

Technische Universität München  
Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt  
Department für Lebensmittel und Ernährung  
Fachgebiet Biomolekulare Lebensmitteltechnologie

**Funktionelle Charakterisierung von Enzymen des  
Sekundärstoffwechsels in  
Lavendel (*Lavandula angustifolia*) und  
Erdbeere (*Fragaria x ananassa*)**

**Christian Landmann**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

**Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Karl-Heinz Engel  
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Wilfried Schwab  
2. Univ.-Prof. Dr. Peter Schieberle  
3. Priv.-Doz. Dr. Wolfgang Eisenreich

Die Dissertation wurde am 11.04.2007 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 03.07.2007 angenommen.



## Danksagung

Die Arbeiten zur vorliegenden Dissertation wurden vom 1. März 2003 bis zum 31. August 2006 am Fachgebiet Biomolekulare Lebensmitteltechnologie der Technischen Universität München durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Wilfried Schwab für die Überlassung des Themas, das entgegengebrachte Vertrauen und seine stete Bereitschaft zur Diskussion.

Ferner danke ich

- Herrn Dr. Asaph Aharoni für die hervorragende Einführung in die Welt der Molekularbiologie während meines Aufenthalts bei Plant Research International,
- Herrn Prof. Dr. Karl-Heinz Engel und Frau Dr. Márta Dregus vom Lehrstuhl für Allgemeine Lebensmitteltechnologie für die Durchführung zahlreicher gaschromatographischer Messungen,
- Herrn Prof. Dr. Peter Schreier und Herrn Dr. Frank Heckel vom Lehrstuhl für Lebensmittelchemie der Universität Würzburg für die Durchführung von MDGC-MS-Messungen,
- Herrn Prof. Dr. Peter Schieberle vom Lehrstuhl für Lebensmittelchemie für die Bereitstellung von deuteriertem Linalool,
- Herrn Dr. Till Beuerle vom Institut für Pharmazeutische Biologie der Technischen Universität Braunschweig für die Bereitstellung des 4CL-Expressionskonstruktes,
- Herrn Dr. Thilo Fischer vom Lehrstuhl für Zierpflanzenbau für seine Unterstützung bei der Hefeexpression,
- der Degussa AG für die finanzielle Unterstützung und die Möglichkeit, ihre Räumlichkeiten und Geräte zu nutzen.

Ein ganz besonderes Dankeschön möchte ich an alle ehemaligen und derzeitigen Mitarbeiter des Fachgebietes Biomolekulare Lebensmitteltechnologie für das hervorragende Arbeitsklima und die zahlreichen privaten Unternehmungen richten. Insbesondere danke ich Barbara Fink für ihre tatkräftige Unterstützung im Laboralltag und Maria Festner für die engagierte Mitarbeit im Rahmen ihrer Studienarbeit.



# Inhaltsverzeichnis

Danksagung .....	I
Inhaltsverzeichnis .....	III
Abkürzungsverzeichnis .....	VII
Zusammenfassung .....	XI
Summary .....	XV
<b>A Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1 Sekundärstoffwechsel</b> .....	<b>1</b>
1.1 Einteilung in Primär- und Sekundärstoffwechsel.....	1
1.2 Vielfalt des Sekundärmetabolismus.....	2
1.3 Funktionelle Charakterisierung von Enzymen des Sekundärmetabolismus .....	4
<b>2 Glucosyltransferasen</b> .....	<b>6</b>
2.1 Einteilung.....	6
2.2 Reaktionen und Struktur.....	6
2.3 Funktionen.....	8
2.4 Vorarbeiten zu FaGT2 .....	10
<b>3 Terpensynthesen</b> .....	<b>12</b>
3.1 Einteilung der Terpenoide.....	12
3.2 Biosynthese der Terpenoide .....	13
3.2.1 Mevalonat-Weg .....	13
3.2.2 Deoxyxylulosephosphat-Weg .....	13
3.2.3 Synthese von Geranyldiphosphat und Farnesyldiphosphat.....	14
3.2.4 Kompartimentierung .....	14
3.2.5 Reaktionen der Mono- und Sesquiterpensynthesen.....	16
3.2.6 Struktur der Mono- und Sesquiterpensynthesen .....	18
3.3 Phylogenetik der Mono- und Sesquiterpensynthesen.....	19
3.4 Funktionen der Mono- und Sesquiterpene.....	21
3.5 Terpene in der Erdbeere.....	22
3.6 Terpene in Lavendel ( <i>Lavandula angustifolia</i> ) .....	24
3.7 <i>Metabolic Engineering</i> von Terpenen .....	25
<b>4 Acyltransferasen</b> .....	<b>27</b>
4.1 Überblick über die Acyltransferasen .....	27
4.2 Gemeinsame Eigenschaften der BAHD-Acyltransferasen.....	27
4.3 Klassifizierung der BAHD-Acyltransferasen.....	29
<b>5 Problemstellung</b> .....	<b>32</b>
<b>B Ergebnisse und Diskussion</b> .....	<b>34</b>
<b>1 Erweiterte Charakterisierung von FaGT2</b> .....	<b>34</b>
1.1 Expression und Aufreinigung von FaGT2 .....	34
1.2 Abhängigkeit von Magnesiumkationen .....	34
1.3 Strukturelle Vielfalt der Substrate von FaGT2.....	36
1.4 Glucosylierung von Umweltkontaminanten.....	42
1.5 Glucosylierung von 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3[2H]-furanon .....	43

1.6	Bildung glucosidischer Verbindungen <i>in planta</i> .....	43
1.7	Diskussion .....	44
1.7.1	Strukturelle Gemeinsamkeiten der Substrate .....	44
1.7.2	Bedeutung von FaGT2 in der Aromabiosynthese .....	45
1.7.3	Bedeutung von FaGT2 als Entgiftungsenzym .....	46
1.7.4	FaGT2 - ein multifunktionelles Enzym .....	48
<b>2</b>	<b>Terpensynthasen in der Erdbeere</b> .....	<b>50</b>
2.1	Design von degenerierten Primern .....	50
2.2	Klonierung und Sequenzanalyse von Terpensynthasen aus <i>Fragaria x ananassa</i> und <i>Fragaria vesca</i> .....	52
2.3	Expression und Charakterisierung von FaLINS und FvNES .....	53
2.4	Diskussion .....	56
<b>3</b>	<b>Terpensynthasen in <i>Lavandula angustifolia</i></b> .....	<b>58</b>
3.1	Klonierung von Terpensynthasen .....	58
3.2	Sequenzanalyse .....	58
3.3	Heterologe Expression .....	62
3.4	Charakterisierung der klonierten Terpensynthasen .....	64
3.4.1	Charakterisierung einer (R)-Limonensynthase .....	65
3.4.1.1	Identifizierung der gebildeten Produkte .....	65
3.4.1.2	Biochemische Charakterisierung .....	67
3.4.2	Charakterisierung einer (R)-Linaloolsynthase .....	70
3.4.2.1	Identifizierung der gebildeten Produkte .....	70
3.4.2.2	Biochemische Charakterisierung .....	71
3.4.3	Charakterisierung einer <i>trans</i> - $\alpha$ -Bergamotensynthase .....	73
3.4.3.1	Identifizierung der Produkte .....	73
3.4.3.2	Biochemische Charakterisierung .....	75
3.5	Vergleich mit einem Extrakt aus Lavendelblüten .....	77
3.6	Diskussion .....	78
3.6.1	Zusammenfassung der Enzymeigenschaften .....	78
3.6.2	(R)-Limonensynthase .....	79
3.6.3	(R)-Linaloolsynthase .....	80
3.6.4	<i>trans</i> - $\alpha$ -Bergamotensynthase .....	81
3.6.5	Bedeutung der drei Terpensynthasen in <i>Lavandula angustifolia</i> .....	82
<b>4</b>	<b>Acyltransferasen in <i>Lavandula angustifolia</i></b> .....	<b>83</b>
4.1	Klonierung von Acyltransferasen .....	83
4.2	Sequenzanalyse und phylogenetische Einordnung .....	84
4.3	Heterologe Expression .....	89
4.4	Enzymassays .....	91
4.5	Diskussion .....	93
<b>C</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>97</b>
<b>1</b>	<b>Material</b> .....	<b>97</b>
1.1	Chemikalien .....	97
1.2	Pflanzenmaterial .....	97
1.3	Bakterien- und Hefestämme .....	97
1.4	Vektoren .....	98
1.4.1	Leervektoren .....	98

---

1.4.2	Vektoren mit Insert .....	98
1.5	Medien, Pufferlösungen und andere Lösungen .....	98
1.5.1	Medien.....	98
1.5.2	Lösungen für molekularbiologische Arbeiten .....	99
1.5.3	Lösungen zur Proteinaufreinigung .....	100
1.5.4	Lösungen für SDS-PAGE .....	102
1.5.5	Lösungen für Western Blotting .....	102
1.5.6	Sonstige Lösungen .....	103
1.6	Enzyme.....	104
1.6.1	Restriktionsendonucleasen.....	104
1.6.2	Reverse Transkriptase .....	104
1.6.3	DNA-Polymerasen .....	104
1.6.4	Sonstige Enzyme.....	104
1.7	Primer .....	104
1.7.1	Standard-Primer .....	104
1.7.2	Degenerierte Primer zur Klonierung von Terpensynthasen .....	105
1.7.3	Degenerierter Primer zur Klonierung von Acyltransferasen.....	105
1.7.4	Primer zur cDNA-Synthese und RACE-PCR .....	105
1.7.5	Primer zur Vollängenklonierung und Herstellung der Konstrukte...	106
1.8	Kits für molekularbiologische Arbeiten.....	107
<b>2</b>	<b>Geräte .....</b>	<b>108</b>
2.1	Hochauflösende Gaschromatographie-Massenspektrometrie (HRGC-MS) .....	108
2.1.1	Gerätekonfiguration .....	108
2.1.2	Methode 1: Identifizierung .....	108
2.1.3	Methode 2: Quantifizierung.....	108
2.2	Chiralphasen-Gaschromatographie (Chirale GC).....	109
2.3	Multidimensionale Gaschromatographie (MDGC) .....	109
2.4	Multidimensionale Gaschromatographie-Massenspektrometrie (MDGC-MS).....	110
2.5	Hochleistungsflüssigchromatographie-Elektrosprayionisations- Massenspektrometrie (HPLC-ESI-MS/MS).....	110
2.5.1	HPLC-System.....	110
2.5.2	Massenspektrometer .....	111
2.5.3	Methode 1.....	111
2.5.4	Methode 2.....	112
2.5.5	Methode 3.....	112
2.5.6	Methode 4.....	113
2.5.7	Methode 5.....	113
2.6	Präparative Hochleistungsflüssigchromatographie .....	114
2.7	Flüssigszintillationszähler (LSC) .....	114
2.8	Sonstige Geräte .....	114
2.9	Software und Internetressourcen.....	115
<b>3</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>117</b>
3.1	Allgemeine Techniken .....	117
3.1.1	Extraktion pflanzlicher mRNA und DNA .....	117
3.1.2	Polymerase-Kettenreaktion .....	117

3.1.3	Gelelektrophorese für DNA .....	118
3.1.4	Subklonierung.....	119
3.1.5	Ligation in pYES2.1 .....	119
3.1.6	Restriktionsverdau, Dephosphorylierung und Ligation klebriger Enden .....	119
3.1.7	Herstellung kompetenter <i>Escherichia coli</i> Zellen .....	120
3.1.8	Transformation von <i>Escherichia coli</i> Zellen .....	120
3.1.9	Transformation von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Zellen .....	121
3.1.10	Überprüfung transformierter Kolonien .....	121
3.1.11	Isolierung von Plasmid-DNA.....	121
3.1.12	Fällung von DNA .....	122
3.1.13	Sequenzierung von DNA .....	122
3.2	Klonierung von Terpensynthasen und Acyltransferasen.....	122
3.2.1	Herstellung von cDNA (RT-PCR) .....	122
3.2.2	PCR mit degenerierten Primern.....	123
3.2.3	3'-Rapid Amplification of cDNA Ends (3'-RACE-PCR) .....	124
3.2.4	5'-Rapid Amplification of cDNA Ends (5'-RACE-PCR) .....	125
3.2.5	Klonierung der Vollängen .....	126
3.2.6	Herstellung der Expressionskonstrukte .....	127
3.2.7	Sequenzierung der genomischen Sequenzen.....	128
3.3	Allgemeine biochemische Methoden .....	128
3.3.1	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	128
3.3.2	<i>Western Blot</i> .....	129
3.3.3	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	129
3.3.4	Heterologe Expression in <i>E. coli</i> .....	130
3.3.5	Heterologe Expression in <i>S. cerevisiae</i> .....	130
3.3.6	Aufreinigung von FaGT2 .....	130
3.3.7	Aufreinigung von 4CL .....	131
3.3.8	Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen.....	131
3.3.9	Aufreinigung von hefeexprimierten Proteinen.....	132
3.4	Biochemische Charakterisierung von FaGT2 .....	132
3.4.1	<i>In-vitro</i> -Assays.....	132
3.4.2	Inkubation und Aufarbeitung von Erdbeerfrüchten .....	133
3.5	Biochemische Charakterisierung von Terpensynthasen.....	134
3.5.1	Enzymassays .....	134
3.5.2	Identifizierung der Enzymprodukte .....	135
3.5.3	Quantifizierung der Enzymprodukte .....	136
3.5.4	Extrakte aus Lavendel und <i>Hyptis suaveolens</i> .....	137
3.6	Biochemische Charakterisierung von Acyltransferasen.....	137
3.6.1	Darstellung von Caffeoyl- und <i>p</i> -Cumaroyl-CoA.....	137
3.6.2	Enzymassays .....	138
<b>D</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>139</b>



## Abkürzungsverzeichnis

2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
4CL	Zimtsäure- und Hydroxyzimtsäure:CoA-Ligase
amu	Atomare Masseneinheit
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-phosphat
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
CAPSO	3-(Cyclohexylamino)-2-hydroxy-1-propansulfonsäure
CAZy	<i>Carbohydrate-Active Enzymes</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
CIP	<i>Calf Intestinal Alkaline Phosphatase</i>
CoA	Coenzym A
DDA	2,2-Bis-(4-chlorphenyl)-essigsäure
DMAPP	3,3-Dimethylallyldiphosphat
DMHF	2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanon
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
DXP	1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EI	Elektronenstoßionisation
ESI	<i>Electrospray Ionization</i>
FaGT2	<i>Fragaria x ananassa</i> Glycosyltransferase 2 (GenBank: AAU09443)
FaLINS	<i>Fragaria x ananassa</i> Linaloolsynthase
FaNES1	<i>Fragaria x ananassa</i> Linalool-/Nerolidolsynthase 1 (GenBank: CAD57083)
FaNES2	<i>Fragaria x ananassa</i> Linalool-/Nerolidolsynthase 2 (GenBank: CAD57106)
FPP	Farnesyldiphosphat
FvLINS	<i>Fragaria vesca</i> Linaloolsynthase

---

FvNES	<i>Fragaria vesca</i> Linalool-/Nerolidolsynthase (GenBank: CAD57084)
GGPP	Geranylgeranyldiphosphat
GPP	Geranyldiphosphat
GST	Glutathion-S-Transferase
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Hochleistungsflüssigchromatographie)
HRGC	<i>High Resolution Gas Chromatography</i> (Kapillargaschromatographie)
IPP	Isopentenylidiphosphat
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid
IUBMB	<i>International Union of Biochemistry and Molecular Biology</i>
$k_{\text{cat}}$	Wechselzahl
$K_{\text{m}}$	Michaelis-Menten-Konstante
LaAT1	<i>Lavandula angustifolia</i> Acyltransferase 1 (GenBank: ABI48360)
LaAT2	<i>Lavandula angustifolia</i> Acyltransferase 2 (GenBank: ABI48361)
LaBERS	<i>Lavandula angustifolia</i> trans- $\alpha$ -Bergamotensynthase (GenBank: ABB73046)
LaLIMS	<i>Lavandula angustifolia</i> (R)-Limonensynthase (GenBank: ABB73044)
LaLINS	<i>Lavandula angustifolia</i> (R)-Linaloolsynthase (GenBank: ABB73045)
MCSS	<i>Moving-Column-Stream-Switching</i>
MDGC	Multidimensionale Gaschromatographie
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
MOPSO	3-Morpholino-2-hydroxypropansulfonsäure
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
MS	Massenspektrometrie
$m/z$	Masse-Ladungs-Verhältnis
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NBT	Nitrobluetetrazolium
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>Phosphat Buffered Saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid

---

PSPG	<i>Plant Secondary Product Glucosyltransferase</i>
RACE	<i>Rapid Amplification of cDNA Ends</i>
RT	Reverse Transkription
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i>
TAPS	<i>N</i> -[Tris-(hydroxymethyl)-methyl]-3-aminopropansulfonsäure
TCP	2,4,5-Trichlorphenol
TEK	Tris-EDTA-Kaliumchlorid
TES	Tris-EDTA-Sorbitol
TIC	Totalionenchromatogramm
TPS	Terpensynthase
tRNA	Gesamt-RNA
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UDP	Uridin-5'-diphosphat
UGT	UDP-Glycosyltransferase
UTR	<i>Untranslated Region</i>
upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
$V_{\max}$	Maximale Reaktionsgeschwindigkeit
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
YPGE	<i>Yeast-Peptide-Glucose-Ethanol</i>

Ein- und Dreibuchstabencode der Aminosäuren:

<b>Aminosäure</b>	<b>Dreibuchstabencode</b>	<b>Einbuchstabencode</b>
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

## Zusammenfassung

Pflanzen synthetisieren eine immense Zahl von sekundären Inhaltsstoffen wie Terpene, Alkaloide und phenolische Substanzen. Die Biosynthese dieser Verbindungen wird von entsprechend vielen verschiedenen Enzymen gewährleistet. Drei Enzymgruppen, deren Reaktionen eine große Rolle im Sekundärstoffwechsel spielen, sind in dieser Arbeit betrachtet worden: Glucosyltransferasen, Terpensynthasen und Acyltransferasen.

Kürzlich wurde eine UDP-Glucose:Cinnamat-Glucosyltransferase der Kulturerdbeere (*Fragaria x ananassa*) (FaGT2) beschrieben, die die Bildung von Zimtsäure- und *p*-Cumarsäure-Glucoseester während der Fruchtreifung katalysiert. Dieses Enzym, das in der Erdbeerfrucht reife- und stressinduziert exprimiert wird, setzt jedoch auch weitere, strukturell verschiedene Substrate natürlichen und anthropogenen Ursprungs *in vitro* um. Deren Reaktionskinetiken wurden verglichen, um zusätzliche biologische Funktionen des Enzyms aufzuklären. Das Spektrum der akzeptierten Substrate reichte von Zimtsäure- und Benzoessäurederivaten über heterozyklische und aliphatische Strukturen und resultierte in der Bildung von *O*- und *S*-Glucoseestern sowie *O*-Glucosiden. Die Synthese der glucosidischen Verbindungen wurde *in planta* bestätigt, nachdem die Substrate in reife Erdbeeren injiziert worden waren. Als gemeinsame chemische und strukturelle Eigenschaften, die für die enzymatische Aktivität erforderlich sind, wurden die einfache Deprotonierung der Glucosylierungsstelle und die Konjugation der dabei gebildeten Anionen mit  $\pi$ -Elektronen identifiziert. Sorbinsäure repräsentiert das Substrat mit der einfachsten Struktur, das mit sehr hoher Effizienz umgesetzt wurde. Als natürliche Substrate wurden neben Zimtsäure auch Anthranilsäure, (*E*)-2-Hexensäure, Nicotinsäure und 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3[*2H*]-furanon glucosyliert. Die glucosidischen Produkte dienen möglicherweise als Vorläufersubstanzen von wichtigen Aromastoffen oder als Speicherungsformen. FaGT2 setzte aber höchst effizient auch Xenobiotika um wie das Herbizid 2,4,5-Trichlorphenol oder die zu einem Herbizidmetaboliten analoge 3,5-Dichlor-4-hydroxybenzoessäure. Diese Ergebnisse in Verbindung mit der stressinduzierten Expression von FaGT2 legen nahe, dass das Enzym in die Detoxifizierung von Xenobiotika involviert ist.

In den Früchten der kultivierten Erdbeere (*Fragaria x ananassa*) trägt der Monoterpenalkohol Linalool, der überwiegend als (S)-Enantiomer vorliegt, zum Aroma bei. Die Biosynthese des (S)-Linalools in Erdbeerfrüchten wurde kürzlich aufgeklärt und wird von der Terpensynthase FaNES1 katalysiert. In den Blättern von *Fragaria x ananassa* und vor allem in denen der wilden Erdbeere (*Fragaria vesca*) liegt neben (S)-Linalool ein höherer Anteil (R)-Linalool vor. Durch eine Polymerase-Kettenreaktion-Strategie (PCR-Strategie), die die Homologie von Terpensynthasegenen ausnutzt, wurden aus komplementärer DNA (cDNA) von Blättern der Arten *Fragaria vesca* und *Fragaria x ananassa* zwei Teilsequenzen extrahiert, die sehr hohe Identitäten mit FaNES1 aufweisen. Aus *Fragaria x ananassa* wurde FaLINS in Volllänge kloniert, das codierte Protein in *Escherichia coli* exprimiert und mit dem Substrat Geranyldiphosphat (GPP) umgesetzt. Mittels multidimensionaler Gaschromatographie-Massenspektrometrie wurde nachgewiesen, dass FaLINS trotz einiger Sequenzunterschiede zu FaNES1 ebenfalls ausschließlich (S)-Linalool bildet. Offenbar handelt es sich bei den beiden Sequenzen um unterschiedliche Allele oder paraloge Gene, die in Blättern und Früchten differenziert exprimiert werden.

In *Fragaria vesca* wurde bereits eine Linaloolsynthase (FvNES) mit unbekannter Stereospezifität nachgewiesen, die ebenfalls homolog zu FaNES1 ist, jedoch ein zusätzliches N-terminales Sequenzelement enthält. Dieses Enzym wurde wie FaLINS heterolog exprimiert und in einem Enzymassay untersucht. Da es ausschließlich (S)-Linalool bildet, kann ausgeschlossen werden, dass der N-terminale Sequenzabschnitt die Stereospezifität der enzymatischen Reaktion beeinflusst.

Das wirtschaftlich bedeutsame etherische Öl des Echten Lavendels (*Lavandula angustifolia*) enthält eine große Zahl an Mono- und Sesquiterpenen. Ähnlich wie in der Erdbeere wurden durch eine Homologie-basierende Strategie die drei neuen Terpensynthasen LaLIMS, LaLINS und LaBERS kloniert. Die phylogenetische Analyse zeigte, dass deren Sequenzen den Terpensynthasen aus anderen Vertretern der Familie *Lamiaceae* ähneln. Die Enzyme wurden heterolog in *Escherichia coli* exprimiert und biochemisch hinsichtlich optimaler Reaktionsbedingungen (pH-Wert, Temperatur und Cofaktorkonzentrationen) und kinetischer Parameter charakterisiert.

LaLIMS bildet die sechs Monoterpene Limonen (39 %), Terpinolen (22 %), Camphen (16 %),  $\alpha$ -Pinen (14 %),  $\beta$ -Myrcen (8 %) und  $\alpha$ -Phellandren (1 %). Die Analyse mittels Chiralphasen-Gaschromatographie zeigte, dass in großem Überschuss die Enantiomere (1R,5R)-(+)- $\alpha$ -Pinen, (1R,4S)-(+)-Camphen und (R)-(+)-Limonen synthetisiert werden. Die Assays ließen zudem eine unterschiedliche Produktzusammensetzung bei Verwendung von Mangan- und Magnesiumkationen erkennen, was den Einfluss dieser Cofaktoren auf die Struktur und Reaktion der Terpensynthasen unterstreicht. Multiproduktsynthasen wie LaLIMS erklären, wie die vielen unterschiedlichen Terpene im etherischen Öl entstehen, ohne dass eine entsprechend große Zahl an Enzymen vorhanden sein muss.

LaLINS katalysiert die Transformation von GPP zu ausschließlich (R)-Linalool. Die stark bevorzugte Bildung des (R)-Enantiomers korrespondiert mit der Konfiguration der Hauptinhaltsstoffe des Lavendelöls, (R)-Linalool und (R)-Linalylacetat. Daher dürfte das Enzym von entscheidender Bedeutung für das Aromaprofil von *Lavandula angustifolia* sein.

Das dritte Enzym, LaBERS, ist eine Sesquiterpensynthase und bildet aus Farnesyldiphosphat (FPP) überwiegend *trans*- $\alpha$ -Bergamoten (74 %). Es handelt sich um die erste beschriebene *trans*- $\alpha$ -Bergamotensynthase. Mit geringer Effizienz katalysiert sie auch die Bildung von Monoterpenen aus GPP. Sie gehört phylogenetisch zur Klasse TPS-b der Terpensynthasefamilie, in der nahezu nur Monoterpensynthasen eingeordnet sind. Sie stellt damit ein weiteres Beispiel einer Sesquiterpensynthase dar, die vermutlich aus einer Monoterpensynthase hervorging. Obwohl die drei Terpensynthasen nur für einen Teil der Terpene des etherischen Öls von *Lavandula angustifolia* verantwortlich sind, stellt die Kenntnis ihrer Gensequenzen eine Grundlage dar, mit der die gezielte genetische Modifizierung von Lavendelpflanzen und die Beeinflussung ihres Aromaprofils ermöglicht wird.

Im etherischen Öl von *Lavandula angustifolia* tragen auch die Ester von Terpenalkoholen und kurzkettigen Alkoholen, vor allem Linalylacetat, wesentlich zum Aroma bei. Da deren Biosynthese von Acyltransferasen der BAHD-Superfamilie katalysiert wird, wurden basierend auf dem gemeinsamen Aminosäuremotiv DFGWG die beiden Sequenzen *LaAT1* und *LaAT2* in Volllänge kloniert. Phylogenetisch ist *LaAT1* verwandt mit der Acyltransferasen-Untergruppe V, die als Donorsubstrate Coenzym A-Ester von Hydroxyzimtsäuren und Benzoesäure benötigen und die

Säurereste auf die Hydroxy- oder Aminofunktionen von Chinasäure und Shikimisäure sowie Anthranilsäure und deren Derivaten übertragen. LaAT2 enthält ebenfalls alle charakteristischen Sequenzelemente der BAHD-Acyltransferasen, weist aber insgesamt wenig Ähnlichkeit zu den bisher beschriebenen auf und könnte Mitglied einer neuen Untergruppe sein. LaAT1 und LaAT2 wurden heterolog in *Escherichia coli* und *Saccharomyces cerevisiae* exprimiert und in einem Substratscreening mit unterschiedlichen Coenzym A-Estern und Alkoholen umgesetzt. Lediglich LaAT1 war in Enzymassays aktiv und katalysierte als erster Vertreter der BAHD-Superfamilie die Bildung sowohl von Amid- als auch Esterbindungen, die in Caffeoyl- und Cumaroylshikimat, Caffeoyl- und Cumaroyltyramin sowie Cumaroylanthranilat resultierte. Bisher wurde die Synthese der Tyraminderivate in Pflanzen ausschließlich der Familie der Tyramin-*N*-hydroxycinnamoyltransferasen zugeschrieben, die sich deutlich von den BAHD-Acyltransferasen unterscheiden. LaAT1 ist damit zwar nicht in die Aromabiosynthese involviert, könnte aber andere wichtige Funktionen im Sekundärmetabolismus übernehmen.



## Summary

Plants contain a huge number of secondary compounds like terpenoids, alkaloids and phenolic substances which are synthesized by numerous different enzymes. Three enzyme families were investigated in this study that play important roles in secondary metabolism: glucosyltransferases, terpene synthases and acyl-transferases.

Recently a UDP-glucose:cinnamate glucosyltransferase of the cultivated strawberry (*Fragaria x ananassa*) (FaGT2) was characterized catalyzing the formation of cinnamic acid and *p*-coumaric acid glucose esters during strawberry fruit ripening. This enzyme, which is induced by ripening and oxidative stress, also transforms other, structurally diverse substrates of natural and anthropogenic origin *in vitro*. The kinetic parameters of these compounds were compared to elucidate additional biological functions of FaGT2. Accepted substrates ranged from derivatives of cinnamic acid and benzoic acid to heterocyclic and aliphatic compounds resulting in the formation of *O*- and *S*-glucose esters as well as *O*-glucosides. *In planta* assays confirmed the formation of glucose derivatives after injection of the substrates into strawberry fruits. Common chemical and structural features required for activity were the easy subtraction of a proton from the glucosylation site and the conjugation of the formed anion with  $\pi$ -electrons as best realized in the simplest substrate sorbic acid. In addition to cinnamic acid, the natural compounds anthranilic acid, (*E*)-2-hexenoic acid, nicotinic acid and 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3[2*H*]-furanone were glucosylated. The derived glucosidic products may serve as precursors for the formation of important flavor compounds or as storage forms in the strawberry. But FaGT2 was also capable of efficiently converting xenobiotic substances like the herbicide 2,4,5-trichlorophenol and the herbicide analogue 3,5-dichloro-4-hydroxybenzoic acid. The results suggest that FaGT2 is involved in the detoxification of xenobiotics in accordance to its induction by oxidative stress.

The monoterpene alcohol linalool contributes to the flavor of the cultivated strawberry (*Fragaria x ananassa*) and occurs predominantly as (*S*)-enantiomer. The biosynthesis of (*S*)-linalool in strawberry fruit was recently elucidated and is catalyzed by the terpene synthase FaNES1. In the foliage of *Fragaria x ananassa* and especially of the wild strawberry (*Fragaria vesca*) a higher percentage of (*R*)-linalool in addition to (*S*)-linalool is present. A polymerase chain reaction (PCR) strategy

based on the homology of terpene synthase genes was applied to complementary DNA (cDNA) from leaves of *Fragaria x ananassa* and *Fragaria vesca* resulting in the extraction of two partial sequences with high identity to *FaNES1*. The full length sequence from *Fragaria x ananassa*, *FaLINS*, was cloned, the encoded protein was expressed in *Escherichia coli* and assayed with geranyl diphosphate (GPP). Analysis with multidimensional gas chromatography mass spectrometry revealed that *FaLINS* exclusively synthesizes (S)-linalool like *FaNES1*, despite several sequence differences. Apparently the two sequences represent separate alleles or paralogous genes differentially expressed in leaves and flowers.

In *Fragaria vesca* a linalool synthase (*FvNES*) with unknown stereospecificity was previously identified. Its sequence is also homologous to *FaNES1*, but it additionally carries an N-terminal signal peptide. The enzyme was heterologously expressed and assayed like *FaLINS*, showing the exclusive formation of (S)-linalool. Thus, it can be excluded that the N-terminal sequence part affects the stereospecificity of the enzymatic reaction.

The economically important essential oil of true lavender (*Lavandula angustifolia*) contains many mono- and sesquiterpenes. Similar to the experiments with strawberry a homology-based PCR strategy allowed cloning of three terpene synthase genes, *LaLIMS*, *LaLINS* and *LaBERS*. Phylogenetic analysis showed similarities to terpene synthases from other species of the family *Lamiaceae*. The enzymes were heterologously expressed in *Escherichia coli* and biochemically characterized determining optimum pH, temperature and cofactor concentrations as well as kinetic parameters.

*LaLIMS* synthesizes the six monoterpenes limonene (39 %), terpinolene (22 %), camphene (16 %),  $\alpha$ -pinene (14 %),  $\beta$ -myrcene (8 %) and  $\alpha$ -phellandrene (1 %). Analysis with chiral phase gas chromatography showed high abundance of the enantiomers (1R,5R)-(+)- $\alpha$ -pinene, (1R,4S)-(+)-camphene and (R)-(+)-limonene. Supplying enzyme assays with manganese or magnesium cations caused different product patterns emphasizing the influence of these cofactors on structure and reactivity of terpene synthases. Multiple product synthases like *LaLIMS* give an explanation for the huge variety of terpenes in essential oils without the need for a high number of enzymes.

*LaLINS* catalyzes the transformation of GPP exclusively to (R)-linalool. The abundant formation of the (R)-enantiomer corresponds to the configuration of the main

components of lavender oil, (R)-linalool and (R)-linalyl acetate. Thus, LaLINS probably is highly important for the flavor profile of *Lavandula angustifolia*.

The third enzyme, LaBERS, is a sesquiterpene synthase predominantly forming *trans*- $\alpha$ -bergamotene (74 %) from farnesyl diphosphate (FPP). It is the first *trans*- $\alpha$ -bergamotene synthase described. With low efficiency the enzyme also converts GPP to monoterpenes. Phylogenetically LaBERS belongs to class TPS-b of the terpene synthase family that comprises almost only monoterpene synthases. It is another example of a sesquiterpene synthase, which probably evolved from a monoterpene synthase.

Although the three terpene synthases account for only a part of the essential oil constituents of *Lavandula angustifolia*, the knowledge of their sequences provides the basis for the specific genetic modification of lavender plants and their flavor profile.

The essential oil of *Lavandula angustifolia* also contains esters of terpene and short-chained alcohols, predominantly (R)-linalyl acetate, which notably contribute to the flavor. The biosynthesis of these substances is catalyzed by acyltransferases of the BAHD superfamily. Based on the common amino acid motif DFGWG the full length sequences of *LaAT1* and *LaAT2* were cloned. *LaAT1* is phylogenetically related to acyltransferases of group V. These enzymes accept coenzyme A esters of hydroxy cinnamic acids and benzoic acid and transfer the acyl moieties to hydroxy and amino functions of quinic acid and shikimic acid as well as anthranilic acid and derivatives thereof. *LaAT2* also contains all characteristic sequence elements of BAHD acyltransferases, but is poorly similar to the characterized enzymes of this family and could be member of a new group. *LaAT1* and *LaAT2* were heterologously expressed in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* and subjected to a substrate screening with different coenzyme A esters and alcohols. Activity was only detected for *LaAT1*, which catalyzed the formation of both amides and esters. This dual reactivity was never reported before for a member of the BAHD superfamily and resulted in the synthesis of caffeoylshikimate, caffeoyl- and coumaroyltyramine as well as coumaroylanthranilate. In plants tyramine derivatives are generally synthesized by enzymes of another family, the tyramine *N*-hydroxycinnamoyl-transferases clearly distinct from BAHD acyltransferases. Thus, *LaAT1* seems not to be involved in the biosynthesis of flavor, but might have other important functions in secondary metabolism.



## A Einleitung

### 1 Sekundärstoffwechsel

#### 1.1 Einteilung in Primär- und Sekundärstoffwechsel

Die Begriffe „Sekundärmetabolismus“ und „sekundärer Pflanzeninhaltsstoff“ sind historisch geprägt (Richter, 1996). Im 19. Jahrhundert fasste man unter diesen Begriffen die Substanzen zusammen, die nach den damaligen wissenschaftlichen Erkenntnissen keine physiologische Funktion erfüllten. Man betrachtete sie als Endprodukte des Stoffwechsels, die als „innere Sekrete“ und Gegenstück zu tierischen Ausscheidungen entstanden und zum Teil in spezialisierten Geweben abgelagert wurden. Von diesen Verbindungen grenzte man den Primärmetabolismus ab, der in allen Pflanzen auf gleiche Weise das unmittelbare Überleben sicherte.

Mit dem heutigen Wissen über die pflanzlichen Biosynthesewege ist eine eindeutige Trennung zwischen Primär- und Sekundärmetabolismus nur schwer möglich. Im Allgemeinen erfüllen Stoffe, die man als Sekundärmetaboliten bezeichnet, zwei Bedingungen: Sie sind nur in einer begrenzten Zahl von Spezies zu finden und ihnen kommt keine klare Funktion bei Wachstum und Entwicklung zu (D’Auria und Gershenzon, 2005). Eine Einteilung nach chemischer Struktur oder nach bestimmten Biosynthesewegen ist dagegen nicht möglich, denn es sind die gleichen Vorläufersubstanzen, sehr ähnliche enzymatische Reaktionen und Verbindungen der gleichen Klassen, die im Primär- und im Sekundärstoffwechsel eine Rolle spielen (Richter, 1996). Selbst einzelne Verbindungen können Funktionen in beiden Bereichen übernehmen. So ist Canavanin, eine giftige Aminosäure, in den Samen einiger Leguminosenarten enthalten und schützt sie vor Insektenfraß. Andererseits wird die Substanz während der Keimung abgebaut und sichert die Versorgung des Keimlings mit Stickstoff.

Abgesehen von diesen Überlappungen wird der Sekundärstoffwechsel durch einige Besonderheiten charakterisiert, die ihn vom Primärstoffwechsel unterscheiden. Viele Verbindungen aus dem Sekundärbereich werden nur in spezialisierten Zellen gebildet bzw. gespeichert und häufig werden sie durch die Kondensation von Grundbausteinen synthetisiert, die aus unterschiedlichen Biosynthesewegen stammen (Richter, 1996; Kutchan, 2005). Ein weiteres typisches Merkmal der Sekundärmetabolite liegt in der Vielfalt struktur- und funktionsähnlicher Substanzen, die in einer Pflanze auftreten und durch Modifizierung einer einzigen

Ausgangsverbindung entstehen. Aus Sicht der Evolution besteht zudem ein wesentlicher Unterschied in der vergleichsweise hohen Variabilität und der raschen Veränderung auf der genetischen Ebene des Sekundärstoffwechsels (Pichersky und Gang, 2000). Dementsprechend kann man den Primärmetabolismus als universell, uniform und konservativ bezeichnen, während der Sekundärmetabolismus singulär, vielfältig und adaptiv erscheint (Richter, 1996).

## 1.2 Vielfalt des Sekundärmetabolismus

Pflanzen synthetisieren eine immense Zahl monomerer und polymerer Verbindungen, wovon etwa 50000 Strukturen zu den niedermolekularen sekundären Pflanzeninhaltsstoffen zählen (De Luca und St. Pierre, 2000). Diese Stoffe werden in einige wenige Hauptklassen eingeteilt. Zu den Isoprenoiden (Terpenoiden) zählt man die flüchtigen Mono- und Sesquiterpene ebenso wie die Saponine (glycosylierte Sterole) und die farbgebenden Carotinoide (Richter, 1996). Eine weitere sehr große Klasse stellen die rund 12000 bekannten Alkaloide dar, deren Bildung hauptsächlich von nur fünf verschiedenen Aminosäuren, Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan, Lysin und Ornithin, ausgeht (De Luca und St. Pierre, 2000). Außerdem enthalten Pflanzen phenolische Verbindungen und davon abgeleitete Strukturen wie Phenolcarbonsäuren, Phenylpropane und Flavonoide (Richter, 1996). Weitere, kleinere Gruppen umfassen zum Beispiel die Stilbene, Betacyane oder Betaxanthine.

Die Biosynthese dieser Verbindungen wird von einer entsprechend großen Zahl von Enzymen gewährleistet. Etwa 15-25 % der 20000-60000 Gene einer Pflanze dürften für diese Proteine codieren (Pichersky und Gang, 2000). Drei Enzymfamilien, die Glucosyltransferasen, Terpensynthasen und Acyltransferasen, werden in dieser Arbeit ausführlicher beschrieben (Kapitel A-2 bis A-4). In der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana*, deren Genom sequenziert ist, wurden Gene sehr vieler weiterer Enzymfamilien identifiziert, die am Sekundärmetabolismus beteiligt sind (Tab. A-1) (D'Auria und Gershenzon, 2005). Allerdings sind über 90 % dieser Enzyme noch nicht biochemisch charakterisiert.

Der Sekundärmetabolismus stellt also einen wesentlichen Bestandteil des pflanzlichen Stoffwechsels dar, in den beachtliche Ressourcen fließen und der sich im Laufe der Evolution offenbar bewährt hat. Dementsprechend erfüllen die Sekundärmetabolite Funktionen, die die Existenz und den Fortbestand der Art in der Umwelt sichern (Richter, 1996). So dienen die flüchtigen Verbindungen und Farbpigmente in Blüten als Lockstoffe für bestäubende Insekten, während giftige

Substanzen Fraßfeinde und Pflanzenpathogene abhalten (Pichersky und Gang, 2000). Farb- und Aromastoffe in Früchten signalisieren Tieren, dass sie eine Belohnung in Form von Zuckern, Vitaminen und Aminosäuren erwartet und helfen auf diese Weise die Samen zu verbreiten. Den Sekundärmetaboliten werden somit überwiegend ökologische, auf externe Parameter gerichtete Funktionen zugeordnet. Vor allem in den letzten Jahren wurde aber zunehmend die Bedeutung dieser Stoffe auch für interne Abläufe wie Wachstum und Entwicklung der Pflanze oder die Abwehr von abiotischem Stress erkannt (D’Auria und Gershenzon, 2005). So scheinen Flavonoide direkt an der Steuerung des Transportes des Phytohormons Auxin (Indolessigsäure) beteiligt zu sein. Ebenso wurden sowohl Phenylpropanoide als auch Flavonole in Zusammenhang mit dem Schutz der Zellen vor UV-B-Strahlung gebracht. Jasmonsäure, Salicylsäure und Brassinosteroide wurden lange als sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe betrachtet, bevor man ihre wichtigen Funktionen in den internen pflanzlichen Signalwegen verstand. Viele Verbindungen aus dem Sekundärstoffwechsel erfüllen also auch primäre Funktionen.

**Tab. A-1:** Auswahl von Genfamilien, deren korrespondierende Enzyme am Sekundärmetabolismus in *Arabidopsis thaliana* beteiligt sind (D’Auria und Gershenzon, 2005).

Genfamilie	Anzahl	Gebildete Sekundärmetabolite
Acylyltransferasen		
Serin-Carboxy-Peptidase-ähnlich	53	Hydroxyzimtsäureester
BAHD-Familie	64	Acylierte Anthocyane, aliphatische und aromatische Ester
Methyltransferasen		
SABATH-Familie	24	Aliphatische und aromatische Methylester
Typ I O-Methyltransferasen	6	Flavonoid-Methylether
Carboxymethyl-Esterasen	20	Carbonsäuren
Cytochrom P450 Monooxygenasen	272	Hydroxylierte Phenylpropanoide, Glucosinolate
Glutathion-S-Transferasen	48	Glutathion-Konjugate
Aldehyd-Dehydrogenasen	14	Aromatische und aliphatische Säuren
Terpensynthasen	30	Mono-, Sesqui-, Diterpene
Oxidosqualencyclasen	13	Triterpene
Glycosyltransferasen	107	Glycoside
Glycosidhydrolasen (Familie I)	47	Aglycons (z. B. Flavonole, Phenylpropanoide)
Pathogen-induzierte Lipase-ähnliche Enzyme	6	Von Fettsäuren abgeleitete Komponenten
Acylylgruppen-aktivierende Enzyme/ CoA-Ligasen	63	CoA-Thioester, Aminosäuren-Konjugate

### 1.3 Funktionelle Charakterisierung von Enzymen des Sekundärmetabolismus

Mit der Verfügbarkeit genetischer Methoden ergaben sich auch für die Forschung am Sekundärmetabolismus neue Möglichkeiten (Memelink, 2005; Rohloff und Bones, 2005). In groß angelegten Studien wurden tausende von Mutantpflanzen erzeugt und ihre Metabolite auf qualitative und quantitative Veränderungen untersucht. Da sich das mutierte Gen problemlos bestimmen lässt, das eine Veränderung verursacht, ist die schnelle funktionelle Zuordnung einer großen Zahl von Genen möglich. Es kann aber keine eindeutige Aussage darüber getroffen werden, für welchen molekularen Mechanismus ein Gen jeweils verantwortlich ist. Das Gen könnte ein Enzym codieren, das einen Schritt in der Biosynthese des veränderten Metaboliten übernimmt, oder es könnte eine regulative Funktion einnehmen. Weitere Erkenntnisse über die Funktion eines Gens lassen sich aus dessen Expressionsprofil ableiten (Fridman und Pichersky, 2005). Gene, die nur in spezifischen Geweben, in bestimmten Entwicklungsstadien oder unter speziellen äußeren oder inneren Bedingungen exprimiert werden, hängen mit den damit verbundenen, biologischen Abläufen zusammen. Häufig basiert die Zuordnung der Funktion einer neuen Gensequenz auch auf der Homologie zu bereits biochemisch charakterisierten Sequenzen. Diese Annotierung gibt zwar wertvolle Hinweise, welcher Gen- bzw. Proteinklasse die Sequenz angehört, ist jedoch meist ungenau und kann die Substrat- oder Produktspezifitäten eines Enzyms nicht sicher vorhersagen.

Daher sind zusätzlich zu genetischen Kenntnissen biochemische Daten von entscheidender Bedeutung (Fridman und Pichersky, 2005). Ist die Gensequenz bekannt, ist es mit molekularbiologischen Methoden möglich, große Mengen an reinem, rekombinantem Enzym zu erzeugen und dieses biochemisch zu charakterisieren. Gegenüber der klassischen Aufreinigung von Enzymen aus pflanzlichen Proteinextrakten hat diese Vorgehensweise entscheidende Vorteile. Denn mit der klassischen Technik ist es häufig nicht möglich, Proteine mit ähnlichen Eigenschaften zu trennen. Gerade im Sekundärstoffwechsel existieren aber Enzyme mit unterschiedlicher Produktspezifität, die sich nur geringfügig voneinander unterscheiden. Zudem benötigt man deutlich weniger Pflanzenmaterial. Dies ist insbesondere bei der Untersuchung des Sekundärmetabolismus von Vorteil, da die beteiligten Enzyme oft in spezialisierten Geweben gebildet werden und nur in geringer Menge enthalten sind (Croteau, 1987). Wenn die Reaktion eines Enzyms *in vitro* charakterisiert wurde, kann die Funktion *in vivo* wiederum mit genetischen



Methoden bestätigt werden, indem dieses Enzym in transgenen Pflanzen spezifisch herabreguliert oder überexprimiert wird, und die Veränderung der Metabolite analytisch erfasst wird (Lunkenbein et al., 2006a).

Durch die Untersuchung von Pflanzen mit rein analytischen Methoden entstand umfangreiches Wissen über deren sekundäre Inhaltsstoffe. Da aber die Zusammensetzung in verschiedenen Geweben ebenso wie in unterschiedlichen Entwicklungsstadien variiert, werden je nach Wahl des analytischen Verfahrens möglicherweise wichtige Substanzen nicht erfasst (Fridman und Pichersky, 2005). Die Charakterisierung von Enzymen aus *Arabidopsis thaliana*, deren genetische Sequenzen lediglich aus der vollständigen Sequenzierung des Genoms bekannt waren, ermöglichte die erstmalige Entdeckung von Sekundärmetaboliten (D'Auria und Gershenzon, 2005; Fridman und Pichersky, 2005). So wurde eine spezifisch in Wurzeln exprimierte 1,8-Cineolsynthase *in vitro* charakterisiert. Erst danach konnte man das Produkt dieses Enzyms durch hochsensitive PTR-MS (Proton Transfer Reaction Mass Spectrometry) auch in der Pflanze nachweisen. Aufgrund derartiger Ergebnisse nimmt die Zahl der nachgewiesenen Sekundärmetabolite ständig zu. Die Verknüpfung der Informationen über Gene (*Genomics*), Enzyme (*Proteomics*) und Metabolite (*Metabolomics*) wird daher in Zukunft die treibende Kraft in der Erforschung des Sekundärmetabolismus sein (Fridman und Pichersky, 2005).

## 2 Glucosyltransferasen

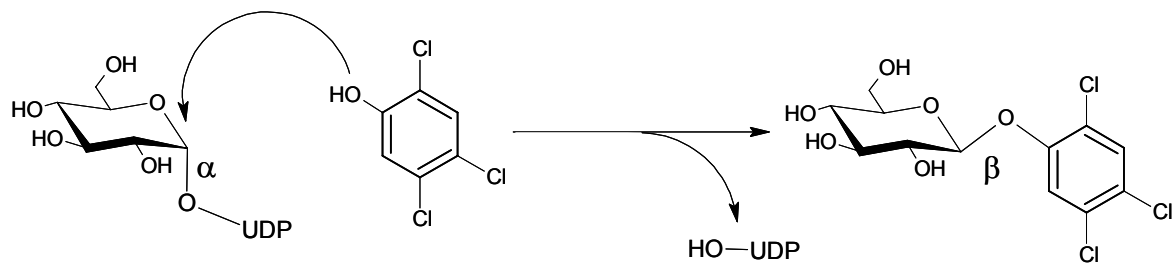
### 2.1 Einteilung

Die Modifikation von Molekülen durch Glycosylierung stellt eine der wichtigsten Reaktionen in der Natur dar und wird von den Mitgliedern einer Enzym-Superfamilie, den Glycosyltransferasen katalysiert. Sie übertragen Zuckereinheiten von aktivierten Donormolekülen auf die funktionellen Gruppen von Alkoholen, Thiolen, Aminen und Säuren und bilden O-, S- und N-glycoside sowie Glucoseester. Die Akzeptorsubstrate sind äußerst unterschiedlich und rangieren von kurzkettigen Alkanolen bis hin zu langkettigen, komplexen Polysacchariden.

Nach den Empfehlungen der *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (IUBMB) wurden die Glycosyltransferasen entsprechend ihrer Substrat- und Produktspezifitäten in Klassen eingeteilt (EC 2.4.x.y). Da in dieses System Enzyme jedoch nur dann befriedigend eingeordnet werden können, wenn sie vollständig charakterisiert sind und dabei stark substratspezifisch sind, wurde ein zweites System eingeführt, das auf der Ähnlichkeit der Aminosäuresequenzen basiert (Campbell et al., 1997; Coutinho et al., 2003). Bisher (Stand: Januar 2007) sind auf diese Weise 87 Familien in der CAZy-Datenbank (*Carbohydrate-Active Enzymes*) identifiziert worden. Innerhalb einer Familie sind Enzyme gruppiert, die zwar unterschiedliche Substrat- und Produktspezifitäten aufweisen können, bei denen aber der molekulare Reaktionsmechanismus konserviert ist. Ausgehend von den vergleichsweise wenigen charakterisierten Glucosyltransferasen werden dadurch Rückschlüsse auf andere Enzyme ermöglicht, von denen lediglich Sequenzinformationen bekannt sind. Im Folgenden wird nur auf die Mitglieder der Familie 1, eine der größten, eingegangen. Es handelt sich um UDP-Glycosyltransferasen (UGTs), die einen UDP-aktivierten Zucker auf kleine (d. h. monomere), häufig hydrophobe Moleküle des Sekundärmetabolismus übertragen.

### 2.2 Reaktionen und Struktur

Die von den Glycosyltransferasen katalysierte Reaktion ist formal eine nucleophile Substitution, bei der das Akzeptormolekül als Nucleophil am anomeren C-Atom des aktivierten Zuckermoleküls angreift. Dabei kann die Konfiguration am C-Atom entweder unverändert bleiben oder sich unter Inversion ändern, sodass man dementsprechend in retentierende und invertierende Glycosyltransferasen einteilt (Charnock et al., 2001). Alle UGTs der Familie 1 reagieren invertierend (Abb. A-1).



**Abb. A-1:** Reaktionsmechanismus der invertierenden UGTs am Beispiel von UDP-Glucose und 2,4,5-Trichlorphenol. Die Konfiguration des anomeren C-Atoms ändert sich von  $\alpha$  zu  $\beta$ .

Als Donorsubstrat akzeptieren die UGTs UDP-aktivierte Zucker, in den meisten Fällen UDP-Glucose. Dabei erwiesen sich die Enzyme als relativ substratspezifisch und reagieren meist nur mit einem Donorsubstrat (Vogt und Jones 2000). Allerdings zeigt gerade die neuere Literatur, dass pflanzliche Glycosyltransferasen zum Teil auch mehrere verschiedene aktivierte Zucker transformieren können (Flint et al., 2005; Offen et al., 2006).

Dagegen wurde bei fast allen bisher charakterisierten Glucosyltransferasen des Sekundärmetabolismus gezeigt, dass sie mit mehr als nur einem Akzeptorsubstrat reagieren. Die Substratspezifität ist also in den meisten Fällen gering und kann sich z. B. auf eine Substanzklasse beziehen, aber auch noch wesentlich weiter gefasst sein. So katalysierte das Enzym UGT84B1 aus *Arabidopsis thaliana* die Bildung des Indolessigsäure-Glucoseesters mit der höchsten spezifischen Aktivität, konjugierte aber nur wenig schlechter auch die Derivate Indolpropylsäure und Indolbutylsäure sowie die strukturell deutlich unterschiedliche Zimtsäure (Jackson et al., 2001). Ähnliche Enzyme wurden unter anderem in Tabak (Fraissinet-Tachinet et al., 1998; Lee and Raskin, 1999), *Dorotheanthus bellidiformis* (Vogt et al., 1999) und *Beta vulgaris* (Isayenkova et al., 2006) beschrieben. Diese Beobachtung führte zu der Annahme, dass die Glucosyltransferasen eher regioselektiv oder regiospezifisch als substratspezifisch reagieren (Vogt und Jones, 2000; Isayenkova et al., 2006).

Erst kürzlich wurden die ersten Kristallstrukturen pflanzlicher Glucosyltransferasen aufgeklärt und halfen dabei, die molekulare Grundlage für die Substratspezifitäten zu klären (Shao et al., 2005; Offen et al., 2006). Bereits früher wurde eine Konsensussequenz, die sogenannte PSPG-Box (*Plant Secondary Product Glucosyltransferase Box*), postuliert, die sich am C-Terminus aller UGTs befindet

(Hughes und Hughes, 1994). Es wurde durch die Kristallstrukturanalyse bestätigt, dass diese Sequenz für die recht spezifische Bindung des Donor-Substrates verantwortlich ist (Offen et al., 2006). Die N-terminale Domäne erkennt dagegen die Akzeptor-Substrate (Shao et al., 2005). Aus der Kristallstruktur der Flavonoid-3-O-glucosyltransferase aus *Vitis vinifera* ist ersichtlich, dass die Bindungstasche einen „Canyon“ bildet, der am Ende offen ist und daher Raum für verschiedene Substrate bietet. Dies führt wahrscheinlich zu der beobachteten geringeren Spezifität (Offen et al., 2006).

### 2.3 Funktionen

Eine Glycosylierung ändert die chemischen Eigenschaften des Akzeptormoleküls in mehrfacher Hinsicht. Erstens erhöht sich durch die Konjugation einer Zuckereinheit die Polarität und damit die Löslichkeit. Zweitens wird die Stabilität einiger Verbindungen deutlich gesteigert, und drittens wird im Allgemeinen die Reaktivität herabgesetzt, da die funktionellen Gruppen, die glucosyliert wurden, nicht mehr für andere Reaktionen zur Verfügung stehen (Jones und Vogt, 2001).

Es gibt zahlreiche Beispiele im pflanzlichen Sekundärmetabolismus, die die Bedeutung dieser veränderten Eigenschaften demonstrieren. Die UDP-Glucose:Flavonoid-3-O-Glucosyltransferase aus *Vitis vinifera* glucosyliert die Anthocyane der Weintraube. Erst durch diesen Schritt wird die Speicherung der ansonsten instabilen Farbstoffe in größeren Mengen ermöglicht (Ford et al., 1998). In *Sorghum bicolor* katalysiert eine Glycosyltransferase die Bildung des cyanogenen Glucosids Dhurrin. Die Pflanze kann diese Verbindung anreichern und erst bei Bedarf, z. B. zur Abwehr von Fraßfeinden, hydrolysieren, was letztendlich zur Freisetzung giftigen Cyanids führt (Jones et al., 1999). Dieser inaktivierenden und stabilisierenden Funktion von Glucosyltransferasen steht eine aktivierende gegenüber. So wurde nachgewiesen, dass Acyl-Glucoseester analog zu Coenzym A-Estern als aktivierte Intermediate in Transesterifizierungs-Reaktionen dienen können (Mikowski und Strack, 2004). Zum Beispiel bildet die 1-O-*trans*-Cinnamoyl- $\beta$ -D-glucopyranose:Alkohol Cinnamoyltransferase aus *Physalis peruviana* aus dem Zimtsäure-Glucoseester und kurzkettigen Alkoholen die aromarelevanten Ester Methyl-, Ethyl- und 1-Propylcinnamat (Latza und Berger, 1997). Ähnliche Reaktionen wurden in *Arabidopsis thaliana* und *Ipomea batatas* beschrieben (Villegas und Kojima, 1986; Lehfeldt et al., 2000).

Die Bedeutung der Glycosyltransferasen geht jedoch über die Glycosylierung von endogenen Substraten hinaus. Es ist bereits seit einiger Zeit bekannt, dass sehr viele Pflanzen in der Lage sind, exogene Substrate wie Herbizide zu glucosylieren (Pflugmacher und Sandermann, 1998). Das Konzept der „grünen Leber“ geht davon aus, dass der Entgiftungsprozess in der Pflanze in ähnlicher Weise abläuft wie in der Leber von Säugetieren. Im ersten Schritt wird die xenobiotische Substanz transformiert, z. B. durch Oxidation oder Hydrolyse. Als zweites folgt die Konjugation, die von Glucosyltransferasen katalysiert wird. Dies ermöglicht den dritten Schritt, die Kompartimentierung. Sie wird meistens durch Aufnahme der Glucoside in die Vakuole, die als Stoffwechsellensenke (*metabolic sink*) fungiert, realisiert (Sandermann, 1994; Kreuz et al., 1996).

Zunächst wurde davon ausgegangen, dass die Metabolisierung der Fremdstoffe von spezifisch agierenden Enzymen geleistet wird (Sandermann, 1994). Nachdem aber durch heterologe Expression größere Mengen der Glycosyltransferasen in hoher Reinheit zugänglich wurden, beobachtete man bei vielen Enzymen eine sehr breite Substratazeptanz, die neben endogenen Substraten auch Xenobiotika einschloss. So glucosylierten sechs Enzyme aus *Arabidopsis thaliana* die Hydroxygruppe von 2,4,5-Trichlorphenol, das häufig als phytotoxische, xenobiotische Modellverbindung in Enzymassays eingesetzt wird (Meßner et al., 2003). Dies war insbesondere für zwei der Enzyme eine überraschende Beobachtung, da diese ansonsten mit den Carboxygruppen ihrer mutmaßlichen endogenen Substrate reagierten und Glucoseester bildeten. Hefner und Mitarbeiter (2002) charakterisierten eine Arbutin-synthase aus *Rauvolfia serpentina* und stellten *in vitro* fest, dass sie neben dem eigentlichen Substrat Hydrochinon ein sehr großes Spektrum strukturähnlicher natürlicher und unnatürlicher Substrate akzeptiert. Dagegen blieb bei UGT72B1, einer weiteren Glucosyltransferase aus *Arabidopsis thaliana*, selbst nach der Analyse von transgenen *Knock-Out*-Pflanzen unklar, welche Verbindung das Enzym originär umsetzt. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* katalysierte das Enzym effizient die Glucosylierung von TCP. Daher stellt sich weiterhin die Frage, ob die Detoxifizierung eine Nebenreaktion von Enzymen ist, die für die Glucosylierung anderer endogener Substrate verantwortlich sind, oder ob sie die Hauptreaktion spezifischer Enzyme ist (Brazier-Hicks und Edwards, 2005).

Die Fähigkeit der Pflanzen, unbekannte Substanzen glucosylieren zu können, dürfte von großer Bedeutung in der Evolution sein. Einerseits können dadurch

xenobiotische, möglicherweise toxische Verbindungen konjugiert und idealerweise entgiftet werden, sodass das Überleben der Pflanze gesichert ist. Andererseits funktioniert die Glucosylierung der endogenen Substrate auch dann noch, wenn sie durch Mutationen von Enzymen in vorgelagerten Stoffwechselschritten verändert sind. Durch diese Flexibilität der Pflanze, auf neue Substratangebote zu reagieren, ergibt sich ein „chemisches Sicherheitsnetz“ (Jones und Vogt, 2001).

## 2.4 Vorarbeiten zu FaGT2

Die in dieser Arbeit untersuchte UDP-Glucose:Cinnamat-Glucosyltransferase aus der Kulturerdbeere *Fragaria x ananassa* cv. Elsanta (FaGT2) wurde zuvor teilweise charakterisiert (Lunkenbein et al., 2006a). Das Enzym gehört zu den invertierenden UGTs der Familie 1 (Kap. A.2.1) und ist dort den Glucoseester-bildenden Glucosyltransferasen anderer Organismen am ähnlichsten. In Expressionsstudien wurde ermittelt, dass *FaGT2* in der Erdbeerfrucht reifekorreliert exprimiert wird. Analog dazu stiegen auch die Gehalte der Metabolite Zimtsäure-, *p*-Cumarsäure-, Kaffeesäure- und *p*-Hydroxybenzoesäure-Glucoseester an. Zusätzlich wurden transgene Erdbeerpflanzen gezüchtet, in denen die Expression des Gens durch ein Antisense-Konstrukt herabreguliert wurde. In den Erdbeerfrüchten dieser Pflanzen waren die Konzentrationen an Zimtsäure- und *p*-Cumarsäure signifikant erniedrigt. Die Autoren folgerten, dass *FaGT2* für die Bildung dieser beiden Produkte *in vivo* verantwortlich ist. Zimtsäure-Glucoseester dient in der Erdbeere vermutlich als aktivierte Vorstufe, aus der durch Transesterifizierung die Aromastoffe Methyl- und Ethylcinnamat entstehen. *In vitro* wurden jedoch zahlreiche weitere Derivate der Zimtsäure und Benzoessäure glucosyliert. Dabei entstanden in allen Fällen die Glucoseester und nicht die *O*-Glucoside. Aus den kinetischen Daten ließ sich erkennen, dass Zimtsäure mit der größten katalytischen Effizienz ( $k_{\text{cat}}/K_m$ ) umgesetzt wurde, während für *p*-Cumarsäure die höchste Maximalgeschwindigkeit ( $V_{\text{max}}$ ) und für 3,4-Dimethoxyzimtsäure die beste Substrataffinität ( $K_m$ ) ermittelt wurde. Von den insgesamt 21 akzeptierten Substraten wurde abgeleitet, dass *FaGT2* nur Verbindungen glucosyliert, die eine Carboxyl- und eine Benzyl-Gruppe enthielten. Letztere durfte zusätzlich in *m*- und *p*-, aber nicht in *o*-Position substituiert sein. Ein weiteres interessantes Ergebnis dieser Studie war der Nachweis, dass *FaGT2* durch oxidativen Stress induziert wird. In Pflanzen entsteht oxidativer Stress durch reaktive Sauerstoffspezies, die sich durch die Einwirkung von Xenobiotika, Angriff von Pathogenen oder bei Verwundung bilden. Im pflanzlichen Organismus bewirkt

oxidativer Stress allgemein die gesteigerte Expression von Entgiftungsenzymen wie Glutathion-S-Transferasen (Marrs, 1996; Aharoni et al., 2002). Daher erscheint es möglich, dass FaGT2 eine zweite Funktion einnimmt und an der Detoxifizierung von Fremdstoffen beteiligt ist.

