszylinder und wurde am unteren Ende mit einer Flussrate von 2 l/min mittels einer Vakuumpumpe über die Duftstofffilter abgesaugt. Der geringe Überdruck von 2 l/min im Inneren des Glasbehälters verhinderte das Einströmen eventuell kontaminierter Aussenluft.

Die Duftstofffilter bestanden aus 150 mm langen Glasröhrchen mit einem Durchmesser von 5 mm und waren auf einer Länge von 10 mm mit 50 mg SuperQ

(Alltech, Columbia, USA) gefüllt, welches die von der Pflanze freigesetzten Duftstoffe adsorbiert. Nach Ende der Duftmessung wurden durch die Zugabe von 170 µl Dichlormethan als Lösungsmittel die adsorbierten Duftstoffe in Lösung gebracht. Anschließend wurden 30 µl n-Nonylacetat (20 ng/µl) als interner Standard zugefügt und die Proben bis zur GC-MS-Analyse (2.4.3) bei -20 °C gelagert.

Eine computergesteuerte Einheit ermöglichte sowohl eine automatische Steuerung der Dauer der Duftsammlung als auch das Umschalten zwischen den einzelnen Duftstofffiltern.

Das komplette Duftsammelsystem befand sich in einer Vötsch-Klimakammer, die mit den gleichen Bedingungen, wie unter Abschnitt 2.3 beschrieben, verwendet wurde.

2.4.2 Duftsammlung mit der „closed-loop stripping“-Methode

Die Duftmessung von Baumwollblüten erfolgte mit der “closed-loop stripping”-Methode (Donath und Boland, 1995), einem geschlossenen System mit hoher Sensitivität. Hierbei befanden sich jeweils zwei junge, vollständig geöffnete, am oberen Blütenstiel frisch abgeschnittene Blüten in einem wassergefüllten Becherglas, welches sich wiederum in einem Exsikkator befand. In einem kontinuierlichen Kreislauf wurde Luft abgesaugt, über einen Aktivkohlefilter (1,5 mg Charcol-Filter, CLSA, Le Ruisseau de Montbrun, Daumazan sur Arize, Frankreich) geleitet und wieder zurückgeführt. Nach 24-stündiger Messung wurden die Aktivkohlefilter entfernt, die gesammelten Duftstoffe mit 50 µl Dichlormethan eluiert und das Eluat mittels GC-MS (2.4.3) analysiert. Der Versuch wurde viermal wiederholt.

2.4.3 Analyse der Duftstoffe durch gekoppelte Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS)

Die gaschromatographische Trennung und Analyse der Duftstoffgemische wurde mit dem Gaschromatographen Modell 6890, der mit einem Autosampler des Types HP 7683 ausgestattet war, durchgeführt. Die Analyse erfolgte durch ein gekoppeltes Massenspektrometer vom Typ 5973. Die Injektortemperatur betrug 220°C, das Injektionsvolumen 1 µl („splittless“). Die Trennung der Komponenten erfolgte auf einer Säule des Typs DB-5MS (J&W Scientific, Folsom, USA), welche eine Länge von 30 Meter und einen Durchmesser von 0,25 mm besaß. Auf der

Säuleninnenseite befand sich ein 0,25 µm dicker Film mit 5% Phenylsiloxane und 95% Dimethylsiloxane. Als Trägergas wurde Helium mit einer gleichmäßigen Fließgeschwindigkeit von durchschnittlich 36 cm/sec eingesetzt. Zu Beginn der Chromatographie hatte der Ofen eine Temperatur von 40°C. Diese Temperatur wurde für 3 min gehalten, gefolgt von einer Heizrate von 5°C/min, bis zu einer Endtemperatur von 240°C, die ebenfalls 3 min gehalten wurde. Zur Erfassung der Analyten war das Säulenende an das Massenspektrometer gekoppelt, mit dessen Hilfe qualitative Aussagen über die in der Probe enthaltenen Substanzen möglich wurden. Bei dem hier verwendeten Massenspektrometer handelte es sich um ein Quadrupol-Gerät, das mit folgenden Einstellungen betrieben wurde: Transferline-Temperatur 230°C, Quelle 230°C, Quadrupol-Temperatur 150°C, Ionisierungspotential 70 eV und einem Scannbereich von 50-400 Atommasseeinheiten.

Zur Identifizierung wurden die Massenspektren der einzelnen, voneinander getrennten Substanzen mit verschiedenen Massenspektrenbibliotheken verglichen. Dazu stand das Programm „Data Analysis“ der GC-MS Firmensoftware (Enhanced MSD-ChemStation-Software, Hewlett-Packard, Böblingen) verbunden mit den Bibliotheken „Nist98“ und „Wiley275“ (Hewlett-Packard, Böblingen) zur Verfügung. Die eindeutige Identifizierung erfolgte durch den Vergleich der Massenspektren und Retentionszeiten mit denen von kommerziell verfügbaren Standards (Tab. 2.4).

2.4.4 Quantifizierung flüchtiger Verbindungen über GC-MS mit der „Single Ion Method“ (SIM)

Die SIM (Einzelionenfragmentnachweis-Methode) beruht auf der Quantifizierung einzelner repräsentativer Fragmentionen der zu trennenden Verbindung. Hierzu wurden zunächst Verdünnungsreihen mit sechs bekannten Konzentrationen der konzentrierten Standards von (*Z*)-3-Hexenylacetat und Benzylacetat mit Dichlormethan hergestellt und mittels GC-MS analysiert. Jede Verdünnungsstufe wurde dreimal analysiert und die ausgewählten Ionenfragmente selektiv in der SCAN-Methode aufgezeichnet. Für jede Verdünnung und Verbindung wurden die Retentionszeiten und gemittelten Peakflächen des jeweiligen zu quantifizierenden „Target“-Ionenfragments, sowie eines weiteren „Qualifier“-Ionenfragments (Tab. 2.4, siehe Anhang) in die Quantifizierungsmethode aufgenommen und eine Eichgerade für jede Verbindung erstellt. Anhand dieser Eichgerade konnten dann die

entsprechenden Peakflächen der zuzubestimmenden Verbindung des jeweiligen Chromatogramms quantifiziert werden.

Tabelle 2.4: Kommerziell erhältliche Standards von flüchtigen Estern. In der Tabelle sind die verwendeten Standards, für die eindeutige Identifizierung von Duftstoffen, sowie für die Erstellung der SIM-Quantifizierungsmethode aufgelistet. T/Q: „Target“-/„Qualifier“-Ion.

Verbindung	Reinheit in %	Ionenfragmente T/Q	Herkunft des Standards
(Z)-3-Hexenylacetat	nicht bekannt	67/82	Aldrich, Steinheim
Benzylacetat	> 99	108/91	Aldrich, Steinheim
Benzylbenzoat	> 99	-	Sigma, St.Louis, USA

2.5 Versuchsabläufe zur Behandlung von Pflanzen

Um den Stress der Versuchspflanzen während der Duftmessungen einzugrenzen, wurden diese bereits einen Tag vor Versuchsbeginn aus der Anzucht-Klimakammer in das Duftsammelsystem überführt und akklimatisiert. Dabei enthielt jeweils ein Glaszylinder die behandelte Pflanze, der andere die Kontrollpflanze. Alle Experimente begannen um acht Uhr und folgten dem entsprechendem Versuchsablauf, um eventuelle, durch diurnale Rhythmen hervorgerufene Schwankungen in der Duftemission zu minimieren. Die unterschiedlichen Versuche, sowie deren Wiederholungen wurden mit denselben Licht- und Temperaturbedingungen (2.3) durchgeführt. Nach Abschluß der Messungen wurden die emittierten Duftstoffe, wie unter 2.4.1 beschrieben von den SuperQ-Filtern eluiert, über GC-MS analysiert und teilweise quantifiziert (2.4.4). Die statistische Auswertung der Meßdaten erfolgte mit der Software „SPSS 13.0“ (SPSS Inc., Chicago, USA).

Nach den Experimenten wurde das Pflanzenmaterial geerntet, das Blattmaterial der mechanisch verwundeten Pflanzen zusätzlich gewogen, sofort in flüssigen Stickstoff überführt und bis zur Isolierung von Gesamt-RNA bei -80°C gelagert.

Insgesamt wurden drei verschiedene Experimente mit jeweils unterschiedlich behandelten Baumwollpflanzen durchgeführt.

2.5.1 Duftanalyse von mechanisch verwundeten Pflanzen

Für den ersten Versuch, wurden die jüngsten vier Blätter, einer im Duftsammelsystem befindlichen Pflanze, mit einem Zackenrädchen (Abb. 2.1, linkes Bild) künstlich verwundet. Jedes der vier Blätter wurde dabei links und rechts der Mittelrippe mit zwei von der Blattbasis bis zur Spitze führenden Verwundungslinien (Abb. 2.1, rechtes Bild) versehen. Die Sammlung der emittierten Duftstoffe erfolgte in Zeitintervallen von 4 h über einen Zeitraum von insgesamt 36 h. Die Kontrollpflanzen blieben unverwundet. Der Versuch wurde dreimal wiederholt.



Abbildung 2.1: Mechanische Verwundung von Baumwollblättern. Das linke Bild zeigt das für die Verwundung verwendete Zackenrädchen. Das rechte Bild zeigt die durch das Zackenrädchen verursachten Verwundungslinien des Baumwollblattes.

2.5.2 Duftanalyse von Herbivor-induzierten Pflanzen

Für den zweiten Versuch, ein Frassexperiment mit Raupen des Herbivoren *S. littoralis* wurden zehn ausgehungerte Raupen des 3. Larvenstadiums (2.3.2), direkt auf die Blätter einer im Duftsammelsystem befindlichen Pflanze gesetzt (Abb. 2.2). Dieses Experiment wurde in Zeitintervallen von 4 h über einen Zeitraum von 24 h durchgeführt und dreimal wiederholt. Die Kontrollpflanzen blieben unbehandelt.



Abbildung 2.2: Herbivorenfrass an Baumwollblättern. Das Bild zeigt die Beschädigung von Baumwollblättern durch Frass des Herbivoren *S. littoralis*.

2.5.3 Duftanalyse von FOV-infizierten Pflanzen

Für diesen Versuch wurde eine Pflanze mit dem baumwollpathogenen Pilz *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (FOV; 2.3.3), durch Einspritzen der Pilzsporen (Titer: $7,5 \times 10^7$ FOV-Sporen/100 μ l Sporenpuffer) an fünf Stellen unterhalb der Keimblätter in den Stamm der Pflanze, infiziert. In die Kontrollpflanze wurde auf die gleiche Art und Weise 100 μ l Sporenpuffer eingespritzt. Das Experiment wurde zweimal wiederholt, wobei die Sammlung der emittierten Duftstoffe jeweils getrennt für die Licht- (6.00 bis 21.00 Uhr) und Dunkelperiode (21.00 bis 6.00 Uhr) d.h. in einem Tag/Nacht-Intervall über einen Zeitraum von 11 Tagen erfolgte.

Sporenpuffer:: 0,03% (v/v) Triton X-100/1 l a. dest

2.6 Isolierung von Nukleinsäuren

2.6.1 Isolierung von DNA

2.6.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli*

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli* erfolgte mit den Plasmidpräparationskits der Firma Invitex (Berlin), der Firma Promega (Madison, USA) oder der Firma Macherey & Nagel (Düren) gemäß den Herstellerprotokollen.

Für weiterführende Analysen, für die Plasmid-DNA in größeren Mengen benötigt wurde, wurde der „Invisorb® Plasmid Midi Kit“ (Invitex, Berlin) verwendet. Die Durchführung erfolgte ebenfalls gemäß dem Herstellerprotokoll. Im Anschluß daran wurde die Konzentration der Plasmid-DNA photometrisch bei $\lambda=320$ nm bestimmt.

2.6.1.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus TAE-Agarosegelen

Nach Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels TAE-Agarosegelelektrophorese wurden diese unter UV-Licht aus dem TAE-Agarosegel geschnitten. Die Isolierung erfolgte mit dem „QIA quick® PCR Purification Kit“ (Qiagen, Hilden) gemäß den Herstellerangaben.

2.6.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus *G. hirsutum*

2.6.2.1 Lithiumchlorid (LiCl)-Methode

Diese Methode erfolgte nach dem Protokoll für die Isolation von Gesamt-RNA aus *A. thaliana* (John D'Auria, persönliche Mitteilung).

Alle Arbeitsschritte erfolgten, wenn nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur.

Dabei wurde 1 g des geernteten Blattmaterials in flüssigem Stickstoff aufgemörsert und in ein 50 ml Falcon-Gefäß, welches 10 ml Extraktionspuffer, 0,9 ml 2 M Natriumacetat (pH 4,0), 10 ml Phenol und 2 ml Chloroform enthielt, überführt und kurz geschüttelt.

Um einen optimalen Zellaufschluß zu gewährleisten, wurde das Gemisch für 10 min bei 250 rpm geschüttelt. Durch einen anschließenden Zentrifugationsschritt (20 min bei 10000 x g) wurden die Pflanzenzellreste entfernt. Die so gewonnene, obere wässrige Phase wurde zunächst mit dem gleichen Volumen eines Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol-Gemisches (25:24:1) versetzt, geschüttelt und zentrifugiert (20 min bei 10000 x g) und anschließend mit dem gleichen Volumen Chloroform versetzt, geschüttelt und erneut unter den oben genannten Bedingungen zentrifugiert. Diese Lösung wurde mit dem gleichen Volumen einer 4 M Lithiumchlorid-Lösung versetzt, geschüttelt und über Nacht bei -20°C inkubiert. Die gefällte RNA wurde am nächsten Tag durch einen weiteren Zentrifugationsschritt (20 min bei 14000 x g, 4°C) angereichert. Anschließend wurde das Zentrifugat (Pellet) mit 200 µl eiskaltem 80% (v/v) Ethanol gewaschen, in ein Eppendorf-Gefäß überführt und erneut zentrifugiert (10 min bei 14000 x g, 4°C). Danach wurde das gereinigte Pellet in 200 µl DEPC-H₂O aufgelöst und der unlösliche Pelletrest durch einen weiteren Zentrifugationsschritt bei maximaler Geschwindigkeit abgetrennt. Der gewonnene Überstand wurde mit 1/10 Volumen von 3 M Natriumacetat (pH 5,0) und 3 Volumen von eiskaltem 100% Ethanol versetzt, geschüttelt und für mindestens 1 h bei -20°C inkubiert. Die gefällte RNA wurde durch Zentrifugieren (15 min bei 14000 x g, 4°C) angereichert, das Zentrifugat anschließend mit eiskaltem 80% (v/v) Ethanol gewaschen und erneut für 10 min zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde nach Dekantieren des Alkohols bei Raumtemperatur im Abzug getrocknet. Die Lösung der reinen RNA erfolgte mit 80 µl DEPC-H₂O.

Extraktionspuffer: 1% (g/v) SDS, 10 µl β-Mercaptoethanol/10 ml TLE-Puffer

TLE-Puffer: 0,2 M Tris, 0,1 M LiCl und 5 mM EDTA/1 l DEPC-H₂O; pH 8,2

DEPC- H₂O: 0,1% (v/v) DEPC/1 l a. dest

2.6.2.2 TRIZOL[®]-Methode

Bei der TRIZOL[®]-Methode (Chomczynski und Sacchi, 1987) wurde 1 g von in flüssigem Stickstoff zermörserter Pflanzenmaterial in ein Falcon-Gefäß mit 10 ml TRIZOL[®] Reagenz (Phenol-Guanidin-Wasser-Emulgatorgemisch, Invitrogen, Karlsruhe) aufgenommen und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 2 ml Chloroform zugegeben, geschüttelt, 2 min bei Raumtemperatur inkubiert und zur Phasentrennung zentrifugiert (15 min bei 12000 x g, 4°C).

Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Falcon-Gefäß mit 2,5 ml Isopropanol und 2,5 ml Hochsalzpuffer für die RNA-Fällung überführt, geschüttelt, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zentrifugiert (10 min bei 12000 x g, 4°C). Das Zentrifugat wurde mit 1 ml eiskalten 80% (v/v) Ethanol gewaschen, zentrifugiert (5 min bei 7500 x g, 4°C), der Überstand dekantiert und das Pellet bei Raumtemperatur im Abzug getrocknet. Abschließend wurde das Pellet in 200 µl DEPC-H₂O aufgenommen.

Hochsalzpuffer: 1,2 M Natriumchlorid, 0,8 M Natriumcitrat/DEPC-H₂O

DEPC-H₂O: 0,1% (v/v) DEPC/1 l a. dest

2.6.2.3 Methode nach Wu *et al.*

Diese Methode beruht auf der Arbeit von Wu *et al.* (2002) und ist eine Kombination aus einem heißem borathaltigen Extraktionspuffer (Wan und Wilkins, 1994) mit „RNeasy“-Säulen der Firma Qiagen (RNeasy[®] Plant Mini Kit, Hilden) und einer zusätzlichen Proteinase K-Behandlung während der Extraktion.

200 mg Blattmaterial wurde mit 1 ml 80°C heißem Extraktionspuffer gemörsert. Anschließend wurde 60 µl Proteinase K und weitere 2 ml Extraktionspuffer zugegeben und weiter gemörsert. Dieser Gewebe-Puffer-Mix wurde dann auf zwei „Qiagen shredder spin“-Säulen aufgeteilt und diese zentrifugiert (1 min bei 13000 rpm). Der Durchfluß wurde in sterilen 10 ml Falcon-Gefäßen gesammelt und mit 0,5 Volumen 100% Ethanol versetzt, geschüttelt und auf zwei „RNeasy mini“-Säulen aufgeteilt. Durch 1 min Zentrifugation wurde die extrahierte RNA auf der Säulenmembran gebunden. Die folgenden Wasch-, Trocknungs- und Elutionsschritte erfolgten gemäß den Herstellerangaben der Firma Qiagen. Das Pellet wurde in 80 µl DEPC-H₂O aufgenommen.

Extraktionspuffer: 200 mM Natriumboratdecahydrat (pH 9,0), 30 mM EGTA, 1% (g/v) SDS, 1% (g/v) Natriumdeoxycholat, 2% (v/v) PVP, 0,5% (v/v) Nonidet-40 (NP- 40) und 10 mM DTT/1 l DEPC-H₂O

Proteinase K: 25 mg/ml *a. dest.*
DEPC-H₂O: 0,1% (v/v) DEPC/1 l *a. dest*

2.6.2.4 RNA-Isolation mit kommerziellen Kits

Das Pflanzenmaterial wurde in flüssigem Stickstoff gemörsert und 100 mg zur RNA-Extraktion gemäß dem Herstellerprotokoll verwendet. Es wurden die RNA-Isolations-Kits der Firmen Qiagen (Hilden) und Invitex (Berlin) verwendet. Die Lösung der reinen RNA erfolgte mit 40 µl DEPC-H₂O.

DEPC-H₂O: 0,1% (v/v) DEPC/1 l *a. dest*

2.7 Synthese von cDNA

Die Herstellung von cDNA für PCR und qRT-PCR erfolgte mit dem Enzym „Superscript™ III RNase H Reverse Transcriptase“ (Invitrogen, Karlsruhe). Dabei wurde das Herstellerprotokoll folgendermaßen geändert: der einstündige Inkubationsschritt bei 50°C wurde auf 2 h erhöht und die Probe während dieser Zeit bei 500 rpm geschüttelt (Michael Philipps, persönliche Mitteilung). Als Vorlage für die cDNA dienten 5 µg Gesamt-RNA, die zuvor kapillarelektrophoretisch mit dem Bioanalyzer (2.12.3) auf ihre Reinheit untersucht, und anschließend durch eine DNase-Behandlung („RNase-Free DNase Set“, Qiagen, Hilden) von Resten genomischer DNA befreit wurde.

2.8 Polymerasekettenreaktion (PCR)

2.8.1 Oligonukleotide

Die Entwicklung von Oligonukleotiden (Primern) für die „Standard-PCR“ erfolgte mit dem Programm „Primer 3“ (Whitehead Institute for Biomedical Research, USA), Oligonukleotide für die qRT-PCR wurden mit der „BeaconDesigner 4.0“ Software (Premier Biosoft, USA) erstellt. Standardoligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) und die Oligonukleotide für die qRT-PCR von der Firma Invitrogen (Karlsruhe) synthetisiert, wobei letztere eine spezielle Aufreinigung mittels HPLC durchliefen und folgende Kriterien erfüllen mussten: Annealingtemperatur von 60°C, 18-20 bp lang, die zu amplifizierende Sequenz sollte etwa 100 bp lang sein.

In Tabelle 2.5 sind die Sequenzen und der Verwendungszweck aller in dieser Arbeit benutzen Oligonukleotide aufgeführt. Die Orientierung wird mit „fwd“ (forward, vom 5' → 3'-Ende) und „rev“ (revers, vom 3' → 5'-Ende) angegeben.

Tabelle 2.5: Verwendete Oligonukleotide

Name	5'- Sequenz -3'	Verwendung
M13 fwd	GTA AAA CGA CGG CCA G	Kolonie-PCR und Sequenzierung
M13 rev	CAG GAA ACA GCT ATG AC	Kolonie-PCR und Sequenzierung
UPMshort	CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C	RACE-PCR
UPMlong	CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG CAA GCA GTG GTA TCA ACG CAG AGT	RACE-PCR
Hex 4 rev	GGT AAG ATC GAA TAA CCG TGA AAT	RACE-PCR, Kolonie-PCR und Sequenzierung
BEbT1fwd	ACT TTC CTC CAC TTC CCT AGT G	RACE-PCR, Kolonie-PCR und Sequenzierung
BEbT3 fwd	GCC CCG TAA TAC TTA TTC AGG TAA	RACE-PCR, Kolonie-PCR und Sequenzierung
BEbT4 fwd	AAT TGC CCC GTA ATA CTT ATT CAG GTA	RACE-PCR, Kolonie-PCR und Sequenzierung
BEbTstart4 fwd	ATG GCG CCT CCA CTT CCC TAG TGC TCA AGG	Kolonie-PCR und Sequenzierung
BEbT_stop rev	ACA AGG AAG ATG AAA TGA AAC CGG GTT TAC GTT	Kolonie-PCR und Sequenzierung
Ndel-Start fwd	ACA TAT GGC GCC TCC ACT TAC CCT AGT	PCR
BamHI-Stop rev	TGG ATC CTC ACA AGG AAG ATG AAA TGA ACC CG	PCR
APT1 qRT fwd	ACA ACA ACA AGA CCC TCG TAT C	qRT-PCR
APT1 qRT rev	TTT GCC CTT TGT ACC TTT CAA C	qRT-PCR
RP2LS qRT fwd	CCT CCT TGA TGC TGC TGT TTA TGC	qRT-PCR
RP2LS qRT rev	GTC ATG CCA AAT TCC AGA CCT TCC	qRT-PCR
CHAT qRT fwd	TTC AAC CAC CAT TCC CAT GCT TG	qRT-PCR
CHAT qRT rev	GGT TCA GGC GAA GGG CGA AG	qRT-PCR

2.8.2 Vervielfältigung von DNA-Fragmenten aus cDNA

Die Vervielfältigung von spezifischen DNA-Fragmenten aus cDNA erfolgte durch die Polymerasekettenreaktion (PCR). Prinzipiell wurde als Polymerase der „Advantage R 2 Polymerase Mix“ (BD Biosciences Clontech, Mountain View, USA) verwendet. Für die Amplifizierung der vollständigen Gensequenz von GhAAT1 mit den Oligonukleotiden *Nde*I-Start und *Bam*HI-Stop und für die erneute Amplifikation der vollständigen cDNA-Sequenz (full-length-clone) wurde die Polymerase Pfu Ultra (Stratagene, La Jolla, USA) mit dem entsprechenden Puffer verwendet.

Die Standard-PCR wurde als 50 µl Ansatz nach folgendem Schema durchgeführt:

1 µl	dNTP-Mix	(je 10 mM)
1 µl	Primer 1	(10 pmol/ µl)
1 µl	Primer 2	(10 pmol/ µl)
5 µl	10x Advantage-Polymerasepuffer	
0.5 µl	Advantage-Polymerase	
1 µl	Template-DNA	
40,5 µl	steriles <i>a. dest.</i>	

Für die Reaktion wurde die PCR-Maschine wie folgt programmiert:

	95°C	5 min
35-40 Zyklen	95°C	2 min
	50-70°C	30 sec
	72°C	1 min 30 sec
	72°C	2 min
	4°C	∞

Die Annealingtemperatur wurde den jeweiligen Schmelztemperaturen der Oligonukleotide aus den Herstellerangaben angepasst. Dabei galt die Regel: Annealingtemperatur = Schmelztemperatur -4 (± 1)°C.

Für weiterführende Experimente wie beispielsweise Klonierungen wurden die PCR-Lösungen mit dem „QIA quick[®] PCR Purification Kit“ (Qiagen, Hilden) gemäß den Herstellerangaben aufgereinigt.

2.8.3 Kolonie-PCR

Diese Technik diente der Identifizierung von positiven Klonen nach einer Transformation. Da dies nur ein Schnelltest war, wurde die Standard-PCR für einen 25 µl Ansatz wie folgt vereinfacht:

0,5 µl	dNTP-Mix	(10 mM)
0,5 µl	Primer 1	(10 pmol/µl)
0,5 µl	Primer 2	(10 pmol/µl)
2,5 µl	Taq-Polymerasepuffer	
0,3 µl	Taq- Polymerase	
20,7 µl	steriles <i>a. dest.</i>	

Die Überführung der *E.coli.*-Zellen in den Reaktionsansatz erfolgte mit Hilfe von sterilen Zahnstochern. Um die Insertionsrichtung der klonierten DNA-Fragmente zu bestimmen, wurde jeweils ein vektorspezifischer und ein genspezifischer Primer in entgegengesetzter Richtung verwendet. Für die Kolonie-PCR wurde die von D´Auria aufgereinigte Taq-Polymerase verwendet. Der Taq-Polymerasepuffer stammte von der Firma Promega (Madison, USA).

Für diese Reaktion wurde die PCR-Maschine wie folgt programmiert:

	95°C	5 min
30 Zyklen	95°C	30 sec
	60°C	30 sec
	72°C	1 min
	4°C	∞

2.8.4 Vervielfältigung von cDNA-Enden/RACE-PCR

Zur Verlängerung der 5´ und 3´-Enden des Anfangsfragmentes (EST) wurden RACE-PCR´s („rapid amplification of cDNA ends“) mit einem universellen Primer (5´ oder 3´UPM) und einem genspezifischen Primer durchgeführt. Die Herstellung der als Vorlage benötigten 5´ und 3´-RACE-cDNA sowie die RACE-Reaktion selbst erfolgte mit dem „SMART™ RACE cDNA Amplification Kit“ (BD Biosciences Clontech, Mountain View, USA) gemäß den Herstellerangaben. Die RACE-cDNAs Herbivor-induzierter Baumwollpflanzen wurden von Juliane Sanft bereitgestellt.

2.8.5 Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

Die Methode der quantitativen real-time PCR (qRT-PCR), welche genutzt wurde, um eventuelle Unterschiede in der Genexpression zu ermitteln, basierte auf Messung der Fluoreszenz nach jedem Zyklus der PCR. Dadurch konnte die Amplifikation der Zielsequenz abhängig von der realen Zeit verfolgt werden. Durch Vergleiche der Zyklen, bei denen das Fluoreszenzsignal erstmals statistisch signifikant vom Hintergrundsignal unterschieden werden konnte (Ct-Wert), konnten Aussagen über quantitative Unterschiede in der Genexpression von verschieden behandeltem Blattmaterial (2.5) gegenüber unbehandeltem Blattmaterial getroffen werden. Da diese Aussagen in höchstem Maße von den verwendeten cDNA-Konzentrationen abhängig sind, wurden alle einheitlich 1:25 verdünnt und jede Reaktion dreimal repliziert.

Alle qRT-PCR-Reaktionen wurden mit der qRT-PCR-Maschine Mx3000P™ und SYBR®green I mit ROX, als Referenzfarbstoff, gemäß den Angaben der Firma Stratagene (La Jolla, USA) durchgeführt.

Jeder 25 µl Ansatz enthielt folgende Lösungen:

1	µl	Primer 1	(10 pmol/µl)
1	µl	Primer 2	(10 pmol/µl)
0,375	µl	ROX	(1:500 verdünnt)
12,5	µl	Brilliant® SYBR®green I Master Mix	
1	µl	cDNA	
9,125	µl	steriles <i>a.dest.</i>	(HPLC-H ₂ O).

Um Kontaminationen auszuschließen wurden Kontrollreaktionen mit HPLC-H₂O, als Vorlage durchgeführt und alle Ansätze in einem speziellen, nur für PCR-Reaktionen genutzten Raum pipettiert.

