

IDENTIFIZIERUNG, KLONIERUNG UND
HETEROLOGE EXPRESSION
EINES TERPENSYNTHASEGENS
AUS *MARRUBIUM VULGARE* L.

DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Annette Zamponi
aus Troisdorf

Bonn 2002

angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1.REFERENT: PRIV.-DOZ. DR. W. KNÖß

2.REFERENTIN: PROF. DR. G. KÖNIG

1	EINLEITUNG.....	7
1.1	MONOTERPENSYNTASEN	11
1.2	SESQUITERPENSYNTASEN.....	13
1.3	DITERPENSYNTASEN	14
1.4	UNTERSUCHUNGEN AN TERPENSYNTASEGENEN.....	16
1.5	TERPENSYNTASEN IM VERGLEICH	17
1.6	DIE PFLANZE <i>MARRUBIUM VULGARE</i> L. (LAMIACEAE)	18
1.7	ZIELSETZUNG	19
2	MATERIAL UND METHODEN	20
2.1	ORGANISMEN	20
2.2	PLASMIDE.....	20
2.3	OLIGONUKLEOTIDE	22
2.4	CHEMIKALIEN	24
2.5	ENZYME	24
2.6	KITS	25
2.7	GERÄTE	25
2.8	KULTUR VON <i>ESCHERICHIA COLI</i>	26
2.8.1	Nährmedien	26
2.9	DNA-ISOLIERUNG.....	27
2.9.1	Genomische DNA aus <i>M.vulgare</i>	27
2.9.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	28
2.10	DNA-ANALYSE	29
2.10.1	DNA-Konzentrationsbestimmung	29
2.10.2	Restriktion der DNA.....	29
2.10.3	Agarose-Gelelektrophorese.....	29
2.10.4	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	30
2.11	KLONIERUNG	30
2.11.1	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	30
2.11.2	Ligation von DNA-Fragmenten	30
2.11.3	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen	31
2.12	POLYMERASE-KETTEN-REAKTION (PCR)	31
2.12.1	PCR Kolonie-Screening	32
2.12.2	Banden-Reamplifizierung.....	33
2.13	PARTIELLE INVERSE PCR	33
2.14	GENOME WALKING™	37
2.15	SEQUENZIERUNGSVERFAHREN	37
2.15.1	Alf-Express™	37
2.15.2	BigDye™ Sequenzierung	39
2.15.3	DNA-Sequenzanalyse	39
2.16	SOUTHERN-BLOT (DNA/DNA HYBRIDISIERUNG).....	40
2.16.1	Southern Blot Analyse	40
2.16.2	Markierung von Gensonden mit dem AlkPhos Direkt™ System (Amersham Pharmacia)	42
2.17	RNA-PRÄPARATION AUS <i>M. VULGARE</i>	44
2.17.1	mRNA-Isolierung.....	44
2.17.2	Analyse von RNA oder mRNA.....	44

2.18	HERSTELLUNG EINER λ -GT- CDNA-BIBLIOTHEK	45
2.18.1	Herstellung der cDNA:	45
2.18.2	Plaque Lifting.....	46
2.19	RT-PCR	47
2.19.1	Avian RT-PCR System	48
2.20	RACE-PCR	48
2.21	NORTHERNBLOT (RNA/RNA-HYBRIDISIERUNG)	52
2.21.1	Herstellung einer RNA-Sonde durch <i>in vitro</i> -Transkription	52
2.21.2	Hybridisierung und immunologische Detektion	53
2.22	HETEROLOGE EXPRESSION DES MVTPS1 IN <i>E. COLI</i>	53
2.22.1	Herstellung der Primer.....	53
2.22.2	Amplifizierung der vollständigen cDNA	54
2.22.3	Klonierung im Expressionsvektor pASK-IBA 7	54
2.22.4	Transformation in <i>E. coli</i> BL21(D3)pLysS-Zellen	56
2.22.5	Expression des Vollklons.....	56
2.23	SDS-PAGE	56
2.23.1	Probenvorbereitung	56
2.23.2	Polyacrylamidgel	57
2.23.3	Coomassie-Färbung	58
2.24	WESTERNBLOT.....	58
2.24.1	Immunologische Detektion.....	58
2.25	ENZYMATISCHE AKTIVITÄT DES EXPRIMIERTEN ENZYMS	59
2.25.1	Zellernte.....	59
2.25.2	Zellaufschluss	60
2.25.3	Inkubation und Isolierung der Produkte.....	60
2.25.4	Geräteparameter	61
3	ERGEBNISSE	63
3.1	GENOMISCHE DNA	63
3.1.1	PCR mit degenerierten Primern	63
3.1.2	Fragmentverlängerung durch partielle inverse PCR.....	64
3.1.3	GenomeWalker™	65
3.1.4	Southern Blot Analyse	68
3.2	ISOLIERUNG DER CDNA-SEQUENZ AUS <i>MARRUBIUM VULGARE</i>	70
3.2.1	RT-PCR.....	70
3.2.2	cDNA-Bank	73
3.2.3	RACE-PCR	74
3.3	UNTERSUCHUNGEN DER MVTPS1 IN <i>MARRUBIUM VULGARE</i>	76
3.3.1	Charakterisierung der MVTPS1	76
3.3.2	Expression von <i>mvtps1</i>	78
3.3.3	Nachweis der enzymatischen Aktivität des exprimierten Proteins...81	
3.3.4	Identifizierung der Hauptterpenkomponente.....	83
3.3.5	Zeitlicher Expressionsstart in <i>Marrubium vulgare</i>	84
4	DISKUSSION	87
4.1	DIE GENSTRUKTUR VON <i>MVTPS1</i>	87
4.2	MVTPS1, DIE CDNA-SEQUENZ DER TERPENSYNTHESE.....	90
4.2.1	Die vollständige cDNA-Sequenz	91
4.3	MVTPS1 - DAS PROTEIN	91

4.3.1	Vergleich der Aminosäuresequenzen von Terpensynthasen	92
4.4	HETEROLOGE EXPRESSION VON MVTPS1	96
4.4.1	Abgeleitete Proteinstruktur.....	98
4.4.2	Identifizierung des Hauptproduktes von MVTPS1	99
4.5	MECHANISMUS DER ZYKLISIERUNG	99
4.6	REAKTIONSMCHANISMUS DER MVTPS1 ANHAND DES VERGLEICHES MIT DER STRUKTUR VON TEAS	102
4.7	EXPRESSIONSSTART DER MVTPS1	105
5	AUSBLICK.....	108
6	ZUSAMMENFASSUNG	110
7	LITERATUR	112

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Allgemeines

A	Adenin
A _{260 bzw. 280}	Absorption bei 260 bzw. 280 nm
AP	Adapter-Primer
Ap	Ampicillin
AS	Aminosäure
AZ <i>n</i>	durch PCR amplifiziertes Fragment
pAZ <i>n</i>	Plasmid mit (PCR-) Fragment
BSA	bovine serum albumin bzw. Rinderserumalbumin
bp	Basenpaare
C	Cytosin
CDP <i>Star</i>	Dinatrium 4-chloro-3-[methoxyspiro{ 1,2-dioxetan-3,2'-[5'-chloro]tricyclo[3.3.1.1 ^{3,7}]decan}-4-yl]phenyphosphat
CDP	Copayldiphosphat
cDNA	copy oder complementary DNA
ddATP	Didesoxyadenosintriphosphat
ddCTP	Didesoxycytosintriphosphat
ddGTP	Didesoxyguanidintriphosphat
ddNTP	Didesoxyribonukleotidtriphosphat
ddTTP	Didesoxythymidintriphosphat
DIG	Digoxygenin
DMDC	Dimethyldichlorid
DCMU	3-(3,4-Dichlorophenyl)-1,1-dimethylharnstoff
DMSO	Dimethylsulfonoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid bzw. Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FPP	Farnesyldiphosphat
FLD	Furanolabdan Diterpen
G	Guanin
GGPP	Geranylgeranyldiphosphat

GPP	Geranyldiphosphat
h	Stunde
IPTG	Isopropyl-1-thio-β-D-Galaktopyranosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
MMLV	Molony-Maus-Leukämie-Virus
MOPS	3-(N-morpholino)-propansulfonat
MVTPS1	<i>Marrubium vulgare</i> Terpensynthase 1
mRNA	messenger RNA
NAD(P)H	Nicotinamidadenindinukleotid-(phosphat)
NUP	Nested Universal-Primer
OD	optische Dichte
pI	isoelektrischer Punkt
pGEM T7/Sp6	Für den Vektor pGEM®-T-Easy hergestellte Primer, T7 bzw. Sp6 gibt die Orientierung des Primers entsprechend der Syntheserichtung der jeweiligen Polymerase an.
RNA	Ribonucleic acid bzw. Ribonukleinsäure
RP	Reverse-Primer
RT	Reverse Transkriptase
RubisCO	Ribulosebisphosphatcarboxylase/-oxygenase
rpm	rounds per minute bzw. Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
Seq	Sequenzierung
T	Thymin
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
tRNA	transfer Ribonukleinsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
MVTPS1	putative Terpensynthase
U	Unit
ü.N.	über Nacht
UE	Unter Einheit
UP	Universal-Primer
UPM	Universal-Primer-Mix

v/v	volume per volume bzw. Volumenprozent
w/v	weight per volume bzw. Gewicht pro Volumeneinheit
x-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Galaktopyranosid
ϵ	Extinktionskoeffizient

Organismen und Pflanzen

<i>M. vulgare</i>	<i>Marrubium vulgare</i> ; gemeiner Andorn
<i>A. grandis</i>	<i>Abies grandis</i> ; große Tanne
<i>C. annuum</i>	<i>Capsicum annuum</i> ; Paprika
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>G. arboreum</i>	<i>Gossypium arboreum</i> ; Baumwolle
<i>H. muticus</i>	<i>Hyoscyamus muticus</i> ; Bilsenkraut
<i>N. tabacum</i>	<i>Nicotiana tabacum</i> ; Tabak
<i>M. piperita</i>	<i>Mentha piperita</i> ; Minze

1 Einleitung

Terpene sind eine der größten Klassen pflanzlicher Naturstoffprodukte. Mehr als 30.000 verschiedene Terpene waren bis 1998 identifiziert [BUCKINGHAM 1998], fast die Hälfte werden von Pflanzen synthetisiert. Eine relativ geringe Anzahl von Terpenen ist am Primärmetabolismus der Pflanzen beteiligt. Sie haben dort wichtige Funktionen z.B. als photosynthetische Pigmente (Carotenoide, Phytolseitenkette des Chlorophylls), Elektronentransporter (Seitenkette des Ubiquinons und Plastoquinons), als strukturelle Komponente in Membranen (Phytosterole) oder als Hormone (z.B. Gibberelline). Die Mehrheit der Terpene sind jedoch Produkte des Sekundärmetabolismus: Pflanzeninhaltsstoffe, die nicht am Wachstum oder der Entwicklung der Pflanze beteiligt sind. Es wird jedoch angenommen, dass sie eine ökologische Funktion wie Kommunikation zwischen Pflanzen oder Verteidigung vor Schädlingen besitzen [LANGENHEIM 1994]. So sind z.B. einige Terpene kompetitive Phytotoxine, locken Bestäuber an, haben antibiotische Wirkungen oder vertreiben bzw. vergiften ihre Schädlinge [HARBORNE 1991]. Verschiedene Terpene enthaltende Gemische, wie z.B. ätherische Öle und Harze bilden die Basis einer Menge kommerziell genutzter Produkte z.B. Geschmacks- und Geruchsstoffe wie Menthol, Klebstoffe, Gummi aus dem Polyterpen Kautschuk und synthetische Intermediate [ZINKEL & RUSSELL 1989; DAWSON 1994]. Einige Terpene haben pharmazeutischen Nutzen: z.B. das gegen Malaria wirksame Sesquiterpen Artemisinin [VAN GELDRE *ET AL.* 1997; ROBERT *ET AL.* 2001], das in der Behandlung verschiedener Krebsarten eingesetzte Diterpen Taxol [HOLMES *ET AL.* 1995] oder abgeleitete Triterpene (z.B. aus Digitalisblättern), die herzwirksame Glycoside sind.

Otto Wallach, der für seine grundlegenden Untersuchungen der Terpene 1910 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet wurde, erkannte, dass formal Isopren der Grundbaustein der Terpene ist. Aufbauend auf den Arbeiten von Wallach fand Leopold Ruzicka (Zürich) heraus, dass Isopren ein universeller Baustein für die Synthese vieler Naturstoffe ist, darunter auch der Steroide. Auch er erhielt dafür den Nobelpreis für Chemie (1939). Er postulierte eine biogenetische Isoprenregel nach der alle Terpene aus einer hypothetischen Vorstufe, die er „aktives Isopren“ nannte, synthetisiert werden. Tatsächlich konnte Feodor Lynen in München Isopentenylidiphosphat (IPP) als das gesuchte „aktive Isopren“ identifizieren. Für die Bildung des IPP gibt es in höheren Pflanzen zwei verschiedene Synthesewege. Im Cytosol wird IPP über den Ace-

tat/Mevalonat-Weg hergestellt [BACH 1995, QUERSHI & PORTER 1981; NEWMAN & CHAPPELL 1999]. Daraus werden die Sesquiterpene und Triterpene gebildet. In den Plastiden, dem Ort der Synthese von Mono- Di- und Tetraterpenen wird IPP über den MEP-Weg (oder auch Triose-Phosphat-Weg), benannt nach seinem Intermediat 2-C-Methyl-D-Erythritol-4-Phosphat, synthetisiert [LICHTENTHALER *ET AL.* 1997; EISENREICH *ET AL.* 1998; ROHMER *ET AL.* 1999]. In Abb.1 sind grundlegende Schritte dieser beiden Wege gegenübergestellt.