### 3 Terpensynthesen

#### 3.1 Einteilung der Terpenoide

Die Terpenoide (auch Terpene oder Isoprenoide genannt) bilden mit etwa 30000 bekannten Vertretern die größte Klasse der Sekundärmetabolite und sind auch innerhalb einer Spezies wie zum Beispiel *Arabidopsis thaliana* die vielfältigsten Verbindungen (De Luca und St. Pierre, 2000; Sell, 2003; D'Auria und Gershenzon, 2005; Rohloff und Bones, 2005). Der Name leitet sich von Terpentin ab, dem Begriff für Coniferenharze, dessen Kohlenwasserstoffe man mit dem Begriff „Terpene“ bezeichnete. Die Beobachtung, dass die C<sub>5</sub>-Verbindung Isopren bei der Pyrolyse von Terpentin entsteht und die Synthese von Terpenen aus Isopren gelingt, führte bereits 1887 zur Formulierung der „Isoprenregel“ (Wallach, 1914). Diese beschrieb erstmals, dass alle Terpenoidstrukturen aus Einheiten von je fünf Kohlenstoffatomen aufgebaut sind. Ruzicka (1953) erweiterte dieses Konzept zur „biogenetischen Isoprenregel“, die die Entstehung von verschiedenartigen Monoterpenen, Sesquiterpenen, Diterpenen und Triterpenen aus zwei, drei, vier bzw. sechs C<sub>5</sub>-Einheiten mit Hilfe chemisch-mechanistischer Betrachtungen erklärt. Auch heute erfolgt die Einteilung der Terpenoid-Grundstrukturen auf dieser Basis. Im Folgenden wird der Schwerpunkt auf den Mono- und Sesquiterpenen liegen.

Die Monoterpene, von denen etwa 1000 bekannt sind, lassen sich einteilen in acyclische, monocyclische und bicyclische Vertreter wie sie beispielsweise von Myrcen, Limonen und  $\alpha$ -Pinen repräsentiert werden (Breitmaier, 2005). Ausgehend von einigen Grundstrukturen werden die cyclischen Monoterpene weiteren Unterklassen zugeordnet. Die *p*-Menthane weisen ein 1-Methyl-4-isopropyl-cyclohexan-Grundgerüst auf, die Iridane eine Cyclopentan-Struktur, während die Pinane ein [3.1.1]-, die Bornane, Camphane und Fenchane ein [2.2.1]-, die Carane ein [4.1.0]-bicyclisches System und die Thujane eine 1-Isopropyl-4-methyl-bicyclo[3.1.0]hexan-Struktur gemeinsam haben (Wise and Croteau, 1999). Daneben existieren weitere halogenierte und irreguläre Formen.

Aufgrund der größeren Kettenlänge der Sesquiterpene (C<sub>15</sub>) ergibt sich mit rund 8000 bekannten Verbindungen eine noch größere Strukturvielfalt als bei den Monoterpenen. Sie leiten sich durch Modifikation von über 300 verschiedenen Kohlenstoffgerüsten ab (Cane, 1999b; Breitmaier, 2005). Entsprechend zahlreich sind die beschriebenen Untergruppen (Connolly und Hill, 1991).



## 3.2 Biosynthese der Terpenoide

Die Biosynthese aller Terpenoide geht von einer einzigen Vorläufersubstanz aus, dem Isopentenylidiphosphat (IPP), das als Verbindung mit fünf Kohlenstoffatomen die biochemische Erklärung für die von Wallach (1914) und Ruzicka (1953) formulierte Isoprenregel liefert. IPP wird in Pflanzen auf zwei verschiedenen, unabhängigen Wegen gebildet, dem Mevalonat-Weg (MVA-Weg) und dem Deoxyxylulosephosphat-Weg (DXP-Weg; MVA-unabhängiger Weg), die in verschiedenen Kompartimenten der Zelle lokalisiert sind.

### 3.2.1 Mevalonat-Weg

Die Biosynthese von IPP nach dem Mevalonat-Weg geht von zwei Molekülen Acetyl-CoA aus, die in einer Claisen-Kondensation unter Katalyse einer Acetoacetyl-CoA-thiolase (AACT) reagieren (Abb. A-2) (Cane, 1999a; Lange et al., 2000; Dewick, 2002; Rodríguez-Concepción und Boronat, 2002). Die Verlängerung um ein weiteres Molekül Acetyl-CoA erfolgt durch 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-synthase (HMGS). Die Verbindung HMG-CoA wird anschließend von der 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-reduktase (HMGR) unter Verbrauch von zwei Äquivalenten NADPH zur Mevalonsäure (MVA) reduziert. In zwei aufeinanderfolgenden ATP-abhängigen Schritten wird diese Verbindung von MVA-Kinase (MK) und Phosphomevalonatkinase (PMK) zu Mevalonat-5-diphosphat phosphoryliert. Im letzten Schritt bewirkt eine Mevalonat-5-diphosphatdecarboxylase (MDC) durch Decarboxylierung und Wasserabspaltung die Bildung von IPP. Durch eine IPP-Isomerase (IPPI) kann diese Verbindung zu Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) reagieren.

### 3.2.2 Deoxyxylulosephosphat-Weg

Lange Zeit galt der Mevalonat-Weg als die einzige Quelle von IPP und DMAPP und somit als Grundlage für die Bildung aller Isoprenoide (Rohdich et al., 2001). In den letzten Jahren wurde jedoch eine alternative Route, der Deoxyxylulosephosphat-Weg, aufgeklärt (Abb. A-2) (Rohmer, 1999; Eisenreich et al., 2004). Im ersten Schritt kondensieren dabei Pyruvat und Glyceraldehyd-3-phosphat zu 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat (DXP) durch die Katalyse einer entsprechenden Synthase (DXPS). Die DXP-Reduktoisomerase (DXR) bewirkt eine Umgruppierung und Reduktion dieses Substrates zu 2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat (MEP). Die MEP-Cytidyltransferase (CMT) überträgt im nächsten Schritt eine Phosphocytidyl-Einheit unter Bildung von 4-

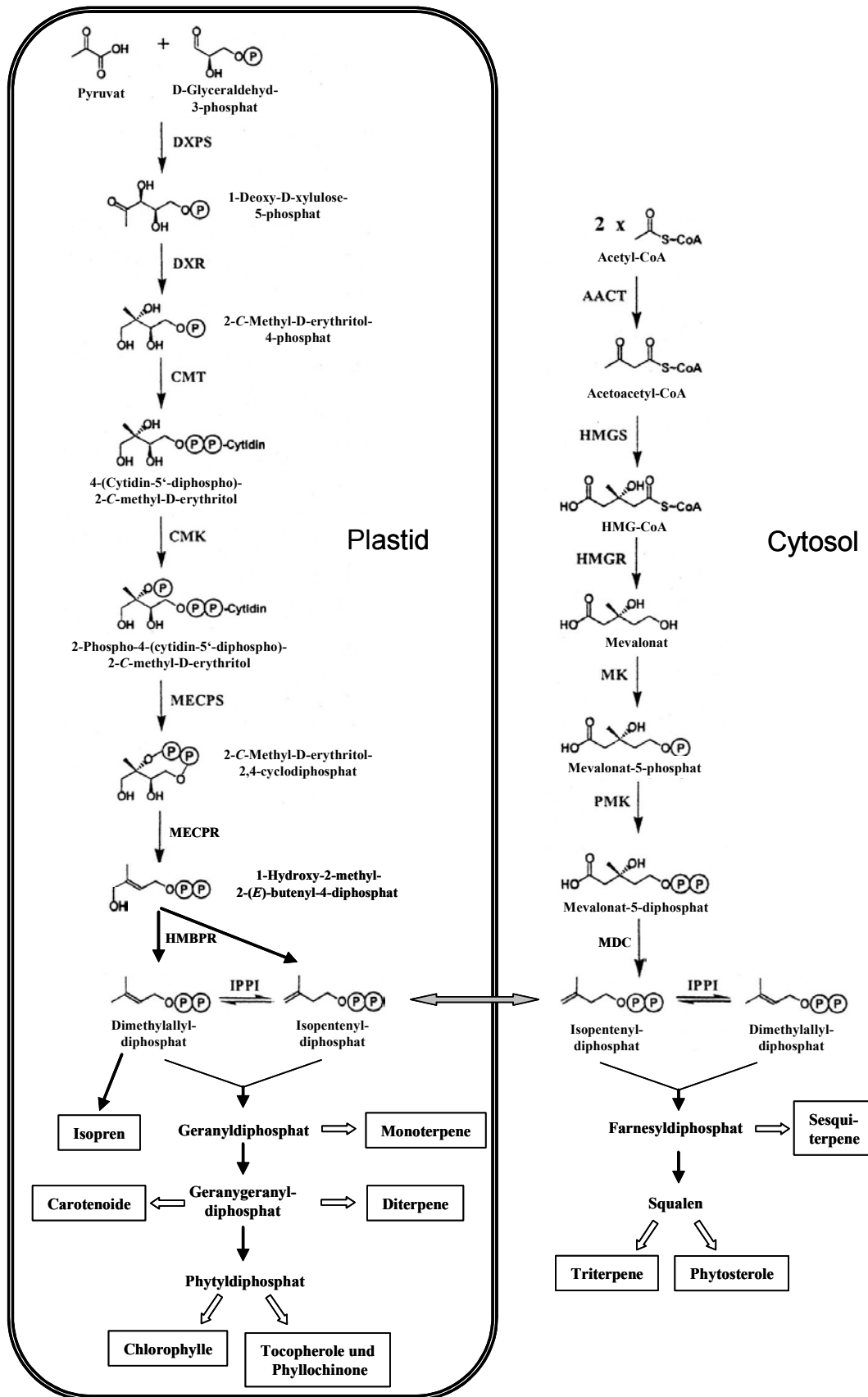
(Cytidin-5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol, das eine weitere Modifikation durch enzymatische Phosphorylierung durch die Cytidin-5'-diphospho-2-C-methyl-D-erythritolkinase (CMK) an C2 erfährt. 2-Phospho-4-(cytidin-5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol wird durch die Aktivität eines weiteren Enzyms (2-C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphatsynthase, MECPS) unter Abspaltung von Cytidinmonophosphat zu 2-C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat cyclisiert. Diese Verbindung wird von einer Reduktase (MECPR) zu 1-Hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl-4-diphosphat konvertiert, das im letzten Schritt nochmals enzymatisch durch die 1-Hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl-4-diphosphatreduktase (HMBPR) reduziert wird. Dabei entstehen IPP und DMAPP im Verhältnis 6:1.

### 3.2.3 Synthese von Geranyldiphosphat und Farnesyldiphosphat

Die Substrate der Mono- und Sesquiterpensynthesen sind Geranyldiphosphat (GPP) beziehungsweise Farnesyldiphosphat (FPP). Die Biosynthese dieser beiden Verbindungen wird von Prenyltransferasen (GPP-Synthase und FPP-Synthase) katalysiert (Koyama und Ogura, 1999). In einer elektrophilen Kopf-Schwanz-Reaktion entsteht aus je einem Molekül DMAPP und IPP Geranyldiphosphat, die Verlängerung mit einem weiteren Molekül IPP resultiert in der Bildung von FPP.

### 3.2.4 Kompartimentierung

Die beiden Biosynthesewege von IPP sind in Pflanzen in unterschiedlichen zellulären Kompartimenten lokalisiert (Abb. A-2) (Rohmer, 1999; Eisenreich et al., 2001; Rodríguez-Concepción et al., 2002; Bick und Lange, 2003). Während der DXP-Weg und die Biosynthese von Isopren, Monoterpenen, Diterpenen sowie Carotinoiden, Chlorophyllen und Tocopherolen in Plastiden abläuft, ist der Mevalonat-Weg spezifisch für das Cytosol und resultiert insbesondere in der Bildung von Sesquiterpenen, Triterpenen und Phytosterolen. Allerdings sind die beiden Wege nicht vollständig voneinander separiert, sondern es existiert ein Austausch von IPP zwischen den Plastiden und dem Cytosol (*metabolic crosstalk*). So wurde über die Aufnahme von IPP aus dem Cytosol in Plastide berichtet, ebenso wie der einseitige Export von IPP ins Cytosol (Bick und Lange, 2003; Laule et al., 2003; Hampel et al., 2005; Dudareva et al., 2005). Der Umfang und die Richtung des Austausches hängen von der Spezies ab und könnten bei der Regulation des Terpenoid-Stoffwechsels eine wichtige Rolle spielen. Auch die Synthese der unmittelbaren Substrate der Terpensynthesen, die Prenyldiphosphate, ist auf die Plastide bzw. das



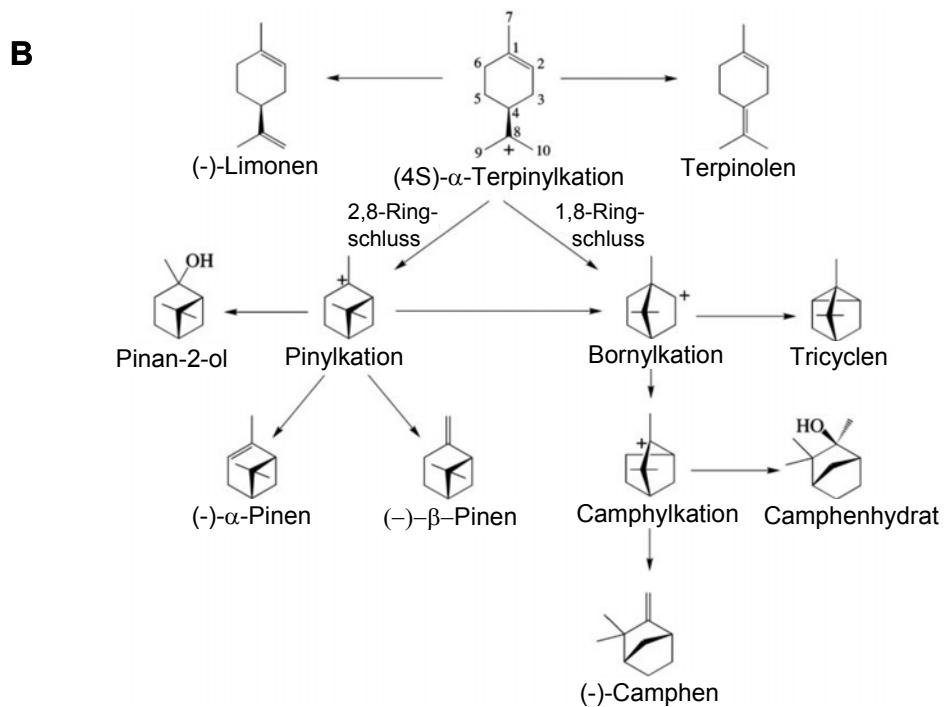
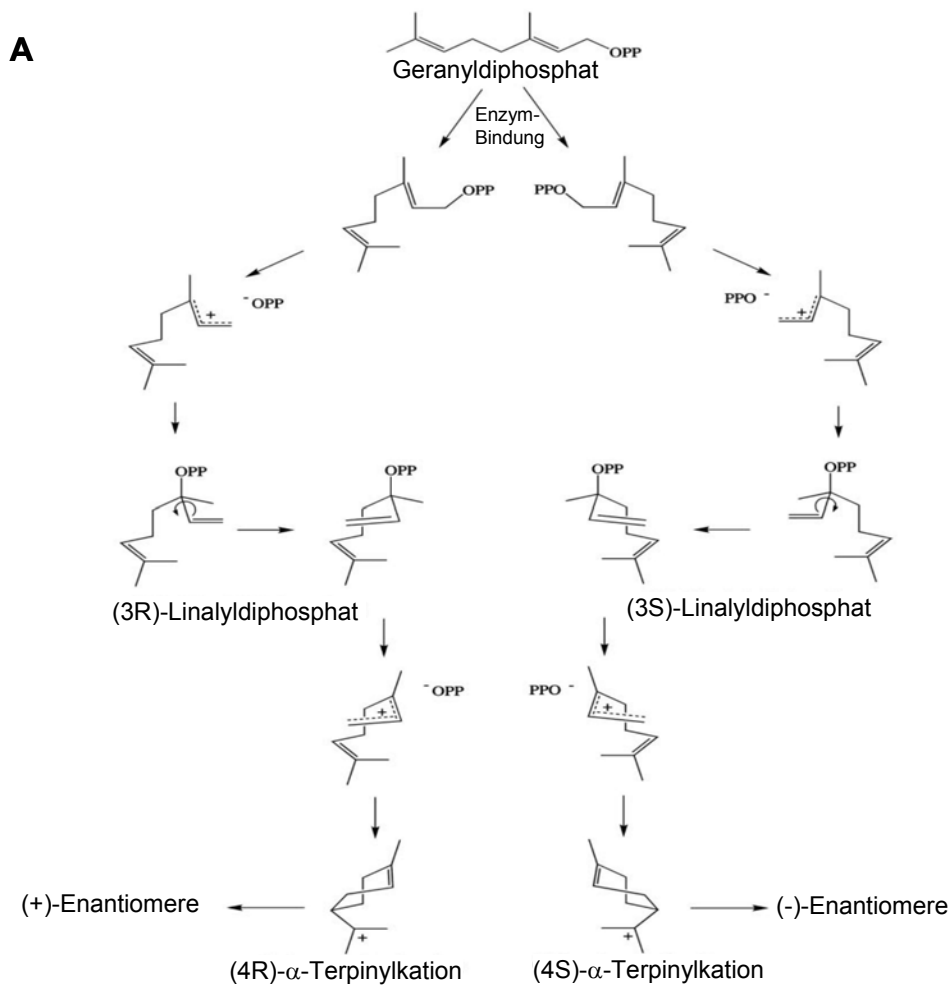
**Abb. A-2:** Terpenbiosynthese nach dem Deoxyxylulosephosphat-Weg (links) in Plastiden und dem Mevalonat-Weg (rechts) im Cytosol. Ausgefüllte Pfeile stehen für einzelne Reaktionen, nicht ausgefüllte für verschiedene und zum Teil mehrfache Reaktionen. Die Abkürzungen werden im Text erläutert (Zusammenstellung nach Koyama und Ogura, 1999; Lange et al., 2000; Bick und Lange, 2003).

Cytosol aufgeteilt. Da die Enzyme im Cytosol synthetisiert werden, enthalten Mono- und Diterpensynthasen in ihrem N-terminalen Bereich ein Signalpeptid, das den intrazellulären Transport in die Plastide vermittelt, wo sich ihre Substrate befinden. Das Signalpeptid wird dort abgespalten. Aber auch die Trennung der Reservoirs von GPP und FPP ist nicht in allen Fällen strikt. In der Erdbeerfrucht ist GPP auch im Cytosol vorhanden, sodass darin (S)-Linalool gebildet wird, und in *Arabidopsis* ist vermutlich ein geringer Vorrat an FPP in den Plastiden vorhanden (Aharoni et al., 2003 und 2004).

### 3.2.5 Reaktionen der Mono- und Sesquiterpensynthasen

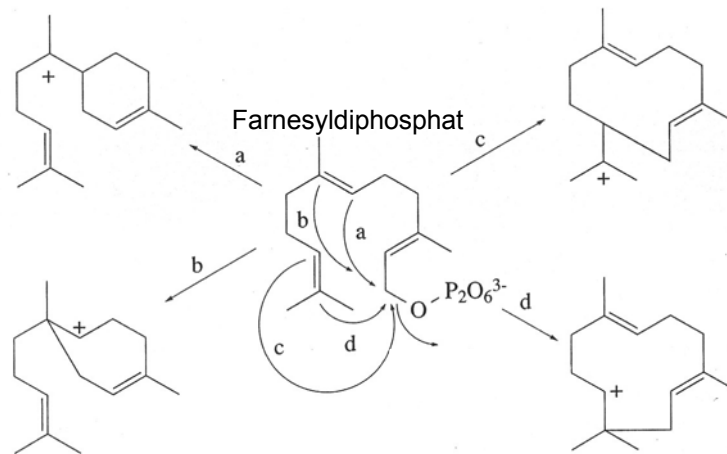
Ausgehend von den zwei Substraten Geranyl- und Farnesyldiphosphat bilden die Mono- und Sesquiterpensynthasen eine sehr große Zahl unterschiedlicher Verbindungen. Manche Enzyme synthetisieren spezifisch nur ein Produkt, häufig entsteht aber auch ein Gemisch unterschiedlicher Substanzen. Ein extremes Beispiel ist eine  $\gamma$ -Humulen-Synthase aus *Abies grandis*, die 52 verschiedene Sesquiterpene produziert (Steele et al., 1998). Die Reaktionswege, die zu diesen Produkten führen, wurden bereits von Ruzicka (1953) in wichtigen Teilen beschrieben und später zu detaillierten elektrophilen Mechanismen ausgearbeitet (Croteau, 1987; Wise und Croteau, 1999; Cane, 1999b). Der erste Schritt der Mono- und Sesquiterpen-Biosynthese besteht in der Ionisierung des Substrates zu einem enzym-gebundenen Carbokation unter Abspaltung des Diphosphates. Dieses Kation kann entweder direkt mit Wasser abreagieren oder isomerisieren, mit den Doppelbindungen intramolekulare Cyclisierungsreaktionen eingehen sowie Hydrid-Shifts und Wagner-Meerwein-Umlagerungen erfahren, bevor es durch Deprotonierung oder Reaktion mit einem Nucleophil zum Endprodukt wird. Diese Reaktionskaskade aus Ionisierung, Isomerisierung und Cyclisierung erfolgt in nur einem aktiven Zentrum des jeweiligen Enzymes und ohne das Auftreten freier Intermediate.

Bei den Monoterpensynthasen ermöglicht die Isomerisierung von GPP zu Linalyldiphosphat die Drehung an der Bindung von C2 und C3 und somit die Bildung des  $\alpha$ -Terpinylkations (Abb. A-3A) (Croteau, 1987; Wise und Croteau, 1999). Dieses Kation ist der Ausgangspunkt für alle cyclischen Monoterpene, die durch die genannten Reaktionen entstehen (Abb. A-3B). Die Chiralität der Produkte wird bereits bei der Bindung des Substrates am Enzym und der dabei vorliegenden Orientierung vorgegeben. Daraus resultiert die Bildung jeweils nur eines Enantiomers des Intermediates Linalyldiphosphat, dessen Konfiguration sich in den Folgeschritten auswirkt.



**Abb. A-3:** Biosynthese der Monoterpene (aus Hyatt und Croteau, 2005). Entstehung des chiralen (4R)- und (4S)- $\alpha$ -Terpinylkations (**A**) und einige Beispiele der weiteren Reaktionen ausgehend vom (4S)- $\alpha$ -Terpinylkation (**B**).

Die Komplexität der Reaktion nimmt bei den Sesquiterpensynthesen deutlich zu (Cane, 1999b). Bereits die erste Cyclisierung von FPP kann zur Bildung vier unterschiedlicher Carbokationen führen (Abb. A-4). Diese Kationen gehen wie das  $\alpha$ -Terpinylkation verschiedenste Reaktionen ein, die entsprechend viele Endprodukte ergeben.



**Abb. A-4:** Erster Ionisierungsschritt in der Biosynthese der Sesquiterpene (Cane, 1999b).

### 3.2.6 Struktur der Mono- und Sesquiterpensynthesen

Obwohl aus den intermediären Carbokationen eine Vielzahl von Produkten entstehen kann, dirigieren viele Terpensynthesen die Reaktion zu einem sehr spezifischen Ergebnis. Erklären lässt sich dies anhand von Kristallstrukturen, die bisher von einer Monoterpensynthese und vier Sesquiterpensynthesen beschrieben wurden (Lesburg et al., 1997; Starks et al., 1997; Caruthers et al., 2000; Rynkiewicz et al., 2002; Whittington et al., 2002). Davon sind lediglich die (+)-Bornyldiphosphatsynthese aus *Salvia officinalis* und die 5-*epi*-Aristolochensynthese aus Tabak pflanzlichen Ursprungs. Weitere Informationen über die Funktionsweise der Enzyme erbrachte die Analyse von Prenyltransferasen, die diesen strukturell sehr ähnlich sind (Christianson, 2006). Die Enzyme bestehen aus zwei Domänen, wobei bei den pflanzlichen Enzymen lediglich die C-terminale Domäne (*class I*) die Reaktion katalysiert. Darin bildet das aktive Zentrum jeweils eine hydrophobe Umgebung, die das hochreaktive Carbokation stabilisiert, zum Teil auch in anti-Markovnikov-Konfiguration, und vor dem Zugriff durch Nucleophile wie Wasser schützt (Whittington et al., 2002; Christianson, 2006). Die räumliche Form des aktiven Zentrums bestimmt die Struktur der Produkte. Die Aminosäuren sind aber kaum aktiv an der Cyclisierungsreaktion beteiligt. Dagegen spielen beim ersten Schritt der

Terpensynthese, der Ionisierung des Prenylphosphates, zwei Sequenzelemente eine wichtige Rolle. Das in Terpensynthesen hochkonservierte, aspartatreiche Motiv DDXXD, koordiniert zwei zweiwertige Metallkationen, meist  $Mg^{2+}$  oder auch  $Mn^{2+}$ . Das zweite Motiv hat die Sequenz (N,D)D(L,I,V)X(S,T)XXXE und ist für die Bindung eines weiteren Metallkations verantwortlich. Dieses Cluster aus drei Kationen steht in Wechselwirkung mit der Diphosphatgruppe des Substrates bzw. mit dem bereits eliminierten Diphosphatanion. Dadurch wird zum einen die Ionisierung, also die Bildung des Carbokations durch Koordination des Diphosphates mit den Metallkationen ermöglicht. Zum anderen ändert sich die Struktur des aktiven Zentrums, sodass erst nach der Bindung des Substrates die Enzymform gebildet wird, die das Produkt der Reaktion bestimmt.

Zwei weitere Motive finden sich in der N-terminalen Domäne (*class II*), denen in pflanzlichen Enzymen jedoch keine klare Bedeutung zukommt (Köllner et al., 2004; Christianson, 2006). Die Sequenz RR(X)<sub>8</sub>W am N-Terminus vieler Terpensynthesen ist notwendig für die Aktivität der Enzyme und verdeckt den Zugang zum aktiven Zentrum nach Bindung des Substrates. Außerdem scheint eine Beteiligung der beiden Arginin-Reste am Isomerisierungsschritt von GPP möglich zu sein (Williams et al., 1998). Unbekannt ist die Bedeutung des konservierten Sequenzelementes LQLYEASFL, von dem man vor Aufklärung der Kristallstrukturen vermutete, dass es am aktiven Zentrum beteiligt ist (McGeady and Croteau, 1995).

Wenige Veränderungen in der Sequenz und damit in der Struktur der Enzyme können recht große Veränderungen in der Produktspezifität bewirken. In einer Sesquiterpensynthese aus Mais kontrollieren zum Beispiel nur vier Aminosäuren im katalytischen Zentrum die Stereoselektivität des Enzyms (Köllner et al., 2004).

### 3.3 Phylogenetik der Mono- und Sesquiterpensynthesen

Nachdem die ersten Sequenzen von Terpensynthesen bekannt waren, wie die der *epi*-Aristolochensynthase aus *Nicotiana tabacum* oder der (S)-Limonensynthase aus *Mentha spicata*, konnten mit Hilfe molekularbiologischer Methoden sehr viele weitere Enzyme kloniert werden (Facchini und Chappell, 1992; Colby et al., 1993; Bohlmann et al., 1998a). Aus Geweben wie Drüsenhaaren, in denen die Terpene spezifisch gebildet werden oder in denen durch äußere Einflüsse wie Verwundung die Genexpression von Terpensynthesen induziert wurde, konnten RNA isoliert und cDNA-Datenbanken generiert werden. Mittels unterschiedlicher Methoden sind

daraus Transkripte noch unbekannter Enzyme extrahiert worden. Auf diese Weise wurden die Sequenzen von Terpensynthasen aus sehr vielen unterschiedlichen Pflanzen bekannt, etwa aus *Arabidopsis thaliana* (Bohlmann et al., 2000; Chen et al., 2003 und 2004; Fäldt et al., 2003; Tholl et al., 2005), *Clarkia breweri* (Dudareva et al., 1996), *Abies grandis* (Bohlmann et al., 1997, 1998b und 1999), *Artemisia annua* (Jia et al., 1999; Mercke et al., 1999; Picaud et al., 2005; Berteau et al., 2006), *Ocimum basilicum* (Iijima et al., 2004), *Salvia officinalis* (Wise et al., 1998), *Citrus limon* (Lücker et al., 2002), *Zea mays* (Schnee et al., 2002; Köllner et al., 2004) und *Cichorium intybus* (Bouwmeester et al., 2002). Die Produktspezifitäten dieser Enzyme konnten durch Assays nach heterologer Expression bestimmt werden. Die Sequenzierung kompletter Genome erlaubte die Identifizierung weiterer Terpensynthasegene. In *Arabidopsis thaliana* wurden auf diese Weise 32 Terpensynthasegene annotiert, von denen erst acht biochemisch charakterisiert sind (Aubourg et al., 2002; Chen et al., 2003).

Unterzieht man die Sequenzen der pflanzlichen Terpensynthasen einer phylogenetischen Analyse, kristallisieren sich sieben Gruppen ähnlicher und daher verwandter Enzyme heraus (Abb. B-11) (Bohlmann et al., 1997 und 1998a; Aubourg et al., 2002; Dudareva et al., 2003; Aharoni et al., 2004; Tholl et al., 2005). Diese Terpensynthase-Unterfamilien wurden mit TPS-a bis g bezeichnet. In TPS-c und TPS-e sind überwiegend die Terpensynthasen des Primärmetabolismus versammelt, die wenig verwandt mit den anderen Terpensynthasen und für die Synthese von Copalylidiphosphat und Kaurenen verantwortlich sind. Die Mitglieder von TPS-a sind vor allem Sesquiterpensynthasen des Sekundärmetabolismus der Angiospermen, während sich unter TPS-b Monoterpensynthasen gruppieren, insbesondere Vertreter der *Lamiaceae*. Es sind jedoch auch eine Isoprensynthase und zwei Sesquiterpensynthasen in dieser Unterfamilie zu finden. TPS-d beinhaltet die Mono-, Sesqui- und Diterpensynthasen der Gymnospermen. Trotz unterschiedlicher Produktspezifitäten sind die Sequenzähnlichkeiten innerhalb dieser Familie größer als zu Enzymen der Angiospermen mit gleicher Funktion. Genauso sind sich innerhalb der Unterfamilien häufig die Sequenzen einzelner Spezies am ähnlichsten und nicht einzelner Funktionen. Die Relation zwischen Sequenz und katalysierter Reaktion ist also bei den Terpensynthasen des Sekundärmetabolismus nur schwach ausgeprägt. Dies wird damit erklärt, dass erst in der neueren Zeit durch Genduplikationen und Mutationen eine Vielzahl verschiedener Enzyme in den



einzelnen Spezies entstanden ist und geringe Sequenzunterschiede zu einer anderen Reaktivität führen können. In der Gruppe TPS-f ist die (S)-Linaloolsynthase aus *Clarkia breweri* die bisher einzige Vertreterin, die charakterisiert wurde. Die Subfamilie TPS-g setzt sich schließlich aus den Mono- und Sesquiterpensynthesen zusammen, die kein RR(X)<sub>8</sub>W-Motiv enthalten und ausschließlich acyclische Terpene bilden.

Zusätzlich wurden die Terpensynthesen basierend auf ihrer genomischen Struktur eingeteilt in Klasse I (mit 12 bis 14 Introns), Klasse II (9 Introns) und Klasse III (6 Introns) (Trapp und Croteau, 2001). Im Laufe der Evolution nahm die Zahl der Introns ab, wobei eine komplette Domäne mit etwa 200 Aminosäuren aus Klasse I wegfiel. Kombiniert man diese genomische mit der oben beschriebenen, phylogenetischen Klassifizierung, so gehören die Enzyme der Familien TPS-c, -e und -f der Klasse I an, die aus TPS-a, -b und -g der Klasse III (Aubourg et al., 2002). Die Gymnospermen-Terpensynthesen (TPS-d) sind Enzyme der Klasse I oder II.

### 3.4 Funktionen der Mono- und Sesquiterpene

Die Anreicherung von Mono- und Sesquiterpenen in beträchtlichen Mengen (> 0,01 % im Frischgewicht) wurde in einigen 100 Pflanzenfamilien nachgewiesen, und ihre Synthese scheint zumindest in Spuren in allen Pflanzen abzulaufen (Wise und Croteau, 1999). Entgegen der früheren Annahme, dass sie als Sekundärmetabolite keine wesentlichen Funktionen einnehmen, wachsen die Erkenntnisse, dass sie in ökologische Prozesse eingebunden sind (Harborne, 1991; Baldwin et al., 2006). Sie dienen als Lockstoffe für bestäubende oder samenverbreitende Tiere, wirken gegen Pathogene und Herbivore und als allelopathische Substanzen (Wise und Croteau, 1999; Pichersky und Gershenzon, 2002). Die am häufigsten beschriebene Funktion ist die der Abwehr (Harborne, 1991; Kessler und Baldwin, 2002). Die Bildung der Substanzen wird oft durch Angriff und Verwundung beziehungsweise durch Signalmoleküle induziert. Die Terpene wirken entweder toxisch für die Spezies, die die Pflanze bedrohen, und werden daher gemieden, oder sie wirken als Lockmittel für Räuber, die wiederum gegen die Fraßfeinde vorgehen. Besonders gut untersucht sind die Funktionen der Terpene und die Abhängigkeit ihrer Bildung in Coniferen (Keeling und Bohlmann, 2006). Das Harz der Bäume enthält große Mengen an Mono- und Diterpenen und wird insbesondere als Reaktion auf Verwundung gebildet. Die Substanzen wirken zum

Teil giftig auf Borkenkäfer und desinfizieren und verschließen die Wunde. Allerdings nutzen einige Feinde die Terpene, um daraus Pheromone zu synthetisieren, die weitere Insekten anlocken und den Befall verstärken. Eine ökologische Funktion von Terpenen hinsichtlich der indirekten Abwehr von Feinden wurde bei Mais beschrieben (Rasmann et al., 2005). Eine Sesquiterpensynthese, die durch den Befall mit Insektenlarven induziert wird, bildet (*E*)- $\beta$ -Caryophyllen. Durch diese Verbindung werden bestimmte Nematoden unterirdisch angelockt, die wiederum die Larven infiltrieren. Ganz ähnlich wirkt eine weitere Sesquiterpensynthese aus der gleichen Pflanze, die ebenfalls nach Schädigung durch Insektenlarven induziert wird und (*E*)- $\beta$ -Farnesen und *trans*- $\alpha$ -Bergamoten bildet. Diese locken Wespen an, die ihre Eier in die Larven legen (Schnee et al., 2006).

Neben diesen sekundären Eigenschaften wurden den Mono- und Sesquiterpenen aber zum Teil auch primäre Funktionen zugeordnet (D'Auria und Gershenzon, 2005). Die Monoterpene der Steineiche (*Quercus ilex*) sind beispielsweise wirksam gegen reaktive Sauerstoffspezies, die als schädliche Nebenprodukte des Stoffwechsels entstehen.

### 3.5 Terpene in der Erdbeere

Das Aroma der Erdbeere wird wesentlich von DMHF (2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2*H*)-furanon) und DMMF (2,5-Dimethyl-4-methoxy-3(2*H*)-furanon) geprägt. Sowohl in kultivierten Erdbeeren (*Fragaria x ananassa*) als auch in der Wilderdbeere (*Fragaria vesca*) haben diese beiden Furanone den größten Aromawert, der sich aus Konzentration und Geruchsschwellenwert der Komponenten berechnet (Ulrich et al. 1997). Ester wie Ethylbutanoat spielen ebenfalls eine große Rolle für den typischen Geruch der Früchte.

Daneben sind auch Terpene als Aromastoffe der Erdbeere identifiziert worden. In den Früchten der kultivierten Erdbeere kommt insbesondere Linalool vor, in geringeren Mengen auch Nerolidol (Gomes da Silva und Chaves das Neves, 1999; Aharoni et al., 2004). Die Blätter enthalten ebenfalls Linalool als Hauptterpen, aber auch  $\alpha$ -Terpineol, Ocimen, Germacren und  $\alpha$ -Farnesen (Hamilton-Kemp et al., 1988 und 1989). Das Enantiomerenverhältnis des Linalools im Blatt unterscheidet sich deutlich von dem in den Früchten. In letzteren liegt fast enantiomerenreines (*S*)-Linalool vor, in den Blättern dagegen zu etwa 60 % (*R*)-Linalool. (Aharoni et al., 2004; Hampel et al., 2006). In Wilderdbeeren beträgt dieser Anteil des (*R*)-Enantiomers in den Blättern fast 100 %. Dort kommt Linalool nur in den Blättern vor,

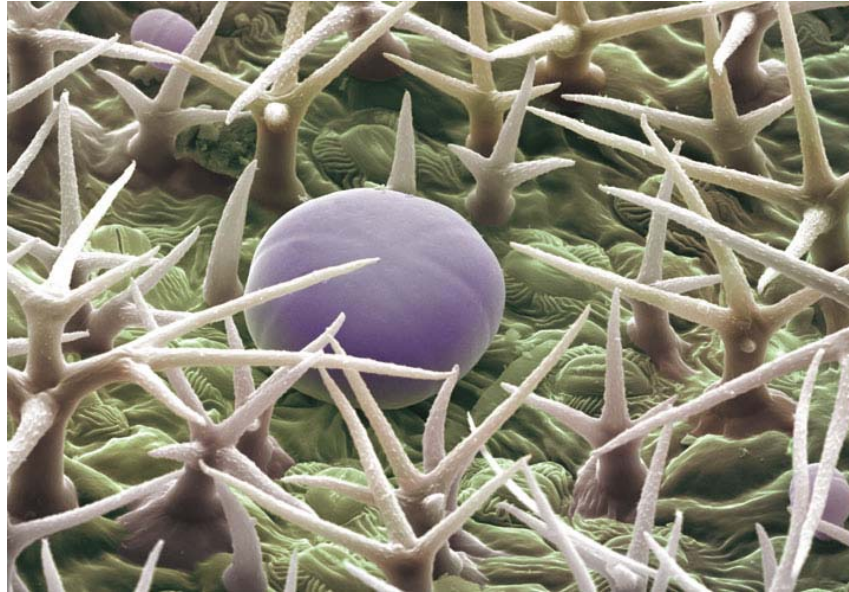
nicht aber in den Früchten, in denen nur die Terpene  $\alpha$ -Pinen, Sabinen und  $\beta$ -Myrcen nachgewiesen wurden.

Einen wesentlichen Beitrag zum Verständnis der Biosynthese von Linalool in der Erdbeere lieferte die Klonierung einer Linalool-/Nerolidol-Synthase aus der Frucht von *Fragaria x ananassa* (*FaNES1*) (Aharoni et al., 2004). Die heterologe Expression zeigte, dass sie die Bildung von (S)-Linalool aus GPP und (3S)-(E)-Nerolidol aus FPP katalysiert. Eine Besonderheit stellt die Sequenz des Enzyms dar, in der kein RR(X)<sub>8</sub>W-Motiv und kein Signalpeptid enthalten sind. Durch Mutation ist zwischen dem eigentlichen Translationsstart (Met1) und dem zweiten Methionin (Met2) ein Stopp-Codon entstanden, wodurch *FaNES1* als verkürztes Enzym ab Met2 exprimiert wird. Es existieren aber sowohl in der Wild- als auch in der kultivierten Erdbeere Transkripte, die das Stoppcodon nicht enthalten (*FaNES2* und *FvNES*). Dementsprechend finden sich in deren Sequenz auch ein Signalpeptid und eine dem RR(X)<sub>8</sub>W-Motiv sehr ähnliche Sequenz (RR(X)<sub>8</sub>P) zwischen Met1 und Met2. Da die Autoren nur die Chiralität der Produkte von *FaNES1*, nicht jedoch von *FaNES2* oder *FvNES* bestimmt haben, ist denkbar, dass diese aufgrund Ihrer verlängerten Sequenz (R)-Linalool synthetisieren. Dabei könnte die N-terminale Konsensussequenz (RR(X)<sub>8</sub>P) für die Chiralität von Bedeutung sein. Zwar ist die Funktion dieser Sequenz nicht bekannt, sie ist aber in vielen Terpensynthesen obligatorisch für die Funktionalität, da sie Einfluss auf die räumliche Gestalt des aktiven Zentrums hat (Williams et al., 1998; Köllner et al., 2004). Hinzu kommt eine Korrelation zwischen den *FaNES*-Expressionsmustern und den Linalool-Enantiomerenverhältnissen. In Früchten der kultivierten Erdbeere wird *FaNES1* stark exprimiert und es entsteht ganz überwiegend (S)-Linalool, während *FaNES2* kaum exprimiert wird und nur sehr wenig (R)-Linalool vorliegt. Ähnlich verhält es sich in den Blättern, in denen *FaNES1* und *FaNES2* gleich niedrig exprimiert sind und etwa gleich hohe Mengen (R)- und (S)-Linalool vorkommen. In der Wilderdbeere wiederum ist kein verkürztes Transkript bekannt, das zu *FaNES1* homolog wäre, sondern nur das vollständige *FvNES*, das *FaNES2* entspricht. Die *FvNES*-Expression korreliert somit mit der Bildung des (R)-Enantiomers von Linalool (Aharoni et al., 2004; Hampel et al., 2006). Diese Überlegungen dienten als Ansatzpunkte, um die Herkunft des (R)-Linalools zu erklären.

### 3.6 Terpene in Lavendel (*Lavandula angustifolia*)

*Lavandula angustifolia*, der (Echte) Lavendel, gehört zur botanischen Familie *Lamiaceae* (Lippenblütler), deren Mitglieder meist reich an etherischen Ölen sind. Aus diesem Grund sind drei von etwa 30 Arten der Gattung *Lavandula* von wirtschaftlicher Bedeutung: Der genannte Echte Lavendel, der breitblättrige Lavendel (*L. latifolia*) und der hybride Lavandin-Lavendel (*L. angustifolia* x *L. latifolia*) (McNaughton, 2000; Segura und Calvo, 1991). Aus den Blüten dieser Arten wird das etherische Öl gewonnen, wobei *L. angustifolia* das hochwertigste hervorbringt (Bown, 2005). Der Name der Pflanzengattung stammt vom lateinischen *lavare* für „waschen“ ab und verweist auf die bereits seit dem Altertum übliche Verwendung in Seifen, Waschmitteln und Parfums. Lavendelöl wird aber auch in Lebensmitteln wie Getränken, Süß- und Backwaren zur Aromatisierung eingesetzt (Kim und Lee, 2002). Darüber hinaus gilt Lavendel als Heilkraut, das zahlreiche physiologische, insbesondere sedative Wirkungen aufweist (Basch et al., 2004).

Wie bei anderen Vertretern der *Lamiaceae* werden die Terpene des etherischen Öls in hochspezialisierten Zellen, den Drüsenhaaren gebildet und akkumuliert (Abb. A-5) (Richter, 1996; Wise und Croteau, 1999; Svoboda et al., 2001). Diese sekretorischen Strukturen befinden sich in großer Zahl an den Blütenkelchen, aber auch auf den Oberflächen von Blättern und Stängeln. Die Inhaltsstoffe des Lavendelöls sind mehrfach beschrieben worden (Lawrence, 1993 und 1994; Shellie et al., 2000 und 2002; Kim und Lee, 2002; Fakhari et al., 2005; Jung et al., 2005). Das Öl setzt sich überwiegend aus Monoterpenen und zu einem geringeren Teil aus Sesquiterpenen zusammen, wobei die berichteten Gehalte aufgrund natürlicher Unterschiede wie Lavendel-Sorte oder Kultivierung der Pflanze sowie verschiedener Extraktionsmethoden stark schwanken. Übereinstimmend sind sehr hohe Gehalte an Linalool und Linalylacetat (jeweils zwischen 15 und 45 %) kennzeichnend für Lavendelöl. Als weitere charakteristische Inhaltsstoffe wurden Limonen, 1,8-Cineol, Campher, Terpinen-4-ol, Lavandulylacetat, Lavandulol und  $\alpha$ -Terpineol identifiziert. Das Enantiomerenverhältnis von Linalool und des Acetats gilt als Reinheitskriterium des häufig verfälschten Lavendelöls. In natürlichem Öl tritt Linalool zu über 94 % als (R)-Enantiomer auf, Linalylacetat zu über 99 % (Lawrence, 1993).



**Abb. A-5:** Elektronenmikroskopische Aufnahme der unteren Blattseite von *Lavandula angustifolia*. Drüsenhaare sind umgeben von nicht-sekretorischen Trichomhaaren (Svoboda et al., 2001).

### 3.7 *Metabolic Engineering* von Terpenen

Viele Terpene sind von kommerziellem Interesse, da sie in Lebensmitteln, Kosmetika, Parfums und Reinigungsmitteln als Aromastoffe verwendet werden und Bestandteile von Pharmazeutika sind. Zudem übernehmen sie in Pflanzen ökologische Funktionen und können zum Beispiel die Resistenz gegenüber Schädlingen erhöhen (Kap. 3.4). Daher werden Anstrengungen unternommen, die Terpenbiosynthese in Pflanzen durch *metabolic engineering* zu beeinflussen (Aharoni et al., 2005 und 2006). Auf diese Weise können die Pflanzen etwa hinsichtlich ihres Aromaprofils oder des Gehaltes an ätherischem Öl verändert werden, um daraus unter Umständen einen ökonomischen und ökologischen Nutzen zu ziehen. Zudem könnte man auch einzelne bedeutende Terpene in Pflanzen produzieren und gewinnen. Gegenüber mikrobiellen Systemen hat dies den Vorteil, dass Pflanzen einen höher entwickelten Biosyntheseapparat besitzen und die benötigte Energie durch kostengünstige Photosynthese gewinnen (Bouwmeester, 2006). Außerdem können durch *metabolic engineering* weitere Erkenntnisse über die Terpenbiosynthese und ihre ökologische Rolle gewonnen werden. Eine wichtige Voraussetzung für die gezielte Änderung des Terpenprofils ist die Kenntnis der Gene, die die in der Biosynthese entscheidenden Enzyme codieren (Mahmoud und Croteau, 2002; Dixon, 2005). In einigen Pflanzen gelang bereits die Manipulation des Terpenstoffwechsels. So wurde die (S)-Linaloolsynthase aus *Clarkia breweri* in der

Tomate und *Petunia hybrida* exprimiert und drei Monoterpensynthesen aus *Citrus limon* in Tabakpflanzen (Lewinsohn et al., 2001; Lücker et al., 2001 und 2004). Die spezifische Beeinflussung der zwei getrennten Biosynthesewege in Plastiden und im Cytosol verspricht zudem Erfolg in der Produktion größerer Mengen einzelner Terpene (Wu et al., 2006).

## 4 Acyltransferasen

### 4.1 Überblick über die Acyltransferasen

Acyltransferasen (EC 2.3.1.x) katalysieren die Übertragung von Acylgruppen auf eine große Zahl von Verbindungen. Das Spektrum der möglichen Donorsubstrate umfasst Coenzym A-Ester, Acylglucoside, acylierte ACPs (*Acyl Carrier Proteins*) und Chinasäureester, während Akzeptorsubstrate Verbindungen sind, in denen Hydroxy-, Thiol- oder Aminogruppen, aber auch C-Atome acyliert werden können (St. Pierre und De Luca, 2000). Dementsprechend sind Acyltransferasen an sehr vielen wichtigen Stoffwechselwegen beteiligt und übernehmen entscheidende Aufgaben im Organismus. Dazu gehören die Lipid- und Proteinbiosynthese ebenso wie detoxifizierende Reaktionen und die Regulation der Genexpression durch Acetylierung von Histonen.

Im sekundären Metabolismus der Pflanzen stehen vor allem die Synthese bzw. Modifizierung von Anthocyanen, Flavonoiden, Pflanzenabwehrstoffen (Phytoalexinen), Terpenen und kurzkettigen Alkoholen im Vordergrund. Von den zahlreichen unterschiedlichen Acyltransferasen bilden die sogenannten Serin-Carboxypeptidase-ähnlichen Acyltransferasen und die BAHD-Acyltransferasen die zwei größten Gruppen. Erstere verwenden als Donorsubstrate Zuckerester (Acylglucoside), wie sie auch von FaGT2 (Kap. A.2.4) synthetisiert werden (Milkowski und Strack, 2004). Die zweite Gruppe, die BAHD-Acyltransferasen, setzen CoA-Ester um und werden im Folgenden näher beschrieben.

### 4.2 Gemeinsame Eigenschaften der BAHD-Acyltransferasen

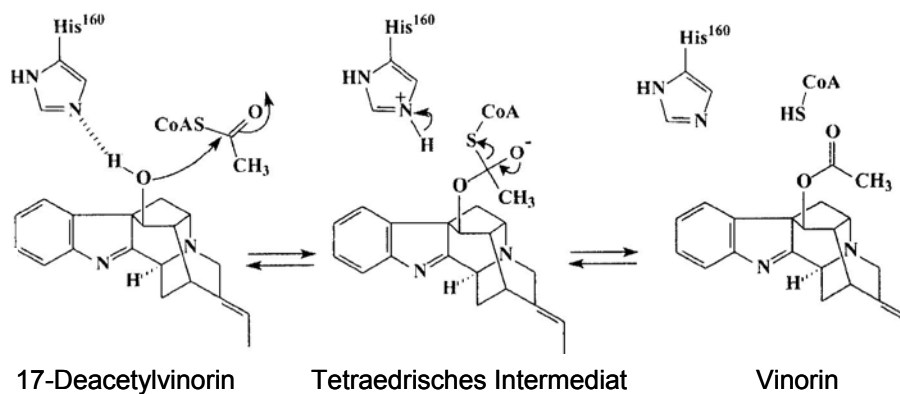
Die Superfamilie der BAHD-Acyltransferasen ist nach den Anfangsbuchstaben der ersten vier Mitglieder benannt, deren Gen- beziehungsweise Aminosäuresequenz vollständig bekannt und die zugleich biochemisch charakterisiert waren (St. Pierre und De Luca, 2000). Es handelt sich dabei um die Enzyme CbBEAT, AHCT, DcHCBT und CrDAT. Die Benzylalkohol-O-Acetyltransferase (CbBEAT) erzeugt den Aromastoff Benzylacetat in den Blüten von *Clarkia breweri*, während die Deacetylvindolin-4-O-Acetyltransferase (CrDAT) für die letzte Stufe in der Biosynthese von Vindolin, dem Hauptalkaloid aus *Catharanthus roseus* verantwortlich ist (Dudareva et al., 1998; St. Pierre et al., 1998). Beiden Enzymen dient also Acetyl-CoA als Donorsubstrat, mit dem eine Hydroxygruppe acetyliert wird. Die Anthranilat-N-Hydroxycinnamoyl/Benzoyltransferase (DcHCBT) dagegen

überträgt aktivierte, aromatische Acylreste auf Aminogruppen (Yang et al., 1997). Das Enzym wurde aus der Nelke (*Dianthus caryophyllus*) kloniert, in der es Anthramide bildet, eine Klasse von Phytoalexinen. Bei AHCT schließlich handelt es sich um eine Gruppe von analogen Anthocyan-O-Hydroxycinnamoyltransferasen aus verschiedenen Pflanzen (St. Pierre und De Luca, 2000). Darunter ist eine spezifisch in Blütenblättern von *Gentiana triflora* exprimierte Acyltransferase (Gt5AT), die ebenfalls Hydroxyzimtsäuren überträgt, in diesem Fall jedoch auf die an C5 gebundenen Glucosemoleküle von 3,5-diglucosidischen Anthocyanen (Fujiwara et al., 1998).

Insgesamt sind bis heute die Sequenzen und Funktionen von 46 verschiedenen BAHD-Acyltransferasen bekannt (D'Auria, 2006). Außerdem sind zahlreiche andere Acyltransferasen beschrieben worden, die durch klassische Aufreinigung aus Proteinextrakten gewonnen und biochemisch charakterisiert wurden. Zum Beispiel katalysieren Flavonol-3-O-Glycosid-Hydroxycinnamoyltransferasen die Bildung wichtiger Pigmente zum Schutz vor UV-B-Strahlung in *Pinus silvestris* (Kaffarnik et al., 2005). Allerdings ist deren Aminosäuresequenz unbekannt und eine Einordnung in die Klassen der BAHD-Familie, die auf Sequenzähnlichkeiten beruht, nicht möglich. Die Sequenzen, die durchschnittlich 445 Aminosäuren lang sind (entsprechend Molekulargewichten von 48 bis 55 kDA), enthalten einige charakteristische konservierte Motive (D'Auria, 2006). Die erst kürzlich gelungene Kristallstrukturanalyse einer BAHD-Acyltransferase, der Vinorin-Synthase aus *Rauvolfia serpentina*, konnte wesentlich dazu beitragen, die Funktionen dieser Regionen aufzuklären (Ma et al., 2005). Das erste Motiv hat die Aminosäuren-Folge HXXXD und befindet sich im aktiven Zentrum des Enzyms. Darin wirkt das Histidin bei der Katalyse als Base und deprotoniert zunächst die Hydroxygruppe des Akzeptorsubstrates (Abb. A-6). Dadurch wird ein nucleophiler Angriff auf das Carbonyl-Kohlenstoffatom des Acyl-CoAs ermöglicht, wobei sich ein tetraedrisches Intermediat mit dem Akzeptorsubstrat bildet. Anschließend wird das Proton auf die Thiofunktion der CoA-Gruppe übertragen, sodass freies CoA und der Ester entstehen. Die Asparaginsäure ist dagegen nicht an der Reaktion beteiligt, sondern stabilisiert vermutlich die Geometrie des aktiven Zentrums. Ein zweites hochkonserviertes und charakteristisches Motiv der BAHD-Enzyme hat die Sequenz DFGWG und befindet sich in der Nähe des C-Terminus. Mutationsversuche hatten gezeigt, dass der Austausch von Asparagin zu einer erheblichen Verminderung oder



zum Verlust der Aktivität führte (Suzuki et al., 2003, Bayer et al., 2004). Die Untersuchung der Kristallstruktur ergab, dass das Motiv weit vom aktiven Zentrum entfernt liegt und wahrscheinlich nicht direkt an der Katalyse beteiligt ist, sondern die tertiäre Struktur des Enzyms entscheidend formt (Ma et al., 2005). Ein drittes Motiv ist weniger stark konserviert und setzt sich aus den 13 Aminosäuren LSXTLXXXYYXXXG zusammen (Aharoni et al., 2000). Über die Funktion dieser Konensussequenz ist bisher nichts bekannt.



**Abb. A-6:** Vorgeschlagener Reaktionsmechanismus im aktiven Zentrum der BAHD-Acyltransferasen am Beispiel der Vinorinsynthese. Das konservierte Histidin ist an der Übertragung der Acetylgruppe maßgeblich beteiligt (Ma et al., 2005).

### 4.3 Klassifizierung der BAHD-Acyltransferasen

Die BAHD-Acyltransferasen können basierend auf der Sequenzhomologie weiter eingeteilt werden. Die 46 Acyltransferasen, von denen bisher sowohl Sequenzen als auch Funktionen bekannt sind, bilden in *Protein-Alignments* 5 Klassen (I bis V in Abb. B-26; Klasse VI enthält nicht charakterisierte Sequenzen) (D'Auria, 2006).

In Klasse I gruppieren sich Enzyme, die phenolische Glucoside verestern. Die häufigsten Akzeptorsubstrate sind Anthocyane, deren Zuckergruppen mit Hilfe von aliphatischen und aromatischen CoA-Estern modifiziert werden (Nakayama et al., 2003).

In Klasse II sind derzeit nur zwei Acyltransferasen eingeordnet, die jedoch nicht biochemisch charakterisiert wurden, sondern denen nur durch Untersuchung von *Knock-Out*-Pflanzen eine Funktion zugeordnet wurde. Es handelt sich um zwei Enzyme, die für die Kettenverlängerung bei der Synthese der epicuticularen Wachse zuständig sind (St. Pierre und De Luca, 2000; Tacke et al., 1995; Xia et al., 1996).

Möglicherweise sind sie die grundlegenden Vertreter der BAHD-Superfamilie (Stewart et al., 2005).

Klasse III enthält eine recht heterogene Gruppe von Acyltransferasen, die aber überwiegend Acetyl-CoA als Donor-Substrat bevorzugen. Die Klasse kann in zwei Untergruppen eingeteilt werden. Zur ersten Gruppe gehören Enzyme, die die flüchtigen Ester in Blüten und Früchten produzieren. Zum Beispiel sind die Alkoholacyltransferasen aus der Erdbeere (FaSAAT) und Rose (RhAAT) wenig substratspezifisch in Bezug auf den Akzeptor-Alkohol und bilden eine Vielzahl von acetylierten Verbindungen (Aharoni et al., 2000, Shalit et al., 2003). Eine zweite Untergruppe ist an der Biosynthese von Alkaloiden beteiligt wie die in Kapitel A.4.2 erwähnte CrDAT (St. Pierre et al., 1998).

Klasse IV enthält bisher nur einen Vertreter, die Agmatin-*N*-Hydroxycinnamoyltransferase aus Gerste (*Hordeum vulgare*), deren Aktivität entscheidend für die Bildung des Pflanzenabwehrstoffes Hordatol ist (Burhenne et al., 2003). Das Enzym akzeptiert verschiedene Hydroxycinnamoyl-CoAs, ist aber spezifisch für das Akzeptorsubstrat Agmatin. Es wurden allerdings nur zwei weitere Substrate getestet.

In Klasse V kann man erneut mehrere Unterklassen definieren. Die erste enthält ausschließlich Enzyme aus Eiben-Arten (*Taxus*), die an der Biosynthese von Paclitaxel beteiligt sind, das auch unter dem Namen Taxol als Chemotherapeutikum bekannt ist. Eine zweite Untergruppe katalysiert überwiegend die Bildung flüchtiger Aromakomponenten. Dazu zählt beispielsweise die Benzoyl-CoA:Benzylolethanol/Phenylethanol-Benzoyltransferase aus Blüten von *Petunia hybrida* (Boatright et al., 2004). In einer dritten Untergruppe kann eine Reihe von Enzymen zusammengefasst werden, die aromatische CoAs akzeptieren. So überträgt die NtHCT aus Tabak (*Nicotiana tabacum*) Hydroxycinnamoylreste auf Shikimat und Chinat, eine Reaktion, die für die Ligninbiosynthese von großer Bedeutung ist (Hoffmann et al., 2003 und 2004). Auch die Acyltransferase DcHCBT, die zuvor beschrieben wurde (Kap. A.4.2), gehört in diese Kategorie.

Aus Sequenzhomologien ergeben sich also ähnliche Reaktivitäten, sodass eine gewisse Aussage zwischen Klassenzugehörigkeit und Funktion gemacht werden kann. Dies erlaubt die Einordnung von neuen Acyltransferasen, von denen nur Sequenzen bekannt sind, und ermöglicht eine Vorhersage, welche Substrate diese Enzyme umsetzen könnten. Allerdings zeigten sehr viele Enzyme eine recht schwache Spezifität sowohl hinsichtlich Akzeptor- als auch Donorsubstrat. Daher ist

---

ohne ausführliche biochemische oder genetische Charakterisierung keine befriedigende Aussage über die Funktion möglich.

## 5 Problemstellung

Ziel dieser Arbeit war es, neue Erkenntnisse über Enzyme des Sekundärstoffwechsels in der kultivierten und wilden Erdbeere (*Fragaria x ananassa* und *Fragaria vesca*) und in Lavendel (*Lavandula angustifolia*) zu gewinnen. Drei Enzymfamilien waren dabei Gegenstand der Untersuchungen: Glucosyltransferasen, Terpensynthasen und Acyltransferasen.

In einer früheren Arbeit konnte bereits die *Fragaria x ananassa* Glucosyltransferase 2 (FaGT2) teilweise charakterisiert werden (Lunkenbein et al., 2006a) (Kap. A.2.4). Es wurde nachgewiesen, dass dieses Enzym in der Erdbeerfrucht Zimtsäure- und *p*-Cumarsäure glucosyliert. Die niedrige Substratspezifität, die FaGT2 *in vitro* entwickelte, und die Induktion durch oxidativen Stress legten jedoch nahe, dass das Enzym auch an der Glucosylierung von Fremdstoffen beteiligt sein könnte. Daher sollte in einem erweiterten Substratscreening geklärt werden, welche strukturellen Voraussetzungen ein Substrat für die Glycosylierung durch FaGT2 erfüllen muss und inwieweit auch Xenobiotika akzeptiert werden.

Ein wichtiger Aromastoff der Erdbeerfrucht ist (S)-Linalool. Während die Bildung dieses Monoterpens in der Frucht bereits aufgeklärt wurde, ist die Entstehung von (R)-Linalool, das insbesondere in den Blättern von *Fragaria x ananassa* und *Fragaria vesca* vorkommt, unklar (Aharoni et al., 2004) (Kap. A.3.5). Um mehr über den Terpenstoffwechsel in der Erdbeere zu erfahren, wurde versucht, eine (R)-Linaloolsynthase aus Erdbeerblättern zu klonieren und zu charakterisieren.

Das wirtschaftlich bedeutende etherische Öl von *Lavandula angustifolia* enthält eine große Zahl unterschiedlicher Mono- und Sesquiterpene (Kap. A.3.6). Im Gegensatz zu anderen aromatischen Pflanzen sind bisher keine Enzyme beschrieben, die für die Bildung dieser Inhaltsstoffe in Lavendel verantwortlich sind. Die Kenntnis der verantwortlichen Gene ist die Grundvoraussetzung für die gezielte Steuerung des Aromaprofils von Lavendel durch *metabolic engineering* (Kap. A.3.7). Daher sollten durch molekularbiologische Techniken Terpensynthasen aus dieser Pflanze kloniert werden, um sie anschließend heterolog zu exprimieren und biochemisch zu charakterisieren.

Einige Terpene des Lavendelöls sind durch Acylierung modifiziert, etwa das durch seinen hohen Anteil bedeutsame Linalylacetat. Die Biosynthese acylierter Verbindungen wird von Acyltransferasen katalysiert (Kap. A.4). Die Sequenzhomologien dieser Enzyme sollten in einer molekularbiologischen Strategie ausgenutzt werden, um Transkripte von Acyltransferasen aus *Lavandula angustifolia* zu klonieren. Anschließend sollten die korrespondierenden Enzyme heterolog exprimiert werden, um die von ihnen katalysierten Reaktionen zu untersuchen.

## B Ergebnisse und Diskussion

### 1 Erweiterte Charakterisierung von FaGT2

Die in der Erdbeerfrucht reifekorreliert exprimierte Glucosyltransferase FaGT2 war in einer früheren Arbeit bereits teilweise charakterisiert worden (Kap. A.2.4) (Lunkenbein et al., 2006a). Zur erweiterten Charakterisierung wurde das Enzym heterolog exprimiert und in Assays mit zum Teil radioaktiv markierter UDP-Glucose als Donator und mit einem zweiten Substrat als Akzeptor umgesetzt. Die gebildeten Produkte sind aus dem Reaktionsansatz mit *n*-Butanol extrahiert und mit Hilfe eines Szintillationszählers quantifiziert worden. Zunächst wurde die Abhängigkeit vom Cofaktor Magnesium bestimmt. Anschließend wurde FaGT2 mit bisher nicht getesteten, natürlichen und unnatürlichen Substraten umgesetzt. Dabei sollte ermittelt werden, welche strukturellen Eigenschaften die enzymatische Reaktion begünstigen und welche biologische Rolle die breite Substratspezifität spielt.

#### 1.1 Expression und Aufreinigung von FaGT2

Das Enzym wurde in *Escherichia coli* mit einem His-Tag exprimiert. Dies erlaubte die Aufreinigung von FaGT2 aus dem Rohproteinextrakt mittels Affinitätschromatographie, bei der der His-Tag mit matrixgebundenem  $\text{Co}^{2+}$  chelatiert wird. Nach der Elution wurde das Protein mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Reinheit betrug etwa 90 % (Abb. B-1). Die Größe des Zielproteins stimmte mit ca. 65 kDa mit der berechneten Größe überein. Der Enzymextrakt enthielt einige Verunreinigungen, die aus den Bakterien stammten und auch in Eluaten zu sehen waren, die aus Zellen mit dem leeren Expressionsplasmid gewonnen wurden.