Die Reaktionen wurden mit folgendem Temperaturprofil durchgeführt:

	95°C	10 min
40 Zyklen	{	95°C 30 sec
		60°C 30 sec
		72°C 30 sec
		95°C 1 min
	60°C	30 sec
	95°C	30 sec
	4°C	∞

Alle Reaktionen wurden mit Schmelzkurven, die eine Temperaturspanne von 55-95°C mit einer Erhöhung von 1°C/sec umfassten, analysiert. Zu Beginn wurden die Primer hinsichtlich ihrer Effizienz optimiert. Dies geschah durch fortlaufendes Verdünnen der cDNA (4x 1:4). Wiesen die Primer eine Effizienz von annähernd 100% und einen R²-Wert zwischen 0,9 bis 1,0 auf, konnte auf Linearität geschlossen werden. Im nächsten Schritt wurden Gene mit konstanter Expression in allen Behandlungen („Normalizer“) evaluiert. Als „Normalizer“ wurden die Gene für *APT1* (Adenosinphosphoribosyltransferase 1) und *RP21s* (RNA-Polymerase2, kleine Unterheit) aus Baumwolle verwendet.

Diese dienten dann als Basis für die vergleichende qRT-PCR zwischen aus behandeltem und unbehandeltem Blattmaterial gewonnener cDNA. Untersucht wurde die endogene Genexpression für das in Baumwolle gefundene Gen *GhAAT1*.

2.9 Klonierungs- und Transformationstechniken

2.9.1 Vektoren

Tabelle 2.6: Beschreibung der in dieser Arbeit verwendeten Vektoren

Bezeichnung /Herkunft	Eigenschaften	Verwendungszweck
pCR [®] 4-TOPO [®] /Invitrogen (Karlsruhe)	bakterieller Klonierungsvektor 3957 bp, Km ^r , Ap ^r	Klonierung von PCR-Fragmenten mit 3'-A-Überhang in <i>E.coli</i>
pCR [®] -Blunt II-TOPO [®] /Invitrogen (Karlsruhe)	bakterieller Klonierungsvektor 3519 bp, Km ^r , Ap ^r	Klonierung von PCR-Fragmenten mit glatten Enden in <i>E.coli</i>
pET-28a(+) /Novagen (San Diego, USA)	bakterieller Expressionsvektor 5359 bp, Km ^r , N-terminaler His-Tag, T7-Promotor	Überexpression von Proteinen in <i>E.coli</i>

2.9.2 pCR[®]4-TOPO[®]-Vektor-Konstrukte in TOP 10 One Shot chemisch kompetenten *E.coli* Zellen

2.9.2.1 Subklonierungen in den pCR[®]4-TOPO[®]-Vektor

Die durch PCR gewonnenen DNA-Fragmente mit einem Desoxyadenosin-Überhang am 3'-Ende wurden zum Sequenzieren in den Vektor pCR[®]4-TOPO[®] ligiert. Der abgewandelte Ligationsansatz (0,5 µl Vektor, 0,5 µl Salzlösung und 2 µl aufgereinigte PCR-Lösung) wurde gemäß den Herstellerangaben behandelt.

2.9.2.2 Transformation der pCR[®]4-TOPO[®]-Vektor-Konstrukte in TOP 10 One Shot chemisch kompetente *E.coli* Zellen

Nach der Ligation wurde die Plasmid-DNA in TOP 10 One Shot chemisch kompetente *E.coli* Zellen (Tab. 2.2) transformiert. Dafür wurden die bei -80°C gelagerten kompetenten Zellen langsam auf Eis aufgetaut und ein 25 µl Aliquot mit dem vollständigen Ligationsansatz (3 µl) versetzt, vorsichtig vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine Hitzeschock-Behandlung für 30 sec bei 42°C und die sofortige Zugabe von 250 µl SOC-Medium. Der Ansatz wurde dann 30 min bei 37°C geschüttelt, auf vorgewärmten Kanamycin-haltigen Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Selektion von positiven Klonen erfolgte durch Kolonie-PCR.

SOC-Medium: 2% (g/v) Trypton, 0,5% (g/v) Hefeextrakt, 0,5% (g/v) Glucose,
10 mM Natriumchlorid, 2,55 mM Kaliumchlorid, 21,6 mM
Magnesiumchlorid, 20 mM Magnesiumsulfat

2.9.3 pET-28a(+)-Vektor/DNA-Konstrukt in BL21(DE3) *E.coli* Zellen

Für die Überexpression der vollständigen Gensequenz wurde der Vektor pET-28a(+) ausgewählt. Dieser ermöglicht die Expression von Proteinen mit einem N-terminalen His-Tag und hat Restriktionsschnittstellen für *NdeI* (ACAT) und *BamHI* (TGGATCC). Um eine Ligation mit der vollständigen Gensequenz zu ermöglichen, wurden diese mit Oligonukleotide, die die selben Restriktionsschnittstellen enthielten vervielfältigt. Für diese Amplifikation wurde die Pfu-Polymerase (Stratagene, La Jolla, USA) mit 3'Exonuklease-Aktivität verwendet. Da diese keine überhängenden 3'-Adenosin-Enden produzierte, wurde diese vor der Ligation durch 30 min Inkubation bei 72°C mit 0,2 µl Taq-Polymerase angehängt.

Alle verwendeten Konzentrationen wurden durch TAE-Agarosegelelektrophorese mit dem „Low DNA Mass Ladder“ bestimmt (2.12.1).

2.9.3.1 Hydrolytische Spaltung von DNA (Restriktionsverdau)

Zur Anwendung kamen die Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Nde*I, der zehnfach konzentrierte Puffer für *Bam*HI, sowie BSA (New England Biolabs, Beverly, USA). Für einen Ansatz von 50 µl wurden als Substrat 10 µg Plasmid-/20 µg Vektor-DNA, 1,5 µl Enzym (10 U/µl), 0,5 µl BSA (1:100 Verdünnung) und 5 µl *Bam*HI-Puffer mit *a. dest.* aufgefüllt und über Nacht bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die hydrolytische Spaltung des Vektors wurde durch 15 min Inkubation bei 65°C abgestoppt. Der ausgeschnittene 40 bp-Rest wurde durch Aufreinigung mit dem „Wizard® SV Gel and PCR Clean Up System“ (Promega, Madison, USA) entfernt. Die verdaute Plasmid-DNA wurde durch TAE-Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, die entsprechende Bande ausgeschnitten und aufgereinigt (2.6.1.2).

2.9.3.2 Ligation in den pET-28a(+)-Expressionsvektor

Zur Ligation der restriktionsverdauten DNA mit dem ebenfalls geschnittenen Vektor wurde der „Quick Ligation Kit“ (New England Biolabs, Beverly, USA) gemäß den Herstellerangaben verwendet. Dabei wurden Vektor- und Insert-DNA im Mengenverhältnis von 1:3 mit 1 µl Quick T4 DNA Ligase und dem mitgelieferten Ligasepuffer 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend auf Eis überführt.

2.9.3.3 Transformation des pET-28a(+)-Vektor/DNA-Konstrukts in BL21(DE3)

***E.coli* Zellen**

Nach der Ligation wurde das Konstrukt zunächst in TOP 10 One Shot chemisch kompetente *E.coli* Zellen transformiert. Nach der Charakterisierung wurde dieses in BL21(DE3) *E.coli* Zellen transformiert. Dafür wurden 2 µl des Konstrukts mit 50 µl auf Eis aufgetauten BL21(DE3) *E.coli* Zellen vorsichtig vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Die Transformation wurde, wie unter Abschnitt 2.9.2.2 beschrieben, fortgeführt.

2.10 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung erfolgte nach der von Sanger *et al.* (1977) beschriebenen Kettenabbruchmethode. Dazu wurden die Sequenzierreaktionen wie folgt angesetzt:

x µl Template-DNA (200 ng), 1 µl Oligonukleotide (10 pmol/µl) und 2 µl „BigDye™-Mix“ (BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kit V2, Applied Biosystems, Foster City, USA) und (10-x) µl *a.dest.*. Der „BigDye™-Mix“ ist eine Mischung aus Puffer, dNTP's, Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Didesoxynukleotiden und DNA-Polymerase. Die Sequenzierungsreaktion, eine lineare PCR mit einem Oligonukleotid, wurde unter folgenden Bedingungen mit der PCR-Maschine durchgeführt:

	96°C	5 min
35 Zyklen	96°C	10 sec
	55°C	20 sec
	60°C	4 min
	4°C	∞

Nicht eingebaute, markierte Nukleotide aus der Reaktion wurden über „DyeEX™2.0 Spin Columns“ (Qiagen, Hilden) nach dem Prinzip der Gelfiltration gereinigt und anschließend in einem Kapillarsequenzierer ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Kapillarlänge 50 cm, Applied Biosystems, Foster City, USA) gelelektrophoretisch aufgetrennt und analysiert. Die Aufreinigung und Auftragung der Proben wurden von Bettina Raguschke durchgeführt.

2.11 DNA- und Protein-Sequenzanalyse

Die DNA-Rohsequenzen wurden mit dem Programm „Seqman“ (DNASTAR Inc., Madison, USA) analysiert und gegebenenfalls editiert. Zur Analyse der AS-Sequenzen wurden die DNA-Sequenzen mit dem Programm „Editseq“ (DNASTAR Inc., Madison, USA) in Proteinsequenzen umgeschrieben und der korrekte Leserahmen ermittelt.

Datenbankrecherchen und Sequenzvergleiche erfolgten mit Hilfe des Internets unter folgenden Internet-Adressen: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (NCBI-National Centre for Biotechnology Information), <http://tigr.org/> (TIGR-The Institut of Genomic Research). Sequenzvergleiche wurden mit dem Programm „Multalin“ (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>) (Corpet., 1988) erstellt.

Die prozentuale Bestimmung der Sequenzähnlichkeiten zwischen verschiedenen Proteinen erfolgte mit dem Programm „MegAlign“ (DNASTAR Inc., Madison, USA). Der hypothetische phylogenetische Stammbaum wurde mit dem Programm

„ClustalX Version 1.83“ (<ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/ClustalX/>) (Thompson *et al.*, 1997) nach der „neighbor-joining“-Methode erstellt und mit dem Programm „Treeview Version 1.6.6“ (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/rod.html>) (Page, 1996) visualisiert.

2.12 Elektrophoretische Verfahren

2.12.1 Auftrennung von DNA über TAE-Agarosegele

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Gemischen nach der Fragmentgröße erfolgte über 1,2%ige Agarosegele. 10 µl der DNA-Probe wurde mit 5 µl Ladepuffer versetzt und bei einer Spannung von 100 V in einer mit 0,5x TAE-Puffer gefüllten Elektrophoresekammer aufgetrennt. Die verwendeten Standards zur Größen- und Konzentrationsbestimmung (Tab. 2.7) wurden gemäß den Herstellerangaben verwendet.

Da Ethidiumbromid in die Doppelhelix interkaliert, konnte die DNA unter einem UV-Licht-Transilluminator detektiert werden. Dies erfolgte mit dem GeneGenius Bio Imaging System (Merck, Dortmund).

<i>1,2%iges Agarosegel:</i>	1,2 g Agarose (Biorad, Hercules, USA)/100 ml 0,5x TAE-Puffer und 1 µg/ml Ethidiumbromid
<i>0,5x TAE-Puffer:</i>	40 mM Tris-HCl pH 8,2, 20 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA
<i>Ladepuffer:</i>	50% (v/v) Glycerin, 0,05% (g/v) Bromphenolblau, 100 mM EDTA

Tabelle 2.7: Verwendete DNA-Längenstandards (Invitrogen, Karlsruhe)

Standard	Verwendung
1 kb Standard	für DNA-Fragmente der Größe 500-12000 bp
100 bp Standard	für DNA-Fragmente der Größe 100-1500 bp
Low DNA Mass Ladder	für die quantitative Abschätzung von DNA

2.12.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Zur Auftrennung von Proteingemischen unter denaturierenden Bedingungen wurden Polyacrylamid-Gelelektrophoresen (PAGE) in Gegenwart von SDS durchgeführt.

2.12.2.1 Herstellung von SDS-Polyacrylamidgelen

Die Herstellung von 12%igen Polyacrylamid-Gelen erfolgte, ebenso wie die Elektrophorese selbst, nach den Angaben von Laemmli (1970).

Die für diese Arbeit verwendeten Gele wurden mit nachfolgend aufgeführter Zusammensetzung in einer BioRad Miniprotean Gelapparatur gegossen:

12 %iges Trenngel	für 10 Stück	4 %iges Sammelgel	für 10 Stück
Acrylamid/Bisacrylamid (30:0,8%)	25,6 ml	Acrylamid/Bisacrylamid (30:0,8%)	3,75 ml
<i>a. dest</i>	21,4 ml	<i>a. dest</i>	15 ml
Trenngelpuffer	16 ml	Sammelgelpuffer	6,25 ml
10% (g/v) SDS	640 µl	10% (g/v) SDS	250 µl
10% (g/v) APS	320 µl	10% (g/v) APS	75 µl
TEMED	32 µl	TEMED	25 µl

Sammelgelpuffer: 60,5 g Tris/1 l *a. dest*, pH 6,8 mit HCl

Trenngelpuffer: 181,5 g Tris/1 l *a. dest*, pH 8,8 mit HCl

2.12.2.2 Aufbereitung der Proben

Zum vollständigen Denaturieren der Proteine wurden die Proben in 4x Proteinladepuffer aufgenommen, für 10 min auf 100°C erhitzt und vor dem Auftragen kurz zentrifugiert.

4x Proteinladepuffer: 5 ml Sammelgelpuffer, 4 ml Glycerol, 0,8 g SDS, 2 ml β -Mercaptoethanol, 1% (g/v) Bromphenolblau

2.12.2.3 Laufbedingungen

Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 100 V unter Verwendung von 1x SDS-Laufpuffer in einer BioRad Miniprotean-Apparatur. Als Molekulargewichtsmarker wurde der „Bench Mark™ Protein Ladder“ (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet.

10x SDS-Laufpuffer: 30,3 g Tris, 144 g Glycine, 10 g SDS/1 l a. dest

2.12.2.4 Coomassie-Färbung

Im Anschluß an die Elektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine mit Coomassie-Blau angefärbt. Für die Färbung wurde das Gel 30 min in der Färbelösung geschüttelt und über Nacht in der Entfärbelösung von überschüssigem Coomassie-Farbstoff befreit.

Coomassie-Färbelösung: 1 g Coomassie brilliant blue R250, 500 ml Methanol,
100 ml Essigsäure/1 l a. dest

Coomassie-Entfärbelösung: 50 ml Essigsäure, 165 ml Ethanol/1 l a. dest

2.12.2.5 Dokumentation

Um die Gele für die wissenschaftliche Dokumentation haltbar zu machen, wurden diese zuerst gründlich gewässert und dann zwischen zwei Cellophanfolien, welche in einen Plexiglasrahmen eingespannt wurden, über mehrere Tage langsam getrocknet. Wichtige Gele wurden zuvor mit einem Densitometer der Firma Bio-Rad (Biorad, Hercules, USA) gescannt und mittels der entsprechenden Software als Bilddatei gespeichert.

2.12.3 Kapillarelektrophoretische Auftrennung mit dem Bioanalyser

Der Agilent 2100 Bioanalyser ersetzte in der vorliegenden Arbeit die herkömmliche Methode des denaturierenden RNA-Agarosegels durch eine Mikrokapillar-Elektrophorese. Dadurch konnte sowohl die Qualität, als auch die Quantität einer RNA-Probe bestimmt werden. Das Prinzip dieser Methode beruhte auf Laserdetektion von fluoreszenzmarkierter RNA, welche durch einen Vergleich mit dem RNA 600-Leiter (Ambion, Austin, USA) und der integrierten Software analysiert werden konnte. Ein weiterer Vorteil dieser Methode lag darin, dass bereits geringe RNA-Mengen ab 50 ng detektiert werden konnten. Die RNA-Proben wurden zuvor spektrophotometrisch bei $\lambda = 260$ nm vermessen und mit DEPC-H₂O auf eine Konzentration von 100 ng/ μ l eingestellt. Für die Analyse wurde der RNA 6000 Nano Lab Chip (Agilent, Palo Alto, USA) gemäß den Herstellerangaben verwendet. Nur RNA-Proben die ein 28S:18S (große zu kleiner Untereinheit) rRNA-Verhältnis von annähernd zwei aufwiesen, wurden als qualitativ hochwertig angesehen und für die cDNA-Synthese verwendet.

Diese Methode wurde hauptsächlich zur Qualifizierung und Quantifizierung von Gesamt-RNA verwendet. Darüberhinaus konnte auch cDNA mit dem Pico Chip (Agilent, Palo Alto, USA) und dem entsprechenden Leiter charakterisiert werden.

2.13 Expression und Reinigung von Proteinen

2.13.1 Heterologe Proteinexpression in *E.coli*

Für die Proteinüberexpression wurde der Vektor pET28a(+) verwendet. In diesen Plasmiden befindet sich das zu exprimierende Gen unter Kontrolle eines T7-Promotors. Als Wirtstamm wurde daher *E.coli* BL21(DE3) verwendet, welcher eine Kopie des T7-RNA-Polymerasegens im Chromosom enthält.

Für die Überexprimierung wurden 50 ml LB-Medium mit Ampicillin in einem sterilem 250 ml Erlenmeyerkolben mit 1 ml aus einer Übernachtskultur inokuliert. Die angeimpfte Kultur wurde bei 37°C, 180 rpm geschüttelt und das Wachstum über die Messung der optischen Dichte (OD) am Spektralphotometer verfolgt. Die Messung der OD bei 600 nm erfolgte gegen das LB-Medium als Blindwert. Nach Erreichen der stationären Phase ($OD_{600} = 0,4-0,5$) wurde die Kultur für 30 min bei 4°C inkubiert und anschließend durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Die induzierten Kulturen wurden 20 h bei 18°C, 180 rpm geschüttelt.

Die Zellen der Expressionskultur wurden durch Zentrifugation (10 min bei 3000 x g, 4°C) geerntet und das Pellet in 10 ml/g 1x Lysepuffer resuspendiert. Der Zellaufschluß erfolgte durch 3 x 3 min Ultraschallbehandlung (Bandelin UW2070, Bandelin) in einem mit Eis gefüllten Becherglas. Darauf folgte ein Zentrifugationsschritt (10 min bei 20000 x g, 4°C). Der Überstand wurde abgenommen und bei -20°C gelagert, ebenso wie das erneut mit 1x Lysepuffer resuspendierte Zentrifugat, welches zur Kontrolle der Expression diente.

Um eine höhere und stabilere Proteinausbeute zu erzielen, wurde das „Overnight Express Instant TB Medium“ der Firma Novagen (San Diego, USA) verwendet. Dieses selbstinduzierbare Medium wurde speziell für IPTG-induzierbare bakterielle Expressionssysteme entwickelt und enthält bereits alle Bestandteile (Glucose, Lactose und Glycerol) um die Kultur bis zur stationären Phase wachsen zu lassen und anschließend automatisch die Proteinexpression über den lac-Promotor zu induzieren. Dazu wurde ein 500 ml steriler Erlenmeyerkolben mit 100 ml autoklavierten „Overnight Express Instant TB Medium“ mit Ampicillin befüllt, mit 10 Kolonien des entsprechenden Klones steril angeimpft und für etwa 48 h bei 18°C

und 180 rpm geschüttelt. Die anschließende Proteinernte erfolgte wie oben beschrieben.

1x Lysepuffer: 50 mM Bis-Tris, 10% (v/v) Glycerol/ a. dest, pH 7,0

2.13.2 Proteinreinigung durch „Fast Performance Liquid Chromatography“ (FPLC)

Da der Vektor pET28a einen N-terminalen His-Tag enthält, konnten die Proteine „His-Tag“ aufgereinigt werden. Diese Reinigung erfolgte mittels der „Fast Performance Liquid Chromatography“ (FPLC), wobei die verwendete Anlage FPLC™ der Automatisierung dieses Prozesses diente.

Die FPLC-Apparatur, welche auf 4°C gekühlt wurde, bestand aus den Vorratsgefäßen für die Puffer A und B, der Pumpenstation (1 ml/min), einer 1 ml „HisTrap“-Säule (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden), dem Leitfähigkeitsmesser (UV-Absorbanz 280 nm) und dem Fraktionssammler, die alle über Kanäle miteinander verbunden waren. Die „HisTrap“-Säule aus Sepharosematrix mit daran gebundenen Nickel, funktionierte ähnlich dem Prinzip der Ni-Affinitätschromatographie, bei dem die His-markierten Proteine an die Matrix gebunden wurden. Um ein Überladen der Säule zu verhindern, wurden maximal 15 ml der Rohextraktlösung aufgetragen und überschüssige Proteine durch einen Waschschrift mit 10 ml Puffer A entfernt. Die darauffolgenden Elutionsschritte folgten einem Imidazolgradienten von 10 bis 500 mM. Dafür wurden die Puffer A und B entsprechend gemischt. Spätestens bei einer Imidazolkonzentration von 500 mM wurde das His-markierte Protein von der Säule eluiert, da Imidazol als Bindeanalogon zum Histidin funktioniert. Die Durchflüsse wurden im Fraktionssammler, der mit 15 ml Falcongefäßen bestückt war, als 5 ml Fraktionen gesammelt.

Der Verlauf der FPLC-Reinigung wurde in einem entsprechenden Chromatogramm dokumentiert und gespeichert. Alle bei der Aufreinigung verwendeten Puffer wurden, um Verunreinigungen zu entfernen, vakuumfiltriert. Die Säule wurde für weitere Aufreinigungen aufbewahrt und gemäß den Herstellerangaben nach etwa fünf Durchläufen mit EGTA entladen, mit Wasser gespült und erneut mit Nickelsulfat beladen. Die Überprüfung der His-tag-Aufreinigung erfolgte mit einem SDS-Gel und einer Aktivitätsbestimmung.

Puffer A: 1x Lysepuffer mit 10 mM Imidazol

Puffer B: 1x Lysepuffer mit 500 mM Imidazol

2.13.3 Konzentration und Umpufferung der Proteinlösung

Die Konzentration der Proteinlösung (FPLC-Fractionen) erfolgte mit „Microsep™ Centrifugal Devices 10 K“-Säulen (Pall Life Sciences, Dreieich) gemäß den Herstellerangaben.

Zum Entfernen des Imidazols aus der gereinigten, konzentrierten Proteinlösung (1 ml) wurde die entsprechende Fraktion auf eine vorbereitete NAP™ 10-Säule (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) aufgetragen und der Durchfluß aufgefangen. Im Anschluß daran wurde das Protein zweimal mit dem entsprechenden Säulenvolumen (1,5 ml) 1x Lysepuffer von der Säule eluiert und aufgefangen. Die Säule wurde vor Beginn einmal mit 1x Lysepuffer und dreimal mit *a. dest.* gewaschen.

2.13.4 Proteinbestimmungsmethoden

2.13.4.1 Quantifizierung nach Bradford

Die Quantifizierung von Proteinen nach Bradford (1976) erfolgte mit dem Proteinnachweis-Reagenz der Firma Bio-Rad (Hercules, USA).

Ein 50 µl Aliquot der Proteinprobe wurde direkt oder mit 1x Lysepuffer verdünnt zu 1 ml Bradford-Reagenz gegeben. Nach 10minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei $\lambda=595$ nm mit einem UV-Vis-Spektralphotometer gemessen. Die Berechnung der Proteinmenge erfolgte anhand einer BSA-Eichgerade (bovine serum albumin, Bio-Rad, Hercules, USA).

Bradford-Reagenz: 200 µl kommerzielles Reagenz und 800 µl *a.dest.* (1:5)

2.13.4.2 Quantifizierung mit dem Mikro-BCA-Test

Zur Quantifizierung von Proteinproben mit geringer Proteinmenge (0,5-20 ng/µl) wurde der „Micro BCA™ Protein Assay Reagent Kit“ der Firma Pierce Biotechnology (Rockford, USA) gemäß den Herstellerangaben verwendet. Die Bestimmung des Proteingehaltes erfolgte mit dem im Kit enthaltenen BSA als Standard. Die dazu erforderliche photometrische Detektion bei $\lambda=562$ nm erfolgte mit einem UV-Vis-Spektralphotometer.

2.13.4.3 Berechnung mit der „GeneTool“-Software

Einige Proteinproben (FPLC-Fraktionen, konzentrierte Proteinlösung) konnten, aufgrund sehr geringer Proteinmengen bzw. geringen Volumens weder mit Bradford, noch mit dem Micro-BCA-Test quantifiziert werden. Daher erfolgte die Berechnung dieser Proteinmengen mittels der „SynGene GeneTools Analysis“-Software (Version 3.02.00, SynGene Laboratories, Pegasus Court, USA) anhand des zuvor als Bilddatei erfassten SDS-Polyacrylamidgeles (2.15.2.5). Als Referenz diente eine Probe mit bekannter Proteinmenge.

2.14 Enzymaktivitätsmessungen und Enzymkinetik

2.14.1 Enzym-Substrat-Reaktionen (Assays) zur Aktivitätsbestimmung

Basierend auf dem von D’Auria *et al.* (2002) entwickelten Protokoll zur Charakterisierung von Alkoholacyltransferasen wurde die Aktivität von GhAAT1 mit verschiedenen Substraten bestimmt.

Die Substrate wurden, wenn nicht anders erwähnt mit einer Endkonzentration von je 1 mM eingesetzt. Die Stammlösungen der Alkohole wurden mit DMSO als Lösungsmittel und die der acyl-CoAs mit *a. dest.* hergestellt. Radioaktiv-markiertes Acetyl-CoA (250 μ Ci in 5 ml 0,01 M Natriumacetat; 57,5 mCi/mmol) stammte von der Firma Movarek Biochemicals (Brea, USA). Pro Ansatz wurden 7,225 ng gereinigtes Protein eingesetzt. Einmal aufgetaute Proteinlösungen wurden nicht wiederverwendet. Jede Reaktion wurde dreimal repliziert.

Der Standardassay erfolgte als 50 μ l Ansatz nach folgendem Schema:

1 μ l	Benzylalkohol	(50 mM)
1 μ l	Acetyl-CoA	(49 mM)
1 μ l	(Acetyl-1- ¹⁴ C)CoA	(57,5 mCi/mmol)
10 μ l	5x Assaypuffer	(250 mM Bis-Tris-Propane, pH 7,1)
5 μ l	gereinigte Proteinlösung	(1,45 ng/ μ l)
32 μ l	<i>a. dest.</i>	

Die Reaktionsansätze wurden nach Zugabe der Proteinlösung für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit 200 μ l Hexan überschichtet, geschüttelt und kurz zentrifugiert. 180 μ l der oberen organischen Phase wurden

abgenommen und in ein Scintillations-Gefäß mit 4 ml Lipoluma[®] Plus (Lumac*LSC B.V., Groningen, Niederlande) überführt. Anschließend wurde die Extraktion wiederholt und die Proben nach Vereinigung der organischen Phasen mit dem Scintillationszähler vermessen. Als Kontrolle dienten Reaktionsansätze mit denaturierter Proteinlösung.

Reaktionsansätze ohne Zugabe von Protein dienten der Bestimmung der tatsächlich eingesetzten Menge an radioaktiv-markiertem Acetyl-CoA und wurden direkt in 4 ml Lumasafe[™] (Lumac*LSC B.V., Groningen, Niederlande) überführt und ebenfalls vermessen.

2.14.1.1 Berechnung der spezifischen Aktivität

Das Prinzip dieser Aktivitätsbestimmung beruht auf der Unlöslichkeit von Acetyl-CoA in organischen Lösungsmitteln. Da bei diesen Assay die Produkte nach Extraktion mit Hexan in der organischen Phase bestimmt wurden, entspricht die Aktivität auch dem tatsächlich umgesetzten radioaktiv-markiertem Acetyl-CoA. Nicht umgesetztes radioaktiv-markiertes Acetyl-CoA verbleibt in der wäßrigen Phase und wird daher nicht detektiert.

Zur Bestimmung der spezifischen Enzymaktivität wurden die Rohdaten der Scintillationsmessung (DPM, disintegrations per minute) basierend auf der spezifischen Aktivität des radioaktiv-markierten Acetyl-CoAs in nkatal/mg Protein umgerechnet.

2.14.1.2 Enzymatische Synthese von Benzoyl-CoA

Die für die Synthese benötigte Benzoate:Coenzyme A Ligase (BZL) wurde von John D'Auria bereitgestellt und in *E.coli* BL21(DE3) Zellen überexprimiert und aufgereinigt (2.13.1 und 2.13.2). Die Synthese von Benzoyl-CoA aus Benzoesäure erfolgte nach Beuerle und Pichersky (2002a, 2002 b). Die Reinheit des hergestellten Benzoyl-CoA wurde durch LC-MS-Analyse (Ales Svatos) überprüft und die Umsetzung unter Standardassaybedingungen mittels der Benzoyltransferase aus *Clarkia brewerii* (CbBEBT, John D'Auria) sichergestellt.