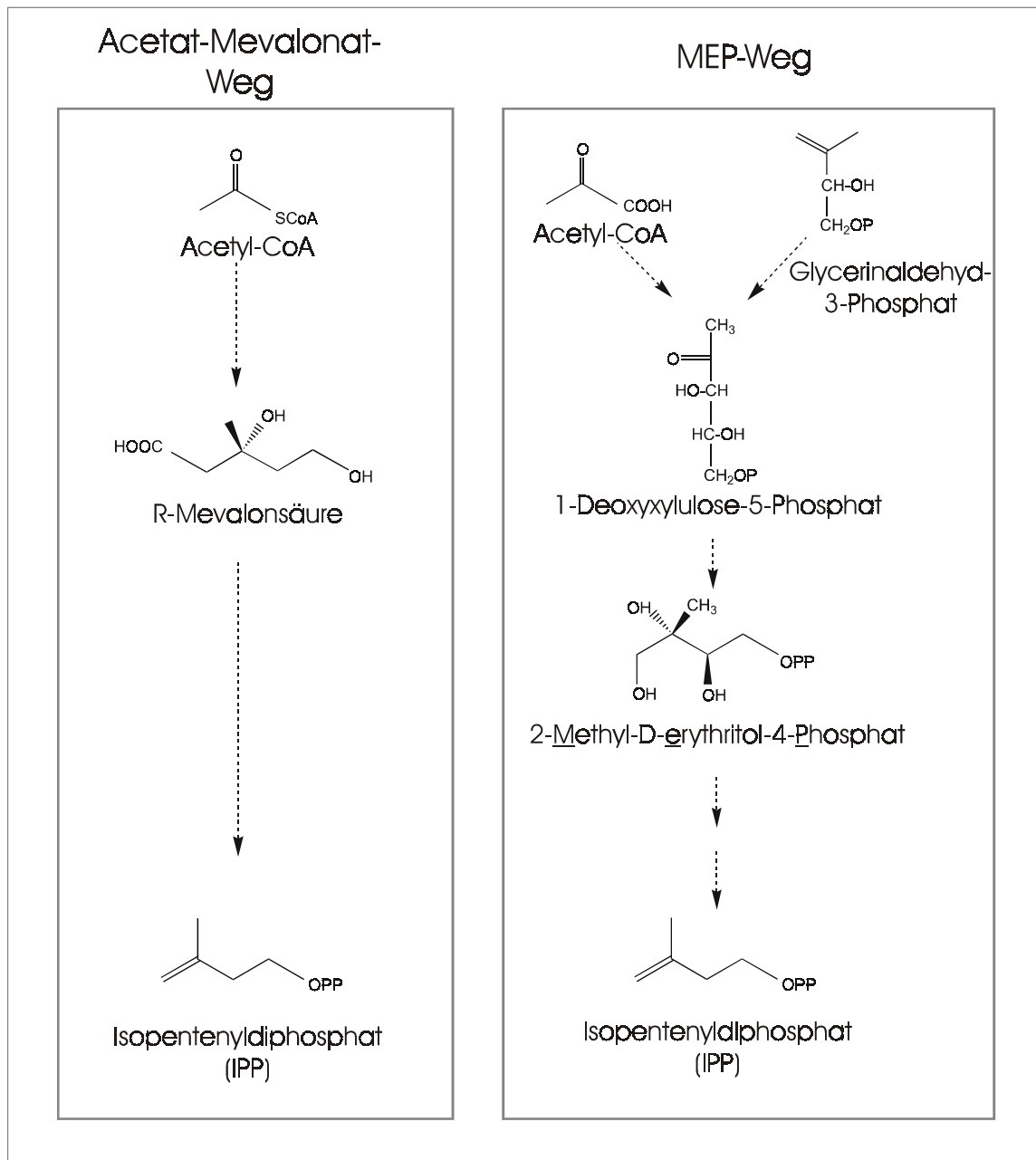


Abb. 1.1 Acetat-Mevalonat-Weg und MEP-Weg

Der Acetat-Mevalonat-Weg ist bereits seit den 50er Jahren bekannt und galt lange als der einzige universelle Biosyntheseweg zur Bildung von Terpenen [ROHMER 1999]. 1993 publizierten ROHMER *ET AL.* erstmals ein hypothetisches Schema des alternativen MEP-Wegs in Bakterien. Zur gleichen Zeit wurde in Zürich von ARIGONI *ET AL.* in *Ginkgo biloba* dieser „neue“ Weg nachgewiesen. Neben diesem gerade nicht typischen Vertreter höherer Pflanzen wurde in weiteren Pflanzen die Existenz dieses Weges nachgewiesen [z.B. KNÖß *ET AL.* 1997]. Der MEP-Weg ist nach den bisherigen Untersuchungen auf Mikroorganismen und Pflanzen beschränkt [KNÖß *ET AL.* 1997; ROHMER 1999]. In tierischen Organismen und Pilzen konnte dieser Weg nicht nachgewiesen werden. Diese Tatsache gibt Ansatzpunkte z.B. für eine neue Generation von Antibiotika oder hinsichtlich der Nutzpflanzen für neue Zielstrukturen zur Entwicklung von Pflanzenwachstumsregulatoren

Die Terpenbiosynthese lässt sich in drei Phasen aufteilen. In der ersten Phase wird IPP gebildet (siehe Abb. 1.1). Nach der Isomerisierung zu Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) folgt die zweite Phase. In dieser Phase kondensiert das DMAPP mit ein, zwei oder drei IPP-Bausteinen zu Geranyldiphosphat (GPP), Farnesyldiphosphat (FPP) bzw. Geranylgeranyldiphosphat (GGPP) (siehe Abb. 1.2). Diese sogenannte Kopf-Schwanz-Kondensation wird von Prenyltransferasen katalysiert [RAMOS-VALDIVIA *ET AL.* 1997; OGURA & KOYAMA 1998; KOYAMA & OGURA 1999]. Die drei azyklischen Prenyldiphosphate sind die Vorstufen einer Vielzahl von Terpenen. FPP und GPP sind daneben auch an der Verankerung von Proteinen der Signaltransduktion beteiligt und wirken somit an Prozessen der Regulation des Zellzyklus und der Steuerung und des Transportes von Vesikeln mit [KNÖß 1999]. Als Vorstufen der verschiedensten Terpene können sie in der dritten Phase unterschiedliche Reaktionen eingehen: Sie können mit sich selber kondensieren, sodass Triterpene (C₃₀) und Tetraterpene (C₄₀), die Vorstufen der Sterole bzw. Carotenoide, entstehen. Oder sie sind an Alkylierungsreaktionen zur Synthese von Prenylseitenketten von z.B. Proteinen beteiligt. Eine weitere Möglichkeit der Reaktion ist die intramolekulare Zyklisierung (siehe Abb. 1.2). Diese Reaktion führt zu den Grundgerüsten der verschiedenen Terpenfamilien: GPP wird zu Monoterpenen, FPP zu Sesquiterpenen und GGPP zu Diterpenen mit verschiedenen Grundgerüsten zyklisiert. Der Hauptanteil der entstehenden Terpene sind zyklische Verbindungen und viele besitzen multiple Ringsysteme, es sind jedoch auch azyklische Terpene wie z.B. die Monoterpene Myrcen und Linalool und das Sesquiterpen β -Farnesen bekannt.

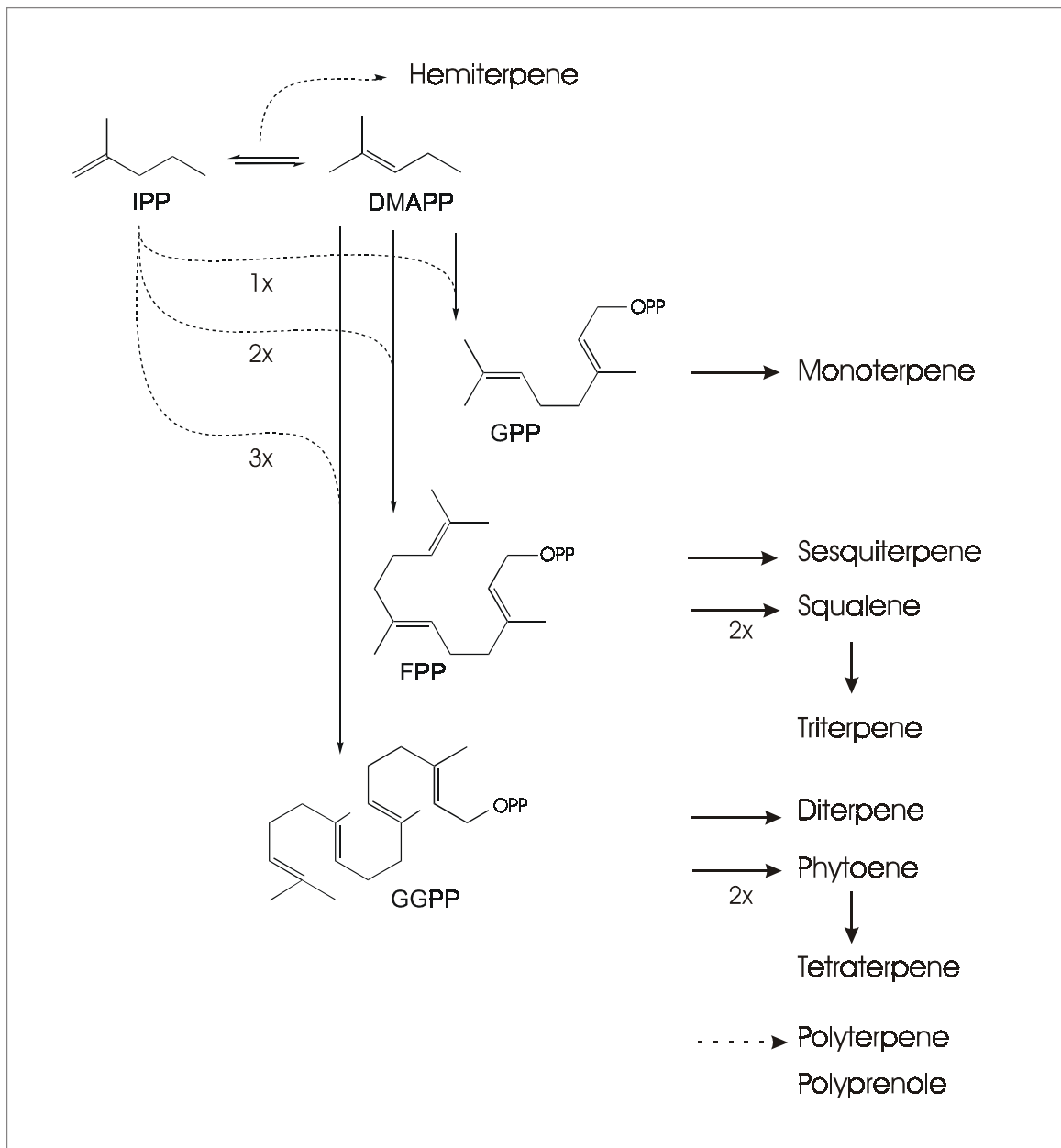


Abb. 1.2: Übersicht über die Biosynthese verschiedener Terpengruppen

IPP: Isopentenylidiphosphat; DMAPP: Dimethylallyldiphosphat; GPP: Geranylidiphosphat; FPP: Farnesylidiphosphat; GGPP: Geranylgeranylidiphosphat; „1x“, „2x“, und „3x“ geben die Anzahl an IPP-Bausteinen an, die durch Kopf-Schwanz-Kondensation angefügt wurden

Die Zyklisierungen werden von Terpensynthasen katalysiert. Die Grundgerüste können im Anschluss an diese Zyklisierung noch eine Vielzahl von Reaktionen (z.B. Oxidation, Reduktion, Isomerisierung) eingehen, sodass eine enorme Vielfalt unterschiedlichster Terpene entsteht. Die Zyklisierung der in allen Pflanzen vorkommenden linearen Vorstufen der Terpene hin zu einer spezifischen, nur noch in wenigen Pflanzen vorkommenden Substanz ist ein wichtiger Schritt in der Biosynthese und ein Ansatzpunkt für Regulationen auf molekularbiologischer und proteinchemischer Ebene. Die

Enzyme, die diesen Schritt katalysieren, werden allgemein als Schlüsselenzyme bezeichnet. Es wird angenommen, dass Terpensynthasen solche Schlüsselenzyme sind. Einige Terpensynthasen der Monoterpene [CROTEAU & WISE 1998; BOHLMANN *ET AL.* 1997], Sesquiterpene [CANE 1998; STEELE *ET AL.* 1998] und Diterpene [WEST 1981; MACMILLAN & BEALE 1998] sind sowohl aus Pflanzen als auch aus mikrobiellen Organismen isoliert und beschrieben worden. Die bisher beschriebenen Terpensynthasen sind sich in ihren physikalischen und chemischen Eigenschaften sehr ähnlich. Sie benötigen z.B. als Cofaktor ein divalentes Metallion und sie katalysieren alle einen elektrophilen Reaktionsmechanismus. Darin gleichen sie auch den Prenyltransferasen [POULTER & RILLING 1981]. Die enorme Bandbreite der möglichen Reaktionen, die das intermediäre Carbokation eingehen kann (Zyklisierungen, Hydrid-Shifts, Umlagerungen und unterschiedliche Abbruchsreaktionen) macht die Terpensynthasen zu einer einzigartigen Klasse von Enzymen.

1.1 MONOTERPENSYNTHASEN

GPP ist in der Regel das natürliche Substrat der Monoterpensynthasen [CROTEAU 1987]. Mehrere Monoterpensynthasen von Angiospermen, Gymnospermen und Bryophyten sind isoliert und charakterisiert worden [ALONSO & CROTEAU 1991; SAVAGE *ET AL.* 1995;]. Sie haben alle ähnliche Eigenschaften: Molekulare Masse zwischen 50 und 100 kDa (entweder Monomere oder Homodimere), ein divalentes Metallion als alleinigen Cofaktor (Mg^{2+} oder Mn^{2+}), den isoelektrischen Punkt (pI) in der Nähe von 5,0 und das pH-Optimum im neutralen Bereich [Bohlmann *et al.* 1998 A]. Die Terpensynthasen der Gymnospermen unterscheiden sich von denen der Angiospermen im zusätzlichen Bedarf eines monovalenten Kations (vorzugsweise K^+), in dem Vorzug von Mn^{2+} (oder Fe^{2+}) vor Mg^{2+} als Cofaktor und durch ein höheres pH-Optimum. Bedingt durch die C2-C3-Doppelbindung kann GPP nicht sofort zyklisieren. CROTEAU & WISE 1998 schlagen daher vor, dass Monoterpensynthasen eine Isomerisierung und eine Zyklisierungsreaktion katalysieren, in dem aus GPP zuerst (3R)- oder (3S)-Linalyl-Diphosphat gebildet wird, das danach eine für eine Zyklisierungsreaktion notwendige Konformation einnehmen kann (siehe Abb. 1.3).

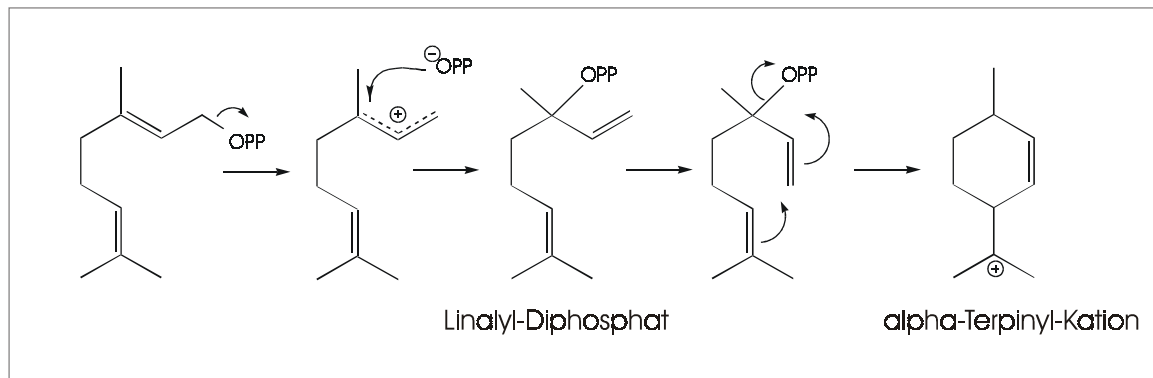


Abb. 1.3: Erste Schritte der Zyklisierungsreaktion von GPP

Das daraus resultierende, immer noch eng an das Enzym gebundene, α -Terpinyl-Kation gilt als Zwischenprodukt für die Bildung einer Vielzahl (je nach Enzym) von Monoterpenen [ROBINSON 2001] (siehe Abb. 1.4).