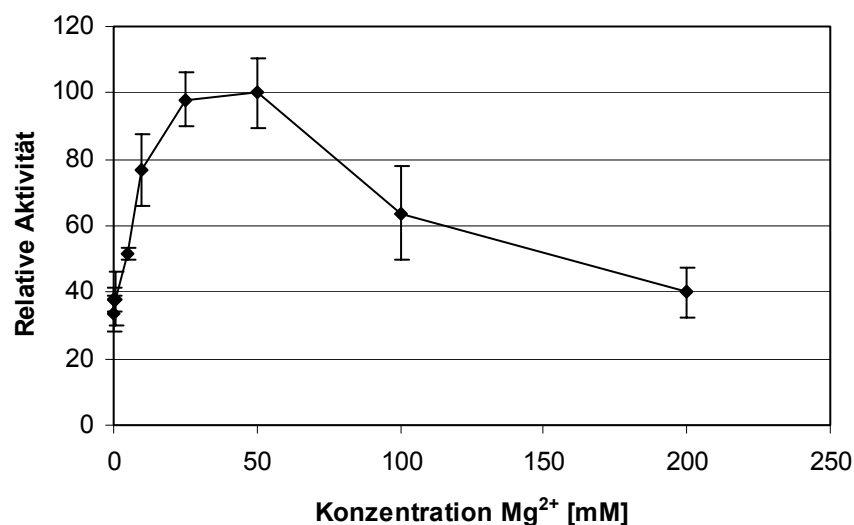
#### 1.2 Abhängigkeit von Magnesiumkationen

In ersten Enzymassays wurde zur Kontrolle der enzymatischen Aktivität Zimtsäure mit UDP-Glucose umgesetzt. Diese lieferten deutlich niedrigere Ausbeuten an Zimtsäure-Glucoseester, als die von Lunkenbein und Mitarbeitern (2006a) beschriebenen. Möglicherweise entfernte das hier verwendete, verbesserte Aufreinigungsprotokoll Salze effektiver aus der Proteinlösung und führte so zu einer Aktivitätsabnahme. Bei Zugabe von  $\text{MgCl}_2$  in Konzentrationen zwischen 0,1 und



**Abb. B-1:** SDS-PAGE von FaGT2-Proteinlösungen nach der Aufreinigung von Expressionskulturen mittels Affinitätschromatographie. Aufgetragen wurden die aufgereinigten Extrakte von Zellen mit leerem Expressionsvektor (**A**), von Zellen mit FaGT2 (**B**), sowie der Größenstandard in kDa (**C**).

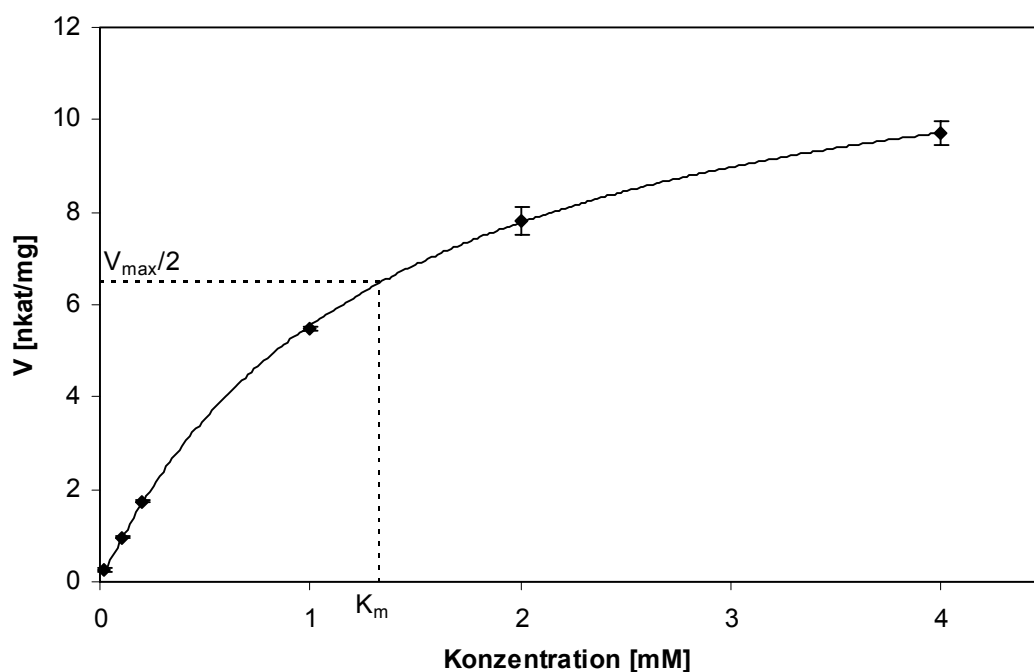
200 mM wurde eine starke Abhängigkeit der Glucosylierungsrate beobachtet, die ihr Maximum bei 25-50 mM hatte (Abb. B-2). Daher wurden die folgenden Assays stets bei einer Konzentration von 50 mM  $Mg^{2+}$  durchgeführt. Viele in der Literatur beschriebene pflanzliche Glucosyltransferasen wurden durch zweiwertige Kationen, vor allem  $Mg^{2+}$  aktiviert (Taguchi et al., 2000; Jackson et al., 2001; Hefner et al., 2002). Allerdings testeten die Autoren nur jeweils eine Konzentration aus einem vergleichsweise niedrigen Bereich (1-10 mM). Die Aktivität erhöhte sich dadurch um 12-68 %. Das Kation fungiert vermutlich im aktiven Zentrum des Enzyms als Koordinator zwischen der UDP-Glucose und der Carboxygruppe einer Aminosäure (Charnock et al., 2001).



**Abb. B-2:** Relative Aktivität von FaGT2 in Abhängigkeit von der  $Mg^{2+}$ -Konzentration.

### 1.3 Strukturelle Vielfalt der Substrate von FaGT2

Um die strukturellen Eigenschaften weiter aufzuklären, die für die Aktivität mit FaGT2 nötig sind, wurden Verbindungen, die den bereits bekannten Substraten (Kap. A.2.4) ähnlich waren, zunächst in einem Screening getestet. Dabei wurden jeweils gleiche Substratkonzentrationen *in vitro* mit der partiell aufgereinigten Glucosyltransferase umgesetzt und die Aktivität relativ zu Zimtsäure berechnet (Tab. B-1). Für alle Substrate, die dabei mehr als 5 % relative Aktivität aufwiesen, wurde eine kinetische Analyse durchgeführt. Dazu wurden Assays mit sechs unterschiedlichen Akzeptorkonzentrationen gemessen und nach der Michaelis-Menten-Gleichung ausgewertet (Abb. B-3). Auf diese Weise konnten die Substrate hinsichtlich der biochemischen Parameter Substrataffinität ( $K_m$ ), maximale Reaktionsgeschwindigkeit ( $V_{max}$ ) und katalytische Effizienz ( $k_{cat}/K_m$ ) verglichen werden.

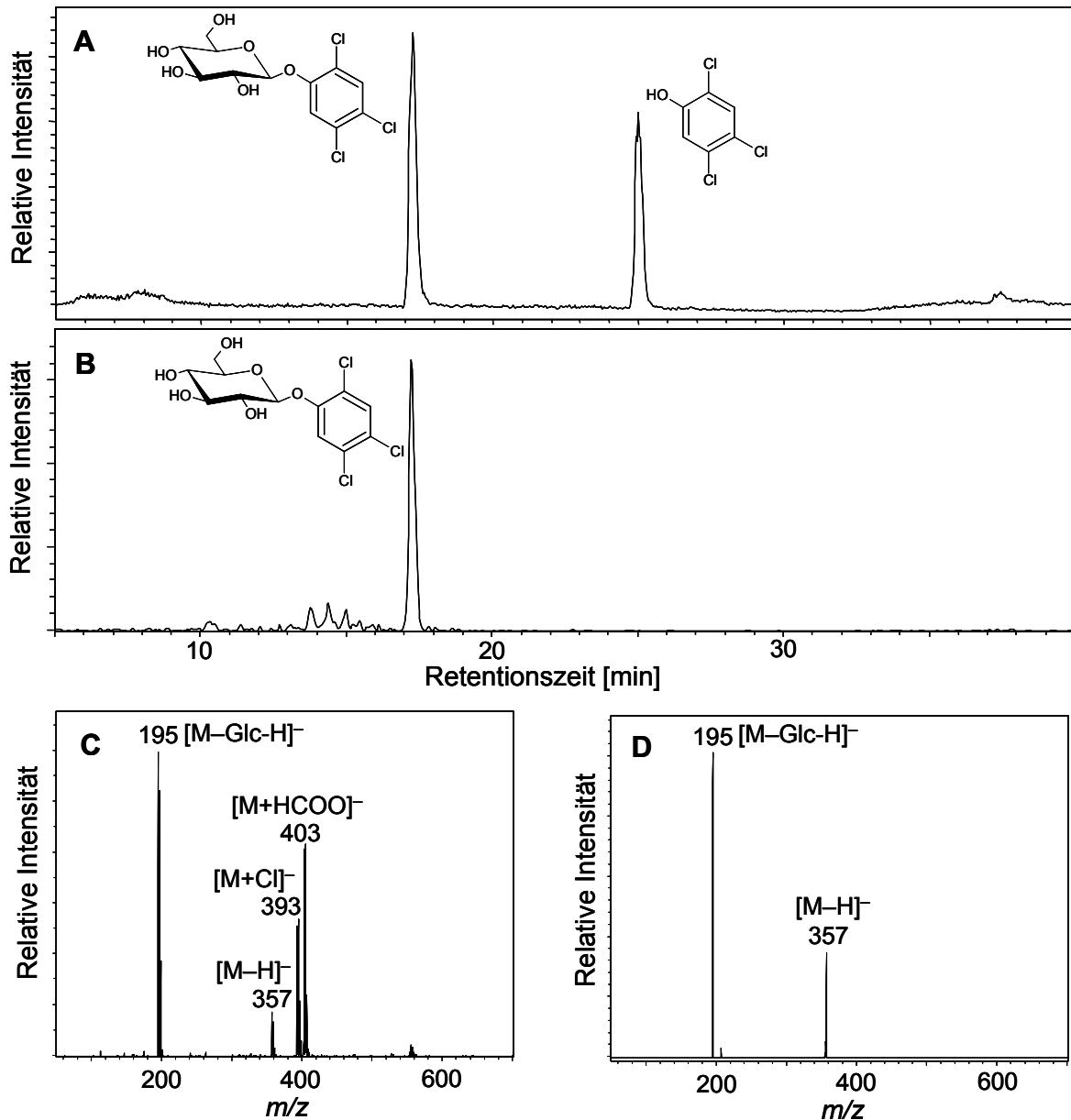


**Abb. B-3:** Michaelis-Menten-Diagramm der Enzymkinetik von FaGT2 mit (*E*)-3-(2-Furyl)acrylsäure. Es wurde die Geschwindigkeit  $V$  für 6 verschiedene Substratkonzentrationen (0,02 bis 4 mM) bei 5 mM UDP-Glucose je zweimal bestimmt und durch hyperbolische Regression ausgewertet. Die Kennzahlen  $K_m$  und  $V_{max}/2$  sind aus dem Diagramm ersichtlich.

Die Identität der gebildeten Verbindungen wurde bestätigt, indem Assays mit unmarkierter UDP-Glucose durchgeführt und mittels HPLC-ESI-MS/MS analysiert wurden (Abb. B-4 und Tab. B-2). Gegenüber entsprechenden Blindproben zeigten die UV- und Ionenchromatogramme die Entstehung der Produkte an. Aufgrund der höheren



Polarität der glucosidischen Verbindungen ist deren Retentionszeit generell kürzer als die der Aglycone mit Ausnahme von Nicotinsäure, die unter den chromatographischen Bedingungen nicht retentiert wurde. Bei den meisten Glucoseestern und



**Abb. B-4:** HPLC-ESI-MS/MS-Analyse von Inkubationen der FaGT2 mit 2,4,5-Trichlorphenol (TCP). Im Totalionenchromatogramm eines Enzymassays von FaGT2 mit TCP sind die Signale von Ausgangsprodukt und Glucosid zu sehen (A). Das Massenchromatogramm ( $m/z$  403+405) des glucosidischen Extraktes aus einer Erdbeere, die mit TCP behandelt wurde, bestätigt die Bildung *in planta* (B). Im Full-Scan-Massenspektrum von TCP-Glucosid ist das Isotopenmuster, das auf die Cl-Atome im TCP-Molekül zurückzuführen ist, deutlich erkennbar (C). Aufgrund der schwachen glucosidischen Bindung entsteht durch den Ionisierungsprozess das Fragment  $[M-Glc-H]^-$ . Das Produktionenspektrum von TCP-Glucosid-Ameisensäure-Addukt  $[M+HCOO]^-$  ( $m/z$  403) zeigt das Pseudomolekülion  $[M-H]^-$  und das um eine Glucose-Einheit verringerte Fragment  $[M-Glc-H]^-$  (D).

Glucosiden erwies sich negative Ionisierung als erfolgreich und resultierte in der Bildung der einfach deprotonierten Ionen  $[M-H]^-$  und der Addukte  $[M+Cl]^-$  und  $[M+HCOO]^-$ . Lediglich Nicotinsäure, Crotonsäure und 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanon (DMHF) erzielten höhere Ionenausbeuten im positiven Modus und wurden als  $[M+H]^+$  und  $[M+Na]^+$  detektiert. Aufgrund der relativ schwachen glucosidischen bzw. Ester-Bindung wurden die Produkte zum Teil bereits bei der Ionisierung fragmentiert und im Full-Scan-Modus als  $[M-Glc-H]^-$  nachgewiesen. In allen Fällen wurden aber die primär gebildeten Ionen auch in MS/MS-Experimenten untersucht. Die dabei gewonnenen Massenspektren zeigten jeweils den Verlust einer Glucose-Einheit und bestätigten somit die Identität der glucosidischen Verbindungen (Abb. B-4).

Zimtsäure, ein natürliches Substrat der FaGT2, wies einen  $K_m$ -Wert von 0,73 mM, einen  $V_{max}$ -Wert von 6,43 nkat/mg und einen  $k_{cat}/K_m$ -Wert von 0,572 1/(s mM) auf. 4-Chlor-Zimtsäure ist dieser Referenzverbindung strukturell sehr ähnlich, ist aber mit einem elektronegativen Chlor-Atom substituiert. Diese Veränderung bewirkte, dass die Substrataffinität etwas anstieg ( $K_m=0,58$  mM), die maximale Reaktionsgeschwindigkeit jedoch stark abnahm ( $V_{max}=3,23$  nkat/mg).

In früheren Versuchen war gezeigt worden, dass FaGT2 Benzoesäure und deren Derivate glucosyliert, wenn diese in *m*- und *p*-Position substituiert sind. In den hier durchgeführten Assays wurde jedoch auch die *o*-substituierte Anthranilsäure (*o*-Aminobenzoesäure) mit niedriger katalytischer Effizienz (0,035 1/(s mM)) umgesetzt. Sterische Effekte zwischen Amino- und Säuregruppe verringerten wahrscheinlich die Aktivität, inhibierten sie aber nicht vollständig.

Zudem katalysierte FaGT2 die Bildung eines S-Glucoseesters. Thiobenzoesäure wurde durch präparative HPLC von Verunreinigungen mit Benzoesäure befreit und anschließend in Enzymassays eingesetzt. Die Aktivität war dabei sehr niedrig, und der  $K_m$ -Wert von 8,37 mM belegt eine sehr geringe Substrataffinität. Die Analyse des Produktes wurde dadurch erschwert, dass ein Großteil des Thioesters bereits beim Ionisierungsprozess zerbrach (Tab. B-2). Außerdem wurde gleichzeitig im Aglycon das Schwefelatom durch Sauerstoff ausgetauscht, sodass das Benzoesäure-Anion mit der Masse  $m/z$  121 entstand. Als Kontrolle wurde daher auch Benzoesäure-glucoseester enzymatisch synthetisiert und unter den gleichen Bedingungen analysiert. Da beide Glucoseester zu unterschiedlichen Zeiten eluierten und unterschiedliche Pseudomolekülonen bildeten, konnte die Entstehung von Thiobenzoesäure-S-glucoseester bestätigt werden.

**Tab. B-1:** Relative Aktivitäten, kinetische Daten und Strukturformeln der mit FaGT2 umgesetzten Substrate. (n. v. = Daten nicht vorhanden)

Substrat	Relative Aktivität [%]	$K_m$ [mM]	$V_{max}$ [nkat/mg]	$k_{cat}/K_m$ [1/(s mM)]	Strukturformel
Zimtsäure	100	0,73 ± 0,04	6,43 ± 0,11	0,57	
2,4,5-Trichlorphenol	225	1,14 ± 0,18	26,32 ± 1,92	1,49	
(E)-3-(2-Furyl)-acrylsäure	94	1,33 ± 0,07	12,96 ± 0,26	0,63	
Sorbinsäure	126	3,23 ± 0,22	18,20 ± 0,69	0,37	
4-Chlorzimtsäure	56	0,58 ± 0,08	3,23 ± 0,13	0,36	
3,5-Dichlor-4-hydroxybenzoesäure	102	2,85 ± 1,40	10,44 ± 3,29	0,24	
(E)-3-(3-Pyridyl)-acrylsäure	9	0,93 ± 0,16	0,63 ± 0,04	0,044	
Anthranilsäure	11	2,74 ± 1,35	1,46 ± 0,46	0,035	
(E)-2-Hexensäure	12	5,76 ± 1,06	2,36 ± 0,29	0,027	
Nicotinsäure	5	2,75 ± 0,20	0,78 ± 0,03	0,018	
Thiobenzoessäure	n. v.	8,37 ± 2,36	2,04 ± 0,48	0,016	
(E)-3-Hexensäure	4		n. v.		
Crotonsäure	3		n. v.		
(E,E)-Muconsäure	1		n. v.		
DMHF	0,5		n. v.		

**Tab. B-2:** HPLC-ESI-MS/MS-Daten, die durch Analyse der Assays mit FaGT2 und nach Applikation *in planta* gewonnen wurden. Es sind für jedes Substrat die Retentionszeiten und molaren Massen des Aglycons und der glucosylierten Verbindung angegeben sowie die relativen Häufigkeiten der Ionen, die bei MS und MS/MS-Experimenten detektiert wurden. Bei chlorhaltigen Verbindungen wurden nur die <sup>35</sup>Cl-Verbindungen berücksichtigt.

Substrat	R <sub>t</sub> [min]	M <sub>w</sub>	MS-Daten	MS/MS-Daten
Zimtsäure	19,1	148	<i>m/z</i> 355 [M+HCOO] <sup>-</sup> 100	MS/MS von <i>m/z</i> 355: <i>m/z</i> 309 [M-H] <sup>-</sup> 100 <i>m/z</i> 207 [Glucose-CO] <sup>-</sup> 60 <i>m/z</i> 147 [M-Glc-H] <sup>-</sup> 27
	14,9	310	<i>m/z</i> 345 [M+Cl] <sup>-</sup> 52 <i>m/z</i> 309 [M-H] <sup>-</sup> 37 <i>m/z</i> 147 [M-Glc-H] <sup>-</sup> 35	
2,4,5-Trichlorphenol	25,0	196	<i>m/z</i> 403 [M+HCOO] <sup>-</sup> 68	MS/MS von <i>m/z</i> 403 <i>m/z</i> 195 [M-Glc-H] <sup>-</sup> 100 <i>m/z</i> 357 [M-H] <sup>-</sup> 34
	17,3	358	<i>m/z</i> 393 [M+Cl] <sup>-</sup> 43 <i>m/z</i> 357 [M-H] <sup>-</sup> 15 <i>m/z</i> 195 [M-Glc-H] <sup>-</sup> 100	
<i>(E)</i> -3-(2-Furyl)-acrylsäure	16,5	138	<i>m/z</i> 345 [M+HCOO] <sup>-</sup> 100	MS/MS von <i>m/z</i> 345: <i>m/z</i> 299 [M-H] <sup>-</sup> 100 <i>m/z</i> 207 [Glucose-CO] <sup>-</sup> 58 <i>m/z</i> 137 [M-Glc-H] <sup>-</sup> 51
	12,5	300	<i>m/z</i> 335 [M+Cl] <sup>-</sup> 97 <i>m/z</i> 299 [M-H] <sup>-</sup> 38 <i>m/z</i> 137 [M-Glc-H] <sup>-</sup> 48	
Sorbinsäure	16,5	112	<i>m/z</i> 319 [M+HCOO] <sup>-</sup> 100	MS/MS von <i>m/z</i> 319: <i>m/z</i> 207 [Glucose-CO] <sup>-</sup> 100 <i>m/z</i> 273 [M-H] <sup>-</sup> 49 <i>m/z</i> 161 [Glucose-H <sub>2</sub> O-H] <sup>-</sup> 10 <i>m/z</i> 111 [M-Glc-H] <sup>-</sup> 9
	12,5	274	<i>m/z</i> 309 [M+Cl] <sup>-</sup> 69 <i>m/z</i> 273 [M-H] <sup>-</sup> 17 <i>m/z</i> 111 [M-Glc-H] <sup>-</sup> 13	
4-Chlorzimtsäure	21,6	182	<i>m/z</i> 389 [M+HCOO] <sup>-</sup> 100	MS/MS von <i>m/z</i> 389: <i>m/z</i> 343 [M-H] <sup>-</sup> 100 <i>m/z</i> 181 [M-Glc-H] <sup>-</sup> 47 <i>m/z</i> 161 [Glucose-H <sub>2</sub> O-H] <sup>-</sup> 16
	17,0	344	<i>m/z</i> 343 [M-H] <sup>-</sup> 59 <i>m/z</i> 379 [M+Cl] <sup>-</sup> 27 <i>m/z</i> 181 [M-Glc-H] <sup>-</sup> 52	
3,5-Dichlor-4-hydroxybenzoesäure	17,6	206	Glucoseester: <i>m/z</i> 367 [M-H] <sup>-</sup> 100	MS/MS von <i>m/z</i> 367 (Glucoseester): <i>m/z</i> 205 [M-Glc-H] <sup>-</sup> 100 <i>m/z</i> 247 [unbekannt] <sup>-</sup> 28 <i>m/z</i> 161 [Glucose-H <sub>2</sub> O-H] <sup>-</sup> 21
	12,6/13,4 (Glucosid/ Ester)	368		
<i>(E)</i> -3-(3-Pyridyl)-acrylsäure	3,8	149	<i>m/z</i> 346 [M+Cl] <sup>-</sup> 100	MS/MS von <i>m/z</i> 346: <i>m/z</i> 148 [M-Glc-H] <sup>-</sup> 100 <i>m/z</i> 197 [Glc+Cl] <sup>-</sup> 69
	3,0	311	<i>m/z</i> 148 [M-Glc-H] <sup>-</sup> 16	
Anthranilsäure	14,3	137	<i>m/z</i> 334 [M+Cl] <sup>-</sup> 100	MS/MS von <i>m/z</i> 334: <i>m/z</i> 136 [M-Glc-H] <sup>-</sup> 100 <i>m/z</i> 298 [M-H] <sup>-</sup> 86
	10,9	299	<i>m/z</i> 344 [M+HCOO] <sup>-</sup> 37 <i>m/z</i> 298 [M-H] <sup>-</sup> 17 <i>m/z</i> 136 [M-Glc-H] <sup>-</sup> 28	
<i>(E)</i> -2-Hexensäure	17,8	114	<i>m/z</i> 321 [M+HCOO] <sup>-</sup> 100	MS/MS von <i>m/z</i> 321: <i>m/z</i> 207 [Glucose-CO] <sup>-</sup> 100 <i>m/z</i> 275 [M-H] <sup>-</sup> 37 <i>m/z</i> 161 [Glucose-H <sub>2</sub> O-H] <sup>-</sup> 9 <i>m/z</i> 113 [M-Glc-H] <sup>-</sup>
	13,5	276	<i>m/z</i> 311 [M+Cl] <sup>-</sup> 57 <i>m/z</i> 275 [M-H] <sup>-</sup> 13 <i>m/z</i> 113 [M-Glc-H] <sup>-</sup> 7	
Nicotinsäure	2,9	123	<i>m/z</i> 286 [M+H] <sup>+</sup> 19	MS/MS von <i>m/z</i> 286: <i>m/z</i> 124 [M-Glc-H] <sup>+</sup> 100
	4,0	285	<i>m/z</i> 124 [M-Glc-H] <sup>+</sup> 100	

## Fortsetzung von Tabelle B-2

Thiobenzoesäure	22,7 15,6	138 300	$m/z$ 299 [M-H] <sup>-</sup> 28 $m/z$ 335 [M+Cl] <sup>-</sup> 22 $m/z$ 121 [Benzoestr-H] <sup>-</sup> 100	MS/MS von $m/z$ 299: $m/z$ 121 [Benzoestr-H] <sup>-</sup> 100
( <i>E</i> )-3-Hexensäure	17,1 13,3	114 276	$m/z$ 321 [M+HCOO] <sup>-</sup> 100 $m/z$ 311 [M+Cl] <sup>-</sup> 78 $m/z$ 275 [M-H] <sup>-</sup> 31 $m/z$ 113 [M-Glc-H] <sup>-</sup> 7	MS/MS von $m/z$ 321: $m/z$ 275 [M-H] <sup>-</sup> 100 $m/z$ 207 [Glucose-CO] <sup>-</sup> 72 $m/z$ 113 [M-Glc-H] <sup>-</sup> 49 $m/z$ 161 [Glucose-H <sub>2</sub> O-H] <sup>-</sup> 46
Crotonsäure	10,2 6,1	86 248	$m/z$ 271 [M+Na] <sup>+</sup> 100 $m/z$ 87 [M-Glc-H] <sup>-</sup> 6	MS/MS von $m/z$ 271: $m/z$ 185 [Glc+Na] <sup>+</sup> 100
( <i>E,E</i> )-Muconsäure	9,6 6,2	142 304	$m/z$ 361 [M-H+Na+Cl] <sup>-</sup> 100 $m/z$ 371 [M-H+Na+HCOO] <sup>-</sup> 100 $m/z$ 339 [M+Cl] <sup>-</sup> 61 $m/z$ 303 [M-H] <sup>-</sup> 61 $m/z$ 141 [M-Glc-H] <sup>-</sup> 78	MS/MS von $m/z$ 303: $m/z$ 141 [M-Glc-H] <sup>-</sup> 100
DMHF	9,8 8,6	128 290	$m/z$ 313 [M+Na] <sup>+</sup> 100 $m/z$ 129 [M-Glc+H] <sup>+</sup> 11	MS/MS von $m/z$ 313: $m/z$ 185 [Glc+Na] <sup>+</sup> 100 $m/z$ 151 [M-Glc+Na] <sup>+</sup> 72 $m/z$ 285 [unbekannt] <sup>+</sup> 49

(*E*)-3-(3-Pyridyl)-acrylsäure enthält wie Zimtsäure eine Carboxylgruppe in Konjugation zu einer Doppelbindung, besitzt aber eine heterocyclische Struktur mit einem basischen Stickstoffatom. Trotzdem wurde im Assay der entsprechende Glucoseester gebildet. Der  $K_m$ -Wert (0,93 mM) weist auf eine relativ hohe Substrataffinität hin, der Quotient  $k_{cat}/K_m$  (0,055 1/(s mM)) jedoch auf eine niedrige katalytische Effizienz. Auch Nicotinsäure, deren Struktur ähnlich zu Benzoessäure keine konjugierende Vinyleneinheit aufweist, wurde durch FaGT2 glucosyliert. Offenbar benötigt das Substrat keine benzyliche Grundstruktur, um vom Enzym akzeptiert zu werden. Diese Annahme konnte bestätigt werden, nachdem (*E*)-3-(2-Furyl)-acrylsäure in Enzymassays eingesetzt wurde. Die katalytische Effizienz lag für diese Verbindung mit 0,633 1/(s mM) sogar höher als die für Zimtsäure, obwohl eine Furyleinheit vorliegt. Dies führte zu der Annahme, dass Doppelbindungen in Konjugation zur Carboxylgruppe eine wichtigere Rolle für die Substratakzeptanz spielen als eine Benzyleinheit.

Aus diesem Grund wurden Assays mit Sorbinsäure ((*E,E*)-2,4-Hexadiensäure) durchgeführt. Überraschenderweise wurde dieses Substrat mit einer dreimal so hohen Maximalgeschwindigkeit mit Glucose konjugiert wie Zimtsäure. Obwohl die Substrataffinität mit einem  $K_m$ -Wert von 3,23 mM niedriger lag, betrug die katalytische Effizienz dennoch 0,366 1/(s mM).

Dagegen wies (*E*)-2-Hexensäure, die lediglich eine konjugierende Doppelbindung enthält, eine deutlich geringere katalytische Effizienz von 0,027 1/(s mM) auf. Die isomere (*E*)-3-Hexensäure, bei der keine Konjugation möglich ist, wurde noch schlechter umgesetzt. Auch mit der kürzerkettigen Crotonsäure ((*E*)-2-Butensäure) sowie mit Muconsäure ((*E,E*)-2,4-Hexadiensäure) wurden nur geringe Aktivitäten (weniger als 5 % im Vergleich zu Zimtsäure) beobachtet.

#### 1.4 Glucosylierung von Umweltkontaminanten

Die im vorangegangenen Abschnitt beschriebene niedrige Substratspezifität gegenüber natürlichen und unnatürlichen Substraten legte es nahe, dass FaGT2 auch Xenobiotika umsetzt, die durch anthropologische Aktivitäten in die Umwelt gelangen. Daher wurden Enzymassays mit dem DDT-Metaboliten DDA (2,2-Bis-(4-chlorphenyl)-essigsäure) und den Herbiziden 2,4-D (2,4-Dichlorphenoxyessigsäure) und TCP (2,4,5-Trichlorphenol) durchgeführt. Zudem wurde 3,5-Dichlor-4-hydroxybenzoesäure eingesetzt, da sie die analoge Verbindung zu 3,5-Dibrom-4-hydroxybenzoesäure darstellt, einem Metaboliten des Herbizids Bromoxynil.

DDA und 2,4-D besitzen zwar strukturelle Ähnlichkeiten zu den anderen akzeptierten Substraten und enthalten eine Carboxylgruppe, wurden von FaGT2 aber nicht glucosyliert. Wahrscheinlich verhinderten die Molekülgrößen den Einbau in das aktive Zentrum des Enzyms.

Im Gegensatz dazu reagierte 3,5-Dichlor-4-hydroxybenzoesäure mit großer katalytischer Effizienz (0,24 1/(s mM)). Die Substrataffinität war zwar niedriger als die von Zimtsäure, die Maximalgeschwindigkeit jedoch höher. Bei der Analyse mittels HPLC-ESI-MS/MS ergaben sich zwei Signale zu unterschiedlichen Retentionszeiten, aber mit gleichem Pseudomolekülion ( $m/z$  367), das rechnerisch der Kondensation eines Glucosemoleküls mit dem Substrat entspricht. Dies wies darauf hin, dass neben der Carboxygruppe auch die Hydroxygruppe glucosyliert wurde. Daher ist der Reaktionsansatz mit 0,1 M NaOH inkubiert worden, um spezifisch den Glucoseester zu spalten (Jackson et al., 2001). Die Analyse ergab, dass der größere Peak (100 % relative Fläche im Totalionenchromatogramm) verschwand, während der kleinere Peak (11 % relative Fläche) verblieb. FaGT2 bildete mit 3,5-Dichlor-4-hydroxybenzoesäure also sowohl den Glucoseester als auch das O-Glucosid. Das Diglucosid wurde aber nicht detektiert.

TCP wurde von allen getesteten Substraten am effektivsten glucosyliert. Der  $K_m$ -Wert lag mit 1,14 mM nur geringfügig über dem von Zimtsäure, während die Maximalgeschwindigkeit (26,32 nkat/mg) viermal und die katalytische Effizienz (1,49 1/s mM) dreimal so groß waren. FaGT2, das sonst fast ausschließlich Säuregruppen mit Glucose veresterte, katalysierte demnach sehr effizient die Bildung eines O-Glucosides. Die phenolische Struktur von TCP bewirkt eine relativ hohe Azidität der Hydroxygruppe, die die Reaktivität erklären könnte.

### 1.5 Glucosylierung von 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3[2H]-furanon

Da FaGT2 neben Carboxy- auch azide Hydroxygruppen glucosylierte, wurde in einem weiteren Versuch 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3[2H]-furanon (DMHF), die Hauptkomponente des Erdbeeraromas, eingesetzt. Diese Verbindung enthält eine schwach saure Hydroxygruppe, die durch Keto-Enol-Tautomerie stabilisiert wird. Tatsächlich wurde auch DMHF glucosyliert, allerdings nur mit weniger als 1 % relative Aktivität. Die unerwartete Bildung des DMHF-Glucosids wurde durch Abgleich der chromatographischen und massenspektrometrischen Daten mit der Referenzverbindung bestätigt.

### 1.6 Bildung glucosidischer Verbindungen *in planta*

Alle Substrate, die FaGT2 *in vitro* glucosylierte, wurden in frische, reife Erdbeeren injiziert und 24 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend sind die Erdbeeren homogenisiert und die glucosidischen Verbindungen mittels Festphasenextraktion in Methanol extrahiert worden. Die Extrakte wurden unter den gleichen Bedingungen wie die Enzymassays mit HPLC-ESI-MS/MS analysiert (Abb. B-4B). Eine Erdbeere, die mit Wasser behandelt worden war, diente als Kontrolle.

Die Glucoseester bzw. Glucoside aller Substrate mit Ausnahme von Thiobenzoessäure und Furaneol wurden auch in der Erdbeere gebildet. Thiobenzoyl-S-glucoseester konnte vermutlich nicht nachgewiesen werden, weil die Verbindung aufgrund ihrer Instabilität schnell weiter reagiert. Außerdem war es in diesem Experiment nicht möglich, die Bildung von DMHF-Glucosid nachzuweisen, da sowohl das Substrat als auch das Glucosid bereits in sehr hohen Mengen in unbehandelten Erdbeeren enthalten ist.

## 1.7 Diskussion

### 1.7.1 Strukturelle Gemeinsamkeiten der Substrate

FaGT2 akzeptierte eine sehr breite Auswahl strukturell unterschiedlicher Substrate und bildete *O*- und *S*-Glucoseester sowie *O*-Glucoside. Eine solche Bandbreite von Substraten wurde bisher von keiner in der Literatur beschriebenen Pflanzen-Glucosyltransferase umgesetzt. Im Vergleich zu den natürlichen Substraten Zimt- und *p*-Cumarsäure waren auch größere Veränderungen in der Struktur möglich, wie verschiedene Substitutionen des aromatischen Ringes (4-Chlorzimtsäure und 3,5-Dichlor-4-hydroxy-zimtsäure), eine heterocyclische statt benzyliche Struktur ((*E*)-3-(3-Pyridyl)-acrylsäure, (*E*)-3-(2-Furyl)-acrylsäure und Nicotinsäure) und eine aliphatische Struktur (Sorbin- und (*E*)-2-Hexensäure). (*E*)-3-Hexensäure, Crotonsäure, (*E,E*)-Muconsäure und DMHF wurden dagegen wesentlich schlechter umgesetzt. Außerdem bildete FaGT2 den *S*-Glucoseester von Thiobenzoessäure und war äußerst aktiv in der Glucosylierung der phenolischen Verbindung TCP.

Der Vergleich der Substrate, die mit hoher Effizienz reagierten, zeigt, dass Sorbinsäure die Verbindung mit der einfachsten chemischen Struktur darstellt. Diese Säure könnte somit das grundlegende Strukturelement beinhalten, das vom aktiven Zentrum des Enzyms erkannt wird. Dies stünde im Einklang mit der These, dass viele Glycosyltransferasen eher regiospezifisch als substratspezifisch reagieren (Vogt und Jones, 2000).

Andererseits unterscheidet sich TCP deutlich von dieser Grundstruktur und wurde trotzdem mit der größten katalytischen Effizienz umgesetzt. Allen Substraten ist aber gemeinsam, dass sie ein saures Proton besitzen und die entsprechenden Anionen durch Konjugation mit einem  $\pi$ -Elektronensystem stabilisieren können. Dementsprechend nimmt die Aktivität von Sorbinsäure über (*E*)-2-Hexensäure zu (*E*)-3-Hexensäure mit der geringeren Fähigkeit zur Konjugation stark ab. Es wird daher vermutet, dass die Konjugation der negativen Ladung der Carboxy- und Hydroxy-Anionen entscheidend dafür ist, dass Glucose-Einheiten effizient auf sie übertragen werden können. Dies unterstützt die Annahme, dass Glucosyltransferasen nicht nur regiospezifisch, sondern auch chemoselektiv reagieren (Meßner et al., 2003), und erklärt das breite Spektrum akzeptierter Substrate.



### 1.7.2 Bedeutung von FaGT2 in der Aromabiosynthese

FaGT2 ist *in vivo* verantwortlich für die Bildung von Zimtsäure- und *p*-Cumar-säureglucoseester (Lunkenbein et al., 2006a). Das erstgenannte Produkt könnte als aktiviertes Substrat einer 1-*O-trans*-Cinnamoyl- $\beta$ -D-glucopyranose:Alkohol-Cinnamoyltransferase fungieren, die Cinnamate auf kurz-kettige Alkohole wie Methanol und Ethanol überträgt. Ein derartiges Enzym aus der Kapstachelbeere, das die Aromakomponenten Ethyl- und Methylcinnamat bildet, wurde von Latza und Berger (1997) beschrieben. Wie der Glucoseester von Zimtsäure könnten auch die Konjugate von (*E*)-2-Hexensäure und Nicotinsäure die Präkursoren von Ethyl-2-hexenoat, Methyl-2-hexenoat und Methylnicotinat sein, die alle als Bestandteile des Erdbeeraromas beschrieben sind (Gomes da Silva and Chaves das Neves, 1999; Aubert et al., 2005; Lunkenbein et al., 2006b). Einige wichtige Ester der Erdbeerfrucht werden aus einer Vielzahl von Acyl-CoAs und Alkoholen von der *Strawberry Acyl Alcoholtransferase* (SAAT) gebildet (Aharoni et al., 2000). Es ist aber ungeklärt, ob auch die Hexenoate und Methylnicotinat von diesem Enzym synthetisiert werden können, und ob die entsprechenden Substrat-CoAs in der Erdbeerfrucht vorhanden sind.

In den Enzymassays entstand auch Anthranilsäureglucoseester, wenngleich mit relativ geringer Geschwindigkeit. Diese Verbindung könnte ebenfalls in einer Transferase-Reaktion zu Methylanthranilat reagieren, das für das typische Aroma der Wilderdbeere (*Fragaria vesca*) verantwortlich ist, aber auch in einigen Sorten der kultivierten Erdbeere (*Fragaria x ananassa*) nachgewiesen wurde (Ulrich et al., 1997; Aubert et al., 2005). In *Vitis labrusca* wird die Biosynthese von Methylanthranilat wahrscheinlich von einer Alkoholacyltransferase katalysiert, die Anthranoyl-CoA mit Methanol konjugiert (Wang und De Luca, 2005). In der Erdbeere wurde bisher kein äquivalentes Enzym charakterisiert. Andererseits stellt Anthranilsäureglucoseester die Speicherform von Anthranilat dar, das eine Vorstufe in der Tryptophan-Biosynthese ist. In *Arabidopsis thaliana* sind mindestens zwei UDP-Glucosyltransferasen, UGT74F1 and UGT74F2, für die Akkumulation dieses Esters *in vivo* verantwortlich (Quiel und Bender, 2003). Ähnlich wie FaGT2 glucosylierten diese Enzyme jedoch auch eine Reihe von Benzoesäure-Derivaten *in vitro* (Lim et al., 2002).

Die Schlüsselverbindung des Erdbeeraromas, DMHF, wurde von FaGT2 glucosyliert. In der Erdbeerfrucht liegt ein großer Teil des DMHF als Glucosid vor (Wintoch et al.,

1991; Roscher et al., 1996). Bisher ist kein Enzym beschrieben worden, das die Bildung dieses Glucosids katalysiert. Da die Erdbeere eine hohe Konzentration an freiem DMHF enthält, ist es wahrscheinlich, dass ein Teil des DMHF-Glucosids von FaGT2 gebildet wird, auch wenn die Bildung *in vitro* nur langsam abläuft. Diese Annahme wird zusätzlich dadurch gestützt, dass sowohl die Bildung des Glucosids als auch die Expression von FaGT2 reifekorreliert sind (Groyne et al., 1999; Lunkenbein et al., 2006a).

### 1.7.3 Bedeutung von FaGT2 als Entgiftungsenzym

Die breite Substratspezifität von FaGT2 ist nicht auf natürliche Verbindungen beschränkt, sondern wurde auch für eine Reihe von Xenobiotika *in vitro* und *in planta* nachgewiesen. Meßner und Mitarbeiter (2003) zeigten, dass sechs Glucosyltransferasen aus *Arabidopsis thaliana* TCP in Enzymassays glucosylieren. Zwei der getesteten Enzyme, UGT84A1 und UGT84A2, sind der FaGT2 relativ ähnlich in Bezug auf Aminosäuresequenz und Substratspezifität (Lunkenbein et al., 2006a). Sie gehören ebenfalls zu den Glucosyltransferasen der Gruppe L, in der sich überwiegend Ester-bildende Enzyme finden (Li et al., 2001). Das beste Substrat von UGT84A1 *in vitro* war *p*-Cumarsäure, während UGT84A2 besonders effizient Sinapinsäure-Glucoseester bildete (Lim et al., 2001). Bei Enzymassays mit TCP lagen bei allen sechs Enzymen die  $K_m$ -Werte zwischen 0,11 und 1,25 mM, und die katalytische Effizienz betrug zwischen 0,10 und 2,1 1/(s mM) (Meßner et al., 2003). Die kinetischen Parameter von FaGT2 sind sehr ähnlich und bewegen sich am oberen Ende dieser Bereiche.

Neben TCP wurde 3,5-Dichlor-4-hydroxybenzoesäure von FaGT2 effizient glucosyliert. In Pflanzen besteht eine Möglichkeit zur Metabolisierung des Herbizids Bromoxynil darin, es zunächst zu 3,5-Dibromo-4-hydroxybenzoesäure abzubauen und anschließend zu glucosylieren, wie es in *Hordeum vulgare*, *Stellaria media* und *Arabidopsis thaliana* (Schaller et al., 1992 und Meßner et al., 2003) nachgewiesen wurde. Aufgrund der breiten Substratspezifität von FaGT2 kann davon ausgegangen werden, dass es auch diese Verbindung mit Glucose konjugiert.

Eines der in den Assays am besten umgesetzten Substrate war Sorbinsäure. Diese Verbindung kommt nicht natürlich vor und wird in der Lebensmittelindustrie vielfach als Konservierungsmittel verwendet. Die Bildung von Sorbinsäure-Glucoseester wurde hier zum ersten Mal nachgewiesen.

Die tatsächliche Aktivität von Enzymen *in vivo* hängt stark davon ab, ob Substrat und Enzym überhaupt in Kontakt kommen. Kompartimentierung spielt also eine entscheidende Rolle bei der Steuerung von Enzymaktivitäten. Allerdings nimmt diese Trennung in der Erdbeerfrucht in den späten Reifestadien ab, da die Zellwände kollabieren und die Enzyme einer Vielzahl von kompetitierenden Substraten ausgesetzt sind. Meßner und Mitarbeiter (2003) haben mit den zuvor erwähnten Glucosyltransferasen kompetitive Enzymassays durchgeführt und gleichzeitig mit TCP und ihren endogenen Substraten inkubiert. Dabei nahm die Glucosylierung von TCP im Vergleich zu Ein-Substrat-Assays deutlich ab. Allerdings war FaGT2 im Gegensatz zu den Enzymen aus *Arabidopsis thaliana* deutlich aktiver mit TCP verglichen mit dem originären Substrat. Es würde daher vermutlich weniger stark an Aktivität in kompetitiven Assays verlieren. Zudem wurde nachgewiesen, dass fast alle Substrate auch in Erdbeerfrüchten glucosyliert werden, trotz Kompartimentierung und trotz Konkurrenz zu anderen, natürlichen Substraten. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass an der Reaktion neben FaGT2 weitere Glucosyltransferasen beteiligt waren. Die *in vitro*-Daten lassen aber eine Beteiligung des Enzyms an Entgiftungsreaktionen als sehr wahrscheinlich erscheinen. Gestützt wird dies von Expressionsdaten aus früheren Arbeiten, die eine Hochregulation der Expression unter oxidativem Stress nachwiesen (Aharoni et al., 2002; Lunkenbein et al., 2006a). Diese Abhängigkeit ist für Enzyme typisch, die in die Abwehr und Detoxifizierung involviert sind, wie beispielsweise Glutathion-S-transferasen (Marrs, 1996; Lamb und Dixon, 1997). Es ist bekannt, dass Glucosyltransferasen, die durch Stress induziert werden, tendenziell eine geringere Substratspezifität aufweisen. Bisher wurden aber erst wenige dieser Enzyme auf ihre Fähigkeit überprüft, auch Xenobiotika zu glucosylieren. Zwei Enzyme aus Tabak zeigten Aktivität gegenüber Naphtholen und einer Reihe von strukturverwandten Substraten wie Flavonoiden und Cumarinen. Ihre originäre Funktion ist nicht abschließend geklärt, wird aber in der Biosynthese von Scopolin vermutet (Taguchi et al., 2001). Eine andere Glucosyltransferase aus *Arabidopsis* metabolisierte Dichloranilin und TCP *in vivo*. Sie ist aber substratspezifischer als FaGT2 und akzeptierte nur eine natürliche Komponente *in vitro*, 4-Hydroxyphenylbrenztraubensäure. Daher ist die endogene Funktion des Enzyms fraglich (Loutre et al., 2003; Brazier-Hicks und Edwards, 2005). Ein weiteres Enzym der gleichen Pflanze entgiftet das von *Fusarien* gebildete Toxin Deoxynivalenol und wird durch Applikation dieses Mykotoxins und anderer

Signalstoffe in der Pflanze induziert. Trotzdem ist es auch an der Glucosylierung von endogenen Brassinosteroiden beteiligt, die eine Rolle in der Zellentwicklung spielen. Angesichts dieser Reaktionen scheint das Enzym allerdings über eine hohe Substratspezifität zu verfügen (Poppenberger et al., 2003 und 2005). In der Modellpflanze *Arabidopsis* wurden viele weitere stress-induzierte Glucosyltransferasen identifiziert, aber noch nicht charakterisiert (Langlois-Meurinne et al., 2005). Die Untersuchung der Enzyme wird interessante Erkenntnisse über ihre Beteiligung am Stoffwechsel endogener und exogener Substrate liefern.

#### 1.7.4 FaGT2 - ein multifunktionelles Enzym

Die Informationen über die Organisation pflanzlicher Entgiftungsreaktionen sind widersprüchlich. Einige Studien zeigten *in vivo*, dass bestimmte Glucosyltransferasen solche Reaktionen katalysieren, und ließen dabei keine zweite Funktion dieser Enzyme hinsichtlich endogener Substrate erkennen (Brazier-Hicks und Edwards, 2005). Andere Ergebnisse deuten darauf hin, dass Glucosyltransferasen mit einer breiten Substratspezifität für die Umsetzung sowohl von endogenen Substraten als auch von Xenobiotika verantwortlich sind (Meßner et al., 2003). Umfassende Daten, die diese zweifache Wirkungsweise der Enzyme nicht nur *in vitro*, sondern auch *in vivo* bestätigen, liegen bisher nicht vor.

Unter evolutionären Gesichtspunkten scheint es sinnvoll, dass ein Enzym sowohl mit endogenen Sekundärmetaboliten als auch mit exogenen Substraten reagiert. Durch Mutationen verändern sich die Eigenschaften und die Verteilung von Produkten des Sekundärmetabolismus wie z. B. von Aromastoffen häufiger als die des Primärmetabolismus. Für den pflanzlichen Organismus ist es ein ökonomischer und daher evolutionärer Vorteil, wenn nachgeordnete Enzyme wie Glucosyltransferasen auch dann noch ihre Funktionalität mit den neuen Substraten behalten. Dies kann durch eine breite Substratspezifität gewährleistet werden. Gleichzeitig erlaubt diese Flexibilität den Pflanzen, auf neue, exogene und möglicherweise toxische Verbindungen wie Herbizide zu reagieren (Jones und Vogt, 2001).

Die dargestellten Ergebnisse unterstützen die Vermutung, dass Entgiftungsreaktionen von Glucosyltransferasen mit einer Doppelfunktion katalysiert werden. Einerseits wurde nachgewiesen, dass FaGT2 *in vivo* an der Glucosylierung der endogenen Verbindungen Zimtsäure und *p*-Cumarsäure beteiligt ist, andererseits aber auch an der Entgiftung von Xenobiotika *in vitro* und sehr wahrscheinlich *in*

*planta*. Dadurch dass *FaGT2* während der Fruchtreifung zunehmend stark exprimiert wird, ergibt sich für die reife Erdbeerfrucht vermutlich ein vorsorglicher Schutz gegenüber einer großen Bandbreite von Fremdstoffen.

## 2 Terpensynthesen in der Erdbeere

Untersuchungen von Erdbeerfrüchten und –blättern der Wilderdbeere (*Fragaria vesca*) und der kultivierten Erdbeere (*Fragaria x ananassa*) hatten gezeigt, dass darin (R)- und (S)-Linalool in unterschiedlichen Verhältnissen vorkommen (Kap. A.3.5). In den Blättern war dabei ein deutlich höherer Anteil an (R)-Linalool nachgewiesen worden als in den Früchten. Bisher ist lediglich eine (S)-Linaloolsynthese beschrieben. Die Herkunft des (R)-Linalools ist unbekannt (Aharoni et al., 2004). Zunächst wurde basierend auf einer PCR-Strategie versucht, neue Terpensynthesen aus den Blättern von *Fragaria x ananassa* und *Fragaria vesca* zu klonieren, zu exprimieren und deren Produkte zu charakterisieren. Dazu wurden im ersten Schritt degenerierte PCR-Primer entworfen, mit deren Hilfe relevante Fragmente aus cDNA amplifiziert wurden. Davon ausgehend sollte die Volllänge der Gene kloniert werden, um sie in *Escherichia coli* zu exprimieren und ihre korrespondierenden Proteine in Enzymassays umzusetzen. Außerdem wurde das Enzym FvNES heterolog exprimiert, um die Chiralität des damit gebildeten Linalools zu untersuchen. Es stammt aus der Wilderdbeere, in deren Blättern fast enantiomerenreines (R)-Linalool gefunden wurde (Hampel et al., 2006). Es ist zwar bereits bekannt, dass FvNES Linalool bildet, allerdings nicht welches Enantiomer.

### 2.1 Design von degenerierten Primern

Um ein Fragment einer unbekanntes Terpensynthese mittels PCR klonieren zu können, benötigt man zwei Primer, die an charakteristischen Sequenzelementen hybridisieren. Um diese Elemente zu identifizieren, wurden sechs Aminosäuresequenzen von bereits bekannten Terpensynthesen miteinander verglichen. Da das Ziel die Klonierung einer Linaloolsynthese aus der Erdbeere war, dienten dazu einerseits Sequenzen anderer Linaloolsynthesen, um mögliche Ähnlichkeiten im Primer zu berücksichtigen. Dies waren die (R)-Linaloolsynthesen aus *Artemisia annua* und *Mentha citrata* und die (S)-Linaloolsynthese aus *Arabidopsis thaliana* sowie eine Linaloolsynthese mit unbekannter Enantiomerenspezifität aus *Perilla frutescens*. Andererseits wurde eine (E)- $\alpha$ -Farnesensynthese aus *Malus domestica* gewählt, da sich Terpensynthesen in ihren Sequenzen nicht nur ähneln, wenn sie die gleiche Produktspezifität aufweisen, sondern besonders auch dann, wenn sie aus der gleichen Pflanzenfamilie stammen (Bohlmann et al., 1998a). *Malus* gehört

ebenso wie *Fragaria* zur Familie *Rosaceae*. Zusätzlich wurde die bereits bekannte Sequenz der Linalool-/Nerolidol-Synthase FaNES2 aus *Fragaria x ananassa* verwendet (Kap. A.3.5), um weitere Spezies-spezifische Sequenzeigenschaften einzubeziehen. Im Sequenz-Alignment sind mehrere Regionen erkennbar, in denen eine erhöhte Homologie besteht (Abb. B-5).

PfLINS	154	IIEAEEIRDLYFTALGFRLLRQHGFQVSOQVDFCFKNEEGSDFKAR-LGDDTKGLLQLYEASFLREGEDTLELARQVAT	TerpDeg1_FW	TerpDeg5_FW	TerpDeg2_FW
McLINS	156	--NSTKVGDLHFTSLGFRLLRQHGFNVSQGVDFCFKNEHGSDFEKTLLIGEDTKGVLQLYEASFLREGEDTLEVARKFST			
AaLINS	130	FPEKWNKFDLNLKALGFRLLRQHGYHVPEEIFLNFKDKNQN--LNSYLLEDVVGMLNLYEASVHSFDEBSILTFEARDIAT			
MdFAS	120	NLG--TRDDLYGTALHFKLLRQHGYKVSQDIFGRFMDEKGM--LENHFFAHLKGMLELFEASNMGFEGEDILDKAKASLT			
AtLINS	125	---LQFNGDLHEIALRFRLLRQEGHYVQESI FKNILDKKGG--FKDVVKNQVKGLELFEASELRVEGEBETLDGAREFTY			
FaNES2	130	---VSASDDLHEVALRFRLLRQEGYFVPEDEVFNFKDKSGT--FKQVLGEDIKGLMSLYEASQLGTCEEDTLEAEKFFEG			
PfLINS	233	KFLQKKVDHELIDDNNLSWILHSLEIPLHWRIQRLEARWFLD---RYATRRD-MNQIHLLELAKLDFNIIQATQQBELKD			
McLINS	234	EPLEEKIKAG-IDGDNLSSIGHLSLEIPLHWRIQRLEERWFLD---AYSRRKD-MNPILFELAKLDFNIIQATQQBELKD			
AaLINS	208	KYLKAS--LEKIDGS--LSSLVSHALDNLRHWRVPRVESKWFLE---VYKRVG-ASPTLIELAKLDFDMVQAHLLEDLKH			
MdFAS	196	LALRDSGHICYPSN-LSRDVVHSLBLPSEHRRVQWFDVKKWLN---AYEDICRVNATLLELAKLNFNVQAQLKKNLRE			
AtLINS	200	SRDNLCSGRESHQK--QEIMKSLAQPPEKTVRGITSKRRTSMIKTAGQEDPEWLSLLRVAEIDSIRLKSITQGEMSQ			
FaNES2	205	HLLKTSISHLDDHHA--RIVGNILRNPEHKSLSAFMARNEF---VTTQATNSWLLEKDVARTDFNVMVRSLEQNEIVQ			
PfLINS	309	LSRWWKSTCLABKLPFVRDRLVBSYFWAIALFEPHQYGYHRKVAAKIITLITSLDDVYDIYGTLDDELQFTDAIQRWDTE			
McLINS	309	LSRWWNSSLPQKLPFVRDRLVBSYFWALGLFEAHKFGYERKTAAKIITLITLALDDVYDIYGTLDDELQFTHVIRRWDTE			
AaLINS	281	ASRWWKNTSWDTKLTFAARDMLVENEIWTVGSYLNFSHGRTITKVAAMITLDDVYDVFGLGELQFTDVIINRWDIK			
MdFAS	272	ASRWWANLGIADNLKFAARDRLVECAACAVGVAFEPEHSSFRICLTKVINLVLIDDDVYDIYGSSEELKHFTNAVDRWDSR			
AtLINS	277	TFKWWTLEGLEKDEKARSQPLKWHITWSKILQDPTLTQORLDDLTKPISLVYVIDDIDVYGELEELTFTRVVERWDHK			
FaNES2	278	ISKWKKELGLAKELKFAARDQPQKWIIWSMACLTDEKLSSEERVELTKPISFVYVIDDIDVYGTLDLDDLIFLTFEAVNRWEIT			
				TerpDeg3_FW	
PfLINS	389	SLSRLPYMQLPFVVLVNFVSELAYDGLKEKGF-ITIPYLDORSWADLVEAYLKEAKWYNYGVPSMEEYLNNAVISIGAT			
McLINS	389	SATOLPYLQLFVFLVNFVSEVAYHILKEEGF-ISIPFLHRAWVDLVEGYLQEAKWYTKYPTTMEEYLNNAVISITIGAP			
AaLINS	361	AEFOLPYMKICFGLYNSINDITWETLATKGF-LILPYIKRAWADLCKSYLVEAQWHRCHPTLNEYLNDNAVWSISGP			
MdFAS	352	ETBOLPECMKMCQVLYNTTCEIAREIEBENGWNGVLPQLTKVWADFCKALLVEAEWYKNSHPTLLEEYLRNGCITSSSVS			
AtLINS	357	GPKTLPKVMRVCBEALDMITTEISMKIYKSHGW-NPTYALRQSWASLCKAFLVEAKWNSGYLPTTEEYMKNGVSSGVH			
FaNES2	358	AIDHLPDYMKICFKALYDMTNETISCKVYQKHGW-NPLQSLRISWASLCKAFLVEAKWNSGQLPKSKBYLKNGLVSSGVN			
		TerpDeg6_REV		TerpDeg4_REV	

**Abb. B-5:** Ausschnitt aus einem *Alignment* von Proteinsequenzen bekannter Terpensynthesen, die zum Design von degenerierten Primern herangezogen wurden. PfLINS: *Perilla frutescens* Linaloolsynthase (GenBank-Akzessionsnummer AAL38029), McLINS: *Mentha citrata* (R)-Linaloolsynthase (AAL99381), AaLINS: *Artemisia annua* (R)-Linaloolsynthase (AAF13356), MdFAS: *Malus domestica* (E,E)- $\alpha$ -Farnesensynthase (AAO22848), AtLINS: *Arabidopsis thaliana* (S)-Linaloolsynthase (AAO85533), FaNES2: *Fragaria x ananassa* Linalool-/Nerolidolsynthase (CAD57106).

Diese Abschnitte wurden in DNA-Code rückübersetzt (Abb. B-6). Da mehrere DNA-Triplets für die gleiche Aminosäure codieren, entstanden dabei jedoch zu viele variierende Nukleotide. Daher wurden nicht nur die Aminosäure-, sondern auch die Nukleotidsequenzen, die für die Terpensynthesen codieren, herangezogen. Weil nicht alle möglichen Triplets auch tatsächlich in den Sequenzabschnitten vorkommen, reduzierte sich die Zahl der unsicheren Nukleotide deutlich. Auf diese Weise konnten vier verschiedene degenerierte Primer (TerpDeg1 bis 4), also Gemische von Primern mit variierenden Nukleotiden, entworfen werden. Die Sequenzen von TerpDeg5\_FW und TerpDeg6\_REV wurden aus der Literatur

übernommen und ebenfalls für die Amplifizierung unbekannter Terpensynthasen eingesetzt (Steele et al., 1995).

<b>Aminosäuren</b>	D (Asp)	D (Asp)	V (Val) I (Ile)	Y (Tyr) F (Phe)	D (Asp)	V (Val) I (Ile)	Y (Tyr) F (Phe)	G (Gly)
<b>Theoretisch mögliche Triplets</b>	GAT GAC	GAT GAC	GTT GTC GTA GTG ATT ATC ATA	TAT TAC TTT TTC	GAT GAC	GTT GTC GTA GTG ATT ATC ATA	TAT TAC TTT TTC	GGT GGC GGA GGG
<b>Tatsächlich vorkommende Triplets</b>	GAT GAC	GAT GAC	ATT GTC GTT	TAT TAC TTC	GAT	GTT GTC GTG ATT ATC	TAT TTT	GGT GGC GGA GGG
<b>Primer</b>	GA(TC)	GA(TC)	(GA)T(TC)	T(AT)(CT)	GAT	(GA)T(TGC)	T(AT)T	GG

**Abb. B-6:** Herleitung der Sequenz der degenerierten Primer am Beispiel von TerpDeg3\_FW im Bereich des konservierten DDXXD-Motives.

## 2.2 Klonierung und Sequenzanalyse von Terpensynthasen aus *Fragaria x ananassa* und *Fragaria vesca*

Aus Blättern von *Fragaria x ananassa* cv. Senga sengana und *Fragaria vesca* wurde mRNA extrahiert und in cDNA umgeschrieben. Die beiden cDNA-Proben dienten jeweils als Matrize in PCR-Reaktionen, in denen alle möglichen Kombinationen aus vorwärts und rückwärts gerichteten degenerierten Primern eingesetzt wurden. Auf diese Weise gelang zunächst die Amplifizierung jeweils eines 108 bp großen Fragmentes. Dies entsprach der erwarteten Größe eines Terpensynthasen-Abschnittes, da die dabei verwendeten Primer TerpDeg3\_FW und TerpDeg6\_REV einen entsprechenden Bereich einschließen (Abb. B-5). Die potenziell neuen Terpensynthasen wurden entsprechend ihrer Herkunft mit *FaLINS* und *FvLINS* bezeichnet, also *Fragaria x ananassa* bzw. *vesca* Linaloolsynthase.

Der erste Vergleich dieser kurzen Sequenzabschnitte mit der Datenbank GenBank ergab eine fast 100%ige Übereinstimmung mit der (S)-Linalool/Nerolidol-Synthase aus der Erdbeere (*FaNES1/2* bzw. *FvNES*). Trotzdem erschien es unwahrscheinlich, dass es sich um die identischen Transkripte handelte, da in *Northern Blots* gezeigt



worden war, dass diese nicht in den Blättern der kultivierten Erdbeere exprimiert werden (Aharoni et al., 2004). Über die Expression in Blättern von *Fragaria vesca* ist nichts bekannt. Daher wurden durch RACE-PCR zunächst nur von *FaLINS* die fehlenden 3'- und 5'-Enden und schließlich die Volllänge amplifiziert, um mehr Sequenzinformationen zu erhalten. Dazu wurde cDNA des Kultivars Elsanta verwendet, da diese auch die Grundlage der zitierten Expressionsstudien waren.

Als Ergebnis wurde eine Sequenz gewonnen, die auf Aminosäure-Ebene zu 90 % identisch mit den bereits bekannten Erdbeer-Sequenzen ist (s. Abb. B-7). Der größte Unterschied ist im N-terminalen Bereich zu erkennen, wo vergleichsweise viele Aminosäuren verändert sind. So ist statt der  $RR(X)_8P$ -Sequenz, die in *FaNES2* und *FvNES* vorliegt und vermutlich eine leicht abgewandelte Form der Konsensussequenz der Terpensynthasen  $RR(X)_8W$  darstellt, die Abfolge  $RW(X)_8S$  vorhanden. Dieser Sequenzabschnitt wird aber *in vivo* nicht exprimiert, da in der Nukleotidsequenz nach den ersten beiden Triplets ein Stopp-Codon folgt. Dadurch kann die Transkription erst ab dem Codon für das zweite Methionin (Met2) ablaufen, sodass das resultierende Protein in der N-terminalen Region um 53 Aminosäuren verkürzt ist. Verschiedene Programme (PSORT, Predotar) sagen mit großer Wahrscheinlichkeit voraus, dass diese Region ein Signalpeptid enthält, so dass das vollständige, ab dem ersten Methionin exprimierte Protein zu Chloroplasten oder Mitochondrien transportiert würde. Ohne das Peptid verbleibt das Protein aber nach der Synthese im Cytosol. Die gleichen Eigenschaften besitzt *FaNES1* (Aharoni et al., 2004). Es enthält ebenfalls ein Stoppcodon im N-terminalen Bereich und ist deshalb nicht in Plastiden lokalisiert. Im Gegensatz dazu wurde nachgewiesen, dass *FaNES2* und *FvNES*, die mit intakten Signalpeptiden exprimiert werden, tatsächlich in Mitochondrien und Chloroplasten transportiert werden.