2.14.1.3 Assay für die funktionelle Charakterisierung des Enzyms

Für die funktionelle Charakterisierung des Enzyms wurden als Substrate die Alkohole Benzylalkohol und (*Z*)-3-Hexenol jeweils in Kombination mit Acetyl-CoA und Benzoyl-CoA eingesetzt. Die Assays erfolgten ohne Zugabe von radioaktiv-markierten Acetyl-CoA. Die Reaktionsansätze wurden über Nacht bei

Raumtemperatur inkubiert und die synthetisierten Produkte am nächsten Morgen zweimal mit 100 µl n-Hexan extrahiert. Die Identifizierung der Produkte erfolgte mittels GC-MS (2.4.3).

2.14.1.4 Einfluß von pH-Wert, Temperatur und verschiedenen Metallionen auf die Enzymaktivität

Für die Bestimmung des optimalen pH-Wertes wurden Standardassays mit auf unterschiedlichen pH-Wert eingestelltem Assaypuffer (250 mM Bis-Tris-Propane) durchgeführt. Der getestete pH-Bereich entsprich dem Pufferbereich von Bis-Tris-Propane (6,3-9,0).

Desweiteren wurde der Einfluß der Temperatur auf die Stabilität des Enzym untersucht. Dafür wurden Proteinlösungen bei 4, 22, 37 und 50°C für jeweils 30 min inkubiert und anschließend die Aktivität mittels des Standardassays (Raumtemperatur) bestimmt.

Außerdem wurden die Effekte verschiedener mono- und divalenter Kationen auf die Enzymaktivität durch Zugabe von jeweils 5 mM Kalium-, Natrium-, Calcium-, Kupfer-, Eisen-, Mangan-, Magnesium-, Zink-, und Cobalt-Ionen zum Standardassay untersucht. Die Kationen wurden in Form der Chloridsalze, Kupfer und Zink zusätzlich als Sulfate zugesetzt

2.14.1.5 Bestimmung der relativen Aktivität mit verschiedenen Alkoholen

Für die Bestimmung der relativen Aktivität wurde die Enzymaktivität mit Benzylalkohol, sowie mit weiteren 19 Alkoholen als mögliche Substrate, ermittelt. Die Berechnung erfolgte auf Basis der Enzymaktivität mit Benzylakohol als Substrat (100%).

2.14.1.6 Konkurrenzassay

Bei dieser Art von Assay konkurrieren zwei mögliche Substrate, in diesem Fall zwei verschiedene acyl-CoAs um die Substratbindestelle. Dafür wurden dem normalen Standardassay je 1 mM der acyl-CoAs Malonyl-, Cinnamoyl-, Benzoyl-, Caffeoyl-, Hexanoyl-, und Butyryl-CoA zugefügt. Cinnamoyl-, Caffeoyl-, und Butyryl-CoA wurden freundlicherweise von Silke Brand bereitgestellt.

2.14.2 Bestimmung der kinetischen Parameter

2.14.2.1 Bestimmung des K_m -Wertes

Der K_m -Wert (Michaelis-Menten-Konstante) entspricht der Substratkonzentration, bei der die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit des Enzyms erreicht wird. Eine hohe Affinität des Enzyms zum jeweiligen Substrat ist demzufolge durch einen niedrigen K_m -Wert gekennzeichnet.

Die graphische Darstellung der Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Substratkonzentration ergibt einen hyperbolen Kurvenverlauf. Die Reaktionsgeschwindigkeit steigt mit zunehmender Substratkonzentration an, bis die maximale Geschwindigkeit der Umsetzung V_{max} erreicht ist. Anhand der halbmaximalen Reaktionsgeschwindigkeit $V_{max}/2$ kann aus dieser Kurve der K_m -Wert abgelesen werden.

Bei der Bestimmung des K_m -Wertes für Benzylalkohol wurde die spezifische Aktivität des Proteins bei variierender Alkoholkonzentration (12,5, 25, 50, 100, 150, 250 und 500 μM Benzylalkohol) und einer konstanten Acetyl-CoA-Konzentration von 7 mM ermittelt. Die Bestimmung des K_m -Wertes für Acetyl-CoA erfolgte mit Konzentrationen von 17,4, 50, 75, 150, 250, 500, 1000 μM bei einer konstanten Benzylalkohol-Konzentration von 1 mM. Jeder Meßwert wurde dreimal repliziert.

Die Bestimmung der V_{max} und K_m -Werte und die Erstellung der Michaelis-Menten-Graphen erfolgte mit dem Programm „SigmaPlot 7.0“ (Enzym-Modul)

2.14.2.2 Berechnung der katalytischen Konstante k_{cat}

Die katalytische Konstante k_{cat} ist definiert als die Anzahl von Substratmolekülen, die bei vollständiger Sättigung des Enzyms pro Zeiteinheit von einem aktiven Zentrum umgesetzt werden (Stryer, 1990). Neben der spezifischen Aktivität fließt auch die Größe des Proteins in die Berechnung dieser enzymkinetischen Größe ein. Der Wert für k_{cat} erlaubt eine Aussage über die maximale molare Aktivität eines Enzyms. Das kalkulierte Molekulargewicht (MG) von GhAAT1 liegt bei 50,68 kD.

Aus den spezifischen Enzymaktivitäten wurde k_{cat} wie folgt berechnet:

1. Berechnung der Anzahl der Moleküle in 1 μg Protein:

$$1/\text{MG (kD)} = \mu\text{mol Protein}/1 \text{ mg}$$

2. Berechnung von k_{cat} :

$$k_{\text{cat}} \text{ (1/sec)} = V_{\text{max}} \text{ (nmol Substrat/sec* mg)} / \mu\text{mol Protein/1 mg}$$

Zum Vergleich verschiedener Substrate und verschiedener Enzyme hinsichtlich ihrer physiologischen Effektivität wurde zusätzlich der Quotient aus k_{cat} und dem K_{m} -Wert bestimmt.

3 Ergebnisse

3.1 Analyse der Duftstoffe von *Gossypium hirsutum*

Aus bereits publizierten Arbeiten ist bekannt, daß *G. hirsutum* neben einer Vielzahl von Terpenen auch den Ester (Z)-3-Hexenylacetat emittiert (McCall *et al.*, 1994, Loughrin *et al.*, 1994; Pare und Tumlinson, 1997a; Turlings *et al.*, 1995). Darüberhinaus ist bekannt, daß die Emission dieser Duftstoffe in Abhängigkeit von der Art der Behandlung qualitativ und quantitativ in großem Maße variiert. Daher wurden zur Analyse der von *G. hirsutum* freigesetzten Duftstoffe Experimente mit drei unterschiedlichen Behandlungen durchgeführt:

1. mechanische Verwundung
2. Herbivor-Induktion
3. FOV-Infektion.

Drei Wochen alte *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (FOV)-infizierte Pflanzen wiesen unter den getesteten Bedingungen circa sieben Tage nach der Infektion die ersten makroskopisch sichtbaren Symptome der Welke auf (Abb. 3.1, A). Nach 11 Tagen waren die meisten Blätter infiziert, die untersten fast vollständig verwelkt und zum Teil abgefallen, so daß dieser Versuch zu diesem Zeitpunkt beendet wurde. Die anschließende mikroskopische Untersuchung des Stammes zeigte deutliche Veränderungen infolge der FOV-Infektion (Abb. 3.1, B). Bei Vorversuchen mit zwei Wochen alten Baumwollpflanzen waren bereits nach 12 Tagen alle Blätter vollständig verwelkt und einen Tag später abgefallen, was zum Tod der Pflanze führte (Abb. 3.1, C), wohingegen vier Wochen alte Pflanzen auch 14 Tage nach der Inokulation kaum Welkesymptome aufwiesen (Daten nicht gezeigt).



Abbildung 3.1: „Fusarium-Welke“ von *G. hirsutum*. (A) zeigt ein Baumwollblatt mit ersten sichtbaren Welkesymptomen (gelbe Verfärbung und Beginn der Nekrose) 7 Tage nach Infektion mit FOV. (B) zeigt die mikroskopische Darstellung eines Stammquerschnitts 11 Tage nach der Infektion. Die braun verfärbten Stellen des Xylems, Phloems und des Marks verdeutlichen die FOV-bedingten Veränderungen. (C) zeigt den fortgeschrittenen Befall einer zwei Wochen alten Baumwollpflanze 12 Tage nach der FOV-Infektion.

3.1.1 Qualitative Analyse der Duftstoffe unterschiedlich behandelter Baumwollpflanzen

Die qualitative Analyse der Chromatogramme zeigte neben einer Vielzahl von Terpenen, den Ester (*Z*)-3-Hexenylacetat und in einigen Chromatogrammen Spuren des Esters Benzylacetat. Weitere Ester waren nicht detektierbar. Die Abbildung 3.2 zeigt die kompletten Duftstoffspektren ausgewählter Chromatogramme von unterschiedlich behandelten Pflanzen. Diese Chromatogramme repräsentieren die für die jeweilige Behandlungsart charakteristischsten Duftspektren d.h. in allen Chromatogrammen der jeweiligen Versuche, sowie in deren zeitlichen Verläufen wurden keine weiteren Duftstoffe identifiziert. Der Benzylacetat-Peak war in diesen Spektren nicht auflösbar.

Pflanzen, die mechanisch verwundet wurden, gaben direkt (0-4 h) nach der Verwundung die GLV (*Z*)-3-Hexenol und (*Z*)-3-Hexenylacetat, sowie die Terpene α -Pinen, β -Pinen, β -Myrcen, β -Caryophyllen und α -Humulen und Spuren der Homoterpene (*E*)-4,8-Dimethyl-1,3,7-Nonatrien (DMNT) und (*E,E*)-4,8,12-Trimethyl-1,3,7,11-Tridecatetraen (TMTT) ab (Abb. 3.2 A).

Pflanzen, deren Blätter durch *S. littoralis*-Fraß beschädigt wurden, emittierten im frühen Stadiums des Fraßes (0-4 h, Abb. 3.2 B) verglichen mit mechanisch verwundeten Pflanzen ein qualitativ ähnliches Duftstoffspektrum, jedoch variierten die freigesetzten Mengen, insbesondere die von (*Z*)-3-Hexenylacetat und TMTT. (*Z*)-3-Hexenol wurde nicht detektiert. Zu einem späteren Zeitpunkt, 8-12 h nach Beginn des Fraßes wiesen die Duftprofile neue Terpene wie β -Ocimen, (*E*)- β -Farnesen, sowie Indol und erhöhte Mengen von (*Z*)-3-Hexenylacetat und DMNT auf (Abb. 3.2 C). Darüberhinaus wurde (*Z*)-3-Hexenol detektiert, α -Humulen jedoch nicht. Unbehandelte Pflanzen (Abb. 3.2 Kontrolle A-C) wiesen im Gegensatz zu behandelten Pflanzen wenige Duftstoffe mit sehr geringen Emissionsraten auf.

FOV-infizierte Pflanzen (Abb. 3.2 D) sowie deren Kontrollpflanzen (Spektrum nicht dargestellt) setzten nach der Infektion überwiegend die beiden Homoterpene DMNT und TMTT frei, wobei keine Unterschiede in der Emission zwischen den Tagen gefunden wurden.

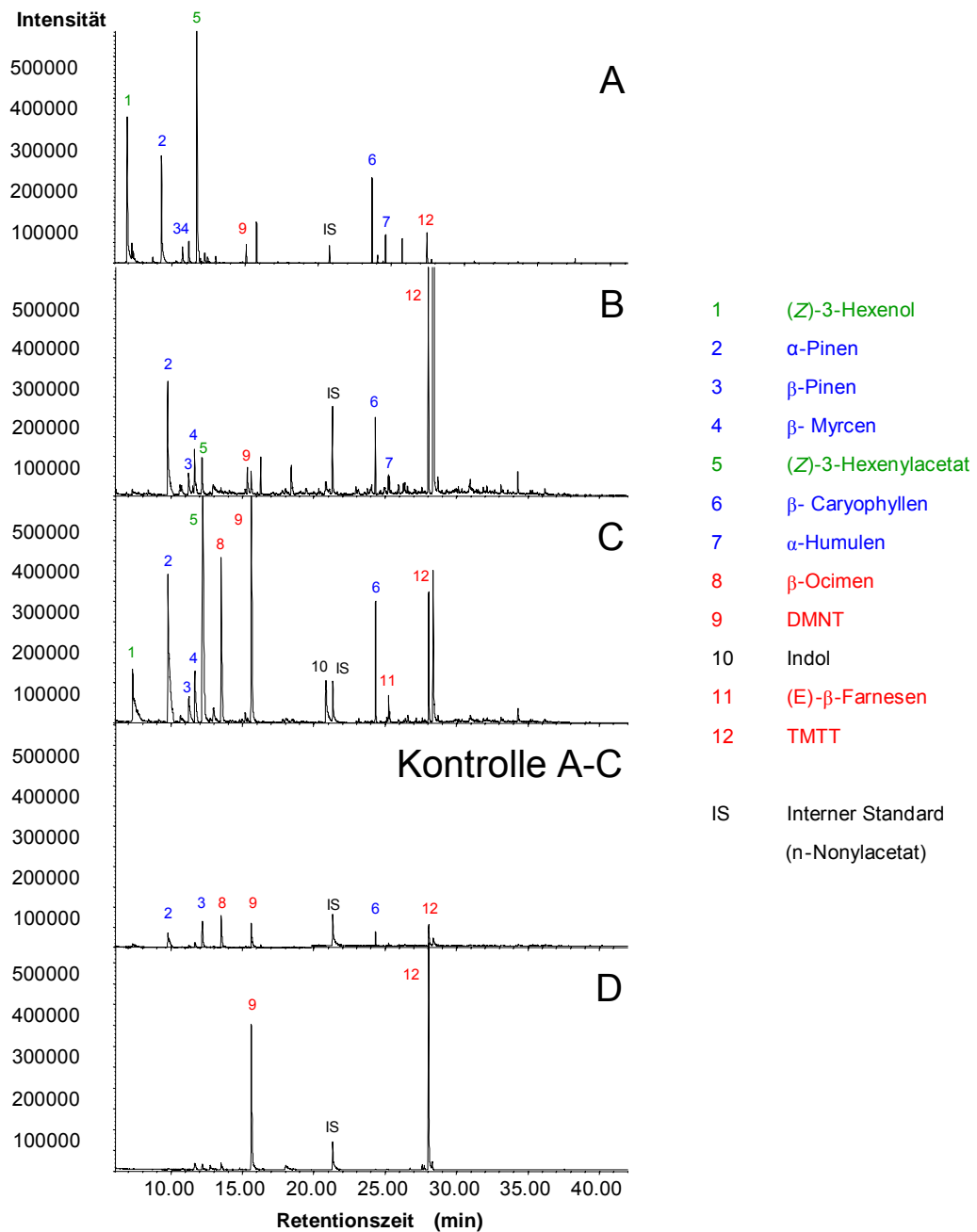


Abbildung 3.2: Charakteristische Duftprofile unterschiedlich behandelter Baumwollpflanzen. Dargestellt ist das komplette Spektrum der emittierten Duftstoffe mit Ausnahme von Benzylacetat (A) 0-4 h nach mechanischer Verwundung, (B) 0-4 h nach Beginn des Fraßes von *S. littoralis*, (C) 8-12 h nach Beginn des Fraßes, (Kontrolle A-C) unbehandelte Pflanze, (D) 7 Tage nach Infizierung der Pflanze mit FOV; Spektrum der FOV-Kontrolle zeigte keine Unterschiede zur Behandlung (Spektrum nicht dargestellt). (1-7) zeigt **GLV** und **konstitutiven Terpene**, (8-12) **induzierbare Terpene**, sowie Indol.

3.1.2 Quantitative Analyse ausgewählter Duftstoffe unterschiedlich behandelter Baumwollpflanzen

Zur genaueren quantitativen Analyse ausgewählter Duftkomponenten in unterschiedlich behandelten Pflanzen wurden die Mengen von (*Z*)-3-Hexenylacetat (ng) und Benzylacetat (pg) mit Hilfe der „Single Ion Methode“ (2.6.3.1) ermittelt und pro Pflanze und Stunde (h) der Duftsammlung innerhalb der entsprechenden Zeitintervalle berechnet.

3.1.2.1 Quantitative Analyse der (*Z*)-3-Hexenylacetat-Emission

Mechanische Verwundung von Baumwollpflanzen bewirkte eine deutliche Verschiebung der Emissionsraten von (*Z*)-3-Hexenylacetat (Abb. 3.3). Innerhalb der ersten vier Stunden, d.h. unmittelbar nach dem Verwundungsereignis, lag die Emissionsrate verwundeter Pflanzen mit $2,14 \pm 1,03$ ng/h/Pflanze um ein Vielfaches über der Emissionsrate unverwundeter Kontrollpflanzen ($0,08 \pm 0,09$ ng/h/Pflanze). Die statistische Vergleich der Emissionsraten mittels einer univariaten ANOVA zeigte zu diesem Zeitpunkt signifikante Unterschiede zwischen Behandlung und Kontrolle ($F_{1,4}=11,96$; $P=0,026$). Im darauffolgenden 4-Stunden-Intervall (4-8 h) sank die Freisetzung von (*Z*)-3-Hexenylacetat mechanisch verwundeter Pflanzen um mehr als die Hälfte ab und glich sich der von Kontrollpflanzen freigesetzten Menge an. Auch während der übrigen Meßintervalle wurden keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der abgegebenen (*Z*)-3-Hexenylacetat-Mengen zwischen verletzten und unverletzten Pflanzen gefunden.

Da die Blattgewichte der behandelten Pflanzen keine Unterschiede zu den unbehandelten Kontrollpflanzen aufwiesen (t-Test; $t=1,044$, $P=0,356$), ergab die Berechnung der Emissionsraten in ng/h/g Frischgewicht das gleiche zeitliche Abgabemuster für (*Z*)-3-Hexenylacetat d.h. größte Abgabe zu Beginn und anschließend rascher Abfall auf Level der Kontrollpflanzen (Daten nicht gezeigt)

Induktion von *G. hirsutum* durch den Herbivoren *S. littoralis* bewirkte ebenso wie mechanische Verwundung eine verstärkte Abgabe des Esters (*Z*)-3-Hexenylacetat (Abb. 3.4). Diese Erhöhung zeigte sich jedoch nicht in den frühen Meßintervallen (0-8 h), sondern erst 8-12 h (16.00-20.00 Uhr) nach Fraßbeginn. Zu diesem Zeitpunkt lag die Emissionsrate Herbivor-induzierter Pflanzen bei $21,31 \pm 13,83$ ng/h/Pflanze, die der unbehandelten Kontrollpflanzen blieb mit

0,72±0,50 ng/h/Pflanze sehr gering. Der Unterschied zwischen diesen beiden Emissionsmengen war nicht signifikant (univariate ANOVA; $F_{1,4}=6,644$, $P=0,061$), ließ jedoch einen starken Trend erkennen. In den darauffolgenden Meßintervallen (12-24 h) emittierten induzierte Pflanzen mit bis zu 10 ng/h/Pflanze weniger als die Hälfte des zuvor freigesetzten (*Z*)-3-Hexenylacetat, die von den Kontrollpflanzen emittierten Mengen mit Ausnahme des letzten 4-h-Intervalls waren aber weiterhin sehr gering.

S. littoralis-induzierte Pflanzen zeigten im Gegensatz zu mechanisch verwundeten Pflanzen nicht nur eine zeitliche Verschiebung im Emissionsmuster. Auch die freigesetzten Mengen im jeweiligen Intervall der stärksten Emission lagen für Herbivor-induzierte Pflanzen (21,31±13,83 ng/h/Pflanze) etwa 10 mal höher als für mechanisch verwundete Pflanzen (2,14±1,03 ng/h/Pflanze). Dieser Trend bestätigt sich beim Vergleich der insgesamt abgegebenen Mengen (innerhalb der ersten 24 h) nach den oben genannten Behandlungen und den entsprechenden Kontrollen (Oneway ANOVA; $F_{3,8}=43,275$, $p=0,000$). Dabei zeigte sich, dass Herbivor-induzierte Pflanzen im Gesamten deutlich mehr (*Z*)-3-Hexenylacetat emittierten als mechanisch verwundete Pflanzen (Post Hoc Test, Tukey; $P=0,000$). Die Gesamtemissionsraten der Kontrollpflanzen beider Experimente wiesen keine Unterschiede auf (Post Hoc Test, Tukey; $P=0,590$).

Die (*Z*)-3-Hexenylacetat-Emissionen **FOV-infizierter Pflanzen** waren aufgrund des zeitlich unterschiedlich durchgeführten Versuches nicht mit denen der anderen Behandlungen vergleichbar. Darüberhinaus war keine statistische Auswertung der emittierten Mengen möglich, da diese Art der Behandlung nur mit zwei einzelnen Pflanzen durchgeführt wurde.

Die Emissionsraten der zwei FOV-infizierten Pflanzen (Abb. 3.5) wiesen im Tag/Nacht-Intervall der Duftmessung keine nennenswerten Unterschiede zu den Kontrollpflanzen auf. Beide Experimente zeigten jedoch, daß eine beträchtliche Variabilität hinsichtlich des abgegebenen (*Z*)-3-Hexenylacetat vorlag. Die emittierten Mengen bewegten sich bis auf wenige Ausnahmen (Kontrollpflanze 2, 6. und 11. Nacht) im Bereich von 0,1-0,4 ng/h/Pflanze. Obwohl die FOV-infizierte Pflanze 2 und deren Kontrollpflanze im allgemeinen etwas mehr (*Z*)-3-Hexenylacetat emittierten, entsprachen die freigesetzten Mengen denen der Kontrollpflanzen anderer Behandlungen.

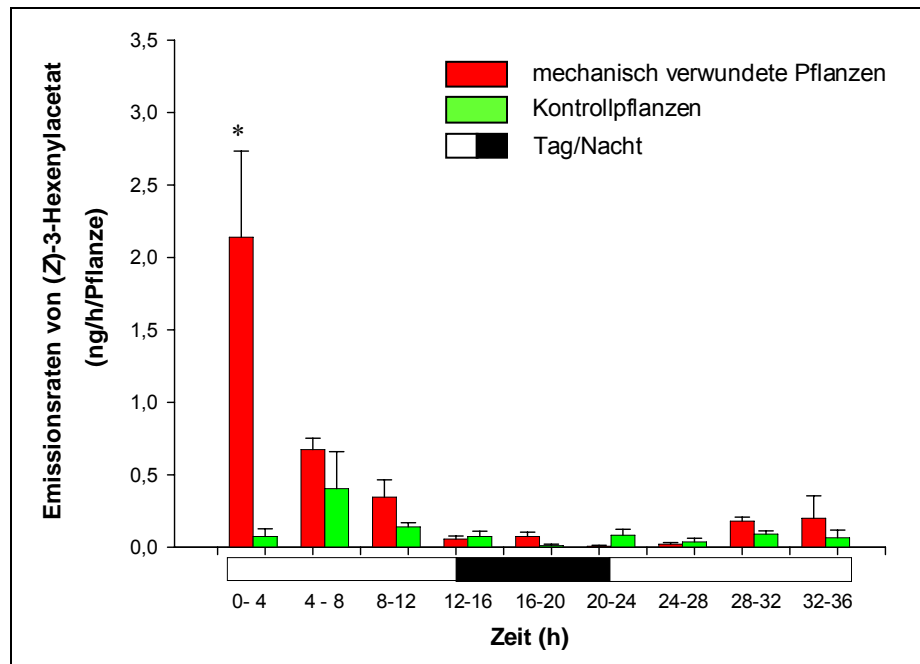


Abbildung 3.3: Emissionsraten von (Z)-3-Hexenylacetat mechanisch verwundeter Pflanzen. Die Abbildung zeigt die Emissionsraten von (Z)-3-Hexenylacetat über einen Zeitraum von 36 h in Intervallen von 4 h nach mechanischer Verwundung der vier jüngsten Blätter. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus n=3, sowie signifikante Unterschiede zwischen mechanisch verwundeten und unverwundeten Pflanzen (* P < 0,05; univariate ANOVA)

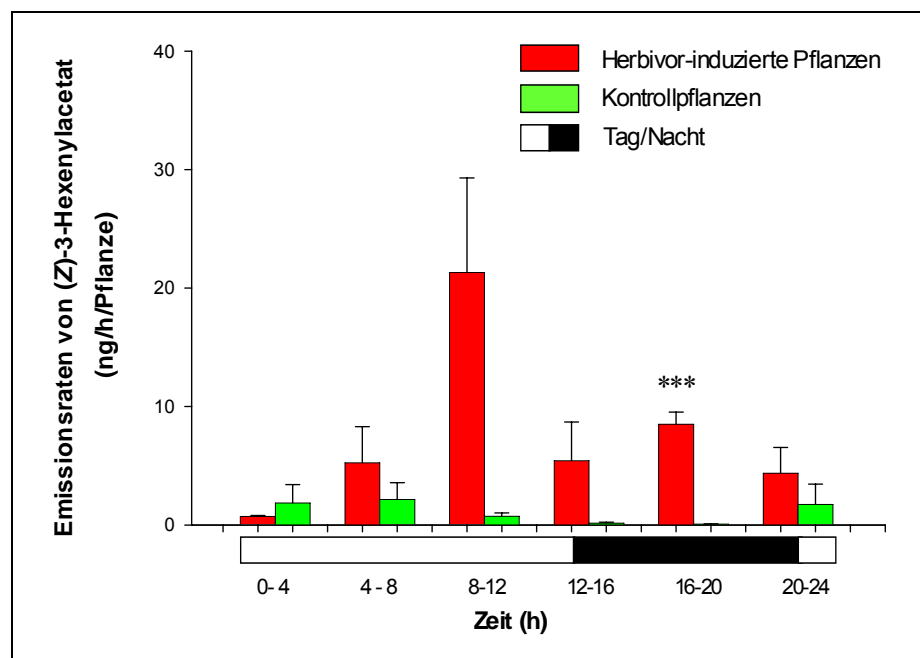


Abbildung 3.4: Emissionsraten von (Z)-3-Hexenylacetat Herbivor-induzierter Pflanzen. Die Abbildung zeigt die Emissionsraten von (Z)-3-Hexenylacetat über einen Zeitraum von 24 h in Intervallen von 4 h bei *S. littoralis* Larvenfraß. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus n=3, sowie signifikante Unterschiede zwischen mechanisch verwundeten und unverwundeten Pflanzen (***) P < 0,001; univariate ANOVA)

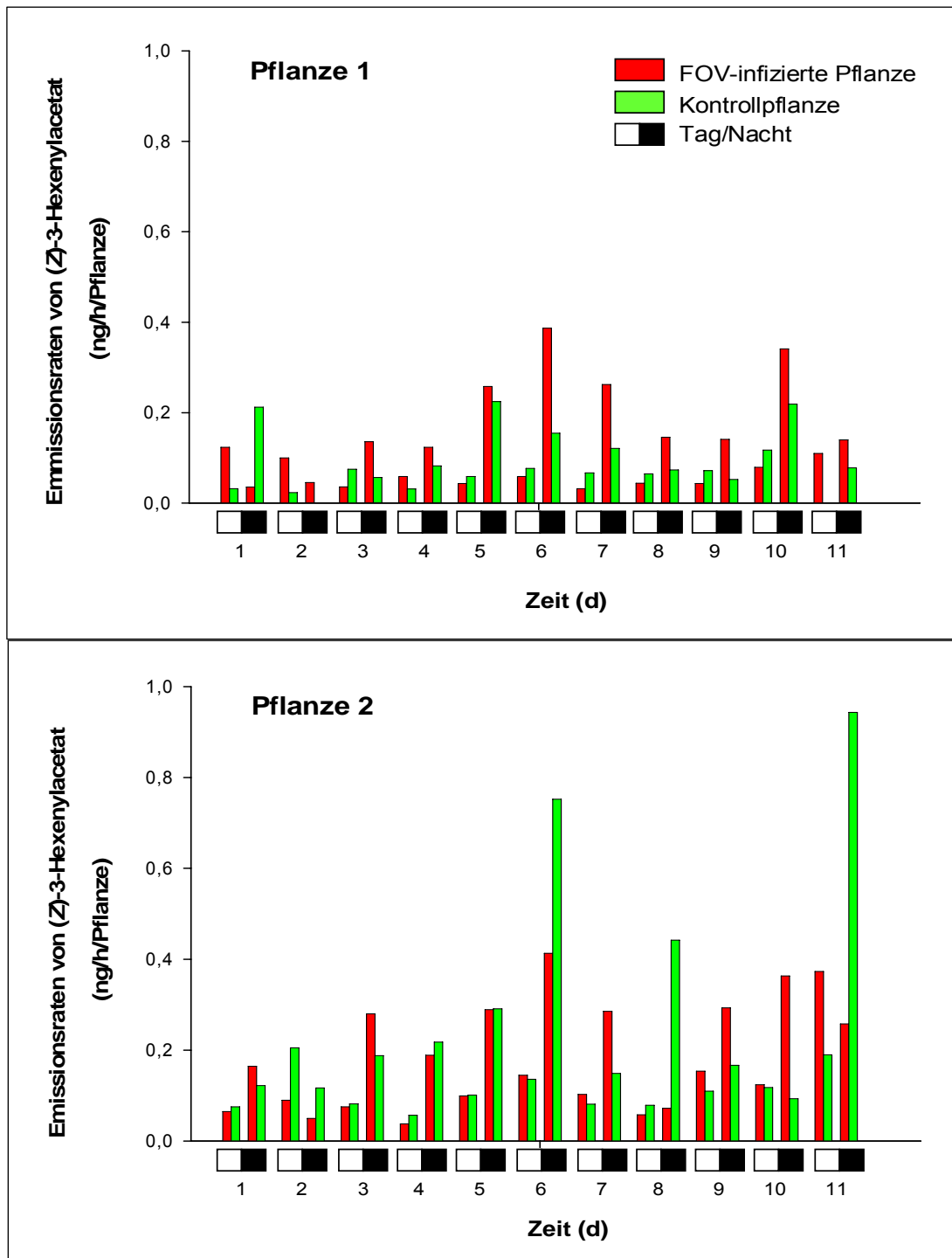


Abbildung 3.5: Emissionsraten von (Z)-3-Hexenylacetat FOV-infizierter Pflanzen Die Abbildung zeigt die Emissionsraten von (Z)-3-Hexenylacetat über einen Zeitraum von 11 Tagen in Tag/Nacht-Intervallen zweier FOV-infizierter Baumwollpflanzen.