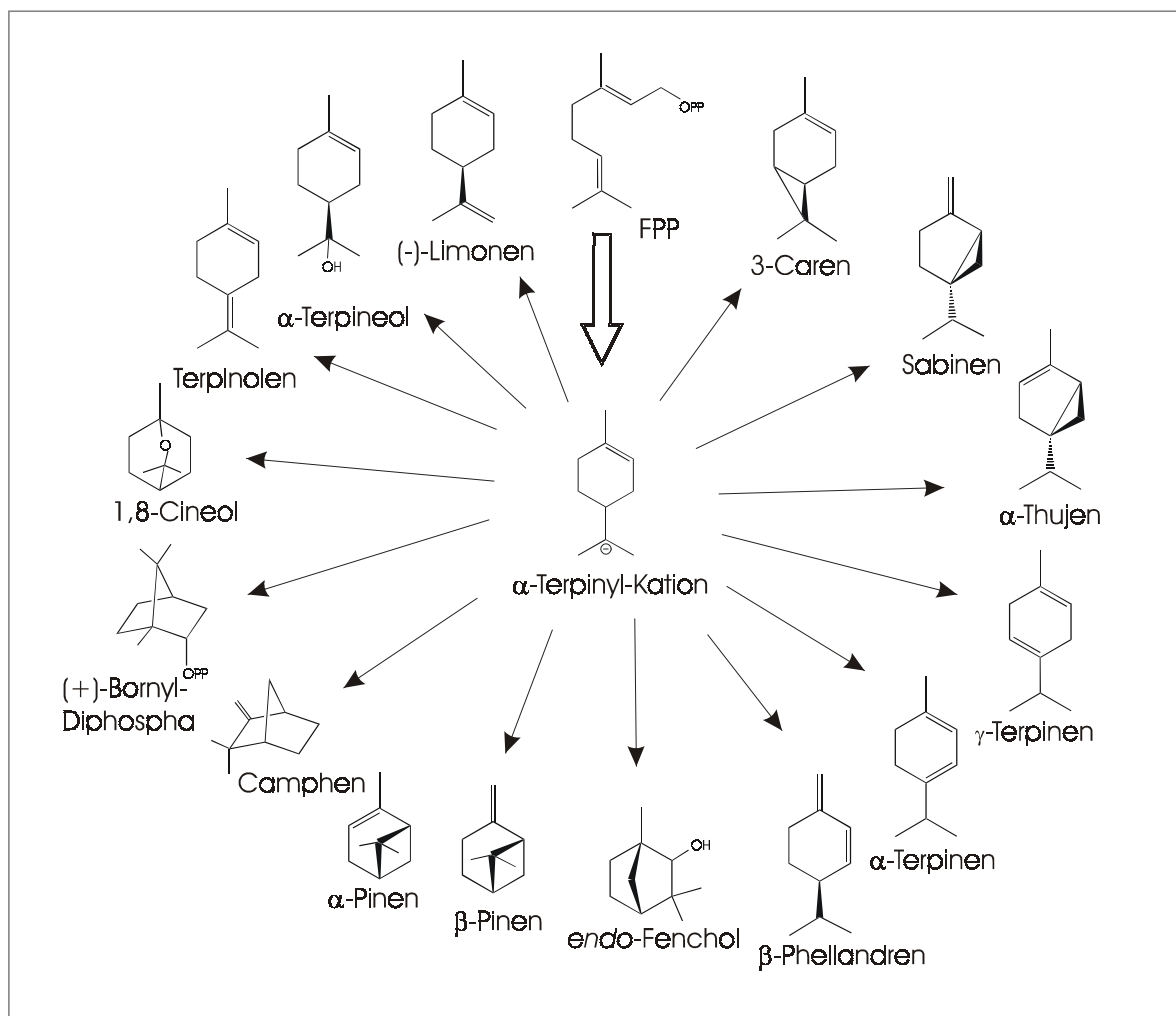


Abb. 1.4: Beispiele von Monoterpenen, die aus dem α -Terpinyl-Kation hervorgehen können

1.2 SESQUITERPENSYNTHASEN

Das Substrat der Sesquiterpensynthasen ist FPP. Im Vergleich zu den Monoterpenen ist die strukturelle Vielfalt aufgrund der fünf zusätzlichen C-Atome des FPP erheblich größer: ca. 7000 verschiedene Sesquiterpene im Vergleich zu ca. 1000 Monoterpenen [CONNOLLY & HILL 1991]). Die Sesquiterpensynthasen benötigen Mg^{2+} als Cofaktor. Einige Zyklisierungen finden unter Retention der Konfiguration an C1 statt, andere unter Inversion. Abb. 1.5 gibt einen Überblick über die möglichen Zyklisierungsmechanismen.

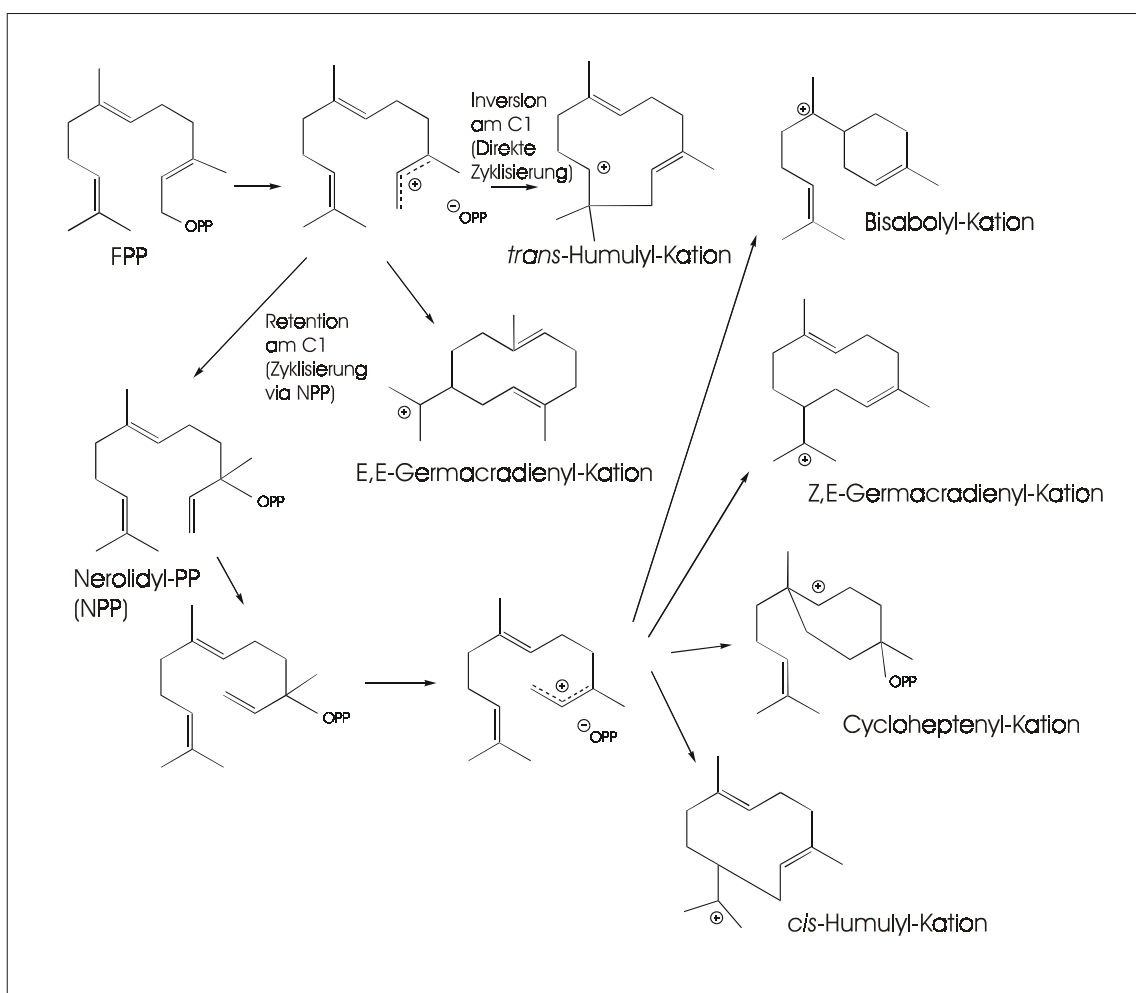


Abb. 1.5 mögliche erste Schritte der Zyklisierungsmechanismen bei Sesquiterpensynthasen

Die Zyklisierung kann auch über interne Additionen an die Doppelbindungen der zyklischen Carbokationen ablaufen, sodass neben diesen Additionen durch Hydrid-Shifts,

Methyl-Wanderungen und Wagner-Meerwein-Umlagerungen eine große Vielfalt an Strukturen entstehen kann (siehe Abb 1.6)

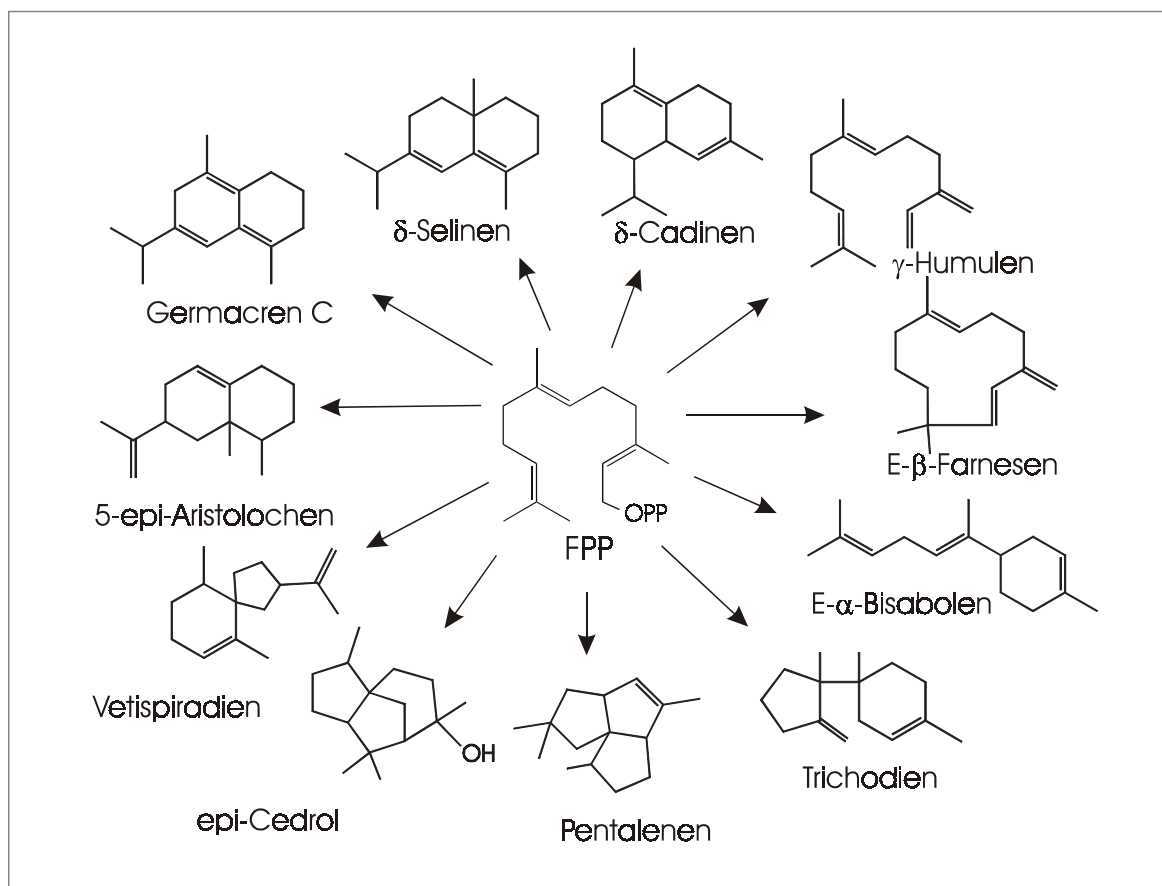


Abb. 1.6: Beispiele von Sesquiterpenen, die aus FPP synthetisiert werden können

Azyklische Sesquiterpene werden aus FPP durch die entsprechenden Sesquiterpensynthasen gebildet [CROCK *ET AL.* 1997]. Die Ähnlichkeiten der Reaktionsmechanismen der plastidiären Monoterpensynthasen und der cytosolischen Sesquiterpensynthasen haben auch ähnliche physikalische und chemische Eigenschaften zur Folge [ALONSO & CROTEAU 1993].

1.3 DITERPENSYNTHASEN

Diterpene sind im Pflanzenreich weit verbreitet. Sie sind häufig in den Harzen von Coniferen [STOFER VOGEL *ET AL.* 1996], in Asteraceen [SEAMAN *ET AL.* 1990], in einigen Lamiaceen [RODRIGUEZ-HAHN *ET AL.* 1996], in der Familie der Euphorbiaceae [SILVEIRA & MCCHESENEY 1994] und in der Familie der Menispermaceae [MAURYA *ET AL.* 1995] zu finden und werden wahrscheinlich, wie die Monoterpene, in den Plastiden synthetisiert [KLEINIG 1989]. Mehr als 3000 verschiedene Diterpenstrukturen

sind bislang gefunden worden und alle stammen von GGPP ab [WEST 1981]. Das bekannteste Diterpen ist Phytol, die azyklische, alkoholische Seitenkette des Chlorophylls. Die meisten Diterpene sind jedoch zyklisch. Für Diterpensynthesen werden zwei völlig unterschiedliche Zyklisierungsmechanismen beschrieben: Die makrozyklischen Diterpene wie z.B. Casben [MAU & WEST 1994] und Taxadien [KOEPP *ET AL.* 1995] werden durch Zyklisierungen analog denen der Mono- und Sesquiterpene synthetisiert. In dem anderen Zyklisierungsmechanismus entsteht Copalyldiphosphat (CDP) als anfängliches Intermediat. Die Reaktion wird durch eine Protonierung der endständigen Doppelbindung des GGPP eingeleitet, gefolgt von zwei intramolekularen Additionen und einer Proton-Eliminierung. Der Diphosphatester CDP kann dann durch Ionisierung und folgende Reaktionen wie z.B. Umlagerungen zu einer Vielzahl von tri- und tetrazyklischen Diterpenen umgewandelt werden (siehe Abb. 1.7)