Abgesehen von den ersten 50 Aminosäuren tauchen nur wenige Sequenzunterschiede auf. Der auffälligste ist die Insertion von 2 Aminosäuren, Arginin und Leucin, an den Positionen 244 und 245 der *FaLINS*-Sequenz (Abb. B-7).

### 2.3 Expression und Charakterisierung von *FaLINS* und *FvNES*

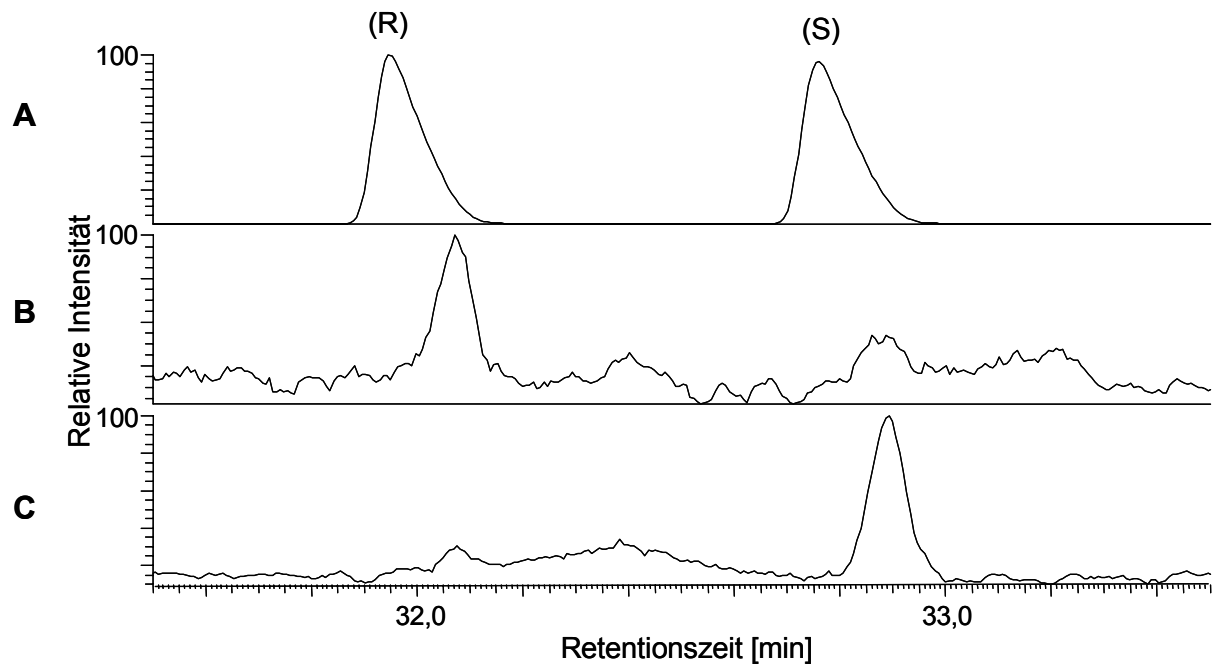
Obwohl sich *FaLINS* insgesamt nur geringfügig von den bereits beschriebenen Enzymen unterscheidet, könnte es die Bildung anderer Produkte katalysieren. Beispielsweise veränderte der Austausch von nur vier Aminosäuren in einer Sesquiterpensynthase aus *Zea mays* wesentlich die Stereoselektivität des Enzyms

	Met1		Stopp		Met2
FaNES1	1	MASSSRAFFKVFNP	-----QIACY-----	F	DSLLPSSIT
FaNES2	1	MASSSRAFFKVFNP	-----APKSIPIRIGQSNLMQLTHKKQLPFFORRGIAEDSLLPSSSTPIKPMNVETKHTRTMGDIFVQHC		
FvNES	1	MASSSRAFFKVFNP	-----QIAPKSIPIRIGQSDLMQLTHKKQLPFFORRGIAEDSLLPSSSTPIKPMNVETKHTRTMGDIFVQHS		
FaLINS	1	MASSPRSLPKVFNP	-----IAPKSIPIRIGQSDLMQLTHKKQLPFFORRGIAEDSLLPSSSTPIKPMNVETKHTRTMGDIFVQHS		
		Stopp		RR	W
FaNES1	53	QKLELRLKTVLRNV	AELDALEGLNMIDAVQRLGIDYH	FQREIDEILHKQMSIVSARDDLHEVALRFRLLRQHGYPVPEDVF	
FaNES2	79	QKLELRLRNVLNRN	AELDALEGLNMIDAVQRLGIDYH	FQREIDEILHKQMSIVSASDDLHEVALRFRLLRQHGYPVPEDVF	
FvNES	81	QKLELRLRNVLNRN	AELDALEGLNMIDAVQRLGIDYH	FQREIDEILHKQMSIVSACDDLHEVALRFRLLRQHGYPVPEDVF	
FaLINS	73	RKLELRLRNVLNRN	AELDALEGLNMIDAVQRLGIDYH	FQREIDEILHKQMSIVSASDDLHEVALRFRLLRQHGYPVPEDVF	
FaNES1	133	NNFKDSKGT	FKQVLGEDIKGLMSLYEASQLGTEGED	ILVEAEKPSGHLKTSLSHLDHHR	VRIVANTLRNPHHKSLSLAFM
FaNES2	159	NNFKDSKGT	FKQVLGEDIKGLMSLYEASQLGTEGED	TLVEAEKPSGHLKTSLSHLDHHR	ARIVGNTLRNPHHKSLSLAFM
FvNES	161	NNFKDSKGT	FKQVLGEDIKGLMSLYEASQLGTEGED	TLVEAEKPSGHLKTSLSHLDHHR	ARIVGNTLRNPHHKSLSLAFM
FaLINS	153	NNFKDSKGT	FKQVLGEDIKGLMSLYEASQLGTEGED	TLVEAEKPSGHLKTSLSHLDHHR	QARIVGNTLRNPHHKSLSLAFM
FaNES1	213	ARNFFVTSQAT	--NSWLNLLKVEAKTDFNMVRS	SLHQNEIVQISKWKKELGLAKELKFARDQPLKWIWMSACLTDPKLSE	
FaNES2	239	ARNFFVTSQAT	--NSWLNLLKVEAKTDFNMVRS	SLHQNEIVQISKWKKELGLAKELKFARDQPKWYIWSMACLTDPKLSE	
FvNES	241	ARNFFVTSQAT	--NSWLNLLKVEAKTDFNMVRS	SLHQNEIVQISKWKKELGLAKELKFARDQPLKWIWMSACLTDPKLSE	
FaLINS	233	ARNFFVTSQATRL	NSWLNLLKVEAKTDFNMVRS	SLHQNEIVQISKWKKELGLAKELKFARDQPLKWIWMSACLTDPKLSE	
FaNES1	291	ERVELTKPISFVYL	IDDIPDVYGTLDLILFTEAVNRWEITAIDHLPDYMKICFKALYDMTNEFS	CKVYQKHGWNPLQSL	
FaNES2	317	ERVELTKPISFVYL	IDDIPDVYGTLDLILFTEAVNRWEITAIDHLPDYMKICFKALYDMTNEFS	CKVYQKHGWNPLQSL	
FvNES	319	ERVELTKPISFVYL	IDDIPDVYGTLDLILFTEAVNRWEITAIDHLPDYMKICFKALYDMTNEFS	CKVYQKHGWNPLQSL	
FaLINS	313	ERVELTKPISFVYL	IDDIPDVYGTLDLILFTEAVNRWEITAIDHLPDYMKICFKALYDMTNEFS	CKVYQKHGWNPLQSL	
FaNES1	371	KISWASLCNAFLVEAKWFASG	LPKSEBYLKNQIVSSGVNVVLVHMFLLGQNITRKSVELLNETPAMISSAAILRLWD		
FaNES2	397	KISWASLCNAFLVEAKWFASG	LPKSEBYLKNQIVSSGVNVVLVHMFLLGQNITRKSVELLNETPAMISSAAILRLWD		
FvNES	399	KISWASLCNAFLVEAKWFASG	LPKSEBYLKNQIVSSGVNVVLVHMFLLGQNITRKSVELLNETPAMISSAAILRLWD		
FaLINS	393	KISWASLCNAFLVEAKWFASG	LPKSEBYLKNQIVSSGVNVVLVHMFLLGQNITRKSVELLNETPAMISSAAILRLWD		
FaNES1	451	DLGSAKDENDGNDGSYVRCY	LEEHGCSIEEAREKTINMISDEWKKLNRELLSPNFPFATFTLASLNLARMIPLMYSYD		
FaNES2	477	DLGSAKDENDGNDGSYVRCY	LEEHGCSIEEAREKTINMISDEWKKLNRELLSPNFPFATFTLASLNLARMIPLMYSYD		
FvNES	479	DLGSAKDENDGNDGSYVRCY	LEEHGCSIEEAREKTINMISDEWKKLNRELLSPNFPFATFTLASLNLARMIPLMYSYD		
FaLINS	473	DLGSAKDENDGNDGSYVRCY	LEEHGCSIEEAREKTINMISDEWKKLNRELLSPNFPFATFTLASLNLARMIPLMYSYD		
FaNES1	531	GNQCLPSLKEYMKLMLEYTVSM			
FaNES2	557	GNQCLPSLKEYMKLMLEYTVSM			
FvNES	559	GNQCLPSLKEYMKLMLEYTVSM			
FaLINS	553	GNQCLPSLKEYMKLMLEYTVSM			

**Abb. B-7:** Alignment der Linalool/Nerolidol-Synthasen aus *Fragaria x ananassa* (FaNES1 und FaNES2, Genbank-Akzessionsnummern CAD57083 und CAD57106) und *Fragaria vesca* (FvNES, CAD57084) sowie des ebenfalls aus *Fragaria x ananassa* klonierten, neuen Transkriptes FaLINS.

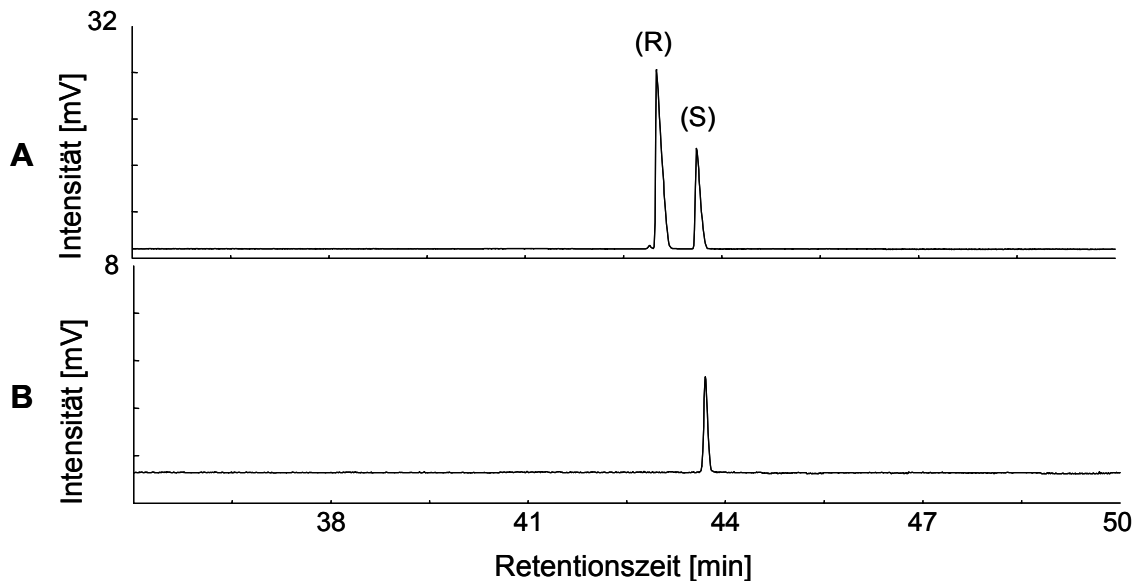
(Köllner et al., 2004). Die Sequenz wurde daher *in frame* in den Expressionsvektor pGEX4T-1 kloniert und ab Met2 als GST-Fusionsprotein in *Escherichia coli* exprimiert. Aus den Bakterienzellen konnte das Enzym, das eine rechnerische Größe von 87 kDa hat, durch Affinitätschromatographie an immobilisiertem Glutathion aufgereinigt werden. Anschließend wurde es zusammen mit Geranyldiphosphat (GPP) und Farnesyldiphosphat (FPP) in Standardassays inkubiert. Die Reaktionsprodukte sind mit Diethylether extrahiert und zunächst mittels Kapillargaschromatographie-Massenspektrometrie (HRGC-MS) analysiert worden. Im Chromatogramm wurden als neu gebildete Substanzen Linalool bzw. Nerolidol identifiziert. Um die Chiralität von Linalool zu bestimmen, wurde der Extrakt zusätzlich mittels Multidimensionaler Gaschromatographie-Massenspektrometrie (MDGC-MS) analysiert. FaLINS bildet annähernd 100 % enantiomerenreines (S)-Linalool und unterscheidet sich daher nicht von FaNES1 (Abb. B-8) (Aharoni et al., 2004). Folglich kann auch FaLINS nicht die Herkunft des (R)-Linalools erklären, das in Blättern von *Fragaria x ananassa* gegenüber dem (S)-Enantiomer bevorzugt vorkommt (Hampel

et al., 2006). Ein Diethyletherextrakt aus Erdbeerblättern bestätigte die Angaben der Literatur und wies einen hohen Anteil (R)-Linalool auf (Abb. B-8).



**Abb. B-8:** MDGC-MS-Analyse zur Bestimmung des Enantiomerenverhältnisses von Linalool. Es wurden ein Standard von racemischem Linalool (**A**), ein Diethyletherextrakt aus Blättern von *Fragaria x ananassa* cv. Senga sengana (**B**) und ein Diethyletherextrakt aus einem Assay von FaLINS mit GPP (**C**) analysiert. Die Elutionsreihenfolge der Linalool-Enantiomere wurde durch einen enantiomeren-angereicherten Standard bestimmt (nicht gezeigt).

Wie zuvor beschrieben (Kap. A.3.5) sind die Linaloolsynthesen FaNES2 und FvNES, die sowohl ein Signalpeptid als auch das RR(X)<sub>8</sub>P-Motiv enthalten, nicht hinsichtlich ihrer Stereospezifität untersucht worden (Aharoni et al., 2004). Es sollte daher geklärt werden, ob diese Sequenzelemente eine Rolle für die Chiralität der enzymatisch gebildeten Produkte spielen. Dazu wurde der offene Leserahmen von *FvNES* aus cDNA, die aus Blättern von *Fragaria vesca* gewonnen worden war, kloniert und anschließend analog zu FaLINS exprimiert, aufgereinigt und mit GPP umgesetzt. Die Analyse des entstandenen Linalools mittels Chiralphasen-Gaschromatographie zeigt, dass auch FvNES enantiomerenreines (> 97%) (S)-Linalool bildet (Abb. B-9).



**Abb. B-9:** MDGC-Analyse zur Bestimmung des Enantiomerenverhältnisses von Linalool. Es wurden ein Linalool-Standard, angereichert mit (R)-Linalool (**A**), und ein Diethyletherextrakt aus der Umsetzung von FvNES mit GPP (**B**) analysiert.

## 2.4 Diskussion

Aus den Blättern von *Fragaria x ananassa* cv. Elsanta wurde das komplette Transkript einer (S)-Linalool/Nerolidol-Synthase (*FaLINS*) kloniert. Die davon abgeleitete Proteinsequenz ist nahezu identisch mit den (S)-Linalool/Nerolidol-Synthasen *FaNES1* und *FaNES2*, die jedoch nach den Ergebnissen von Northern Blots nicht in Blättern exprimiert werden (Aharoni et al., 2004). In diesen Northern Blots diente die Volllänge von *FaNES1*, also die verkürzte Variante ab dem zweiten Startcodon (Methionin 2), als Sonde. Möglicherweise wurde *FaLINS* in den Blättern nicht detektiert, da die Sequenz durch die Insertion von 6 Nukleotiden keine Hybridisierung erlaubte. Die geringen Sequenzunterschiede legen nahe, dass es sich bei *FaLINS* und *FaNES1/2* um paraloge Gene oder um Allele des gleichen Gens handelt. Das Allel *FaNES1* wird stark in der Frucht exprimiert. Die problemlose Klonierung von *FaLINS* weist auf eine recht starke Expression im Blatt hin. Eine allel-spezifische Expression wurde für ein Polygalacturonase-inhibierendes Protein aus der Erdbeere beschrieben (Schaart et al., 2005). Dabei wurden sechs Allele untersucht, die in Frucht und Blatt und zudem in verschiedenen Kultivaren deutlich unterschiedlich exprimiert wurden. Außerdem sind in Mais zwei zu 98 % identische Allele einer Multiprodukt-Sesquiterpensynthase untersucht worden. Die Enzyme produzierten zwar die gleichen Strukturen, aber mit einem sehr stark

unterschiedlichen Verhältnis der Stereoisomere (Köllner et al, 2004). Diese veränderliche Stereospezifität ist bei FaLINS und FaNES jedoch nicht gegeben.

Die Sequenzunterschiede im N-terminalen Bereich von FaLINS und FaNES betreffen nicht nur die Art und Anzahl der Aminosäuren, sondern auch die Position des Stoppcodons zwischen Methionin 1 und Methionin 2. *FaNES1* ist durch Mutation aus *FaNES2* oder einem anderen intakten Allel hervorgegangen, und hat dabei den funktionellen Code für das Signalpeptid verloren (Aharoni et al., 2004). Genauso sollte auch *FaLINS* aus *FaNES2* hervorgegangen sein. Offenbar ist also unabhängig voneinander sowohl im Allel *FaNES1* als auch in *FaLINS* eine Mutation aufgetreten, die zum Verlust des Signalpeptids geführt hat. In der Frucht führt dies dazu, dass das Enzym im Cytosol verbleibt, das ein neues oder größeres Reservoir an Substraten darstellt als das „frühere“ Ziel, die Plastide, sodass größere Mengen an Terpenen entstehen können.

Die Expression des Proteins FvNES ergab, dass der N-terminale Teil des Enzyms inklusive des RR(X)<sub>8</sub>W-Motiv ähnlichen Sequenzelementes RR(X)<sub>8</sub>P keinen Einfluss auf die Chiralität des Produktes hat. In FaLINS ist dieses Element zu RW(X)<sub>8</sub>S mutiert, hat also nur sehr wenig Ähnlichkeit zum ursprünglichen Motiv. Es kann daher bezweifelt werden, dass das RR(X)<sub>8</sub>P in den FaNES-Sequenzen tatsächlich das Analogon zum RR(X)<sub>8</sub>W-Motiv darstellt (Aharoni et al., 2004), zumal auf genetischer Ebene mindestens zwei Nukleotide mutiert worden sein müssen, damit für Prolin statt Tryptophan codiert wird.

Die Frage, wodurch das (R)-Enantiomer vor allem in den Blättern entsteht, bleibt zu klären. In der Frucht und in den Beeren von *Vitis vinifera* wurden ebenfalls unterschiedliche Enantiomerenverhältnisse von Linalool nachgewiesen (Luan und Wüst, 2002). Experimente mit radioaktiv markierten Präkursoren des Mevalonat-abhängigen und des DXP-abhängigen Terpenbiosyntheseweges legten nahe, dass zwei unterschiedliche Enzyme für die Enantiomere verantwortlich sind, die jedoch bisher nicht bekannt sind. Ähnliche Experimente mit der Erdbeere konnten klären, dass (S)-Linalool in Früchten der kultivierten Erdbeere mevalonatabhängig gebildet wird (Hampel et al., 2006). Die Herkunft des (R)-Linalools in den Blättern der Kulturerdbeere konnte dagegen keinem der beiden Biosynthesewege zugeordnet werden.

### 3 Terpensynthesen in *Lavandula angustifolia*

#### 3.1 Klonierung von Terpensynthesen

Zuvor wurde bereits die Vorgehensweise zur Klonierung unbekannter Enzyme auf der Grundlage von Sequenzhomologien beschrieben (Kap. B.2.1). Die degenerierten Primer, die für die Amplifizierung der Sequenzen aus der Erdbeere verwendet wurden, kamen auch bei Lavendel zum Einsatz. Es sind PCRs mit allen möglichen Kombinationen aus Vorwärts- und Rückwärts-Primern durchgeführt worden. Als Matritze diente in cDNA umgeschriebene mRNA, die aus Blättern und aus Blüten von *Lavandula angustifolia* extrahiert worden war. Dabei wurden einige Fragmente amplifiziert, deren Größen den erwarteten Abschnitten von Terpensynthesen entsprachen. Aus beiden cDNA-Proben (Blatt und Blüte) konnte jeweils ein 582 bp und ein 108 bp großes Teilstück gewonnen werden, die in pGEM-T zwischenkloniert wurden. Die Sequenzierung mehrerer Plasmide ergab jedoch nur für die Fragmente aus der Lavendelblüte zwei unterschiedliche Nukleotidsequenzen, während die beiden Abschnitte aus dem Lavendelblatt das gleiche Transkript repräsentierten. In einer BLAST-Datenbankabfrage waren die drei PCR-Produkte teilweise homolog zu veröffentlichten Sequenzen von Terpensynthesen. Daher wurden durch RACE-Protokolle die fehlenden 5'- und 3'-Enden der Nukleotidsequenzen einschließlich der nicht-translatierten Regionen (*untranslated region*, UTR) amplifiziert. Mit diesen Informationen konnten schließlich die Vollängen der drei Enzyme LaLIMS (aus dem Blatt), LaLINS und LaBERS (beide aus der Blüte) aus cDNA mittels PCR amplifiziert werden.

#### 3.2 Sequenzanalyse

Die offenen Leserahmen (ORF) der drei Terpensynthesen aus Lavendel haben inklusive Stoppcodon eine Größe von 1809 bp, 1695 bp und 1617 bp entsprechend einer Proteinsequenz von 602, 564 und 538 Aminosäuren Länge. Dies entspricht rechnerisch Molekulargewichten von 70,3, 65,8 und 62,4 kDa. Um die drei Sequenzen gegenüberzustellen, wurden sie mit ClustalW ausgerichtet (Abb. B-10). Dadurch ist eine hohe Übereinstimmung zu erkennen, die zwischen 40 und 60 % liegt. Die in Terpensynthesen konservierten Motive DDXXD und (N,D)D(L,I,V)X(S,T)XXXE, die die zweiwertigen Kationen koordinieren, sind jeweils vollständig enthalten, ebenso wie das charakteristische Sequenzelement RR(X)<sub>8</sub>W im N-terminalen Sequenzbereich (Whittington et al., 2002; Christianson, 2006). Der

LaLIMS	1	MSIISMHVGIINRPAAYNHLRNLDRRAKPRHVSSTAATRLRVSCAFOLEIKSVDETRRSGNYNPFQAWDFNYIQSLDNG
LaLINS	1	MSIN-----INMP-----AAAVLRPFRCSQLH---VDETRRSGNYRPSAWDSNYIQSLNSG
LaBERS	1	-----MERRRSGNFESSTIWDDDYIQSLRFS
		RR W
LaLIMS	81	YKKEBYSTRHAEITVQVKKLLEEBMEAVQKLELIEDLKNLGISYPPKDNIQQLLNQIYNHKKCHNSEVEEKDLYFTALR
LaLINS	49	YKKEKCLTRLEGIEQVKEIKGTKMEAVQCLELIDDSQNLGLSYYPQDKIKHILNLIYNDHKYFYDSEAEQMDLYFTALG
LaBERS	26	YTGKMYVDKSEKIKTIVKMMMDDEATDEEQLLELINDLQRLGISYHFKDGIAKMLNNIYKS-----DSKYMKEKDLHETALK
LaLIMS	161	FRLLRQOGFEVSOEVDFHFKNEKGTDFKPNLAADDTKGLLQLYEASFLLRREEDTLELARQFSTKLLQKKVDENGDDKIED
LaLINS	129	FRLFRQHGFKVSOEVDFRKNENGTYPFKH---DDTKGLLQLYEASFLVRREGETLEQAREFAATKSLQRKLEDEGDDG-IDA
LaBERS	101	FRLLRQHGGRVPOQDVFSFMDDEG-NFEAWVVEDVSVLVSLYEASHISVEGESILDMAKDFSSHLLTEMVEQIGEA-----
		LQLYEASFLL
LaLIMS	241	NILLWIRRSLELPLHWRVQRLEARCFLDAYVRRPDMNPIVPELAKLDFNITQATQOEBELKDLSRWVNSGLAEKLPFARD
LaLINS	205	NIESWIRHSLELPLHWRAQRLEARWFLDAYARRPDMNPVIFELAKLNFNIQATQOEBELKALSRWVSSLGLAEKLPFVRD
LaBERS	176	CHAEQVKRLELPLHWRVGRLEARWVQAYETRPNSNPTIVELAKLDFNMVQAKYQDELKRCRWRVETGLPEKLSFARH
LaLIMS	321	RVVESEYFWAMGTFEPHOYGYORELVAKINALATVVDVVDVYGTLEELELFTDAIRRDRESIDQLPYYMQLCFITVNNF
LaLINS	285	RLVESYFWAIPLEPFOYGYQRKATKIITLFTSLDDVYDIYGTLELDELPTNLPERWNASIGRLPEYQLQFYFAIHNPF
LaBERS	256	RLAECLWLSLGFIPDPHHGYSREIMTKIAVLITITDDIYDIYCALBEELOEFTAEFERWDINSIDLPEYMQICFLAIFNS
		DDXXD
LaLIMS	401	VFELAHADVLDKRSFNCPHLLQRSWDLAEAYLVEAKWYHSRYTSPLEBYLNIARVSVTCPTIVSQMYFALPIPIEKPVIE
LaLINS	365	VSEVAYDILKKEKGFSTIVYLRQSRWDLKGYLKEAKWYNSGYTSPLEBYFDNAFMTIGAPPVLSQAYFTLQSSMEKPIIE
LaBERS	336	ANELGYQLLRDQCGLNITPNLRSSWAEBSRAYLLEARWPHNGFVETTDQYLNIAWISISGPLLLSYGLTITNPNINNKELK
LaLIMS	481	IMYKYHDTLYLSGMLLRLPDDLGTASPELKRGDVQRAVQCYMKERNVPENEARHVKFLIREASKQINTAMAT-DCPFTF
LaLINS	445	SMYBYDNILRVSGMLVRLPDDLGTSSFERGQVPRKSVQIYMKETNATEEBAVEHVRFPLNREAWKMMNTAEAAGDSPLVS
LaBERS	416	SLEKHPSTIRWPSMVLRLADDLGTSSBEIKRGDVSXSIQCYMNETGCCEGDARHVVKSLTEVALKRRMN-DEILMEKPPFS
		(N,D)D(L,I,V)X(S,T)XXXE
LaLIMS	560	DFAVAAANLGRVANFVYVDGDGFCVQHSKITYEQIGTLMFEPYP--
LaLINS	525	DVVVAANLGRVAQFMYPDGDGN---QSSLQQWIVSMLFEPYA--
LaBERS	495	-EDTNAMNLARSLCFWQYGDGFCKPHSDTIKINLVSLIVLPEFHMP

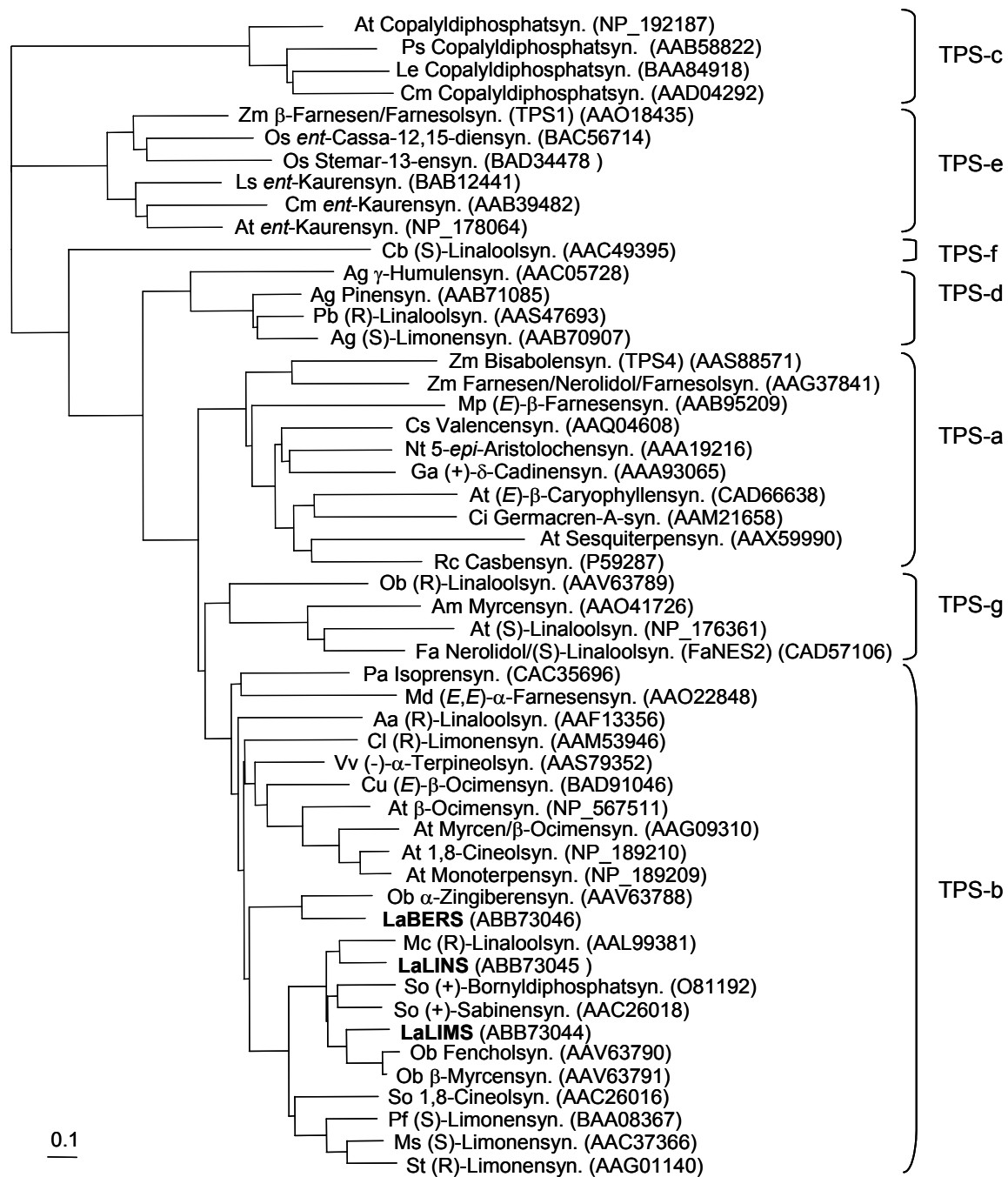
**Abb. B-10:** Protein-Alignment der drei Terpensynthesen aus Lavendel. Die charakteristischen Sequenzelemente sind jeweils vorhanden.

Abschnitt LQLYEASFLL, der möglicherweise am aktiven Zentrum beteiligt ist, ist ebenfalls vollständig in LaLIMS und leicht abgewandelt in LaLINS und LaBERS zu finden (McGeady und Croteau, 1995; Wise et al., 1998). Am N-Terminus unterscheiden sich die Sequenzen von LaLIMS und LaLINS von LaBERS am deutlichsten, da sie zusätzliche Aminosäuren enthalten. Wie bei den Terpensynthesen aus der Erdbeere handelt es sich dabei um Signalpeptide, die den intrazellulären Transport der Enzyme vom Ort der Synthese in Plastide dirigieren. LaLIMS und LaLINS enthalten in diesem Abschnitt eine relativ große Anzahl an Alanin und Serin und wenige saure Aminosäuren, wie es für Signalpeptide typisch ist (Keegstra et al., 1989; Von Heijne et al., 1989). Dementsprechend berechnen die meisten Programme zur Vorhersage von Signalpeptiden (TargetP, SignalP, ChloroP, Predator) eine hohe Wahrscheinlichkeit für das Vorhandensein einer solchen Sequenz bei LaLIMS und – mit niedrigerer Wahrscheinlichkeit – bei LaLINS. Da ein Signalpeptid üblicherweise etwa 50 bis 70 Aminosäuren lang ist, ist das von LaLINS mit etwa 20 Aminosäuren ungewöhnlich kurz (Bohlmann et al., 1998a). LaBERS trägt dagegen sicher kein Signalpeptid. Im Allgemeinen enthalten Monoterpensynthesen Signalpeptide, da ihr Substrat GPP nur in den Plastiden gebildet wird. Sesquiterpensynthesen benötigen dies nicht und verbleiben im Cytosol, in dem FPP vorliegt. Demnach sollte es sich bei LaLIMS und LaLINS um Monoterpensynthesen, bei LaBERS um eine Sesquiterpensynthase handeln. Man nimmt an, dass *in vivo* die

Signalpeptide von Terpensynthasen nach dem Transport in die Plastide kurz vor dem doppelten Arginin des RR(X)<sub>8</sub>W-Motives abgespalten werden (Williams et al., 1998). Um weitere Erkenntnisse über die Funktionalität der klonierten Terpensynthasen zu erhalten, wurden ihre Sequenzen in einen phylogenetischen Baum eingeordnet. Dazu wurden sie zunächst mit ausschließlich biochemisch charakterisierten Terpensynthasen aus den sieben definierten TPS-Klassen (Kap. A.3.3) mittels ClustalW ausgerichtet. Darunter befanden sich auch die in einer BLAST-Datenbankabfrage bestimmten Sequenzen mit der höchsten Homologie zu LaLIMS, LaLINS und LaBERS. Dieses *Alignment* wurde anschließend erneut mit ClustalW unter Verwendung der *Neighbour-Joining*-Methode zu einem phylogenetischen Baum umgerechnet. Zur Darstellung diente die Software Treeview, mit der die Klasse TPS-c als *Out-Group* definiert und im Baum als Wurzel verwendet wurde (Abb. B-11) (Page, 1996).

Es sind deutlich die sieben Klassen TPS-a bis g zu erkennen. Alle drei Lavendel-Enzyme wurden der Klasse TPS-b zugeordnet, in der sich überwiegend Monoterpensynthasen befinden. LaLIMS ist stark verwandt mit zwei Enzymen aus Basilikum (*Ocimum basilicum*). Die Fencholsynthase katalysiert in dieser Pflanze die Bildung eines Gemisches aus Fenchol, Limonen,  $\alpha$ -Pinen und einem weiteren, unbekanntem Monoterpen. Das zweite Enzym synthetisiert ausschließlich  $\beta$ -Myrcen (Iijima et al., 2004). Geringfügig weniger verwandt sind zwei Monoterpensynthasen aus *Salvia officinalis*, die ebenfalls nicht nur ein Produkt bilden. Die Sabinensynthase setzt GPP zu Sabinen,  $\gamma$ -Terpinen, Terpinolen, Limonen und Myrcen um, die Bornyldiphosphatsynthase überwiegend zur namensgebenden Verbindung sowie zu  $\alpha$ -Pinen, Camphen, Limonen, Terpinolen und Myrcen (Wise et al., 1998). LaLINS zeigt zu diesen beiden Enzymen aus Salbei ebenfalls hohe Ähnlichkeit, ist aber am stärksten mit einer (R)-Linaloolsynthase aus *Mentha citrata* verwandt (Crowell et al., 2002). Dieses Enzym bildet im Gegensatz zu den anderen nur ein Produkt, (R)-Linalool. LaBERS ist dagegen relativ deutlich von den beiden anderen Lavendel-Sequenzen abgesetzt und stimmt gut mit einer Sesquiterpensynthase überein, die ebenfalls aus Basilikum kloniert wurde. Diese bildet neben der Hauptkomponente  $\alpha$ -Zingiberen auch Nerolidol,  $\beta$ -Farnesen,  $\alpha$ -Bergamoten und  $\beta$ -Bisabolen. Bei Betrachtung des phylogenetischen Baumes fällt insgesamt auf, dass alle zu LaLIMS, LaLINS und LaBERS ähnlichen Enzyme aus Pflanzen stammen, die wie der Lavendel zur Familie der *Lamiaceae* gehören.





**Abb. B-11:** Phylogenetischer Baum, der nach *Alignment* von ausgewählten, biochemisch charakterisierten Terpensynthasen aus den sieben TPS-Familien mit ClustalW und unter Verwendung der *Neighbour-Joining*-Methode berechnet wurde. Der Baum ist mit der Gruppe TPS-c verwurzelt, die als *Out-Group* definiert wurde. In Klammern sind die GenBank Akzessionsnummern angegeben. Die Abkürzungen stehen für den jeweiligen Organismus: Aa, *Artemisia annua*; Ag, *Abies grandis*; Am, *Antirrhinum majus*; At, *Arabidopsis thaliana*; Cb, *Clarkia breweri*; Ci, *Cichorium intybus*; Cl, *Citrus limon*; Cm, *Cucurbita maxima*; Cs, *Citrus sinensis*; Cu, *Citrus unshiu*; Fa, *Fragaria x ananassa*; Ga, *Gossypium arboreum*; Le, *Lycopersicum esculentum*; Ls, *Lactuca sativa*; Mc, *Mentha citrata*; Md, *Malus domestica*; Mp, *Mentha x piperata*; Ms, *Mentha spicata*; Nt, *Nicotiana tabacum*; Ob, *Ocimum basilicum*; Os, *Oryza sativa*; Pa, *Populus alba x Populus tremula*; Pb, *Picea abies*; Pf, *Perilla frutescens*; Ps, *Pisum sativum*; Rc, *Ricinus communis*; So, *Salvia officinalis*; St, *Schizunepeta tenuifolia*; Vv, *Vitis vinifera*; Zm, *Zea mays*.

Die genomische Struktur der Lavendel-Terpensynthasen wurde bestimmt, um eine Einordnung in die von Trapp und Croteau (2001) identifizierten Klassen zu ermöglichen (Kap. A.3.3). Hierzu wurde aus Lavendelblättern DNA extrahiert, aus der mittels PCR die entsprechenden Sequenzen amplifiziert wurden. Es fanden die gleichen Primer Verwendung, die zur Klonierung der Vollängen aus cDNA eingesetzt worden waren. Nach Zwischenklonierung in den Vektor pGEM-T konnten so die genomischen Sequenzen in mehreren Schritten sequenziert werden. Sie enthalten jeweils sechs Introns und gehören daher zur Klasse III der Terpensynthasegene, die die evolutionär jüngste ist (Tab. B-3) (Trapp und Croteau, 2001). Während die Länge der Introns sehr stark variiert, ist ihre Position vom 3'-Ende aus gesehen sehr konstant. Dementsprechend unterscheiden sich die Exons nur geringfügig. Wie bereits zuvor im *Alignment* zu sehen war (Abb. B-10), ist lediglich die Länge des ersten Exons deutlich unterschiedlich, da es bei LaLIMS und LaLINS für ein Signalpeptid codiert.

**Tab. B-3:** Genomische Struktur der Terpensynthasen aus Lavendel. Es sind die Längen der Introns in bp sowie die der Exons in bp und Anzahl Aminosäuren (in Klammern) angegeben. Die Anzahl der Aminosäuren ist gerundet, da die Introns zum Teil innerhalb eines Triplets platziert sind. Die gesamte Länge auf genomischer Ebene ist ebenfalls in bp angegeben. Die Nummerierung der Introns richtet sich nach Trapp und Croteau (2001).

Exon	Intron	1	III	2	VIII	3	XI	4	XII	5	XIII	6	XIV	7	Gesamt
LaLIMS	[bp]	246	65	272	81	396	105	216	82	138	105	250	74	291	2321
	[AS]	(82)		(91)		(132)		(72)		(46)		(83)		(96)	
LaLINS	[bp]	148	926	276	339	377	93	221	148	139	78	249	435	285	3714
	[AS]	(49)		(92)		(126)		(74)		(46)		(83)		(94)	
LaBERS	[bp]	82	140	256	91	379	79	218	90	138	94	250	89	294	2200
	[AS]	(27)		(85)		(126)		(73)		(46)		(83)		(98)	

### 3.3 Heterologe Expression

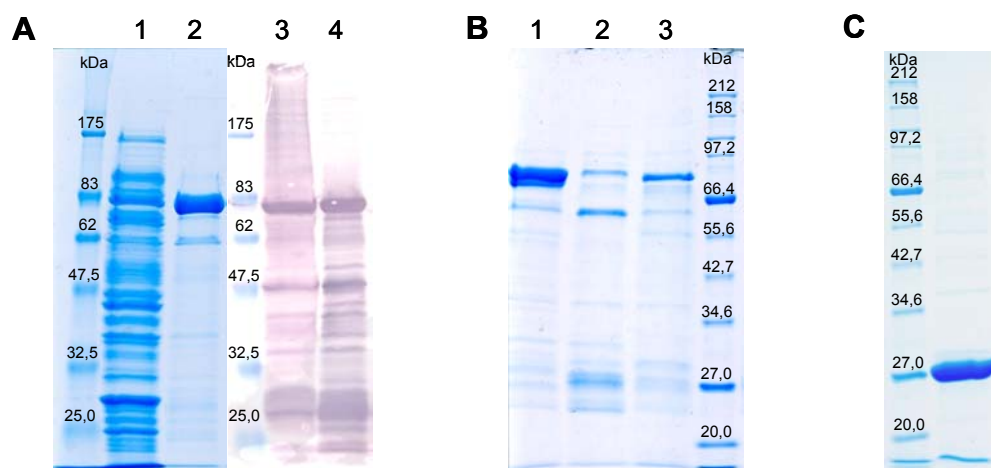
Um eine biochemische Charakterisierung zu ermöglichen, wurden die drei Enzyme aus Lavendel heterolog in *Escherichia coli* exprimiert. Dazu sind die kompletten codierenden Sequenzen *in frame* in den Expressionsvektor pGEX-4T-1 kloniert worden. Außerdem sollten LaLIMS und LaLINS auch ohne Signalpeptide exprimiert werden. Daher wurden zwei weitere Konstrukte erzeugt, die die Sequenz von *LaLIMS* ab dem Codon für Asp<sup>56</sup> und die von *LaLINS* ab Arg<sup>27</sup> enthielten (Tab. B-4).

**Tab. B-4:** Konstrukte, die zur heterologen Expression der Terpensynthesen verwendet wurden. Es sind jeweils die Länge der codierenden Sequenzen und die rechnerisch bestimmten Größen der daraus resultierenden nativen Proteine und GST-Fusionsproteine angegeben.

Konstrukt	Bezeichnung	ORF [bp]	Größe [kDa]	Größe mit GST [kDa]
LaLIMS mit Signalpeptid	LaLIMS_M1	1809	70,3	97,0
LaLIMS ohne Signalpeptid	LaLIMS_RR	1644	64,0	90,9
LaLINS mit Signalpeptid	LaLINS_M1	1695	65,8	92,3
LaLINS ohne Signalpeptid	LaLINS_RR	1617	62,8	89,4
LaBERS	LaBERS	1617	62,4	89,0

Die Expressionskulturen wurden aufgeschlossen und extrahiert. Mit Hilfe von Glutathion, das an Sepharose immobilisiert war, sind die Zielproteine affinitätschromatographisch weiter aufgereinigt worden (Abb. B-12A). Die Analyse der Fraktionen per SDS-Gelelektrophorese zeigte, dass die Expression für alle Konstrukte außer für LaLIMS\_M1 gelang. Wahrscheinlich verhinderte die Sequenz des Signalpeptides eine effektive Synthese dieses Enzyms (Bohlmann et al., 1998a). *Western Blots* bestätigten, dass die anderen Proteine tatsächlich erfolgreich aufgereinigt wurden, indem ihre GST-Tags mit Anti-GST-Antikörpern angefärbt wurden. Allerdings sind nicht nur die eigentlichen Enzyme gefärbt worden, sondern auch Banden, die im Elektrophorese-Gel zum größten Teil nicht zu sehen waren. Da das Muster der aufgereinigten Fraktion fast identisch mit dem Rohextrakt ist, können unspezifische Proteinfärbungen nicht die Ursache sein. Daher handelt es sich zum einen vermutlich um GST-haltige Bruchstücke der Enzyme, die durch proteolytische Aktivitäten entstanden sind. Zum anderen dürften es Proteine sein, deren Synthese abgebrochen wurde. Da sich der GST-Teil der Fusionsproteine am N-Terminus befindet und als erstes exprimiert wird, wurden diese Fragmente zusammen mit den vollständigen Enzymen aufgereinigt.

Die Größe der Proteine entspricht in etwa den berechneten Werten (Abb. B-12B und Tab. B-4). Es ist jedoch insbesondere in der aufgereinigten Fraktion von LaLINS\_M1 eine weitere, deutliche Bande bei etwa 63 kDa zu sehen. Es ist bekannt, dass GST-Fusionsproteine zum Teil nach der Aufreinigung ihren GST-Tag abspalten (Jackson et al., 2001). Tatsächlich ist die zusätzliche Bande etwa genauso groß wie das native



**Abb. B-12:** SDS-PAGE und *Western Blot* der heterolog exprimierten Terpensynthasen. Rohextrakt und aufgereinigte Fraktion von LaLIMS\_RR wurden durch Gelelektrophorese aufgetrennt (**A1 und A2**) und im *Western Blot* angefärbt (**A3 und A4**). Die Terpensynthasen LaLIMS\_RR (**B1**), LaLINS\_M1 (**B2**) und LaBERS (**B3**) sind nach Aufreinigung und Auftrennung mittels SDS-PAGE als deutliche Banden erkennbar. Die Expression des leeren pGEX-4T-1 Vektors und die anschließende Aufreinigung ergab in hoher Reinheit GST (**C**).

Protein. Zudem ist eine schwache Bande in der Größe von GST bei 27 kDa zu erkennen. Vermutlich ist die unter Erhitzung durchgeführte Denaturierung, die für die Auftrennung über SDS-PAGE erforderlich ist, verantwortlich für die Spaltung. Es kann mit großer Sicherheit ausgeschlossen werden, dass es sich um bakterielle Proteine handelt, die als Verunreinigung in die Fraktionen gelangten. Denn als Kontrolle wurden Bakterienzellen, die den leeren Expressionsvektor enthielten, analog aufgereinigt. Dabei wurde in sehr hoher Reinheit lediglich GST gewonnen (Abb. B-12C).

### 3.4 Charakterisierung der klonierten Terpensynthasen

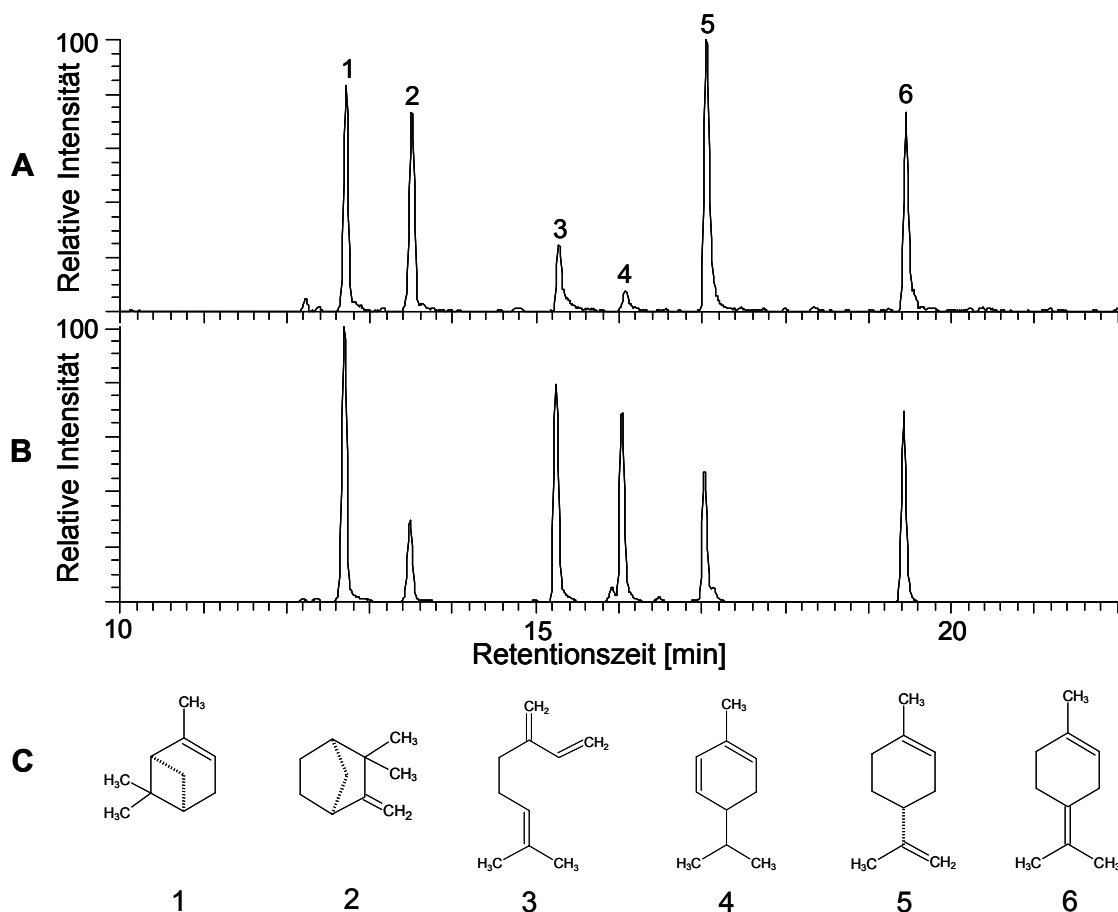
Die durch heterologe Expression in reiner Form gewonnenen Enzyme sollten biochemisch charakterisiert werden. Es sollte zunächst geklärt werden, ob es sich um eine Mono-, Sesqui- oder Diterpensynthase handelt und welche Produkte in den enzymatischen Reaktionen entstehen. Die weiteren Arbeiten hatten zum Ziel, die optimalen Reaktionsbedingungen der Enzyme hinsichtlich pH, Temperatur und der Abhängigkeit von zweiwertigen Kationen zu bestimmen. Nachdem der Zeitrahmen, in dem die Reaktion einen linearen Verlauf aufweist, geklärt war, konnten die kinetischen Parameter  $K_m$  und  $V_{max}$  ermittelt werden. Die Enzymassays, die zum Zweck dieser Charakterisierung durchgeführt wurden, liefen alle nach dem gleichen Schema ab. Die aufgereinigten Terpensynthasen wurden zusammen mit den möglichen

Substraten GPP, FPP und GGPP umgesetzt. Nach Ablauf der Reaktionszeit sind die wässrigen Ansätze mit internem Standard versetzt und mit Diethylether extrahiert worden. Die in den Extrakten vorliegenden Terpene wurden anschließend zur Identifizierung und Quantifizierung mittels HRGC-MS und zum Teil mittels Chiralphasen-GC analysiert. Als Blindprobe dienten Ansätze, die statt Enzymlösung das aufgereinigte GST-Protein aus der Expression des Leervektors enthielten.

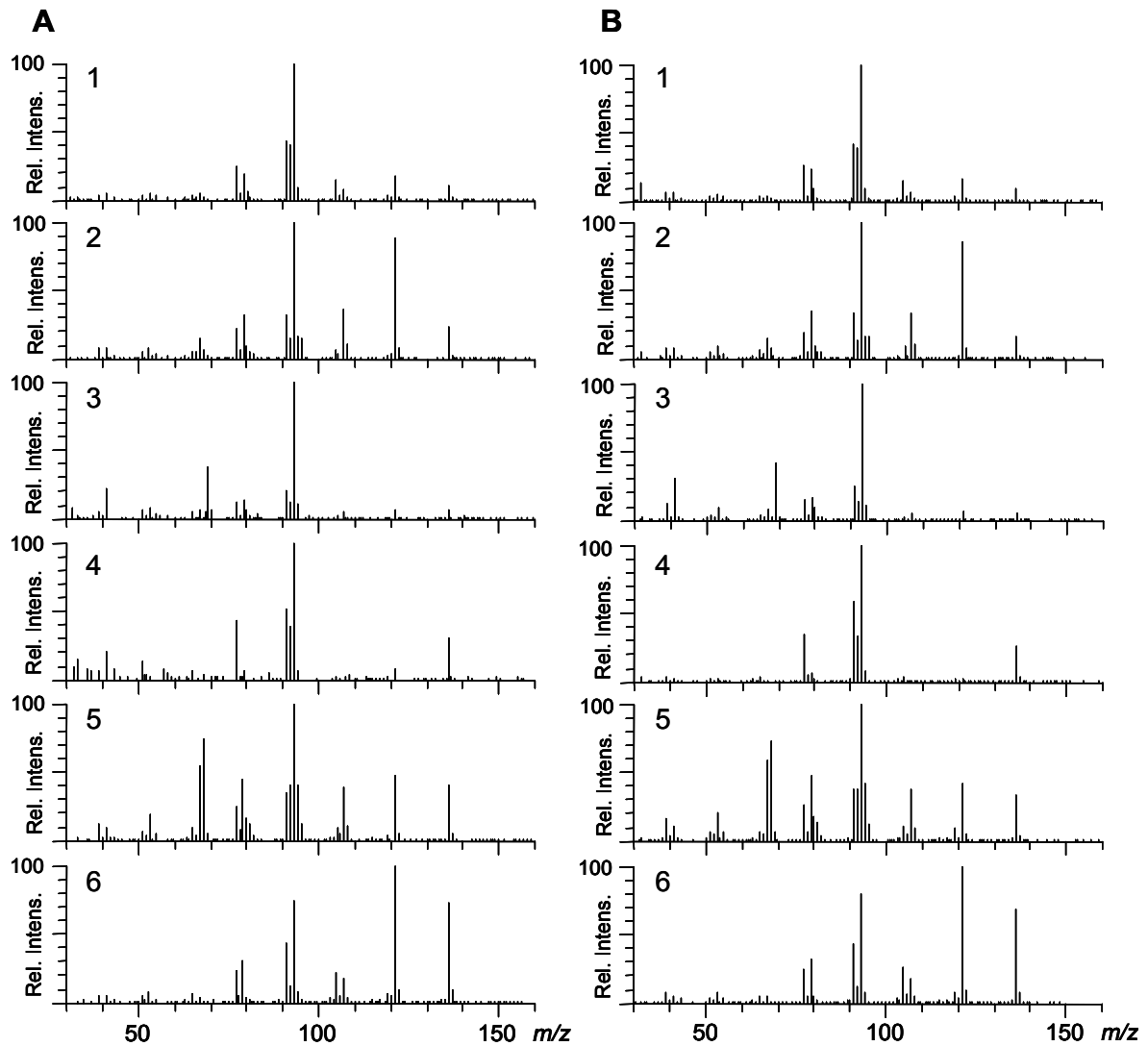
### 3.4.1 Charakterisierung einer (R)-Limonensynthase

#### 3.4.1.1 Identifizierung der gebildeten Produkte

LaLIMS\_RR bildete lediglich aus GPP, nicht jedoch aus FPP oder GGPP neue Produkte. Es handelt sich dementsprechend um eine Monoterpensynthase. Es entstehen sechs Monoterpene, die mit Hilfe von authentischen Standards über die Retentionszeiten und Massenspektren identifiziert wurden (Abb. B-13 und B-14).



**Abb. B-13:** HRGC-MS-Analyse (Ionenchromatogramme  $m/z$  93) der Reaktionsprodukte nach Umsetzung von LaLIMS\_RR mit GPP (A) und eines Gemisches authentischer Standardsubstanzen (B). Die Strukturformeln von (1R,5R)-(+)- $\alpha$ -Pinen (1), (1R,4S)-(+)-Camphen (2),  $\beta$ -Myrcen (3),  $\alpha$ -Phellandren (4), (R)-(+)-Limonen (5) und Terpinolen (6) sind angegeben (C). Die Chiralität aller Komponenten außer  $\alpha$ -Phellandren, dessen Konzentration zu niedrig war, wurde bestimmt und ist in Abb. B-15 gezeigt.

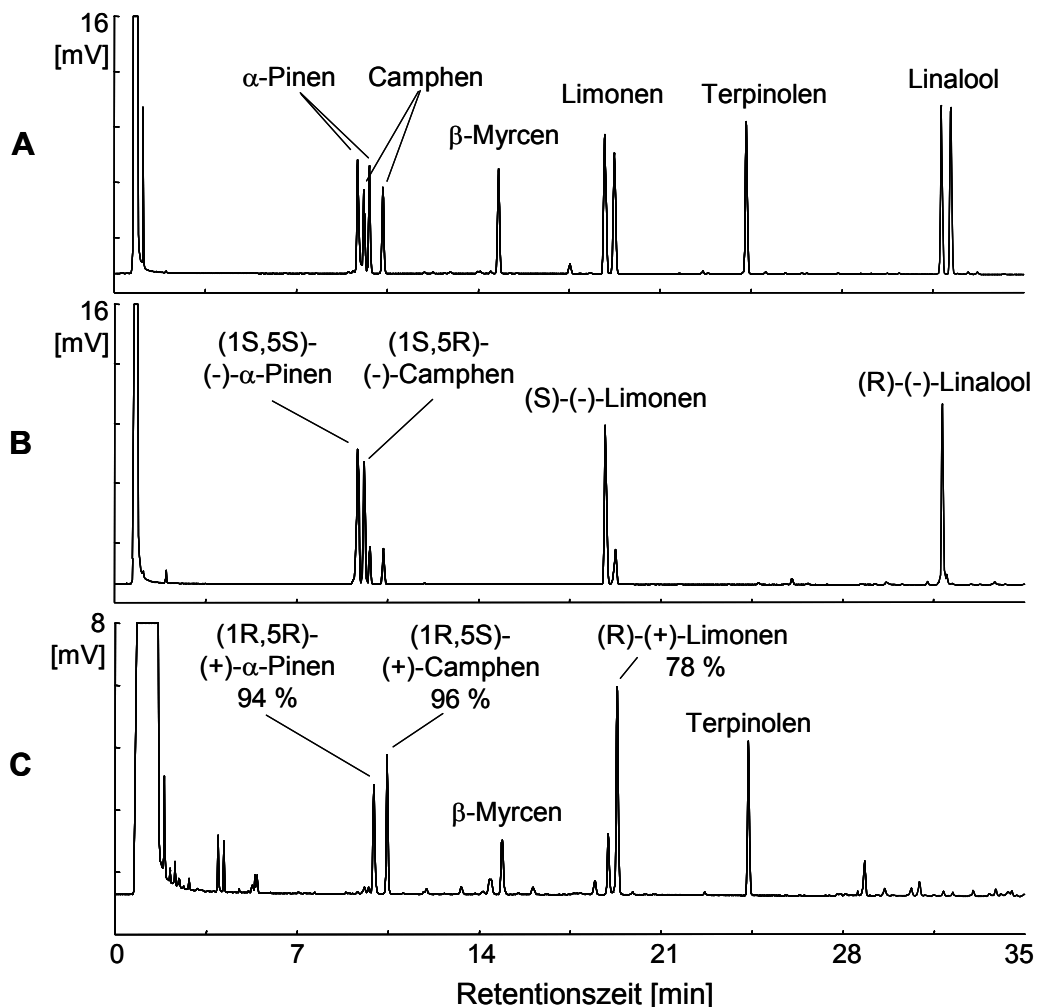


**Abb. B-14:** Massenspektren der von LaLIMS\_RR gebildeten Produkte (A) sowie von authentischen Standardsubstanzen (B). Zur Nummerierung siehe Abb. B-13.

Das Hauptprodukt ist Limonen mit einem Anteil von 39 %. Daher wird das Enzym als *Lavandula angustifolia* Limonensynthase (LaLIMS) bezeichnet. Desweiteren wurden Terpinolen (22 %), Camphen (16 %) und  $\alpha$ -Pinen (14 %) sowie geringere Mengen  $\beta$ -Myrcen (8 %) und  $\alpha$ -Phellandren (1 %) nachgewiesen. Es entstehen somit sowohl zwei bicyclische und drei monocyclische Monoterpene als auch das acyclische  $\beta$ -Myrcen (Abb. B-13C).

Von  $\alpha$ -Pinen, Camphen,  $\alpha$ -Phellandren und Limonen gibt es jeweils zwei Enantiomere. Der Extrakt aus dem Assay wurde mittels Chiralphasen-Gaschromatographie untersucht, um die Chiralität der gebildeten Monoterpene zu bestimmen. Dazu sind zunächst racemische Standardsubstanzen analysiert worden, um die Trennung zu optimieren (Abb. B-15). Anschließend erfolgte die Zuordnung der jeweiligen Enantiomere zu den Signalen mit Hilfe von enantiomeren-

angereicherten Standards. Danach bildet die Limonensynthase 94 % (1R,5R)-(+)- $\alpha$ -Pinen, 96 % (1R,4S)-(+)-Camphen und 78 % (R)-(+)-Limonen. Die Konzentration an  $\alpha$ -Phellandren reichte nicht aus, um eine Aussage über die Chiralität treffen zu können. Zudem war kein Standard des (S)-Enantiomers verfügbar.



**Abb. B-15:** Chiralphasen-Gaschromatographie der von LaLIMS\_RR gebildeten Produkte. Die racemischen Standards werden auf der verwendeten Säulenphase getrennt (A).  $\beta$ -Myrcen und Terpinolen sind achirale Verbindungen. Enantiomeren-angereicherte Standards mit einem Überschuss jeweils eines Enantiomers erlaubten die Bestimmung der Elutionsreihenfolge der Enantiomere (B). Die Analyse des Extraktes aus der Umsetzung von LaLIMS\_RR mit GPP zeigt die Enantiomerenverteilung der Produkte (C).