3.1.2.2 Quantitative Analyse der Benzylacetat-Emission

In einigen Chromatogrammen mechanisch verwundeter und Herbivor-induzierter Pflanzen, sowie in deren Kontrollpflanzen wurden Spuren des Esters Benzylacetat detektiert. Die Tabelle 3.1 gibt einen Überblick über die detektier- und quantifizierbaren Emissionsraten von Benzylacetat in diesen Pflanzen.

Benzylacetat konnte sowohl in **mechanisch verwundeten**, als auch in deren Kontrollpflanzen in sehr geringen Mengen bis maximal 0,05 pg/h/Pflanze 8-12 bzw. 32-36 h nach Beginn der Messungen gefunden werden. Diese Meßintervalle entsprachen der Tageszeit von 16.00 bis 20.00 Uhr des ersten, sowie des zweiten Versuchstages. Bei den **Herbivor-induzierten** Pflanzen wurde lediglich bei einer Pflanze 8-12 h nach Beginn des Fraßes Benzylacetat (0,05 pg/h/Pflanze) detektiert. Zu diesem Zeitpunkt emittierten jedoch alle drei Kontrollpflanzen Benzylacetat, wobei zwei dieser höhere Emissionsraten von 0,15 bzw. 0,11 pg/h/Pflanze aufwiesen. Darüberhinaus zeigte die Kontrollpflanze 3 als einzige im Zeitraum zwischen 12-20 h eine geringe Emission von Benzylacetat.

Die abgegebene Benzylacetat-Menge von zwei FOV-infizierten Pflanzen, sowie deren Kontrollpflanzen sind in Abbildung 3.6 (Pflanze 1 und 2) dargestellt. Die Pflanze 1 und deren Kontrollpflanze emittierten ab dem dritten Versuchstag Benzylacetat. Wesentliche Unterschiede in den Emissionsraten zwischen der behandelten und der unbehandelten Pflanze waren nicht festzustellen. Die Emissionsraten lagen zwischen 5 bis 25 pg/h/Pflanze. Die Pflanze 2, sowie deren Kontrollpflanze zeigten ein von der Pflanze 1 abweichendes Emissionsmuster. Hier wurde bereits am zweiten Versuchstag von der Kontrollpflanze Benzylacetat freigesetzt. Am vierten Tag konnte sowohl in der FOV-infizierten, als auch in der Kontrollpflanze kein Benzylacetat detektiert werden. Die Emissionsraten lagen, wie schon bei der Pflanze 1 beschrieben meist im Bereich von 5 bis 25 pg/h/Pflanze und wiesen keine Unterschiede zwischen behandelter und unbehandelter Pflanze auf. Eine Ausnahme ist der Tag 11, an dem die Emissionsrate der FOV-infizierten Pflanze mit circa 60 pg/h/Pflanze deutlich höher lag, als alle anderen und mehr als doppelt so hoch wie die Emission der Kontrollpflanze zum gleichen Zeitpunkt. Darüberhinaus ist deutlich erkennbar, daß Benzylacetat in allen Pflanzen mit Ausnahme der Kontrollpflanze 2 in der 6. und 11. Nacht ausschließlich während der Lichtphasen (Tag, 6.00-21.00 Uhr) emittiert wurde.

Tabelle 3.1: Emissionsraten von Benzylacetat mechanisch verwundeter und herbivor-induzierter Pflanzen, sowie deren Kontrollpflanzen. Die Tabelle zeigt die Emissionsraten von Benzylacetat über einen Zeitraum von 36 h nach mechanischer Verwundung, sowie 24 h bei Herbivor-Induktion jeweils in Meßintervallen von 4 h. (n.d.) nicht detektierbar

Art der Behandlung	Zeit (h)	Emmissionsraten von Benzylacetat (pg/h/Pflanze)					
		behandelte Pflanze			Kontrollpflanze		
		1	2	3	1	2	3
mechanische Verwundung	0-4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	4-8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	8-12	0,03	0,05	0,05	0,05	0,05	n.d.
	12-16	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	16-20	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	20-24	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	24-28	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	28-32	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	32-36	0,03	n.d.	n.d.	0,02	n.d.	n.d.
Herbivor- Induktion	0-4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	4-8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	8-12	0,05	n.d.	n.d.	0,04	0,15	0,11
	12-16	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,03
	16-20	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,03
	20-24	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

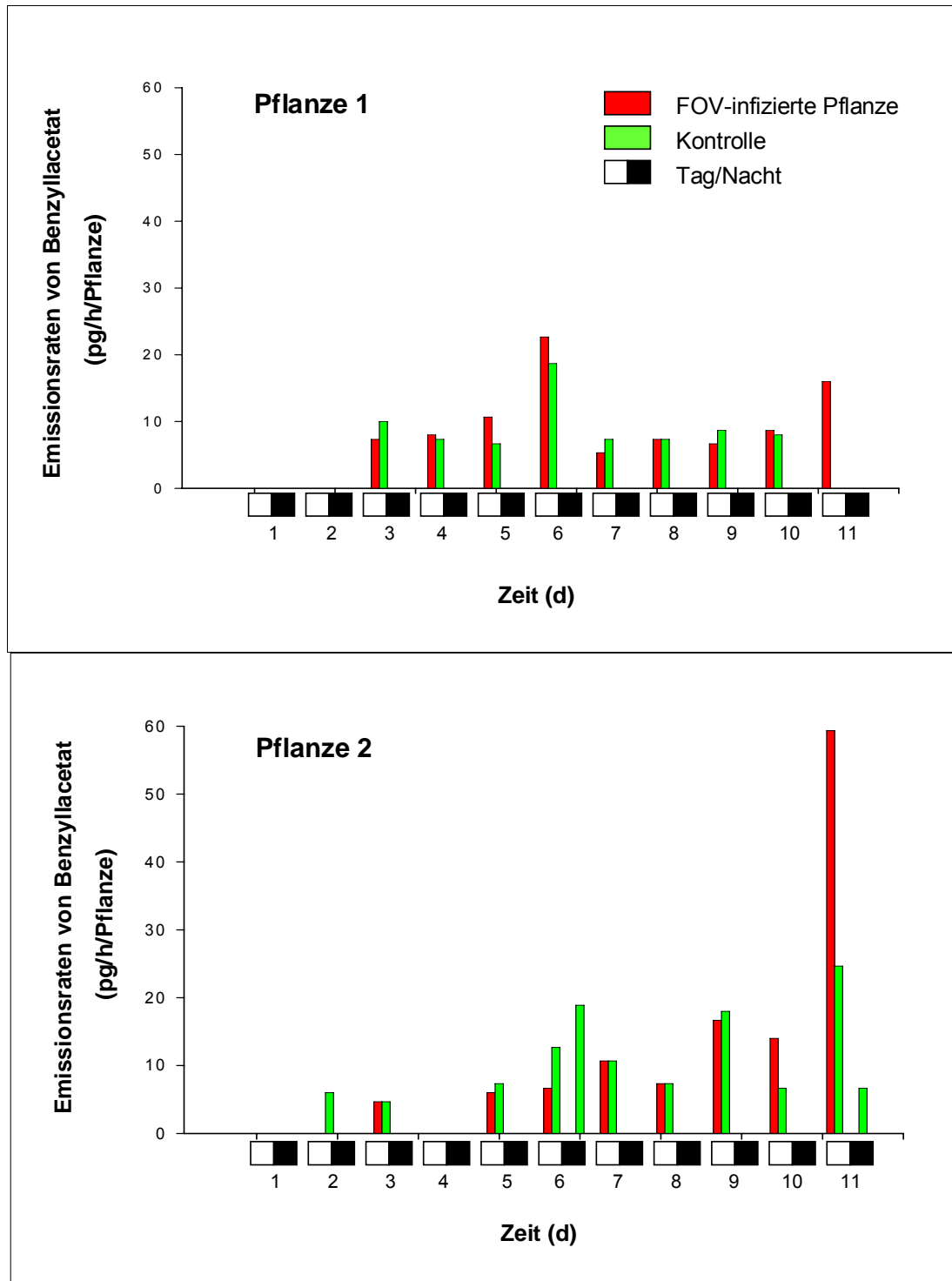


Abbildung 3.6: Emissionsraten von Benzylacetat FOV-infizierter Pflanzen Die Abbildung zeigt die Emissionsraten von Benzylacetat über einen Zeitraum von 11 Tagen in Tag/Nacht-Intervallen zweier FOV-infizierter Pflanzen.

3.1.3 Analyse des Duftstoffspektrums von Baumwollblüten

Da viele Blüten volatile Ester, darunter vor allem den Ester Benzylacetat emittieren, sollte das Duftspektrum von Baumwollblüten analysiert werden.

Die Blüten von *G. hirsutum*, deren Duft für unsere Nase nicht wahrnehmbar ist, emittierten wie die Abbildung 3.7 demonstriert einige Duftstoffe, darunter vor allem der Alkohol 1-Hexanol. Desweiteren wurden Benzaldehyd, Nonylaldehyd, Benzoesäure, Benzen, Decanal und in geringen Mengen die Terpene β -Caryophyllen, α -Humulen und δ -Cadinen freigesetzt. Volatile Ester waren nicht detektierbar.

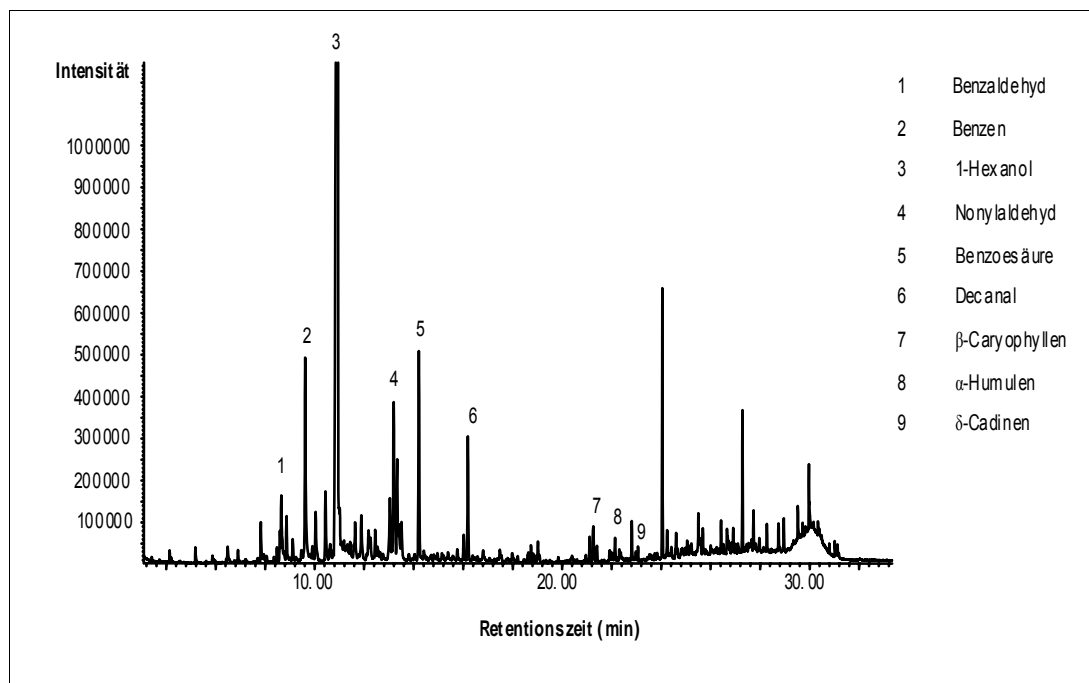


Abbildung 3.7: Duftprofil der Blüten von *G. hirsutum*. Dargestellt ist das komplette Spektrum der von Baumwollblüten emittierten Duftstoffe. Das Chromatogramm resultierte aus 24 h Headspace-Analyse von zwei frisch geernteten Baumwollblüten.

3.2 Identifizierung und Charakterisierung einer Alkoholacyltransferase in *Gossypium hirsutum*

3.2.1 Identifizierung des *GhAAT1*-Gens

Zu Beginn dieser Arbeit wurde die TIGR-EST-Datenbank für Baumwolle mit der Gensequenz von *CHAT* aus *A. thaliana* (D'Auria *et al.*, 2002) abgeglichen. Dabei wurden zwei Baumwoll-ESTs (TC19275) gefunden. Ausgewählt wurde ein 431 bp langes EST (Identifizierungsnummer Ga_Ea0023D14r) das einer EST-Bibliothek aus *G. arboreum*-Fasern entstammte (Abb. 3.8). Es wurden genspezifische Primer erstellt und mittels RACE-PCR die 5'- und 3'-Enden des EST verlängert. Daraus resultierten drei überlappende, je etwa 500 bp lange Genfragmente anhand derer Start- und Stop-Primer erstellt und die vollständige cDNA-Sequenz des gesuchten Gens ermittelt wurde. Das Gen, *GhAAT1* besteht aus 1362 Nukleotiden (Abb. 3.8) und kodiert ein Protein mit für Acyltransferasen charakteristischen Sequenzmotiven. Daher wurde als Bezeichnung die Abkürzung „AAT“ für Alkoholacyltransferase gewählt. Der Präfix „Gh“ spezifiziert die Herkunft des Gens aus *Gossypium hirsutum* und die angehängte Ziffer „1“ steht für die erste in Baumwolle gefundene Alkoholacyltransferase.

Die Amplifikation des *GhAAT1* erfolgte mit der Advantage R2 Polymerase, die keine Korrekturlese-Funktion besitzt. PCR-Wiederholungen mit der Pfu Ultra Polymerase ergaben erneut die vollständige Gensequenz, jedoch wies dieser „full-length-clone“ verglichen mit dem exprimierten Gen *GhAAT1* zwei veränderte Nukleotide auf (Abb. 3.8). Diese führten zum Austausch der entsprechenden AS. Eine dieser Substitutionen, die von Cystein zu Arginin lag an Position 267, die andere von Leucin zu Phenylalanin an Position 306.

3.2.2 Charakterisierung des *GhAAT1*-Enzyms

3.2.2.1 Analyse der Proteinsequenz von *GhAAT1*

Das identifizierte Gen *GhAAT1*, kodiert für ein 454 AS langes Protein mit den für die BAHD-Enzymfamilie charakteristischen, evolutionär hochkonservierten Sequenzmotiven. Das „HXXXD“-Motiv, das etwa in der Mitte der Sequenz (165. bis 169. AS) liegt und essentiell für die katalytische Aktivität ist, beinhaltet im Falle von *GhAAT1* die AS Threonin, Methionin und Serin („HTMSD“, Abb. 3.8 und 3.9). Das nahe dem

1	M	A	P	P	L	T	L	V	L	K	V	H	R	H	E	P	E	L
1	ATGGCGCCT	CCACTTACC	CTAGTGCTC	AAGGTTTAC	CGACATGAA	CCTGAACTA												
19	I	A	P	A	K	P	T	P	H	E	Y	K	L	L	S	D	I	D
55	ATAGCTCCA	GCTAAGCCT	ACCCCTCAT	GAATACAAA	CTATTATCC	GACATCGAT												
37	D	Q	E	G	L	R	F	Q	I	P	V	I	Q	F	Y	K	Y	N
109	GATCAAGAA	GGTCTTCGG	TTCCAAATT	CCGGTTATC	CAATTTTAC	AAATACAAT												
55	P	S	M	Q	G	K	D	P	V	R	V	I	R	E	A	L	A	Q
163	CCTTCCATG	CAAGGAAAA	GACCCGTGT	AGGGTGATC	AGGGAGGCA	CTTGACAAA												
73	A	L	V	F	Y	Y	P	F	A	G	R	L	R	E	G	P	Q	R
217	GCGTTAGTG	TTTTATTAC	CCATTTGCC	GGTAGGCTA	AGGGAAGGA	CCTCAGCGC												
91	K	L	M	V	D	C	T	G	E	G	L	M	F	I	E	A	D	A
271	AAGCTGATG	GTGGATTGC	ACGGGTGAA	GGTCTAATG	TTTATCGAA	GCGGATGCG												
109	D	V	T	L	E	Q	F	G	D	V	L	Q	P	P	F	P	C	L
325	GATVTTACG	CTCGAGCAA	TTTCGGTAT	GTA	CTACTTCAA	CCACCATTG												
127	E	E	L	L	Y	D	V	P	G	S	T	G	V	L	N	C	P	V
379	GAGGAGCTC	CTTTATGAT	GTTCCGGGT	TCTACTGGG	GTGTTGAAT	TGCCCCGTA												
145	I	L	I	Q	V	T	R	L	R	C	G	G	F	I	F	A	L	R
433	ATACTTATT	CAGGTAACG	CGGCTTAGA	TGCGGTGGT	TTTATCTTC	GCCCTTCGC												
163	L	N	H	T	M	S	D	A	A	G	L	A	Q	F	M	S	A	V
487	CTGAACCAC	ACCATGAGC	GATGCTGCT	GGCCTAGCT	CAATTTCAT	TCTGCTGTA												
181	G	E	M	A	R	G	W	L	T	P	S	I	P	P	V	W	E	R
541	GGAGAAATG	GCTCGTGGT	TGGCTTACC	CCATCCATT	CCACCAGTA	TGGGAAAGG												
199	H	L	L	A	A	R	D	P	P	R	V	T	C	K	H	R	E	Y
595	CATTTGTTG	GCGGCTAGA	GATCCACCG	AGAGTCACA	TGTAAGCAT	CGTGAGTAC												
217	E	E	V	E	G	T	I	V	P	Y	D	D	M	V	H	R	S	F
649	GAAGAAGTA	GAGGGAACC	ATTGTCCCC	TACGATGAC	ATGGTCCAT	CGGTCTTTT												
235	F	F	G	P	T	E	V	S	A	L	R	K	L	V	P	E	H	F
703	TTCTTTGGC	CCCACGGAA	GTCTCAGCA	CTTCGAAA	CTTGTTCGG	GAACACTTT												
253	R	K	C	S	T	F	E	L	L	T	A	C	L	W	C(R)	C	R	T
757	CGTAAGTGT	TCAACATTT	GAGCTATTG	ACTGCTTGT	TTATGGTGT	TGTCGAACC												
271	I	A	I	Q	A	N	P	E	E	E	V	R	I	I	C	I	V	N
811	ATCGCAATT	CAAGCTAAT	CCCAGAGAA	GAGGTACGT	ATTATATGC	ATCGTAAAC												
289	A	R	S	R	F	N	P	P	L	P	S	G	Y	Y	G	N	A	L(F)
865	GCACGTTCC	AGGTTTAAT	CCTCCATTA	CCTTCGGGG	TACTACGGG	AATGCACTC												
307	A	F	P	V	A	V	A	Q	A	G	K	L	C	Q	N	P	L	E
919	GCGTTCCCA	GTGGCAGTA	GCACAAGCA	GGGAAACTT	TGTCAAAAA	CCATTAGAG												
325	Y	S	L	E	L	V	K	Q	A	K	N	D	V	T	E	E	Y	M
973	TATTCATTA	GAGCTGGTG	AAACAAGCA	AAGAATGAT	GTAACGGAA	GAATACATG												
343	K	S	L	A	D	L	M	V	I	K	G	R	P	H	F	T	V	I
1027	AAATCATTA	GCAGATTTA	ATGGTGATT	AAGGGTCGA	CCACATTTT	ACGGTTATT												
361	R	S	Y	L	V	S	D	V	T	H	A	R	F	G	D	A	D	F →
1081	CGATCTTAC	CTGGTGTG	GATGTGACA	CATGCCCGG	TTTGGCGAT	GCGGATTTT												
379	G	W	G	K	A	V	Y	G	G	P	A	K	G	G	V	G	A	I
1135	GGGTGGGGC	AAGGCAGTT	TATGGTGGT	CCAGCTAAA	GGTGGAGTA	GGGCAATA												
397	P	G	V	A	S	F	L	I	P	V	K	N	K	K	G	E	A	G
1189	CCTGGAGTA	GCAAGTTTT	CTAATACCA	GTCAAGAAC	AAGAAAGGA	GAGGCTGGA												
415	V	V	L	P	I	T	L	P	A	R	A	M	E	I	F	V	K	E
1243	GTTGTGCTA	CCAATTACG	TTGCCAGCC	CGAGCTATG	GAAATATTT	GTGAAAGAA												
433	L	D	G	M	L	K	G	K	P	I	E	R	K	P	G	F	I	S
1297	TTAGATGGC	ATGTTAAAG	GGAAAGCCA	ATAGAACGT	AAACCCGGT	TTCAATTTCA												
451	S	S	L	▪														
1351	TCTTCCTTG	TAAAAGTAA	TAAGTGAAA	ATCTAAAAGT	TCAGCATTG	GTAAGGTAG												
1405	TTTACTAGT	CATCTTTAG	GCGTGGGAC	TCCTTTTAT	ATGTTCACT	ATATTATAG												
1459	AACTATATA	CATTTGGTA	AAAAAAAAA	AAAAAAAAA	AAA													

Abbildung 3.8: Vollständige Nukleotid- und AS-Sequenz von GhAAT1. Dargestellt ist die vollständige Nukleotidsequenz (5' → 3'), sowie die daraus abgeleitete AS-Sequenz und die charakteristischen BAHD-Motive **HXXXD** und **DFGWG**. Das 431 bp lange **EST Ga_Ea0023D14r** reicht teilweise über das 3'-Ende des Gens **hinaus**. Weiterhin sind die **AS-Substitutionen** an der AS-Position 267 und 306 des „full-length-clone“ markiert.

C-Terminus (377. bis 381. AS) befindliche „DFGWG“-Motiv, das für den strukturellen Aufbau wichtig ist, wurde ebenfalls in den Abbildungen 3.8 und 3.9 markiert. Das kalkulierte Molekulargewicht beträgt 50,7 kD.

3.2.2.2 Vergleich der AS-Sequenz von GhAAT1 mit anderen Alkoholacyltransferasen

Der Abgleich der AS-Sequenz von GhAAT1 mit der NCBI-Datenbank erbrachte eine Reihe von übereinstimmenden AS-Sequenzen anderer pflanzlicher Alkoholacyltransferasen. Einige ähnliche Proteine, die in Tabelle 1.1 näher erläutert sind, wurden ausgewählt und der Sequenz von GhAAT1 gegenübergestellt (Abb. 3.9).

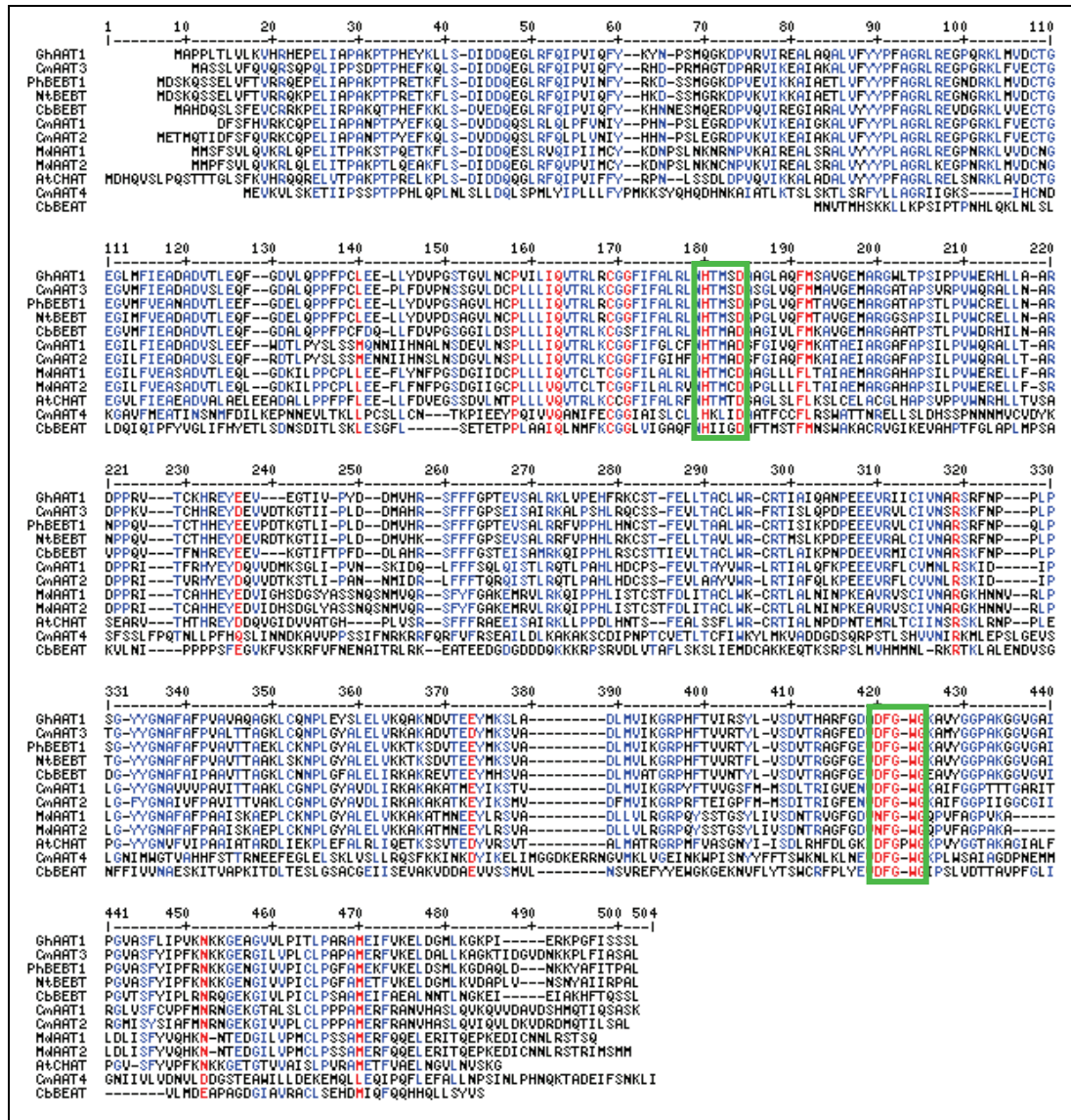


Abbildung 3.9: Vergleich der AS-Sequenz von GhAAT1 mit anderen pflanzlichen Alkoholacyltransferasen. Die Abbildung zeigt ein Alignment von GhAAT1 mit Alkoholacyltransferasen aus *Cucumis melo* (CmAAT1-4), *Petunia hybrida* (PhBEBT1), *Nicotiana tabacum* (NtBEBT), *Clarkia brewerii* (CbBEBT und CbBEAT) und *A.thaliana* (AtCHAT), sowie zwei Alkoholacyltransferasen aus *Malus pumila* (MdAAT1 und 2). Nähere Erläuterungen zu den hier aufgeführten Proteine, sowie deren NCBI-Accessionnummer sind in der Tabelle 1.1 aufgelistet. Rot markierte AS sind in allen acht Sequenzen und blau markierte sind in mindestens vier Sequenzen identisch. Zusätzlich wurden die hochkonservierten Motive „HXXXD“ und „DFGWG“, die für alle Alkoholacyltransferasen charakteristisch sind grün eingrahmt.

Der Grad der Identität war dabei sehr unterschiedlich. Während beispielsweise die AS-Sequenz von GhAAT1 mit CmAAT3 73% , und mit PhBEBT1 und NtBEBT zu je 75% identisch waren, betrug die Identität zu CbBEBT 69% und zu MdAAT1 und 2 jeweils nur 52%. AtCHAT, CmAAT2 und CmAAT1 waren 50% bzw. 48% identisch mit GhAAT1, wohingegen CmAAT4 und die zweite Alkoholacyltransferase aus *Clarkia brewerii* CbBEAT nur noch eine Sequenzähnlichkeit von 15 bzw. 13% zu GhAAT1 aufwiesen.