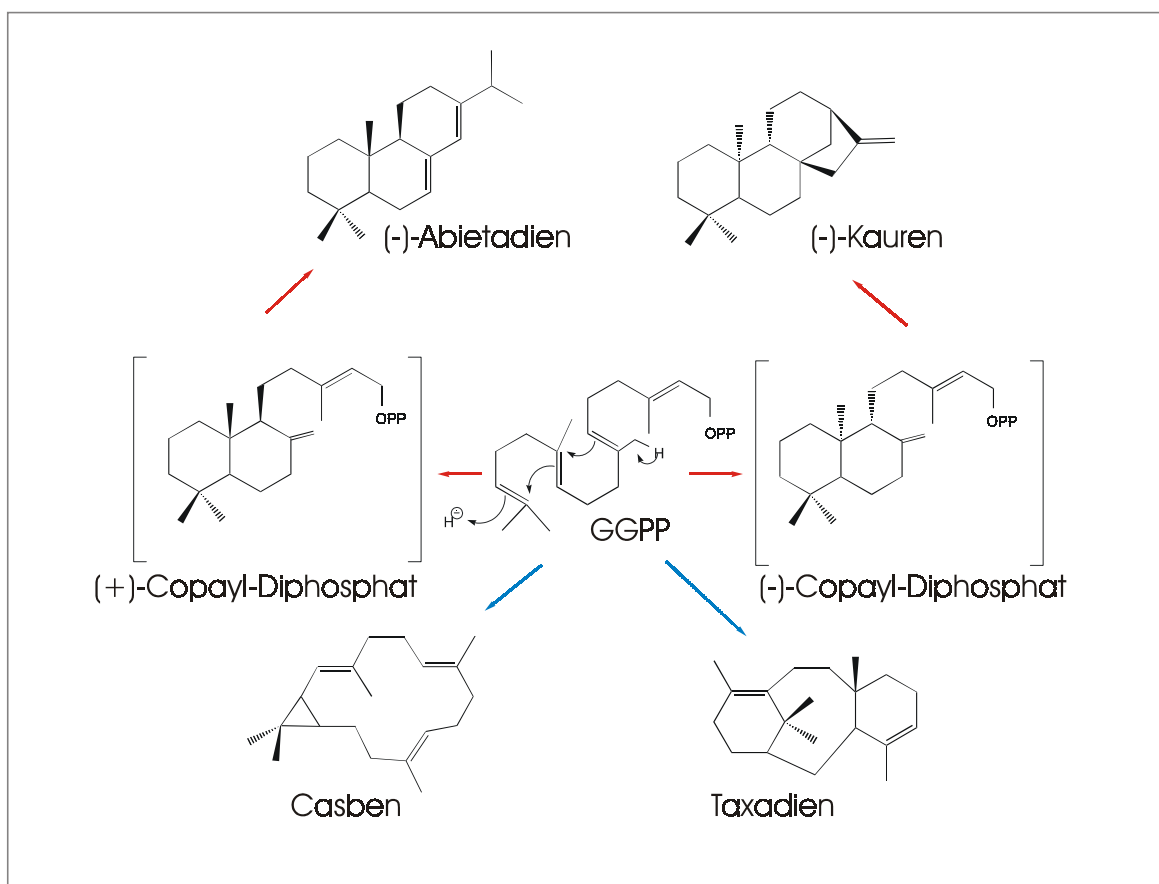


Abb. 1.7: mögliche Zyklisierungsschema der Diterpensynthesen

Die unterschiedlich farbigen Pfeile zeigen die beiden möglichen Zyklisierungsmechanismen an

1.4 UNTERSUCHUNGEN AN TERPENSYNTHASEGENEN

Die ähnlichen physikalischen und chemischen Eigenschaften der Mono-, Sesqui- und Diterpensynthasen sind dadurch bedingt, dass sie ähnliche elektrophile Zyklisierungen katalysieren. Obwohl das aktive Zentrum unterschiedlich sein muss, ist anzunehmen, dass die Art und Weise auf der diese Enzyme Regio- und Stereochemie gewährleisten, sehr ähnlich ist.

Bis jetzt wurde die cDNA von mehr als 30 pflanzlichen Terpensynthasen isoliert. Die Isolierung ist größtenteils schwierig: Viele Terpene werden über einen langen Zeitraum akkumuliert, das bedeutet, dass die Terpensynthasen entweder nur in geringen Mengen in der Pflanze vorliegen oder niedrige Turnover-Raten besitzen (Verhältnis von Substrat zu Umwandlung in das Produkt pro Enzym und pro Zeiteinheit) [CHAPPELL 1995]. Andere Terpensynthasen werden nur in sehr geringen Mengen in speziellen Zelltypen oder Geweben synthetisiert, wie z.B. die Mono-, Sesqui- und Diterpene in Drüschuppen, Harzgängen und Trichomen [GERSHENZON & CROTEAU 1993]. Die mRNA der meisten bis jetzt isolierten und charakterisierten Terpensynthasen wurde daher aus Material gewonnen, in welchem sie vorher angereichert worden war. Neben der Isolierung von speziellen Zellen oder Gewebe kann die mRNA-Transkription mancher Terpensynthasen induziert damit angereichert werden [CHAPPELL 1995]. Auslöser für diese Induktion können z.B. Elicitoren sein. Mit Elicitoren werden Substanzen bezeichnet, welche Verteidigungsreaktionen von Pflanzen stimulieren [EBEL J. 1986, SCHEEL & PARKER 1990]. Sie sind Signalmoleküle, die von pathogenen Organismen abgegeben werden und in der Pflanze die Produktion von Phytoalexinen und anderen Stoffen zu Verteidigung aktivieren [DARVILL & ALBERTSHEIM 1984. Viele dieser Reaktionen basieren auf einer schnellen transkriptionellen Aktivierung spezifischer Gene zur Verteidigung der Pflanze. Die Terpenproduktion wird in manchen Pflanzen auch durch Verwundung induziert oder anderen Stressfaktoren wie z.B. UV-Bestrahlung induziert [STOFER VOGEL *ET AL.* 1996; BACK *ET AL.* 1998].

In den meisten Fällen wurden aus der isolierten mRNA cDNA-Banken hergestellt. Die Sonden, mit denen diese Bibliotheken durchsucht wurden, sind hauptsächlich durch zwei verschiedene Strategien gewonnen worden: Zum einen wurde das entsprechende Protein vorher isoliert, aufgereinigt und ansequenziert, sodass von diesem Enzym entweder Sonden aus Antikörpern oder aus dessen Nukleotidsequenz cDNA-Sonden hergestellt werden konnten. Da jedoch die Aufreinigung und Trennung pflanzlicher Terpensynthasen meist sehr schwierig ist, wurde als zweite Strategie eine

auf Ähnlichkeiten in den Sequenzen der Terpensynthasen basierende Klonierungstechnik entwickelt: Zur Ableitung degenerierter Primer für die PCR wurden Elemente der Consensus-Sequenz aus den Vergleich mehrerer Terpensynthasen verwendet [BOHLMANN *ET AL.* 1997; WILDUNG & CROTEAU 1996]. Bedingt durch die schwierige Aufreinigung der Terpensynthasen liegen bis jetzt auch nur zwei Röntgenstrukturanalysen von Terpensynthasen vor.

1.5 TERPENSYNTHASEN IM VERGLEICH

Verglichen mit den meist nukleophilen Kondensationen im Verlauf anderer Biosynthesewege katalysieren die Terpensynthasen eine eher unübliche elektrophile Reaktion [GERSHENZON & CROTEAU 1993]. Die einzigen anderen Enzyme, die elektrophile Reaktionen katalysieren sind die Prenyltransferasen [RAMOS-VALDIVIA *ET AL.* 1997; OGURA & KOYAMA 1998; KOYAMA & OGURA 1999]. Diese katalysieren die Bildung einer C-C-Bindung zwischen zwei Substratmolekülen. Trotz des analogen Reaktionsmechanismus besteht jedoch fast gar keine Ähnlichkeit zwischen den Prenyltransferasen und den Terpensynthasen.

Die Aminosäuresequenzen der mikrobiellen Terpensynthasen (aus Pilzen und Bakterien) gleichen trotz des selben Reaktionsmechanismus wenig bis überhaupt nicht den Sequenzen pflanzlicher Terpensynthasen [HOHN & BEREMAND 1989; TRAPP *ET AL.* 1998; HOHN 1999; MCGARVEY & CROTEAU 1995]. Innerhalb der Aminosäuresequenzen pflanzlicher Terpensynthasen ist jedoch die Ähnlichkeit der Terpensynthasen ungeachtet struktureller Unterschiede ihrer Produkte relativ groß. BACK UND CHAPPEL (1996) haben z.B. bei der Untersuchung funktionaler Domänen festgestellt, dass eine aus Fragmenten zweier verschiedener Terpensynthasen zusammengesetzte Chimäre in der Lage ist, abhängig von der Position der beiden Fragmente die Produkte beider Terpensynthasen zu synthetisieren. Die Ähnlichkeit der Aminosäuresequenzen von Terpensynthasen ist innerhalb der phylogenetisch älteren Gymnospermen bzw. der innerhalb phylogenetisch jüngeren Angiospermen größer als zwischen diesen beiden Unterabteilungen.

1.6 DIE PFLANZE *MARRUBIUM VULGARE* L. (LAMIACEAE)



Abb. 1.8 *Marrubium vulgare* L., **Andorn** (Anzucht im Garten des Instituts für pharmazeutische Biologie der Universität Bonn)

M. vulgare (Synonyme: gemeiner Andorn, weißer Dorant) ist eine mehrjährige Pflanze mit verholzter Faserwurzel. Die Pflanze hat ihren Ursprung vermutlich in einem Gebiet zwischen Mittelmeer und Zentralasien und wächst auf sonnigen nährstoffreichen Böden, Ödland, Schutt und trockenen Weiden. Mittlerweile ist sie weltweit verbreitet [FROHNE 1987]. Der Stengel ist wie bei allen Pflanzen der Familie der Lamiaceae vierkantig. Er ist stark verzweigt, wirkt durch starke Behaarung filzig weiß und erreicht eine Höhe von 50-60 cm. Die kreuzgegenständigen Blätter sind rundlicheiförmig bis herzförmig, filzig, uneben und am Rand gekerbt. Die kleinen Blüten sind weiß und sitzen in einem Scheinquirl in den Achseln der Blätter (siehe Abb. 1.8). *M. vulgare* wurde bereits in der

Antike bei Dioskurides und in Kräuterbüchern des Mittelalters (z.B. Hildegard von Bingen, Matthiolus) als Heilpflanze erwähnt.

Hauptsächlich wurde das Kraut bereits zu dieser Zeit gegen Husten und als Mittel zur Förderung des Schleimauswurfes verwendet. Ferner wurde *M. vulgare* bei Durchfall, Gelbsucht, Schwächezuständen, Fettleibigkeit, Frauenkrankheiten, Herzrhythmusstörungen, als Abführmittel und äußerlich bei Hautkrankheiten angewendet [HÄNSEL ET AL. 1993]. Heute wird *M. vulgare* noch zur Therapie leichter Erkältungskrankheiten und bei Magen- und Darmbeschwerden wie Völlegefühl und Blähungen angewendet. Die Pflanze weist einen schwach aromatischen Geruch auf und hat einen bitteren, etwas scharfen Geschmack. Der bittere Geschmack kommt wahrscheinlich von der Hauptterpenkomponente, den Furanolabdanditerpen (FLD) Marrubiin. Viele Mitglieder der Pflanzenfamilie der Lamiaceae besitzen als Inhaltsstoffe Terpene. Sie akkumulieren diese häufig flüchtigen Mono- und Sesquiterpene in speziellen Drüsenschuppen. Marrubiin ist dagegen ein nichtflüchtiges Diterpen und ist durch seinen Furanring leicht zu detektieren. *M. vulgare* wurde daher von KNÖB ET AL. als Modellsystem aus-

gewählt, um Untersuchungen des Biosyntheseweges von Diterpenen und den Vergleich des Terpenstoffwechsels und seiner Regulation in differenzierten und undifferenzierten Systemen durchzuführen.

1.7 ZIELSETZUNG

Bis zum Beginn dieser Arbeit waren in der Arbeitsgruppe Knöß verschiedene Aspekte der Terpenbiogenese in *Marrubium vulgare* untersucht worden: Die Akkumulation von ausgewählten Terpenen in verschiedenen Pflanzenteilen und in jungen Pflanzen, die Bildung in differenzierten (Pflanzen aus dem Gewächshaus und Sprosskulturen) und undifferenzierten (Kallus- und Suspensionskulturen) Kultursystemen sowie grundlegende Schritte zu den Bausteinen der Terpenbiosynthese. Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein essentieller Schritt der Terpenbiosynthese untersucht werden- die Zyklisierung allgemein verbreiteter linearer Vorstufen, der Prenyldiphosphate, zu taxonspezifischen Terpengerüsten. Die diese Reaktion katalysierenden Enzyme, die Terpensynthasen, sollten mit molekularbiologischen Methoden untersucht werden.

Bislang waren noch keine molekularbiologischen Arbeiten an *M. vulgare* durchgeführt worden. Aufbauend auf Vorversuche mit aus bekannten Terpensynthasen abgeleiteten degenerierten Primern, sollte in *M. vulgare* gezielt nach Genen dieser Enzymklasse gesucht werden. Nach erfolgreicher Amplifikation von Terpensynthasefragmenten sollte das vollständige Gen einer Terpensynthase isoliert, kloniert und – falls möglich – auch exprimiert werden

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 ORGANISMEN

Pflanze: Untersucht wurde *Marrubium vulgare* aus der Familie der Lamiaceae

Escherichia coli: *E. coli*-Stamm DH5 α MCR wurde für Transformationen mit α -Komplementation verwendet. Zusätzlich kam der Stamm MC1061 zum Einsatz. Die heterologe Expression wurde in Zellen des Stammes BL21(D3) pLysS (Epicurian Coli® BL21 Gold (D3) pLysS Competent Cells [Stratagene]) durchgeführt.

Tab. 2.1: Liste verwendeter *Escherichia coli*- Stämme und deren Eigenschaften

Stamm	Eigenschaften
MC 1061	<i>HsdR mcrB araD139 (ara.leu) 7696 lacY74 galU galK rpsL thi</i> ; Rezipientenstamm für Vermehrung von Plasmid-Vektoren und deren Derivaten [CASADABAN & COHEN, 1980]
DH5 α MCR	<i>F'end A1 hsd 17 (rk⁻ mk⁺) sup E44 thi-1 rec A1 Δ (lacIzyA-argF) u 169 deoR</i> Rezipientenstamm für Vermehrung von Plasmid-Vektoren und deren Derivaten [RALEIGH ET AL., 1989; WOODCOCK ET AL., 1989]
BL21(D3)pLysS	<i>E. coli B F⁻ dcm ompT hsdS (r_B-m_B-) gal (D3) [pLysS Cam^r]</i> Rezipientenstamm für high level Protein-Expression für auf T7-RNA-Polymerase basierende Expressionssysteme (z.B. pET-System)
XL1-Blue MRF'	<i>Δ (mcrA)183 Δ mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F'proAB lacI^rZ Δ M15 Tn10 (Tet^r)]</i> Rezipientenstamm für hemimethylierte λ - cDNA-Bank
XL0LR	<i>Δ (mcrA)183 Δ mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F'proAB lacI^rZΔM15 Tn10(Tet^r)] Su⁻ (nonsuppressing) λ^r (lambda resistant)</i>

2.2 PLASMIDE

Die nachfolgende Tabelle enthält die in dieser Arbeit verwendeten und hergestellten Plasmide. Der Vektor ist nur aufgeführt, sofern es sich nicht um das Plasmid pGem®-T-Easy (Promega) handelt.