### 3.4.1.2 Biochemische Charakterisierung

In weiteren Enzymassays wurden der pH-Wert und die Temperatur variiert, um die idealen Reaktionsbedingungen der (R)-Limonensynthase zu bestimmen. Die Gesamtmenge an gebildeten Produkten erreichte ein Maximum bei 30 °C und pH 7 (Abb. B-16A und B). Die Extrakte aus den Enzymassays wurden mittels HRGC-MS

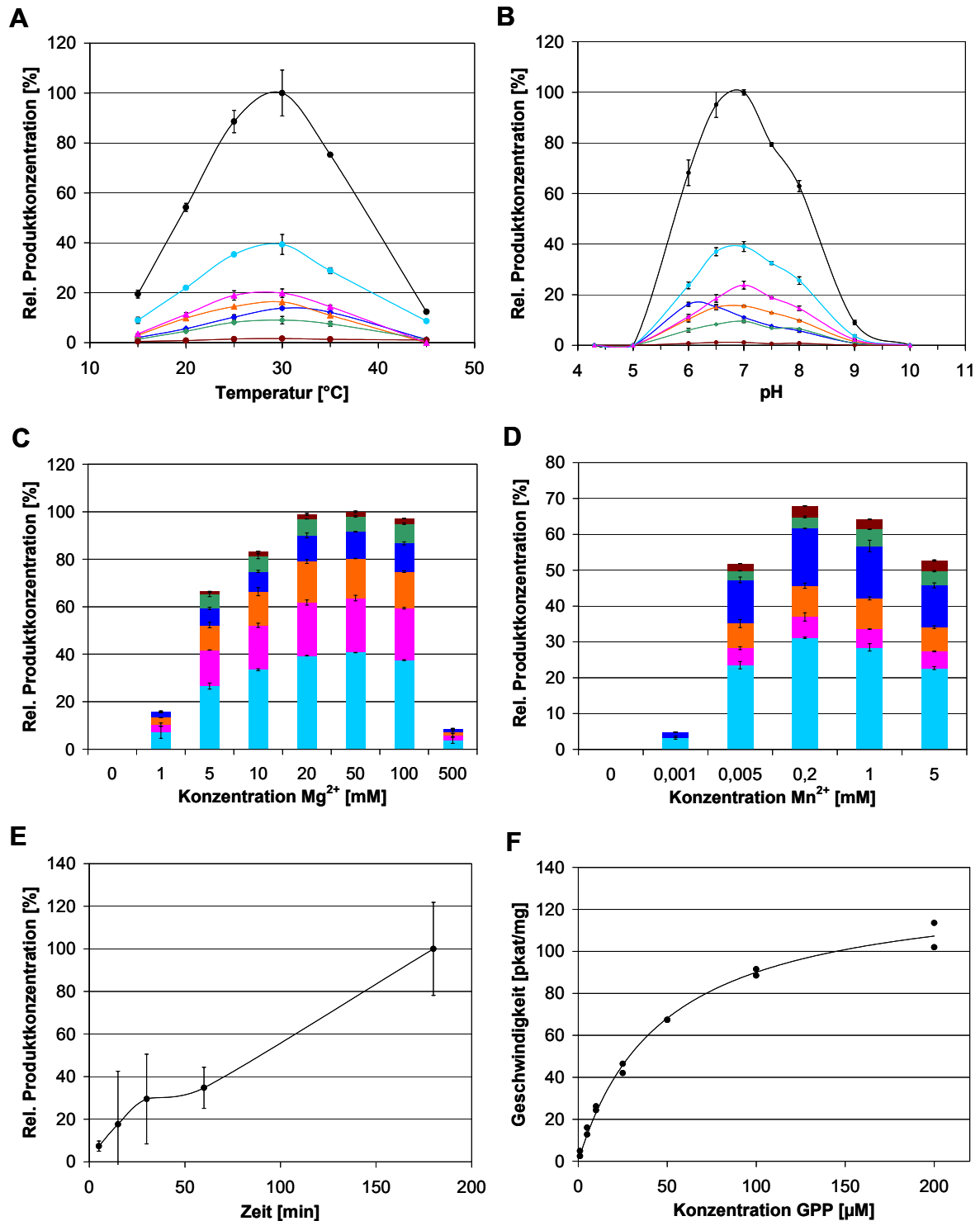
analysiert, sodass jede Komponente einzeln quantifiziert werden konnte. Daher ist erkennbar, dass die Bildung nicht aller Produkte in gleicher Weise von pH und Temperatur abhängen. Insbesondere  $\alpha$ -Pinen weicht von den anderen Monoterpenen deutlich ab. Das Maximum der Bildung dieses Produktes wird bei etwa 33 °C und pH 6 erreicht.

Terpensynthesen benötigen als Cofaktoren zweiwertige Kationen, üblicherweise  $Mg^{2+}$  oder  $Mn^{2+}$  (Bohlmann et al., 1998a). Daher wurde eine entsalzte Enzymlösung in Puffern mit  $Mg^{2+}$ -Konzentrationen zwischen 0 und 500 mM und  $Mn^{2+}$ -Konzentrationen zwischen 0 und 5 mM inkubiert (Abb. B-16C und D). Bis zu einer Konzentration von 50 mM  $Mg^{2+}$  bzw. 0,2 mM  $Mn^{2+}$  steigt die Menge der gebildeten Terpene an. Höhere Konzentrationen bewirken eine teilweise Inaktivierung der (R)-Limonensynthase, ohne Cofaktoren wird keine Produktbildung beobachtet. Im Vergleich von Magnesium- und Mangankationen werden mit letzteren nur maximal 68 % des Niveaus der magnesiumabhängigen Bildung erreicht. Interessanterweise unterscheiden sich die Anteile der einzelnen Komponenten auch in Abhängigkeit vom verwendeten Kation. Befindet sich  $Mn^{2+}$  im Reaktionspuffer, setzt sich das Terpengemisch aus 46 % Limonen, 9 % Terpinolen, 13 % Camphen, 23 %  $\alpha$ -Pinen, 5 %  $\beta$ -Myrcen und 4 %  $\alpha$ -Phellandren zusammen. Im Vergleich zur magnesiumabhängigen Bildung (prozentuale Anteile in Kap. B.3.4.1.1) wird fast der doppelte Anteil  $\alpha$ -Pinen gebildet, zu Lasten vor allem des Terpinolen-Anteils, der weniger als die Hälfte beträgt.

Der zeitliche Verlauf der enzymatischen Terpensynthese ist in einem Zeitraum bis 180 Minuten weitgehend linear, die Reaktionsgeschwindigkeit also konstant (Abb. B-16E).

Die kinetischen Parameter der (R)-Limonensynthase wurden unter den optimalen Bedingungen von 30 °C, pH 7 und 50 mM  $Mg^{2+}$  bei einer Reaktionsdauer von 15 Minuten bestimmt, indem Substratkonzentrationen zwischen 0 und 200  $\mu$ M GPP in Enzymassays eingesetzt wurden. Die Datenpunkte zeigen den erwarteten, hyperbolischen Verlauf einer Enzym-Sättigungskurve. Durch hyperbolische Regression mit der Software SigmaPlot wurde die Gleichung nach Michaelis-Menten erstellt, aus der die kinetische Konstante  $K_m$  mit  $47,4 \pm 3,8 \mu$ M und die maximale Geschwindigkeit  $V_{max}$  mit  $133 \pm 4,0$  pkat/mg hervorgeht. Die katalytische Effizienz  $k_{cat}/K_m$  errechnet sich zu  $2,55 \times 10^{-4} 1/(s \mu$ M).





**Abb. B-16:** Biochemische Charakterisierung der (R)-Limonensynthase (LaLIMS\_RR). Die Farben stehen für die Produkte ● Limonen, ● Terpinolen, ● Camphen, ●  $\alpha$ -Pinen, ●  $\beta$ -Myrcen und ●  $\alpha$ -Phellandren, schwarze Datenpunkte stehen für die Summe. In Enzymassays wurde die Abhängigkeit der relativen Produktkonzentrationen von der Temperatur (**A**), dem pH-Wert (**B**), der Mg<sup>2+</sup>-Konzentration (**C**) und der Mn<sup>2+</sup>-Konzentration (**D**) sowie die zeitabhängige Bildung der Gesamtprodukte (**E**) und die enzymkinetischen Daten nach Michaelis-Menten bestimmt (**F**).

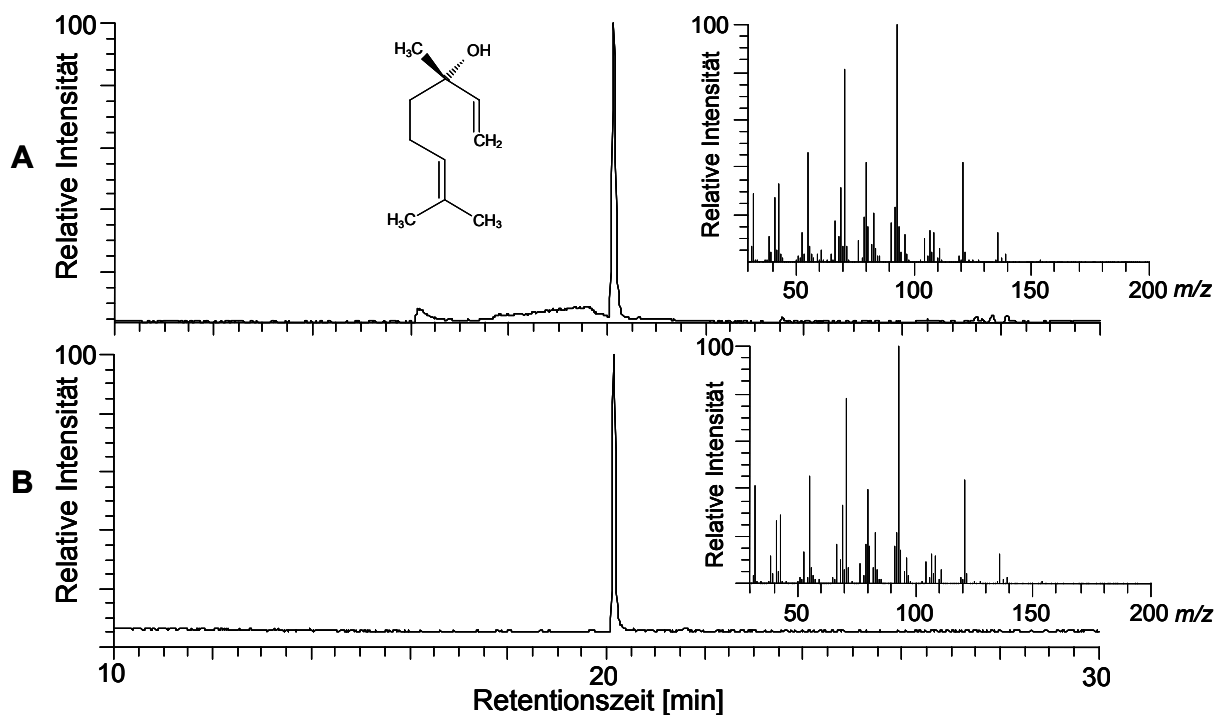
### 3.4.2 Charakterisierung einer (R)-Linaloolsynthase

Die zweite klonierte Terpensynthase wurde sowohl mit Signalpeptid (LaLINS\_M1) als auch ohne (LaLINS\_RR) exprimiert, um den Einfluss dieses Sequenzabschnittes auf die Produktbildung beurteilen zu können. Zur Charakterisierung wurde nur LaLINS\_M1 verwendet, während die kinetischen Parameter für beide Konstrukte bestimmt wurden.

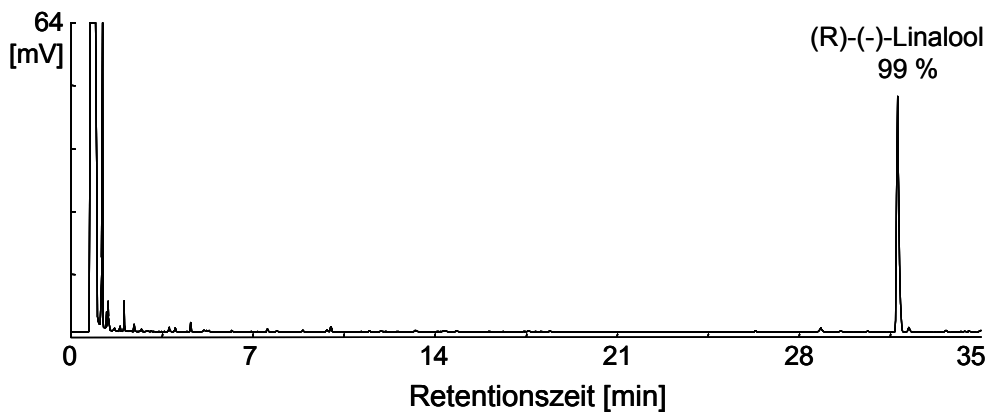
#### 3.4.2.1 Identifizierung der gebildeten Produkte

Wie die (R)-Limonensynthase akzeptierte auch LaLINS nur GPP als Substrat, während mit FPP und GGPP keine Produktbildung beobachtet wurde. Anders als das zuvor beschriebene Enzym katalysierte es die Reaktion von GPP zu nur einem Monoterpen, Linalool. Das Massenspektrum und die Retentionszeit stimmten mit einem authentischen Standard überein (Abb. B-17). Bei LaLINS handelt es sich also um eine *Lavandula angustifolia* Linaloolsynthase.

Der Extrakt aus der enzymatischen Umsetzung wurde zusätzlich mittels Chiralphasen-GC untersucht. LaLINS bildet zu 99 % das (R)-Enantiomer von Linalool (Abb. B-18).



**Abb. B-17:** HRGC-MS-Analyse (Totalionen chromatogramme und Massenspektren) eines Extraktes aus der Umsetzung von LaLINS\_M1 mit GPP (**A**) sowie eines Standards von Linalool (**B**). Die Strukturformel zeigt (R)-(-)-Linalool. Die Bestimmung der Chiralität ist in Abb. B-18 gezeigt.

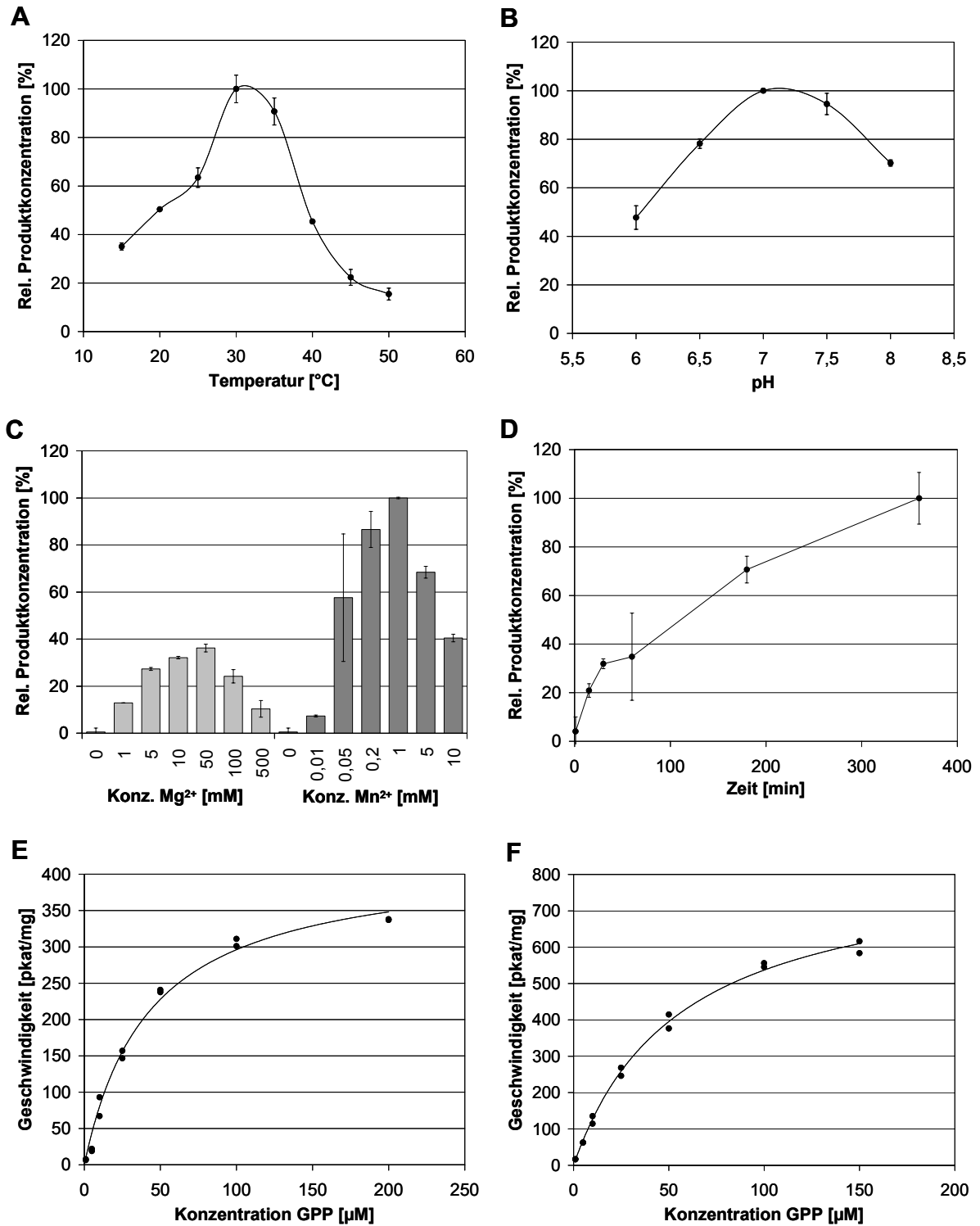


**Abb. B-18:** Chiralphasen-GC-Analyse des Produktes von LaLINS\_M1 mit GPP. Die Trennung der beiden Enantiomere wurde zuvor anhand eines Standards gezeigt (Abb. B-15).

### 3.4.2.2 Biochemische Charakterisierung

In vorläufigen Assays konnte die Aktivität der (R)-Linaloolsynthese durch die Anwesenheit von Rinderserumalbumin (BSA) erhöht werden, da vermutlich proteolytischer Abbau vermindert wurde. Infolgedessen wurden alle Assays mit BSA supplementiert. Die (R)-Linaloolsynthese ist analog zur (R)-Limonensynthese biochemisch charakterisiert worden. Sie zeigt die höchste Umsatzrate bei einer Temperatur von ca. 30 °C und bei einem pH-Wert von 7 (Abb. B-19A und B). Beim Test der Cofaktoren  $Mg^{2+}$  und  $Mn^{2+}$  ergab sich ein deutlich anderes Bild als bei der (R)-Limonensynthese. Die (R)-Linaloolsynthese bevorzugt Mangankationen und katalysiert die Reaktion bei 1 mM am effektivsten (Abb. B-19C). Steht stattdessen  $Mg^{2+}$  zur Verfügung, wird die maximale Produktkonzentration bei 50 mM erreicht. Diese beträgt aber nur 36 % des Maximalwertes, der bei Verwendung von Mangankationen erzielt wird. Erhöht man die Konzentration der Kationen jeweils weiter, so wird die (R)-Linaloolsynthese teilweise inaktiviert. Während einer Dauer von 360 Minuten verläuft die Bildung von (R)-Linalool annähernd mit konstanter Geschwindigkeit.

Wird die (R)-Linaloolsynthese mit Signalpeptid (LaLINS\_M1) mit unterschiedlichen Konzentrationen GPP inkubiert, erhält man die für enzymatische Reaktionen typische hyperbolische Sättigungskurve nach Michaelis-Menten (Abb. B-19E). Daraus ergibt sich für LaLINS\_M1 eine kinetische Konstante  $K_m$  von  $42,7 \pm 4,6 \mu M$  und eine maximale Geschwindigkeit von  $422 \pm 17 \text{ pkat/mg}$ . Die katalytische Effizienz  $k_{cat}/K_m$  beträgt  $9,11 \times 10^{-4} \text{ 1/(s } \mu M)$ . Demgegenüber erhöht sich die kinetische Konstante leicht auf  $55,8 \pm 4,1 \mu M$ , wenn das Enzym ohne Signalpeptid (LaLINS\_RR) untersucht wird (Abb. B-19F). Zudem steigt die Geschwindigkeit der Umsetzung deutlich auf  $837 \pm 25 \text{ pkat/mg}$  und dadurch auch die katalytische Effizienz auf  $1,34 \times 10^{-3} \text{ 1/(s } \mu M)$ .



**Abb. B-19:** Biochemische Charakterisierung der (R)-Linaloolsynthase. In Enzymassays wurde die Abhängigkeit der relativen Produktkonzentration von der Temperatur (**A**), dem pH-Wert (**B**), der Mg<sup>2+</sup>- und Mn<sup>2+</sup>-Konzentration (**C**) sowie die zeitabhängige Bildung von (R)-Linalool (**D**) bestimmt. Zudem wurde die Enzymkinetik nach Michaelis-Menten der (R)-Linaloolsynthase mit Signalpeptid (LaLINS\_M1) (**E**) und ohne (LaLINS\_RR) (**F**) erstellt.

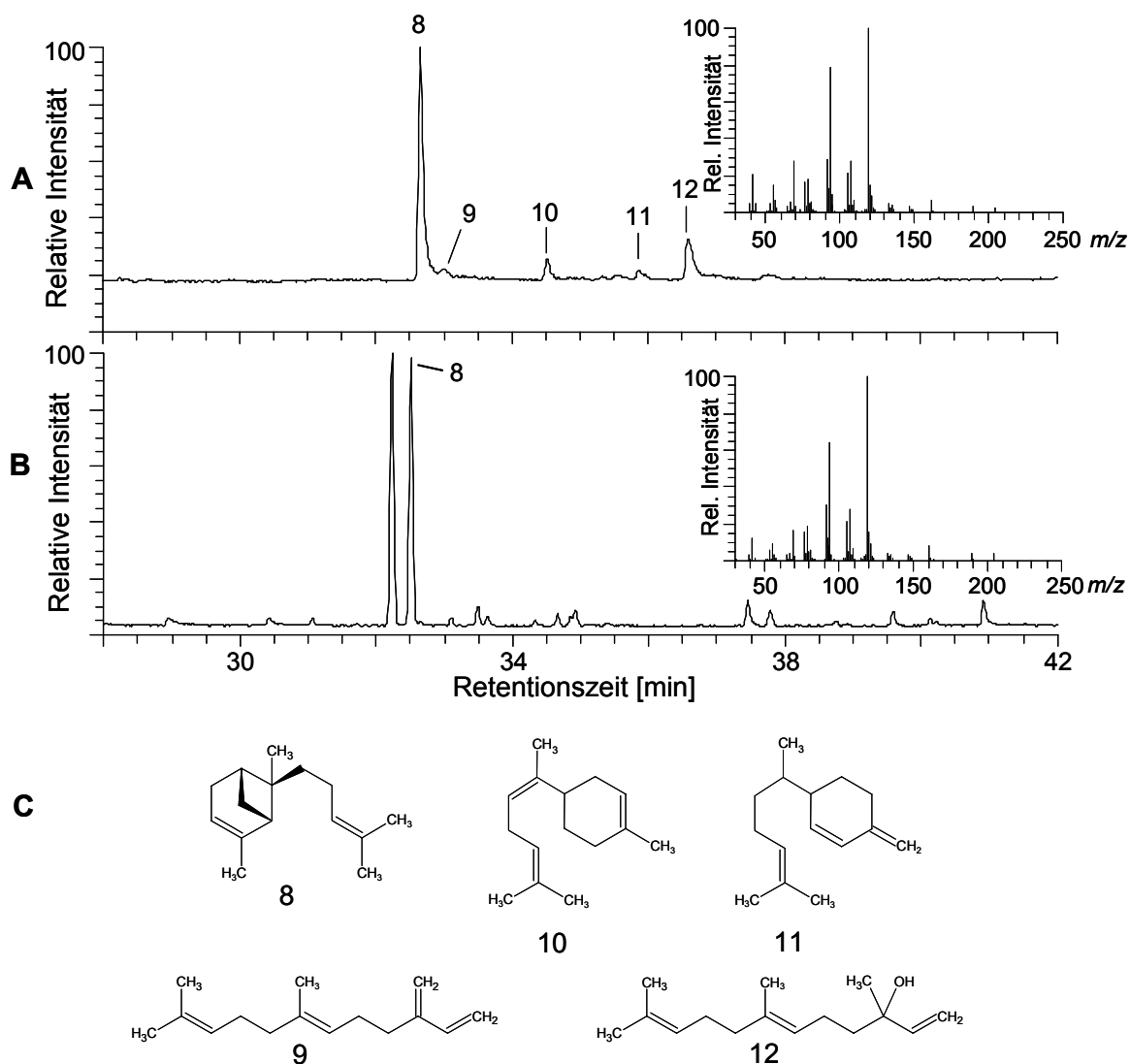
### 3.4.3 Charakterisierung einer *trans*- $\alpha$ -Bergamotensynthase

#### 3.4.3.1 Identifizierung der Produkte

In Assays, die mit der dritten klonierten Terpensynthase LaBERS durchgeführt wurden, entstanden mit dem Substrat FPP und in deutlich geringerem Maße auch mit GPP neue Produkte. Es handelt sich demnach um eine Sesquiterpensynthase, die eine Nebenaktivität mit GPP aufweist. Zur Identifizierung der Komponenten, die aus FPP gebildet wurden, standen keine Standardsubstanzen zur Verfügung. Daher wurden ihre Massenspektren mit einer Datenbank (NIST MS Search 2.0) und ihre linearen Retentionsindizes (LRI) mit publizierten Daten verglichen, um eine Zuordnung zu ermöglichen (Abb. B-20 und Tab. B-5). Danach bildet LaBERS 74 % *trans*- $\alpha$ -Bergamoten, 10 % (*E*)-Nerolidol, 6 % (*Z*)- $\alpha$ -Bisabolen und jeweils 5 % (*E*)- $\beta$ -Farnesen und  $\beta$ -Sesquiphellandren gemessen an den Flächen im Totalionen-chromatogramm. Da die Angaben zu den Retentionsindizes zwischen verschiedenen Quellen stark schwanken und die Massenspektren insbesondere für (*E*)-Nerolidol, (*Z*)- $\alpha$ -Bisabolen und (*E*)- $\beta$ -Farnesen nicht eindeutig waren, hat diese Zuordnung nur vorläufigen Charakter. Um die Identität des Hauptproduktes *trans*- $\alpha$ -Bergamotens zu bestätigen, wurden Blätter von *Hyptis suaveolens* mit n-Hexan extrahiert und mittels HRGC-MS gemessen. Das etherische Öl dieser Pflanze enthält mit 5 % einen sehr hohen Anteil an diesem Sesquiterpen (Eshilokun et al., 2005). In gleicher Menge ist  $\beta$ -Caryophyllen enthalten. Die Analyse bestätigte, dass diese zwei Komponenten in gleich hoher Menge im Öl enthalten sind (Abb. B-20B). Das Massenspektrum des *trans*- $\alpha$ -Bergamotens ist mit dem der Hauptkomponente von LaBERS identisch. Daher wird das Enzym aus Lavendel als *trans*- $\alpha$ -Bergamotensynthase bezeichnet.

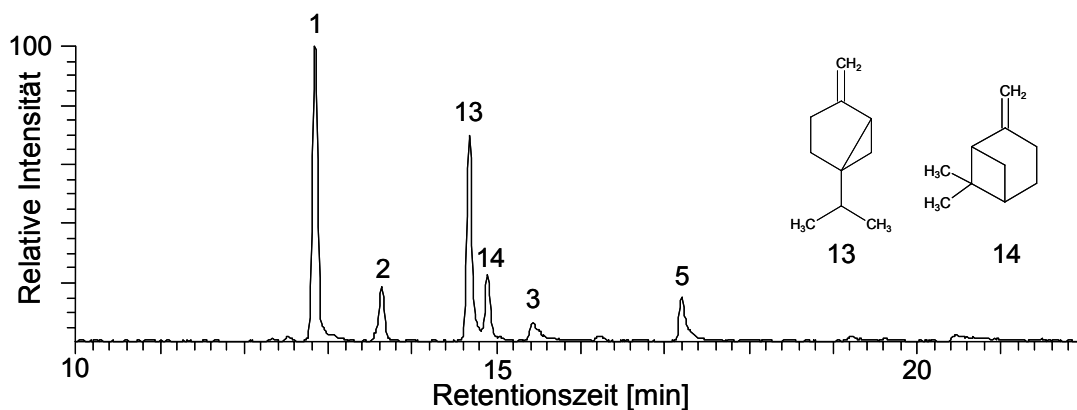
**Tab. B-5:** Bestätigung der Identitäten der von LaBERS gebildeten Sesquiterpene durch Vergleich der berechneten linearen Retentionsindizes mit publizierten Werten.

Komponente	Name	LRI (berechnet)	LRI (Referenz)
8	<i>trans</i> - $\alpha$ -Bergamoten	1438	1440 (Eshilokun et al., 2005)
9	( <i>E</i> )- $\beta$ -Farnesen	1448	1449 (Eshilokun et al., 2005)
10	( <i>Z</i> )- $\alpha$ -Bisabolen	1494	1495 (Verzera et al., 2000)
11	$\beta$ -Sesquiphellandren	1535	1528 (Da Silva et al., 2003)
12	( <i>E</i> )-Nerolidol	1558	1556 (Verzera et al., 2000)



**Abb. B-20:** HRGC-MS-Analyse (Totalionenchromatogramme und Massenspektren) eines Extraktes aus der Umsetzung von LaBERS mit FPP (**A**) und eines Diethyletherextraktes aus *Hyptis suaveolens* (**B**). Das Massenspektrum stammt jeweils von Signal 8 (*trans*- $\alpha$ -Bergamoten). Die Strukturformeln zeigen *trans*- $\alpha$ -Bergamoten (eines der beiden möglichen Enantiomere, die Chiralität wurde jedoch nicht bestimmt) (8), (*E*)- $\beta$ -Farnesen (9), (*Z*)- $\alpha$ -Bisabolon (10),  $\beta$ -Sesquiphellandren (11) und (*E*)-Nerolidol (12) (**C**). Die Zuordnung der Struktur von *trans*- $\alpha$ -Bergamoten erfolgte aufgrund der Übereinstimmung von Retentionsindex und Massenspektrum mit der Referenzsubstanz aus *Hyptis suaveolens*.

Wird LaBERS mit GPP inkubiert, so entstehen geringe Konzentrationen von Monoterpenen (Abb. B-21). Das Gemisch setzt sich aus 30 %  $\alpha$ -Pinen, 27 % Sabinen, 17 % Limonen, 11 %  $\beta$ -Pinen, 8 % Camphen und 7 %  $\beta$ -Myrcen zusammen. Die Identitäten dieser sechs Komponenten wurden durch Vergleich der Retentionszeiten und Massenspektren mit authentischen Standardsubstanzen abgesichert. Die Chiralitäten wurden aufgrund der sehr geringen Produktmengen nicht bestimmt.

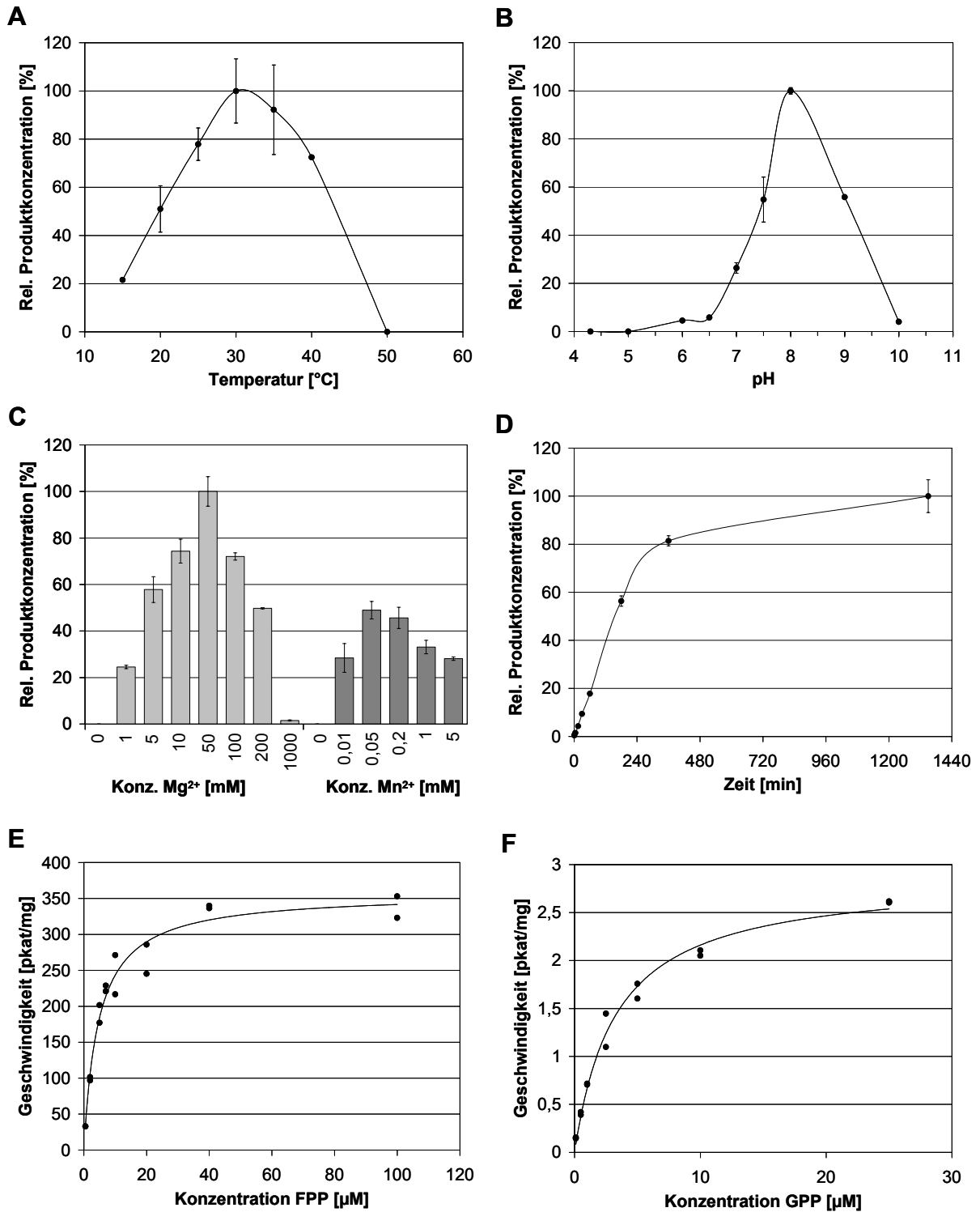


**Abb. B-21:** HRGC-MS-Analyse (Ionenchromatogramm  $m/z$  93) eines Extraktes aus der Umsetzung von LaBERS mit GPP. Die Komponenten wurden als  $\alpha$ -Pinen (1), Camphen (2), Sabinen (13),  $\beta$ -Pinen (14),  $\beta$ -Myrcen (3) und Limonen (5) identifiziert. Die Strukturformeln von (+)-Sabinen und (+)- $\beta$ -Pinen sind angegeben, die der anderen Komponenten wurden zuvor abgebildet (Abb. B-13C). Die Chiralitäten wurden jedoch nicht bestimmt.

### 3.4.3.2 Biochemische Charakterisierung

Wie für die (R)-Limonen- und (R)-Linaloolsynthese wurden auch für die *trans*- $\alpha$ -Bergamotensynthese die optimalen Bedingungen der Enzymreaktion bestimmt (Abb. B-22A bis C). Da BSA einen stabilisierenden Effekt auf das Enzym hatte, wurden die Assays damit supplementiert. Für die biochemische Charakterisierung ist jeweils nur die Konzentration von *trans*- $\alpha$ -Bergamoten bestimmt worden, da die anderen Produkte zur Quantifizierung nicht in ausreichend großer Menge gebildet wurden. Bei 30 °C und pH 8 wird FPP am effizientesten umgesetzt. Der Test der Cofaktoren ergab, dass Magnesiumkationen präferiert werden und bei einer Konzentration von 50 mM den stärksten Effekt haben.  $Mn^{2+}$  bewirkt in einer Konzentration von 0,05 mM die höchste Aktivierung der *trans*- $\alpha$ -Bergamotensynthese, die aber nur 49 % des Niveaus von  $Mg^{2+}$  erreicht. Die Bildung von *trans*- $\alpha$ -Bergamoten verläuft bis zu einer Reaktionszeit von drei Stunden linear und verlangsamt sich danach deutlich (Abb. B-22D).

In anschließenden Assays wurden unter den optimalen Bedingungen die kinetischen Parameter bei Verwendung von FPP und GPP bestimmt (Abb. B-22E und F). Da *trans*- $\alpha$ -Bergamoten nicht als Standardsubstanz zur Verfügung stand, wurde der Gehalt als (R)- $\alpha$ -Cedren-Äquivalente berechnet. Für die kinetische Analyse mit FPP konnten nur die Signale der Hauptkomponente *trans*- $\alpha$ -Bergamoten ausgewertet werden, in den Assays mit GPP nur die von  $\alpha$ -Pinen und Sabinen. Die Bildung der Produkte in Abhängigkeit von der Substratkonzentration zeigt in beiden Fällen einen



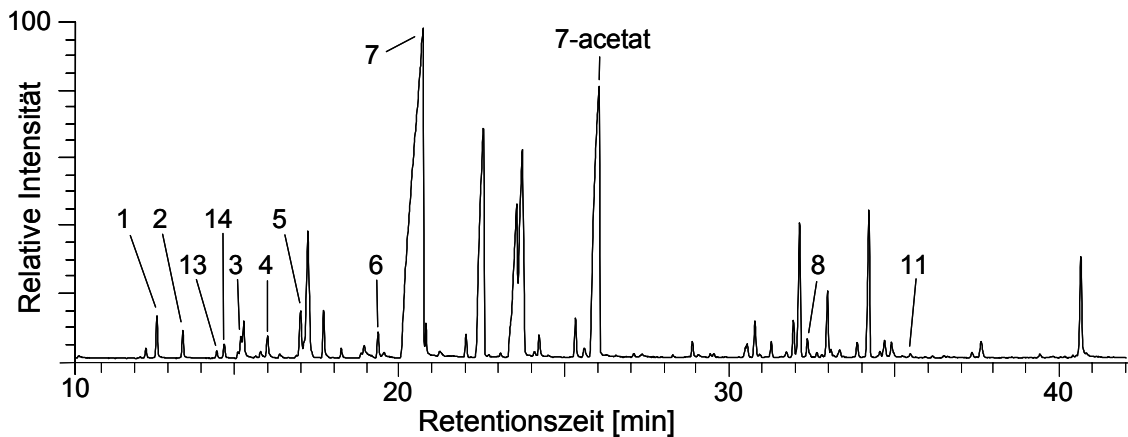
**Abb. B-22:** Biochemische Charakterisierung der *trans*- $\alpha$ -Bergamotensynthase (LaBERS). In Enzymassays wurde die Abhängigkeit der relativen Produktkonzentration von der Temperatur (**A**), dem pH-Wert (**B**), der Mg<sup>2+</sup>- und Mn<sup>2+</sup>-Konzentration (**C**) sowie die zeitabhängige Bildung von *trans*- $\alpha$ -Bergamoten (**D**) bestimmt. Zudem wurde die Enzymkinetik nach Michaelis-Menten bei Inkubation mit FPP (**E**) und GPP (**F**) erstellt.



hyperbolischen Verlauf. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit  $V_{\max}$  mit FPP als Substrat beträgt  $358 \pm 12$  pkat/mg, die halbmaximale Geschwindigkeit wird bei einem  $K_m$ -Wert von  $4,7 \pm 0,6$   $\mu\text{M}$  erreicht. Die katalytische Effizienz beträgt  $6,74 \times 10^{-3}$   $1/(\text{s } \mu\text{M})$ . Werden stattdessen verschiedene Konzentrationen GPP getestet, läuft die Reaktion nur mit maximal  $2,9 \pm 0,1$  pkat/mg ab. Die Substrataffinität ist dennoch relativ hoch, ausgedrückt durch die Konstante  $K_m$ , die  $3,3 \pm 0,3$   $\mu\text{M}$  beträgt. Diese Werte ergeben eine katalytische Effizienz von  $7,76 \times 10^{-5}$   $1/(\text{s } \mu\text{M})$ .

### 3.5 Vergleich mit einem Extrakt aus Lavendelblüten

Lavendelblüten wurden mit n-Hexan extrahiert und mittels HRGC-MS analysiert, um die Relevanz der drei klonierten Enzyme für die Bestandteile des etherischen Öls zu bestimmen (Abb. B-23). Die Angaben in der Literatur über die Zusammensetzung des etherischen Öls wurden im Hinblick auf die Hauptkomponenten im Wesentlichen bestätigt (Shellie et al., 2002; Kim und Lee, 2002). Im Extrakt, der neben Terpenen auch andere Verbindungen wie aliphatische Alkohole und deren Ester enthält, konnten alle Produkte der drei Enzyme durch Vergleich der Massenspektren und Retentionszeiten nachgewiesen werden bis auf die Sesquiterpene (*E*)- $\beta$ -Farnesen, (*Z*)- $\alpha$ -Bisabolen und (*E*)-Nerolidol. Über 50 % der Gesamtfläche der im Totalionenchromatogramm erfassten Verbindungen lassen sich mit der Aktivität der drei Terpensynthesen erklären, wenn Linalylacetat (14 %) und die von LaBERS gebildeten Monoterpene mitberechnet werden. Da die Monoterpene in Plastiden gebildet werden, ist es jedoch relativ unwahrscheinlich, dass LaBERS *in vivo* dafür verantwortlich ist. Weitere mengenmäßig wichtige Komponenten des etherischen Öls, die nicht von den klonierten Enzymen synthetisiert werden, sind 1,8-Cineol, Campher, Borneol, Terpinen-4-ol,  $\beta$ -Caryophyllen und Germacren D, die zusammen etwas mehr als 30 % der Gesamtfläche einnehmen.



**Abb. B-23:** HRGC-MS-Analyse (Totalionenchromatogramm) eines Hexanextraktes aus Lavendelblüten. Die Nummerierung der Komponenten richtet sich nach den vorausgehenden Abbildungen. Komponente 4 ( $\alpha$ -Phellandren) ko-eluiert in diesem Chromatogramm mit  $\delta$ -3-Caren.

### 3.6 Diskussion

#### 3.6.1 Zusammenfassung der Enzymeigenschaften

Die drei Terpensynthasen, die aus *Lavandula angustifolia* kloniert und charakterisiert wurden, sind die ersten, die in dieser Pflanze beschrieben sind. Die Analyse der Sequenzen ermöglichte bereits die Identifizierung von LaLIMS und LaLINS als Monoterpensynthasen und von LaBERS als Sesquiterpensynthase, weil sie entsprechende Sequenzhomologien zu bereits charakterisierten Terpensynthasen aufweisen. Da GPP, das Substrat der (R)-Linalool- und (R)-Limonensynthase, in Plastiden gebildet wird, tragen die beiden Enzyme ein Signalpeptid, während die *trans*- $\alpha$ -Bergamotensynthase im Cytosol verbleibt, dem Ort der FPP-Bildung.

Im phylogenetischen Baum sind alle drei Enzyme benachbart zu anderen Terpensynthasen der *Lamiaceae*, vor allem *Ocimum basilicum* und *Salvia officinalis* (Wise et al., 1998; Iijima et al., 2004). Es bestätigt sich, dass die Terpensynthasen des Sekundärstoffwechsels in erster Linie homolog zu Enzymen der gleichen oder nahe verwandten Spezies sind und weniger zu solchen mit gleicher Reaktivität (Tholl et al., 2006). Die Ursache ist die späte und rasche Evolution dieser Terpensynthasen im Vergleich zu den Enzymen des Primärstoffwechsels wie die der Klassen TPS-c und TPS-e, die deutlich mehr Homologie untereinander aufweisen.

Die biochemischen Eigenschaften der drei Terpensynthasen aus *Lavandula angustifolia* unterscheiden sich in einigen Parametern (Tab. B-6). So liegt der optimale pH-Wert der (R)-Limonensynthase und (R)-Linaloolsynthase bei 7,0, der der *trans*- $\alpha$ -Bergamotensynthase bei 8,0. Während für LaLIMS und LaBERS die höchste

Aktivität mit Magnesiumkationen bei 50 mM beobachtet wurde, wird (R)-Linalool in Gegenwart von 1 mM Mangankationen bevorzugt gebildet. Bei den kinetischen Parametern sind die Michaelis-Menten-Konstanten von LaLIMS und LaLINS im Vergleich zu anderen Terpensynthesen, die meist einen  $K_m$  im niedrigen  $\mu\text{M}$ -Bereich haben, relativ hoch (Wise und Croteau, 1999). Wird die Linaloolsynthese ohne Signalpeptid exprimiert, steigen der  $K_m$ -Wert und die katalytische Aktivität an. Ein ähnliches Verhalten wurde auch bei anderen Terpensynthesen beobachtet (Williams et al., 1998; Crowell et al., 2002). Die Bergamotensynthese weist einen niedrigeren  $K_m$ -Wert auf, wie er typisch für Terpensynthesen ist. Neben FPP setzte das Enzym mit geringer Geschwindigkeit auch GPP um, ein verbreitetes Merkmal von Sesquiterpensynthesen (Crock et al., 1997; Colby et al., 1998; Steele et al., 1998).

**Tab. B-6:** Überblick über die biochemischen Daten der charakterisierten Terpensynthesen. Die Prozentsätze geben die Aktivitäten relativ zur maximalen Aktivität mit dem jeweils anderen Kation an.

	LaLIMS_RR +GPP	LaLINS_M1 +GPP	LaLINS_RR +GPP	LaBERS +FPP	LaBERS +GPP
pH	7,0	7,0	-	8,0	-
Temperatur	30 °C	30 °C	-	30 °C	-
Mg <sup>2+</sup> -Konz.	50 mM	10-50 mM (36 %)	-	50 mM	-
Mn <sup>2+</sup> -Konz.	0,2 mM (68 %)	1 mM	-	0,05 mM (49 %)	-
$K_m$ [ $\mu\text{M}$ ]	47,4±3,8	42,7±4,6	55,8±4,1	4,7±0,6	3,3±0,3
$V_{\max}$ [pkat/mg]	133±4,0	422±17	837±25	358±12	2,9±0,1
$k_{\text{cat}}$ [1/s]	0,0121	0,0389	0,0748	0,0317	2,56x10 <sup>-4</sup>
$k_{\text{cat}}/K_m$ [1/(s $\mu\text{M}$ )]	2,55x10 <sup>-4</sup>	9,11x10 <sup>-4</sup>	1,34x10 <sup>-3</sup>	6,74x10 <sup>-3</sup>	7,76x10 <sup>-5</sup>

### 3.6.2 (R)-Limonensynthase

Die (R)-Limonensynthase katalysiert die Bildung von sechs verschiedenen Monoterpenen, darunter acyclische, cyclische und bicyclische Vertreter. Diese geringe Produktspezifität wird häufig bei Terpensynthesen beobachtet und erklärt, wie die Vielzahl an Terpenen in Lavendelöl bei geringem Aufwand für die Proteinbiosynthese gebildet werden kann (Bohlmann et al., 1997 und 2000; Wise et al., 1998; Chen et al., 2003; Iijima et al., 2004). Interessanterweise variiert das Produktspektrum des Enzyms abhängig von pH-Wert, Temperatur und zweiwertigem

Kation. Besonders beeinflusst ist die Bildung von  $\alpha$ -Pinen, das bei höherer Temperatur, niedrigerem pH und in Anwesenheit von Mangankationen bevorzugt entsteht. Eine ähnliche Abhängigkeit wurde bisher nicht berichtet, da die biochemische Charakterisierung anderer Terpensynthasen meist in Assays mit radioaktiv markiertem Substrat durchgeführt und die Gesamtproduktmenge bestimmt wurde. Eine Trichodiensynthase, bei der ein Aspartat des DDXXD-Motivs experimentell substituiert worden war, produzierte aber in Abhängigkeit von Mangan ein anderes Produktspektrum als mit Magnesium (Cane et al., 1996). Die Kationen beeinflussen die Form des katalytischen Zentrums, indem sie das Substrat-Diphosphat in einer polyhedrischen Struktur koordinieren und die Ionisierung stabilisieren (Kap. A.3.2.6) (Christianson, 2006). Bei LaLIMS scheint die räumliche Geometrie des aktiven Zentrums durch Mangankationen so verändert zu sein, dass der Reaktionsweg zum  $\alpha$ -Pinen verstärkt abläuft. Auch die Geschwindigkeit der Terpensynthese wird vom Kation beeinflusst und ist mit Magnesiumkationen größer.

### 3.6.3 (R)-Linaloolsynthase

LaLINS bildet ausschließlich den Monoterpenalkohol (R)-Linalool. Auch die bisher beschriebenen (R)-Linaloolsynthasen aus *Ocimum basilicum* (Iijima et al., 2004), *Artemisia annua* (Jia et al., 1999) und *Mentha citrata* (Crowell et al., 2002) sowie die (S)-Linaloolsynthasen aus *Clarkia breweri* (Dudareva et al., 1996), *Arabidopsis thaliana* (Chen et al., 2003) und *Fragaria x ananassa* (Aharoni et al., 2004) transformierten GPP zu nur einem Produkt. Lediglich die (R)-Linaloolsynthase aus der Gymnospermen-Art *Picea abies* synthetisierte sehr geringe Mengen (< 2 %) anderer Monoterpene (Martin et al., 2004). Die Ursache liegt im Reaktionsmechanismus, der anders als bei den Terpenocyclasen nicht über die anfängliche Ionisierung des Substrates hinausgeht. Das Geranyl-Carbokation reagiert sofort mit Wasser, sodass keine Cyclisierungsreaktionen ablaufen, sondern je nach Angriffsseite (R)- oder (S)-Linalool entsteht (Pichersky et al., 1995; Crowell et al., 2002). Die Sequenz der (R)-Linaloolsynthase aus *Mentha citrata* ist LaLINS am ähnlichsten (63 % Identität auf Proteinebene). Die Modellierung des aktiven Zentrums dieses Enzyms zeigte, dass eine Aminosäuren-Schleife, die in anderen Terpenocyclasen den Zugriff durch Wasser verhindert, an anderer Position platziert ist (Crowell et al., 2002). Verursacht wird dies durch die Deletion von drei Aminosäuren in der Nähe des C-Terminus, die im Vergleich zu anderen Terpenocyclasen der

*Lamiaceae* fehlen. Auch in LaLINS sind diese drei Aminosäuren zwischen Aminosäure 547 und 548 nicht vorhanden, im Gegensatz zu den beiden anderen Enzymen LaLIMS und LaBERS, bei denen Cyclisierungsreaktionen möglich sind (Abb. B-10). Die (R)-Linaloolsynthese aus Lavendel kann daher wie die aus *Mentha citrata* als eine „defekte“ Form einer Terpen cyclase angesehen werden, die nur noch den Ionisierungsschritt katalysieren kann. Möglicherweise haben sich aus dem gleichen Grund und unabhängig voneinander Linaloolsynthesen in den Klassen TPS-f, TPS-g, TPS-d und TPS-b aus cyclisierungsfähigen Vorläufern entwickelt (Abb. B-11).

Das Enzym aus *Mentha citrata* bildet wie LaLINS zu 98 % das (R)-Enantiomer und hat einen gleichen, sehr hohen  $K_m$ -Wert von 56  $\mu\text{M}$  GPP für das um das Signalpeptid verkürzte Protein (Crowell et al., 2002). Da das ätherische Öl von *Mentha citrata* ausschließlich (R)-Linalool und (R)-Linalylacetat enthält, kommt dem Enzym eine besondere Bedeutung zu. Genauso dürfte auch LaLINS für den großen Anteil des (R)-Linalools und (R)-Linalylacetats in Lavendelöl verantwortlich sein.

#### 3.6.4 *trans*- $\alpha$ -Bergamotensynthase

Mit LaBERS wurde zum ersten Mal eine Sesquiterpensynthase kloniert und charakterisiert, die überwiegend *trans*- $\alpha$ -Bergamoten bildet. Einige Sesquiterpensynthesen katalysieren die Bildung nur eines Produktes wie die (*E*)- $\alpha$ -Bisabolensynthase aus *Abies grandis* (Bohlmann et al., 1998b), Germacren A-Synthesen aus der Zichorie (Bouwmeester et al., 2002) und *Artemisia annua* (Bertea et al., 2006) oder eine  $\beta$ -Farnesen-Synthase ebenfalls aus *A. annua* (Picaud et al., 2005). Viele Sesquiterpencyclasen transformieren FPP jedoch in mehrere verschiedene Produkte, wie die Enzyme aus *Abies grandis*, *Lycopersicon esculentum*, *Mentha x piperata*, *Artemisia annua* und *Arabidopsis thaliana* (Steele et al., 1998; Colby et al., 1998; Crock et al., 1997; Mercke et al., 1999; Chen et al., 2003; Tholl et al., 2005). Nur vier Enzyme sind bisher charakterisiert worden, die *trans*- $\alpha$ -Bergamoten als Nebenprodukt bilden. Dies sind zwei stark miteinander verwandte Sesquiterpensynthesen mit sehr breitem Produktspektrum (TPS4 und TPS5) und eine (*E*)- $\beta$ -Farnesensynthase (TPS10) aus *Zea mays* sowie eine  $\alpha$ -Zingiberensynthase aus *Ocimum basilicum* (Köllner et al., 2004; Schnee et al., 2006; Iijima et al., 2004). Mit letzterem Enzym ist LaBERS phylogenetisch am stärksten verwandt (Abb. B-11). Überraschenderweise sind diese beiden Enzyme den Monoterpensynthesen ähnlicher als andere Sesquiterpen-

synthasen und daher der Klasse TPS-b zugeordnet. Ebenso befindet sich eine Farnesensynthase aus *Malus domestica* in dieser Klasse (Pechous und Whitaker, 2004). Es ist gut vorstellbar, dass diese Enzyme von Monoterpensynthasen abstammen, indem sie das Signalpeptid verloren und FPP als Substrat akzeptierten. Unterstützt wird diese Vermutung dadurch, dass LaBERS auch GPP umsetzt. Dies geschieht sogar mit einer etwas größeren Affinität (niedrigerer  $K_m$ ) als mit FPP, wenngleich mit deutlich niedrigerer Effizienz. Erstaunlich ist hierbei, dass die Fähigkeit zu komplexen Cyclisierungsreaktionen bei LaBERS und bei der  $\alpha$ -Zingiberensynthase aus Basilikum nicht verloren wurde oder durch weitere Mutationen neu entstanden ist. Die Produktspezifität der Lavendel *trans*- $\alpha$ -Bergamotensynthase ist sogar vergleichsweise hoch. Die Farnesensynthase aus *Malus domestica* könnte dagegen wie die Linaloolsynthasen ein „defektes“ Enzym darstellen, das lediglich die anfängliche Ionisierung von FPP unterstützt.

### 3.6.5 Bedeutung der drei Terpensynthasen in *Lavandula angustifolia*

Die drei klonierten Terpensynthasen erklären einen großen Teil der im Lavendelöl enthaltenen Terpene. Das Öl enthält jedoch noch viele weitere Verbindungen, deren Biosynthese offenbar von anderen Enzymen bewerkstelligt wird. Andererseits wurden *in vitro* einige Sesquiterpene gebildet, die im Lavendelöl nicht nachgewiesen werden konnten. Ähnliche Beobachtungen wurden bei der Charakterisierung anderer Enzyme gemacht (Iijima et al., 2004). Möglicherweise werden die Produkte *in vivo* metabolisiert oder sie entstehen nur *in vitro*, da die bakteriell exprimierten Enzyme strukturell nicht vollständig mit den pflanzlichen übereinstimmen.

Die Kenntnis der drei Enzyme LaLIMS, LaLINS und LaBERS stellt eine Grundlage dafür dar, das Aromaprofil von *Lavandula angustifolia* durch *metabolic engineering* zu beeinflussen (Kap. A.3.7). Die Herstellung von transgenen Lavendelpflanzen gelang bereits für zwei wirtschaftlich bedeutende Lavendelarten, *Lavandula x intermedia* (Lavandin-Lavendel) und *Lavandula latifolia* durch Infektion mit *Agrobacterium tumefaciens* (Dronne et al., 1999; Munoz-Bertomeu et al., 2006). Dabei wurde in *L. latifolia* durch die Hochregulierung der 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphatsynthase die Produktion der Monoterpene deutlich erhöht. Mit den dargestellten Ergebnissen könnte in Zukunft durch gezielte Beeinflussung der für das Aroma von Lavendel besonders bedeutenden (R)-Linaloolsynthase die Zusammensetzung des Lavendelöls gesteuert werden.

## 4 Acyltransferasen in *Lavandula angustifolia*

In Lavendelöl kommen einige acylierte Verbindungen vor, die einen wichtigen Beitrag zum Aroma leisten. Besonders (R)-Linalylacetat sticht mit einem Anteil von 15-45 % besonders hervor. Daneben wurden unter anderem die Acetate der Terpenalkohole Borneol, Lavandulol, Nerol und Geraniol nachgewiesen, sowie Ester kurzkettiger Alkohole wie Octen-3-ylacetat, Hexylbutyrat und Hexylisobutyrat (Shellie et al., 2002). Nachdem die Entstehung des (R)-Linalools durch die Katalyse der in Kapitel B-3 beschriebenen (R)-Linaloolsynthase aufgeklärt worden war, sollte auch die Bildung des Acetyl-Derivates untersucht werden. Daher wurden Acyltransferasen aus *Lavandula angustifolia* kloniert und charakterisiert.

### 4.1 Klonierung von Acyltransferasen

Zur Klonierung von Acyltransferasen wurde die gleiche Vorgehensweise wie bei den Terpensynthasen gewählt. Mittels PCR mit degenerierten Primern sollte auch hier ein Bruchstück eines zutreffenden Transkripts erhalten werden, das anschließend durch RACE-PCR bis auf Volllänge vergrößert werden sollte. Zunächst wurde ein Primer entworfen, der auf einer charakteristischen Sequenz von Acyltransferasen basiert. Eine solche Konsensussequenz stellt das DFGWG-Motiv dar (Kap. A.4.2). Eine Rückübersetzung dieser Sequenz in Nukleotide wurde mit dem degenerierten Primer ATDeg\_FW verwirklicht. Die Variabilität in vier Basen wurde durch den Einbau von Inosin (I) berücksichtigt, das mit allen Basen Bindungen eingeht (Abb. B-24).

Aminosäure	D (Asp)	F (Phe)	G (Gly)	W (Trp)	G (Gly)
Genetischer Code	GAT GAC	TTT TTC	GGT GGC GGA GGG	TGG	GGT GGC GGA GGG
ATDeg_FW	GA(TC)	TT(TC)	GGI	TGG	GG

**Abb. B-24:** Herleitung der Sequenz des degenerierten Primers ATDeg\_FW aus der Konsensussequenz DFGWG der Acyltransferasen.

Aus Lavendelblüten wurde mRNA isoliert und in einer RT-PCR mit dem Oligo(dT)<sub>18</sub>-Primer in cDNA umgeschrieben. Diese diente als Matrize in einer PCR, in der die Primer ATDeg\_FW und GR3', der an der Ankersequenz des Oligo(dT)<sub>18</sub>-Primers

hybridisiert, verwendet wurden. Auf diese Weise wurde ein PCR-Fragment amplifiziert, das mit etwa 350 bp der erwarteten Größe eines Acyltransferasen-Bruchstückes entsprach. Nach Subklonierung wurde die Plasmid-DNA mehrerer Kolonien sequenziert. Zwei unterschiedliche Sequenzen ergaben in einer BLAST-Datenbankabfrage gute Übereinstimmungen für bereits bekannte Sequenzen von Acyltransferasen.

Folglich wurden die fehlenden Sequenzabschnitte der beiden Transkripte über RACE-PCR ermittelt. Da aus der PCR mit dem degenerierten Primer bereits das 3'-Ende bekannt war, wurde lediglich das 5'-RACE-PCR-Protokoll angewendet. Auf diese Weise konnte die Gesamtsequenz der beiden potenziellen Acyltransferasen *LaAT1* und *LaAT2* zusammengesetzt werden und in einer weiteren PCR die Volllänge kloniert werden.

## 4.2 Sequenzanalyse und phylogenetische Einordnung

Die offenen Leserahmen (ORF) von *LaAT1* und *LaAT2* betragen 1383 bzw. 1344 bp, was 460 bzw. 447 Aminosäuren entspricht. Daraus errechnet sich eine Proteingröße von 50,6 bzw. 49,1 kDa. Die Analyse der Proteinsequenzen mit verschiedener Software (Predotar, SignalP, TargetP, PSORT) ergab, dass die Enzyme am N-Terminus mit sehr großer Wahrscheinlichkeit keine Signalpeptide enthalten und *LaAT1* und *LaAT2* demnach im Cytosol lokalisiert sind. Diese Daten stehen im vollen Einklang mit den durchschnittlichen Werten der bisher charakterisierten BAHD-Acyltransferasen (D'Auria, 2006).