3.2.2.3 Heterologe Expression und Reinigung des GhAAT1-Proteins

Zur genauen enzymatischen Charakterisierung wurde das identifizierte *GhAAT1* in einem heterologen System überexprimiert und gereinigt. Die Proteinüberexpression erfolgte mit dem Vektor pET-28a(+) in BL21(DE3) *E.coli* Zellen. Als Kontrolle der Expression diente der pET-28a(+)-Vektor ohne Sequenzinsert („leerer“ Vektor).

Das in der Abbildung 3.10 dargestellte, mit Coomassie angefärbte 12%ige SDS-Polyacrylamidgel zeigt die Überexpression von *GhAAT1* (Proteinrohextrakt, Abb. 3.10 B) im Vergleich zum „leeren“ Vektor (Abb. 3.10 A). Es wurde jeweils eine Probe des löslichen Proteinüberstands (Ü), sowie der abgetrennten und resuspendierten Zellbestandteile (Pellet, P) aufgetragen. Deutlich sichtbar präsentierte sich im Proteinrohextrakt verglichen mit den Standardproteinen der 10 kD-Leiter eine etwas mehr als 50 kD große Proteinbande. Diese stimmte mit dem vorhergesagtem Molekulargewicht von 50,7 kD überein und war in den aufgetragenen Extrakten des „leeren“ Vektor nicht zu sehen. Die Bande war kaum im löslichen Überstand, sondern hauptsächlich im Pellet des Rohextraktes zu finden. Das ist ein Hinweis darauf, daß sich das überexprimierte Protein in von *E.coli* Zellen gebildeten Einschlußkörpern befand. Dadurch verringerte sich die Ausbeute merklich, was aber ein allgemeines Problem bei der Überexpression von BAHD-Acyltransferasen darstellt.

Für die biochemische Charakterisierung von GhAAT1 konnte der noch mit bakteriellen *E.coli* Proteinen verunreinigte Rohextrakt nicht verwendet werden. Daher wurde die als His 6-Hybridprotein exprimierte GhAAT1 mittels Flüssigkeitschromatographie (FPLC) aufgereinigt. Der für diese Aufreinigung verwendete Puffer enthielt als Bindeanalogon zum Histidin Imidazol, das möglicherweise die Enzym-Substrat-Reaktionen beeinflussen könnte. Aus diesem Grunde wurde der Puffer gegen normalen Lysepuffer austauscht. Bevor dies jedoch, geschah wurden die ennur geringe Konzentrationen enthaltenden FPLC-Fractionen konzentriert. Das His-tag gereinigte (H), das konzentrierte GhAAT1-Protein (K), sowie das gereinigte, konzentrierte Protein nach Austausch des Puffers (R) sind in der Abbildung 3.10 C dargestellt.

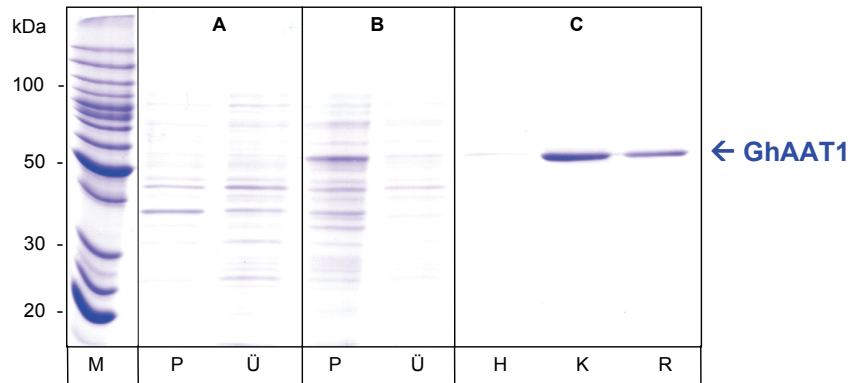


Abbildung 3.10: SDS-PAGE des exprimierten und gereinigten GhAAT1-Proteins.

Ein 12%iges SDS-Polyacrylamidgel wurde mit Proben des in *E.coli* BL21(DE3) überexprimierten „leeren“ pET28a(+)-Vektors (A) und des GhAAT1-Proteins (B), sowie mit Proben der einzelnen Aufreinigungsschritte (C) beladen und mit Coomassie angefärbt. M: 10kD-Molekulargewichtsmarker, Ü: löslicher Proteinüberstand, P: resuspendiertes Pellet, H: His-tag-gereinigtes Protein, K: konzentriertes Protein, R:reines Protein nach Pufferaustausch

Veränderungen des Volumens, der Aktivität und der Proteingesamtmenge während der Aufreinigung sind in Tabelle 3.2 aufgelistet. Anhand dieser Daten wurde der Aufreinigungsfaktor sowie die prozentuale Ausbeute nach jedem Reinigungsschritt ausgehend vom verunreinigten Rohextrakt mit einem Gesamtvolumen von 50 ml bestimmt. Die Entfernung bakterieller *E.coli* Proteine während der His-tag-Reinigung resultierte in einer 160fach reineren Proteinlösung und einem Verlust von 35% der Gesamtaktivität. Die anschließende 20 fache-Verringerung des Volumens auf 2,5 ml erhöhte den Aufreinigungsfaktor auf 179, wobei die Ausbeute um weitere 33% abnahm. Nach Austausch des Puffers war das Protein 336fach reiner als der ursprüngliche Proteinrohextrakt und besaß eine spezifische Aktivität von 53,01 nkatal/mg bei einem hochgerechnetem Gesamtvolumen von 3,75 ml.

Die Erhöhung des Volumens kam durch den Pufferaustausch zustande, da zwar nur 1 ml der konzentrierten Proteinlösung auf die PD-10-Säule aufgetragen, anschließend aber mit 1,5 ml Lysepuffer eluiert wurde. Insgesamt wurde zweimal von je 1 ml konzentrierter Proteinlösung der Puffer ausgetauscht, wobei nur von einer dieser Fraktionen die Proteinmenge bestimmt werden konnte. Daher stellen die Werte hinsichtlich des reinen Proteins nach dem Pufferaustausch lediglich hochgerechnete Werte ($2,5 \text{ ml} \cdot 1,5 = 3,75 \text{ ml}$) der einen Fraktion dar. Die ermittelte Ausbeute von 41% erscheint unwahrscheinlich in Anbetracht dessen, daß nach der Aufkonzentrierung nur noch 32% der ursprünglichen Aktivität vorhanden waren. Diese Abweichung könnte einerseits durch die Hochrechnung bei der Bestimmung der Ausbeute, andererseits aber auch durch Ungenauigkeiten bei der Quantifizierung der Proteinmenge verursacht worden sein. Darüberhinaus könnte

bereits die Gesamtaktivität des konzentrierten und des His-tag-gereinigten Proteins durch das im Puffer vorhandene Imidazol beeinflusst worden sein, was eine zusätzliche Verschiebung der prozentualen Werte der Ausbeute bewirkt haben könnte.

Tabelle 3.2: Exemplarische Aufreinigungstabelle. Aufgelistet ist das Volumen, die Aktivität, die Proteinmenge und die daraus resultierende spezifische Aktivität der einzelnen gereinigten Fraktionen. Die Proteinmenge wurde ¹ nach Bradford, ² mit „GeneTool“ und ³ mit dem Micro-BCA-Test quantifiziert. Der Faktor der Aufreinigung wurde über die spezifische Aktivität und die Ausbeute über die Aktivität bestimmt. Das Volumen der Proteinlösung nach dem Pufferaustausch ⁴ stellt lediglich eine Hochrechnung aus 1 ml konzentrierten Protein dar.

	Volumen (ml)	Aktivität (nkatal)	Proteinmenge (mg)	spezifische Aktivität (nkatal/mg)	Aufreinigungsfaktor	Ausbeute (%)
Proteinrohextrakt	50	14,06	89,05 ¹	0,16	1	100
His-tag-gereinigtes Protein	50	9,13	0,36 ²	25,21	160	65
konzentriertes Protein	2,5	4,55	0,16 ²	28,21	179	32
Protein nach Pufferaustausch	3,75 ⁴	5,75	0,11 ³	53,01	336	41

3.2.2.4 Funktionelle Analyse des identifizierten GhAAT1-Enzyms

Zur Charakterisierung der katalytischen Aktivität wurde das exprimierte und gereinigte GhAAT1-Protein mit potentiellen Substraten inkubiert. Als mögliche Substrate wurden (Z)-3-Hexenol und Benzylalkohol in Kombination mit Acetyl-CoA ausgewählt. Um dieses Spektrum zu erweitern wurde eine dritte Kombination, Benzylalkohol mit Benzoyl-CoA, in die Tests mit aufgenommen (Abb. 3.11).

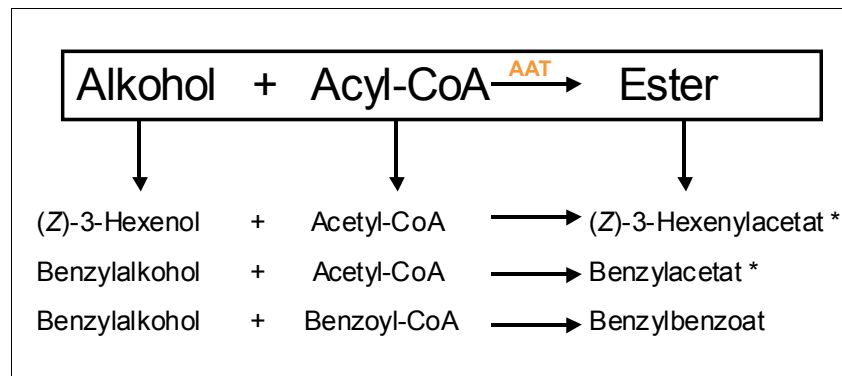


Abbildung 3.11: Potentielle Substratkombinationen für GhAAT1 und deren Produkte. Alkoholacyltransferasen (AAT), die Schlüsselenzyme der Esterbiosynthese katalysieren den letzten Schritt der Esterbildung durch eine Transacylierung von einem Acyl-CoA (Donor) zu einem Alkohol (Akzeptor). Die mit * gekennzeichneten Ester werden von *G.hirsutum* emittiert.

Diese möglichen Substratkombinationen wurden zunächst in einfachen Enzym-Substrat-Reaktionen eingesetzt und die Reaktionsprodukte gaschromatographisch analysiert. Die Ergebnisse dieser Analysen sind in Abbildung 3.12 dargestellt.

Nach der Inkubation von GhAAT1 mit Benzylalkohol und Benzoyl-CoA (Abb. 3.12, A) konnte kein mit dem Benzylbenzoat-Standard übereinstimmendes Produkt detektiert werden. Das obere Chromatogramm zeigte ebenso wie der Kontrollassay mit denaturiertem Enzym, nur ein Signal, das dem als Substrat eingesetzten Benzylalkohol entsprach.

Bei der Analyse der Substratkombination (Z)-3-Hexenol mit Acetyl-CoA (Abb. 3.12, B) konnte im Chromatogramm lediglich (Z)-3-Hexenol, jedoch nicht das zu erwartende Produkt (Z)-3-Hexenylacetat detektiert werden.

Wurden jedoch Benzylalkohol und Acetyl-CoA als Substrate eingesetzt, war das zu erwartende Produkt, der Ester Benzylacetat, eindeutig nachweisbar (Abb. 3.12, C). Dieses Ergebnis veranschaulicht, daß GhAAT1 Benzylalkohol und Acetyl-CoA als Substrate akzeptiert und zu Benzylacetat umsetzt.

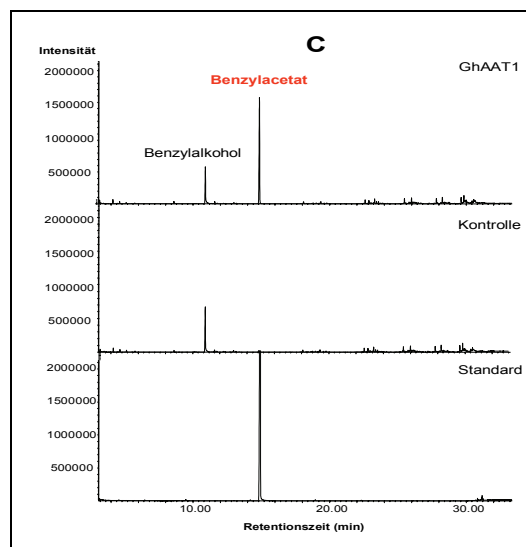
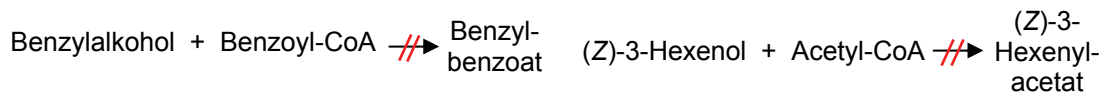
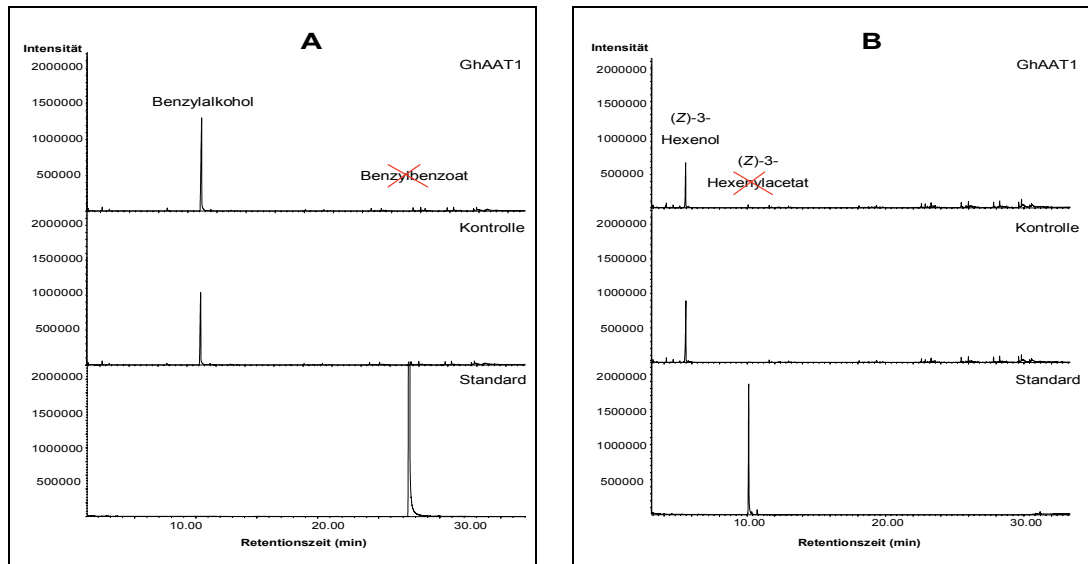


Abbildung 3.12 Gaschromatographische Analyse nach Inkubation von GhAAT1 mit potentiellen Substraten. Nach der Inkubation des aufgereinigten Proteins mit den Substraten **(A)** Benzylalcohol und Benzoyl-CoA, **(B)** (Z)-3-Hexenol und Acetyl-CoA und **(C)** Benzylalcohol und Acetyl-CoA wurden die Reaktionsprodukte gaschromatographisch aufgetrennt, analysiert und mit dem jeweiligen kommerziell erhältlichen **Standard** verglichen. Assays mit denaturiertem GhAAT1 dienten als **Kontrolle**.

3.2.2.5 biochemische Charakterisierung des GhAAT1-Enzyms

Um optimale Reaktionsbedingungen für GhAAT1 zu schaffen, wurde Bis-Tris-Propan (pH-Bereich von 6,3 bis 9,0) als Assaypuffer ausgewählt. Das **pH-Optimum** lag bei 7,1. Bei einem pH von 9,0 wies das Enzym nur etwa 20%, im Pufferbereich pH 6,3 - 6,9 noch 70 - 80% der maximalen Aktivität auf (Daten nicht gezeigt).

Desweiteren wurde die Stabilität des GhAAT1-Proteins bei verschiedenen **Temperaturen** (Abb. 3.13) getestet. Das Protein wies nach einer 30-minütigen Inkubation bei 4°C die höchste Aktivität auf, diese sank jedoch bereits bei einer Inkubationstemperatur von 22°C um etwa ein Viertel, bei 37°C sogar um circa die Hälfte. Nach einer Inkubation von 30 min bei 50°C war das Enzym komplett inaktiv.

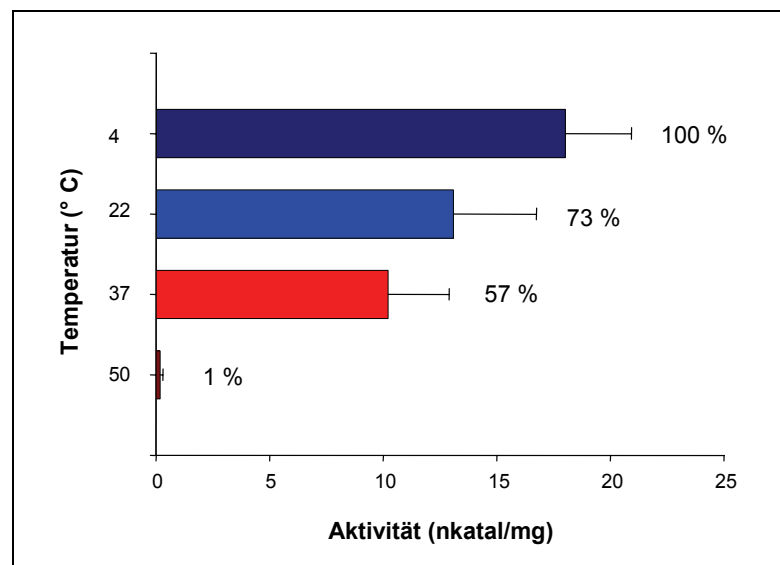


Abbildung 3.13: Einfluß der Temperatur auf die Stabilität (Aktivität) von GhAAT1. Dargestellt ist die Aktivität, die GhAAT1 nach einer 30-minütigen Inkubation bei 4, 22, 37 und 50°C aufwies. Die Aktivität des bei 4°C inkubierten Enzyms wurde gleich 100% gesetzt. (n=3)

Im Zuge der biochemischen Charakterisierung des Enzyms wurde auch der Einfluß verschiedener mono- und divalenter **Kationen** auf die Aktivität von GhAAT1 (Abb. 3.14) untersucht. Die Ergebnisse zeigten, daß einige der Metallionen bei einer Konzentration von 5 mM die Enzymaktivität erhöhen. Dazu gehörten die Ionen von Kalium und Natrium, die beide eine Aktivitätserhöhung von mehr als einem Drittel bewirkten, aber auch Magnesium- und Cobalt-Ionen steigerten die GhAAT1-Aktivität geringfügig. Dagegen zeigten die Ionen von Calcium, Eisen, Mangan, Kupfer und Zink die für BAHD-Acyltransferasen bekannten inhibitorischen Effekte (9-37% bei einer Endkonzentration von 5 mM), wobei Kupfer und Zink die Enzymaktivität nahezu vollständig hemmten.

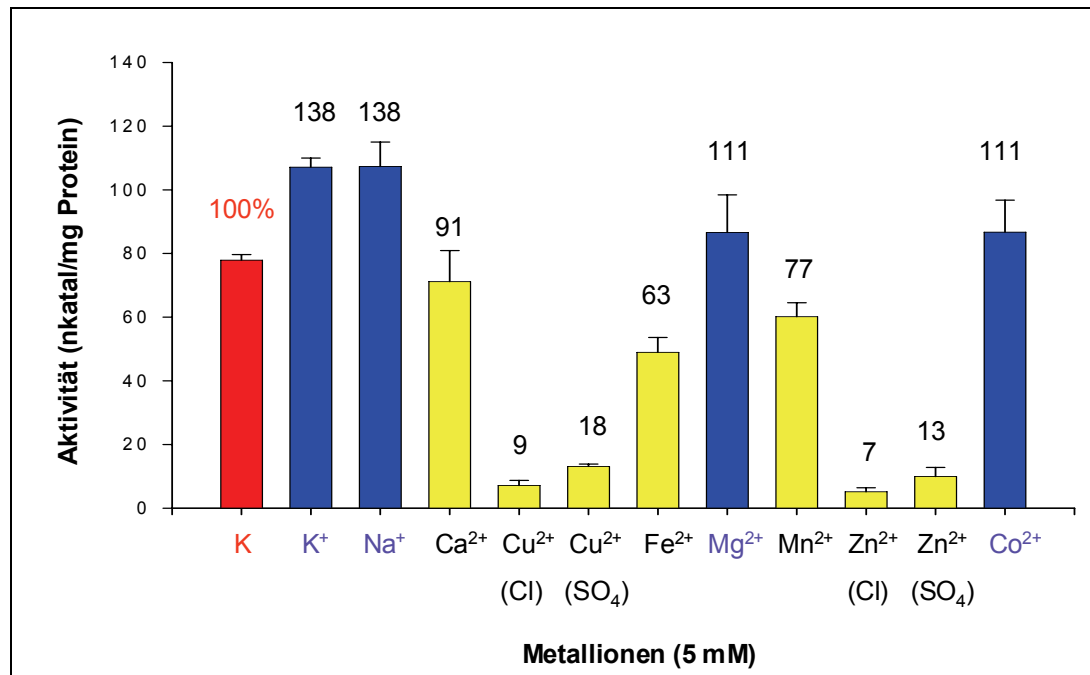


Abbildung 3.14: Effekte verschiedener Metallionen auf die Aktivität von GhAAT1. Dargestellt ist die Aktivität, die GhAAT1 nach Zugabe von je 5 mM der mono- und divalenten Kationen von Kalium (K⁺), Natrium (Na⁺), Calcium (Ca²⁺), Kupfer (Cu²⁺), Eisen (Fe²⁺), Magnesium (Mg²⁺), Mangan (Mn²⁺), Zink (Zn²⁺) und Cobalt (Co²⁺) aufwies. Die Ziffer über dem jeweiligen Balken entspricht dem prozentualen Anteil der Aktivität im Vergleich zur Kontrolle (K=100%, ohne Zugabe von Metallionen). Ziffern > 100 verdeutlichen den **stimulierenden**, Ziffer < 100 beschreiben den **inhibierenden** Effekt eines Metallions auf die Enzymaktivität. (n=3)

Um den bei der GC-MS-Produktanalyse gezeigten Trend der Substratpräferenz gegenüber Benzylalkohol als Akzeptor der Transacylierungs-Reaktion zu beweisen, wurde die relative Aktivität von GhAAT1 für diese Verbindung, sowie für weitere neunzehn Alkoholen ermittelt. Die in der Tabelle 3.3 aufgelisteten prozentualen Aktivitäten bekräftigen, daß GhAAT1 in Verbindung mit Acetyl-CoA ausschließlich Benzylalkohol als Alkoholsubstrat nutzt. Um die Bevorzugung von Acetyl-CoA als Donor zu unterstreichen wurden Enzym-Substrat-Reaktionen, sogenannte Konkurrenzassays, mit radioaktiv markiertem Acetyl-CoA, sowie mit jeweils 1 mM eines weiteren Acyl- (Malonyl-, Cinnamoyl-, Benzoyl-, Caffeyol-, Hexanoyl- und Butyryl-) CoAs, durchgeführt. Da die meisten dieser Acyl-CoAs nicht kommerziell erhältlich waren und erst synthetisiert werden mußten, konnte dieser Assay nur ein einziges Mal durchgeführt werden. Die hierbei erzielten Ergebnisse waren nicht so eindeutig, standen aber auch nicht in Widerspruch zu der zuvor gezeigten Präferenz von GhAAT1 für Acetyl-CoA

Tabelle 3.3: Relative Aktivität von GhAAT1 gegenüber verschiedenen Alkoholen. Ermittelt wurde die relative Aktivität von GhAAT1 mit jeweils Acetyl-CoA als Donor und den in der Tabelle aufgelisteten verschiedenen Alkoholen als Akzeptor. Alle Alkoholsubstrate wurden in Konzentrationen von 1mM getestet.* Die Aktivität gegenüber Benzylalkohol wurde 100% gesetzt und die Aktivitäten der anderen Alkohole als prozentuale Anteile dieser wiedergegeben.

Alkoholsubstrat	relative Aktivität (%)	Alkoholsubstrat	relative Aktivität (%)
Benzylalkohol	100 *	Eugenol	0
2-Phenylethanol	2	Isoeugenol	0
(E)-2-Hexen-1-ol	2	2-Phenyl-2-propanol	0
Cinnamylalkohol	0	Methanol	0
(Z)-3-Hexenol	2	Ethanol	0
1-Hexanol	1	1-Butanol	1
2-Hexanol	0	1-Heptanol	0
3-Hexanol	0	1-Octanol	2
3-Hydroxybenzylalkohol	5	1-Decanol	0
4-Hydroxybenzylalkohol	0	1-Dodecanol	1

Um die qualitativen Eigenschaften, Substrataffinität und -spezifität von GhAAT1 bezüglich der Präferenz für Benzylacetat und Acetyl-CoA mit denen anderer BAHD-Alkoholacyltransferasen zu vergleichen, wurden die kinetischen Parameter K_m , V_{max} , k_{cat} , sowie das Verhältnis von k_{cat} zu K_m bestimmt. Die Bestimmung der K_m -Werte für beide Substrate erfolgte mit Hilfe des Enzym-Moduls von SigmaPlot 7.0, wobei jeweils die Aktivitäten von sieben verschiedenen Konzentrationen mit wiederum drei Wiederholungen in die Berechnungen einfließen. Die Kurven, die der Michaelis-Menten-Kinetik folgen sind in Abbildung 3.15 dargestellt.

Die Bestimmung des K_m -Wertes für Acetyl-CoA gestaltete sich schwierig, da mit der maximalen Acetyl-CoA-Konzentration von 1 mM keine Sättigung erreicht wurde (Abb. 3.15, A). Der berechnete K_m -Wert war dementsprechend mit $702,5 \pm 80,2 \mu\text{M}$ sehr hoch. Daraus ergab sich, daß die K_m -Wert-Bestimmung für Benzylalkohol nur mit einer konstanten Acetyl-CoA-Konzentration von 7 mM exakt durchgeführt werden konnte. Diese Kurve zeigt im verwendeten Konzentrationsbereich von 12,5 bis 500 μM Benzylalkohol die gewünschte Sättigung (Abb. 3.15, B). Der K_m -Wert für Benzylalkohol betrug $71,4 \pm 9,9 \mu\text{M}$.

Die kinetischen Parameter sind in Tabelle 3.4 zusammengefasst. Die maximalen Umsatzgeschwindigkeiten (V_{max}) betragen für Acetyl-CoA $44,3 \pm 2,7$ und für Benzylalkohol $65,0 \pm 3,0 \text{ nmol/sec} \cdot \text{mg}$. Die katalytische Konstante k_{cat} , die die Geschwindigkeit der Produktbildung beschreibt, entspricht dem theoretischen Maximum der molaren Aktivität. Ein hoher k_{cat} -Wert weist demnach auf einen schnellen Substratumsatz hin. Die Werte für Acetyl-CoA und für Benzylalkohol ($2,3$ und $3,3 \text{ sec}^{-1}$) deuten auf ein vergleichsweise langsames Enzym hin. Der Quotient

aus der katalytischen Konstante k_{cat} und dem K_{m} -Wert erlaubt einen Vergleich zwischen verschiedenen Substraten hinsichtlich ihrer physiologischen Effektivität, sowie zwischen Enzymen ein und derselben Klasse. Ein größerer Quotient bedeutet höhere Substrataffinität und/oder Umsatzrate. Das $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ -Verhältnis für Benzylacetat war zwar mit $46,2 \text{ sec}^{-1}\text{nM}^{-1}$ mehr als 10fach höher als das von Acetyl-CoA, lag aber dennoch unter denen von anderen BAHD-Acyltransferasen.