Tab. 2.2: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide

Plasmid	Charakteristika	Pri-mer/Enzyme
pAZ3	505 bp genomische DNA aus <i>M. vulgare</i>	WKA - WKC
pAZ5	801 bp genomische DNA aus <i>M. vulgare</i> (inverse PCR)	I2 – IR1
pAZ7	330 bp genomische DNA der “RuBisCO“ aus <i>M.v.</i>	R1 – R2
pAZ7a	291 bp cDNA der “RuBisCO“ aus <i>M.vulgare</i>	R1 – R2
pAZ9	2,151 kb genomische DNA aus <i>M. vulgare</i> (Genome Walker™) DraI-Bank	534 – AP1
pAZ9a	1,175 kb Subklon von pAZ9 aus <i>M. vulgare</i> (Genome Walker™)	Acc I
pAZ9b	760 bp Subklon von pAZ9 aus <i>M. vulgare</i> (Genome Walker™)	Hinc II
pAZ9c	415 bp Subklon von pAZ9 aus <i>M. vulgare</i> (Genome Walker™)	Hinc II
pAZ9d	450 bp Subklon von pAZ9 aus <i>M. vulgare</i> (Genome Walker™)	Hind III
pAZ9e	484 bp Subklon von pAZ9 aus <i>M. vulgare</i> (Genome Walker™)	Spe I
pAZ9f	1,175 kb Subklon von pAZ9 aus <i>M. vulgare</i> (Genome Walker™)	Sal I
pAZ10	1028 bp genomische DNA aus <i>M. vulgare</i> (Genome Walker™) HincII-Bank	534 – AP2
pAZ11	750 bp genomische DNA aus <i>M. vulgare</i> (Genome Walker™)	AP1 – IR1
pAZ13	453 bp cDNA aus <i>M.vulgare</i>	1252 – 2643c
pAZ14	757 bp cDNA aus <i>M.vulgare</i>	798 – 2643c
pAZ16	953 bp cDNA aus <i>M. vulgare</i> (RACE)	1252 - NUP
pAZ18	561 bp cDNA aus <i>M. vulgare</i> (RACE)	1980 - NUP
pAZ22	426 bp cDNA aus <i>M. vulgare</i> (RACE)	2623 - NUP
pAZ23	563 bp cDNA aus <i>M.vulgare</i>	560 – 320c
pAZ25	344 bp cDNA aus <i>M.vulgare</i>	798 – 320c
pAZ26	730bp cDNA aus <i>M. vulgare</i> (RACE)	NUP – 265c
pAZ29	605 bp cDNA aus <i>M. vulgare</i> (RACE)	NUP – 102c
pAZ31	1,6 kb genomische DNA aus <i>M. vulgare</i> (Genome Walker™)	1.PCR – AP1
pAZ41	1652 bp in pASK IBA 7 insetierte ORF der vollständigen cDNA der Selinensynthese aus <i>M. vulgare</i>	5'Eco31I – 3'Eco31I
pASK IBA 7	Expressionsvektor mit Strep Tag	
pGem-TEasy	3 kb Klonierungsvektor mit “A-Überhang“	
pBK-CMV	4,5 kb; Phagemid-Vektor für Expression, Neo ^r -Kan ^r	
pET 9a	4,3 kb Expressionsvektor	
ZAPExpress™ Vektor	38.94 kb; dient der Klonierung von bis zu 12 kb großen Fragmenten	

2.3 OLIGONUKLEOTIDE

Die in Tabelle Tab. 2.3 aufgeführten Oligonukleotide wurden für Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) und Sequenzierungen eingesetzt.

Primer die durch ein in Klammern gesetztes "Cy5" gekennzeichnet sind, enthalten eine Markierung mit dem Fluoreszenz-Farbstoff Cy5™. In Klammern aufgeführte Basen zeigen an, dass diese Primer degeneriert sind. Ein kleines c im Namen eines Primers zeichnet die komplementäre Orientierung zur cDNA-Sequenz aus.

Tab. 2.3: Liste der verwendeten Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz
102c	5'-GAGTTGGGTGTCTCCGTGTATTCTC-3'
265c	5'-GTTGTTCCCTCCTCGTAGATGGAGATG-3'
1252	5'-CTTGAGCTTCTTACCGAGGCAATG-3'
1980	5'-TGGAGGCCAAGTGGTTCATTGAG-3'
2643c	5'-ACTCTATTCCAGTAGCAGGCTGAC-3'
534	5'-ATGTACCATGAGCCGCAGTACTCC-3'
560	5'-ATGGGAATGGAAAATTCCAGGAAAG-3'
320c	5'-ATTGCCTCGGTAAGAAGCTCAAGT-3'
1. PCR	5'-CAGTGGTAACAACGCAGAGTACG-3'
1.PCRc	5'-GTCCTAAGACACGATCATATGTCAGA-3'
3'-Race cDNA Synth. Primer	5'-AAG CAG TGG TAA CAA CGC AGA GTA C(T)30N-1N-3'
3' <i>Bam</i> HI	5'-GGATCCTTAAATGTCAATTTGATCGACGAAC-3'
3' <i>Eco</i> 31I	5'-ATGGTAGGTCTCATATCAAATGTCAATTTGATCGACGAACAAAG-3'
5'-Race cDNA Synthese Pri- mer	5'-(T)25N-1N-3'
5' <i>Eco</i> 31I	5'-ATGGTAGGTCTCAGCGCATGGCTGCACAAATCGAAACTCG-3'
5' <i>Nde</i> I	5'-CATATGGCTGCACAAATCGAAACTCG-3'
798	5'-CATCTCCATCTACGAGGAGGAACA-3'
A2	5'-GGCTTGCATTTTGGGCTTCCAAG-3'
AP1; GW	5'-GCC CTA TAG TGA GTC GTA TTA C-3'
AP2; GW	5'-ACT ATA GGG CAC GCG TAA T-3'
AR3	5'-GTCCAATTCTTTCCACCACCT-3'

AR4	5'-GGAGTACTGCGGCTCATGGTACATTC-3'
<i>Eco</i> RI- Adapter; cDNA Synth.	5'-OH-AA TTC GGC ACG AG-3' <i>Eco</i> RI 3'-GCC GTG CTCp-5'
I2	5'-CCTCGAGAGTTCGCAGAGCTC-3'
IR1	5'-CCTCGAGAGTTCGCAGAGCTC-3'
NUP, RACE	5'-AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGT-3'
pGEM Sp6	5'-CCA TAT GGT CGA CCT GCA GGC-3'
pGEM T7	5'-GAC GTC GCA TGC TCC CGG CC-3'
R1	5'-CA(AG) TG(CT) ATG CA(AG) GT(GT) TGG CC-3'
R2	5'-(AT)GG (AC)AC (CT)TT CCA CAT AGT CCA (AG)TA-3'
RP (Cy5)	5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3'
SMART II Oligonukleotid	5'-AAG CAG TGG TAA CAA CGC AGA GTA CGC GGG-3'
UP (Cy5)	5'-CGA CGT TGT AAA ACG ACG GCC AGT-3'
UPM; RACE	5'-CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG CAA GCA GTG GTA ACA AAC GCA GAG T-3'
WKA	5'-G GA(TC) GA(GA) (GA)A(TG) GG(CT) AA(GA) TTC AA(AG) G-3'
WKC	5'-CAT ANG CA(TA) A(TA)G T(AG)T CAT C-3'

AP: Adapter-Primer; RP: Reverse-Primer; UP: Universal-Primer; UPM: Universal-Primer-Mix; NUP: Nested Universal-Primer; pGEM T7/Sp6: für den Vektor pGEM®-T-Easy hergestellte Primer, T7 bzw. Sp6 gibt die Orientierung des Primers entsprechend der Syntheserichtung der jeweiligen Polymerase an; Seq.: Sequenzierung

Die Oligonukleotide, bis auf diejenigen, die zu speziellen Kits gehören, wurden von der Firma MWG-Biotech GmbH oder der Firma Sigma synthetisiert.

2.4 CHEMIKALIEN

Die verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Roche, LKB-Parmacia, Merk, Serva und Sigma in der Qualitätsstufe: für die Analyse (p. A. Qualität) bezogen. Die für die Gaschromatographie benötigten Gase wurden von der Firma Linde geliefert.

2.5 ENZYME

Die Enzyme, die für die experimentellen Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden, sind in Tab.2.4 aufgeführt

Tab. 2.4: Liste der verwendeten Enzyme

Enzym	Hersteller
Alkalische Phosphatase	Gibco BRL
AMV- Reverse Transkriptase	Promega / Sigma
DNaseI, RNase-frei	Roche
Exonuclease III	Promega
M-MLV-Reverse Transkriptase	Promega
<i>Pfu</i> -Turbo-DNA-Polymerase	Promega
Proteinase K	Boehringer Ingelheim
Restriktionsendonukleasen	Roche / Gibco BRL / Fermentas
Ribonuklease A (RNase A)	Roche
Ribonuklease H (RNase H)	Roche
Ribonuklease Inhibitor RNasin	Promega
Superscript TM II Reverse Transkriptase	Gibco BRL
T4-DNA-Ligase	Gibco BRL
T7-DNA-Polymerase	Parmacia Biotech
T7-RNA-Polymerase	Promega
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Promega

2.6 KITS

Die im Rahmen dieser Arbeit aufgeführten Kits sind in Tab.2.5 aufgeführt.

Tab. 2.5: Liste der verwendeten Kits

Kit	Hersteller
2x Rapid Ligation System	Promega
BigDye RR Terminator Cycle Sequencing Kit	ABI Prism™ (Perkin Elmer)
Cy5 AutoRead™ Sequencing Kit	Pharmacia Biotech
DIG-High Prime	Roche
GFX™ Micro Plasmid Prep Kit	Amersham Pharmacia Biotech
GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit	Amersham Pharmacia Biotech
mRNA Oligotex Mini Kit	Qiagen
Plant RNA Extraction Kit	Qiagen
minElute Kit	Qiagen
SMART™ RACE cDNA Amplification Kit	Clontech
T7 Sequencing™ Kit	Pharmacia Biotech
Enhanced Avian RT-PCR-Kit	Sigma
Universal Genome Walker™ Kit	Clontech
ZAP Express™ cDNA Synthesis Kit und ZAP Express™ cDNA Gigapack® III Gold Cloning Kit	Stratagene

2.7 GERÄTE

In dieser Arbeit verwendete Geräte sind in Tab. 2.6 zusammengefasst.

Tab. 2.6: Liste der verwendeten Geräte

Gerät	Hersteller	Modell
Chemilumineszenz-Detektions-Apparatur	Roche Raytest	Lumi-Imager Workstation LAS 1000
PCR-Gerät	Perkin Elmer	GeneAmp 9700
Protein Blot-Kammern	Biometra	Fastblot B44
	Thermo-DUX GmbH	Thermocycler Progene
Sequenzierungsgeräte	Pharmacia Biotech	ALF-express™ DNA Sequenzer
	Perkin Elmer	ABI Prism 310
Zentrifugen	Beckmann	L8-70 M
	Du-Pont	Sorvall RC-5B
	Eppendorf	5415 C und ZK 380
	Heraeus	Biofuge 22 R Megafuge 1.0
Gas-Chromatograph	Hewlett-Packard	6890 Gas-Chromatograph
Radioaktivitätsdetektor	Raytest	Raga 92
Massenspektrometer	Hewlett-Packard	5973 Quadrupole-type mass selective Detektor

2.8 KULTUR VON *ESCHERICHIA COLI*

2.8.1 Nährmedien

LB-Flüssigmedium: 25 g/l Luria Broth Base (Gibco)

LB-Agar: 32 g/l Luria Agar (Gibco)

2.8.1.1 Anzucht

Agarplatten mit *E. coli* werden über Nacht im Brutschrank bei 37°C angezogen.

Für eine Plasmidminipräparation wird eine einzelne Bakterien-Kolonie von einer Platte in 3 ml LB-Flüssigmedium mit dem jeweiligen Antibiotikum angeimpft. Die Zellen wachsen bei 37°C unter permanentem Schütteln mit 130 rpm.

Je nach Resistenz des transformierten Plasmids werden zur Selektion plasmidtragender *E. coli*-Zellen Antibiotika in folgenden Konzentrationen zugegeben:

Ampicillin	100 µg/ml
Kanamycin	50 µg/ml
Tetracyclin	10 µg/ml

2.8.1.2 Bestimmung der Zelldichte

Die Zelldichte einer *E. coli*-Kultur wird mit Hilfe der Extinktion bei einer Wellenlänge von 600 nm [SAMBROOK *ET AL.* 1989] geschätzt. Eine optische Dichte von 1 bei 600 nm entspricht dabei etwa einer Zelldichte von 8×10^8 Zellen/ml.

2.9 DNA-ISOLIERUNG

2.9.1 Genomische DNA aus *M.vulgare*

Blattmaterial wird unter Zugabe von flüssigem Stickstoff im Mörser pulverisiert, das Pulver in 15 ml Elutionspuffer suspendiert und die Suspension mit Elutionspuffer auf 25 ml aufgefüllt. Nach Zugabe von 7 µl Mercaptoethanol und 1 ml 20%igem SDS wird die Suspension 20 min lang in einem auf 65°C temperierten Wasserbad unter langsamen Schütteln inkubiert und bei 4 °C auf Eis gekühlt. Anschließend wird der Ansatz mit 5 ml Kaliumacetat (5 M) versetzt und 45 min lang bei 4 °C auf Eis gekühlt. Der gesamte Ansatz wird 15 min lang bei 4°C und 5000 x g zentrifugiert, der Überstand über Mull filtriert und das Filtrat erneut zentrifugiert. Der Überstand wird mit 0,7 Vol % Isopropanol versetzt. Nach 5 min, in denen sich eine Interphase bildet, werden die Phasen solange vorsichtig vermischt, bis die DNA ausfällt. Diese wird mit einem Glashaken vorsichtig abgenommen, getrocknet und in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß in Wasser gelöst. Nachdem 5 µl RNase zugegeben worden sind wird die Lösung 1 Stunde lang bei 37°C inkubiert. Anschließend wird mehrmals phenolisiert. Dazu wird die Lösung mit der Hälfte ihres Volumen Phenol versetzt, vorsichtig die Phasen vermischt und anschließend bei 3000 x g 5 min lang zentrifugiert. Dieser Vorgang wird mit der abgenommenen wässrigen Phase nochmals wiederholt. Die wässrige Phase wird in Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) gewaschen und der Über-

stand unter Zugabe von 1/10 Natriumacetat (3 M; pH 5,3) und 2,5 Vol % Ethanol wie nach der Mullfiltration gefällt (s.o.). Die gefällte DNA wird mit 70%igen Ethanol gewaschen und anschließend in Wasser gelöst.

Extraktionspuffer:	100 mM	TRIS-HCl
	10 mM	EDTA
	150 mM	NaCl

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

2.9.2.1 Alkalische Lyse nach BIRNBOIM & DOLY (1979)

E. coli-Zellen werden durch Behandlung mit Natriumhydroxid lysiert. Die freigesetzte Plasmid-DNA wird durch Phenol-Chlorophorm-Extraktion von Proteinen und membranassoziierter chromosomaler Bakterien-DNA gereinigt.

2.9.2.2 Schnellpräparation

Diese Methode ist von der Plasmid-Präparation durch S-Lyse [HOLMES & QUIGLEY 1981] abgeleitet. Sie ermöglicht ein schnelles Durchmustern vieler Klone nach positiv verlaufenden Transformationen. Diese Methode liefert allerdings eine DNA, die aufgrund von nicht abgetrennten Proteine unsauber ist und somit nicht geeignet für weitere Versuche wie z.B. Sequenzierungen, Restriktionsanalysen oder als Sonden eingesetzt werden kann.