Bei genauerer Betrachtung der Sequenzen der beiden klonierten Enzyme sind die charakteristischen Motive der BAHD-Acyltransferasen erkennbar. Im *Alignment* von *LaAT1* und *LaAT2* mit Enzymen aus den fünf definierten BAHD-Klassen (Kap. A.4.3) wird dies besonders deutlich (Abb. B-25). Das HXXXD-Motiv, dessen Histidin aktiv am Reaktionsmechanismus der Acylübertragung beteiligt ist, ist ebenso in der Sequenz vorhanden wie das hochkonservierte DFGWG-Motiv, das vermutlich die räumliche Struktur des aktiven Zentrums gewährleistet. Lediglich ZmGlossy2, das zu der biochemisch nicht charakterisierten Klasse II der BAHD-Acyltransferasen gehört, enthält dieses Sequenzelement nicht. Das relativ schwach konservierte Motiv LSXTLXXXYYXXXG kann man in ähnlicher Weise ebenfalls bei beiden Lavendel-Enzymen finden. Ein deutlicher Unterschied zwischen *LaAT1* und den anderen Acyltransferasen ist kurz nach dessen HXXXD-Motiv zu erkennen. Dort beginnt ein



NtHQT	1	-----MGSEKMKIKNTKESTLVKPKSPE-----FTTKRLWSSNLDLIVGR-IHLTVVYFKPNG-----SSNFFD---SKI	MX
LaAT1	1	-----MKIEKKESTLVRPAAE-----TFSGSLWSSNLDLSPANYHTLTVVYFKSHDG-----SANFFD---ATA	LK
AtAT	1	-----MKIKKMSKTHVKPTKPV-----LGKKQPHLITFDLPYLAFYINQKFLLLKFKFNLLDLLEBPTFQNEVVENL	K
LaAT2	1	MGEVANDEKKVGSVKTFNPTTYVKKPKP-----IGRKECQLVTFDLPYLAFYINQKFLLLKFKFNLLDLLEBPTFQNEVVENL	K
VlAMAT	1	-----MASPSSPLVFSVNRCPVQIVRPNP-----TREVVKLSDIDDEQEGRRFQIPVIMFVRNNP-----LMEGKDPVKVLR	R
HvACT	1	-----MKITVHSSKAKVPEYGACGLAGCTADVVPVLPVLDKANFDYVSVIVAFHAP-----APPNAVLE	E
Pf3AT	1	-----VITETCRVGFPPDS-----VAQSVDLTFDFDMTWLHFHPMQQLLFFEFPCS-----KQHSSGSDIVPKLE	E
CbBEAT	1	-----MNVTHSKKLLKPSIETP-----NHLQKLNLSLDDQIQIPFVVGLETFHMETLSDN-----SDITLSKLE	E
FaSAAT	1	-----MEKLEVSINSHKHTIKPSTSS-----TELQPYKLTLLDQLTPPAVVPVFFVPIITDHD-----FNLPQTLADLR	R
ZmGlossy2	1	-MVFEQHEEEAAPGAVHGHRSTVVVSS-VNGEVDYLAADAALAFKLYLRGVYYVRSGDG-----LTKVLE	K
NtHQT	64	EALSNVLSVDFYPMAGRLARDEQGRIEINCNGE-----CVLFVEAESD-AFVDDFGDFTPS-LETRKLIPTVDTS---G	D
LaAT1	59	EALSRAVLDVDFYPMAGRLKLNKENRLEINCNGE-----CILLVEAESD-GALDEDFGDFTPR-PELN-LIPKVDYS---KG	D
AtAT	67	DGLGLVLEDFYQIAGKLAKDEGVFRVEYDAEDSE-INGVEFVSAHAADVTVDLTAEDGT-AKFKELVPYNGILN---LE	E
LaAT2	69	DGLAVVLEDFYQIAGKLEKDEGVFRVYDDD-----MEGVEVVEAAAEGVEVADITAEEGT-SKFKELVPYNGVLN---LE	E
VlAMAT	69	EALGKALVDFYPMAGRLIEGDNRKLMVDTGTE-----GVLFTEADADTTLENLGDADQEM-CPCFEBLYDVPGS---TT	T
HvACT	61	AGLGRALVDYREWAGRLGVDSGGRAILLNDA-----GARFVEATAD-VALDSVMPLEKPT-SEVLSLHHSGGDG---	D
Pf3AT	59	QSLSKTLVHFFPLSCNLIYPSSEPKMPEFRYLSG---DSVSEPTAESDDFDLVGNRPESPVRYNFVPEKLPIVEESD	D
CbBEAT	60	SSLSEETLLYYVHAGRYN---GTDCEVFCNDQ-----GIGYVETAFVVELHQFELGERSN---NDLLVGLSGFLS---	E
FaSAAT	64	QALSEETLLYYVHAGRYN---NLYIDDFEEG-----VPIYLEARVNCMDTDFRLRRIE---CNEFVIKPPSMEAIS	S
ZmGlossy2	68	DPMLPWLDDHFPVAGRVRRATEGDGAPRRPYIKCNDCCVRIVEARCDRDMAWIRDAAPG---RIRQCYDKVLGPF---	E
<u>LSxTlxxxYxxxG</u>			
NtHQT	133	ISTFPLIIFQVTRFKCGGVSLGCGVFHTLSDGLSSIHFINTWSDIARCLLSVAIPP-FIDRTLRLARDPPTSSFEHV---EY	E
LaAT1	127	MSTYPLMLFQITRFKCGGVALGVANEHHSDDGVAALHFINTWVHYSRQVPAPSPPHFDRTALSARNPQQPQFSHA---EY	E
AtAT	143	GLSRPLLAOVVTKLKDGLAMGLAFNHAVALDGRSTWTFMSSWAEICRGAQSISTQPFLLDRSKARDTRVKLDLTSQF---D	F
LaAT2	142	GLQRPLLAOVVTKLKDGMVMGCAFNHAALDGRSTWTFMSSWAAICSGATSVSVPVFLERTKARNTRVKLDLTSQF---D	A
VlAMAT	140	ILGSPLLDIQVTRLRCCGFIFALRLNETHMSDAAGLIQFLDITCEMAQCLSVPSLLPIWQRELNNARNPFRITRIHH---EY	E
HvACT	128	--PEELLLIQVTRFACGSLVGVFTTQVHVSDEGRSTGNFVAWQATRCGAAIDPVVHADRASFPHPRELHVVEHGRVPE	E
Pf3AT	136	RKLFQVPAVQVTLFPPGRGVGIGIATHVSDAPLSFLAFTIWAWSMSKHIENEDEDEEFPKSLPVPDRHIVIKYPTFDSIY	W
CbBEAT	126	TETPPLAAIQNLMPKCGGLVICQAQFNHILIGDMPTMSTWSSWAKACRVGIKEVAHPTFGLAPMPSAKVNLNIPPPP---	P
FaSAAT	132	DERYPLRGVQVNVFDSG-IAIGVSVSHKIDGCGADCEILKSWCAVFRGCRENIHPSLSBAALLFPPRRDLPEKVV---	D
ZmGlossy2	143	LFFSPLLYVQITNFKCGGLALCFSWAHLIGDIPSAATCFNKWAQILSKKPEATVLTTPPNQPLQGSBAAPRSVKQ---	D
<u>HxxxD</u>			
NtHQT	210	HPPPSLISSS-----KSLESTSPKPS---TTMFKPSSDQLGLLKSXSKHDG-----STYB	E
LaAT1	205	QPPTLENPLPATDIAHSKFKLTRAQLNSLKAKCAAGSDGHNGTANGKSDANGTADGKSDANGTANGKSAAKRYSTFE	E
AtAT	220	NETSNGEDAAN-----PTVEPPQLVEKIFRFSDFAVHTIKSRANSVIPSDSSKP-----FSTFQ	Q
LaAT2	219	PEHANTASNGD-----TPVN-PLLRGVKFKESVLDQIKSKVN---AGSDSSKP-----FSTFQ	Q
VlAMAT	218	EKVNTKGTLM-----AMDENSLVHSEFFGREERALRNRLPASLGAC-----FSTFE	E
HvACT	206	KYEKAHDVVCG-----ADGDEDEVVNVKHFSEREFISKLKAQASAGAPRP-----CSTLQ	Q
Pf3AT	216	RNALKFPPLQSR-----HPSLPTDRIRTFVFPQSKIKLKGWIQSRVPSLVHLS-----SFF	F
CbBEAT	202	-----SFGVKFVSRFVFNENATRLRKEATEEDGDGDDQKK-----KRPSTRVD	D
FaSAAT	207	---DQMEALW-----FAGKKVATRFVFGVKAISSIQDEAKSESVPKP-----SRVH	H
ZmGlossy2	219	--VGPIEDLWLVF-----AGRDMACYSFHVQDAVLKLLHQQNGRQDAAAG-----TFE	E
NtHQT	258	ILAAHIWRCCTCAR-ALSDD---QLTKLHVATDGRSRLICPP-LPPGYLGNVVFTGTPMAKS---SELL-QEPLTNSAKRI	I
LaAT1	285	VLAGHIWRSVCTAR-GEPAE---QETLHHPDGRSRLIN---LPPGYFGNALFFATPITAC---GEIE-SNSLSYAVRVI	I
AtAT	274	SLTSHIWRHVTLAR-GLKPE---DITFTVTFADCRKRVDPPP-MPEBYRGNLQAIIFTGTAA---GLLA-AHGFPGASVI	I
LaAT2	270	SLSAHVQAVTAR-ELGPT---DYTFVTFADCRKRVDPPP-MPESYRGNLQAIIFTGTAA---GLIL-ANPEFAGAGLI	I
VlAMAT	266	VLMACVWRCRTIAR-AVDPP---EVVTRSCINMRG-HGFE-LPPGYVGNFVTPASTKA---GMLC-KNPLFAIRLV	I
HvACT	257	CLVAHLWRSMTAR-GLDGG---ETTSVATAVDGRARMSFQ-VPDGVTGNVILWARPPTTA---GELV-TRPVHVAELVI	I
Pf3AT	268	AAAYMWAGITKSF-TADEDDQN-EDAPFLIPVDLRRLDPPP-VPENYFGNCSYALPRMRR---RELVGEKGVFLAAEVI	I
CbBEAT	248	LVTAFLSKSLIEMD-CAKKEQTKSRPLMVHMLNLRKRTKLA-LENDVSGNPFIVVNAESKI---TVAPKITDLETSLGSA	A
FaSAAT	251	AVTGFLWHLIASRATSTGTTSTRLSAAQAANLRLRNMMETVLDNATGNLFWWAQAALLSHSTTPEISDLKICDLVNL	L
ZmGlossy2	266	LVSALVWQAVAKIR-----GDVDVTVVVRADAAAGSGKSLANEMKVGVEESAGSSFAKT---DLAELAALAKNLVDE	E
NtHQT	329	HSALSK-MDDNYDRSALDYLEL---LPDLSALIRGPTYFASPNLNIWSWTRFVHSDDFGCGRPIHMGF-ACILYEGTV	V
LaAT1	354	GDGIAR-LDEEYLKSSLDLLEL---QPDISKLAQGAHSFRCPNLWISWVWPIIYBDFGCGKAVHMGF-WAAPFEGKS	S
AtAT	345	QRAIAA-HDASVIDARNDEWEK---SPKIFQFKDAG---VNCVAVGSSPRFRVYEVDFGFGKPEVTRSGSNRPNLM	M
LaAT2	341	RGAIES-HNAEATNKRNEEWES---KPVIFQYKDG---VNCVAVGSSPRFQVYGVDFGCGSPESVRLNRRDFGDMV	V
VlAMAT	337	KRAKAE-MSQEVTKSVALMVI---KGRPLFTQPGN---FTVSDVTRAGLEVDVFGWGRPVYGVVARACPISFR	F
HvACT	328	SREVAR-INDGVFKSPLDFAVSGAVEKERLVATADADMVLSPTIEVDSWLLIPFYDMDFGCGRPFPPFP-SYPVEGLI	I
Pf3AT	343	AAEIKRINDKRLLETVEKWSP---ERIKALQKS---YFSVAGSSKLDIYGDVFGWGRAR-QEILSIDGKYA	A
CbBEAT	324	CGEIISEWAKVDDAEVSSMVLN---SVREFFYEWGKGEKNVFLYTSWCRFPVLYEVDVFGWGRPSLVDL-TAVPEGLIV	I
FaSAAT	331	LNQSVKQCGNDVFEFTFKGKEGYGRMCBYLDFQRTMSSMEPADIYLFSSWTFN-FNPLDFGQGRTSWVGVAGKLESASCK	K
ZmGlossy2	336	TAAVAAEQGDVLYYGGAN-----LTVDMEQDLYGLLEIKGQRFVHYEGMDGVGDGGA	A
<u>DFGWG</u>			
NtHQT	403	YILPSPNSKDRNRIAVCHDADHMLPEKYLYEF-----	
LaAT1	428	YLLPNPEN-DGSFVSTLHKQHMERQKLFYEF-----	
AtAT	416	YLYQKAG-GISLDVETLEASVMEKLVKSKEFLSEEEEEEDDGKLTNGNGHVNGNGVYVNGNGV	
LaAT2	412	YLYPGKSG-GRSLDVETLEAKCMEKLEKDKFIMEA-----	
VlAMAT	405	MIFRNSKQ-BEGSVIPVWPPVMEFRQELKRLTKKAEILLITSM-----	
HvACT	406	ILLPSFLG-DGSDVAYPLFSRDMNTKNCYSID-----	
Pf3AT	410	MTLCKARDFEGCLEVCSLPLKDKMDAAAFYSLGNG-----	
CbBEAT	398	LNDEAPAQ-DGTAVRACESEHDMIQQQHQLSYVVS-----	
FaSAAT	410	FLLVPTQCGSGLEBAWVNEEEKMAMLEQDPHFALASPKTLI-----	
ZmGlossy2	390	VLVQPDAD-GRRLVTAVLPGDEILSLRAALGSALQA-----	

Abb. B-25: Alignment von LaAT1 und LaAT2 mit einigen anderen BAHD-Acyltransferasen. Die charakteristischen Sequenzmotive sind markiert. (Zur Erklärung der Abkürzungen siehe Abb. B-26).

Bereich, der bei allen gezeigten Enzymen von geringer Homologie geprägt ist. LaAT1 ist in diesem Abschnitt im Vergleich zu den 46 anderen charakterisierten Acyltransferasen, deren Sequenz bekannt ist, um etwa 25 Aminosäuren länger. Insgesamt enthalten aber sowohl LaAT1 als auch LaAT2 alle kennzeichnenden Bereiche der BAHD-Acyltransferasen. Sie sind daher Mitglieder dieser Enzym-Superfamilie.

In einer Protein-Protein-BLAST-Datenbankabfrage (pBLAST) zeigte LaAT1 die höchste Homologie (Identität: 53 %, Ähnlichkeit: 69 %) zu einer Hydroxycinnamoyl-Transferase aus *Coffea arabica* (GenBank-Akzessionsnummer: CAJ40778). LaAT2 war fast identisch (Identität: 74 %, Ähnlichkeit: 85 %) mit einer Acyltransferase aus *Petunia hybrida* (PhAT, GenBank-Akzessionsnummer: BAA93453). Allerdings sagt diese Art der Zuordnung wenig über die tatsächliche Funktion der Lavendel-Enzyme aus, da die Annotierung dieser beiden ähnlichsten Enzyme nur auf Sequenzhomologie und nicht auf tatsächlichen, biochemischen Eigenschaften basiert.

Daher wurde aus den BAHD-Acyltransferasen, deren Sequenz und Funktion bekannt sind (Kap. A.4.3; D'Auria, 2006), und aus den beiden Lavendelsequenzen ein phylogenetischer Baum erzeugt. Zusätzlich wurden die Sequenzen der zuvor erwähnten Acyltransferase aus *Petunia hybrida* (PhAT) und eine weitere aus *Arabidopsis thaliana* (AtAT, GenBank-Akzessionsnummer: NP\_197782) berücksichtigt. Diese beiden Enzyme sind zwar nicht charakterisiert, wiesen aber im pBLAST die höchste Homologie zu LaAT2 auf. Die insgesamt 50 Sequenzen wurden zunächst mit ClustalW ausgerichtet. Das erhaltene *Alignment* wurde in einem weiteren Schritt ebenfalls mit ClustalW nach der *Neighbour-Joining*-Methode zu einem nicht-verwurzelten phylogenetischen Baum umgerechnet. Die grafische Darstellung erfolgte anschließend mit der Software Treeview (Abb. B-26).

Die Klassen I bis V der BAHD-Acyltransferasen mit entsprechenden Unterklassen (Kap. A.4.3) sind gut zu erkennen. LaAT1 gehört offenbar zu den Enzymen der Klasse V, genauer zu einer Untergruppe von Acyltransferasen, die aromatische Acylgruppen übertragen. Dazu zählen die Hydroxycinnamoyltransferasen aus *Arabidopsis* und Tabak (AtHCT und NtHCT), die eine wesentliche Rolle für die Ligninbiosynthese spielen (Hoffmann et al., 2003 und 2004). NtHCT bevorzugte *in vitro* *p*-Cumaroyl-CoA und Caffeoyl-CoA als Donorsubstrate, akzeptierte aber auch Feruloyl-CoA. Die Übertragung der Acylgruppe lief mit der höchsten Effizienz bei

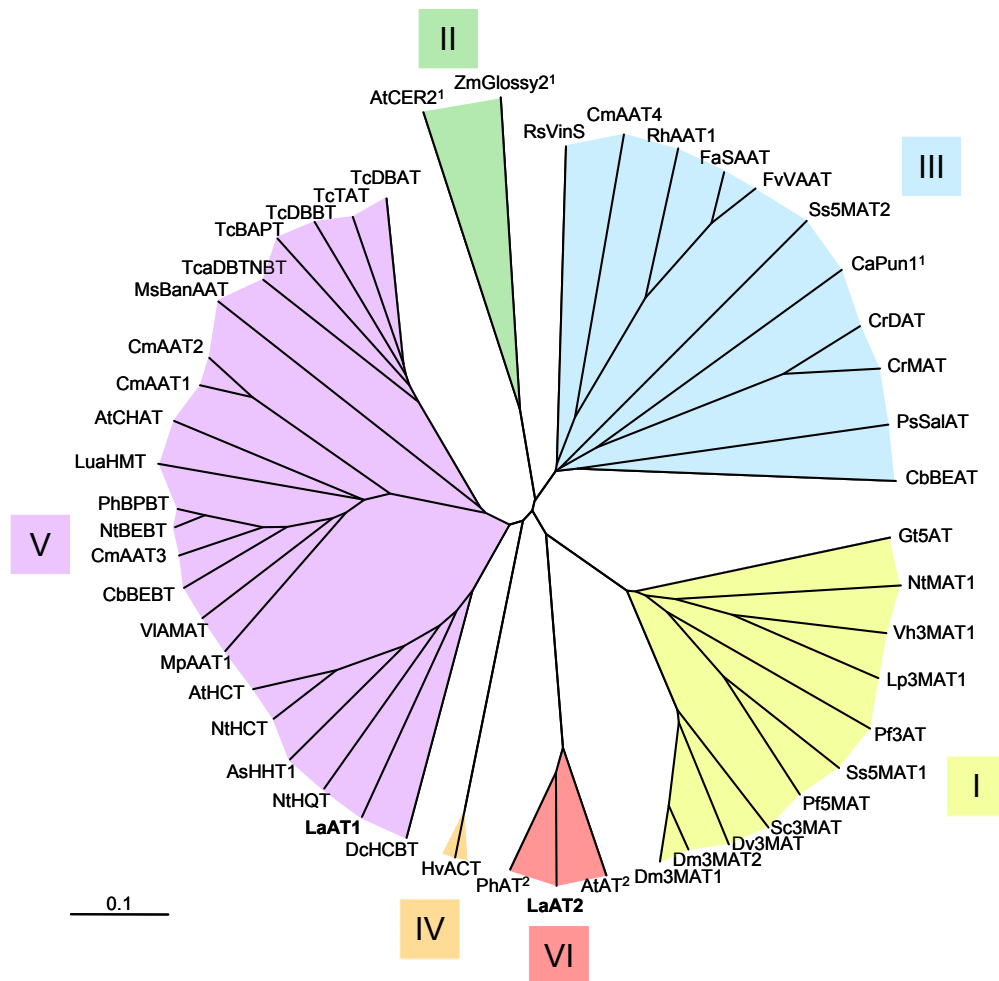


Abb. B-26: Phylogenetischer Baum von BAHD-Acyltransferasen inklusive LaAT1 und LaAT2, erstellt nach der *Neighbour-Joining*-Methode (angelehnt an D'Auria, 2006). Die Abkürzungen werden im Folgenden erläutert (in Klammern ist jeweils die GenBank-Akzessionsnummer angegeben).

AtAT: *Arabidopsis thaliana* Acyltransferase (NP\_197782)<sup>2</sup>; AtCER2: *A. thaliana* CER2-Protein, Biosynthese von C30-Wachsen (AAM64817)<sup>1</sup>; AtCHAT: *A. thaliana* (Z)-3-Hexen-1-ol-O-acetyltransferase (AAN09797); ATHCT: *A. thaliana* Hydroxycinnamoyl-CoA:Shikimat/Chinat-hydroxycinnamoyltransferase (NP\_199704); AsHHT1: *Avena sativa* Hydroxycinnamoyl-CoA:Hydroxyanthranilat-*N*-hydroxycinnamoyltransferase (BAC78633); CaPun1: *Capsicum annum* Pun1-Protein, Biosynthese von Capsaicin (AAV66311)<sup>1</sup>; CbBEAT: *Clarkia breweri* Benzylalkohol-*O*-Acetyltransferase (AAC180262); CbBEBT: *C. breweri* Benzoyl-CoA: Benzylalkohol-*O*-benzoyltransferase (AAN09796); CmAAAT1-4: *Cucumis melo* Alkoholacyltransferase (CAA94432, AAL77060, AAW51125, AAW51126); CrDAT: *Catharanthus roseus* Deacetylindolin-4-*O*-acetyltransferase (AAC99311); CrMAT: *C. roseus* Minovincinin-19-hydroxy-*O*-acetyltransferase (AAO13736); DcHCBT: *Dianthus caryophyllus* Anthranilat-*N*-hydroxycinnamoyl/benzoyltransferase (CAB06430); Dm3MAT1-2: *Dendranthema x morifolium* Anthocyanidin-3-*O*-glucosid-6''-*O*-malonyltransferase (AAQ63615, AAQ63616); Dv3MAT: *Dahlia variabilis* Malonyl-CoA:Anthocyanidin-3-*O*-glucosid-6''-*O*-malonyltransferase (AAO12206); FaSAAT: *Fragaria x ananassa* (Strawberry-) Alkoholacyltransferase (AAG13130); FvVAAT: *Fragaria vesca* Alkoholacyltransferase (CAC09062); Gt5AT: *Gentiana triflora* Anthocyan-5-Aromatenacyltransferase (BAA74428); HvACT: *Hordeum vulgare* Agmatincumaroyltransferase (AAO73071); LaAT1 und LaAT2: *Lavandula angustifolia* Acyltransferasen 1 und 2 (ABI48360 und ABI48361); Lp3MAT1: *Lamium purpureum* Malonyl-CoA:Flavonol-3-*O*-glucosid-6''-*O*-malonyltransferase (AAS77404); LuaHMT/HLT: *Lupinus albus* Tigloyl-CoA:13 $\alpha$ -hydroxymultiflorin/13 $\alpha$ -hydroxylupanin-*O*-tigloyltransferase (BAD89275); MpAAT1: *Malus pumila* (Pumila-) Alkoholacyltransferase (AAU14879); MsBanAAT: *Musa sapientum* (Banana-) Alkoholacyltransferase (CAC09063); NtBEBT: *Nicotiana tabacum* Benzoyl-CoA: Benzylalkohol-*O*-benzoyltransferase (AAN09798); NtHCT: *N. tabacum* Hydroxycinnamoyl-CoA:Shikimat/Chinat-Hydroxycinnamoyltransferase (CAD47830); NtHQT: *N. tabacum* Hydroxycinnamoyl-CoA:Chinat-Hydroxycinnamoyltransferase (CAE46932); NtMAT1: *N. tabacum* Malonyl-CoA:Flavonoid/Naphtol-Glucosid-Acyltransferase (BAD93691); Pf3AT: *Perilla frutescens* Hydroxycinnamoyl-CoA:Anthocyanin-3-*O*-glucosid-6''-*O*-acyltransferase (BAA93475); Pf5MAT: *P. frutescens*

Anthocyanin-5-O-glucosid-6''-O-malonyltransferase (AAL50565); PhAT: *Petunia hybrida* Acyltransferase (BAA93453)<sup>2</sup>; PhBPBT: *P. hybrida* Benzoyl-CoA: Benzylalkohol/Phenylethanol-benzoyltransferase (AAU06226); PsSalAT: *Papaver somniferum* Salutaridinol-7-O-acetyltransferase (AAK73661); RhAAT1: *Rosa hybrida* Alkoholacetyltransferase (AAW31948); RsVinS: *Rauvolfia serpentina* Vinorinsynthase (CAD89104); Sc3MaT: *Senecia cruentus* Malonyl-CoA:Anthocyanidin-3-O-glucosid-6''-O-malonyltransferase (AAO38058); Ss5MaT1-2: *Salvia splendens* Malonyl-CoA:Anthocyanin-5-O-glucosid-6''-O-malonyltransferase (AAL5065, AAR26385); TcaDBTNBT: *Taxus canadensis* 3'-N-Debenzoyl-2'-deoxytaxol-N-benzoyltransferase (AAM75818); TcBAPT: *Taxus cuspidata* Baccatin-III-O-phenylpropanoyltransferase (AAL92459); TcDBAT: *T. cuspidata* 10-Deacetylbaaccatin-III-10-O-acetyltransferase (AAF27621); TcDBBT: *T. cuspidata* 2-Debenzoyl-7,13-diacetylbaaccatin-III-O-benzoyltransferase (Q9FPW3); TcTAT: *T. cuspidata* Taxa-4(20),11(12)-dien-5 $\alpha$ -ol-O-acetyltransferase (AAF34254); Vh3MAT1: *Verbena x hybrida* Malonyl-CoA:Flavonol-3-O-glucosid-6''-O-malonyltransferase (AAS77404); VIAMAT: *Vitis labrusca* Anthraniloyl-CoA:Methanolacyltransferase (AAW22989); ZmGlossy2: *Zea mays* Glossy2-Protein, Biosynthese von C32-Wachsen (CAA61258)<sup>1</sup>;

<sup>1</sup> Nur durch genetische Versuche charakterisiert. <sup>2</sup> Nicht charakterisiert.

Shikimisäure ab, etwas weniger gut mit Chinasäure. Da das Enzym auch die Rückreaktion katalysierte, also beispielsweise die Bildung von Caffeoyl-CoA aus CoA und Chlorogensäure, dürfte es eine regulative Funktion im Ligninstoffwechsel einnehmen. Das analoge Enzym aus *Arabidopsis*, AtHCT, reagierte sehr ähnlich. Die Hydroxyanthranilat-Hydroxycinnamoyltransferase aus Hafer (AsHHT1), die ebenfalls in der gleichen Unterklasse wie LaAT1 erscheint, katalysiert die Bildung von arttypischen Phytoalexinen, den sogenannten Avenanthramiden. Das Enzym bildet also Amide, indem es eine Reihe von aromatischen Acyl-CoAs mit Anthranilsäure und deren Derivaten umsetzt (Yang et al., 2004). Die unmittelbaren phylogenetischen Nachbarn von LaAT1 sind NtHQT und DcHCBT. Das Enzym aus Tabak (NtHQT) ist für die Bildung von Chlorogensäure aus Caffeoyl-CoA und Chinasäure verantwortlich. Außerdem war dieses Enzym auch mit *p*-Cumaroyl-CoA und Shikimisäure aktiv (Niggeweg et al., 2004). Die Acyltransferase aus der Nelke (DcHCBT) katalysiert *in vivo* die Reaktion von Anthranilsäure und Benzoyl-CoA zum Amid *N*-Benzoylanthranilat, einer Vorstufe für die Abwehrstoffe dieser Pflanze. *In vitro* war das Enzym aber nur hinsichtlich des Akzeptors Anthranilsäure spezifisch und setzte mit hoher Geschwindigkeit auch Cinnamoyl-CoA, *p*-Cumaroyl-CoA und Salicyl-CoA um (Yang et al., 1997).

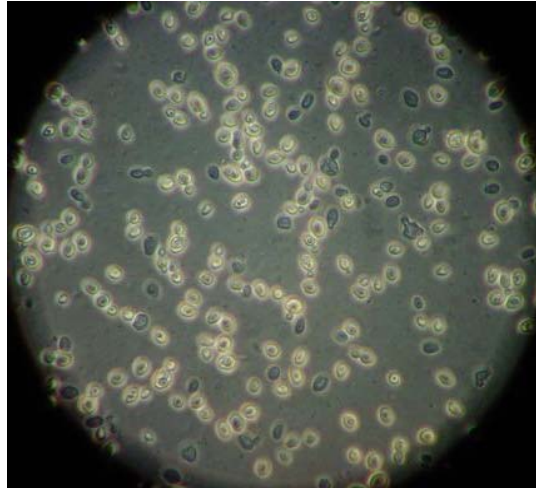
Da LaAT1 die höchste Sequenzhomologie mit den aufgeführten Enzymen aufweist, ist davon auszugehen, dass dieses Enzym ähnliche Reaktionen katalysiert. Dementprechend wurden die Substrate für die Enzymassays (Kap. B.4.4) ausgewählt.

Das zweite klonierte Enzym aus Lavendel, LaAT2, ist im phylogenetischen Baum keiner der fünf beschriebenen BAHD-Klassen zugeordnet. Offenbar unterscheidet sich die Sequenz deutlich von allen bisher charakterisierten BAHD-Acyltransferasen,

obwohl sie alle für diese Enzyme charakteristischen Elemente aufweist. Die Sequenzen aus *Petunia hybrida* PhAT und *Arabidopsis thaliana* AtAT, die die höchsten Homologien in der BLAST-Datenbankabfrage aufwiesen, bilden zusammen mit LaAT2 eine Gruppe. Womöglich handelt es sich bei den drei Enzymen um eine neue Klasse VI von BAHD-Acyltransferasen (Abb. B-26). AtAT und PhAT sind beide weder biochemisch noch ausreichend genetisch charakterisiert, sodass dieser Klasse keine Funktion zugeordnet werden kann. Es ist aber bekannt, dass AtAT in *Arabidopsis* notwendig ist, um einen Embryo auszubilden. Im Rahmen des *Arabidopsis SeedGenes* Projektes wurden Pflanzen analysiert, in denen durch Insertions-Mutationen Gene funktionsunfähig waren, und dadurch ein veränderter Phänotyp bei den Samen entstand (Tzafrir et al., 2003). Wenn das zu AtAT gehörige Gen *EMB3009* (Chromosomen-Locus At5g23940) ausgeschaltet wurde, konnten sich in den Samenanlagen keine Embryos entwickeln. Zudem sind in den Datenbanken *NCBI UniGene* und *Arabidopsis MPSS* Genexpressionsdaten zu *EMB3009* veröffentlicht worden (Wheeler et al., 2003; Meyers et al., 2004). Danach wird dieses Gen insbesondere in den Blüten bzw. Früchten der Pflanze exprimiert, jedoch nicht oder kaum in Wurzeln, Blättern oder anderen vegetativen Geweben. Die genaue Funktion oder Substrate von AtAT sind jedoch unbekannt. Folglich kann in dieser Hinsicht auch für LaAT2 keine Aussage getroffen werden.

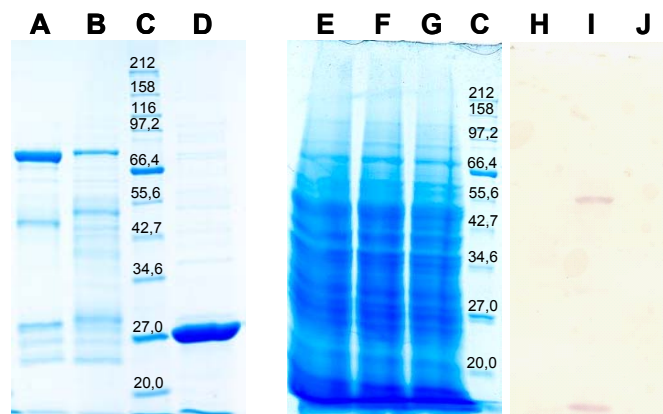
### 4.3 Heterologe Expression

LaAT1 und LaAT2 wurden jeweils in *Escherichia coli* und *Saccharomyces cerevisiae* heterolog exprimiert. Dazu wurden die offenen Leserahmen *in frame* in die Vektoren pGEX4T-1 und pYES2.1 kloniert, sodass bei der bakteriellen Expression GST-Fusionsproteine und bei der Hefeexpression Proteine mit His-Tag erzeugt wurden. Die GST-Proteine wurden aus den Bakterienzellen, die mittels Ultraschall aufgebrochen wurden, extrahiert und über Affinitätschromatographie partiell aufgereinigt. Die Hefezellen sind mit Glaskügelchen behandelt worden, wodurch allerdings nur etwa 20 % der Zellen aufgebrochen wurden (Abb. B-27). Der dabei gewonnene Proteinrohextrakt wurde direkt in Enzymassays eingesetzt.



**Abb. B-27:** Mikroskopische Aufnahme (Vergrößerung 1000X) der Hefezellen nach Behandlung mit Glaskügelchen. Dunkel erscheinende Zellen sind aufgebrochen, während helle noch unversehrt sind.

Die Auftrennung der Proteinlösungen über SDS-PAGE zeigt, dass die bakterielle Expression recht gute Ergebnisse erbrachte (Abb. B-28 A-D). LaAT1-GST bildet eine starke Bande im Bereich der berechneten Sollgröße von 76,9 kDa, Verunreinigungen sind wie bei den Terpensynthasen vermutlich auf die teilweise Spaltung der Fusionsproteine zurückzuführen (Kap. B.3.3). LaAT2-GST ist schwächer exprimiert, aber deutlich als Bande nahe der Sollgröße von 75,4 kDa zu erkennen.



**Abb. B-28:** SDS-PAGE und *Western Blot* von Proteinlösungen aus der Expression der potenziellen Acyltransferasen. LaAT1 (**A**) und LaAT2 (**B**) wurden als GST-Fusionsproteine bakteriell exprimiert und partiell über Affinitätschromatographie aufgereinigt. Am Größenstandard (Angabe in kDa) kann die Größe der Proteine abgeschätzt werden (**C**). Als Kontrolle wurde GST aus der Expression des Leervektors pGEX4T-1 aufgereinigt (**D**). In *Saccharomyces cerevisiae* wurden als Kontrolle das DFR-Protein der Birne (**E**) (ohne His-Tag) sowie LaAT1 (**F**) und LaAT2 (**G**) (beide mit His-Tag) exprimiert. Die Rohextrakte wurden auf das Gel aufgetragen. Ein *Western Blot* diente zur selektiven Färbung von His-Tag-Proteinen und wurde mit Rohextrakten aus der Hefeexpression des DFR-Proteins (**H**), LaAT1 (**I**) und LaAT2 (**J**) durchgeführt.

Bei der Expression der beiden Lavendel-Acyltransferasen mit *S. cerevisiae* war im Rohextrakt keine zusätzliche Bande im Vergleich zur Kontrolle, einer Dihydroflavonol-4-Reduktase (DFR) aus der Birne (Fischer et al., 2003), zu sehen (Abb. B-28E-G). Inklusive His-Tag sollten die Größen von LaAT1 und LaAT2 54,3 kDa bzw. 52,8 kDa betragen. Allerdings trat auch das Kontroll-Protein, das ohne His-Tag exprimiert wurde, im Rohextrakt nicht hervor. Daher wurden in einem *Western Blot* mit Antikörpern spezifisch His-Tag-Proteine angefärbt (Abb. B-28H-J). DFR wurde dabei erwartungsgemäß nicht detektiert, da es keinen His-Tag trägt. Dagegen ist bei LaAT1 eine deutliche Bande in der erwarteten Größe zu sehen, was bedeutet, dass die Expression erfolgreich verlaufen war (Abb. B-28I). Im Gegensatz dazu blieb die Bahn des LaAT2-Rohextraktes ungefärbt. Dies lässt darauf schließen, dass das Protein nicht exprimiert wurde.

#### 4.4 Enzymassays

Der Vergleich der Lavendel-Sequenzen mit denen anderer, bereits charakterisierter Acyltransferasen, erbrachte nur für LaAT1 den Hinweis, dass es sich um eine Hydroxycinnamoyl-Transferase handeln könnte. LaAT2 unterscheidet sich jedoch so stark von anderen Enzymen, dass keine Vorhersage über die möglichen Substrate getroffen werden konnte. Deshalb wurden beide Enzyme einem Substratscreening unterzogen, in dem sowohl die bakteriell als auch die hefeexprimierten Proteine mit verschiedenen Acyl-CoAs und Akzeptorsubstraten inkubiert wurden (Tab. B-7). Die Auswahl der Substrate richtete sich zum einen nach der Substratakzeptanz der mit LaAT1 verwandten Enzyme, zum anderen nach den acylierten Verbindungen, die im Lavendelöl enthalten sind (Shellie et al., 2002).

Als Donorsubstrate wurden Acetyl-, Butyryl-, Malonyl-, Caffeoyl- und *p*-Cumaroyl-CoA verwendet. Catechin, Agmatin, Tyramin, Phenethylamin und Anthranilsäure wurden nur zusammen mit den bakteriellen Proteinen, Butyryl- und Malonyl-CoA nur in Assays mit den Hefeexpressions-Rohextrakten eingesetzt. Alle anderen Kombinationen wurden mit beiden Proteinen inkubiert. Caffeoyl- und *p*-Cumaroyl-CoA waren nicht käuflich zu erwerben und mussten enzymatisch synthetisiert werden. Dazu wurde das Enzym 4CL (Zimtsäure- und Hydroxyzimtsäure:CoA-Ligase) heterolog exprimiert, aufgereinigt und mit CoA, ATP sowie Kaffeesäure bzw. *p*-Cumarsäure umgesetzt (Beuerle und Pichersky, 2002). Das 4CL-tragende Plasmid wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Till Beuerle zur Verfügung gestellt. Die

entstandene Lösung wurde direkt in den Acyltransferase-Assays verwendet, die bei 30 °C für 90 Minuten in Anlehnung an Literaturdaten durchgeführt wurden (Hoffmann et al., 2003; Beekwilder et al., 2004). Als Kontrolle diente jeweils eine Probe, die unter den gleichen Bedingungen mit dem Proteinextrakt, der aus der Expression des Leervektors bzw. des DFR-Proteins stammte, angesetzt wurde. Anschließend wurden die Umsetzungen abhängig von den Eigenschaften der theoretischen Produkte mit unterschiedlichen Methoden analysiert. Die Assays mit flüchtigen Substraten bzw. Produkten wurden mit Diethylether extrahiert und mittels HRGC-MS untersucht. Die Ansätze mit den nicht-flüchtigen Verbindungen wurden direkt per HPLC-ESI-MS/MS vermessen.

**Tab. B-7:** Akzeptor- und Donorsubstrate, die im Substratscreening der heterolog exprimierten LaAT1 und LaAT2 eingesetzt wurden, und die verwendete Analysenmethode.

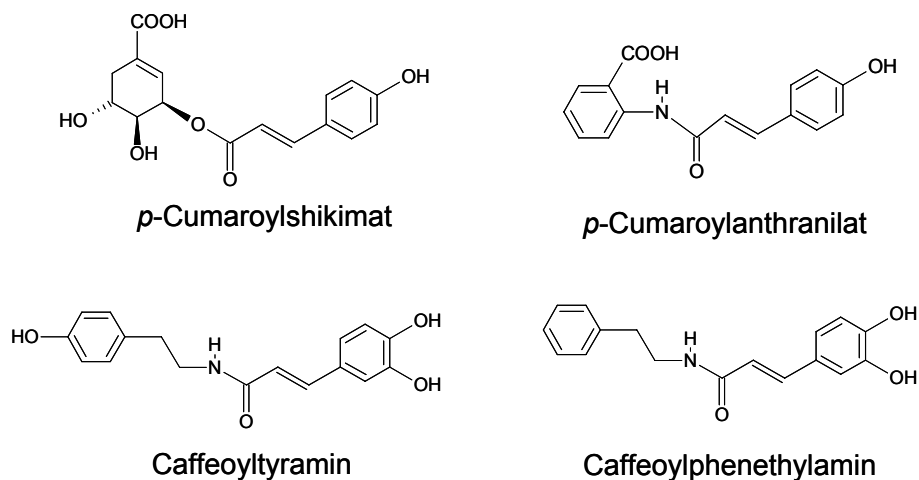
Akzeptorsubstrat	Donorsubstrat	Analyse der Assays
Ethanol		
Hexanol		
Borneol		
Linalool		
Nerol	Acetyl-CoA	HRGC-MS
Geraniol	Butyryl-CoA	
1-Octen-3-ol		
Terpineol		
Lavandulol		
Chinasäure		
Shikimisäure		
Pelargonidin-3-glucosid	Acetyl-CoA	HPLC-ESI-MS/MS
Catechin	Malonyl-CoA	
Agmatin	Caffeoyl-CoA	
Tyramin	<i>p</i> -Cumaroyl-CoA	
Phenethylamin		
Anthranilsäure		

Die Auswertung ergab für einige Ansätze mit der bakteriell exprimierten LaAT1 die Bildung neuer Produkte. Die MS- und MS/MS-Spektren bestätigten die enzymatische Synthese von Caffeoyl- und *p*-Cumaroylshikimat, Caffeoyl- und *p*-Cumaroyltyramin und *p*-Cumaroylanthranilat (Abb. B-29 und B-30). Es entstanden demnach sowohl Ester als auch Amide von Hydroxyzimtsäuren. In Caffeoyltyramin könnte die Hydroxy- oder Aminogruppe substituiert worden sein. In weiteren Assays wurde auch Phenethylamin acyliert, dessen Struktur der des Tyramins ähnelt, jedoch nur eine Aminogruppe aufweist. LaAT1 reagiert daher sehr wahrscheinlich auch in Tyramin



mit dieser funktionellen Einheit und bildet das Amid. Es konnte dagegen nicht bestimmt werden, welche Hydroxygruppe der Shikimisäure verestert wird. Die Analyse mit unterschiedlichen Methoden (positive bzw. negative Ionisierung) erlaubt zudem nur die Angabe der qualitativen Ergebnisse, aber es kann keine Aussage über bevorzugte Substrate getroffen werden.

Die Enzymassays mit LaAT2 erbrachten keine positiven Resultate. Weder mit den bakteriell noch mit den in Hefe exprimierten Proteinen konnte eine enzymatische Aktivität nachgewiesen werden.

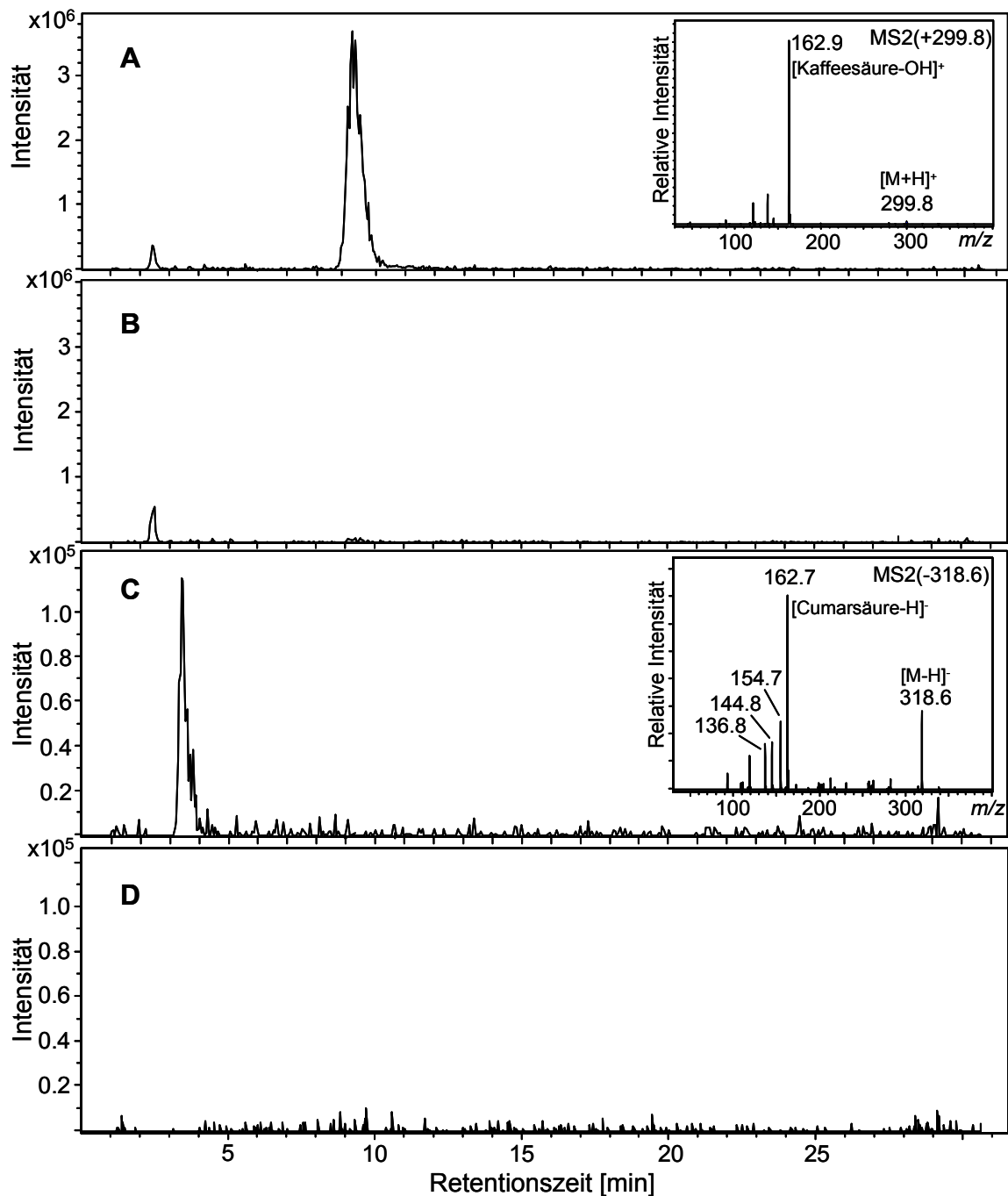


**Abb. B-29:** Strukturformeln einiger von LaAT1 gebildeter Verbindungen. Es ist jedoch bisher nicht eindeutig bekannt, welche Hydroxygruppe in Cumaroylshikimat acyliert ist.

#### 4.5 Diskussion

Durch eine PCR-basierte Strategie war es möglich, mit degenerierten Primern zwei Acyltransferasen LaAT1 und LaAT2 aus mRNA von Lavendelblüten zu klonieren. Die Analyse der Sequenzen ergab, dass sie alle Motive der BAHD-Acyltransferasen enthalten, einer Superfamilie von Enzymen, die maßgeblich am Sekundärmetabolismus der Pflanzen beteiligt sind (St. Pierre und De Luca, 2000).

Die Einordnung der Lavendel-Enzyme in den phylogenetischen Baum aller charakterisierter Acyltransferasen zeigte, dass LaAT1 zu Klasse V gehört und Ähnlichkeit zu Hydroxycinnamoyltransferasen aufweist. In der Tat akzeptierte das Enzym *p*-Cumaroyl-CoA und Caffeoyl-CoA und übertrug die Säurereste auf Shikimisäure, Anthranilsäure, Tyramin und Phenethylamin. Das Enzym katalysierte somit die Bildung zweier unterschiedlicher Bindungsarten, einer Esterbindung in Shikimat und Amidbindungen in den anderen Produkten. Diese zweifache Reaktivität



**Abb. B-30:** HPLC-ESI-MS/MS-Analyse von Assays mit bakteriell exprimierter LaAT1. Das Massenchromatogramm **(A)** (ESI positiv,  $m/z$  300) bestätigt die enzymatische Reaktion von LaAT1 mit Tyramin und Caffeoyl-CoA. Das MS2-Produktionenspektrum von Caffeoyltyramin ( $[M+H]^+$   $m/z$  299.8) zeigt das Fragment  $[Kaffeensäure-OH]^+$  ( $m/z$  162.9). Eine Kontrolle wurde mit dem Proteinextrakt des Leervektors unter den gleichen Bedingungen durchgeführt **(B)**. Im Massenchromatogramm **(C)** (ESI negativ,  $m/z$  319) ist das Produkt aus der Umsetzung von Shikimisäure, Cumaroyl-CoA und LaAT1 als Signal zu sehen. Das MS2-Produktionenspektrum von Cumaroylshikimat ( $[M-H]^-$   $m/z$  318.6) zeigt die nicht-fragmentierte Ausgangsverbindung sowie die Fragmente  $[Cumarsäure-H]^-$  ( $m/z$  162.7),  $[Shikimisäure-H_2O-H]^-$  ( $m/z$  154.7),  $[Cumarsäure-H_2O-H]^-$  ( $m/z$  144.8) und  $[Shikimisäure-2xH_2O-H]^-$  ( $m/z$  136.8). Die Analyse einer entsprechenden Kontrollprobe mit dem Proteinextrakt des Leervektors zeigt keine Signale **(D)**.

wurde bisher bei keiner der charakterisierten BAHD- Acyltransferasen beschrieben (Kap. A.4.3). Die mit LaAT1 verwandten Enzyme katalysieren zum einen die Bildung von Hydroxyzimtsäureestern der Shikimi- bzw. Chinasäure und spielen eine Rolle im Ligninstoffwechsel sowie bei der Bildung freier Chlorogensäure (Hoffmann et al., 2003 und 2004; Niggeweg et al., 2004). Zum anderen sind sie an der Biosynthese von Amiden der Anthranilsäure beteiligt, die als Pflanzenabwehrstoffe in *Dianthus caryophyllus* und *Avena sativa* beschrieben sind (Yang et al., 1997 und 2004). LaAT1 scheint eine Sonderstellung unter den Acyltransferasen einzunehmen, da es die Spezifität dieser Enzyme vereint und sowohl Ester als auch Amide aus den gleichen oder ähnlichen Substraten bildet.

Unter den BAHD-Acyltransferasen befinden sich außer den genannten nur zwei weitere Enzyme, die die Bildung von Amiden katalysieren. Der Vertreter der Klasse IV, die Agmatin-Cumaroyltransferase aus *Hordeum vulgare* (HvACT), reagiert mit *p*-Cumaroyl-CoA und Agmatin (Burhenne et al., 2003). Ein Enzym aus *Taxus canadensis*, die 3'-*N*-Debenzoyl-2'-deoxytaxol-*N*-benzoyltransferase (TcaDBTNBT), ist für eine Acylierung im letzten Biosyntheseschritt von Taxol verantwortlich (Walker et al., 2002). Die Synthese der Tyraminderivate, die LaAT1 *in vitro* bildete, wurde dagegen für keine der BAHD-Acyltransferasen beschrieben. Die Bildung solcher Verbindungen wird aber von einer anderen Enzymgruppe, den Tyramin-*N*-hydroxycinnamoyltransferasen (THT) katalysiert (Facchini et al., 2002). Die Sequenzen dieser Enzyme unterscheiden sich sehr stark von denen der BAHD-Acyltransferasen und enthalten nicht deren typische Motive. Hydroxyzimtsäurederivate des Tyramins sind sehr verbreitet in der Pflanzenwelt und sollen eine Reihe von physiologischen Funktionen aufweisen. So könnten sie für die Entwicklung von Blüten und anderen Organen bedeutend sein, aber auch bei der Antwort auf Verwundung und für die Resistenz gegenüber Ozon eine Rolle spielen. Über die *in vivo* Funktion von LaAT1 lässt sich daher noch wenig aussagen.

Anders als bei LaAT1 erlaubt die Sequenz von LaAT2 keine Rückschlüsse auf mögliche Substrate, da sie sich von den anderen bekannten Acyltransferasen zu stark unterscheidet. Zusammen mit den zwei homologen Proteinen aus *P. hybrida* und *A. thaliana* dürfte es sich um eine neue, sechste Klasse in der Superfamilie der BAHD-Acyltransferasen handeln. Allerdings ist es zur Bestätigung dieser Hypothese notwendig, die Substrate der Enzyme zu ermitteln. Die einzige Information, die über die Funktion dieser potenziellen Enzymklasse bekannt ist, stammt aus der

Untersuchung von *Arabidopsis*-Pflanzen, in denen das entsprechende Gen ausgeschaltet war (Kap. 4.2). Demnach ist das Produkt der enzymatischen Reaktion oder das Protein selbst in *Arabidopsis* wahrscheinlich notwendig, um eine normale Entwicklung des Embryos zu gewährleisten.

Dass sich LaAT2 in seiner Sequenz relativ deutlich von den Sequenzen der Enzyme aus anderen BAHD-Klassen unterscheidet, ließe sich damit erklären, dass es Substrate acyliert, die von den anderen BAHD-Enzymen nicht akzeptiert werden. Im Gegensatz zu LaAT1 konnte in den Enzymassays mit LaAT2 aber bisher keine Aktivität nachgewiesen werden. Die Expression des Enzyms gelang lediglich in *E. coli*, aber nicht in *S. cerevisiae*. Möglicherweise war das Enzym nach der Expression und Aufreinigung nicht aktiv, weil es seine Funktionalität durch Denaturierungsprozesse verloren hatte. Ebenso ist denkbar, dass die Bedingungen im Enzymassay nicht den Anforderungen des Enzyms entsprachen. Es ist aber auch möglich, dass das Substrat von LaAT2 im Screening nicht enthalten war, obwohl Acyltransferasen *in vitro* im Allgemeinen recht unspezifisch reagieren.

Die genaue Analyse der Metaboliten von *Knock-Out*-Pflanzen wie z. B. der erwähnten *Arabidopsis*-Mutante könnte wertvolle Hinweise über die Funktion von LaAT2 liefern und eine biochemische Charakterisierung ermöglichen.

## C Material und Methoden

### 1 Material

#### 1.1 Chemikalien

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle verwendeten Chemikalien von den Firmen Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen), Fluka (Deisenhofen), Carl Roth (Karlsruhe), VWR International (Darmstadt) und Applichem (Darmstadt) bezogen. Geranyldiphosphat (GPP) stammte von Echelon Biosciences (Salt Lake City, USA) und UDP-[6-<sup>3</sup>H<sub>1</sub>]-Glucose von American Radiolabeled Compounds (St. Louis, USA). [1,2-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Linalool (D<sub>2</sub>-Linalool) wurde dankenswerterweise von Prof. Dr. Schieberle (Technische Universität München) zur Verfügung gestellt.

Die Lösungsmittel Diethylether und Methanol wurden vor der Verwendung über eine Vigreux-Kolonnen destilliert.

#### 1.2 Pflanzenmaterial

Lavendel-Pflanzen (*Lavandula angustifolia*) (Lavendel 1) wurden im lokalen Handel erworben und bei Raumtemperatur im Labor unter den natürlichen Lichtverhältnissen kultiviert. Bei Bedarf wurden entsprechende Pflanzenteile geerntet. Weiterhin wurden Blüten von *Lavandula angustifolia* (Lavendel 2) von Prof. Dr. Schwab freundlicherweise zur Verfügung gestellt und bei -80 °C gelagert, sofern sie nicht sofort verwendet wurden.

Pflanzen der Art *Hyptis suaveolens* wurden bei Rühlemanns Kräuter & Duftpflanzen (Horstedt) bezogen, ebenso Samen von *Fragaria vesca*. Letztere wurden auf Blumenerde ausgesät und unter standardisierten Bedingungen bei 25 °C und 16 Stunden Licht pro Tag bei einer Strahlung von 120 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (Fluoro-Lampen, Osram, Augsburg) angezogen.

Erdbeerpflanzen (*Fragaria x ananassa* cv. Senga Sengana bzw. cv. Elsanta) wurden im lokalen Handel und bei Kraege (Telgte) erworben und unter den gleichen Bedingungen kultiviert.

Erdbeerfrüchte der Sorte Polka wurden beim örtlichen Erwerbsanbau gepflückt und frisch verwendet.

#### 1.3 Bakterien- und Hefestämme

- *Escherichia coli* Rosetta(DE3)pLysS (Novagen, Darmstadt) mit Chloramphenicol-Resistenz (34 mg/l)

- *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS (Novagen, Darmstadt) mit Chloramphenicol-Resistenz (34 mg/l)
- *Escherichia coli* JM109 (Promega, Mannheim)
- *Saccharomyces cerevisiae* INVSc1 (Invitrogen, Karlsruhe)

## 1.4 Vektoren

Alle verwendeten Vektoren beinhalteten ein Ampicillin-Resistenzgen (100 mg/l).

### 1.4.1 Leervektoren

- pGEM-T (Promega, Mannheim)  
Primer für Kolonie-PCR: SP6 und T7  
Primer zur Sequenzierung: M13\_FW und M13\_REV
- pGEX-4T-1 (Amersham Biosciences, Freiburg)  
Primer für Kolonie-PCR und Sequenzierung: pGEX\_FW und pGEX\_REV
- pYES2.1 (Invitrogen, Karlsruhe)  
Primer für Kolonie-PCR: GAL1\_FW oder V5CTerm\_REV und Insert-spezifisch  
Primer zur Sequenzierung: GAL1\_FW und V5CTerm\_REV

### 1.4.2 Vektoren mit Insert

- pRSETB (Invitrogen, Karlsruhe) mit FaGT2 (Lunkenbein et al., 2006a)
- pCRT7/CT-TOPO (Invitrogen, Karlsruhe) mit 4CL (Beuerle und Pichersky, 2002)

## 1.5 Medien, Pufferlösungen und andere Lösungen

Wässrige Lösungen wurden stets mit Reinstwasser (Purelab Plus UV/UF, Ransbach-Baumbach) angesetzt.

### 1.5.1 Medien

- LB-Medium:           10 g Trypton  
                          5 g Hefeextrakt  
                          10 g NaCl  
                          wurden mit Wasser auf 1 l aufgefüllt, auf pH 7 eingestellt  
                          und autoklaviert.
- SOC-Medium:       20 g Trypton  
                          5 g Hefeextrakt

0,5 g NaCl

2,5 mM KCl

1 mM MgCl<sub>2</sub>

wurden in Wasser gelöst und autoklaviert. Anschließend wurde separat sterilfiltrierte Glucose zugegeben (ad 2 mM) und mit sterilem Wasser auf 1 l aufgefüllt.

- SGI-Medium: 1 g Pepton  
6,7 g yeast nitrogen base w/o amino acids (Difco™, BD Diagnostics, Heidelberg)  
20 mg L-Tryptophan  
wurden mit Wasser auf 900 ml aufgefüllt und autoklaviert.  
20 g Glucose  
wurden mit Wasser zu 100 ml gelöst, sterilfiltriert und zugegeben.
- YPGE-Medium: 5 g Glucose  
10 g Pepton  
10 g Hefeextrakt  
wurden mit Wasser auf 970 ml aufgefüllt und autoklaviert.  
Abschließend wurden 30 ml Ethanol zugegeben.
- Agarplatten: Das entsprechende Medium (nicht autoklaviert) wurde zusätzlich mit 15 g/l Agar versetzt, autoklaviert, nach dem teilweisen Abkühlen ggf. mit Antibiotika versetzt und in Petrischalen gegossen.

### 1.5.2 Lösungen für molekularbiologische Arbeiten

- 50X TAE-Puffer: 2 M Tris  
1 M Essigsäure  
0,05 M EDTA
- 10X DNA-Ladepuffer: 0,21 % Orange G  
0,1 M EDTA

50 % Glycerin  
pH 8,0

- TFB1-Puffer: 30 mM Kaliumacetat  
10 mM CaCl<sub>2</sub>  
50 mM MnCl<sub>2</sub>  
100 mM RbCl  
15 % Glycerin  
Mit 1 M Essigsäure wurde pH 5,8 eingestellt,  
anschließend wurde sterilfiltriert (0,45 µm).
- TFB2-Puffer: 100 mM MOPS  
75 mM CaCl<sub>2</sub>  
10 mM RbCl  
15 % Glycerin  
Mit 1 M KOH wurde pH 6,5 eingestellt, anschließend  
wurde sterilfiltriert (0,45 µm).
- DNA-Größenstandard O'GeneRuler DNA Ladder Mix (Fermentas, St. Leon-  
Rot)
- DNA-Größenstandard 2-Log DNA Ladder (New England Biolabs, Frankfurt am  
Main)
- RNase Inhibitor Gold (Peqlab Biotechnologie, Erlangen)
- Deoxynukleotidtriphosphate (dNTPs) (Promega, Mannheim)

### 1.5.3 Lösungen zur Proteinaufreinigung

- His-Waschpuffer 1: 50 mM Natriumphosphatpuffer  
300 mM NaCl  
Durch Vereinigen entsprechender Volumina  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>- und NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Lösungen wurde pH 7,0  
eingestellt.
- His-Elutionspuffer 1: His-Waschpuffer 1  
150 mM Imidazol  
pH 7,0



- 8X His-Bindepuffer : 160 mM Tris  
4 M NaCl  
40 mM Imidazol  
pH 7,9
  
- 8X His-Waschpuffer 2: 160 mM Tris  
4 M NaCl  
480 mM Imidazol  
pH 7,9
  
- 4X His-Elutionspuffer 2: 80 mM Tris  
2 M NaCl  
1,6 M Imidazol  
pH 7,9
  
- 10X GST-Waschpuffer: 43 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
14,7 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
1,37 M NaCl  
27 mM KCl  
pH 7,3
  
- 10X GST-Rekonstitutionspuffer: 500 mM Tris  
pH 8,0
  
- GST-Elutionspuffer: 1X Rekonstitutionspuffer  
10 mM Glutathion
  
- PMSF-Lösung: 0,1 M Phenylmethansulfonylfluorid in 2-Propanol
  
- TEK-Puffer: 50 mM Tris  
1 mM EDTA  
100 mM KCl  
pH 7,4

- TES-B-Puffer: 50 mM Tris  
1 mM EDTA  
0,6 M Sorbitol  
2 mM DTT  
pH 7,4

#### 1.5.4 Lösungen für SDS-PAGE

- Tris/Glycin/SDS: 25 mM Tris  
192 mM Glycin  
0,1 % SDS  
pH 8,3
- Färbelösung: 60 ml Wasser  
20 ml Methanol  
20 ml Roti-Blue (Carl-Roth, Karlsruhe)
- Entfärbelösung: 10 % Methanol  
7 % Essigsäure
- Protein-Ladepuffer: 4X Roti-Load 1 (Carl-Roth, Karlsruhe)
- Proteingrößenmarker: Prestained Protein Marker, Broad Range  
Protein Marker, Broad Range (2-212 kDa)  
(New England Biolabs, Frankfurt am Main)

#### 1.5.5 Lösungen für Western Blotting

- Blotting-Puffer: 1X Tris/Glycin-Puffer (Bio-Rad Laboratories, München)  
20 % Methanol
- PBS: 8,23 g/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$   
2,35 g/l  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$   
4,0 g/l NaCl

- PBS/Tween:            PBS  
                          1 ml/l Tween
  
- TBS:                 6,057 g/l Tris  
                          8,766 g/l NaCl
  
- Alkalische Phosphatase-Puffer: 100 mM Tris  
  100 mM NaCl  
  5 mM MgCl<sub>2</sub>  
  pH 9,5
  
- 10X Ponceau:         20 g/l Ponceau S  
                          300 g/l Trichloressigsäure  
                          300 g/l Sulfosalicylsäure
  
- Blocklösung:         Roti-Block (Carl-Roth, Karlsruhe)
  
- NBT-Lösung:         5 mg NBT (Nitrobluetetrazolium) in 100 µl 70 % DMF
  
- BCIP-Lösung:         5 mg BCIP (5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat) in 100 µl  
                          100 % DMF

### 1.5.6 Sonstige Lösungen

- 1000X Ampicillin: 25 mg/ml, sterilfiltriert.
- 1000X Chloramphenicol: 34 mg/ml Ethanol, sterilfiltriert.
- 1000X IPTG: 238 mg/ml, sterilfiltriert.
- 1000X X-Gal: 50 mg/ml Dimethylformamid, sterilfiltriert.
- Bradford-Lösung (Bradford, 1976)  
100 mg Coomassie Brilliant Blau G250 wurden in  
50 ml Ethanol (95 %) gelöst, mit  
100 ml Phosphorsäure (85 %) versetzt und mit Wasser auf 1 l aufgefüllt.

## 1.6 Enzyme

### 1.6.1 Restriktionsendonucleasen

Alle Restriktionsendonucleasen und entsprechende Puffer wurden von Fermentas (St. Leon-Rot) und New England Biolabs (Frankfurt am Main) bezogen.

### 1.6.2 Reverse Transkriptase

- Superscript III Reverse Transkriptase (Invitrogen, Karlsruhe)

### 1.6.3 DNA-Polymerasen

- *Taq* DNA Polymerase, 5 u/μl (New England Biolabs, Frankfurt am Main)
- REDTaq ReadyMix PCR Reaction Mix (Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen)
- PCR Master Mix (Promega, Mannheim)
- Phusion High Fidelity PCR Kit (New England Biolabs, Frankfurt am Main)
- *Pfu* DNA Polymerase, 2-3 u/μl (Promega, Mannheim)

### 1.6.4 Sonstige Enzyme

- RNase H, 5 u/μl (New England Biolabs, Frankfurt am Main)
- Terminale Deoxynukleotid Transferase (TdT), 30 u/μl (Promega, Mannheim)
- T4 DNA Ligase, 400 u/μl (New England Biolabs, Frankfurt am Main)
- Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIP), 10 u/μl (New England Biolabs, Frankfurt am Main)

## 1.7 Primer

Die Synthese von Primern wurde in entsalzter Qualität bei MWG-Biotech (Ebersberg) und Microsynth (Balgach, Schweiz) in Auftrag gegeben.

### 1.7.1 Standard-Primer

- SP6: 5'-CATTAGGTGACACTATAG-3'
- T7 5'-AATACGACTCACTATAGGG-3'
- GAL1\_FW 5'-AATATACCTCTATACTTTAACGTC-3'
- V5CTerm\_REV 5'-ACCGAGGAGAGGGTTAGGGAT-3'
- pGEX\_FW 5'-ATAGCATGGCCTTTGCAGG-3'
- pGEX\_REV 5'-GAGCTGCATGTGTCAGAGG-3'
- M13\_FW 5'-TGTAACGACGGCCAGT-3'
- M13\_REV 5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3'

### 1.7.2 Degenerierte Primer zur Klonierung von Terpensynthasen

In Klammern angegebene Basen zeigen an, dass diese variieren. I steht für Inosin, das anstatt einer Base als Modifikation eingefügt ist.