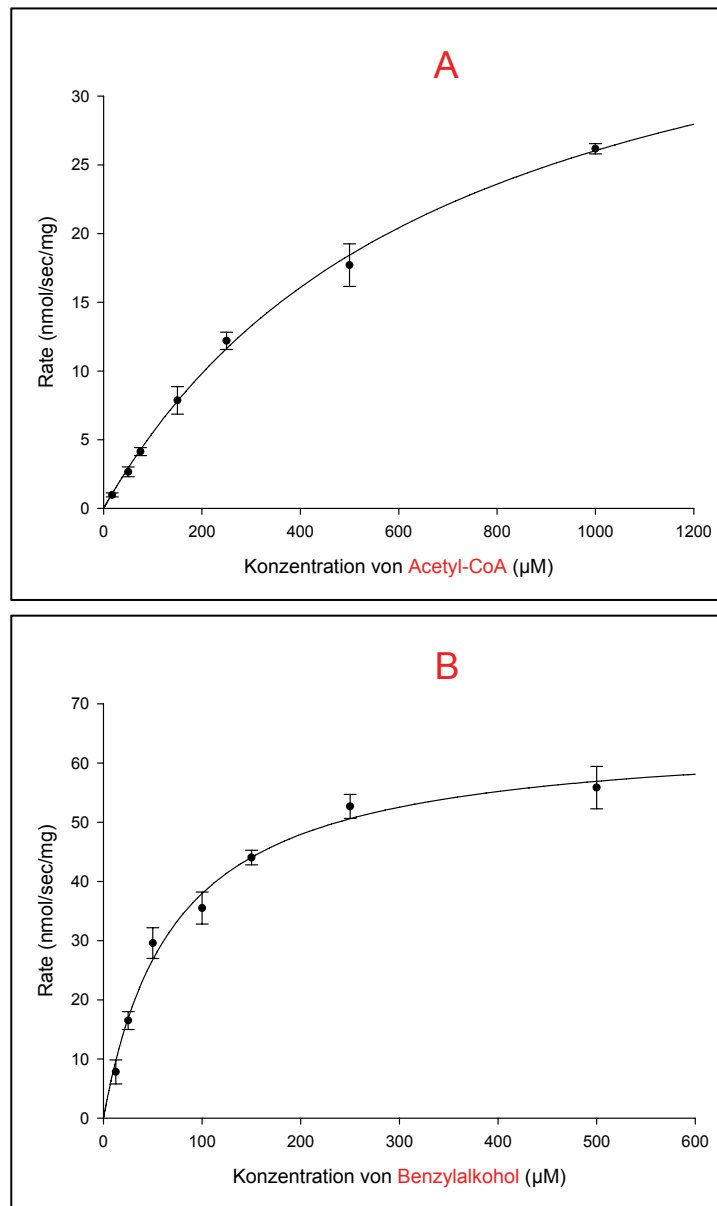


Abbildung 3.15: Michaelis-Menten-Kinetik des Enzyms GhAAT1 für die Substrate Acetyl-CoA und Benzylalkohol. Dargestellt sind die mit SigmaPlot 7.0 (Enzym-Modul) erstellten Michaelis-Menten-Graphen für das Substrat **A** Acetyl-CoA mit 1mM Benzylalkohol und **B** Benzylalkohol mit 7mM Acetyl-CoA.

Tabelle 3.3: Kinetische Parameter von GhAAT1 für Acetyl-CoA und Benzylalkohol.

Substrat	K_m (μM)	V_{max} ($\text{nmol}/\text{sec} \cdot \text{mg}$)	k_{cat} ($1/\text{sec}$)	k_{cat}/K_m $\text{sec}^{-1}\text{nM}^{-1}$
Acetyl-CoA mit 1 mM Benzylalkohol	702,5 $\pm 80,2$	44,3 $\pm 2,7$	2,3	3,2
Benzylalkohol mit 7 mM Acetyl-CoA	71,4 $\pm 9,9$	65,0 $\pm 3,0$	3,3	46,2

3.3 GhAAT1-Expression in *G. hirsutum*

Neben der Identifizierung, Überexprimierung und Charakterisierung der Alkoholacyltransferase GhAAT1 aus *G. hirsutum* war ein weiteres Ziel dieser Arbeit, die Expression des GhAAT1-Gens auf transkriptioneller Ebene zu erforschen. Dabei lag der Augenmerk weniger auf der organspezifischen Ausprägung, als vielmehr auf eventuellen Unterschieden der Genexpression in Blättern unterschiedlich behandelte Baumwollpflanzen. Zur Expressionsanalyse wurde die Methode der quantitativen real-time PCR (qRT-PCR) ausgewählt. Leider gelang es im Zeitrahmen dieser Arbeit nicht, diese Methode an das GhAAT1-*G. hirsutum*-System anzupassen, wodurch letztendlich keinerlei Ergebnisse bezüglich der Genexpression von GhAAT1 in der Pflanze erhalten werden konnten.

Problematisch gestaltete sich bereits die Isolierung von Gesamt-RNA, da die RNA-Ausbeute aus Blattmaterial von *G. hirsutum* verglichen mit beispielsweise der Modellpflanze *A. thaliana* sehr gering war (Daten nicht dargestellt). Um die Ausbeute an RNA zu erhöhen, wurden daher verschiedene Methoden der Isolierung getestet. Die Ausbeuten an RNA, die mit dem kommerziellen Kit der Firma Invitex, der Trizol-Methode und der Methode nach Wu (2002) erzielt wurden, lagen jeweils zwischen 100-300 μg pro 1 g Blattmaterial. Mit dem Qiagen-Kit, sowie der LiCl-Methode wurden Ausbeuten zwischen 200-600 μg pro 1 g Blattmaterial erzielt. Die mit dem Bioanalyzer analysierten RNA-Proben (Abb. 3.16) zeigten jedoch, daß nur mit der LiCl-Methode reproduzierbar qualitativ hochwertige, d.h. nicht degradierte RNA isoliert wurde, die für die cDNA-Synthese verwendet werden konnte.

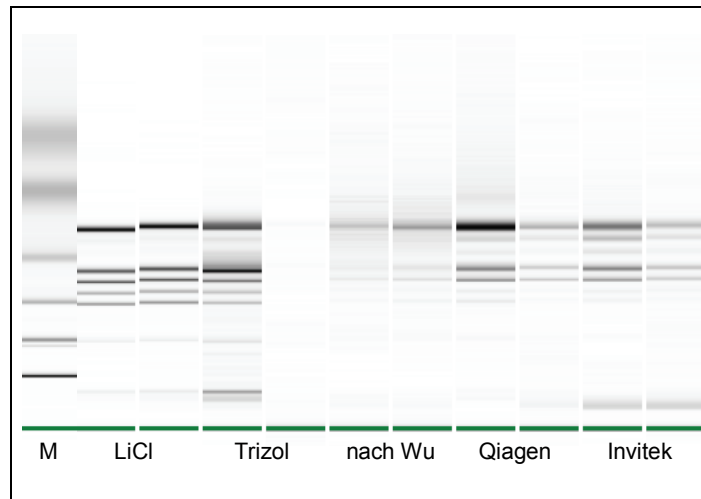


Abbildung 3.16: Kapillarelektrophoretische Auftrennung von Gesamt-RNA aus *G. hirsutum*, die mit verschiedenen Methoden isoliert wurde. Dargestellt sind jeweils zwei unabhängige Isolierungen von Gesamt-RNA mit der LiCl-, der Trizolmethode, der Methode nach Wu (2002), sowie mit den kommerziell erhältlichen Kits der Firmen Qiagen und Invitex. Die erste Spur zeigt den RNA 600-Leiter (Marker, M). Die kapillarelektrophoretische Auftrennung erfolgte mit dem Bioanalytiker.

Ein weiteres Problem bestand in der Optimierung der qRT-PCR. Die erstellten Primer (Tab. 2.5) zeigten zwar sehr gute Effizienzen (etwa 99%), jedoch konnten für die als „Normalizer“ gewählten Gene *APT1* (Adenosinphosphoribosyltransferase) und *RP2/s* (RNA-Polymerase 2, kleine Unterheit) keine konstanten Genexpressionen nachgewiesen werden. Aufgrund dessen war es nicht möglich aus behandelten und unbehandelten Blättern gewonnene cDNA miteinander zu vergleichen.

4 Diskussion

4.1 Duftstoffe von *G. hirsutum*

Der erste Teil der vorliegenden Arbeit hatte das Ziel, die Zusammensetzung der Duftstoffe von *G. hirsutum* nach verschiedenen Behandlungen (mechanische Verwundung, Herbivor-Induktion, FOV-Infektion) näher zu charakterisieren, wobei der Schwerpunkt auf der Emission volatiler Ester lag. Darüberhinaus sollte das von Baumwollblüten abgegebene Duftgemisch analysiert werden.

4.1.1 Das Terpen- und GLV-dominierte Duftbouquet von *G. hirsutum* variiert infolge unterschiedlicher Behandlung

Die Baumwollpflanze *G. hirsutum* emittiert insbesondere nach Induktion durch Herbivorie oder mechanischer Verwundung ein artspezifisches Bouquet flüchtiger organisch-chemischer Verbindungen. Die abgegebenen Duftstoffgemische werden von Terpenen dominiert, wobei deren genaue Zusammensetzung sowie die Mengen der einzelnen Duftstoffe von der jeweiligen Behandlungsart bestimmt werden. Diese Variabilität wurde als spezifische Abwehrantwort auf Herbivorie bereits für viele Pflanzenarten wie beispielsweise Limabohne, Mais und Tabak beschrieben (Dicke *et al.*, 1990; Turlings *et al.*, 1990; Turlings *et al.*, 1995; Kessler und Baldwin, 2001). McCall *et al.* (1994) zeigte, daß auch Baumwolle, die im unverletzten Zustand sehr geringe Mengen volatiler Stoffe abgibt (Loughrin *et al.*, 1994), bei Fraß des Baumwollkapselwurms *Helicoverpa zea* signifikant erhöhte Mengen an verschiedenen Duftstoffen emittiert, wobei sich das Emissionsprofil zu Beginn des Fraßes deutlich von dem unterscheidet, das bei länger andauerndem Fraß abgegeben wird

Die in der hier vorliegenden Arbeit mit dem Herbivoren *S. littoralis* induzierten Baumwollpflanzen ließen ebenfalls zeitlich abhängige Unterschiede erkennen (Abb. 3.2, B und C). Zu Beginn des Fraßes bestand das abgegebene Gemisch vorwiegend aus konstitutiven Terpenen (α -Pinen, β -Pinen, β -Myrcen, β -Caryophyllen und α -Humulen), sowie dem C₁₆-Homoterpen (*E,E*-4,8,12-Trimethyl-1,3,7,11-Tridecatetraen (TMTT) und (*Z*)-3-Hexenylacetat. Einige Stunden nach Beginn des Fraßes wurde das Duftspektrum vor allem von induzierten Terpenen wie β -Ocimen, (*E*)- β -Farnesen, (*E*)-4,8-Dimethyl-1,3,7-Nonatrien (DMNT) und TMTT

dominiert, wobei auch die GLVs (*Z*)-3-Hexenol und (*Z*)-3-Hexenylacetat detektiert werden konnten. Das Vorhandensein dieses zeitlichen Musters in der Emission kann dadurch erklärt werden, daß die durch Raupenfraß induzierten Terpene erst *de novo* synthetisiert und daher zeitlich verzögert freigesetzt werden, wohingegen die Abgabe der konstitutiven Terpene und auch der GLV sofort nach der Beschädigung des Pflanzengewebes erfolgt (Pare und Tumlinson, 1997a).

Die qualitative Analyse der Duftstoffe mechanisch verwundeter Baumwollpflanzen (Abb. 3.2, A) demonstrierte ebenfalls, daß innerhalb der ersten vier Stunden konstitutive Terpene, sowie die GLVs (*Z*)-3-Hexenol und (*Z*)-3-Hexenylacetat freigesetzt wurden. Daraus wird ersichtlich, daß Baumwollpflanzen bei dem physikalischen Vorgang der Zerstörung, sei es durch mechanische Beschädigung, die in der Natur durch Stürme, Hagel oder starken Regen, aber auch durch den Biß der Raupe entsteht, eine Mischung aus cyclischen und acylischen Mono- und Sesquiterpenen (Loughrin *et al.*, 1994), sowie aus GLV in die Atmosphäre freisetzen. Die Menge der emittierten Substanzen korreliert mit dem Grad der Zerstörung (Pare und Tumlinson, 1997b). Die Schnelligkeit der Emission von konstitutiven Terpenen wird dadurch gewährleistet, daß das bereits fertig synthetisierte Produkt in subepidermalen Drüsen der Baumwollpflanze gespeichert wird (Elzen *et al.*, 1985), wohingegen die Synthese induzierter Terpene erst durch Elicitoren aus Raupenspeichel aktiviert wird.

Der Elicitor Volicitin, ein im oralen Sekret der Zuckerrübenmotte *Spodoptera exigua* entdecktes Fettsäure-Aminosäure-Konjugat (Alborn *et al.*, 1997), induziert in Maispflanzen die Abgabe von Duftstoffen, die typischerweise nach Raupenfraß freigesetzt werden (Turlings *et al.*, 1993, Turlings *et al.*, 2000). Das gleiche konnte für den Herbivoren *S. littoralis*, dessen Speichel ebenfalls Volicitin enthält, gezeigt werden (Gouinguene *et al.*, 2003). Für *G. hirsutum* und auch die Limabohne gilt dies jedoch nur, wenn die Volicitin-Konzentration sehr hoch ist (Spiteller *et al.*, 2001), was darauf schließen läßt, daß erst nach wiederholter kontinuierlicher Verwundung ein interner Schwellenwert überschritten und die Induktion typischer Herbivoren-induzierter Duftstoffe ausgelöst wird (Arimura und Kost, 2005) oder daß möglicherweise weitere Herbivoren-spezifische Elicitoren existieren. Der Elicitor β -Glucosidase sowie Behandlungen mit Jasmonsäure induzieren, ebenso wie Herbivorie, die Emission der beiden Homoterpene DMNT und TMTT in Limabohnen und Maispflanzen (Hopke *et al.*, 1994).

Die Herbivoren-induzierte Abgabe der acylischen Homoterpene DMNT und TMTT, die bereits für *G. hirsutum* als Antwort auf *Helicoverpa zea*- und *S. exigua*-Fraß beschrieben wurde (McCall *et al.*, 1994, Loughrin *et al.*, 1994), konnten für das

dieser Arbeit zugrundeliegende Modellsystem *G. hirsutum*/*S. littoralis* verifiziert werden (Abb.3.2 B und C). Gleiches gilt für das im späteren Stadium des Fraßes emittierte Indol. Im Gegensatz dazu konnten die in anderen Studien nachgewiesenen volatilen Stoffe wie beispielsweise das konstitutive cyclische Monoterpen Limonen, die induzierten acyclischen Terpene Linalool und (*E,E*)- α -Farnesen, isomerische Hexenyl- und Methylbutyrate, sowie weitere GLVs wie das (*Z*)-3-Hexenal (McCall *et al.* 1994; Loughrin *et al.*, 1994; Röse *et al.*, 1998, siehe 1.3.2) unter den getesteten Bedingungen nicht detektiert werden.

Der in der Natur häufig vorkommende und großen Schaden verursachende Befall von Baumwollpflanzen mit dem pathogenen Pilz *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* („Fusarium-Welke“) konnte unter Laborbedingungen erfolgreich simuliert werden (Abb. 3.1). Dabei erwies sich die Inokulation der Pilzsporen durch Einspritzen in den unteren Teil des Baumwollstammes als effektive Methode. Die verwendete Sporenanzahl war mit $7,5 \times 10^7$ Sporen die maximale, experimentell korrekt injizierbare Menge.

Studien an mit dem Pilz *Sclerotium rolfsii*-infizierten Erdnusspflanzen ergaben, daß neben Linalool und (*Z*)-3-Hexenylacetat auch relative hohe Mengen des C_{11} -Homoterpenes DMNT emittiert werden (Cardoza *et al.*, 2002). Darüberhinaus konnte Alamethicin, eine Peptidmischung aus *Trichoderma viridae*, als pilzlicher Elicitor die Homoterpen-Synthese in Limabohnen stimulieren (Engelberth *et al.*, 2001). Die Analyse der Emissionsgemische zweier FOV-infizierter Baumwollpflanzen zeigte in der aktuellen Studie, daß vor allem die beiden Homoterpene DMNT und TMTT freigesetzt wurden (Abb 3.2, D). Da diese Homoterpene jedoch auch in den entsprechenden Kontrollpflanzen detektiert wurden und eine induzierte Homoterpen-Emission von Baumwollpflanzen nach Infektion mit Pilzen der Gattung *Fusarium* in der Literatur bisher nicht beschrieben wurde, können keine Aussagen über eine Homoterpen-Induktion nach FOV-Infektion getroffen werden.

4.1.2 Die Emission der Ester (*Z*)-3-Hexenylacetat und Benzylacetat

Im Zusammenhang mit der Identifikation einer Alkoholacyltransferase in *G. hirsutum*, einem Schlüsselenzym der Esterbiosynthese, bestand zunächst das Ziel darin, die Emission volatiler Ester näher zu charakterisieren und quantitative Veränderungen hinsichtlich der unterschiedlichen Behandlungen zu erfassen. Neben dem bereits erwähnten und in der Literatur beschriebenen GLV-Ester (*Z*)-3-

Hexenylacetat emittierten Baumwollpflanzen in geringen Mengen den fruchtig riechenden Ester Benzylacetat. Weitere volatile Ester waren nicht detektierbar.

4.1.2.1 Die Emission von (Z)-3-Hexenylacetat

GLVs, eine Mischung volatiler gesättigter und einfach ungesättigter C₆-Aldehyde, Alkohole und Ester, bilden den charakteristischen „grünen“ Duft vieler Pflanzen, der bei Verwundung freigesetzt wird (Hatanaka, 1993). Die in *A.thaliana* entdeckte Alkoholacyltransferase CHAT, die (Z)-3-Hexenylacetat synthetisiert, kann durch Verwundung induziert werden (D'Auria *et al.*, 2006). Aber auch für andere an der GLV-Synthese beteiligte Enzyme/Gene (LOX, HPL, siehe Abb. 1.1) konnte eine Induktion durch Verwundung zweifelsfrei nachgewiesen werden (Porta und Rocha-Sosa, 2002; Bate *et al.*, 1998; Halitschke und Baldwin, 2003; Halitschke *et al.*, 2004).

Die nach mechanischer Verwundung sowie Herbivorie induzierte (Z)-3-Hexenylacetat-Abgabe von Baumwollpflanzen konnte in der hier vorliegenden Arbeit verifiziert werden. Durch die qualitative Analyse der Duftprofile unterschiedlich behandelte Pflanzen wurde deutlich, daß das Emissionsmuster von (Z)-3-Hexenylacetat zeitlichen und quantitativen Veränderungen unterliegt. Die statistische Analyse der jeweils emittierten Mengen bestätigte diese Trends.

Mechanisch verwundete Baumwollpflanzen (Abb. 3.3) emittieren unmittelbar nach dem Verwundungsereignis die größte Menge an (Z)-3-Hexenylacetat, während Herbivor-induzierte Pflanzen (Abb. 3.4) erst einige Stunden nach Versuchsbeginn größere Mengen dieses Stoffes abgeben. Der Vergleich der absoluten emittierten Mengen der beiden Behandlungen zeigte ebenfalls signifikante Unterschiede dahingehend, daß mechanisch verwundete Pflanzen insgesamt geringere Mengen emittierten als *Spodoptera*-induzierte Pflanzen. Der Grund dafür liegt darin, daß GLVs wie beispielsweise (Z)-3-Hexenylacetat durch mechanische Zerstörung des grünen chlorophyllhaltigen Blattgewebes in die Atmosphäre entweichen können. Daher ist verständlich, daß ein einmaliges mechanisches Verwundungsereignis zwar kurzfristig erhöhte, aber insgesamt über einen längeren Zeitraum betrachtet eher niedrigere Emissionsmengen hervorbringt als bei einer kontinuierlichen Verletzung durch Raupenfraß. Wird diese kontinuierliche Verletzung beispielsweise durch vorzeitiges Entfernen der Raupen unterbrochen, müßte somit die Emissionsmenge rasch abnehmen. Loughrin *et al.* (1994) zeigte am Beispiel von

(Z)-3-Hexenal, einem Vorläufer von (Z)-3-Hexenylacetat, das nach vorzeitiger Entfernung der Raupen die Emissionsmenge schnell absinkt.

Die höchste (Z)-3-Hexenylacetat-Emissionsmenge Herbivor-induzierter Pflanzen wurde 8-12 Stunden nach Fraßbeginn beobachtet. Für diesen Effekt konnte zwar keine Signifikanz, zumindest aber eine deutliche Tendenz festgestellt werden. Eine mögliche Ursache dafür könnte die jüngst entwickelte Theorie des sogenannten „Primings“ sein. Nach dieser Theorie können Pflanzen auf GLVs aus der näheren Umgebung mit einer verstärkten Abgabe volatiler Substanzen wie beispielsweise Terpene oder GLVs reagieren. Dieser Priming-Effekt wurde durch Applikation synthetischer GLVs nachgewiesen (Engelberth *et al.*, 2004, Ruther und Fürstenau, 2005), könnte aber genauso gut durch Wiederaufnahme der eigenen zuvor emittierten oder von Nachbarpflanzen abgegebenen GLVs entstehen. Mehrmalige Verwundungsereignisse wie z.B. bei Raupenfraß könnten aufeinanderfolgende (Z)-3-Hexenylacetat-Abgaben verursachen, die sich dadurch gegenseitig verstärken bzw. „primen“. Experimente mit wiederholter mechanischer Verwundung, wie von D’Auria *et al.* (2006) an *A. thaliana* durchgeführt, sollten zur Aufklärung dieses Phänomens beitragen.

Die Infektion von *G. hirsutum* mit dem phytopathogenen Pilz FOV (Abb. 3.5) zeigte keinerlei Veränderungen in der Freisetzung von (Z)-3-Hexenylacetat gegenüber den Kontrollpflanzen. Das deutet darauf hin, daß unter den in dieser Arbeit getesteten Bedingungen (Z)-3-Hexenylacetat nicht induziert wird und von *G. hirsutum* abgegebenes (Z)-3-Hexenylacetat nicht in die Abwehr von FOV involviert ist. Im Gegensatz dazu wiesen Erdnusspflanzen, die mit dem Pilz *Sclerotium rolfsii* inokuliert wurden, eine erhöhte Abgabe von (Z)-3-Hexenylacetat infolge der Infektion auf (Cardoza *et al.*, 2002). Auch die Expression von LOX-Genen, die letztendlich in die Synthese von (Z)-3-Hexenylacetat involviert sind, ist in *Aspergillus spp.*-infizierten Erdnusspflanzen erhöht (Burow *et al.*, 2000).

4.1.2.2 Die Emission von Benzylacetat

Der fruchtig riechende Ester Benzylacetat ist Bestandteil vieler Blütendüfte (Knudsen *et al.*, 1993). So besteht beispielsweise der Blütenduft von *Clarkia brewerii*, einer von Motten bestäubten, an der Küste Californiens beheimateten Pflanze zu 40% aus Benzylacetat (Raguso und Pichersky, 1995). Die Freisetzung dieses Essigsäurebenzylesters aus vegetativen Pflanzenteilen wurde bisher nicht beschrieben. In der hier vorliegenden Arbeit konnte jedoch in den Duftspektren der

vegetativen oberirdischen Organe von *G. hirsutum* Benzylacetat im pg-Bereich detektiert werden.

Bei mechanischer Verwundung und Herbivor-Induktion konnten nur sehr geringe Mengen von Benzylacetat in wenigen Meßintervallen und nicht bei allen Pflanzen detektiert werden (Tab. 3.1). Darüberhinaus zeigten sich keine Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Pflanzen.

Die Infektion mit FOV ließ ebenfalls keine induzierte Abgabe von Benzylacetat erkennen (Abb. 3.6). Jedoch zeigten sowohl die FOV-infizierten als auch deren Kontrollpflanzen erhöhte Mengen dieses Stoffes im Vergleich zu den Pflanzen der anderen Experimente. Diese quantitativen Unterschiede der Benzylacetat-Emission zwischen den verschiedenen Experimenten sind möglicherweise auf die unterschiedlich langen Meßintervalle der Duftsammlung zurückzuführen. Während in den Versuchen mit mechanischer Verwundung und Induktion mit *S. littoralis* die Meßintervalle jeweils 4 h betragen, wurde die Duftstoffabgabe FOV-infizierter Pflanzen über 15 h am Tag und 9 h in der Nacht gemessen. Durch dieses längere Meßintervall wurde eine exaktere Quantifikation des in sehr geringen Mengen ausgestoßenen Benzylacetats möglich, da dieser Ester hier möglicherweise besser detektierbar war.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß weitere Experimente mit erhöhten Stichproben notwendig sind, um die sich abzeichnenden Trends zweifelsfrei zu bestätigen. In Ergänzung zu den vorliegenden Experimenten wäre es interessant, den Organismus *S. littoralis* durch künstliche Verwundung mit gleichzeitiger Applikation von Raupenspeichel zu ersetzen. Durch diese Methode kann eine bessere Standardisierung der Verwundung erreicht werden, so daß mögliche Ungenauigkeiten in Dauer und Intensität des Fraßes, die mit einem lebenden Fraßschädling nicht auszuschließen sind, umgangen werden können.

4.1.3 Duftstoffe von Baumwollblüten

Unsere Welt ist erfüllt mit einer unermeßlichen Vielfalt von Düften und Aromen. Die meisten dieser flüchtigen Duftstoffe, die unsere Atmosphäre „parfümieren“, werden von den Blüten der Pflanzen freigesetzt. Der Duft einer Rose beispielsweise hat nicht nur eine magische Wirkung auf Menschen, sondern dient in erster Linie der Anlockung von Pollinatoren. Neben den intensiv duftenden Bienenpflanzen gibt es jedoch auch Blütendüfte, die auf uns eine neutrale Wirkung ausüben. Ein Beispiel ist die gelbe bis purpurfarbene Blüte von *G. hirsutum*, deren Duft für unsere Nase nicht

wahrnehmbar ist. Wie in dieser Arbeit aber gezeigt werden konnte, emittieren auch diese Blüten einige flüchtige Duftstoffe, darunter vor allem den Alkohol 1-Hexanol. Im Gegensatz zu vielen anderen Blüten, die beispielsweise in großen Mengen den fruchtigen Ester Benzylacetat abgeben (Raguso und Pichersky, 1995), setzen Baumwollblüten keine volatilen Ester frei.

Ein Grund für die relativ geringe Emission von Blütenduftstoffen von *G. hirsutum* könnte in der generellen Tendenz zur Selbstbestäubung liegen. Da nur in Anwesenheit korrespondierender Insekten wie beispielsweise Bienen und Hummeln eine entomogame Bestäubung für *G. hirsutum* angezeigt ist (McGregor, 1976, zitiert aus www.aphis.usda.gov), kann möglicherweise der hohe Energieaufwand für die Synthese von Blütendüften eingespart werden. Interessant wäre es, den Blütenduft der von Lepidopteren bestäubten Art *G. tomentosum*, deren Blütezeit zusätzlich auch noch in der Nacht liegt (www.aphis.usda.gov), zu analysieren und mit dem von *G. hirsutum* zu vergleichen.

4.2 Die Alkoholacyltransferase GhAAT1 - Ein Schlüsselenzym der Benzylacetat-Biosynthese von *G. hirsutum* ?

„Während die ökologischen Funktionen und die chemische Zusammensetzung von Pflanzendüften seit vielen Jahren intensiv untersucht werden, besteht mangelndes Wissen über die Biosynthesewege, die zur Entstehung und Vielfalt der Duftkomponenten beitragen“ (Effmert *et al.*, 2005). Daher sollte das Hauptaugenmerk dieser Arbeit auf der Aufklärung eines an der Synthese volatiler Ester beteiligten Enzyms in *G. hirsutum* liegen.

4.2.1 GhAAT1, die erste bekannte Alkoholacyltransferase von *G. hirsutum* ist ein Mitglied der BAHD-Acytransferasen-Familie

Die BAHD-Familie der Acyltransferasen beschreibt eine erst vor wenigen Jahren entdeckte Gruppe von Enzymen (St.Pierre und DeLuca, 2000). Die biochemische Erforschung und Aufklärung pflanzlicher Genome wie beispielsweise von *A. thaliana* und *Oryza sativa* führten in den letzten Jahren zur Entdeckung einer Vielzahl möglicher Acyltransferasen. Schätzungen gehen davon aus, daß allein *A. thaliana* mehr als 64, *Oryza sativa* sogar mehr als 119 Acyltransferasen besitzt (D'Auria, 2006), wobei wahrscheinlich mit einer ähnlichen, wenn nicht sogar weitaus höheren Anzahl auch in anderen Pflanzenarten gerechnet werden kann. Nur wenige dieser BAHD-Enzyme konnten bisher funktionell charakterisiert werden. Auch in *G. hirsutum* konnte die Existenz einer oder mehrerer Acyltransferasen bislang nur vermutet werden. Im Rahmen dieser Arbeit gelang nunmehr die Amplifikation der vollständigen Sequenz eines Gens, das für ein Protein mit für Acyltransferasen charakteristischen Merkmalen und Sequenzmotiven kodiert, das GhAAT1.

GhAAT1 besitzt die beiden charakteristischen, evolutionär hochkonservierten BAHD-Sequenzmotive, das „HXXXD“-Motiv in der Mitte der Sequenz und das „DFGWG“-Motiv nahe dem C-Terminus (St.Pierre und DeLuca, 2000). Die Aminosäureanzahl von 454 AS sowie das Molekulargewicht von 50,7 kD entsprechen den jeweiligen Durchschnittswerten bekannter Acyltransferasen (445 AS und 48-55 kD, St.Pierre, 2000, D'Auria, 2006) und unterstreichen die Zuordnung zur Familie der BAHD-Enzyme. Darüberhinaus sprechen auch die biochemischen Eigenschaften, d.h. der Einfluß des pH-Wertes, der Temperatur und verschiedener Metallionen auf die Aktivität des Enzyms (Abb.3.13 und 3.14), für eine Klassifizierung von GhAAT1 als BAHD-Enzym. So liegt das pH-Optimum von

GhAAT1 mit Bis-Tris-Propan als Puffer bei 7,1, das von AtCHAT im gleichen Puffersystem beispielsweise zwischen 7,1-7,3 (D'Auria *et al.*, 2006). Darüberhinaus weist GhAAT1, ebenso wie die meisten Alkoholacyltransferasen nach 30 min bei 50°C keine Aktivität mehr auf (D'Auria *et al.*, 2002; D'Auria *et al.*, 2006; Souleyre *et al.*, 2005). Die höchste Aktivität von GhAAT1 wird nach Lagerung bei 4 bis 22 °C erreicht.