Jeweils 1 ml LB-Flüssigmedium mit Antibiotikum wird in einem Eppendorf-Gefäß mit Bakterien-Kolonien inokuliert und unter Schütteln bei 37°C kultiviert. Nach 8 h werden die Zellen durch Zentrifugation bei 3000 x g geerntet werden. In 25 µl SST-Puffer gründlich resuspendiert werden sie unter wiederholtem Durchmischen bei 37°C 30 min lang inkubiert. Die Suspension wird 1 min lang bei 99°C erhitzt und anschließend die Zelltrümmer und denaturierten Proteine durch Zentrifugation 10000 x g sedimentiert. 10-15 µl des Überstandes werden zur Restriktion eingesetzt und elektro-phoretisch in einem Agarosegel aufgetrennt.

STT-Puffer:	50	mM	Tris-HCl, pH 8,0
	175	mM	Saccharose
	5	%	Triton X 100 (v/v)

2.9.2.3 GFX™ Micro Plasmid Prep Kit

Plasmid-DNA wird entsprechend der Vorschrift des Herstellers mit dem GFX™ Mikro Plasmid Prep Kit der Firma Amersham Pharmacia isoliert. Sie kombiniert die alkalische Lyse der Bakterienzellen mit der Aufreinigung der Plasmid-DNA durch Bindung an eine in einer Säule befindliche Kieselgel-Membran. Die erhaltene DNA kann anschließend für weitere Experimente einschließlich der Sequenzierung eingesetzt werden.

2.10 DNA-ANALYSE

2.10.1 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die DNA-Konzentration einer Probe wird entweder durch Vergleich mit dem DNA-Längenstandard (1kb - Leiter, New England Biolabs) auf dem Agarosegel abgeschätzt oder photometrisch bestimmt. Bei der photometrischen Messung wird die Absorption der verdünnten DNA bei 260 und 280 nm gegen Wasser als Referenz bestimmt. Dabei entspricht eine Abs_{260} von 1,0 etwa einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Der Quotient A_{260}/A_{280} lässt Rückschlüsse auf die Reinheit der Nukleinsäure zu. Sind keine Verunreinigungen vorhanden, liegt der Wert zwischen 1,8 und 2. Werte <1,8 deuten auf eine Kontamination mit Phenol hin, da deren aromatische Struktur auch im 280 nm Bereich absorbiert. Ist der Wert größer als 2 enthält der Ansatz wahrscheinlich RNA als Verunreinigung.

2.10.2 Restriktion der DNA

Zum enzymatischen Verdau der DNA werden Restriktionsendonukleasen der Firmen Gibco BRL, Fermentas und Roche eingesetzt. Die Restriktionen werden in den von den Herstellern mitgelieferten 10x Puffern durchgeführt. Plasmid-DNA wird mit 1 bis 2 U Enzym/µg DNA mindestens 1 h lang, genomische DNA mit bis zu 5 U Enzym/µg DNA mindestens 3 h lang enzymatisch geschnitten.

2.10.3 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente werden aufgrund ihrer Größe in 1% TAE-Agaroselgelen (Flachbrett-Elektrophorese) elektrophoretisch aufgetrennt. Die DNA wird detektiert, in dem der Agarose-Lösung Ethidiumbromid mit einer Endkonzentration von 0,5 µg/µl zugesetzt

wird. Ethidiumbromid interkaliert in die DNA-Helix und ermöglicht ihre Detektion auf einem UV-Licht-Transilluminator.

Zum Größenvergleich wird eine 1 kb λ -DNA-Leiter (Fermentas) als Marker eingesetzt.

TAE-Puffer:	40	mM	Tris
	1	mM	Natrium-Acetat
	0,1	mM	EDTA
		ad	H ₂ O pH 7,8

2.10.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die selektive Adsorption von DNA an Glasperlen in Anwesenheit chaotroper Agenzien [VOGELSTEIN & GILLESPIE 1979] ist die Grundlage des GFX™ Gel Band Purification Kits und bietet die Möglichkeit, die DNA einzelner Banden aus einem Agarosegel zu extrahieren. Sie wird bei der Herstellung von Subklonen, Klonierung spezifischer Banden aus einer PCR, die mehrere Amplifikate liefert, sowie bei der Herstellung von Random-markierten DNA-Sonden angewandt (siehe 2.16.1.1).

2.11 KLONIERUNG

2.11.1 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

SAMBROOK *ET AL.* (1989) beschrieben die Induktion der Kompetenz von *E. coli*-Zellen durch CaCl₂. Die Zugabe dieses Salzes in der logarithmischen Wachstumsphase erhöht die Zellpermeabilität für Fremd-DNA und inaktiviert wahrscheinlich membranassoziierte Nukleasen. Die kompetenten Zellen werden in einer CaCl₂-Glycerin-Lösung in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.11.2 Ligation von DNA-Fragmenten

Insert und linearisiertes Plasmid werden im Mengenverhältnis von etwa 5:1 zu 5 µl 2x Rapid Buffer und einer entsprechenden Menge Wasser (auf 9 µl) gegeben und durch 1 µl T4-DNA-Ligase zusammengefügt. Bei Verwendung des 2x Rapid Buffers (Promega) ist die Reaktion schon nach 1-2 h Inkubation bei Raumtemperatur abgeschlossen. Ist das Insert größer als 1,5 kb oder steht nur wenig DNA für die Ligation zur Verfügung, wird der Ansatz zur Erhöhung der Effizienz bei 4°C über 18 h lang inkubiert.

2.11.3 Transformation von *E. coli*-Zellen

Die bei -80°C gelagerten kompetenten *E. coli*-Zellen werden langsam auf Eis aufgetaut, mit geringen Mengen des fremden Plasmids oder mit dem vollständigen Ligationsansatz (siehe 2.11.2) versetzt und der Ansatz vorsichtig gemischt. Zunächst wird der Ansatz 30 min lang auf Eis aufbewahrt. In dieser Zeit heften sich die Fremdplasmide an die Zellwand. Durch eine 1-minütige Hitzebehandlung bei 42°C im Wasserbad werden die Zellwände für die Plasmide durchlässig. Anschließend werden 700 μl LB-Flüssigmedium hinzugefügt und der Ansatz 45 min lang bei 37°C inkubiert. Die vektortragenden Zellen werden durch Ausstreichen und Kultivierung der Ansätze auf antibiotikahaltigen Agarplatten selektiert.

Der *E. coli*-Stamm DH5 α bietet in Kombination mit einem entsprechenden Vektor die Möglichkeit der α -Komplementation. Hierfür werden dem Transformations-Ansatz vor dem Ausstreichen 1mM IPTG als Induktor und 0,02% X-Gal als Substrat zugesetzt. Inserttragende Kolonien erscheinen später auf der Platte weiß, da das aufgenommene Insert die Untereinheit (UE) der β -Galaktosidase zerteilt. Die Zellen, die einen religierten Vektor aufgenommen haben, färben sich, da die intakte Untereinheit der β -Galaktosidase aus Vektor und Zellgenom zusammen ein funktionsfähiges Enzym bilden, blau. Dieses Enzym spaltet die chromophore Indolgruppe des X-Galaktosids ab.

2.12 POLYMERASE-KETTEN-REAKTION (PCR)

Die von MULLIS entwickelte Methode der Polymerase-Ketten-Reaktion ermöglicht mit Hilfe einer thermostabilen *Taq*-Polymerase (*Thermus aquaticus*) eine spezifische Amplifikation von durch zwei Primer flankierten DNA-Fragmenten. Die PCR besteht aus einer Abfolge von drei Schritten, die mehrfach wiederholt werden. Zunächst wird die doppelsträngige DNA bei $94-96^{\circ}\text{C}$ in zwei Einzelstränge zerlegt (Denaturierung), so dass nach Absenkung der Temperatur kurze, einzelsträngige DNA-Oligonukleotide (Primer) spezifisch an die DNA binden können (Annealing). Während eines dritten Schrittes synthetisiert die *Taq*-Polymerase ausgehend von den Primern jeweils einen vollständigen komplementären DNA-Strang (Extension). Die zyklische Wiederholung dieser drei Schritte bewirkt eine exponentielle Amplifikation der Ziel-DNA, da auch die neu synthetisierte DNA jeweils im nächsten Zyklus als Template zur Verfügung steht.

Mit Hilfe der PCR können auch unbekannte DNA-Abschnitte aus genomischer DNA amplifiziert werden [MCPHERSON *ET AL.* 1991], solange flankierende Sequenzen bekannt sind, von denen Primer abgeleitet werden können.

PCR-Ansatz		Taq-Polymerasepuffer		
DNA-Template	1-5 ng	Tris-HCL	10	mM
Taq-Polymerase-Puffer (10 x)	5 µl	KCl	50	mM
dNTP (je 100 µM)	1 µl	MgCl ₂	2,5	mM
Hin- und Rückprimer (je 0,25 µM)	1 µl			
Taq-Polymerase (Clontech)	2,5 U			
H ₂ O auf 50 ml				

Standard-PCR-Programm:

5 min	95°C	} 25 x	Denaturierung, meist vor Zugabe der Polymerase
10 sec	95°C		Denaturierung
10-20 sec	55-72°C		Annealing; Temperatur wird der Schmelztemperatur der Primer angepasst
0,5 - 2 min	72°C		Extension, die Dauer ist von der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments und der Aktivität des Enzyms abhängig
3 min	72°C		finale Extension, erlaubt die Vervollständigung noch unvollständiger DNA-Stränge durch die <i>Taq</i> -Polymerase
4 min	∞		Beendigung der Reaktion

5 µl des Ansatzes werden nach Beendigung der PCR in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und somit das Amplifikat identifiziert.

2.12.1 PCR Kolonie-Screening

Die PCR ist die bevorzugte Methode für das schnelle Screening von Bakterien-Kolonien, da sie die Durchmusterung sehr vieler Klone, ohne dass diese vorher angeimpft und angezogen werden müssen, ermöglicht.

Eine Bakterien-Kolonie wird mit Hilfe eines sterilen Holzstäbchens von einer Agarplattenkultur genommen und in einen 50 ml-PCR-Ansatz überführt. Zum Erhalt der Zellen kann entweder die Ausgangskolonie gekennzeichnet oder das Holzstäbchen

anschließend zum Animpfen einer Flüssigkultur oder einer Masterplatte verwendet werden.

Die Zellen werden während des ersten Schritts der PCR aufgeschlossen, so dass die enthaltenen Plasmide für die Primer zugänglich werden. Bei nicht genauer bekannten Inserts werden Vektor-spezifische Primer (RP und UP oder pGEM T7 und pGEM Sp6) gewählt, ansonsten aber insertspezifische Primerkombinationen bevorzugt.

PCR-Programm:	94°C	10 min	
	94°C	30 sec	} 35 x
	55°C	30 sec	
	72°C	0,5-2 min	
	72°C	2 min	
	4°C	∞	

2.12.2 Banden-Reamplifizierung

Oftmals sind auf dem Agarosegel einer PCR-Reaktion wider Erwarten mehrere Banden bis hin zu einem „Schmier“ von sehr vielen Banden zu erkennen, welche das gewünschte Produkt überlagern. Dies kann eintreten, wenn die optimalen Bedingungen für eine PCR nicht ausgetestet sind, ein Primer unspezifisch bindet oder die Reaktion mit nur einem spezifischen und einem unspezifischen Primer durchgeführt wird. In diesen Fällen kann die DNA einer einzelnen Bande spezifisch angereichert werden, indem aus dieser Bande ein Agarosegel-Zylinder ausgestanzt wird. Dieses Gelstück wird in 10 µl Wasser in einem Eppendorf-Gefäß bei 70-80°C gelöst und die Agarosereste anschließend kurz bei 14.000 x g zentrifugiert. 5 µl dieses Ansatzes werden in einer nachfolgenden PCR mit der gleichen Primerkombination eingesetzt, die für die primäre PCR gewählt wurde. Das Ergebnis ist ein einzelnes Amplifikat, welches anschließend kloniert oder direkt sequenziert werden kann. Letzteres setzt voraus, dass für die Reamplifikation eine verminderte Menge an Primern (3-5 pmol) eingesetzt wird, da ansonsten die Genauigkeit der Sequenzierung durch einen verstärkten Hintergrund beeinträchtigt wird.

2.13 PARTIELLE INVERSE PCR

Die partielle inverse PCR ist eine Methode, flankierende Sequenzen eines bekannten Fragmentes zu erhalten. Im Unterschied zu der inversen PCR [OCHMAN *ET AL.* 1988] ist es bei der partiellen inversen PCR nicht notwendig, die Restriktionsstellen im

Randbereich des Fragmentes durch vorherige Southern Blot Analyse bestimmt zu haben. Je 5 µg genomische DNA werden mit *Sau3A1* in den Konzentrationen 2, 0,5, 0,125 und 0,031U/µg DNA eine Stunde lang bei 37°C verdaut. Um die Reaktion zu stoppen, werden die Ansätze daraufhin 20 min lang bei 65°C im Heizblock inkubiert. Um das Ergebnis der Restriktion zu überprüfen, werden je 2 µg elektrophoretisch aufgetrennt. Die restliche DNA wird durch Zugabe von 1/10 Volumen 3M Natrium-Acetat (pH5,2) und 2,5 Volumen Ethanol bei Raumtemperatur gefällt. Die DNA wird 20 min lang bei Raumtemperatur und 14000 x g zentrifugiert und anschließend mit 70%igen Ethanol gewaschen. Das Ethanol wird abgenommen und die DNA bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wird die DNA in 1xLigationspuffer (Fermentas) in einer Konzentration von 5ng/µl resuspendiert. Durch Zugabe von 4U/µl T4 DNA Ligase (Fermentas) und einer Inkubation bei 37°C werden die unterschiedlich langen DNA-Fragmente ligiert. Bei diesen niedrigen DNA-Konzentrationen ligieren die DNA-Fragmente bevorzugt mit sich selber als mit anderen DNA-Fragmenten. Die Ansätze werden, nach einer Inkubation von 4 h, 20 min lang bei 65°C inkubiert und damit die Reaktion durch Inaktivierung der Ligase gestoppt. Daraufhin wird die DNA phenolisiert, mit Ethanol gefällt (siehe 2.9.1) und in TE -Puffer (10mM TRIS-HCl, pH8, 1mM EDTA) aufgenommen, sodass eine DNA-Konzentration von 100ng/µl vorliegt.

Mit Primern, welche an beiden Seiten des bekannten Fragmentes nach außen gerichtet sind, wird eine PCR durchgeführt.

Temperaturprogramm:	94°C	5 min	
	94°C	1 min	} 35 x
	54°C	1 min	
	72°C	1,5 min	
	72°C	7 min	

Die amplifizierten Fragmente werden anschließend sequenziert (siehe 2.15) und die Lage der *Sau3A1*-Schnittstellen ermittelt. Falls das Fragment größer ist und daher mehrere Schnittstellen aufweist, muss die Schnittstelle gefunden werden, an der die Restriktion/Ligation erfolgte. Dies kann auf zwei Wegen geschehen:

1. Die neue Sequenz wird mit der bereits bekannten Sequenz und anderen Fragmenten verglichen
2. Aus der neuen Sequenz werden in der Nähe der verschiedenen *Sau3A1*-Schnittstellen Primer in Richtung des bekannten Fragments abgeleitet. In einer PCR mit unverdauter genomischer DNA werden daraufhin diese Primer jeweils zusammen mit einem Primer, der auf der bereits bekannten Sequenz liegt eingesetzt. Die Restriktionsstelle oder die Stelle, an der ligiert wurde, kann durch positive bzw. negative PCR-Ergebnisse gefunden werden.