- TerpDeg1\_FW 5'-T(AC)CT(GC)(AC)G(AG)CA(AG)CA(GT)GG-3'
- TerpDeg2\_FW 5'-GA(AG)G(AG)(AT)GAA(AG)(ACT)A(CT)(AT)(CT)TIG-3'
- TerpDeg3\_FW 5'-GA(CT)GA(CT)(AG)T(CT)T(AG)(CT)GAT(AG)T(GCT)T  
(AT)TGG-3'
- TerpDeg4\_REV 5'-ACCA(CT)T(GCT)(AT)GC(CT)TC(CT)(AT)(GCT)(CT)A-3'
- TerpDeg5\_FW 5'-ATG(CT)TICA(AG)(CT)TITA(CT)GA(AG)GC-3'
- TerpDeg6\_REV 5'-(CT)T(GT)CAT(AG)TA(AG)TCIGGIA(AG)I(CT)(GT)ITC-3'

### 1.7.3 Degenerierter Primer zur Klonierung von Acyltransferasen

Vgl. Kommentar in Kap. C.1.7.2.

- ATDeg\_FW 5'-GA(CT)TT(CT)GGITGGGG-3'

### 1.7.4 Primer zur cDNA-Synthese und RACE-PCR

- Oligo(dT)<sub>18</sub> 5'-GCTGTCAACGATACGCTACGTAACGGCATGACAGT  
GTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'
- GR3' 5'-GCTGTCAACGATACGCTACGTAACG-3'
- GR3'Nested 5'-CGCTACGTAACGGCATGACAGTG-3'
- FaLINS\_3R 5'-TGGAACCCTTGATGACCTCTATCT-3'
- FaLINS\_5R 5'-TTCTGTGAAGAGATAGAGGTCATC-3'
- LaLIMS\_3R 5'-AAAGTCGATGAGAATGGTGATGAT-3'
- LaLIMS\_5R1 5'-CTCAAAGTTCCCATTGCCCAGAAGTA-3'
- LaLIMS\_5R2 5'-CAGAAGTAGGACTCAACAACCCG-3'
- LaLINS\_3R 5'-TGGCCACCAAGATCATAACCCTAATCAC-3'
- LaLINS\_5R1 5'-TTCCACAAGCCTATCCCTCACAAATG-3'
- LaLINS\_5R2 5'-CGATATTGGCGTCAATTCCATCACCATCC-3'
- LaBERS\_3R 5'-CGTTAGAAGAACTTCAAGAGTTCACAGAG-3'
- LaBERS\_5R1 5'-CAATGAATTGATATCCCATCTCTCG-3'
- LaBERS\_5R2 5'-CTCTGTGAACTCTTGAAGTTCTTCTAACG-3'
- LaAT1\_5R1 5'-CCCACGGCCCATATGCAC-3'
- LaAT1\_5R2 5'-CGGTAGCAGATAACTCTTCCCTTC-3'
- LaAT2\_5R1 5'-GGTACAAATAAACCATCCCATCGA-3'

- LaAT2\_5R2      5'-AACCATCCCATCGAACCGGTTG-3'
- LaAT2\_5R3      5'-ACCCGCTCCGAACACTTTCC-3'

### 1.7.5 Primer zur Vollängenklonierung und Herstellung der Konstrukte

- FaLINS
  - FaLINS\_UTR\_FW      5'-CGAAAGAAATATCATCTCCCACAGC-3'
  - FaLINS\_UTR\_REV      5'-AGTTCAACTCCACTTCCAGTAGTC-3'
  - FaLINS\_FW      5'-TCGGATCCATGAACGTTGAAACCAAG-3'
  - FaLINS\_REV      5'-TGCTCGAGCATTGATACAGTCTC-3'
  
- FvNES
  - FvNES\_M1\_FW      5'-GCGGATCCATGGCATCGTCTTCTTGGG-3'
  - FvNES\_REV      5'-CGGTGCGACTTACATTGATACAGTCTCATAAC-3'
  
- LaLIMS
  - LaLIMS\_UTR\_FW      5'-AAAACCAACTACCCATCACAGAA-3'
  - LaLIMS\_UTR\_REV      5'-GAGGTTATTACTTGACTGAACATTGC-3'
  - LaLIMS\_M1\_FW      5'-CGGAATTCATGTCTATCATTAGCATG-3'
  - LaLIMS\_RR\_FW      5'-CGGAATTCGATGAAACCCGACGCTC-3'
  - LaLIMS\_REV      5'-ATGCGGCCGCTTAGGGATATGGCTC-3'
  
- LaLINS
  - LaLINS\_UTR\_FW      5'-ATACAAAGACAAACCAACCAACAAGC-3'
  - LaLINS\_UTR\_REV      5'-TCATAACTTTGATGATGGGAGAACAC-3'
  - LaLINS\_M1\_FW      5'-GCGAATTCATGTCGATCAATATCAACATGC-3'
  - LaLINS\_RR\_FW      5'-GCGAATTCGACGCTCCGGAACTAC-3'
  - LaLINS\_REV      5'-CGGTGCGACTCATGCGTACGGCTCG-3'
  
- LaBERS
  - LaBERS\_UTR\_FW      5'-AGTGAGATCCTCATCTCATCTCAG-3'
  - LaBERS\_UTR\_REV      5'-GTAGAAATTAAGAACAGGGAGTCTAC-3'
  - LaBERS\_FW      5'-GCGAATTCATGGAGGCGAGAAGGTTCG-3'
  - LaLINS\_REV      5'-CGGTGCGACTCATGGCATATGGAAGGGTAG-3'

- LaAT1
  - LaAT1\_UTR\_FW      5'-CTCTCTGTCTTATCCCTCTCTAAG-3'
  - LaAT1\_UTR\_REV    5'-CATACAACAAAGTCACCAAACGCAG-3'
  - LaAT1\_FW          5'-GCGGATCCATGAAGATCGAAATCAAAGAGTC-3'
  - LaAT1\_REV         5'-GTAGCGGCCGCTCAGATCTCGTAGAACAATTTCT-3'
  - LaAT1\_pYES\_FW    5'-ATGAAGATCGAAATCAAAGAGTC-3'
  - LaAT1\_pYES\_REV   5'-GATCTCGTAGAACAATTTCTG-3'
  
- LaAT2
  - LaAT2\_UTR\_FW      5'-CGAACCCAAACACATCAAATTCCC-3'
  - LaAT2\_UTR\_REV    5'-AGGGAGTGAGAGAGAGAGAG-3'
  - LaAT2\_FW          5'-GACGGATCCATGGGTGAAGTTGCAAATGAC-3'
  - LaAT2\_REV         5'-GTAGCGGCCGCTCAAGCCTCCATCAAGAAC-3'
  - LaAT2\_pYES\_FW    5'-ATGGGTGAAGTTGCAAATGAC-3'
  - LaAT2\_pYES\_REV   5'-AGCCTCCATCAAGAAC-3'

### 1.8 Kits für molekularbiologische Arbeiten

- Extraktion von RNA: RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden)
- Extraktion von DNA: DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden)
- Extraktion von mRNA: Oligotex mRNA Mini Kit (Qiagen, Hilden)
- Gelextraktion: peqGOLD Gel Extraction Kit (Peqlab Biotechnologie, Erlangen)  
Perfectprep Gel Cleanup Kit (Eppendorf, Hamburg)
- Extraktion von Plasmid-DNA:  
Wizard Plus SV Miniprep Kit (Promega, Mannheim)
- Aufreinigung von DNA aus enzymatischen Reaktionen:  
QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden)  
Montage PCR (Millipore, Schwalbach)
- Ligation in den pGEM-T-Vektor:  
pGEM-T Vector System I (Promega, Mannheim)
- Ligation in den pYES2.1-Vektor:  
pYES2.1 TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, Karlsruhe)
- Transformation von *S. cerevisiae*:  
*S. c.* EasyComp Transformation Kit (Invitrogen, Karlsruhe)

## 2 Geräte

### 2.1 Hochauflösende Gaschromatographie-Massenspektrometrie (HRGC-MS)

#### 2.1.1 Gerätekonfiguration

GC:	Thermo Finnigan Trace GC 2000 ultra (Thermo Finnigan, Egelsbach)
Autosampler:	Thermo Finnigan AI 3000 (Thermo Finnigan, Egelsbach)
Injektor:	Split/Splitless-Injektor
Trennsäule:	BPX5 (30 m x 0,25 mm, $d_f=0,25 \mu\text{m}$ ) (SGE, Darmstadt)
Massenspektrometer:	Thermo Finnigan Trace DSQ (Thermo Finnigan, Egelsbach)
Ionisation:	Elektronenstoßionisation (EI positiv), 70 eV
Temperatur:	Ionenquelle 200 °C, Transferline 280 °C
Photomultiplier:	1195 V
Scanrate:	500 amu/s
Datenaufnahme und -auswertung:	Xcalibur für Windows V. 1.4 (Thermo Electron, San Jose, USA) und NIST MS Search 2.0a

#### 2.1.2 Methode 1: Identifizierung

Injektor:	Temperatur 220 °C, 2 $\mu\text{l}$ Splitless injection
Trägergas:	Helium 5.0, Konstanter Druck 75 kPa
Temperaturprogramm:	40 °C (5 min isotherm), 4 °C/min bis 240 °C (25 min isotherm)
Scanbereich:	$m/z$ 30-350

#### 2.1.3 Methode 2: Quantifizierung

Injektor:	Temperatur 200 °C, 2 $\mu\text{l}$ Splitless injection
Trägergas:	Helium 5.0, Konstanter Fluss 1,5 ml/min
Temperaturprogramm:	40 °C (1 min isotherm), 15 °C/min bis 250 °C (10 min isotherm)
Scanbereich:	$m/z$ 30-400



## 2.2 Chiralphasen-Gaschromatographie (Chirale GC)

Gerät	GC 8000 Series (Thermo Finnigan, C. E. Instruments, Egelsbach)
Kapillarsäule:	33 % Heptakis(2,3,6-tri-O-ethyl)- $\beta$ -cyclodextrin in OV-1701-vi (30 m x 0,25 mm, $d_f=0,25 \mu\text{m}$ )
Trägergas:	Wasserstoff, 100 kPa
Detektor:	Flammenionisationsdetektor (FID), 220 °C
Injektor:	On-column
Temperaturprogramm:	40 °C (2 min isotherm), 2 °C/min bis 50 °C, 1 °C/min bis 60 °C, 2 °C/min bis 200 °C (25 min isotherm)

## 2.3 Multidimensionale Gaschromatographie (MDGC)

Zur multidimensionalen Gaschromatographie wurden zwei GC 8000 Series Gaschromatographen (Thermo Finnigan, C.E. Instruments, Egelsbach) gekoppelt. Die Verbindung der Säulen erfolgte durch eine mechanische, ventillose, elektrisch betriebene Verschiebeeinrichtung, das Moving-Column-Stream-Switching-System (MCSS), das sich in einem Glasdom (desaktiviert, inert) in Säulenofen 1 befand.

Injektor:	215 °C, Splitinjektion, Splitfluss 30 ml/min Splitverhältnis ca. 1:15
Trennsäule 1:	DBWAX (30 m x 0,32 mm, $d_f=0,25 \mu\text{m}$ , J&W Scientific)
Trägergas 1:	Wasserstoff, 165 kPa
Temperaturprogramm 1:	35 °C (5 min isotherm), 3 °C/min bis 230 °C (15 min isotherm)
Detektor 1 (Monitor):	Flammenionisationsdetektor (FID), 260 °C
Trennsäule 2 (chiral):	25 % Heptakis(2,3-di-O-methyl)- $\beta$ -cyclodextrin in SE 54 (30 m x 0,25 mm, $d_f=0,25 \mu\text{m}$ )
Trägergas 2:	Wasserstoff, 98 kPa
Temperaturprogramm 2:	35 °C (8 min isotherm), 2 °C/min bis 200 °C (10 min isotherm)
Detektor 2:	Flammenionisationsdetektor (FID), 200 °C

## 2.4 Multidimensionale Gaschromatographie-Massenspektrometrie (MDGC-MS)

Wie unter 2.3 beschrieben wurden zwei Gaschromatographen (GC 8160 und GC 8130, Fisons Instruments, Dreieich) durch MCSS gekoppelt. Als zweiter Detektor kam jedoch ein Massenspektrometer zum Einsatz.

Trennsäule 1:	DBWAX (30 m x 0,32 mm, $d_f=0,25 \mu\text{m}$ , J&W Scientific)
Temperaturprogramm 1:	60 °C, 10 °C/min bis 240 °C (10 min isotherm)
Detektor 1 (Monitor):	Flammenionisationsdetektor (FID), 250 °C
Transferkapillaren:	0.25 mm I.D., unbelegt, deaktiviert, 200 °C
Trennsäule 2 (chiral):	2,3-Diethyl-6- <i>t</i> -butyl-dimethyl- $\beta$ -cyclodextrin in PS086 (25 m x 0,25 mm, $d_f = 0,15 \mu\text{m}$ )
Temperaturprogramm 2:	60 °C (15 min isotherm), 2 °C/min bis 200 °C
Detektor 2:	Fisons Instruments MD 800 (Thermo Electron, Dreieich) Ionisation: Elektronenstoßionisation (EI), 70 eV Temperatur: Ionenquelle 220 °C, Transferline 300 °C Quellendruck: $1 \times 10^{-5}$ mbar Multipliiert: 350 V Scanbereich: $m/z$ 38-450
Trägergas:	Helium 5.0, Säulenkopfdruck 165 kPa
Make-up-Gas:	Stickstoff 5.0
Brennergase:	Wasserstoff 5.0, Luft
Datenaufnahme und -auswertung:	Xcalibur für Windows V. 1.4 (Thermo Electron, San Jose, USA)

## 2.5 Hochleistungsflüssigchromatographie-Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie (HPLC-ESI-MS/MS)

### 2.5.1 HPLC-System

Gerät:	Agilent 1100 Series (Agilent Technologies, Waldbronn)
Pumpe:	Agilent G 1311A Quaternäre Pumpe
Injektor:	Agilent Sample Injector Model G 1313A ALS
Injektionsvolumen:	5 $\mu\text{l}$

Trennsäule:	Luna 5u C18(2) 100 A, 150 x 200 mm, 5 µm Partikelgröße (Phenomenex, Aschaffenburg)
Vorsäule:	Security Guard Cartridges (Phenomenex, Aschaffenburg)
Fließmittel:	A: Wasser + 0,05 % Ameisensäure B: Acetonitril + 0,05 % Ameisensäure
Fluss:	0,2 ml/min
UV-Detektor:	Agilent G 1314A VWD UV-Detektor mit variabler Wellenlänge

### 2.5.2 Massenspektrometer

Gerät:	Esquire 3000plus (Bruker Daltonik, Bremen)
Spraygas:	Stickstoff, 35,0 psi
Trockengas:	Stickstoff, 10,0 l/min, 300 °C
Datenaufnahme:	Bruker Daltonics Esquire 5.1 (Bruker Daltonik, Bremen)
Datenauswertung	Data Analysis Version 3.1 (Bruker Daltonik, Bremen)

### 2.5.3 Methode 1

Mit dieser Methode wurden die FaGT2-Assays und Erdbeerextrakte gemessen, sofern negative Ionisierung möglich war.

Fließmittelgradient:	0–30 min: 5–100 % B
Säulentemperatur:	20 °C
UV-Detektion:	254 nm
Scanbereich:	<i>m/z</i> 30–700
Polarität:	negativ
Max. Akkumulationszeit:	200 ms
Ion charge control (ICC):	10000
Kapillarspannung:	+4000 V
Zielmasse (Smart Parameter Setting):	<i>m/z</i> 200
MS/MS:	AutoMS2
Kollisionsgas:	Helium ( $3,56 \times 10^{-6}$ mbar)
Kollisionsenergie (Amplitude)	1,00 V

### 2.5.4 Methode 2

Mit dieser Methode wurden die FaGT2-Assays und Erdbeerextrakte gemessen, bei denen positive Ionisierung erforderlich war.

Fließmittelgradient:	0–30 min: 5–100 % B
Säulentemperatur:	20 °C
UV-Detektion:	254 nm
Scanbereich:	<i>m/z</i> 30–700
Polarität:	positiv
Max. Akkumulationszeit:	200 ms
Ion charge control (ICC):	20000
Kapillarspannung:	-4000 V
Zielmasse (Smart Parameter Setting):	<i>m/z</i> 200 (Nicotinsäure, DMHF) <i>m/z</i> 80 (Crotonsäure)
MS/MS:	AutoMS2
Kollisionsgas:	Helium ( $3,56 \times 10^{-6}$ mbar)
Kollisionsenergie (Amplitude)	1,00 V

### 2.5.5 Methode 3

Mit dieser Methode wurden die Acyltransferase-Assays gemessen, bei denen Shikimisäure, Chinasäure und Anthranilsäure als Akzeptorsubstrate eingesetzt wurden.

Fließmittelgradient:	0–30 min: 0–100 % B
Säulentemperatur:	25 °C
UV-Detektion:	254 nm
Scanbereich:	<i>m/z</i> 30–1000
Polarität:	negativ
Max. Akkumulationszeit:	200 ms
Ion charge control (ICC):	10000
Kapillarspannung:	+4000 V
Zielmasse (Smart Parameter Setting):	<i>m/z</i> 400
MS/MS:	AutoMS2
Kollisionsgas:	Helium ( $3,56 \times 10^{-6}$ mbar)
Kollisionsenergie (Amplitude)	1,00 V

### 2.5.6 Methode 4

Mit dieser Methode wurden die Acyltransferase-Assays gemessen, bei denen Catechin, Agmatin und Tyramin als Akzeptorsubstrate eingesetzt wurden.

Fließmittelgradient:	0–30 min: 0–100 % B
Säulentemperatur:	25 °C
UV-Detektion:	254 nm
Scanbereich:	<i>m/z</i> 30–1000
Polarität:	positiv
Max. Akkumulationszeit:	200 ms
Ion charge control (ICC):	20000
Kapillarspannung:	-4000 V
Zielmasse (Smart Parameter Setting):	<i>m/z</i> 400
MS/MS:	AutoMS2
Kollisionsgas:	Helium ( $3,56 \times 10^{-6}$ mbar)
Kollisionsenergie (Amplitude)	1,00 V

### 2.5.7 Methode 5

Mit dieser Methode wurden die Acyltransferase-Assays gemessen, bei denen Pelargonidin-3-glucosid als Akzeptorsubstrat eingesetzt wurde.

Fließmittelgradient:	0–30 min: 0–100 % B
Säulentemperatur:	25 °C
UV-Detektion:	520 nm
Scanbereich:	<i>m/z</i> 30–800
Polarität:	positiv
Max. Akkumulationszeit:	200 ms
Ion charge control (ICC):	20000
Kapillarspannung:	-4000 V
Zielmasse (Smart Parameter Setting):	<i>m/z</i> 529
MS/MS:	AutoMS2
Kollisionsgas:	Helium ( $3,56 \times 10^{-6}$ mbar)
Kollisionsenergie (Amplitude)	1,00 V

## 2.6 Präparative Hochleistungsflüssigchromatographie

Pumpensystem:	Analytische HPLC Maxi Star Niederdruckpumpe (Knauer, Berlin)
Degasser:	4-Wege-Degasser (Knauer, Berlin)
Mischkammer:	Dynamische Mischkammer (Knauer, Berlin)
Injektor:	Vier-Wege-Ventil Nr. 7125 (Rheodyne), Probenschleife 225 µl
Trennsäule:	Synergi 4u Fusion RP-80, 250 mm x 15 mm, 4 µm Partikelgröße (Phenomenex, Aschaffenburg)
Fließmittel:	A: Wasser + 0,05 % Ameisensäure B: Acetonitril + 0,05 % Ameisensäure
Fluss:	5,0 ml/min
Gradient:	0–30 min: 15–100 % B
Detektor:	UV-Detektor Nr. 29815 mit variabler Wellenlänge (Knauer, Berlin)
Wellenlänge:	254 nm
Datenaufnahme und -auswertung:	Eurochrom 2000 (Knauer, Berlin)

## 2.7 Flüssigszintillationszähler (LSC)

Gerät:	LKB Rackbeta 1219 (Perkin-Elmer, Rodgau)
Messzeit:	5 Minuten
Reaktionsgefäße:	Schraubgefäße 15 ml (Hartenstein, Würzburg)
Szintillationscocktail:	Ultima Gold XR LSC (Perkin-Elmer, Rodgau)

## 2.8 Sonstige Geräte

Thermocycler:	Primus 96 advanced (Peqlab Biotechnologie, Erlangen)
Sterile Werkbank:	Waldner FAZ 3 (Waldner Laboreinrichtungen, Wangen)
Schüttel-Inkubator:	GFL 3032 und 3033 (Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel)
Spektralphotometer:	Specord 200 (Analytik Jena, Jena)
Zentrifugen:	Sorvall RC 5B Plus (Kendro, Hamburg) Mini Spin 5452 (Eppendorf, Hamburg) Eppendorf 5415R (Eppendorf, Hamburg) Sigma 4K15 (Sigma Laborzentrifugen, Osterode am Harz)
Ultraschall-Sonotrode:	Bandelin Sonopuls, UW2200 (Bandelin electronic, Berlin)

Thermomixer:	Eppendorf Comfort (Eppendorf, Hamburg)
pH-Meter:	CG 820 (Schott Geräte, Hofheim) mit Elektrode Inlab 423 (Mettler-Toledo, Gießen)
Blot-Kammer:	Criterion-Blotter (Bio-Rad Laboratories, München)
Horizontale Gelkammer:	MIDI 1 Elektrophorese-Kammer (Carl Roth, Karlsruhe)
Vertikale Gelkammer:	MINI Vertikal Doppel-Elektrophorese-Kammer (Carl-Roth, Karlsruhe)
Spannungsquelle:	Consort E 835 (Consort nv, Turnhout, Belgien)
Waagen:	Sartorius 1702 (Sartorius, Göttingen) Scout Pro SP U 4001 (Ohaus Corporation, Pine Brook, USA)
Vortex:	REAX 2000 (Heidolph Instruments, Schwabach)
Ultraschallbad:	RK103H (Bandelin electronic, Berlin)
Wasserbad:	HC 5/6 (Julabo Labortechnik, Seelbach)
Mikrowelle:	MS-1915H (LG, Willich)
Überkopfschüttler:	Rotator (Labinco, DG Breda, Niederlande)
Ultra-Turrax:	T18 basic (IKA-Werke, Staufen)
Rotationsverdampfer:	Laborota 4000 mit Vakuumpumpe Rotavac (Heidolph Instruments, Schwabach)
Autoklav:	HST 4-5-7 (Zirbus Technology, Bad Grund)
Geldokumentation	Alpha Imager 2200 mit Alpha Ease Software (Alpha Innotech, San Leandro, USA)
Mikroskop:	Zeiss Axioskop 2 plus (Objektiv 100X, Okular 10X) (Carl Zeiss, Oberkochen) mit Sony Cybershot DSC S75 (Sony Deutschland, Köln)

## 2.9 Software und Internetressourcen

- SigmaPlot V. 8.02 (Systat Software, Erkrath)
- EditSeq V. 4.0 (DNASTAR, Madison, USA)
- MegAlign V. 4.0 (DNASTAR, Madison, USA)
- PrimerSelect V. 4.0 (DNASTAR, Madison, USA)
- Treeview V. 1.6.6 (Page, 1996)
- NCBI (BLAST, GenBank, UniGene) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>  
(Altschul et al., 1997; Schäffer et al., 2001)

- SeedGenes Projekt <http://www.seedgenes.org/>  
(Tzafrir et al., 2003)
- Arabidopsis MPSS <http://mpss.udel.edu/at/>  
(Brenner et al., 2000)
- ClustalW 1.83 <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>  
(Thompson et al., 1994)
- SDSC Biology Work Bench <http://workbench.sdsc.edu/>
- CBS SignalP 3.0 Server <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>  
(Bendtsen et al., 2004)
- CBS TargetP 1.1 Server <http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>  
(Emanuelsson et al., 2000)
- CBS ChloroP 1.1 Server <http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>  
(Emanuelsson et al., 1999)
- Predotar V. 1.03 <http://urgi.infobiogen.fr/predotar/>  
(Small et al., 2004)
- PSORT V. 6.4 <http://psort.nibb.ac.jp/>  
(Nakai und Horton, 1999)
- CAZy Datenbank <http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>  
(Campbell et al., 1997; Coutinho et al., 2003)



### 3 Methoden

#### 3.1 Allgemeine Techniken

##### 3.1.1 Extraktion pflanzlicher mRNA und DNA

100-200 mg Pflanzenmaterial wurden in Reaktionsgefäße eingewogen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und mit sterilen Mikro-Mörsern pulverisiert. Anschließend erfolgte die Extraktion der Gesamt-RNA (tRNA) mit Hilfe des RNeasy Plant Mini Kits (Qiagen, Hilden). Die weitere Isolierung von mRNA wurde nach Anleitung des Oligotex mRNA Mini Kits (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Zur Isolierung von DNA wurden gleiche Mengen an Pflanzenmaterial eingesetzt und der DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden) verwendet.

##### 3.1.2 Polymerase-Kettenreaktion

DNA-Fragmente mit bekannter und unbekannter Sequenz wurden mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. Je nach Anwendung kamen verschiedene Protokolle zum Einsatz. Standardanwendungen wie Kolonie-PCR wurden mit einem Mastermix (REDTaq oder PCR Master Mix) durchgeführt, schwierigere mit *Taq* Polymerase. Reaktionen, bei denen eine hohe Genauigkeit erforderlich ist, wie z. B. die Klonierung von Vollängen, wurden mit den fehlerkorrigierenden (*proof-reading*) Enzymen Phusion oder *Pfu* Polymerase angesetzt. In Tabelle C-1 sind die jeweiligen Mengen für 25 µl-Ansätze angegeben, die in PCR-Reaktionsgefäße pipettiert wurden. Das Volumen Wasser wurde der Menge an Matrizen-DNA angepasst.

**Tab. C-1:** Pipettier-Schema für PCR-Reaktionen

<b>Mastermix</b>	<b><i>Taq</i></b>	<b>Phusion</b>	<b><i>Pfu</i></b>
12,5 µl 2X Mastermix	2,5 µl 10X Thermopol Puffer	4 µl 5X HF Puffer	5 µl Pfu Puffer
–	1 µl dNTPs (10 mM)	0,5 µl dNTPs (10 mM)	0,5 µl dNTPs (10 mM)
1 µl Vorwärts-Primer (10 pmol/µl)			
1 µl Rückwärts-Primer (10 pmol/µl)			
–	0,2 µl <i>Taq</i> Polymerase	0,25 µl Phusion Polymerase	0,25 µl <i>Pfu</i> Polymerase
x µl Matrizen-DNA			
y µl Wasser			
Σ 25 µl			

Die Reaktionsgefäße wurden im Thermocycler mit verschiedenen Temperaturprogrammen behandelt (Tab. C-2).

**Tab. C-2:** Temperaturprogramme bei der PCR

	<b>Taq/Mastermix</b>	<b>Phusion</b>	<b>Pfu</b>
Vordenaturierung	94 °C 2 min	98 °C 2 min	94 °C 2 min
Anzahl der Zyklen	33	30	30
Denaturierung	94 °C 30 s	98 °C 10 s	94 °C 30 s
Primerhybridisierung	$T_m - 5^\circ\text{C}$ 30 s	$T_m + 3^\circ\text{C}$ 20 s	$T_m - 5^\circ\text{C}$ 30 s
Elongation	72 °C 1 min/1 kb	72 °C 25 s/1 kb	72 °C 2 min/1 kb
Abschließende Elongation	72 °C 5 min	72 °C 5 min	72 °C 5 min

Die PCR-Reaktionen bestanden aus einer Vordenaturierungsphase gefolgt von einer bestimmten Anzahl Zyklen zur Denaturierung, Primerhybridisierung und Elongation und wurden mit einer abschließenden Elongationsphase beendet. Die Schmelztemperatur der Primer ( $T_m$ ) war maßgeblich für die Wahl der Primerhybridisierungstemperatur, während die Länge des gewünschten DNA-Fragmentes die Dauer der Elongationsphase bestimmte. In einigen Fällen wurde eine abweichende Zahl an Zyklen gewählt, um eine höhere Ausbeute zu erreichen bzw. eine Überamplifizierung und resultierende Amplifizierungsfehler zu verhindern.

### 3.1.3 Gelelektrophorese für DNA

Zur qualitativen und halbquantitativen Analyse von DNA wurde diese elektrophoretisch in einem Agarosegel aufgetrennt. Je nach Größe der DNA-Fragmente wurde ein 0,7-1,5%iges Agarosegel hergestellt, wobei größere Fragmente bei niedrigeren Konzentrationen besser aufgetrennt wurden. Zu 80 ml 1X TAE-Puffer wurde eine entsprechende Menge Agarose eingewogen und in der Mikrowelle zum Sieden erhitzt. Nach Abkühlen auf ca. 50 °C wurden 4 µl einer 1%igen Ethidiumbromid-Lösung zugegeben und das Gel gegossen. Die zu analysierenden Proben wurden mit DNA-Ladepuffer versetzt, aufs Gel aufgetragen und bei einer Spannung von 10 V/cm für 30-45 Minuten in einer horizontalen

Gelkammer aufgetrennt. Ein Größenstandard diente zur Größenbestimmung und halbquantitativen Bestimmung der DNA-Fragmente. Die Visualisierung erfolgte in einem Geldokumentationsgerät mittels UV-Strahlung. Zur Isolierung einzelner Fragmente wurden die entsprechenden Banden aus dem Gel ausgeschnitten und mit einem Geextraktionskit behandelt.

### 3.1.4 Subklonierung

Zur Subklonierung von PCR-Fragmenten wurde das pGEM-T-System verwendet, das die rasche Ligation von PCR-Fragmenten mit A-Überhang in den pGEM-T-Vektor erlaubt. *Taq*-Polymerase erzeugt diesen Überhang an allen PCR-Fragmenten, sodass diese direkt zur Ligation eingesetzt werden können. *Pfu* oder *Phusion* Polymerase erzeugen dagegen PCR-Produkte, die glatte Enden haben. Daher wurden diese vor der Ligation nach folgendem Ansatz für 20 Minuten auf 72 °C erhitzt, um A-Überhänge zu erzeugen:

- 7 µl PCR-Produkt (glattes Ende)
- 1 µl 10X Thermopol-Puffer (New England Biolabs, Frankfurt am Main)
- 1 µl dATP (2 mM) (Promega, Mannheim)
- 1 µl *Taq* Polymerase

Ein Ligationsansatz wurde nach folgendem Schema pipettiert und über Nacht bei 4 °C inkubiert:

- 5 µl 2X Rapid Ligation Puffer
- 3 µl PCR-Produkt mit A-Überhang
- 1 µl pGEM-T Vektor
- 1 µl T4 DNA Ligase

### 3.1.5 Ligation in pYES2.1

Zur Ligation in den Hefeexpressionsvektor pYES2.1 wurde das pYES2.1 TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Dabei wurden 2 µl PCR-Produkt mit A-Überhang (Kap. C.3.1.4) mit 1 µl *salt solution* (Teil des Kits), 2 µl Wasser und 0,5 µl Vektor versetzt und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

### 3.1.6 Restriktionsverdau, Dephosphorylierung und Ligation klebriger Enden

Expressionsvektoren und das jeweilige Insert wurden mit Restriktionsenzymen verdaut, um „klebrige Enden“ zu erzeugen, die die Ligation ermöglichten. Es wurden

zwei unterschiedliche Restriktionsschnittstellen gewählt, um die richtige Orientierung bei der Ligation zu gewährleisten. Dazu wurden in einem Ansatz jeweils zwei Restriktionsenzyme gleichzeitig eingesetzt. Die Reaktion erfolgte in dem Puffer, der vom Hersteller für die Enzymkombination vorgegeben war. Der Verdau wurde in 30 µl-Ansätzen durchgeführt, in denen mindestens 1 u Enzym/µg DNA vorlag. Nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden bei 37 °C wurde für 20 Minuten bei 80 °C inaktiviert. Vektoren wurden anschließend mit 1 µl CIP dephosphoryliert (30 Minuten, 37 °C), um Selbstligation zu verhindern.

Die Reaktionsansätze wurden über Gelelektrophorese aufgetrennt, und das gewünschte Fragment wurde aus dem Gel ausgeschnitten und extrahiert (Kap. C.3.13).

Nach folgendem Ansatz wurde das Fragment in den Vektor ligiert:

2 µl	10X T4 DNA Ligase Puffer
1 µl	T4 DNA Ligase
0,5 µg	Vektor (entsprechend einem Molanteil)
x µl	Insert (entsprechend mindestens einem Molanteil)
ad 20 µl	Wasser

Der Ansatz wurde für 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

### 3.1.7 Herstellung kompetenter *Escherichia coli* Zellen

Es wurde eine modifizierte Rubidiumchlorid-Methode (Hanahan, 1985) angewandt, um chemisch kompetente *E. coli* Zellen herzustellen. 2,5 ml einer Übernachtskultur des entsprechenden *E. coli* Stammes wurden in 250 ml LB-Medium (mit 20 mM MgSO<sub>4</sub> supplementiert) verdünnt und bei 37 °C bis zu einer optischen Dichte (OD<sub>600</sub>) von 0,4 bis 0,6 angezogen. Durch 5-minütige Zentrifugation (4500 g, 4 °C) wurden die Zellen pelletiert und in 100 ml eiskaltem TFB1-Puffer aufgenommen. Nach Inkubation auf Eis für 5 Minuten wurden die Zellen ein zweites Mal abzentrifugiert und anschließend in 10 ml eiskaltem TFB2-Puffer resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten auf Eis wurden die Zellen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und zur späteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

### 3.1.8 Transformation von *Escherichia coli* Zellen

50 µl kompetente *E. coli* Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit 5 µl Ligationsansatz oder 0,5 µl Plasmid-DNA vorsichtig gemischt. Nach einer Inkubation von 20 Minuten

auf Eis wurde der Transformationsansatz für 50 Sekunden bei genau 42 °C im Wasserbad erhitzt (Hitzeschock) und danach sofort für 2 Minuten auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Zellen mit 950 µl SOC-Medium gemischt und bei 37 °C und 600 upm für 90 Minuten geschüttelt. Ein Teil der Suspension wurde auf vorgewärmten Agarplatten ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Die Platten waren zur Selektion mit entsprechenden Antibiotika (abhängig von Zellstamm und Vektor, Kap. C1.3 und C1.4) und im Falle des pGEM-T-Vektors zusätzlich mit 0,5 mM IPTG und 80 µg/ml X-Gal supplementiert.

### **3.1.9 Transformation von *Saccharomyces cerevisiae*-Zellen**

Kompetente Zellen des Stamms *S. cerevisiae* INVSc1 wurden mit Hilfe des *S.c.* EasyComp Transformation Kit (Invitrogen, Karlsruhe) transformiert. 15 µl der Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit 0,5 µl Plasmid-DNA und 250 µl *Solution III* (Teil des Kits) mit dem Vortexer gut gemischt und eine Stunde lang bei 30 °C inkubiert. Während dieser Zeit wurde alle 15 Minuten erneut mit dem Vortexer gemixt. Anschließend wurde der Ansatz komplett auf eine vorgewärmte SGI-Platte ausplattiert und 2-4 Tage bei 30 °C inkubiert, bis deutliche Kolonien zu sehen waren.

### **3.1.10 Überprüfung transformierter Kolonien**

Wurden Zellen mit dem pGEM-T-Vektor transformiert, so ermöglichte das Blue-White-Screening eine erste Beurteilung, ob Kolonien das gewünschte Plasmid enthielten.

Zur weiteren Absicherung wurden nach Transformationen Kolonie-PCRs durchgeführt. Dazu wurde jeweils ein Teil einer Kolonie in ein PCR-Reaktionsgefäß überführt, in dem bereits ein PCR-Gemisch aus Mastermix und vektorspezifischen Primern vorlag (Kap. C.1.4 und C.3.1.2). Die Amplifikation eines Fragmentes mit entsprechender Größe bestätigte die korrekte Transformation.

### **3.1.11 Isolierung von Plasmid-DNA**

5 ml LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika wurden mit positiven Kolonien (Kap. C.3.1.10) angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 140 upm geschüttelt. Die Zellen wurden durch 5-minütige Zentrifugation bei 5000 g pelletiert. Mit einem Miniprep-Kit wurde die Plasmid-DNA extrahiert und per Gelelektrophorese auf Menge und Reinheit überprüft.

### 3.1.12 Fällung von DNA

Um DNA aus Lösungen zu fällen, wurden diese mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5,2) und mit dem 2,5-fachen Volumen Ethanol p. a. versetzt. Nach 10 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Lösung 20 Minuten lang bei 13000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde von der nicht sichtbaren, pelletierten DNA vorsichtig abgezogen. Anschließend wurde der Rückstand mit 200 µl 70%igem Ethanol gewaschen, erneut abzentrifugiert (10 Minuten, 13000 g) und bei 50 °C getrocknet.

### 3.1.13 Sequenzierung von DNA

Zur Sequenzierung wurden 10 µl Plasmid-DNA-Lösung (entspricht ca. 1 µg DNA) gefällt und an MWG-Biotech (Ebersberg) zur Sequenzierung eingeschickt. Es wurden vektorspezifische Primer (Kap. C.1.4) verwendet, die die Sequenzierung von beiden Seiten des Inserts ermöglichte. Wenn dabei die Sequenzinformation aufgrund der Insertgröße nicht vollständig gelesen werden konnte, so wurden weitere Sequenzierungen mit flankierenden Primern durchgeführt.

## 3.2 Klonierung von Terpensynthasen und Acyltransferasen

### 3.2.1 Herstellung von cDNA (RT-PCR)

Zur Herstellung von cDNA wurde mRNA aus Lavendelblättern (Lavendel 1), Lavendelblüten (Lavendel 2) und aus Erdbeerblättern (*Fragaria x ananassa* cv. Senga sengana und Elsanta sowie *Fragaria vesca*) in einer Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) umgeschrieben. Um sämtliche mRNA Transkripte in cDNA umzuschreiben wurde folgender Ansatz pipettiert:

11,5 µl	mRNA-Lösung
1 µl	Oligo(dT) <sub>18</sub> -Primer (50 pmol/µl)
1 µl	dNTPs (10 mM)

Nach 5 Minuten bei 65 °C wurde eine Minute auf Eis abgekühlt und die folgenden Lösungen zugegeben:

4 µl	5X Superscript III Puffer
1 µl	DTT (0,1 M)
0,5 µl	RNAse Inhibitor Gold (Peqlab Biotechnologie, Erlangen)
1 µl	Superscript III Reverse Transkriptase

Die Reverse Transkription wurde für 50 Minuten bei 50 °C durchgeführt und anschließend durch 15-minütiges Erhitzen auf 70 °C gestoppt. Zum Abbau der mRNA wurde abschließend 1 µl RNase H zugegeben und für 20 Minuten bei 37 °C inkubiert.

Sollte genspezifische cDNA generiert werden, wurden statt des Oligo(dT)<sub>18</sub>-Primers 0,2 µl genspezifischer Primer (10 pmol/µl) zugegeben und lediglich 15 Minuten bei 55 °C inkubiert. Nach der Behandlung mit RNase H erfolgte die Aufreinigung des Ansatzes mit einem Kit.

### 3.2.2 PCR mit degenerierten Primern

Zur Klonierung eines Teilstücks von Terpensynthasen und Acyltransferasen wurden PCR-Reaktionen mit *Taq*-Polymerase durchgeführt (Kap. C.3.1.2). Als Primer wurden bei den Terpensynthasen jeweils sämtliche mögliche Kombinationen aus den degenerierten Vorwärts- und Rückwärts-Primern angewendet (Kap. C.1.7.2). Bei der Klonierung von Acyltransferasen wurde die Kombination aus Vorwärtsprimer (Kap. C.1.7.3) und den Primern GR3' und GR3'Nested, die an den Anker der cDNA hybridisieren, gewählt. Als Matrizen-DNA diente die entsprechende cDNA, die Primerhybridisierungstemperatur betrug 43 °C bei den Terpensynthasen und 42 °C bei den Acyltransferasen. Häufig erbrachte diese erste PCR lediglich ein sehr schwach amplifiziertes Fragment. Die entsprechende Bande wurde aus dem Gel extrahiert und diente als Matrize in einer zweiten PCR. Der daraus resultierende Sequenzabschnitt wurde subkloniert und sequenziert. In Tabelle C-3 ist aufgeführt, welche Primerkombinationen erfolgreich eingesetzt wurden und welche Größe das amplifizierte Fragment hatte.

**Tab. C-3:** Primerkombinationen, die bei der Klonierung von Terpensynthasen und Acyltransferasen erfolgreich eingesetzt wurden

cDNA	1. PCR	2. PCR	Fragmentgröße	Enzym
<i>Fragaria x ananassa</i> , Blatt	TerpDeg5_FW TerpDeg4_REV	TerpDeg3_FW TerpDeg6_REV	108 bp	FaLINS
<i>Fragaria vesca</i> , Blatt	TerpDeg3_FW TerpDeg4_REV	TerpDeg3_FW TerpDeg6_REV	108 bp	FvLINS
Lavandel 1, Blatt	TerpDeg5_FW TerpDeg6_REV	TerpDeg5_FW TerpDeg6_REV	582 bp	LaLIMS
		TerpDeg3_FW TerpDeg6_FW	108 bp	
Lavandel 2, Blüte	TerpDeg5_FW TerpDeg6_REV	TerpDeg5_FW TerpDeg6_REV	582 bp	LaLINS
Lavandel 2, Blüte	TerpDeg3_FW TerpDeg6_REV	TerpDeg3_FW TerpDeg6_REV	108 bp	LaBERS
Lavandel 2, Blüte	ATDeg_FW GR3'	ATDeg_FW GR3'	338 bp	LaAT1
Lavandel 2, Blüte	ATDeg_FW GR3'	ATDeg_FW GR3'	356 bp	LaAT2

### 3.2.3 3'-Rapid Amplification of cDNA Ends (3'-RACE-PCR)

Durch PCR mit degenerierten Primern wurde nur ein Teilstück der Gensequenz für die Terpensynthasen erhalten. Das 3'-Ende wurde jeweils mit Hilfe der 3'-RACE-PCR amplifiziert. Dazu wurde eine *Taq* Polymerase-PCR mit einem Primer, der an den Anker des Oligo(dT)<sub>18</sub>-Primers bindet (GR3' bei LaLIMS und LaBERS; GR3'Nested bei LaLINS) und einem genspezifischen Primer (in Kap. C.1.7.4 jeweils mit x\_3R bezeichnet) durchgeführt. Als Temperatur wurde ein Touchdown-Protokoll (Don et al., 1991) gewählt, bei dem die Primerhybridisierungstemperatur in den ersten Zyklen kontinuierlich abnahm.

Vordenaturierung:	94 °C, 2 min
1. Anzahl der Zyklen:	12
Denaturierung:	94 °C, 30 s
Primerhybridisierung:	68°C, -1 °C/Zyklus, 30 s
Elongation:	72 °C, 1 min/1 kb



2. Anzahl der Zyklen: 24  
Denaturierung: 94 °C, 30 s  
Primerhybridisierung: 55 °C, 30 s  
Elongation: 72 °C, 1 min/1 kb  
Abschließende Elongation: 72 °C, 5 min

Die erhaltenen Fragmente wurden in den Vektor pGEM-T subkloniert und sequenziert.

### 3.2.4 5'-Rapid Amplification of cDNA Ends (5'-RACE-PCR)

Die 5'-RACE-PCR ermöglichte die Amplifizierung unbekannter 5'-Enden von mRNA-Transkripten. Dazu wurde zunächst mRNA mit einem genspezifischen Primer (in Kap. C.1.7.4 jeweils mit x\_5R1 bezeichnet) zu cDNA umgeschrieben. Anschließend wurde an das 3'-Ende der cDNA (entspricht dem 5'-Ende des mRNA-Transkriptes) durch eine enzymatische Reaktion mit Terminale Deoxynukleotid Transferase (TdT) ein Oligo-(dA)-Anhang synthetisiert. Dazu wurde der folgende Ansatz für 10 Minuten bei 37 °C inkubiert und anschließend für 10 Minuten bei 70 °C inaktiviert.

- 14,6 µl Aufgereinigte cDNA
- 0,4 µl dATP (10 mM) (Promega, Mannheim)
- 4 µl 5X TdT-Puffer
- 1 µl TdT

Anschließend wurde zur Vervielfältigung des 5'-Endes folgender PCR-Reaktionsansatz pipettiert. In den meisten Fällen war der genspezifische Rückwärts-Primer in verschachtelter Position zum cDNA-Synthese-Primer.

- 2,5 µl 10X Thermopol Puffer (New England Biolabs, Frankfurt am Main)
- 1 µl dNTPs (10 mM)
- 1 µl Oligo(dT)<sub>18</sub>-Primer (1 pmol/µl)
- 1 µl Vorwärts-Primer (10 pmol/µl)
- 1 µl Rückwärts-Primer (10 pmol/µl)
- 0,2 µl Taq-Polymerase
- 1 µl Oligo(dA)-cDNA
- 17,3 µl Wasser

Im Thermocycler erfolgten zunächst die Hybridisierung des Oligo(dT)<sub>18</sub>-Primers und die Zweitstrangsynthese. Das anschließende Temperaturprogramm folgte einem Touchdown-PCR-Protokoll (Don et al., 1991). Dabei richtete sich die Primerhybridisierungstemperatur im zweiten Teil nach der Schmelztemperatur  $T_m$  der Primer. Entsprechend wurde die Temperatur im ersten Teil zyklusweise abgesenkt.

Vordenaturierung:	94 °C, 5 min
Hybridisierung Oligo(dT) <sub>18</sub> :	50 °C, 2 min
Elongation (Zweitstrang):	72 °C, 40 min
1. Anzahl der Zyklen:	12
Denaturierung:	94 °C, 30 s
Primerhybridisierung:	68°C, – x °C/Zyklus, 30 s (x=0,4 bis 1,2 °C)
Elongation:	72 °C, 1 min/1 kb
2. Anzahl der Zyklen:	24
Denaturierung:	94 °C, 30 s
Primerhybridisierung:	$T_m - 5$ °C, 30 s
Elongation:	72 °C, 1 min/1 kb
Abschließende Elongation:	72 °C, 5 min

In einigen Fällen erbrachte die 5'-RACE-PCR nur ein schwach amplifiziertes Fragment, das aus dem Gel ausgeschnitten und durch eine zweite Standard-PCR verstärkt wurde. Zur Sequenzierung wurden die Fragmente in pGEM-T subkloniert. Tabelle C-4 fasst die verwendeten Primer für alle klonierten Enzyme zusammen.

### 3.2.5 Klonierung der Vollängen

Aus cDNA wurden mit Primern, die in der nicht-translatierten Region der Transkripte hybridisierten (jeweils x\_UTR\_FW und x\_UTR\_REV in Kap. C.1.7.4), die Vollängen der Enzyme durch PCR mit den fehler-korrigierenden DNA-Polymerasen Phusion oder *Pfu* amplifiziert (Kap. C.3.1.2). Die erhaltenen Fragmente wurden in den Vektor pGEM-T subkloniert und sequenziert.

**Tab. C-4:** Primer zur Durchführung der 5'-RACE-PCR.

Transkript	Primer cDNA	Touchdown-PCR	2. PCR
<i>FaLINS</i>	FaLINS_5R	FaLINS_5R GR3'	-
<i>LaLIMS</i>	LaLIMS_5R1	LaLIMS-5R2 GR3'	-
<i>LaLINS</i>	LaLINS_5R1	LaLINS_5R2 GR3'Nested	-
<i>LaBERS</i>	LaBERS_5R1	LaBERS_5R2 GR3'Nested	LaBERS_5R2 GR3'Nested
<i>LaAT1</i>	LaAT1_5R1	LaAT1_5R2 GR3'	LaAT1_5R2 GR3'Nested
<i>LaAT2</i>	LaAT2_5R1	LaAT2_5R2 GR3'Nested	LaAT2_5R3 GR3'Nested

### 3.2.6 Herstellung der Expressionskonstrukte

Aus Plasmid-DNA, die jeweils die Volllänge des Enzyms enthielt, wurde der offene Leserahmen zur bakteriellen Expression mit Restriktionsschnittstellen amplifiziert (Tab. C-5). Dieser wurde zunächst ein weiteres Mal in pGEM-T subkloniert. Die daraus erzeugte Plasmid-DNA wurde mit Restriktionsenzymen verdaut, und das entstandene Teilstück wurde in den Expressionsvektor pGEX-4T-1 ligiert (Kap. C.3.1.6). Zur Expression in *S. cerevisiae* wurden die PCR-Produkte direkt in den Vektor pYES2.1 ligiert (Kap. C.3.1.5). Kompetente *E. coli* JM109-Zellen sind jeweils mit dem Ligationsansatz transformiert worden. Daraus gewonnene Plasmid-DNA wurde vollständig sequenziert, um sicherzustellen, dass das codierende DNA-Fragment korrekt in den Leserahmen des Expressionsvektors eingefügt worden war. Zur heterologen Expression wurden kompetente Zellen der Stämme *E. coli* BL21(DE3)pLysS (Stamm A), *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS (Stamm B) und *S. cerevisiae* INVSc1 (Stamm C) transformiert (Kap. 3.1.8 und 3.1.9). Tabelle C-5 zeigt eine Übersicht aller Expressionskonstrukte.

**Tab. C-5:** Übersicht über die hergestellten Expressionskonstrukte und die verwendeten Primer mit Angabe der Restriktionsschnittstellen.

Konstrukt	Vorwärts-Primer	Rückwärts-Primer	Stamm <sup>1</sup>
FaLINS	FaLINS_FW ( <i>Bam</i> HI)	FaLINS_REV ( <i>Xho</i> I)	A
FvNES (ab Methionin 1)	FvNES_M1_FW ( <i>Bam</i> HI)	FvNES_REV ( <i>Sal</i> I)	B
LaLIMS_M1 (vollständig)	LaLIMS_M1_FW ( <i>Eco</i> RI)	LaLIMS_REV ( <i>Not</i> I)	A
LaLIMS_RR (ohne Signalpeptid)	LaLIMS_RR_FW ( <i>Eco</i> RI)	LaLIMS_REV ( <i>Not</i> I)	B
LaLINS_M1 (vollständig)	LaLINS_M1_FW ( <i>Eco</i> RI)	LaLINS_REV ( <i>Sal</i> I)	B
LaLINS_RR (ohne Signalpeptid)	LaLINS_RR_FW ( <i>Eco</i> RI)	LaLINS_REV ( <i>Sal</i> I)	B
LaBERS	LaBERS_FW ( <i>Eco</i> RI)	LaBERS_REV ( <i>Sal</i> I)	B
LaAT1	LaAT1_FW ( <i>Bam</i> HI)	LaAT1_REV ( <i>Not</i> I)	B
	LaAT1_pYES_FW	LaAT1_pYES_REV	C
LaAT2	LaAT2_FW ( <i>Bam</i> HI)	LaAT2_REV ( <i>Not</i> I)	B
	LaAT2_pYES_FW	LaAT2_pYES_REV	C

<sup>1</sup>A: *E. coli* BL21(DE3)pLysS; B: *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS; C: *S. cerevisiae* INVSc1

### 3.2.7 Sequenzierung der genomischen Sequenzen

Zur Klonierung der genomischen Sequenzen der Terpensynthasen wurde DNA aus Blättern von Lavendel 1 und 2 mit einem Kit extrahiert. Diese DNA diente als Matrize für eine PCR mit Phusion und den Primern, die auch zur Klonierung der Vollängen benutzt wurden. Die erhaltenen Fragmente wurden in pGEM-T subkloniert und vollständig sequenziert. Durch Alignment mit den offenen Leserahmen wurde die Anzahl und Größe der Introns bestimmt.

## 3.3 Allgemeine biochemische Methoden

### 3.3.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

30 µl der jeweiligen proteinhaltigen Probe, 30 µl SDS-Lösung (4 %) und 20 µl Protein-Ladepuffer wurden gemischt. Um pelletierten Zellrückstand ebenfalls auftragen zu können, wurde zuvor eine kleine Menge in 30 µl Wasser suspendiert. Die so vorbereiteten Proben und ein Proteingrößenmarker sind für 10 Minuten bei 95 °C denaturiert, auf Eis gekühlt und kurz zentrifugiert worden. Anschließend wurden die Proben auf ein Tris-Glycin-Fertiggel (12 % Polyacrylamid, 1 mm Dicke, 12 Taschen) (Anamed Elektrophorese GmbH, Darmstadt-Arheilgen) aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in einer vertikalen Gelkammer bei

konstanter Stromstärke von 30 mA für eine Stunde. Zur Detektion wurde das Gel über Nacht in Färbelösung und anschließend einige Stunden in Entfärbelösung geschüttelt.

### **3.3.2 Western Blot**

Der spezifische Nachweis der rekombinanten GST-Fusionsproteine bzw. His-Tag-Proteine erfolgte durch *Western Blots* mit Anti-GST- bzw. Anti-His-Antikörpern. Die Proteinlösungen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend im Criterion-Blotter auf eine 0,45 µm Nitrocellulosemembran (Bio-Rad Laboratories, München) transferiert. Dabei lag in der mit Blotting-Puffer befüllten Kammer ein konstanter Strom von 500 mA für zwei Stunden vor. Anschließend wurden zur Kontrolle die transferierten Proteine auf der Membran 15 Minuten lang mit Ponceau gefärbt und mit Wasser wieder entfärbt. Um eine unspezifische Bindung von Antikörpern zu verhindern, wurde die Membran über Nacht in Blocklösung und anschließend in einer Mischung aus 0,5 µl Anti-GST-/Anti-His-Antikörper und 500 µl Blocklösung eine Stunde inkubiert. Auf dreimaliges Waschen mit PBS/Tween folgte für eine weitere Stunde eine Inkubation mit 1 µl Anti-Mouse-Antikörper in 10 ml Blocklösung. Die Membran wurde nochmals dreimal mit PBS/Tween und zweimal mit TBS gewaschen. Zur spezifischen Färbung der Proteine wurde eine Mischung aus 10 ml Alkalischer Phosphatase-Puffer, 66 µl NBT- und 33 µl BCIP-Lösung auf die Membran gegeben. Nach 5-minütiger Entwicklung im Dunkeln war die Färbung sichtbar.

### **3.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Die Konzentration der aufgereinigten Proteinlösungen wurde mit der Methode nach Bradford bestimmt (Bradford, 1976). Dazu wurden 10-50 µl Proteinlösung mit dem jeweiligen Elutionspuffer auf 100 µl verdünnt, mit 1 ml Bradford-Lösung versetzt und durchmischt. Die Messung der Absorption erfolgte innerhalb von 10 Minuten im Spektralphotometer bei 595 nm gegen einen Blindwert ohne Proteinlösung. Eine Kalibriergerade, die mit 0-10 µg BSA erstellt wurde, ermöglichte die Berechnung der Proteinkonzentration.

$$\text{Protein } [\mu\text{g}] = (A_{595} - 0,0009) / 0,0364$$

### 3.3.4 Heterologe Expression in *E. coli*

Zur Expression von FaGT2 wurden *E. coli* BL21(DE3)pLysS-Zellen verwendet, die bereits in einer früheren Arbeit mit dem Expressionsplasmid pRSETB, das die codierende Sequenz von *FaGT2* enthielt, transformiert worden waren (Lunkenbein et al., 2006a). Die Expression des Enzyms 4CL, für das freundlicherweise ein Konstrukt von Herrn Dr. Till Beuerle zur Verfügung gestellt wurde, erfolgte ebenfalls in diesen Zellen. Die anderen Enzyme wurden in den Stämmen, wie in Tabelle C-5 angegeben, exprimiert. Zur bakteriellen Expression des jeweiligen rekombinanten Proteins wurden einzelne Zellen über Nacht in LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) und Chloramphenicol (34 µg/ml) bei 37 °C und 120 upm angezogen. Am folgenden Tag wurde diese Vorkultur 1:40 mit antibiotikahaltigem LB-Medium verdünnt und unter denselben Bedingungen bis zu einer optischen Dichte ( $OD_{600}$ ) von 0,4 bis 0,8 kultiviert. Zur Induktion der Expression wurde der Ansatz mit 1 mM IPTG versetzt und über Nacht bei 16 °C und 120 upm geschüttelt. Durch 15-minütige Zentrifugation bei 5000 g wurden die Zellen am Folgetag geerntet und bei -80 °C eingefroren.

### 3.3.5 Heterologe Expression in *S. cerevisiae*

Eine etwa Stecknadelkopf-große Menge an transformierten Hefe-Zellen wurde über Nacht in 25 ml SGI-Medium bei 28-30 °C inkubiert, bis eine  $OD_{600}$  von 2 bis 4 erreicht war (nach etwa 36 Stunden). 250 ml YPGE-Medium wurden mit dieser Starterkultur angeimpft und bei 28-30 °C und 120 upm bis zu einer optischen Dichte von 0,8-1,2 geschüttelt. Durch Zugabe von 27 ml Galaktose-Lösung startete die Expression, die unter den gleichen Bedingungen für weitere 16 Stunden andauerte. Die Zellen wurden anschließend durch Zentrifugation (4000 g, 10 Minuten) geerntet.

### 3.3.6 Aufreinigung von FaGT2

Die partielle Aufreinigung des His-Tag-Proteins FaGT2 erfolgte über Affinitätschromatographie an Talon-Harz (Clontech Laboratories, Mountain View, USA) unter Verwendung eines leicht modifizierten Protokolls (*Gravity-flow column purification protocol*) des Herstellers. Dabei wurden alle Schritte bei 4 °C durchgeführt. Die abzentrifugierten und eingefrorenen Zellen aus einer 400-ml-Kultur wurden mit gewaschenen Glasperlen (<106 µm) vermengt, mit Mörser und Pistill zerrieben und mit 30 ml His-Waschpuffer 1 extrahiert. Die Suspension wurde zentrifugiert (10000 g, 20 Minuten) und der gewonnene Rohextrakt (Überstand) mit

1 g Talon-Harz vermengt, das zuvor mit His-Waschpuffer 1 äquilibriert worden war. Nach 30-minütiger Inkubation am Überkopfschüttler wurde das Harz abzentrifugiert (900 g, 5 Minuten) und zweimal mit 30 ml His-Waschpuffer 1 gewaschen. Anschließend wurde das Harz in 1 ml His-Waschpuffer 1 suspendiert, auf die Säule (*Gravity-flow column*) übertragen und mit weiteren 5 ml Puffer gewaschen. Anschließend erfolgte die Elution des gebundenen Proteins durch Aufgabe von 1 ml His-Elutionspuffer.

### 3.3.7 Aufreinigung von 4CL

Das mit His-Tag exprimierte Enzym 4CL wurde mit His Bind Quick 900 Kartuschen (Novagen/Merck Biosciences, Schwalbach am Taunus) affinitätschromatographisch aufgereinigt. Dazu wurden die aus einer 200 ml-Kultur geernteten Zellen zunächst in 8 ml His-Bindepuffer aufgenommen und durch Ultraschall (dreimal 30 Sekunden lang bei 15 % Energie) aufgebrochen. Durch 20-minütige Zentrifugation bei 10000 g wurde der Rohproteinextrakt gewonnen, der auf die zuvor mit 6 ml His-Bindepuffer äquilibrierte Kartusche aufgebracht wurde. Anschließend wurde diese mit 30 ml His-Bindepuffer und 10 ml His-Waschpuffer 2 gewaschen. Zuletzt wurde das gebundene Protein mit 4 ml His-Elutionspuffer 2 eluiert.

### 3.3.8 Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Die heterolog exprimierten GST-Fusionsproteine wurden mit an Sepharose immobilisiertem Glutathion (GST Bind Resin, Novagen/Merck Biosciences, Schwalbach am Taunus) partiell aufgereinigt. Alle Schritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Die tiefgefrorenen Zellen aus 800 ml Expressionskultur wurden in 30 ml GST-Waschpuffer und 200 µl PMSF-Lösung aufgetaut und, wie in Kapitel C.3.3.7 beschrieben, mit Ultraschall behandelt und zentrifugiert. 1,5 ml GST Bind Resin (50%ige Suspension) wurden in einem 50 ml-Zentrifugenröhrchen zweimal mit 10 ml GST-Waschpuffer gewaschen, abzentrifugiert (800 g, 3 Minuten) und anschließend mit dem Rohproteinextrakt für 30 Minuten am Überkopfschüttler inkubiert. Nach Zentrifugation (800 g, 5 Minuten) wurde der Überstand verworfen und das GST Bind Resin erneut dreimal mit 20 ml GST-Waschpuffer gewaschen. Das GST-Fusionsprotein wurde in bis zu 3 Fraktionen mit je 0,75 ml GST-Elutionspuffer eluiert, wobei die ersten beiden Fraktionen für Enzymassays vereinigt wurden.

### 3.3.9 Aufreinigung von hefeexprimierten Proteinen

Die abzentrifugierten Hefezellen wurden in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen in 27 ml TEK-Puffer resuspendiert und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden erneut durch Zentrifugation (4000 g, 5 Minuten) pelletiert und anschließend in 2,5 ml eiskaltem TES-B-Puffer aufgenommen. Diese Zellsuspension wurde mit 10 g gewaschenen Glasperlen (425-600 µm) versetzt und für eine Dauer von 30 Minuten abwechselnd 30 Sekunden lang geschüttelt und 30 Sekunden lang auf Eis gestellt. Im Anschluss wurde der Zustand der Zellen im Lichtmikroskop überprüft. Nach Zugabe von 2,5 ml TES-B-Puffer wurde kurz bei 800 g zentrifugiert, um die Glasperlen abzutrennen. Der Überstand wurde für weitere 20 Minuten bei 10000 g zentrifugiert, um den Rohproteinextrakt zu erhalten, der direkt für Enzymassays eingesetzt wurde.

## 3.4 Biochemische Charakterisierung von FaGT2

### 3.4.1 *In-vitro*-Assays

Ein Standard-Assay zur Untersuchung der FaGT2-Aktivität hatte ein Volumen von 200 µl und bestand aus 10 µl UDPG/UDPG\*-Lösung (1 % 0,016 mM UDP-[6-<sup>3</sup>H<sub>1</sub>]-Glucose und 99 % 101 mM UDP-Glucose), 1 µl Substratlösung (200 mM) und Puffer (100 mM Tris-Cl pH 8,0, 10 % Glycerin, 5 mM, Natriumdisulfit, 5 mM 2-Mercaptoethanol, 50 mM MgCl<sub>2</sub>). Die Reaktion wurde durch Zugabe von aufgereinigter FaGT2 (8-30 µg Protein) gestartet und für 30 Minuten bei 21 °C gehalten. Anschließend wurden die Assays mit 1 ml Wasser-gesättigtem *n*-Butanol mit dem Vortexer gemischt. Nach kurzer Zentrifugation bei 13000 g wurden 0,8 ml der Butanol-Phase mit 4 ml Szintillationscocktail gemischt und für 5 Minuten im Szintillationszähler gemessen.

Um Magnesium-Kationen als Cofaktor zu testen, wurde MgCl<sub>2</sub> in acht Konzentrationen von 0,1 bis 200 mM zugegeben, während die Konzentration des Akzeptors Zimtsäure bei 100 µM konstant blieb.

Die kinetischen Parameter  $K_m$  und  $V_{max}$  wurden ermittelt, indem sechs Assays mit unterschiedlicher Akzeptor-Konzentration (20 µM bis 4 mM) durchgeführt wurden. Alle Assays wurden doppelt durchgeführt. Als Blindprobe wurde die Proteinlösung verwendet, die aus der Expression und Aufreinigung des leeren pRSETB-Vektors stammte.