Auch die nahezu vollständige Inhibierung der Aktivität durch Kupfer- oder Zinkionen (je 5 mM), die bereits mehrfach für andere BAHD-Enzyme in der Literatur beschrieben wurde (Fujiwara *et al.*, 1998; D'Auria *et al.*, 2002; D'Auria *et al.*, 2006; Souleyre *et al.*, 2005), konnte für GhAAT1 nachgewiesen werden. Die Hemmung der Aktivität durch Zinkionen kann dadurch erklärt werden, daß diese divalenten Kationen als Liganden hauptsächlich Cysteinreste verwenden, welche vermehrt in der Nähe der Substratbindetasche und/oder der katalytischen Region vorkommen (Souleyre *et al.*, 2005) und daher die Substratbindestellen durch diese Kationen blockiert werden können. In Anwesenheit von Kalium- und Natriumionen zeigte sich eine Erhöhung der Aktivität von GhAAT1. Die Stimulierung der Aktivität durch diese beiden monovalenten Kationen beschrieb Yahayoui *et al.* (2002), wenn auch mit höheren Konzentrationen getestet, bereits für das Enzym CmAAT1 aus *Cucumis melo*. Die Ursachen dafür bleiben bis heute ungeklärt.

Neben den Sequenzcharakteristika und den biochemischen Merkmalen zeigte der Sequenzvergleich von GhAAT1 mit bekannten Alkoholacyltransferasen, beispielsweise mit der Benzoyltransferase CbBEBT aus *Clarkia brewerii* und weiteren zehn Alkoholacyltransferasen aus Früchten, Blüten oder Blättern anderer Pflanzenfamilien eine Vielzahl von Übereinstimmungen in der AS-Sequenz (Abb. 3.9). Um neben den Sequenzidentitäten die verwandschaftlichen Beziehungen genauer zu definieren, wurde anhand des Sequenzvergleiches ein hypothetischer, phylogenetischer Stammbaum konstruiert (Abb. 4.1). In diesem Phylogramm, daß nur einen kleinen Ausschnitt aus dem großen Stammbaum aller bekannten BAHD-Enzyme darstellt (siehe Abb. 1.2), können drei Gruppen unterschieden werden.

Die Gruppe I beinhaltet nur ein Enzym, CmAAT3 aus *Cucumis melo*, dessen AS-Sequenz zu 73% der von GhAAT1 gleicht. CmAAT3 kann ein breites Spektrum mittelkettiger Acyl-CoA nutzen und daraus verschiedene mittelkettige Acylester, darunter vor allem den Ester Benzylacetat, formieren (El-Sharkawy *et al.*, 2005).

Die Gruppe II umfaßt eine Vielzahl von BAHD-Enzymen, deren Sequenzen zu 13-69% identisch mit GhAAT1 sind. Hierzu zählen neben CbBEBT, das aus Benzylalkohol und Benzoyl-CoA den volatilen Ester Benzylbenzoat synthetisiert

(D'Auria *et al.*, 2002), die beiden Alkoholacyltransferasen MdAAT1 und 2 aus *Malus pumila*. MdAAT1 bevorzugt die Bildung von Hexylestern aus C3, 6 und 8 CoA-Substraten, wohingegen für MdAAT2 noch keine funktionelle Charakterisierung vorliegt (Souleyre *et al.*, 2005). Darüberhinaus gehören zu dieser zweiten Gruppe das (Z)-3-Hexenylacetat-formierende Enzym aus *A. thaliana* (AtCHAT) (D'Auria *et al.*, 2002), das in den Blüten von *Clarkia brewerii* entdeckte Enzym CbBEAT, welches den fruchtig-riechenden Ester Benzylacetat synthetisiert (Dudareva *et al.*, 1998) und drei weitere Alkoholacyl-transferasen aus *Cucumis melo* (CmAAT1, 2 und 4). CmAAT1 katalysiert die Bildung von (E)-2-Hexenylacetat, CmAAT2 zeigt keinerlei Aktivität und CmAAT4 kann wie schon bei CmAAT3 beschrieben ein breites Spektrum mittelkettiger Acyl-CoA nutzen, wobei aber die Bildung von Cinnamoylacetat bevorzugt wird (Yahyaoui *et al.*, 2002; El-Sharkawy *et al.*, 2005).

Die Gruppe III enthält neben GhAAT1 die beiden Benzoyl-CoA:Benzyalkohol Benzoyltransferasen aus *Petunia hybrida* und *Nicotiana tabacum* (Boatright *et al.*, 2004; D'Auria *et al.*, 2002). Die AS-Sequenzähnlichkeit dieser beiden Benzylbenzoat-formierenden Enzyme zu GhAAT1 beträgt 75 bzw. 74%.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß GhAAT1 auf AS-Ebene die größte Übereinstimmung mit PhBEBT1, NtBEBT und CmAAT3 aufweist und aufgrund dessen diesen drei BAHD-Enzymen phylogenetisch am nächsten steht. Die Vermutung, daß aufgrund der hohen Sequenzidentität GhAAT1 in die Synthese von Benzylacetat bzw. Benzylbenzoat involviert sein könnte, liegt nahe, kann aber aufgrund der Kenntnisse bezüglich der funktionellen Charakterisierung anderer bekannter Alkoholacyl-transferasen nur unter Vorbehalt gelten. So zeigte Beekwilder (Beekwilder *et al.*, 2004) an BAHD-Enzymen, die in Erdbeeren und Bananen volatile Ester bilden, daß die Substratpräferenz nicht auf Basis der Sequenzähnlichkeit vorrausgesagt werden kann. Allen BAHD-Alkoholacyltransferasen liegt die Fähigkeit der Nutzung eines breiten Substratspektrums zugrunde, Einschränkungen entstehen nur durch die jeweilige Verfügbarkeit der entsprechenden Substrate in den Zellen (Beekwilder *et al.*, 2004). Funktionelle Charakterisierungen von in *E.coli* Zellen überexprimierten Alkoholacyl-transferasen, wie auch im Rahmen dieser Arbeit geschehen, können nur für dieses heterologe System gelten, da die Verfügbarkeit und die Konzentrationen von Substraten *in planta* nicht denen *in vitro* gleicht (D'Auria *et al.*, 2002).

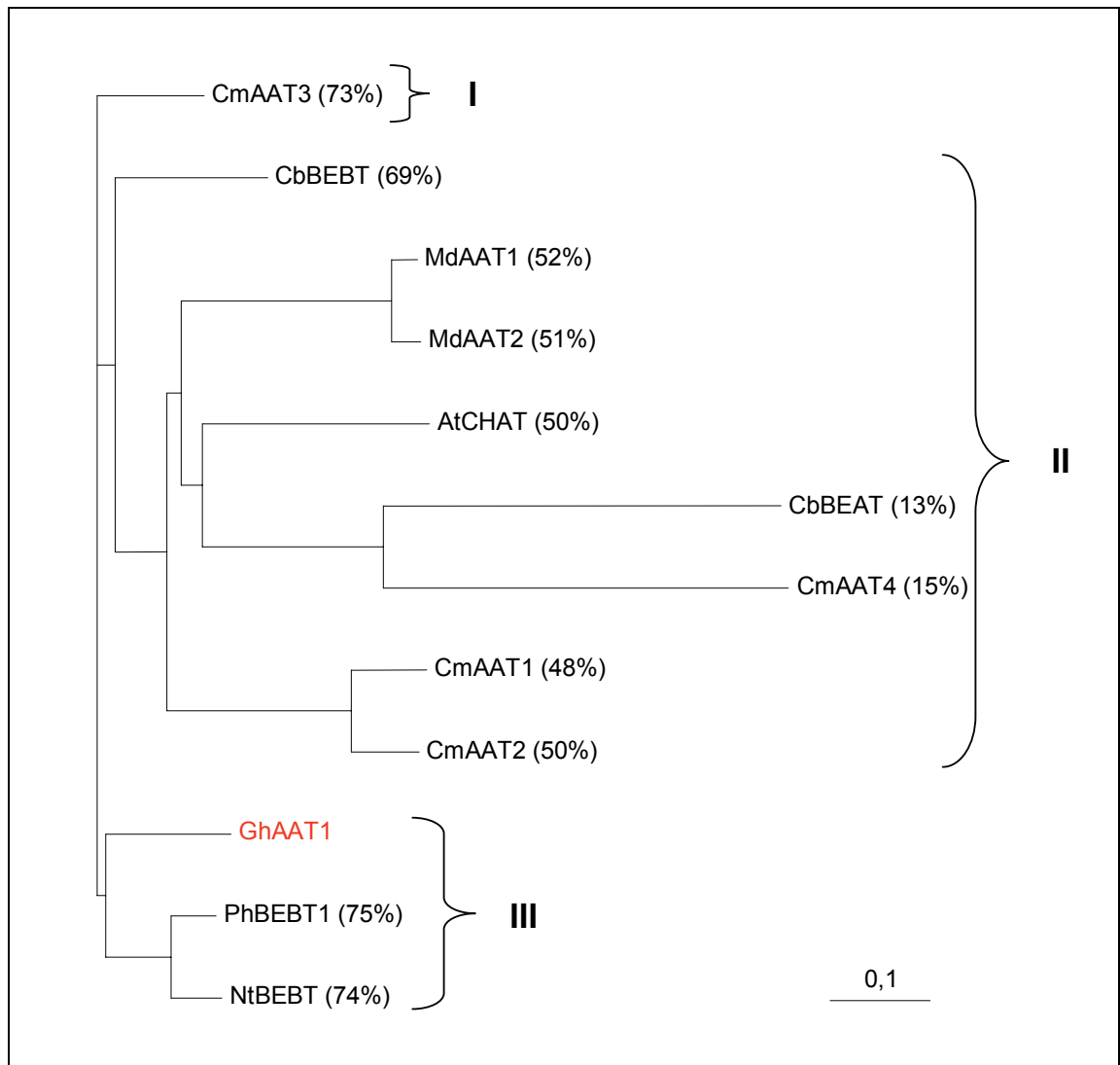


Abbildung 4.1: Hypothetisches Phylogramm der AS-Sequenzen von GhAAT1, sowie einiger bekannter Alkoholacyltransferasen aus anderen Pflanzenfamilien. Die Sequenzverwandtschaft der Alkoholacyltransferasen aus *Cucumis melo* (CmAAAT1-4), *Petunia hybrida* (PhBEET1), *Nicotiana tabacum* (NtBEET), *Clarkia brewerii* (CbBEET und CbBEAT), *A.thaliana* (AtCHAT) und *Malus pumila* (MdAAAT1 und 2), sowie von GhAAT1 wurde mit dem Programm „ClustalX“ (Version 1.83) nach der „neighbor-joining“-Methode analysiert und mit dem Programm „Tree View“ (Version 1.6.6) visualisiert. Prozentuale AS-Sequenzidentitäten zu GhAAT1 sind in (%) angegeben. Nähere Erläuterungen zu den hier aufgeführten Proteinen, sowie deren Accessionnummer sind in der Tabelle 1.1 aufgelistet.

4.2.2 GhAAT1 katalysiert die Synthese des fruchtig-riechenden Esters Benzylacetat aus Benzylalkohol und Acetyl-CoA

Die Überexpression von GhAAT1 in *E. coli* und die anschließende Reinigung ermöglichte die funktionelle und biochemische Charakterisierung. Ausgehend von den Duftsammelexperimenten, die zeigten, daß *G. hirsutum* sowohl den Ester (Z)-3-Hexenylacetat, als auch Benzylacetat emittiert, und den Sequenzalignments mit

bekannten Alkoholacyltransferasen, die vermuten ließen, daß möglicherweise Benzylbenzoat synthetisiert werden könnte, wurden als mögliche Substrate die Alkohole (Z)-3-Hexenol und Benzylalkohol sowie die beiden Acyl-CoAs Acetyl- und Benzoyl-CoA miteinander kombiniert (Abb. 3.11 und 3.12).

Die gaschromatographische Analyse dieser Enzym-Substrat-Reaktionen zeigte unter den getesteten Bedingungen, daß GhAAT1 Benzylalkohol in Kombination mit Acetyl-CoA akzeptiert und zu Benzylacetat umsetzt (Abb. 4.2), wohingegen bei den anderen Kombinationen kein Produkt detektiert werden konnte. Das schließt natürlich nicht aus, daß auch andere Produkte wie beispielsweise nichtflüchtige Ester von GhAAT1 synthetisiert wurden, die nur mit der angewandten Methode nicht erfasst werden konnten.

Die Bestimmung der relativen Aktivität von GhAAT1 gegenüber einem breiten Spektrum weiterer möglicher Alkohole in Kombination mit Acetyl-CoA bestätigte zweifelsfrei die Substratpräferenz für Benzylalkohol als Substrat-Akzeptor (Tab. 3.3). Die Durchführung von Konkurrenzassays mit verschiedenen Acyl-CoAs deutete auf eine Bevorzugung von Acetyl-CoA als Substrat-Donor hin, wobei angemerkt werden muss, daß diese Experimente, aufgrund fehlender Verfügbarkeit der meisten Acyl-CoA, nicht umfassend durchgeführt werden konnten.

Um diese qualitativen Ergebnisse zu verifizieren und die Substrataffinität und -spezifität von GhAAT1 mit denen bekannter Alkoholacyltransferasen vergleichen zu können, wurden die kinetischen Parameter K_m , V_{max} , k_{cat} , sowie das Verhältnis von k_{cat} zu K_m für die Substrate Benzylalkohol und Acetyl-CoA ermittelt (Tab. 3.4). Der Quotient k_{cat}/K_m für Benzylalkohol betrug $46,2 \text{ sec}^{-1}\text{nM}^{-1}$, der K_m -Wert lag bei $71,4 \mu\text{M}$. Im Vergleich dazu besitzt beispielsweise das Enzym CbBEAT aus *Clarkia brewerij*, das ebenfalls Benzylalkohol als Substrat bevorzugt, einen K_m -Wert von $240 \mu\text{M}$ für dieses Substrat (Nam *et al.*, 1999). Daraus läßt sich schließen, daß GhAAT1 eine höhere Affinität zu Benzylalkohol besitzt als CbBEAT. Der Quotient k_{cat}/K_m , der den Vergleich der Effizienzen der Enzyme erlaubt, wurde von Nam *et al.* (1999) nicht angegeben. Zur Einordnung der katalytischen Effizienz von GhAAT1 dient ein Vergleich mit AtCHAT, das (Z)-3-Hexenol als Alkoholakzeptor bevorzugt und einen k_{cat}/K_m von $45 \text{ sec}^{-1}\text{nM}^{-1}$ aufweist (D'Auria *et al.*, 2006). Da dieser dem hier ermittelten k_{cat}/K_m von Benzylalkohol nahezu gleicht, kann davon ausgegangen werden, das GhAAT1 ebenso wie AtCHAT in die Familie der BAHD-Enzyme eingeordnet werden kann und die Funktion einer Acetyl-CoA: Benzylalkohol Acetyltransferase (BEAT) entspricht.

Der Wert von k_{cat}/K_m für Acetyl-CoA betrug $3,2 \text{ sec}^{-1}\text{nM}^{-1}$ und ist damit deutlich geringer (185fach) als der für AtCHAT bezüglich Acetyl-CoA ($597 \text{ sec}^{-1}\text{nM}^{-1}$, D'Auria *et al.*, 2006). Der Grund für diesen niedrigen k_{cat}/K_m -Wert von GhAAT1 ist einerseits der sehr hohe K_m von $702,5 \mu\text{M}$ und andererseits der niedrige k_{cat} -Wert von $2,3 \text{ sec}^{-1}$. Das bedeutet, daß GhAAT1 sowohl eine niedrige Affinität zu Acetyl-CoA als auch eine geringe Reaktionsgeschwindigkeit unter den Bedingungen der Substratsättigung aufweist. Acetyl-CoA ist also möglicherweise nicht das universelle Donorsubstrat von GhAAT1. Das erscheint in Anbetracht der Tatsache, daß BAHD-Acyltransferasen die Eigenschaft besitzen, ein breites Spektrum an Substraten nutzen zu können (St.Pierre und De Luca, 2000), nicht unwahrscheinlich. Im Rahmen dieser Arbeit konnte jedoch kein weiteres von GhAAT1 synthetisiertes Produkt identifiziert werden, das möglicherweise aus der Verwendung eines anderen Acyl-CoAs als Substrat entstand. Diese Frage bedarf einer genaueren Analyse durch weitere Experimente beispielsweise auch der Wiederholung des Konkurrenzassays.

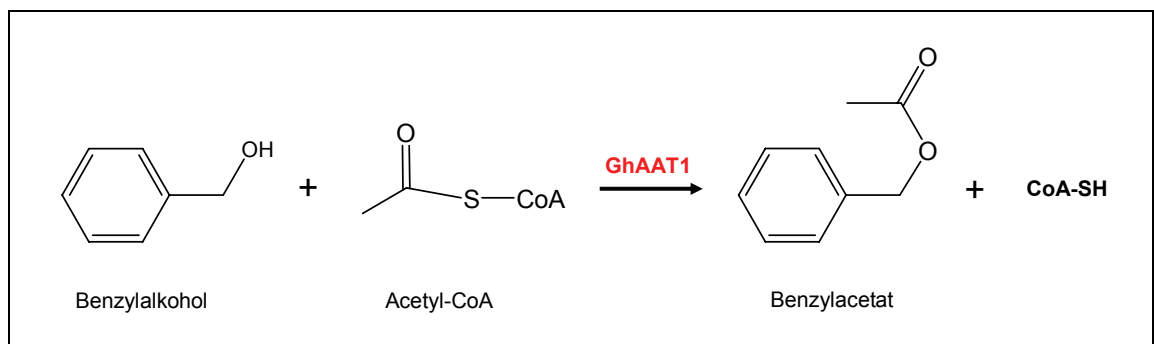


Abbildung 4.2: Hypothetische durch GhAAT1 katalysierte Transacylierungsreaktion.

4.2.3 GhAAT1 *in planta* nur BEAT-ähnlich?

Die Tatsache, daß GhAAT1 *in vitro* eine hohe Konzentration von Acetyl-CoA benötigt um den Ester Benzylacetat zu formieren und die Tatsache, daß Baumwolle nur geringe Mengen an Benzylacetat emittiert, spricht möglicherweise dafür, daß GhAAT1 in den pflanzlichen Zellen von *G. hirsutum* diese Reaktion nicht ohne weiteres ausführen kann. Obwohl die Konzentration von Acetyl-CoA in pflanzlichen Zellen bisher nicht genau ermittelt wurde, kann davon ausgegangen werden, daß die Acetyl-CoA-Konzentration, die GhAAT1 benötigt, über der in der Zelle vorhandenen Konzentration liegt.

Benzylacetat ist ein fruchtig-riechender Ester, der bisher hauptsächlich als Bestandteil vieler Blütendüfte beispielsweise von *Clarkia brewerii* (Knudsen *et al.*, 1993; Raguso und Pichersky, 1995), vereinzelt aber auch für reife Früchte wie beispielsweise Melonen (*Cucumis melo*) (El-Sharkawy *et al.*, 2005) beschrieben wurde. Dass auch vegetative Pflanzenorgane Benzylacetat abgeben, konnte bisher nicht gezeigt werden.

Daher stellt sich die Frage, warum die Blätter von *G. hirsutum* geringe Mengen an Benzylacetat emittieren? Ist die Bedeutung dieser Emission möglicherweise im Laufe der Evolution in den Hintergrund getreten oder befindet sich die Ausbildung dieses Merkmals gerade am Anfang der Entwicklung?

Für GhAAT1, das Benzylacetat-bildende Enzym, könnte das möglicherweise bedeuten, daß sich sowohl eine höhere Affinität zu Acetyl-CoA, als auch eine Affinität zu einem gänzlich anderen Acyl-CoA, beispielsweise Benzoyl-CoA entwickeln könnte. Eine ähnliche Entwicklung bezüglich der Substrataffinität und der Emission von Benzylacetat fand Nam *et al.* (1999) bei dem Vergleich von drei Benzylacetat-synthetisierenden Enzymen aus *Clarkia concinna* (CcBEAT1-3) mit zwei weiteren aus *Clarkia brewerii* (CbBEAT1-2). Beide Arten unterscheiden sich in der Zusammensetzung ihres Blütenduftes. *Clarkia brewerii* emittiert Benzylacetat, wohingegen der Blütenduft von *Clarkia concinna* diesen Ester nicht beinhaltet. Die Enzyme CcBEAT1-3 aus *Clarkia concinna* katalysieren zwar *in vitro* die Bildung von Benzylacetat, d.h. sie sind aktiv in Anwesenheit von Benzylalkohol, zeigten jedoch darüberhinaus wesentlich höhere Aktivitäten mit einer Reihe weiterer Alkohole beispielsweise Cinnamoylalkohol und Heptanol. Nam *et al.* (1999) schlußfolgerte daraus zwei Möglichkeiten. Eine mögliche Ursache könnte sein, daß CbBEAT1-2 aus *Clarkia brewerii* sich aus einem Gen entwickelte, das für eine Acetyltransferase kodierte, deren Substrat Benzylalkohol ähnlich war. Das würde bedeuten, daß CbBEAT1-2 sich auf Benzylacetat als Substrat spezialisiert haben könnte. Die zweite mögliche Erklärung ist, daß der Blütenduft von *Clarkia concinna* in der Vergangenheit ebenfalls Benzylacetat beinhaltete. Das würde bedeuten, daß die Funktion dieses Duftes im Laufe der Evolution verloren ging, was eine Mutation in den dafür kodierenden Genen aus *Clarkia concinna* erlaubte. Als Folge davon besitzt CcBEAT aus *Clarkia concinna* heute *in vivo* keine eindeutige Substrataffinität für Benzylalkohol mehr.

Die durch Nam's Beobachtungen verstärkte Hypothese, daß sich GhAAT1 hinsichtlich der Nutzung von Acetyl-CoA als Substrat mitten in der Entwicklung (in

die eine oder andere Richtung) befindet, legt nahe, daß GhAAT1 eher nur BEAT-ähnliche Funktion besitzt. Eine Möglichkeit, diese Hypothese näher zu beleuchten, könnte durch den zweiten im Rahmen dieser Arbeit entdeckten „full-length-clone“, der zwei ausgetauschte AS gegenüber der AS-Sequenz des exprimierten GhAAT1 besitzt, realisiert werden. Erstaunlicherweise liegt die eine AS-Substitution an der Position 267 (Abb. 3.8). El-Sharkawy *et al.* (2005) konnte anhand von „site directed mutagenesis“ beweisen, daß ein Austausch von AS an etwa der gleichen AS-Position (268) die Aktivität eines BAHD-Enzyms nachhaltig verändern kann. Durch Substitution einer einzigen AS (Alanin zu Threonin), zeigte Sharkawy *et al.* (2005), daß das zuvor inaktive CmAAT2 aus *Cucumis melo* (Yahahoui *et al.*, 2002) seine Aktivität zurückerlangte. Aufgrund dieser bemerkenswerten Tatsache, wäre es interessant den zweiten aus *G. hirsutum* isolierten „full-length-clone“ zu exprimieren, funktionell zu charakterisieren und hinsichtlich der Aktivität und der Substrataffinität mit GhAAT1 zu vergleichen.

5 Zusammenfassung

Volatile Ester sind im Pflanzenreich weitverbreitete Duftstoffe, die eine wichtige Rolle in der Interaktion von Pflanzen mit ihrer biotischen Umwelt spielen. Die qualitative Duftstoffanalyse Herbivor-induzierter und mechanisch verwundeter Baumwollpflanzen bestätigte weitgehend das in der Literatur beschriebene Duftbouquet, das sich aus volatilen Terpenen und vor allem aus dem GLV-Ester (Z)-3-Hexenylacetat zusammensetzt. Die Infektion von *G. hirsutum* mit dem phytopathogenen Pilz *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* zeigte keinerlei Effekt auf das Duftstoffprofil. Neben dem bekanntermaßen von Baumwolle emittierten (Z)-3-Hexenylacetat, konnte auch der fruchtig-riechende Ester Benzylacetat in Spuren nachgewiesen werden. Obwohl die Abgabe von Benzylacetat für eine Vielzahl von Blüten beschrieben wurde, konnte dieser Ester im Duft von Baumwollblüten nicht detektiert werden.

Die Schlüsselenzyme der Esterbiosynthese sind die Alkoholacyltransferasen, die die Transacylierung von einem Acyl-CoA-Donor auf einen Alkohol-Akzeptor katalysieren. Im Rahmen dieser Arbeit gelang es erstmals in der Modellpflanze *G. hirsutum* eine Alkoholacyltransferase, das GhAAT1, zu identifizieren. Das rekombinante GhAAT1 nutzt *in vitro* die Substrate Benzylalkohol und Acetyl-CoA für die Synthese von Benzylacetat. Basierend auf der enzymkinetischen Charakterisierung kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß GhAAT1 *in planta* andere, bisher nicht getestete Substrate bevorzugt. Da GhAAT nicht für die Bildung von (Z)-3-Hexenylacetat verantwortlich ist, kann von der Existenz mindestens einer weiteren Alkoholacyltransferase in *G. hirsutum* ausgegangen werden.

6 Literatur

- Alborn, H.T., Rose, U.S.R. and McAuslane, H.J. (1996).** Systemic induction of feeding deterrents in cotton plants by feeding of *Spodoptera* spp larvae. *Journal of Chemical Ecology*, 22, 919-932.
- Alborn, T., Turlings, T.C.J., Jones, T.H., Stenhagen, G., Loughrin, J.H. and Tumlinson, J.H. (1997).** An elicitor of plant volatiles from beet armyworm oral secretion. *Science*, 276, 945-949.
- Alchanati, I., Patel, J.A.A., Liu, J.G., Benedict, C.R., Stipanovic, R.D., Bell, A.A., Cui, Y.X. and Magill, C.W. (1998).** The enzymatic cyclization of nerolidyl diphosphate by delta-cadinene synthase from cotton stele tissue infected with *Verticillium dahliae*. *Phytochemistry*, 47, 961-967.
- Andersen, R.A., Hamiltonkemp, T.R., Hildebrand, D.F., McCracken, C.T., Collins, R.W. and Fleming, P.D. (1994).** Structure-antifungal activity relationships among volatile C₆ and C₉ aliphatic aldehydes, ketones, and alcohols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 1563-1568.
- Arimura, G., Kost, C. and Boland, W. (2005).** Herbivore-induced, indirect plant defences. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1734, 91-111.
- Arimura, G., Ozawa, R., Horiuchi, J., Nishioka, T. and Takabayashi, J. (2001).** Plant-plant interactions mediated by volatiles emitted from plants infested by spider mites. *Biochemical Systematics and Ecology*, 29, 1049-1061.
- Arimura, G., Ozawa, R., Nishioka, T., Boland, W., Koch, T., Kuhnemann, F. and Takabayashi, J. (2002).** Herbivore-induced volatiles induce the emission of ethylene in neighboring lima bean plants. *Plant Journal.*, 29, 87-98.
- Baldwin, I.T., Halitschke, R., Paschold, A., von Dahl, C.C. and Preston, C.A. (2006).** Volatile signaling in plant-plant interactions: "Talking trees" in the genomics era. *Science*, 311, 812-815.
- Bate, N.J., Riley, J.C.M., Thompson, J.E. and Rothstein, S.J. (1998a).** Quantitative and qualitative differences in C₆-volatile production from the lipoxygenase pathway in an alcohol dehydrogenase mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum*, 104, 97-104.
- Bate, N.J., Sivasankar, S., Moxon, C., Riley, J.M.C., Thompson, J.E. and Rothstein, S.J. (1998b).** Molecular characterization of an *Arabidopsis* gene encoding hydroperoxide lyase, a cytochrome P-450 that is wound inducible. *Plant Physiology*, 117, 1393-1400.
- Beekwilder, J., Alvarez-Huerta, M., Neef, E., Verstappen, F.W.A., Bouwmeester, H.J. and Aharoni, A. (2004).** Functional characterization of enzymes forming volatile esters from strawberry and banana. *Plant Physiology*, 135, 1865-1878.