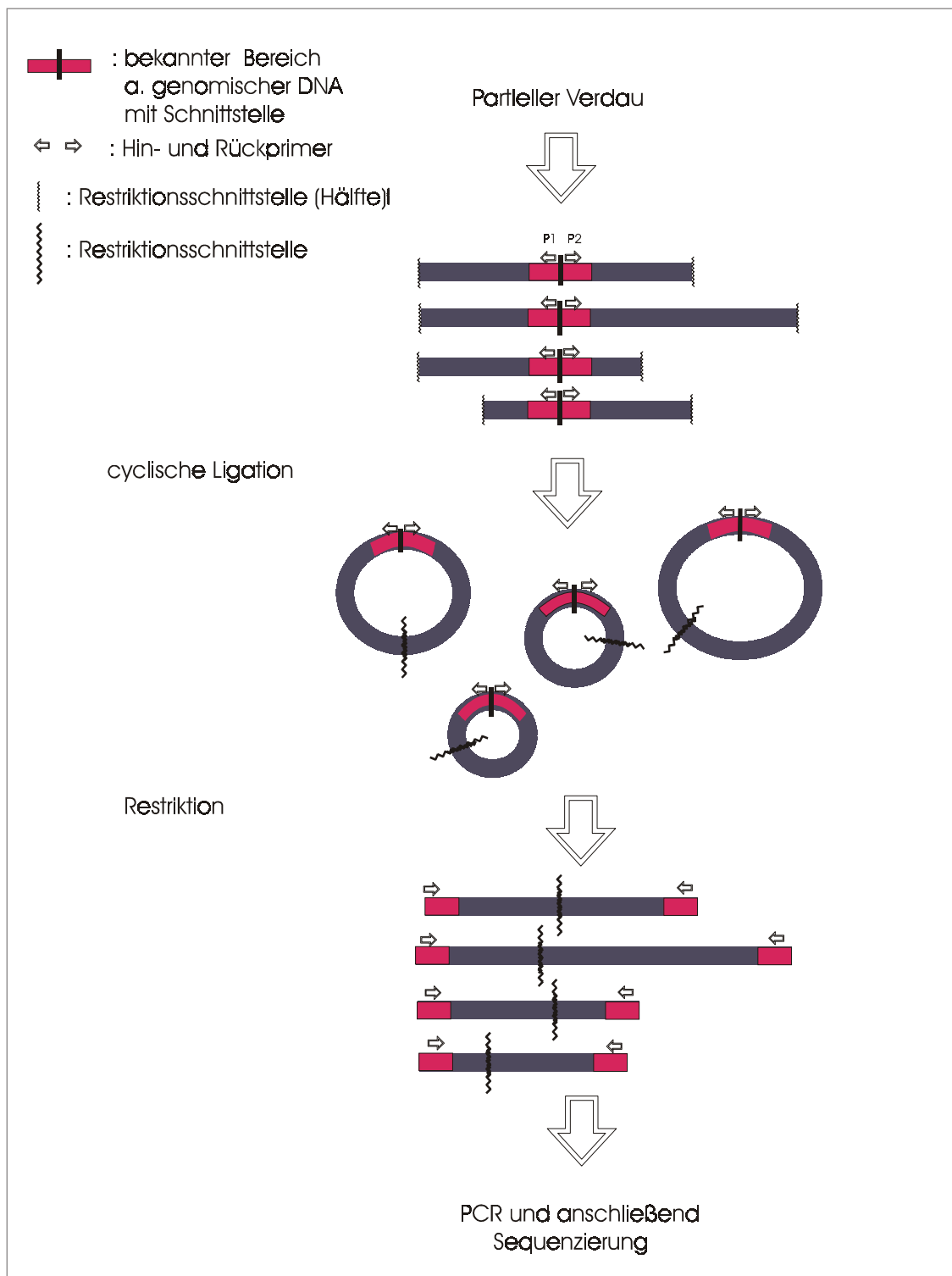


Abb. 2.1: Schematische Darstellung des Verlaufs der partiellen inversen PCR

Rote Boxen kennzeichnen die schon vor der inversen PCR bekannte Sequenz. Dünne Zickzacklinien kennzeichnen je eine Hälfte des Restriktionsenzym, mit der die genomische DNA partiell verdaut wurde. Dicke Zickzacklinien zeigen die religierten Schnittstellen. Ein schwarzer senkrechter Balken zeigt die Schnittstelle, an der nach der Ligation die zyklisierten Fragmente zwecks effektiverer PCR geschnitten werden.

Die Pfeile zeigen die Position der Primer, die in der abschließenden PCR eingesetzt werden

2.14 GENOME WALKING™

Mittels der Methode des Genome Walking™ können flankierende Bereiche bereits bekannter genomischer DNA erfasst werden [POPPE *ET AL.* 1999; SIEBERT *ET AL.* 1995]. In dieser Arbeit wurde das Universal Genome Walker™ DNA Walking Kit eingesetzt, um die genomischen 5'- und 3'-Enden des putativen Terpensynthase-Gens aus *M. vulgare* zu ermitteln.

Im ersten Schritt wird die genomische DNA mit unterschiedlichen Restriktionsenzymen geschnitten. An die entstandenen Fragmente werden sogenannte *blunt end* Adapter ligiert. An diese Adapter kann während der primären PCR der Adapter-Primer 1 (AP1) binden. Als Gegenprimer werden unterschiedliche genspezifische Primer eingesetzt, die aus der bereits bekannten Sequenz abgeleitet und in Richtung der 5'- bzw. 3'-Enden orientiert sind. Um die Produktspezifität der Reaktion zu erhöhen, wird nach der primären PCR eine sekundäre „nested“ PCR durchgeführt. Für diese PCR wird ein zweiter Adapterprimer (AP2) in Kombination mit einem weiteren genspezifischen Primer, der stromaufwärts bzw. stromabwärts des Primers aus der ersten PCR bindet, verwendet.

Die unterschiedlich großen DNA-Fragmente, die aus der PCR mit den verschiedenen Bibliotheken resultieren, erstrecken sich von dem gleichen genspezifischen Primer ausgehend bis zur ersten stromaufwärts gelegenen Schnittstelle der entsprechenden Restriktionsendonuklease mit angefügter Adaptersequenz.

2.15 SEQUENZIERUNGSVERFAHREN

2.15.1 Alf-Express™

Die DNA-Sequenzierung wird nach der Kettenabbruch-Methode von SANGER *ET AL.* (1977) in vier parallelen Ansätzen durchgeführt. Jeder enthält neben den vier dNTPs auch eine geringe Menge eines bestimmten Didesoxynukleotids (ddATP, ddCTP, ddGTP oder ddTTP). Die T7-Polymerase synthetisiert von einem Cy5™ markierten Primer ausgehend, den zum Template komplementären DNA-Strang, bis ein ddNTP in die wachsende Kette eingebaut wird. Da den Didesoxynukleotiden die 3'-Hydroxylgruppe fehlt, kann keine weitere Base angefügt werden und die Reaktion bricht an dieser Stelle ab.

Es entstehen Cy5TM-markierte DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge, die das basenspezifische Ende des jeweiligen ddNTP aufweisen. Diese werden dann in einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und durch den Laserstrahl des A.L.F.-ExpressTM DNA-Sequencers vor Detektoren angeregt. Das Ergebnis der Sequenzierung kann anschließend mit der Software AM V 3.2 analysiert werden.

2.15.1.1 Cycle-Sequencing

Im Cycle - Sequencing werden PCR und Sequenzierungsreaktion kombiniert. Auf diese Weise wird nicht nur sequenziert sondern auch die DNA durch die *Taq*-Polymerase linear amplifiziert, so dass 0,2 - 1 µg DNA als Ausgangsmaterial

Reaktionsansatz:

Prämix:	PCR-Ansatz:	
0,2-1 µg DNA	1,8 µl	jeweils ddA(C,G,T)TP
1,6 µl DMSO	6 µl	Prämix
2 µl Primer (10 µM)		
ad 27 µl H ₂ O		

Die Ansätze werden mit 15 µl Mineralöl, welches nach der PCR abgenommen wird, überschichtet.

Die Sequenzierung wird entsprechend der Vorschrift des „Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP“ durchgeführt.

Das Temperaturprogramm der Sequenzierungsreaktion im PCR-Gerät lautet wie folgt:

95°C	5 min	Einleitende Denaturierung
95°C	37 sec	} 25 x Denaturierung
60°C	37 sec	
68°C	4 min	Annealing und Extension
		Terminale Extension

2.15.1.2 Elektrophorese

Ein Harnstoff enthaltendes denaturierendes Polyacrylamidgel (0,5 mm) wird in den A.L.F.-ExpressTM Sequenzer eingesetzt und die Laufpuffer-Kammern mit 0,5 x TBE-Puffer gefüllt. Nach einem etwa 10-minütigem Vorlauf ist die Betriebstemperatur von 55°C erreicht, und die aus der PCR hervorgegangenen Proben (siehe 2.15.1.1) können aufgetragen werden. Die Elektrophorese wird bei 800 V und 60 mA über 14 h durchgeführt.

TBE-Puffer:	0,9 M	Tris-HCl
	0,9 M	Borsäure
	0,02 M	EDTA

2.15.2 BigDye™ Sequenzierung

Die Methode der BigDye™ Sequenzierung ist eine Modifikation der Kettenabbruch-Sequenzierung, bei der nicht die Primer, sondern die ddNTP mit jeweils unterschiedlichen Fluoreszenz-Farbstoffen markiert sind. Auf diese Weise ermöglicht sie die Verwendung beliebiger unmarkierter Primer und somit die direkte Sequenzierung eines PCR-Produktes ohne vorherige Klonierung. Die gleichzeitige Detektion der vier unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffe und die Berechnung der Signalpeakhöhen erfordert einen MacIntosh-gestützten Kapillar-Sequenzierer (ABI Prism 310) mit entsprechender Software (Sequencing Analysis Vers. 3.3 Perkin Elmer).

2.15.2.1 Probenvorbereitung

200-500 ng Template-DNA werden mit 10 pmol Primer und 4 µl Ready Reaction Mix (RRM) gemischt und der Ansatz mit Wasser auf 20 µl aufgefüllt. Der RRM enthält bereits Puffer, dNTP, Polymerase und die vier Arten fluoreszenzmarkierter Dides-oxy-nukleotide.

Die Sequenzierungsreaktion verläuft nach folgendem Programm:

95°C	37 sec	} 25 x
Annealing-Temp. des Primers	37 sec	
60°C	4 min	

Nach der PCR-Reaktion muss zur Entfernung überschüssiger markierter Nukleotide eine Ethanol-Fällung durchgeführt werden. Anschließend wird das Pellet in 20 µl TSR-Puffer (Perkin Elmer, ABI Prism) resuspendiert.

2.15.3 DNA-Sequenzanalyse

Die erhaltenen DNA-Sequenzen werden mit Hilfe der Autoassembler Software für MacIntosh-Computer (ABI-Prism) und dem Sci Ed Central-Packet (Scientific & Educational Software) für PC, welches die Programme Clone Manager, Align Plus und Primer Designer umfasst, analysiert und bearbeitet. Mit diesen Programmen lassen

sich die Sequenzen editieren, verschiedene Fragmente verbinden und vergleichen, sowie Nukleotid-Sequenzen in Aminosäure-Abfolgen übersetzen. Für Vergleiche mehrerer Sequenzen untereinander und für Homologieanalysen wird das Unterprogramm AlignX von Vektor NTI (InforMax) eingesetzt.

Mit den Programmen BLASTX und BLASTN werden die bearbeiteten Sequenzen mit bekannten Sequenzen aus verschiedenen über das Internet zugänglichen Datenbanken (DDBJ, ClustalW, EMBL, GenBank, PDB, TransFac, SwissProt [ALTSCHUL *ET AL.* 1985; ALTSCHUL *ET AL.* 1994; ALTSCHUL *ET AL.* 1997, THOMPSON *ET AL.* 1994]) verglichen.

2.16 SOUTHERN-BLOT (DNA/DNA HYBRIDISIERUNG)

E. SOUTHERN (1975) entwickelte eine Methode, mit der spezifische DNA-Sequenzen aufgrund ihrer Hybridisierung mit einer komplementären Gensonde identifiziert werden können. Die zu untersuchende DNA wird zuerst gelelektrophoretisch aufgetrennt denaturiert und einzelsträngig auf eine Nylonmembran übertragen. Durch Hybridisierung markierter Nukleinsäure-Sonden mit der auf der Membran fixierten DNA können genomische DNA- oder cDNA-Fragmente identifiziert werden, die der Sonde ähnlich oder mit ihr identisch sind.

2.16.1 Southern Blot Analyse

10 µg genomischer DNA aus *M. vulgare* werden mit den Enzymen *Dra*I, *Hinc*II und *Sau*3AI vollständig verdaut und der Restriktionsansatz anschließend in einem Agarosegel (1%) aufgetrennt. Nach einer kurzen Inkubation in 0,4 N NaOH wird die DNA mittels aufwärts gerichtetem Kapillarblot 2 h auf eine positiv geladene Nylonmembran (Amersham) transferiert (Aufbau nach [SAMBROOK *ET AL.* 1989]). Durch Kapillarkraft entsteht ein Flüssigkeitsstrom, der die DNA aus dem Agarosegel löst und auf die Nylonmembran überführt. Durch die positive Ladung der Nylonmembran wird die DNA fixiert.

2.16.1.1 Markierung von Gensonden nach der „Random-Priming“-Methode

Bei der „Random-Priming“-Methode nach FEINBERG UND VOGELSTEIN (1983) werden DNA-Fragmente radioaktiv oder mit Digoxigenin (DIG) markiert und können als Sonden bei Southern-Analysen eingesetzt werden. Als Primer für die Amplifikation einzelsträngiger DNA durch das Klenow-Enzym werden Hexanukleotide zufälliger

Zusammensetzung verwendet. Hierbei werden radioaktiv-markierte Nukleotide oder DIG-markiertes dUTP in den neu synthetisierten DNA-Strang eingebaut.

1 µg DNA wird in einem Volumen von 16 µl H₂O bei 100°C denaturiert und danach sofort auf Eis abgekühlt, wodurch eine Renaturierung verhindert wird. Die einzelsträngige DNA wird mit 4 µl des DIG-High Prime-Gemisches (Roche) versetzt und der Ansatz mindestens 2 h lang oder über Nacht bei 37 °C inkubiert. Bei einer radioaktiven Markierung wird dem Ansatz ³²P-dCTP anstelle des DIG-UTP hinzugefügt.

2.16.1.2 Southern Hybridisierung

Eine 10 cm x 7 cm große Nylonmembran (Hybond N; Amersham Pharmacia) wird in einem Folienbeutel zunächst mit Hybridisierungs-Puffer, der Milchproteine oder BSA enthält, abgesättigt. Die DIG-markierte DNA-Sonde wird durch 10-minütiges Erhitzen bei 100°C (Kochwasserbad) denaturiert und in den Folienbeutel mit geblotteter Membran gegeben. Es wird über Nacht unter stringenten, dem Homologie-Grad der verwendeten Sonde entsprechenden Bedingungen (60°C-68°C) hybridisiert.