Die Berechnung der Reaktionsgeschwindigkeit erfolgte nach folgender Formel:

$$V = \frac{(DPM_{\text{Probe}} - DPM_{\text{Nullwert}}) \cdot 1000}{10 \cdot DPM_{\text{Maximalwert}} \cdot 0,8 \cdot t \cdot m_{\text{Enzym}}}$$

V	Geschwindigkeit [nkat/mg]
t	Reaktionszeit [s]
m <sub>Enzym</sub>	Pro Assay eingesetzte Enzymmenge [mg]
0,8	Umrechnungsfaktor, da nur 800 von 1000 µl der organischen Phase vermessen wurden
DPM	Messwert (Zerfälle pro Minute)
DPM <sub>Nullwert</sub>	Messwert der Blindprobe
DPM <sub>Maximalwert</sub>	Messwert von 1 µl UDPG/UDPG*-Lösung

Die Michaelis-Menten-Gleichung wurde durch hyperbolische Regression mit der Software SigmaPlot erstellt.

Zur Analyse der gebildeten Produkte mittels HPLC-ESI-MS/MS (Methode 1 oder 2) (Kap. C.2.5) wurden Standard-Assays durchgeführt, die jedoch keine radioaktiv markierte UDP-Glucose enthielten und in einem 100 mM Tris-Cl-Puffer (pH 8,0) mit 50 mM MgCl<sub>2</sub> durchgeführt wurden. Zur spezifischen Hydrolyse von Glucose-Estern wurde der entsprechende Assay mit 1 M NaOH alkalisiert (Endkonzentration 0,1 M), für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend vermessen.

### 3.4.2 Inkubation und Aufarbeitung von Erdbeerfrüchten

Frische, reife Erdbeerfrüchte wurden mit den Substraten inkubiert, die mit dem rekombinanten Enzym Aktivität zeigten. Dazu wurde jeweils eine Erdbeerfrucht mit einer Spritze an 10 verschiedenen Stellen angestochen, um insgesamt 50 µl Substratlösung (50 mM) in der Frucht zu verteilen. Nach 24 Stunden Inkubation bei Raumtemperatur wurden die glycosidischen Verbindungen durch Festphasenextraktion an einer mit Amberlite XAD-2 (20-60 mesh) gefüllten Glassäule isoliert. Dazu sind die Erdbeeren mit Hilfe des Ultraturrax zerkleinert und abzentrifugiert worden (5000 g, 15 Minuten). Der Überstand wurde aufbewahrt und der Rückstand zweimal mit je 20 ml Wasser extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden über Glaswolle filtriert und auf die mit Wasser vorkonditionierte Säule aufgetragen. Anschließend wurde die Säule mit 100 ml Wasser gewaschen, im Luftstrom

weitgehend trocken geblasen und mit 50 ml Diethylether eluiert. Dabei koeluierte eine kleine Menge Wasser, die im Gegensatz zur Etherphase aufbewahrt wurde. Abschließend wurden 100 ml Methanol auf die Säule gegeben. Das dabei gewonnene Eluat wurde mit der Wasserphase vereinigt, am Rotationsverdampfer bei 40 °C auf 2 ml eingeeengt und mittels HPLC-ESI-MS/MS (Methode 1 oder 2) (Kap. C.2.5) analysiert.

### **3.5 Biochemische Charakterisierung von Terpensynthasen**

#### **3.5.1 Enzymassays**

Ein Standard-Assay enthielt in einem Volumen von 500 µl 2-20 µg aufgereinigtes Enzym, 50 µM Substrat (GPP, FPP oder GGPP) und eine entsprechende Menge Puffer (25 mM Tris-Cl, pH 7,5, 5 % Glycerin, 1 mM DTT) mit Cofaktoren (10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mg/ml BSA; bei LaLINS zusätzlich 1 mM MnCl<sub>2</sub>). Die Mischung wurde mit 500 µl Diethylether überschichtet und für 15 bis 180 Minuten bei 23 °C inkubiert. Anschließendes Vortexen stoppte die Reaktion. Nach Zugabe des internen Standards (LaLIMS und LaBERS: 1 µg Campher; LaLINS: 0,164 µg D<sub>2</sub>-Linalool) wurde die Etherphase abgenommen und es wurde ein zweites Mal mit 500 µl Diethylether extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden im Stickstoffstrom auf etwa 300 µl eingeeengt, mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und per HRGC-MS analysiert (Kap. C.3.5.2 und C.3.5.3).

Zur Bestimmung der optimalen Reaktionstemperatur wurde der Ansatz des Standard-Assays bei gleichen Konzentrationen auf 100 µl verringert und vor Zugabe des Substrates auf die jeweilige Temperatur (15 bis 50 °C) gebracht. Der optimale pH-Wert wurde durch Assays in unterschiedlichen Puffern (25 mM MES, MOPS, MOPSO, TAPS oder CAPSO) mit pH-Werten zwischen 4 und 10 ermittelt. Die Abhängigkeit von zweiwertigen Kationen (Magnesium und Mangan) wurde in Reaktionsansätzen bestimmt, in denen eine mit PD-10-Säulen (Amersham Biosciences, Freiburg) entsalzte Enzymlösung und je fünf bis sieben unterschiedliche Konzentrationen an MgCl<sub>2</sub> (1-500 mM) und MnCl<sub>2</sub> (0,01-10 mM) eingesetzt wurden. Als Gegenprobe dienten Ansätze ohne Salze sowie mit 1 mM EDTA.

Die kinetischen Daten wurden wie im Standardassay ermittelt, jedoch unter den jeweils optimalen Bedingungen (LaLIMS: pH 7,0, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, ohne BSA, 30 °C; LaLINS: pH 7,0, 1 mM MnCl<sub>2</sub>, 30 °C; LaBERS: pH 8,0, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 30 °C) mit sieben unterschiedlichen Substratkonzentrationen.

Nach Analyse der Assays (Kap. C.3.5.3) wurde die Geschwindigkeit nach folgender Formel berechnet:

$$V = \frac{m_{\text{Produkt}} \cdot 1000000}{M_{\text{Produkt}} \cdot t \cdot m_{\text{Enzym}}}$$

V	Geschwindigkeit [pkat/mg]
$m_{\text{Produkt}}$	Gebildete Produktmenge [ $\mu\text{g}$ ] (Kap. C.3.5.3)
$M_{\text{Produkt}}$	Molare Masse des Produktes [g/mol]
t	Reaktionszeit [s]
$m_{\text{Enzym}}$	Pro Assay eingesetzte Enzymmenge [mg]

Die Erstellung der Michaelis-Menten-Kinetik erfolgte durch hyperbolische Regression mit der Software SigmaPlot.

Alle Bestimmungen wurden doppelt durchgeführt. Als Blindprobe diente ein Ansatz mit Proteinlösung, der aus der Expression und Aufreinigung von mit dem Leervektor transformierten Zellen stammte.

### 3.5.2 Identifizierung der Enzymprodukte

Die Identifizierung fast aller enzymatisch gebildeten Terpene (Limonen,  $\alpha$ -Pinen,  $\beta$ -Pinen,  $\alpha$ -Phellandren,  $\beta$ -Myrcen, Camphen, Terpinolen, Sabinen, Linalool) erfolgte durch HRGC-MS-Analyse (Methode 1) (Kap. C.2.1) und Abgleich von Retentionszeit und Massenspektren mit Standardsubstanzen. Das von LaBERS gebildete *trans*- $\alpha$ -Bergamoten wurde durch Vergleich mit einem Etherextrakt aus Blättern von *Hyptis suaveolens* identifiziert.

Die anderen Produkte konnten lediglich durch Abgleich ihrer linearen Retentionsindizes (LRI, auch Kovat's Index) mit in der Literatur angegebenen Werten zugeordnet werden. Dazu wurde ein Gemisch aus aliphatischen Kohlenwasserstoffen (C8 bis C32, Retention Index Standard, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen) mit der gleichen gaschromatographischen Methode analysiert. Die Retentionszeiten der Kohlenwasserstoffe entsprechen per Definition jeweils dem Hundertfachen ihrer Kettenlänge, also die Retentionszeit von Decan (C10) dem Wert 1000. Dementsprechend wurden den analysierten Enzymprodukten abhängig von ihren Retentionszeiten charakteristische LRI-Werte zugeordnet.

Die Chiralität wurde durch Chiralphasen-GC (LaLIMS, LaLINS, LaBERS) (Kap. C.2.2), MDGC (FvNES) (Kap. C.2.3) oder MDGC-MS (FaLINS) (Kap. C.2.4) ermittelt, indem die Produkte mit Enantiomeren-angereicherten Standards verglichen wurden.

### 3.5.3 Quantifizierung der Enzymprodukte

Zur Quantifizierung wurden die Extrakte aus den Enzymassays mittels HRGC-MS (Methode 2) (Kap. C.2.1) analysiert.

Bei der Bestimmung der enzymatisch gebildeten Linaloolmenge wurde D<sub>2</sub>-Linalool als interner Standard eingesetzt. Da das verwendete D<sub>2</sub>-Linalool mit 6 % unmarkiertem Linalool verunreinigt war, erfolgte die Berechnung nach folgender Formel:

$$m_{\text{Linalool}} = \frac{A_{m/z\ 121} - 0,06 \cdot A_{m/z\ 123}}{A_{m/z\ 123}} \cdot m_{\text{D}_2\text{-Linalool}}$$

$m_{\text{Linalool}}$	Masse des gebildeten Linalools
$m_{\text{D}_2\text{-Linalool}}$	Masse des D <sub>2</sub> -Linalools (interner Standard)
$A_{m/z\ 121}$	Peakfläche des Linalools bei $m/z$ 121
$A_{m/z\ 123}$	Peakfläche des Linalools bei $m/z$ 123

Zur Berechnung der absoluten Produktmenge der anderen gebildeten Terpene wurden zunächst die Responsefaktoren bestimmt. Dazu wurde eine Lösung mit gleicher Konzentration an internem Standard (Campher) und den zu bestimmenden Substanzen analysiert. Das Verhältnis der Peakflächen des internen Standards zu den Produkten ergab die Responsefaktoren. Dabei wurde für den Faktor von  $\alpha$ -Cedren das Totalionenchromatogramm ausgewertet, für die Faktoren der anderen Verbindungen jeweils die Ionenspur  $m/z$  93.

$\alpha$ -Pinen:	0,06960	Sabinen:	0,08709
Camphen:	0,09718	$\beta$ -Pinen:	0,09558
Limonen:	0,18149	$\beta$ -Myrcen:	0,14188
$\alpha$ -Phellandren:	0,07500	Terpinolen:	0,18607
$\alpha$ -Cedren:	1,4186		

Eine unbekannte Menge enzymatisch gebildeten Produkts wurde über die folgende Formel berechnet:

$$m_{\text{Produkt}} = \frac{A_{\text{Produkt}}}{A_{\text{ISTD}}} \cdot m_{\text{ISTD}} \cdot F$$

$m_{\text{Produkt}}$	Masse des Produktes
$m_{\text{ISTD}}$	Masse des internen Standards
$A_{\text{Produkt}}$	Peakfläche des Produktes
$A_{\text{ISTD}}$	Peakfläche des internen Standards
$F$	Responsefaktor

Da *trans*- $\alpha$ -Bergamoten nicht als Reinsubstanz erhältlich war, wurde zur Quantifizierung der Responsefaktor von  $\alpha$ -Cedren verwendet.

Die relative Produktkonzentration wurde jeweils aus den absoluten Konzentrationen berechnet, indem der höchste Wert auf 100 % gesetzt wurde.

### 3.5.4 Extrakte aus Lavendel und *Hyptis suaveolens*

Etwa 0,5 g Pflanzenmaterial (Blüten von Lavendel 2 und Blätter von *Hyptis suaveolens*) wurden mit 2 ml n-Hexan sehr gut vermischt. Anschließend wurde abzentrifugiert und der klare Extrakt auf etwa 500  $\mu$ l eingeeengt und mit HRGC-MS (Methode 1) (Kap. C.2.1) analysiert.

## 3.6 Biochemische Charakterisierung von Acyltransferasen

### 3.6.1 Darstellung von Caffeoyl- und *p*-Cumaroyl-CoA

Die Substrate Caffeoyl- und *p*-Cumaroyl-CoA wurden nach Beuerle und Pichersky (2002) enzymatisch hergestellt. Das notwendige Enzym 4CL (Zimtsäure- und Hydroxymzimtsäure:CoA-Ligase) wurde heterolog exprimiert und partiell aufgereinigt (Kap. C.3.3.7). Zunächst wurde die Aktivität photometrisch überprüft. Dazu wurden 20  $\mu$ l Coenzym A-Lösung (10 mM), 12,5  $\mu$ l ATP-Lösung (100 mM), 5  $\mu$ g Enzym und 20  $\mu$ l Substratlösung (10 mM *p*-Cumarsäure bzw. Kaffeesäure) mit Puffer (50 mM Tris-Cl, pH 7,5, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>) auf 1 ml verdünnt. Im Photometer wurde die Zunahme der Absorption bei 333 nm (*p*-Cumarsäure) bzw. 343 nm (Kaffeesäure) beobachtet.

Zur Synthese größerer Mengen Hydroxymzimtsäure-CoAs wurden jeweils 5 ml-Ansätze mit 6,9 mg ATP, 3,84 mg Coenzym A, 0,41 mg *p*-Cumarsäure bzw. 0,45 mg

Kaffeesäure und 50 µg Enzym in einer entsprechenden Menge Puffer über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Bei angenommenem, vollständigem Umsatz entstanden Lösungen mit 0,5 mM *p*-Cumarsäure-CoA bzw. Kaffeesäure-CoA, die direkt für Enzymassays mit LaAT1 und LaAT2 eingesetzt wurden.

### 3.6.2 Enzymassays

Zum qualitativen Nachweis der Bildung flüchtiger Verbindungen durch LaAT1 und LaAT2 wurden Assays bestehend aus 1 µl Akzeptor-Alkohol (1 M in Hexan), 5 µl Acetyl- oder Butyryl-CoA-Lösung (10 mM), 20 µl Proteinlösung (entsprechend 19 µg Protein bei bakterieller Expression) und 224 µl Puffer (50 mM Tris-Cl, pH 7,5, 10 % Glycerin, 1 mM DTT) für 1,5 Stunden bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze mit 1 ml Diethylether extrahiert und die Extrakte mittels HRGC-MS (Methode 2) analysiert (Kap. C.2.1).

Die Bildung nichtflüchtiger Verbindungen durch die Acyltransferasen wurde in 20 µl-Assays aus 2 µl Substratlösung (0,1 M), 1 µl Acetyl-CoA-Lösung (10 mM) und 16 µl Puffer (bzw. 17 µl 0,5 mM *p*-Cumaroyl-CoA- oder Kaffeesäure-CoA-Lösung, Kap. C.3.6.1) sowie 1 µl Enzymlösung (entsprechend 1 µg Protein bei bakterieller Expression) mittels HPLC-ESI-MS/MS (Methoden 3 bis 5) analysiert (Kap. C.2.5).

Als Kontrolle wurden alle Ansätze mit einem Proteinextrakt aus der analog vollzogenen Expression des leeren Vektors durchgeführt.

## D Literaturverzeichnis

- Aharoni, A., Keizer, L. C. P., Bouwmeester, H. J., Sun, Z., Alvarez-Huerta, M., Verhoeven, H. A., Blaas, J., Van Houwelingen, A. M. M. L., De Vos, R. C. H., Van Der Voet, H., Jansen, R. C., Guis, M., Mol, J., Davis, R. W., Schena, M., Van Tunen, A. J., O'Connell, A. P. (2000) Identification of the SAAT gene involved in strawberry flavor biogenesis by use of DNA microarrays. *Plant Cell*, 12, 647-661.
- Aharoni, A., Keizer, L. C. P., Van den Broeck, H. C., Blanco-Portales, R., oz-Blanco, J., Bois, G., Smit, P., De Vos, R. C. H., O'Connell, A. P. (2002) Novel insight into vascular, stress, and auxin-dependent and -independent gene expression programs in strawberry, a non-climacteric fruit. *Plant Physiology*, 129, 1019-1031.
- Aharoni, A., Giri, A. P., Deuerlein, S., Griepink, F., De Kogel, W. J., Verstappen, F. W. A., Verhoeven, H. A., Jongtsma, M. A., Schwab, W., Bouwmeester, H. J. (2003) Terpenoid Metabolism in Wild-Type and Transgenic *Arabidopsis* Plants. *Plant Cell*, 15, 2866-2884.
- Aharoni, A., Giri, A. P., Verstappen, F. W. A., Berteza, C. M., Sevenier, R., Sun, Z., Jongtsma, M. A., Schwab, W., Bouwmeester, H. J. (2004) Gain and loss of fruit flavor compounds produced by wild and cultivated strawberry species. *Plant Cell*, 16, 3110-3131.
- Aharoni, A., Jongtsma, M. A., Bouwmeester, H. J. (2005) Volatile science? Metabolic engineering of terpenoids in plants. *Trends in Plant Science*, 10, 594-602.
- Aharoni, A., Jongtsma, M. A., Kim, T. Y., Ri, M. B., Giri, A. P., Verstappen, F. W. A., Schwab, W., Bouwmeester, H. J. (2006) Metabolic engineering of terpenoid biosynthesis in plants. *Phytochemistry Reviews*, 5, 49-58.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25, 3389-3402.
- Aubert, C., Baumann, S., Arguel, H. (2005) Optimization of the analysis of flavor volatile compounds by liquid-liquid microextraction (LLME). Application to the aroma analysis of melons, peaches, grapes, strawberries, and tomatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 8881-8895.
- Aubourg, S., Lechary, A., Bohlmann, J. (2002) Genomic analysis of the terpenoid synthase (AtTPS) gene family of *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Genetics and Genomics*, 267, 730-745.
- Baldwin, I. T., Halitschke, R., Paschold, A., Von Dahl, C. C., Preston, C. A. (2006) Volatile signaling in plant-plant interactions: "Talking trees" in the genomics era. *Science*, 311, 812-815.
- Basch, E., Foppa, I., Liebowitz, R., Nelson, J., Smith, M., Sollars, D., Ulbricht, C. (2004) Lavender (*Lavandula angustifolia* Miller). *Journal of Herbal Pharmacotherapy*, 4, 63-78.
- Bayer, A., Ma, X., Stöckigt, J. (2004) Acetyltransfer in natural product biosynthesis - Functional cloning and molecular analysis of vinorine synthase. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 12, 2787-2795.
- Beekwilder, J., Alvarez-Huerta, M., Neef, E., Verstappen, F. W. A., Bouwmeester, H. J., Aharoni, A. (2004) Functional characterization of enzymes forming volatile esters from strawberry and banana. *Plant Physiology*, 135, 1865-1878.
- Bendtsen, J. D., Nielsen, H., Von Heijne, G., Brunak, S. (2004) Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *Journal of Molecular Biology*, 340, 783-795.
- Berteza, C. M., Voster, A., Verstappen, F. W. A., Maffei, M., Beekwilder, J., Bouwmeester, H. J. (2006) Isoprenoid biosynthesis in *Artemisia annua*: Cloning and heterologous expression of a germacrene A synthase from a glandular trichome cDNA library. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 448, 3-12.
- Beuerle, T., Pichersky, E. (2002) Enzymatic synthesis and purification of aromatic coenzyme A esters. *Analytical Biochemistry*, 302, 305-312.

- Bick, J. A., Lange, B. M.** (2003) Metabolic cross talk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis: Unidirectional transport of intermediates across the chloroplast envelope membrane. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 415, 146-154.
- Boatright, J., Negre, F., Chen, X., Kish, C. M., Wood, B., Peel, G., Orlova, I., Gang, D., Rhodes, D., Dudareva, N.** (2004) Understanding in vivo benzenoid metabolism in petunia petal tissue. *Plant Physiology*, 135, 1993-2011.
- Bohlmann, J., Steele, C. L., Croteau, R.** (1997) Monoterpene synthases from grand fir (*Abies grandis*): cDNA isolation, characterization, and functional expression of myrcene synthase, (-)-(4S)-limonene synthase, and (-)-(1S,5S)-pinene synthase. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 21784-21792.
- Bohlmann, J., Meyer-Gauen, G., Croteau, R.** (1998a) Plant terpenoid synthases: Molecular biology and phylogenetic analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 4126-4133.
- Bohlmann, J., Crock, J., Jetter, R., Croteau, R.** (1998b) Terpenoid-based defenses in conifers: cDNA cloning, characterization, and functional expression of wound-inducible (E)- $\alpha$ -bisabolene synthase from grand fir (*Abies grandis*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 6756-6761.
- Bohlmann, J., Phillips, M., Ramachandiran, V., Katoh, S., Croteau, R.** (1999) cDNA cloning, characterization, and functional expression of four new monoterpene synthase members of the *Tpsd* gene family from grand fir (*Abies grandis*). *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 368, 232-243.
- Bohlmann, J., Martin, D., Oldham, N. J., Gershenzon, J.** (2000) Terpenoid secondary metabolism in *Arabidopsis thaliana*: cDNA cloning, characterization, and functional expression of a myrcene/(E)- $\beta$ -ocimene synthase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 375, 261-269.
- Bouwmeester, H. J., Kodde, J., Verstappen, F. W. A., Altug, I. G., De Kraker, J. W., Wallaart, T. E.** (2002) Isolation and characterization of two germacrene A synthase cDNA clones from chicory. *Plant Physiology*, 129, 134-144.
- Bouwmeester, H. J.** (2006) Engineering the essence of plants. *Nature Biotechnology*, 24, 1359-1361.
- Bown, D.** (2005) The Royal Horticultural Society. Die neue Kräuter-Enzyklopädie. Anbau und Verwendung. Dorling Kindersley, Starnberg.
- Bradford, M. M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Brazier-Hicks, M., Edwards, R.** (2005) Functional importance of the family 1 glucosyltransferase UGT72B1 in the metabolism of xenobiotics in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 42, 556-566.
- Breitmaier, E.** (2005) Terpene. Aromen, Düft, Pharmaka, Pheromone. WILEY-VCH, Weinheim.
- Brenner, S., Johnson, M., Bridgham, J., Golda, G., Lloyd, D. H., Johnson, D., Luo, S., McCurdy, S., Foy, M., Ewan, M., Roth, R., George, D., Eletr, S., Albrecht, G., Vermaas, E., Williams, S. R., Moon, K., Burcham, T., Pallas, M., DuBridge, R. B., Kirchner, J., Fearon, K., Mao, J. I., Corcoran, K.** (2000) Gene expression analysis by massively parallel signature sequencing (MPSS) on microbead arrays. *Nature Biotechnology*, 18, 630-634.
- Burhenne, K., Kristensen, B. K., 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.
- Campbell, J. A., Davies, G. J., Bulone, V., Henrissat, B.** (1997) A classification of nucleotide-diphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities [1]. *Biochemical Journal*, 326, 929-939.
- Cane, D. E., Xue, Q., Fitzsimons, B. C.** (1996) Trichodiene synthase. Probing the role of the highly conserved aspartate-rich region by site-directed mutagenesis. *Biochemistry*, 35, 12369-12376.



- Cane, D. E.** (1999a) Isoprenoid Biosynthesis: Overview. In: Comprehensive Natural Products Chemistry, Vol. 2: Isoprenoids including carotenoids and steroids. Cane, D. (Hrsg.), Elsevier, Oxford, 1-13.
- Cane, D. E.** (1999b) Sesquiterpene Biosynthesis: Cyclization Mechanisms. In: Comprehensive Natural Products Chemistry, Vol. 2: Isoprenoids including carotenoids and steroids. Cane, D. (Hrsg.), Elsevier, Oxford, 155-200.
- Caruthers, J. M., Kang, I., Rynkiewicz, M. J., Cane, D. E., Christianson, D. W.** (2000) Crystal structure determination of aristolochene synthase from the blue cheese mold, *Penicillium roqueforti*. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 25533-25539.
- Charnock, S. J., Henrissat, B., Davies, G. J.** (2001) Three-Dimensional Structures of UDP-Sugar Glycosyltransferases Illuminate the Biosynthesis of Plant Polysaccharides. *Plant Physiology*, 125, 527-531.
- Chen, F., Tholl, D., D'Auria, J. C., Farooq, A., Pichersky, E., Gershenzon, J.** (2003) Biosynthesis and emission of terpenoid volatiles from *Arabidopsis* flowers. *Plant Cell*, 15, 481-494.
- Chen, F., Ro, D. K., Petri, J., Gershenzon, J., Bohlmann, J., Pichersky, E., Tholl, D.** (2004) Characterization of a root-specific arabidopsis terpene synthase responsible for the formation of the volatile monoterpene 1,8-cineole. *Plant Physiology*, 135, 1956-1966.
- Christianson, D. W.** (2006) Structural biology and chemistry of the terpenoid cyclases. *Chemical Reviews*, 106, 3412-3442.
- Colby, S. M., Alonso, W. R., Katahira, E. J., McGarvey, D. J., Croteau, R.** (1993) 4S-Limonene synthase from the oil glands of spearmint (*Mentha spicata*). cDNA isolation, characterization, and bacterial expression of the catalytically active monoterpene cyclase. *Journal of Biological Chemistry*, 268, 23016-23024.
- Colby, S. M., Crock, J., Dowdle-Rizzo, B., Lemaux, P. G., Croteau, R.** (1998) Germacrene C synthase from *Lycopersicon esculentum* cv. VFNT Cherry tomato: cDNA isolation, characterization, and bacterial expression of the multiple product sesquiterpene cyclase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 2216-2221.
- Connolly, J. D.; Hill, R. A.** (1991) Dictionary of Terpenoids. Volume 1: Mono- and Sesquiterpenoids. Chapman & Hall, London.
- Coutinho, P. M., Deleury, E., Davies, G. J., Henrissat, B.** (2003) An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases. *Journal of Molecular Biology*, 328, 307-317.
- Crock, J., Wildung, M., Croteau, R.** (1997) Isolation and bacterial expression of a sesquiterpene synthase cDNA clone from peppermint (*Mentha x piperita*, L.) that produces the aphid alarm pheromone (*E*)- $\beta$ -farnesene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 12833-12838.
- Croteau, R.** (1987) Biosynthesis and catabolism of monoterpenoids. *Chemical Reviews*, 87, 929-954.
- Crowell, A. L., Williams, D. C., Davis, E. M., Wildung, M. R., Croteau, R.** (2002) Molecular cloning and characterization of a new linalool synthase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 405, 112-121.
- Da Silva, J. D., Luz, A.I.R., Da Silva, M. H. L., Andrade, E. H. A., Zoghbi, M. G. B., Maia, J. G. S.** (2003) Essential oils of the leaves and stems of four *Psidium* spp. *Flavour and Fragrance Journal*, 18, 240-243.
- D'Auria, J. C., Gershenzon, J.** (2005) The secondary metabolism of *Arabidopsis thaliana*: Growing like a weed. *Current Opinion in Plant Biology*, 8, 308-316.
- D'Auria, J. C.** (2006) Acyltransferases in plants: a good time to be BAHD. *Current Opinion in Plant Biology*, 9, 331-340.
- De Luca, V., St Pierre, B.** (2000) The cell and developmental biology of alkaloid biosynthesis. *Trends in Plant Science*, 5, 168-173.

- Dewick, P. M.** (2002) The biosynthesis of C5-C25 terpenoid compounds. *Natural Product Reports*, 19, 181-222.
- Dixon, R. A.** (2005) Engineering of plant natural product pathways. *Current Opinion in Plant Biology*, 8, 329-336.
- Don, R.H., Cox, P.T., Wainwright, B.J., Baker, K. und Mattick, J.S.** (1991) 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res.* 19, 4008.
- Dronne, S., Moja, S., Jullien, F., Berger, F., Caissard, J.-C.** (1999) Agrobacterium-mediated transformation of lavandin (*Lavandula x intermedia* Emeric ex Loiseleur). *Transgenic Research*, 8, 335-347.
- Dudareva, N., Cseke, L., Blanc, V. M., Pichersky, E.** (1996) Evolution of floral scent in *Clarkia*: Novel patterns of S-linalool synthase gene expression in the *C. breweri* Flower. *Plant Cell*, 8, 1137-1148.
- Dudareva, N., D'Auria, J. C., Nam, K. H., Raguso, R. A., Pichersky, E.** (1998) Acetyl-CoA:benzylalcohol acetyltransferase - An enzyme involved in floral scent production in *Clarkia breweri*. *Plant Journal*, 14, 297-304.
- Dudareva, N., Martin, D., Kish, C. M., Kolosova, N., Gorenstein, N., Fäldt, J., Miller, B., Bohlmann, J.** (2003) (*E*)-b-ocimene and myrcene synthase genes of floral scent biosynthesis in snapdragon: Function and expression of three terpene synthase genes of a new terpene synthase subfamily. *Plant Cell*, 15, 1227-1241.
- Dudareva, N., Andersson, S., Orlova, I., Gatto, N., Reichelt, M., Rhodes, D., Boland, W., Gershenzon, J.** (2005) The nonmevalonate pathway supports both monoterpene and sesquiterpene formation in snapdragon flowers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 933-938.
- Eisenreich, W., Rohdich, F., Bacher, A.** (2001) Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids. *Trends in Plant Science*, 6, 78-84.
- Eisenreich, W., Bacher, A., Arigoni, D., Rohdich, F.** (2004) Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61, 1401-1426.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., Von Heijne, G.** (1999) ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Protein Science*, 8, 978-984.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S., Von Heijne, G.** (2000) Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *Journal of Molecular Biology*, 300, 1005-1016.
- Eshilokun, A. O., Kasali, A. A., Giwa-Ajeniya, A. O.** (2005) Chemical composition of essential oils of two *Hyptis suaveolens* (L.) Poit leaves from Nigeria. *Flavour and Fragrance Journal*, 20, 528-530.
- Facchini, P. J., Chappell, J.** (1992) Gene family for an elicitor-induced sesquiterpene cyclase in tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89, 11088-11092.
- Facchini, P. J., Hagel, J., Zulak, K. G.** (2002) Hydroxycinnamic acid amide metabolism: Physiology and biochemistry. *Canadian Journal of Botany*, 80, 577-589.
- Fakhari, A. R., Salehi, P., Heydari, R., Ebrahimi, S. N., Haddad, P. R.** (2005) Hydrodistillation-headspace solvent microextraction, a new method for analysis of the essential oil components of *Lavandula angustifolia* Mill. *Journal of Chromatography A*, 1098, 14-18.
- Fäldt, J., Arimura, G. I., Gershenzon, J., Takabayashi, J., Bohlmann, J.** (2003) Functional identification of *AtTPS03* as (*E*)-b-ocimene synthase: A monoterpene synthase catalyzing jasmonate- and wound-induced volatile formation in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 216, 745-751.
- Fischer, T. C., Halbwirt, H., Meisel, B., Stich, K., Forkmann, G.** (2003) Molecular cloning, substrate specificity of the functionally expressed dihydroflavonol 4-reductases from *Malus domestica* and *Pyrus*

*communis* cultivars and the consequences for flavonoid metabolism. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 412, 223-230.

**Flint, J., Taylor, E., Yang, M., Bolam, D. N., Tailford, L. E., Martinez-Fleites, C., Dodson, E. J., Davis, B. G., Gilbert, H. J., Davies, G. J.** (2005) Structural dissection and high-throughput screening of mannosylglycerate synthase. *Nature Structural & Molecular Biology*, 12, 608-614.

**Ford, C. M., Boss, P. K., Høj, P. B.** (1998) Cloning and characterization of *Vitis vinifera* UDP-glucose:Flavonoid 3-O-Glucosyltransferase, a homologue of the enzyme encoded by the maize *Bronze-1* locus that may primarily serve to glucosylate anthocyanidins *in vivo*. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 9224-9233.

**Fraissinet-Tachet, L., Baltz, R., Chong, J., Kauffmann, S., Fritig, B., Saindrenan, P.** (1998) Two tobacco genes induced by infection, elicitor and salicylic acid encode glucosyltransferases acting on phenylpropanoids and benzoic acid derivatives, including salicylic acid. *FEBS Letters*, 437, 319-323.

**Fridman, E., Pichersky, E.** (2005) Metabolomics, genomics, proteomics, and the identification of enzymes and their substrates and products. *Current Opinion in Plant Biology*, 8, 242-248.

**Fujiwara, H., Tanaka, Y., Yonekura-Sakakibara, K., Fukuchi-Mizutani, M., Nakao, M., Fukui, Y., Yamaguchi, M., Ashikari, T., Kusumi, T.** (1998) cDNA cloning, gene expression and subcellular localization of anthocyanin 5-aromatic acyltransferase from *Gentiana triflora*. *Plant Journal*, 16, 421-431.

**Gomes Da Silva, M. D. R., Chaves Das Neves, H. J.** (1999) Complementary use of hyphenated purge-and-trap gas chromatography techniques and sensory analysis in the aroma profiling of strawberries (*Fragaria ananassa*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 4568-4573.

**Groyne, J., Lognay, G., Marlier, M.** (1999) Accumulation of glycosidically bound compounds in *Fragaria x ananassa* cv. Elsanta fruits at various developmental stages. *Biotechnologie, Agronomie, Societe et Environnement*, 3, 5-9.

**Hamilton-Kemp, T. R., Rodriguez, J. G., Archbold, D. D., Andersen, R. A., Loughrin, J. H., Patterson, Lowry, S. R.** (1989) Strawberry resistance to *Tetranychus urticae* Koch: Effects of flower, fruit, and foliage removal – comparisons of air- vs. nitrogen-entrained volatile compounds. *Journal of Chemical Ecology*, 15, 1465-1473.

**Hamilton-Kemp, T. R., Andersen, R. A., Rodriguez, J. G., Loughrin, J. H., Patterson, C. G.** (1998) Strawberry foliage headspace vapor components at periods of susceptibility and resistance to *Tetranychus urticae* Koch. *Journal of Chemical Ecology*, 14, 789-796.

**Hampel, D., Mosandl, A., Wüst, M.** (2005) Biosynthesis of mono- and sesquiterpenes in carrot roots and leaves (*Daucus carota* L.): Metabolic cross talk of cytosolic mevalonate and plastidial methylerythritol phosphate pathways. *Phytochemistry*, 66, 305-311.

**Hampel, D., Mosandl, A., Wüst, M.** (2006) Biosynthesis of mono- and sesquiterpenes in strawberry fruits and foliage: 2H labeling studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 1473-1478.

**Hanahan, D.** (1985) DNA Cloning. Volume 1, London, IRL Press.

**Harborne, J. B.** (1991) Recent advantages in the ecological chemistry of plant terpenoids. In: Ecological Chemistry and Biochemistry of Plant Terpenoids. Harborne, J. B.; Tomas-Barberan, F. A. (Hrsg.), Clarendon Press, Oxford, 399-426.

**Hefner, T., Arend, J., Warzecha, H., Siems, K., Stöckigt, J.** (2002) Arbutin synthase, a novel member of the NRD1b glycosyltransferase family, is a unique multifunctional enzyme converting various natural products and xenobiotics. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 10, 1731-1741.

**Hoffmann, L., Maury, S., Martz, F., Geoffroy, P., Legrand, M.** (2003) Purification, cloning, and properties of an acyltransferase controlling shikimate and quinate ester intermediates in phenylpropanoid metabolism. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 95-103.

**Hoffmann, L., Besseau, S., Geoffroy, P., Ritzenthaler, C., Meyer, D., Lapierre, C., Pollet, B., Legrand, M.** (2004) Silencing of hydroxycinnamoyl-coenzyme A shikimate/quinate hydroxycinnamoyltransferase affects phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Cell*, 16, 1446-1465.

- Hughes, J., Hughes, M. A.** (1994) Multiple secondary plant product UDP-glucose glucosyltransferase genes expressed in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) cotyledons. *DNA Seq.*, 5, 41-49.
- Hyatt, D. C., Croteau, R.** (2005) Mutational analysis of a monoterpene synthase reaction: Altered catalysis through directed mutagenesis of (-)-pinene synthase from *Abies grandis*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 439, 222-233.
- Iijima, Y., Davidovich-Rikanati, R., Fridman, E., Gang, D. R., Bar, E., Lewinsohn, E., Pichersky, E.** (2004) The biochemical and molecular basis for the divergent patterns in the biosynthesis of terpenes and phenylpropenes in the peltate glands of three cultivars of basil. *Plant Physiology*, 136, 3724-3736.
- Isayenkova, J., Wray, V., Nimitz, M., Strack, D., Vogt, T.** (2006) Cloning and functional characterisation of two regioselective flavonoid glucosyltransferases from *Beta vulgaris*. *Phytochemistry*, 67, 1598-1612.
- Jackson, R. G., Lim, E. K., Li, Y., Kowalczyk, M., Sandberg, G., Hogget, J., Ashford, D. A., Bowles, D. J.** (2001) Identification and Biochemical Characterization of an *Arabidopsis* Indole-3-acetic Acid Glucosyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 4350-4356.
- Jia, J. W., Crock, J., Lu, S., Croteau, R., Chen, X. Y.** (1999) (3*R*)-Linalool synthase from *Artemisia annua* L.: cDNA isolation, characterization, and wound induction. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 372, 143-149.
- Jones, P. R., Møller, B. L., Høj, P. B.** (1999) The UDP-glucose:*p*-hydroxymandelonitrile-*O*-glucosyltransferase that catalyzes the last step in synthesis of the cyanogenic glucoside dhurrin in *Sorghum bicolor*. Isolation, cloning, heterologous expression, and substrate specificity. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 35483-35491.
- Jones, P., Vogt, T.** (2001) Glycosyltransferases in secondary plant metabolism: Tranquilizers and stimulant controllers. *Planta*, 213, 164-174.
- Jung, J., Sewenig, S., Hener, U., Mosandl, A.** (2005) Comprehensive authenticity assessment of lavender oils using multielement/multicomponent isotope ratio mass spectrometry analysis and enantioselective multidimensional gas chromatography-mass spectrometry. *European Food Research and Technology*, 220, 232-237.
- Kaffarnik, F., Heller, W., Hertkorn, N., Sandermann, J.** (2005) Flavonol 3-*O*-glycoside hydroxycinnamoyltransferases from Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *FEBS Journal*, 272, 1415-1424.
- Keegstra, K., Olsen, L. J., Theg, S. M.** (1989) Chloroplastic precursors and their transport across the envelope membranes. *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 40, 471-501
- Keeling, C. I., Bohlmann, J.** (2006) Genes, enzymes and chemicals of terpenoid diversity in the constitutive and induced defence of conifers against insects and pathogens. *New Phytologist*, 170, 657-675.
- Kessler, A., Baldwin, I. T.** (2002) Plant responses to insect herbivory: The emerging molecular analysis. *Annual Review of Plant Biology*, 53, 299-328.
- Kim, N. S., Lee, D. S.** (2002) Comparison of different extraction methods for the analysis of fragrances from *Lavandula* species by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 982, 31-47.
- Köllner, T. G., Schnee, C., Gershenzon, J., Degenhardt, J.** (2004) The variability of sesquiterpenes emitted from two *Zea mays* cultivars is controlled by allelic variation of two terpene synthase genes encoding stereoselective multiple product enzymes. *Plant Cell*, 16, 1115-1131.
- Koyoma, T., Ogura, K.** (1999) Isopentenyl Diphosphate Isomerase and Prenyltransferases. In: Comprehensive Natural Products Chemistry, Vol. 2: Isoprenoids including carotenoids and steroids. Cane, D. (Hrsg.), Elsevier, Oxford, 69-96.
- Kreuz, K., Tommasini, R., Martinoia, E.** (1996) Old enzymes for a new job: Herbicide detoxification in plants. *Plant Physiology*, 111, 349-353.

- Kutchan, T. M.** (2005) A role for intra- and intercellular translocation in natural product biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology*, 8, 292-300.
- Lamb, C., Dixon, R. A.** (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Biology*, 48, 251-275.
- Lange, B. M., Rujan, T., Martin, W., Croteau, R.** (2000) Isoprenoid biosynthesis: The evolution of two ancient and distinct pathways across genomes. *PNAS*, 97, 13172-13177.
- Langlois-Meurinne, M., Gachon, C. M. M., Saindrenan, P.** (2005) Pathogen-responsive expression of glycosyltransferase genes *UGT73B3* and *UGT73B5* is necessary for resistance to *Pseudomonas syringae* pv tomato in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 139, 1890-1901.
- Latza, S., Berger, R. G.** (1997) 1-*O-trans*-cinnamoyl- $\beta$ -D-glucopyranose:Alcohol cinnamoyltransferase activity in fruits of cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.). *Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, 52, 747-755.
- Laule, O., Fürholz, A., Chang, H. S., Zhu, T., Wang, X., Heifetz, P. B., Gruissem, W., Lange, B. M.** (2003) Crosstalk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 6866-6871.
- Lawrence, B. M.** (1993) Progress in Essential Oils. *Perfumer and Flavorist* 18(1), 53-61.
- Lawrence, B. M.** (1994) Progress in Essential Oils. *Perfumer and Flavorist* 19(3), 33-40.
- Lee, H. I., Raskin, I.** (1999) Purification, cloning, and expression of a pathogen inducible UDP-glucose:salicylic acid glucosyltransferase from tobacco. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 36637-36642.
- Lehfeldt, C., Shirley, A. M., Meyer, K., Ruegger, M. O., Cusumano, J. C., Viitanen, P. V., Strack, D., Chapple, C.** (2000) Cloning of the *SNG1* gene of *Arabidopsis* reveals a role for a serine carboxypeptidase-like protein as an acyltransferase in secondary metabolism. *Plant Cell*, 12, 1295-1306.
- Lesburg, C. A., Zhai, G., Cane, D. E., Christianson, D. W.** (1997) Crystal structure of pentalenene synthase: Mechanistic insights on terpenoid cyclization reactions in biology. *Science*, 277, 1820-1824.
- Lewinsohn, E., Schalechet, F., Wilkinson, J., Matsui, K., Tadmor, Y., Nam, K. H., Amar, O., Lastochkin, E., Larkov, O., Ravid, U., Hiatt, W., Gepstein, S., Pichersky, E.** (2001) Enhanced levels of the aroma and flavor compound *S*-linalool by metabolic engineering of the terpenoid pathway in tomato fruits. *Plant Physiology*, 127, 1256-1265.
- Li, Y., Baldauf, S., Lim, E. K., Bowles, D. J.** (2001) Phylogenetic Analysis of the UDP-glycosyltransferase Multigene Family of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 4338-4343.
- Lim, E. K., Li, Y., Parr, A., Jackson, R., Ashford, D. A., Bowles, D. J.** (2001) Identification of Glucosyltransferase Genes Involved in Sinapate Metabolism and Lignin Synthesis in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 4344-4349.
- Lim, E. K., Doucet, C. J., Li, Y., Elias, L., Worrall, D., Spencer, S. P., Ross, J., Bowles, D. J.** (2002) The activity of *Arabidopsis* glycosyltransferases toward salicylic acid, 4-hydroxybenzoic acid, and other benzoates. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 586-592.
- Loutre, C., Dixon, D. P., Brazier, M., Slater, M., Cole, D. J., Edwards, R.** (2003) Isolation of a glucosyltransferase from *Arabidopsis thaliana* active in the metabolism of the persistent pollutant 3,4-dichloroaniline. *Plant Journal*, 34, 485-493.
- Luan, F., Wüst, M.** (2002) Differential incorporation of 1-deoxy-D-xylulose into (3S)-linalool and geraniol in grape berry exocarp and mesocarp. *Phytochemistry*, 60, 451-459.
- Lücker, J., Bouwmeester, H. J., Schwab, W., Blaas, J., Van der Plas, L. H. W., Verhoeven, H. A.** (2001) Expression of *Clarkia* *S*-linalool synthase in transgenic petunia plants results in the accumulation of *S*-linalyl- $\beta$ -D-glucopyranoside. *Plant Journal*, 27, 315-324.

- Lücker, J., El Tamer, M. K., Schwab, W., Verstappen, F. W. A., Van der Plas, L. H. W., Bouwmeester, H. J., Verhoeven, H. A. (2002) Monoterpene biosynthesis in lemon (*Citrus limon*) cDNA isolation and functional analysis of four monoterpene synthases. *European Journal of Biochemistry*, 269, 3160-3171.
- Lücker, J., Schwab, W., van Hautum, B., Blaas, J., van der Plas, L. H. W., Bouwmeester, H. J., Verhoeven, H. A. (2004) Increased and altered fragrance of tobacco plants after metabolic engineering using three monoterpene synthases from lemon. *Plant Physiology*, 134, 510-519.
- Lunkenbein, S., Bellido, M., Aharoni, A., Salentijn, E. M. J., Kaldenhoff, R., Coiner, H. A., Munoz-Blanco, J., Schwab, W. (2006a) Cinnamate metabolism in ripening fruit. Characterization of a UDP-glucose:cinnamate glucosyltransferase from strawberry. *Plant Physiology*, 140, 1047-1058.
- Lunkenbein, S., Coiner, H., de Vos, C. H. R., Schaart, J. G., Boone, M. J., Krens, F. A., Schwab, W., Salentijn, E. M. J. (2006b) Molecular characterization of a stable antisense chalcone synthase phenotype in strawberry (*Fragaria x ananassa*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 2145-2153.
- Ma, X., Koepke, J., Panjkar, S., Fritsch, G., Stöckigt, J. (2005) Crystal structure of vinorine synthase, the first representative of the BAHD superfamily. *Journal of Biological Chemistry*, 280, 13576-13583.
- Mahmoud, S. S., Croteau, R. (2002) Strategies for transgenic manipulation of monoterpene biosynthesis in plants. *Trends in Plant Science*, 7, 366-373.
- Marrs, K. A. (1996) The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47, 127-158.
- Martin, D. M., Fäldt, J., Bohlmann, J. (2004) Functional characterization of nine Norway spruce TPS genes and evolution of gymnosperm terpene synthases of the *TPS-d* subfamily. *Plant Physiology*, 135, 1908-1927.
- McGeady, P., Croteau, R. (1995) Isolation and characterization of an active-site peptide from a monoterpene cyclase labeled with a mechanism-based inhibitor. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 317, 149-155.
- McNaughton, V. (2000) Lavender the grower's guide. Timber Press, Portland.
- Memelink, J. (2005) The use of genetics to dissect plant secondary pathways. *Current Opinion in Plant Biology*, 8, 230-235.
- Mercke, P., Crock, J., Croteau, R., Brodelius, P. E. (1999) Cloning, expression, and characterization of epi-cedrol synthase, a sesquiterpene cyclase from *Artemisia annua* L. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 369, 213-222.
- Meßner, B., Thulke, O., Schäffner, A. R. (2003) *Arabidopsis* glucosyltransferases with activities toward both endogenous and xenobiotic substrates. *Planta*, 217, 138-146.
- Meyers, B. C., Lee, D. K., Vu, T. H., Tej, S. S., Edberg, S. B., Matvienko, M., Tindell, L. D. (2004) *Arabidopsis* MPSS. An Online Resource for Quantitative Expression Analysis. *Plant Physiology*, 135, 801-813.
- Milkowski, C., Strack, D. (2004) Serine carboxypeptidase-like acyltransferases. *Phytochemistry*, 65, 517-524.
- Munoz-Bertomeu, J., Arrillaga, I., Ros, R., Segura, J. (2006) Up-Regulation of 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Synthase Enhances Production of Essential Oils in Transgenic Spike Lavender. *Plant Physiology*, 142, 890-900.
- Nakai, K., Horton, P. (1999) PSORT: A program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends in Biochemical Sciences*, 24, 34-35.

- Nakayama, T., Suzuki, H., Nishino, T.** (2003) Anthocyanin acyltransferases: Specificities, mechanism, phylogenetics, and applications. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 23, 117-132.
- Niggeweg, R., Michael, A. J., Martin, C.** (2004) Engineering plants with increased levels of the antioxidant chlorogenic acid. *Nature Biotechnology*, 22, 746-754.
- Offen, W., Martinez-Fleites, C., Yang, M., Lim, E-K., Davis, B. G., Tarling, C. A., Ford, C. M., Bowles, D. J., Davies, G. J.** (2006) Structure of flavonoid glucosyltransferase reveals the basis for plant natural product modification. *EMBO Journal*, 25, 1396-1405.
- Page, R. D. M.** (1996) TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput. Appl. Biosci.* 12, 357-358.
- Pechous, S. W., Whitaker, B. D.** (2004) Cloning and functional expression of an (*E,E*)- $\alpha$ -farnesene synthase cDNA from peel tissue of apple fruit. *Planta*, 219, 84-94.
- Pflugmacher, S., Sandermann, J.** (1998) Taxonomic distribution of plant glucosyltransferases acting on xenobiotics. *Phytochemistry*, 49, 507-511.
- Picaud, S., Brodelius, M., Brodelius, P. E.** (2005) Expression, purification and characterization of recombinant (*E*)- $\beta$ -farnesene synthase from *Artemisia annua*. *Phytochemistry*, 66, 961-967.
- Pichersky, E., Lewinsohn, E., Croteau, R.** (1995) Purification and characterization of S-linalool synthase, an enzyme involved in the production of floral scent in *Clarkia breweri*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 316, 803-807.
- Pichersky, E., Gang, D. R.** (2000) Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: An evolutionary perspective. *Trends in Plant Science*, 5, 439-445.
- Pichersky, E., Gershenzon, J.** (2002) The formation and function of plant volatiles: Perfumes for pollinator attraction and defense. *Current Opinion in Plant Biology*, 5, 237-243.
- Poppenberger, B., Berthiller, F., Lucyshyn, D., Sieberer, T., Schuhmacher, R., Krska, R., Kuchler, K., Glössl, J., Luschnig, C., Adam, G.** (2003) Detoxification of the Fusarium Mycotoxin Deoxynivalenol by a UDP-glucosyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 47905-47914.
- Poppenberger, B., Fujioka, S., Soeno, K., George, G. L., Vaistij, F. E., Hiranuma, S., Seto, H., Takatsuto, S., Adam, G., Yoshida, S., Bowles, D.** (2005) The UGT73C5 of *Arabidopsis thaliana* glucosylates brassinosteroids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 15253-15258.
- Quiel, J. A., Bender, J.** (2003) Glucose conjugation of anthranilate by the *Arabidopsis* UGT74F2 glucosyltransferase is required for tryptophan mutant blue fluorescence. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 6275-6281.
- Rasmann, S., Köllner, T. G., Degenhardt, J., Hiltpold, I., Toepfer, S., Kuhlmann, U., Gershenzon, J., Turlings, T. C. J.** (2005) Recruitment of entomopathogenic nematodes by insect-damaged maize roots. *Nature*, 434, 732-737.
- Richter, G.** (1996) Biochemie der Pflanzen. Thieme, Stuttgart.
- Rodríguez-Concepción, M., Boronat, A.** (2002) Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics. *Plant Physiology*, 130, 1079-1089.
- Rodríguez-Concepción, M., Forés, O., Martínez-García, J. F., González, V., Phillips, M. A., Ferrer, A., Boronat, A.** (2004) Distinct Light-Mediated Pathways Regulate the Biosynthesis and Exchange of Isoprenoid Precursors during *Arabidopsis* Seedling Development. *Plant Cell*, 16, 144-156.
- Rohdich, F., Kis, K., Bacher, A., Eisenreich, W.** (2001) The non-mevalonate pathway of isoprenoids: genes, enzymes and intermediates. *Current Opinion in Chemical Biology*, 5, 535-540.
- Rohloff, J., Bones, A. M.** (2005) Volatile profiling of *Arabidopsis thaliana* - Putative olfactory compounds in plant communication. *Phytochemistry*, 66, 1941-1955.

- Rohmer, M.** (1999) A Mevalonate-independent Route to Isopentenyl Diphosphate. In: *Comprehensive Natural Products Chemistry*, Vol. 2: Isoprenoids including carotenoids and steroids. Cane, D. (Hrsg.), Elsevier, Oxford, 45-67.
- Roscher, R., Herderich, M., Steffen, J. P., Schreier, P., Schwab, W.** (1996) 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3 [2H]-furanone 6'O-malonyl-b-D-glucopyranoside in strawberry fruits. *Phytochemistry*, 43, 155-159.
- Ruzicka, L.** (1953) Isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds. *Experientia*, 9, 357-367.
- Rynkiewicz, M. J., Cane, D. E., Christianson, D. W.** (2002) X-ray crystal structures of D100E trichodiene synthase and its pyrophosphate complex reveal the basis for terpene product diversity. *Biochemistry*, 41, 1732-1741.
- Sandermann, J.** (1994) Higher plant metabolism of xenobiotics: The 'green liver' concept. *Pharmacogenetics*, 4, 225-241.
- Schaart, J. G., Mehli, L., Schouten, H. J.** (2005) Quantification of allele-specific expression of a gene encoding strawberry polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) using Pyrosequencing<sup>TM</sup>. *Plant Journal*, 41, 493-500.
- Schäffer, A. A., Aravind, L., Madden, T. L., Shavirin, S., Spouge, J. L., Wolf, Y. I., Koonin, E. V., Altschul, S. F.** (2001) Improving the accuracy of PSI-BLAST protein database searches with composition-based statistics and other refinements. *Nucleic Acids Research*, 29, 2994-3005.
- Schaller, B., Schneider, B., Schuette, H. R.** (1992) Metabolism of the herbicide bromoxynil in *Hordeum vulgare* and *Stellaria media*. *Zeitschrift fuer Naturforschung, C: Journal of Biosciences*, 47, 126-131.
- Schnee, C., Köllner, T. G., Gershenzon, J., Degenhardt, J.** (2002) The maize gene *terpene synthase 1* encodes a sesquiterpene synthase catalyzing the formation of (*E*)- $\beta$ -farnesene, (*E*)-nerolidol, and (*E,E*)-farnesol after herbivore damage. *Plant Physiology*, 130, 2049-2060.
- Schnee, C., Köllner, T. G., Held, M., Turlings, T. C. J., Gershenzon, J., Degenhardt, J.** (2006) The products of a single maize sesquiterpene synthase form a volatile defense signal that attracts natural enemies of maize herbivores. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 1129-1134.
- Segura, J.; Calvo, M. C.** (1991) *Lavandula* spp. (Lavender): In Vitro Culture, Regeneration of Plants, and the Formation of Essential Oils and Pigments. In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 15: Medicinal and Aromatic Plants III. Bajaj, Y. P. S. (Hrsg.), Springer, Berlin, 283-310.
- Sell, C.** (2003) A fragrant introduction to terpenoid chemistry. The Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- Shalit, M., Guterman, I., Volpin, H., Bar, E., Tamari, T., Menda, N., Adam, Z., Zamir, D., Vainstein, A., Weiss, D., Pichersky, E., 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.
- Shao, H., He, X., Achnine, L., Blount, J. W., Dixon, R. A., Wang, X.** (2005) Crystal structures of a multifunctional triterpene/flavonoid glycosyltransferase from *Medicago truncatula*. *Plant Cell*, 17, 3141-3154.
- Shellie, R., Marriott, P., Cornwell, C.** (2000) Characterization and comparison of tea tree and lavender oils by using comprehensive gas chromatography. *HRC Journal of High Resolution Chromatography*, 23, 554-560.
- Shellie, R., Mondello, L., Marriott, P., Dugo, G.** (2002) Characterisation of lavender essential oils by using gas chromatography-mass spectrometry with correlation of linear retention indices and comparison with comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 970, 225-234.
- Small, I., Peeters, N., Legeai, F., Lurin, C.** (2004) Predotar: A tool for rapidly screening proteomes for N-terminal targeting sequences. *Proteomics*, 4, 1581-1590.



**St Pierre, B., Laflamme, P., Alarco, A. M., De Luca, V.** (1998) The terminal O-acetyltransferase involved in vindoline biosynthesis defines a new class of proteins responsible for coenzyme A-dependent acyl transfer. *Plant Journal*, 14, 703-713.

**St-Pierre, B.; 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. Vol. 34. John RI, Romeo T, Varin L, De Luca V. (Hrsg.) Elsevier Science Publishing; Oxford, 285–315.

**Starks, C. M., Back, K., Chappell, J., Noel, J. P.** (1997) Structural basis for cyclic terpene biosynthesis by tobacco 5-*epi*-aristolochene synthase. *Science*, 277, 1815-1820.

**Steele, C. L., Lewinsohn, E., Croteau, R.** (1995) Induced oleoresin biosynthesis in grand fir as a defense against bark beetles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, 4164-4168.

**Steele, C. L., Crock, J., Bohlmann, J., Croteau, R.** (1998) Sesquiterpene Synthases from grand fir (*Abies grandis*). *Journal of Biological Chemistry*, 273, 2078-2089.

**Stewart, J., Kang, B. C., Liu, K., Mazourek, M., Moore, S. L., Eun, Y. Y., Kim, B. D., Paran, I., Jahn, M. M.** (2005) The *Pun1* gene for pungency in pepper encodes a putative acyltransferase. *Plant Journal*, 42, 675-688.

**Suzuki, H., Nakayama, T., Nishino, T.** (2003) Proposed mechanism and functional amino acid residues of malonyl-CoA:anthocyanin 5-O-glucoside-6"-O-malonyltransferase from flowers of *Salvia splendens*, a member of the versatile plant acyltransferase family. *Biochemistry*, 42, 1764-1771.

**Svoboda, K. P.; Svoboda, T. G.; Syred, A. D.** (2001) A Closer Look: Secretory Structures of Aromatic and Medicinal Plants. *HerbalGram*, 53, 34-43.

**Tacke, E., Korfhage, C., Michel, D., Maddaloni, M., Motto, M., Lanzini, S., Salamini, F., Doring, H. P.** (1995) Transposon tagging of the maize *Glossy2* locus with the transposable element *En/Spm*. *Plant Journal*, 8, 907-917.

**Taguchi, G., Imura, H., Maeda, Y., Kodaira, R., Hayashida, N., Shimosaka, M., Okazaki, M.** (2000) Purification and characterization of UDP-glucose:hydroxycoumarin 7-O-glucosyltransferase, with broad substrate specificity from tobacco cultured cells. *Plant Science*, 157, 105-112.

**Taguchi, G., Yazawa, T., Hayashida, N., Okazaki, M.** (2001) Molecular cloning and heterologous expression of novel glucosyltransferases from tobacco cultured cells that have broad substrate specificity and are induced by salicylic acid and auxin. *European Journal of Biochemistry*, 268, 4086-4094.

**Tholl, D., Chen, F., Petri, J., Gershenzon, J., Pichersky, E.** (2005) Two sesquiterpene synthases are responsible for the complex mixture of sesquiterpenes emitted from *Arabidopsis* flowers. *Plant Journal*, 42, 757-771.

**Tholl, D.** (2006) Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism. *Current Opinion in Plant Biology*, 9, 297-304

**Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J.** (1994) CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22, 4673-4680.

**Trapp, S. C., Croteau, R. B.** (2001) Genomic organization of plant terpene synthases and molecular evolutionary implications. *Genetics*, 158, 811-832.

**Tzafrir, I., Dickerman, A., Brazhnik, O., Nguyen, Q., McElver, J., Frye, C., Patton, D., Meinke, D.** (2003) The *Arabidopsis* SeedGenes project. *Nucleic Acids Research*, 31, 90-93.

**Ulrich, D., Hoberg, E., Rapp, A., Kecke, S.** (1997) Analysis of strawberry flavor. Discrimination of aroma types by quantification of volatile compounds. *Zeitschrift fuer Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung A: Food Research and Technology*, 205, 218-223.

- Verzera, A., Trozzi, A., Cotroneo, A., Lorenzo, D., Dellacassa, E.** (2000) Uruguayan Essential Oil. 12. Composition of Nova and Satsuma Mandarin Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 2903-2909.
- Villegas, R. J. A., Kojima, M.** (1986) Purification and characterization of hydroxycinnamoyl D-glucose. Quinate hydroxycinnamoyl transferase in the root of the sweet potato, *Ipomoea batatas* Lam. *Journal of Biological Chemistry*, 261, 8729-8733.
- Vogt, T., Grimm, R., Strack, D.** (1999) Cloning and expression of a cDNA encoding betanidin 5-O-glucosyltransferase, a betanidin- and flavonoid-specific enzyme with high homology to inducible glucosyltransferases from the *Solanaceae*. *Plant Journal*, 19, 509-519.
- Vogt, T., Jones, P.** (2000) Glycosyltransferases in plant-natural product synthesis: Characterization of a supergene family. *Trends in Plant Science*, 5, 380-386.
- Von Heijne, G., Stepphuhn, J., Herrmann, R. G.** (1989) Domain structure of mitochondrial and chloroplast targeting peptides. *European Journal of Biochemistry*, 180, 535-545.
- Walker, K.; Long, R., Croteau, R.** (2002) The final acylation step in taxol biosynthesis: Cloning of the taxoid C13-side-chain N-benzoyltransferase from *Taxus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 9166-9171.
- Wallach, O.** (1914) Terpene und Campher. Veit & Comp., Leipzig.
- Wang, J., De Luca, V.** (2005) The biosynthesis and regulation of biosynthesis of Concord grape fruit esters, including 'foxy' methylanthranilate. *Plant Journal*, 44, 606-619.
- Wheeler D. L., Church, D. M., Federhen, S., Lash, A. E., Madden, T. L., Pontius, J. U., Schuler, G. D., Schriml, L. M., Sequeira, E., Tatusova, T. A., Wagner, L.** (2003) Database resources of the National Center for Biotechnology. *Nucleic Acids Research*, 31, 28-33.
- Whittington, D. A., Wise, M. L., Urbansky, M., Coates, R. M., Croteau, R. B., Christianson, D. W.** (2002) Bornyl diphosphate synthase: Structure and strategy for carbocation manipulation by a terpenoid cyclase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 15375-15380.
- Williams, D. C., McGarvey, D. J., Katahira, E. J., Croteau, R.** (1998) Truncation of limonene synthase preprotein provides a fully active 'pseudomature' form of this monoterpene cyclase and reveals the function of the amino-terminal arginine pair. *Biochemistry*, 37, 12213-12220.
- Wintoch, H., Krammer, G., Schreier, P.** (1991) Glycosidically bound aroma compounds from two strawberry fruit species, *Fragaria vesca* f. *semperflorens* and *Fragaria x ananassa*, cv. Korona. *Flavour and Fragrance Journal*, 6, 209-215.
- Wise, M. L., Savage, T. J., Katahira, E., Croteau, R.** (1998) Monoterpene synthases from common sage (*Salvia officinalis*). cDNA isolation, characterization, and functional expression of (+)-sabinene synthase, 1,8-cineole synthase, and (+)-bornyl diphosphate synthase. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 14891-14899.
- Wise, M. L.;Croteau, R.** (1999) Monoterpene Biosynthesis. In: Comprehensive Natural Products Chemistry, Vol. 2: Isoprenoids including carotenoids and steroids. Cane, D. (Hrsg.), Elsevier, Oxford, 97-153.
- Wu, S., Schalk, M., Clark, A., Miles, R. B., Coates, R., Chappell, J.** (2006) Redirection of cytosolic or plastidic isoprenoid precursors elevates terpene production in plants. *Nature Biotechnology*, 24, 1441-1447.
- Xia, Y., Nikolau, B. J., Schnable, P. S.** (1996) Cloning and characterization of *CER2*, an *Arabidopsis* gene that affects cuticular wax accumulation. *Plant Cell*, 8, 1291-1304.
- Yang, Q., Reinhard, K., Schiltz, E., Matern, U.** (1997) Characterization and heterologous expression of hydroxycinnamoyl/benzoyl-CoA:anthranilate N-hydroxycinnamoyl/benzoyltransferase from elicited cell cultures of carnation, *Dianthus caryophyllus* L. *Plant Molecular Biology*, 35, 777-789.

**Yang, Q., Trinh, H. X., Imai, S., Ishihara, A., Zhang, L., Nakayashiki, H., Tosa, Y., Mayama, S.** (2004) Analysis of the involvement of hydroxyanthranilate hydroxycinnamoyltransferase and caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase in phytoalexin biosynthesis in oat. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 17, 81-89.