- Beuerle, T. and Pichersky, E. (2002a).** Purification and characterization of benzoate : coenzyme A ligase from *Clarkia breweri*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 400, 258-264.
- Beuerle, T. and Pichersky, E. (2002b).** Enzymatic synthesis and purification of aromatic coenzyme A esters. *Analytical Biochemistry*, 302, 305-312.
- Boatright, J., Negre, F., Chen, X.L., Kish, C.M., Wood, B., Peel, G., Orlova, I., Gang, D., Rhodes, D. and Dudareva, N. (2004).** Understanding in vivo benzenoid metabolism in petunia petal tissue. *Plant Physiology*, 135, 1993-2011.
- Boland, W., Gabler, A., Gilbert, M. and Feng, Z.F. (1998).** Biosynthesis of C₁₁ and C₁₆ homoterpenes in higher plants; Stereochemistry of the C-C-bond cleavage reaction. *Tetrahedron*, 54, 14725-14736.
- Bradford, M.M. (1976).** Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Burhenne, K., Kristensen, B.K. and Rasmussen, S.K. (2003).** A new class of N-hydroxycinnamoyltransferases - purification, cloning, and expression of a barley agmatine coumaroyltransferase (Ec 2.3.1.64). *Journal of Biological Chemistry*, 278, 13919-13927.
- Burow, G.B., Gardner, H.W. and Keller, N.P. (2000).** A peanut seed lipoxygenase responsive to *Aspergillus* colonization. *Plant Molecular Biology*, 42, 689-701.
- Cardoza, Y.J., Alborn, H.T. and Tumlinson, J.H. (2002).** In vivo volatile emissions from peanut plants induced by simultaneous fungal infection and insect damage. *Journal of Chemical Ecology*, 28, 161-174.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987).** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate phenol chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162, 156-159.
- Corpet, F. (1988).** Multiple sequence alignment with hierarchical-clustering. *Nucleic Acids Research*, 16, 10881-10890.
- Creelman, R.A. and Mulpuri, R. (2002).** The oxylipin pathway in *Arabidopsis*. In *The Arabidopsis Book* (American Society of Plant Biologists)
- D'Auria, J.C. (2006).** Acyltransferases in plants: A good time to be BAHD. *Current Opinion in Plant Biology*, in press.
- D'Auria, J.C., Chen, F. and Pichersky, E. (2002).** Characterization of an acyltransferase capable of synthesizing benzylbenzoate and other volatile esters in flowers and damaged leaves of *Clarkia breweri*. *Plant Physiology*, 130, 466-476.
- D'Auria, J.C., Pichersky, E. and Gershenzon, J. (2006).** Characterization of a BAHD acyltransferase responsible for producing the green leaf volatile (Z)-3-hexen-1-yl acetate in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, submitted.

- Dicke, M. and van Loon, J.J.A. (2000).** Multitrophic effects of herbivore-induced plant volatiles in an evolutionary context. *Entomologia Experimentalis Et Applicata*, 97, 237-249.
- Dicke, M. and Bruin, J. (2001).** Chemical information transfer between plants: back to the future. *Biochemical Systematics and Ecology*, 29, 981-994.
- Dicke, M., van Poecke, R.M.P. and de Boer, J.G. (2003).** Inducible indirect defence of plants: from mechanisms to ecological functions. *Basic and Applied Ecology*, 4, 27-42.
- Dicke, M., Sabelis, M.W., Takabayashi, J., Bruin, J. and Posthumus, M.A. (1990).** Plant strategies of manipulating predator-prey interactions through allelochemicals - prospects for application in pest-control. *Journal of Chemical Ecology*, 16, 3091-3118.
- Donath, J. and Boland, W. (1995).** Biosynthesis of acyclic homoterpenes - enzyme selectivity and absolute-configuration of the nerolidol precursor. *Phytochemistry*, 39, 785-790.
- Dudareva, N. and Pichersky, E. (2000).** Biochemical and molecular genetic aspects of floral scents. *Plant Physiology*, 122, 627-633.
- Dudareva, N., Pichersky, E. and Gershenzon, J. (2004).** Biochemistry of plant volatiles. *Plant Physiology*, 135, 1893-1902.
- Dudareva, N., D'Auria, J.C., Nam, K.H., Raguso, R.A. and Pichersky, E. (1998a).** Acetyl-CoA : benzylalcohol acetyltransferase - an enzyme involved in floral scent production in *Clarkia breweri*. *Plant Journal*, 14, 297-304.
- Dudareva, N., Raguso, R.A., Wang, J.H., Ross, E.J. and Pichersky, E. (1998b).** Floral scent production in *Clarkia breweri* - III. Enzymatic synthesis and emission of benzenoid esters. *Plant Physiology*, 116, 599-604.
- Effmert, U., Rohrbeck, D., Buß, D. and Piechulla, B. (2005).** Something to sniff at - die Welt der Düfte. *BIOspektrum*, 11.
- El-Sharkawy, I., Manriquez, D., Flores, F.B., Regad, F., Bouzayen, M., Latche, A. and Pech, J.C. (2005).** Functional characterization of a melon alcohol acyl-transferase gene family involved in the biosynthesis of ester volatiles. Identification of the crucial role of a threonine residue for enzyme activity. *Plant Molecular Biology*, 59, 345-362.
- Elzen, G.W., Williams, H.J., Bell, A.A., Stipanovic, R.D. and Vinson, S.B. (1985).** Quantification of volatile terpenes of glanded and glandless *Gossypium hirsutum* L. cultivars and lines by gas-chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 33, 1079-1082.
- Engelberth, J., Alborn, H.T., Schmelz, E.A. and Tumlinson, J.H. (2004).** Airborne signals prime plants against insect herbivore attack. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 1781-1785.
- Engelberth, J., Koch, T., Schuler, G., Bachmann, N., Rechtenbach, J. and Boland, W. (2001).** Ion channel-forming alamethicin is a potent elicitor of

volatile biosynthesis and tendrils coiling. Cross talk between jasmonate and salicylate signaling in lima bean. *Plant Physiology*, 125, 369-377.

- Fall, R., Karl, T., Hansel, A., Jordan, A. and Lindinger, W. (1999).** Volatile organic compounds emitted after leaf wounding: On-line analysis by proton-transfer-reaction mass spectrometry. *Journal of Geophysical Research-Atmospheres*, 104, 15963-15974.
- Farag, M.A. and Pare, P.W. (2002).** C₆-green leaf volatiles trigger local and systemic VOC emissions in tomato. *Phytochemistry*, 61, 545-554.
- Feussner, I. and Wasternack, C. (2002).** The lipoxygenase pathway. *Annual Review of Plant Biology*, 53, 275-297.
- Flament, I., Debonneville, C. and Furrer, A. (1993).** Volatile constituents of roses - characterization of cultivars based on the headspace analysis of living flower emissions. *Acs Symposium Series*, 525, 269-281.
- Flores, F., El Yahyaoui, F., de Billerbeck, G., Romojaro, F., Latche, A., Bouzayen, M., Pech, J.C. and Ambid, C. (2002).** Role of ethylene in the biosynthetic pathway of aliphatic ester aroma volatiles in Charentais Cantaloupe melons. *Journal of Experimental Botany*, 53, 201-206.
- Frohne, D. and Jensen, U. (1998).** Systematik des Pflanzenreichs. (Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart).
- Fujiwara, H., Tanaka, Y., Fukui, Y., Nakao, M., Ashikari, T. and Kusumi, T. (1997).** Anthocyanin 5-aromatic acyltransferase from *Gentiana triflora* - purification, characterization and its role in anthocyanin biosynthesis. *European Journal of Biochemistry*, 249, 45-51.
- Fujiwara, H., Tanaka, Y., Fukui, Y., Ashikari, T., Yamaguchi, M. and Kusumi, T. (1998a).** Purification and characterization of anthocyanin 3-aromatic acyltransferase from *Perilla frutescens*. *Plant Science*, 137, 87-94.
- Fujiwara, H., Tanaka, Y., Yonekura-Sakakibara, K., Fukuchi-Mizutani, M., Nakao, M., Fukui, Y., Yamaguchi, M., Ashikari, T. and Kusumi, T. (1998b).** cDNA cloning, gene expression and subcellular localization of anthocyanin 5-aromatic acyltransferase from *Gentiana triflora*. *Plant Journal*, 16, 421-431.
- Gabler, A., Boland, W., Preiss, U. and Simon, H. (1991).** Stereochemical studies on homoterpene biosynthesis in higher plants - mechanistic, phylogenetic, and ecological aspects. *Helvetica Chimica Acta*, 74, 1773-1789.
- Gang, D.R. (2005).** Evolution of flavors and scents. *Annual Review of Plant Biology*, 56, 301-325.
- Gershenzon, J., Maffei, M. and Croteau, R. (1989).** Biochemical and histochemical localization of monoterpene biosynthesis in the glandular trichomes of spearmint (*Mentha spicata*). *Plant Physiology*, 89, 1351-1357.
- Goff, S.A. and Klee, H.J. (2006).** Plant volatile compounds: Sensory cues for health and nutritional value? *Science*, 311, 815-819.

- Gouinguene, S., Alborn, H. and Turlings, T.C.J. (2003).** Induction of volatile emissions in maize by different larval instars of *Spodoptera littoralis*. *Journal of Chemical Ecology*, 29, 145-162.
- Halitschke, R. and Baldwin, I.T. (2003).** Antisense LOX expression increases herbivore performance by decreasing defense responses and inhibiting growth-related transcriptional reorganization in *Nicotiana attenuata*. *Plant Journal*, 36, 794-807.
- Halitschke, R., Ziegler, J., Keinanen, M. and Baldwin, I.T. (2004).** Silencing of hydroperoxide lyase and allene oxide synthase reveals substrate and defense signaling crosstalk in *Nicotiana attenuata*. *Plant Journal*, 40, 35-46.
- Hamilton-Kemp, T.R., McCracken, C.T., Andersen, R.A. and Hildebrand, D.F. (1995).** Antimicrobial properties of natural volatile compounds. In *Synthesis and Chemistry of Agrochemicals Iv*, pp. 449-462.
- Harborne, J.B. (1995).** *Ökologische Biochemie*. (Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum Akademischer Verlag).
- Hatanaka, A. (1993).** The biogenesis of green odor by green leaves. *Phytochemistry*, 34, 1201-1218.
- Heath, R.R. and Manukian, A. (1994).** An automated system for use in collecting volatile chemicals released from plants. *Journal of Chemical Ecology*, 20, 593-608.
- Holopainen, J.K. (2004).** Multiple functions of inducible plant volatiles. *Trends in Plant Science*, 9, 529-533.
- Homatidou, V.I., Karvouni, S.S., Dourtoglou, V.G. and Poulos, C.N. (1992).** Determination of total volatile components of *Cucumis melo* L. Variety Cantaloupensis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 1385-1388.
- Hopke, J., Donath, J., Blechert, S. and Boland, W. (1994).** Herbivore-induced volatiles - the emission of acyclic homoterpenes from leaves of *Phaseolus lunatus* and *Zea mays* can be triggered by a beta-glucosidase and jasmonic acid. *Febs Letters*, 352, 146-150.
- Karapinar, M. and Aktug, S.E. (1987).** Inhibition of foodborne pathogens by thymol, eugenol, menthol and anethole. *International Journal of Food Microbiology*, 4, 161-166.
- Kessler, A. and Baldwin, I.T. (2001).** Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. *Science*, 291, 2141-2144.
- Knudsen, J.T., Tollsten, L. and Bergstrom, L.G. (1993).** Floral scents - a checklist of volatile compounds isolated by headspace techniques. *Phytochemistry*, 33, 253-280.
- Kurita, N., Miyaji, M., Kurane, R. and Takahara, Y. (1981).** Antifungal activity of components of essential oils. *Agricultural and Biological Chemistry*, 45, 945-952.

- Laemmli, U.K. (1970).** Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680.
- Linton, C.J. and Wright, S.J.L. (1993).** Volatile organic compounds - Microbiological aspects and some technological implications. *Journal of Applied Bacteriology*, 75, 1-12.
- Loughrin, J.H., Manukian, A., Heath, R.R., Turlings, T.C.J. and Tumlinson, J.H. (1994).** Diurnal cycle of emission of induced volatile terpenoids herbivore-injured cotton plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91, 11836-11840.
- Ma, X.Y., Koepke, J., Panjekar, S., Fritzsche, G. and Stockigt, J. (2005).** Crystal structure of vinorine synthase, the first representative of the BAHD superfamily. *Journal of Biological Chemistry*, 280, 13576-13583.
- Mattiacci, L., Rocca, B.A., Scascighini, N., D'Alessandro, M., Hern, A. and Dorn, S. (2001).** Systemically induced plant volatiles emitted at the time of "danger". *Journal of Chemical Ecology*, 27, 2233-2252.
- McCall, P.J., Turlings, T.C.J., Loughrin, J., Proveaux, A.T. and Tumlinson, J.H. (1994).** Herbivore-induced volatile emissions from cotton (*Gossypium hirsutum* L) seedlings. *Journal of Chemical Ecology*, 20, 3039-3050.
- McGregor, S.E. (1976).** Insect pollination of cultivated crop plants-Agriculture handbook. (Washington, D.C.: U.S. Government Printing Office).
- Müller, R. (2005).** Untersuchung der Effekte von Glucosinolathydrolyseprodukten auf Lepidopterenlarven. In Biologisch-Pharmazeutische Fakultät (Jena: Friedrich-Schiller-Universität).
- Nam, K.H., Dudareva, N. and Pichersky, E. (1999).** Characterization of benzylalcohol acetyltransferases in scented and non-scented *Clarkia* species. *Plant and Cell Physiology*, 40, 916-923.
- Negrak, V., Yang, P., Subramanian, M., McNevin, J.P. and Lemieux, B. (1996).** Molecular cloning and characterization of the CER2 gene of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 9, 137-145.
- Okada, T., Hirai, M.Y., Suzuki, H., Yamazaki, M. and Saito, K. (2005).** Molecular cloning and characterization of tigloyl-CoA : 13 alpha-hydroxymultiflorine/13 alpha-hydroxylupanine O-tigloyltransferase from *Lupinus albus*: The first gene identification involved in quinolizidine alkaloid biosynthesis. *Plant and Cell Physiology*, 46, S55-S55.
- Page, R.D.M. (1996).** TreeView: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences*, 12, 357-358.
- Pare, P.W. and Tumlinson, J.H. (1997a).** De novo biosynthesis of volatiles induced by insect herbivory in cotton plants. *Plant Physiology*, 114, 1161-1167.
- Pare, P.W. and Tumlinson, J.H. (1997b).** Induced synthesis of plant volatiles. *Nature*, 385, 30-31.

- Pare, P.W. and Tumlinson, J.H. (1998).** Cotton volatiles synthesized and released distal to the site of insect damage. *Phytochemistry*, 47, 521-526.
- Pare, P.W. and Tumlinson, J.H. (1999).** Plant volatiles as a defense against insect herbivores. *Plant Physiology*, 121, 325-331.
- Pare, P.W., Farag, M.A., Krishnamachari, V., Zhang, H.M., Ryu, C.M. and Kloepper, J.W. (2005).** Elicitors and priming agents initiate plant defense responses. *Photosynthesis Research*, 85, 149-159.
- Pichersky, E. and Gang, D.R. (2000).** Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. *Trends in Plant Science*, 5, 439-445.
- 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.
- Pichersky, E., Noel, J.P. and Dudareva, N. (2006).** Biosynthesis of plant volatiles: Nature's diversity and ingenuity. *Science*, 311, 808-811.
- Porta, H. and Rocha-Sosa, M. (2002).** Plant lipoxygenases. Physiological and molecular features. *Plant Physiology*, 130, 15-21.
- Raguso, R.A. and Pichersky, E. (1995).** Floral volatiles from *Clarkia breweri* and *C. concinna* (Onagraceae) - recent evolution of floral scent and moth pollination. *Plant Systematics and Evolution*, 194, 55-67.
- Rose, U.S.R. and Tumlinson, J.H. (2004).** Volatiles released from cotton plants in response to *Helicoverpa zea* feeding damage on cotton flower buds. *Planta*, 218, 824-832.
- Rose, U.S.R., Lewis, W.J. and Tumlinson, J.H. (1998).** Specificity of systemically released cotton volatiles as attractants for specialist and generalist parasitic wasps. *Journal of Chemical Ecology*, 24, 303-319.
- Rose, U.S.R., Manukian, A., Heath, R.R. and Tumlinson, J.H. (1996).** Volatile semiochemicals released from undamaged cotton leaves - A systemic response of living plants to caterpillar damage. *Plant Physiology*, 111, 487-495.
- Ruther, J. and Furstenau, B. (2005).** Emission of herbivore-induced volatiles in absence of a herbivore - Response of *Zea mays* to green leaf volatiles and terpenoids. *Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal of Biosciences*, 60, 743-756.
- 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.
- Shalit, M., Katzir, N., Tadmor, Y., Larkov, O., Burger, Y., Shalekhet, F., Lastochkin, E., Ravid, U., Amar, O., Edelstein, M., Karchi, Z. and Lewinsohn, E. (2001).** Acetyl-CoA: Alcohol acetyltransferase activity and aroma formation in ripening melon fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 794-799.

- Shalit, M., Guterman, I., Volpin, H., Bar, E., Tamari, T., Menda, N., Adam, Z., Zamir, D., Vainstein, A., Weiss, D., Pichersky, E. and Lewinsohn, E. (2003).** Volatile ester formation in roses. Identification of an acetyl-coenzyme A. Geraniol/citronellol acetyltransferase in developing rose petals. *Plant Physiology*, 131, 1868-1876.
- Shiota, H. (1993).** New esteric components in the volatiles of banana fruit (*Musa sapientum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, 2056-2062.
- Souleyre, E.J.F., Greenwood, D.R., Friel, E.N., Karunairetnam, S. and Newcomb, R.D. (2005).** An alcohol acyl transferase from apple (cv. Royal Gala), MpAAT1, produces esters involved in apple fruit flavor. *Febs Journal*, 272, 3132-3144.
- Spiteller, D., Pohnert, G. and Boland, W. (2001).** Absolute configuration of volicitin, an elicitor of plant volatile biosynthesis from lepidopteran larvae. *Tetrahedron Letters*, 42, 1483-1485.
- Steeghs, M., Bais, H.P., de Gouw, J., Goldan, P., Kuster, W., Northway, M., Fall, R. and Vivanco, J.M. (2004).** Proton-transfer-reaction mass spectrometry as a new tool for real time analysis of root-secreted volatile organic compounds in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 135, 47-58.
- St-Pierre, B. and De Luca, V. (2000).** Evolution of acyltransferase genes: Origin and diversification of the BAHD Superfamily of acyltransferases involved in secondary metabolism. In *Recent advances in phytochemistry - Evolution of metabolic pathways*, J.T. Romeo, ed (Oxford: Elsevier Science), pp. 285-315.
- Stryer, L. (1990).** *Biochemie* (Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum Akademischer Verlag).
- Suzuki, H., Sawada, S., Watanabe, K., Nagae, S., Yamaguchi, M., Nakayama, T. and Nishino, T. (2004).** Identification and characterization of a novel anthocyanin malonyltransferase from scarlet sage (*Salvia splendens*) flowers: an enzyme that is phylogenetically separated from other anthocyanin acyltransferases. *Plant Journal*, 38, 994-1003.
- Suzuki, H., Nakayama, T., Yonekura-Sakakibara, K., Fukui, Y., Nakamura, N., Yamaguchi, M., Tanaka, Y., Kusumi, T. and Nishino, T. (2002).** cDNA cloning, heterologous expressions, and functional characterization of malonyl-coenzyme A : anthocyanidin 3-O-glucoside-6"-O-malonyltransferase from dahlia flowers. *Plant Physiology*, 130, 2142-2151.
- Tabachnik, M. and Devay, J.E. (1980).** Black root-rot development in cotton roots caused by *Thielaviopsis basicola* and the possible role of methyl acetate in pathogenesis. *Physiological Plant Pathology*, 16, 109.
- Tacke, E., Korfhage, C., Michel, D., Maddaloni, M., Motto, M., Lanzini, S., Salamini, F. and Doring, H.P. (1995).** Transposon tagging of the maize Glossy2 locus with the transposable element En/Spm. *Plant Journal*, 8, 907-917.

- Takabayashi, J. and Dicke, M. (1996).** Plant-carnivore mutualism through herbivore-induced carnivore attractants. *Trends in Plant Science*, 1, 109-113.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D.G. (1997).** The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25, 4876-4882.
- Tumlinson, J.H., Lewis, W.J. and Vet, L.E.M. (1993).** How parasitic wasps find their hosts. *Scientific American*, 268, 100-106.
- Turlings, T.C.J. and Tumlinson, J.H. (1992).** Systemic release of chemical signals by herbivore-injured corn. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89, 8399-8402.
- Turlings, T.C.J., Tumlinson, J.H. and Lewis, W.J. (1990).** Exploitation of herbivore-induced plant odors by host-seeking parasitic wasps. *Science*, 250, 1251-1253.
- Turlings, T.C.J., McCall, P.J., Alborn, H.T. and Tumlinson, J.H. (1993).** An elicitor in caterpillar oral secretions that induces corn seedlings to emit chemical signals attractive to parasitic wasps. *Journal of Chemical Ecology*, 19, 411-425.
- Turlings, T.C.J., Alborn, H.T., Loughrin, J.H. and Tumlinson, J.H. (2000).** Volicitin, an elicitor of maize volatiles in oral secretion of *Spodoptera exigua*: Isolation and bioactivity. *Journal of Chemical Ecology*, 26, 189-202.
- Turlings, T.C.J., Loughrin, J.H., McCall, P.J., Rose, U.S.R., Lewis, W.J. and Tumlinson, J.H. (1995).** How caterpillar-damaged plants protect themselves by attracting parasitic wasps. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, 4169-4174.
- Urbasch, I. (1984).** Production of C₆-wound gases by plants and the effect on some phytopathogenic fungi. *Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal of Biosciences*, 39, 1003-1007.
- Verstrepen, K.J., Derdelinckx, G., Dufour, J.P., Winderickx, J., Thevelein, J.M., Pretorius, I.S. and Delvaux, F.R. (2003).** Flavor-active esters: Adding fruitiness to beer. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 96, 110-118.
- Walker, K. and Croteau, R. (2000).** Molecular cloning of a 10-deacetylbaccatin III-10-O-acetyl transferase cDNA from *Taxus* and functional expression in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 583-587.
- Walker, K. and Croteau, R. (2001).** Taxol biosynthetic genes. *Phytochemistry*, 58, 1-7.
- Wan, C.Y. and Wilkins, T.A. (1994).** A modified hot borate method significantly enhances the yield of high-quality RNA from cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Analytical Biochemistry*, 223, 7-12.

- Wang, C.L., Xing, J.S., Chin, C.K., Ho, C.T. and Martin, C.E. (2001).** Modification of fatty acids changes the flavor volatiles in tomato leaves. *Phytochemistry*, 58, 227-232.
- Watkins, G.M. (1981).** Compendium of Cotton Diseases. (St. Paul, Minnesota: American Phytopathological Society).
- Wu, Y.R., Llewellyn, D.J. and Dennis, E.S. (2002).** A quick and easy method for isolating good-quality RNA from cotton (*Gossypium hirsutum* L.) tissues. *Plant Molecular Biology Reporter*, 20, 213-218.
- Wyllie, S.G. and Fellman, J.K. (2000).** Formation of volatile branched chain esters in bananas (*Musa sapientum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3493-3496.
- Yahyaoui, F.E.L., Wongs-Aree, C., Latche, A., Hackett, R., Grierson, D. and Pech, J.C. (2002).** Molecular and biochemical characteristics of a gene encoding an alcohol acyl-transferase involved in the generation of aroma volatile esters during melon ripening. *European Journal of Biochemistry*, 269, 2359-2366.
- Yang, Q., Grimmig, B. and Matern, U. (1998).** Anthranilate N-hydroxycinnamoyl/benzoyltransferase gene from carnation: rapid elicitation of transcription and promoter analysis. *Plant Molecular Biology*, 38, 1201-1214.
- Young, H., Gilbert, J.M., Murray, S.H. and Ball, R.D. (1996).** Causal effects of aroma compounds on Royal Gala apple flavours. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 71, 329-336.
- Zabetakis, I. and Holden, M.A. (1997).** Strawberry flavour: Analysis and biosynthesis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 74, 421-434.

7 Danksagung

Ich danke Prof. Jonathan Gershenzon, der mir die Möglichkeit gab, meine Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für chemische Ökologie zu schreiben und stets ein offenes Ohr für mich hatte.

Mein größtes Dankeschön gilt Meike Burow, Christine Zipfel und meiner lieben Freundin Anja Paschold ohne deren positive Energie, Kraft und Motivation diese Arbeit in den letzten Momenten gescheitert wäre.

Ich danke meinen Korrektoren Stefan Opitz, Christian Abel und vielen weiteren für die kritische Durchsicht des Manuskriptes und die anregenden Diskussionen.

Besonders dankbar bin ich meiner Freundin Juliane Sanft, die mir in den letzten Jahren all das was ich heute kann, beigebracht hat und mich immer emotional unterstützt hat.

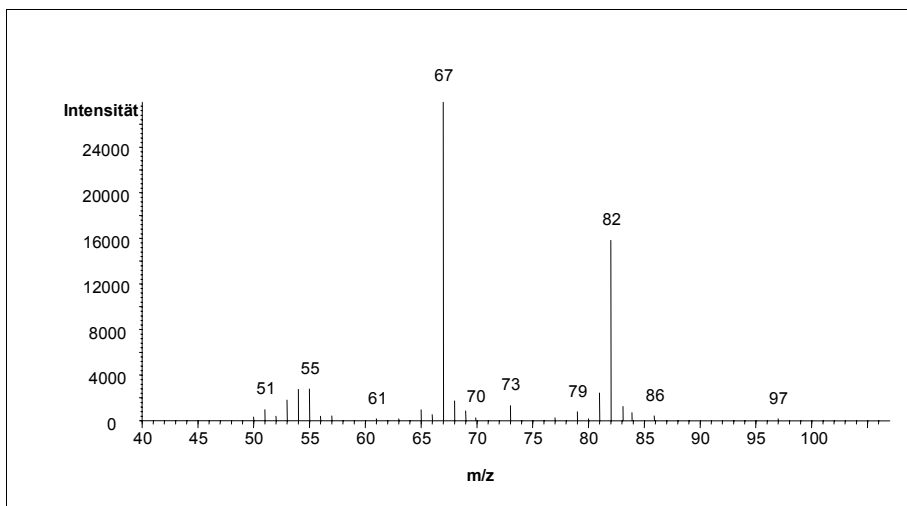
John D'Auria danke ich für die praktische Betreuung der Arbeit und seinem festen Glauben, aus mir einen guten Biochemiker zu machen.

Zu großem Dank verpflichtet bin ich meinen Eltern, meinen Schwestern und meiner lieben Oma, die immer an mich glaubten, mich unterstützen und einfach immer da waren. Damit machten sie es mir leichter, mich auf mein Studium und die Arbeit zu konzentrieren.

Meiner kleinen Familie, meinem Sonnenkäfer Emma und meinem Tobi danke ich für die unendliche Geduld, ihr Verständnis, ihre Liebe und ihr Lachen, das mich tagtäglich ermutigt hat nicht aufzugeben.

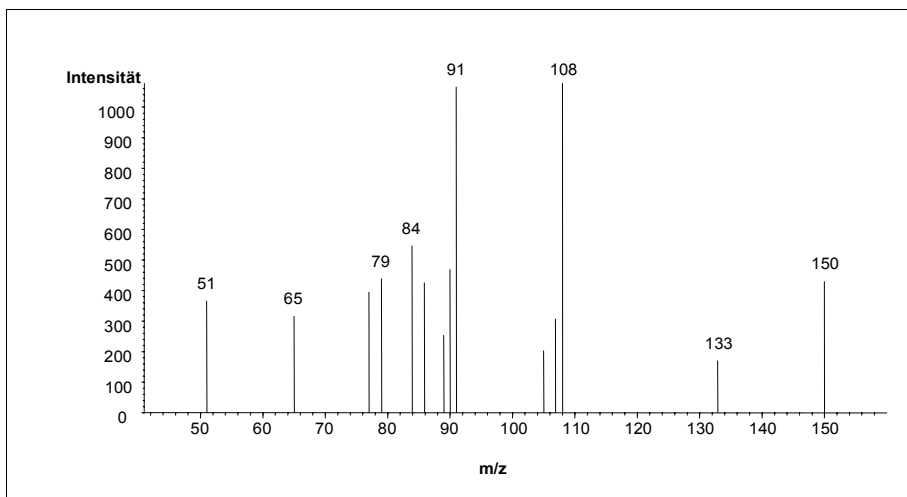
8 Anhang

Massenspektren analysierter emittierter Ester von *G.hirsutum*



Massenspektrum des Esters (Z)-3-Hexenylacetat . „Target“-Ion 67, „Qualifizier“-Ion

82



Massenspektrum des Esters Benzylacetat. „Target“-Ion 108, „Qualifizier“-Ion 91

Selbständigkeitserklärung

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

Jena, den 18. April 2006

Jana Pastuschek