Hybridisierungspuffer: 5 x SSC
 1 % Blocking Reagenz (w/v)
 0,1 % N-Laurylsarcosin
 0,02 % SDS (w/v)

2.16.1.3 Immunologische Detektion

Die Sonde wird mit Hilfe von Anti-DIG-Antikörpern detektiert. Diese binden an das eingebaute Steroid-Hapten Digoxigenin. An die Antikörper ist eine alkalische Phosphatase gekoppelt, welche das Substrat Dinatrium 4-chloro-3-[methoxyspiro{1,2-dioxetan-3,2'-[5'-chloro]tricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decan}-4-yl]phenylphosphat (CDP-StarTM) unter Freisetzung von Chemilumineszenz dephosphoryliert. Die Lichtemission kann durch einen Lumi-Imager (Roche) detektiert und die hybridisierten Fragmente auf diese Weise sichtbar gemacht werden.

Überschüssige Sonde wird nach der Hybridisierung (siehe 2.16.1.2) in mehreren Waschschritten in einem Waschpuffer mit 0,1-2 x SSC und 0,1% SDS (w/v) von der Membran entfernt. Die Stringenz wird durch den Gehalt an SSC reguliert (je weniger Salz, desto stringenter). Um während der nachfolgenden Antikörper-Reaktion unspezifische Bindungen weitgehend auszuschließen, wird nach einminütiger Inkubation in

Maleinsäure-Puffer die Membran mit Blocking-Reagenz abgesättigt. Mit Maleinsäure-Puffer werden die unspezifisch gebundenen Antikörper von im nachfolgenden Waschschritt der Membran entfernt. Dann wird die Membran in Puffer 3 getränkt und mit dem Chemolumineszenz-Substrat CDP-Star in einer Verdünnung von 1:200 15 min lang bei 37°C inkubiert.

Die Lichtemission wird anschließend im Lumi-Imager während einer 10 – 60 minütigen Exposition der Membran detektiert.

Maleinsäurepuffer				Puffer 3			
100	mM	Maleinsäure	pH4,5	100	mM	TRIS-HCl	pH9,5
150	mM	NaCl		100	mM	NaCl	
				50	mM	MgCl	

Blocking-Reagenz: 1% Blocking-Reagenz in Maleinsäure-Puffer

Antikörper-Konjugat: Polyklonale Anti-Digoxigenin-F_{ab}-Fragmente konjugiert mit alkalischer Phosphatase

2.16.1.4 Dot-Blot zur Überprüfung der Sondenmarkierung

Wie effizient eine Sonde markiert wurde, kann durch einen sogenannten Dot-Blot überprüft werden. Dazu wird aus dem Markierungsansatz eine Verdünnungsreihe hergestellt und von dieser jeweils punktförmig 1 µl auf eine Membran aufgebracht. Nach 3 min langer UV-Fixierung bei 254 nm wird der Dot-Blot wie ein Southern-Blot weiterbehandelt (s.2.16.1). Der letzte noch erkennbare Punkt (Dot) auf der Membran kennzeichnet eine Konzentration von 0,3 pg/µl markierter DNA. Von dieser Konzentration kann bei bekannter Verdünnung auf die Ursprungs-Konzentration des Markierungsansatzes rückgeschlossen werden.

Dies Verfahren eignet sich gleichermaßen für die Überprüfung von DNA- und RNA-Sonden.

2.16.2 Markierung von Gensonden mit dem AlkPhos Direkt™ System (Amersham Pharmacia)

Das AlkPhos Direkt™ System markiert sowohl RNA- als auch DNA-Sonden mit einer thermostabilen alkalischen Phosphatase. Dieses System eignet sich für sehr sensitive Anwendungen wie z.B. die Detektion von Single-copy-Genen, da die Sonden direkt markiert werden. Ein Crosslinker verbindet das Enzym kovalent mit der Nukle-

insäure. Die markierte Sonde kann daraufhin direkt in einer Southern bzw. Northernblot- Anwendung eingesetzt werden. Aufgrund der Thermostabilität der Phosphatase lässt sich die Stringenz über die Temperatur und die Salzkonzentration steuern.

100 ng DNA werden 5 min lang bei 100°C denaturiert und danach zur Vermeidung einer Renaturierung sofort auf Eis gestellt. Die DNA wird mit 10 µl Reaktionspuffer (Amersham Pharmacia), 2 µl Markierungsreagenz (Amersham Pharmacia) und 10 µl „Crosslinker“-Arbeitslösung (Amersham Pharmacia) versetzt, der Ansatz gemischt, und 30 min lang bei 37°C inkubiert. Die Sonde kann sofort oder innerhalb von 2 h verwendet werden.

2.16.2.1 Southern Blot Hybridisierung

Eine 10 cm x 7 cm große Nylonmembran (Hybond N; Amersham Pharmacia) wird in einem Folienbeutel zunächst mit Hybridisierungs-Puffer, der Milchproteine oder BSA enthält, 30 min lang abgesättigt. Der Ansatz mit markierter Sonde (siehe 2.16.2) wird zu der Membran in den Folienbeutel gegeben und über Nacht (> 18 h) bei 60°C hybridisiert.

2.16.2.2 Immunologische Detektion

Die Sonde wird mit Hilfe des CDP-StarTM Chemilumineszenzreagenz (siehe 2.16.1.3) detektiert. Die in die Sonde eingebaute Phosphatase katalysiert mit Hilfe dieses Reagenz die Zersetzung des stabilisierten Dioxetan-Substrates. Unter Freisetzung von Chemilumineszenz zersetzt sich dieses Substrat. Die Lichtemission der hybridisierten Fragmente wird durch einen Lumi-Imager (Roche) detektiert.

In mehreren Waschschritten mit zwei verschiedenen Waschpuffern wird überschüssige Sonde von der Membran entfernt. Die Stringenz wird vorwiegend durch die Temperatur (55-68°C) im Waschschriff mit Waschpuffer 1 gesteuert (höhere Temperatur = höhere Stringenz). Nach Zugabe von 30-40 µl/cm² CDP- Star wird der Blot 2-5 min bei Raumtemperatur aufbewahrt und die Lichtemission anschließend im Lumi-Imager während einer entsprechenden Detektionszeit bestimmt.

Waschpuffer 1:

2M	Harnstoff
1,0%	SDS
50mM	Natriumphosphat pH7,0
150mM	NaCl
1mM	MgCl ₂
0,2%	Blockierungsreagenz

Waschpuffer 2 (Stammlösung):

1M	TRIS
2M	NaCl

pH10

Waschpuffer 2:

zu 1L der 1:20 verdünnten Stammlösung
werden noch 2ml 1M MgCl₂ hinzugefügt

2.17 RNA-PRÄPARATION AUS *M. VULGARE*

Aus 1 g junger Blätter, die aus den oberen zwei Blattkreisen mindestens acht Wochen alter Pflanzen von *M. vulgare* L. stammen, wird mittels des RNA Plant Extraction Kit der Firma Qiagen nach den Anweisungen des Herstellers RNA gewonnen. Die isolierte RNA wird zur Erhöhung der Konzentration mit 1/10 Vol. 8 M LiCl und 2,5 x Vol. Ethanol gefällt, bei 4°C und 14000 x g zentrifugiert und nach Waschen mit 70%igen Ethanol in 10-20 µl Wasser aufgenommen. Die RNA wird bei -80°C gelagert. Alle zur Isolierung von RNA benötigten Lösungen und Materialien (z.B. Pipettenspitzen, Spatel, Mörser etc.) sind möglichst frei von RNasen.

2.17.1 mRNA-Isolierung

Die Isolierung eukaryotischer mRNA aus Gesamt-RNA basiert auf der selektiven Adsorption der PolyA⁺-haltigen mRNA an eine Matrix, an die Oligo-dT gekoppelt wurden (Qiagen Oligotex mRNA Mini Kit).

Sie wird nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt.

Die isolierte mRNA wird bei -80°C gelagert.

2.17.2 Analyse von RNA oder mRNA**2.17.2.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung**

Die Konzentration von RNA oder mRNA wird photometrisch durch Messung der Absorption verdünnter RNA gegen H₂O als Referenz bei 260 nm bzw. 280 nm bestimmt [SAMBROOK 1989]. Eine A₂₆₀ von 1,0 entspricht einer RNA/mRNA Konzentration von etwa 40 µg/µl. Der Quotient beider Messwerte zeigt die Reinheit der isolierten Nukleinsäure an (s. auch 2.10.1).

2.17.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Konzentration sowie die Qualität der isolierten RNA bzw. mRNA kann durch Gelelektrophorese in 1,5% Formaldehyd-Agarosegelen abgeschätzt werden. Die RNA-Proben (20-50 µl) werden mit 14 µl Probelösung, die 2 µl 5 x MOPS-Puffer, 3 µl Formaldehyd und 9 µl Formamid enthält, versetzt und 10 min lang bei 65°C inkubiert. Diese denaturierenden Bedingungen verhindern die Ausbildung von Sekundärstrukturen innerhalb der RNA. Die RNA wird bei 70-80 V in 1x MOPS-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt.

Nachdem das Gel mit Gesamt-RNA beladen und diese elektrophoretisch aufgetrennt worden ist sind je nach Konzentration der RNA 3-5 Banden ribosomaler RNA im UV-Licht sichtbar.

MOPS-Puffer (10x): 200 mM Morpholinopropansulfonsäure, pH 7,0
 50 mM Natrium-Acetat
 10 mM EDTA

2.18 HERSTELLUNG EINER λ -gt- cDNA-BIBLIOTHEK

cDNA Banken repräsentieren die Informationen eines Organismus oder eines Gewebes, die durch die mRNA codiert werden. Da mRNA Moleküle meist sehr labil sind und bereits nach äußerst kurzer Zeit degradiert werden, ist es notwendig, sie in eine stabile DNA Kopie (cDNA) zu konvertieren. Anschließend wird die cDNA in einen selbstreplizierenden λ -Phagen-Vektor inseriert, da dieser besonders für große Fragmente gut geeignet ist.

2.18.1 Herstellung der cDNA:

Die cDNA wurde mittels des ZAP-Express® cDNA Synthesis-Kit der Firma Stratagene (Kalifornien, U.S.A.) hergestellt. Gesamt RNA aus *M. vulgare* wird wie unter 2.17 beschrieben isoliert und mit Hilfe eines mRNA Isolierungskits (siehe 2.17.1) aufgereinigt. 5 µg mRNA werden für die Erststrang-Synthese mit 1 µl MMLV-RT (Molony-Maus-Leukämie-Virus-Reverse-Transkriptase), 10 µM Linker-Primer, je 100 mM dATP, dGTP, dTTP und 5-Methyl-dCTP versetzt. Dadurch wird die cDNA hemimethyliert, so dass sie nicht mehr durch Endonukleasen abgebaut werden kann. Nur die Erkennungsstelle innerhalb des linker-Primers für *XhoI* bleibt erhalten.

Mittels RNase H werden Einzelstrangbrüche im RNA-Strang der Hybridmoleküle produziert, und die entstehenden Fragmente können als Primer für die DNA-Polymerase I verwendet werden. Somit entsteht der Zweitstrang der cDNA. Überstehende Fragmentenden werden mit einer *Pvu*-DNA-Polymerase entweder aufgefüllt oder abgebaut, so dass stumpfe Enden entstehen. An diese wird ein Adapter mit einem *Eco*RI-Schnittstellenüberhang ligiert. Nach einem *Xho*I Verdau werden die kurzen Reststücke des linker-Primers durch eine Gelfiltration (Sepharose® CL-2B) abgetrennt. Die cDNA-Fragmente werden dann gerichtet in einen ZAP Express Vektor ligiert (Firma Stratagene, Kalifornien, U.S.A.). Da die cDNA hemimethyliert ist, muss darauf geachtet werden, dass für die Infektion ein *E. coli*-Stamm verwendet wird, der keine Methylase-Aktivität aufweist (McrA⁻ und McrB⁻). XL-Blue MRF' besitzt diese Eigenschaft und enthält zusätzlich ein F'-Episom, auf dem die Gene für die Ausbildung von F-Pili kodiert sind. Diese sind für eine Phagen-Anheftung notwendig. Nachdem durch die Lyse der infizierten Zellen die DNA freigegeben worden ist, können die gewünschten Sequenzen durch Hybridisierung der DNA mit entsprechenden Sonden identifiziert werden.

2.18.2 Plaque Lifting

E. coli-Zellen werden mit einer vorab ermittelten Phagenmenge infiziert, so dass, wenn sie auf Agarplatten kultiviert werden, ein möglichst gleichmäßiges aber definiertes Plaquemuster entsteht. Jedes Muster wird auf Nylonmembranen übertragen. Anschließend wird mit diesen eine Southern-Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten Sonde (siehe 2.16) durchgeführt. Abweichend vom Standardprotokoll (siehe 2.16.1.2) wurde der folgende Puffer verwendet:

Genomic Blotbuffer:	0,6	M	NaCl	pH 8,5
	1	mM	EDTA	
	0,1	%	SDS	
	10	%	Denhardts	
	10	mM	Pipes	
Denhardts (wäßr.Lsg):	10	%	Ficoll 400	
	10	%	Polyvinylpyrrolidon	
	10	%	BSA	

Plaques, die Signale bei der Hybridisierung zeigen, werden für die *in-vivo*-Exzision des ZAP-Express-Vektors eingesetzt. Die Plaques werden mit Helferphagen, welche die notwendigen Proteine für die Verkürzung des ZAP-Express-Vektors zum Phagemid-Vektor pBK-CMV einbringen superinfiziert. Dieser gekürzte Vektor wird wieder, in Phagen verpackt, zur Infektion von XL0LR-Zellen verwendet. Da dieser Stamm nicht von Helferphagen infiziert werden kann, ist die alleinige Aufnahme des pBK-CMV gesichert, der eine Kanamycin-Resistenz vermittelt. Die Insertion von cDNA kann mittels α -Komplementation (siehe 2.11.3) in beiden *E. coli*-Stämmen durch Blau-Weiß-Selektion (siehe 2.8.1.1) überprüft werden.

2.19 RT-PCR

Mit Hilfe der RT-PCR [FOLEY *ET AL.* 1993] können PolyA⁺-Transkripte nachgewiesen werden, die in so geringer Anzahl in der Zelle vorliegen, dass sie mit Northernblots nicht detektierbar sind.

Im ersten Schritt dieser Reaktion wird mRNA von einer reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Das Enzym geht dabei von einem kurzen Oligonukleotid-Primer aus und synthetisiert anhand der mRNA-Vorlage den komplementären cDNA-Strang. Dieses doppelsträngige RNA/DNA-Hybrid dient in einem zweiten Schritt als Template für eine PCR-Reaktion mit einer ausgewählten Primer-Kombination. Die Erststrangsynthese wird nach den Angaben des jeweiligen Herstellers der verschiedenen reversen Transkriptasen (MMLV-, Superscript™ II- und AMV-Reverse Transkriptase) [GROPPE & MORSE 1993] durchgeführt.

3-5 μ l des RT-PCR-Ansatzes werden mit je 25 pmol Hin- und Rückprimer, 10 mM Tris, 15 mM MgCl₂, und je 100 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP in einem 50 μ l-Ansatz in der folgenden PCR eingesetzt. Der PCR-Ansatz wird vor Zugabe der DNA-Polymerase 5 min lang bei 95°C erhitzt, um eventuell vorhandene Sekundärstrukturen aufzubrechen und die Spezifität der Primer-Bindung zu erhöhen.

PCR-Programm:	94°C	5 min	} 25 x	50°C	20 sec
	94°C	10sec			
	72°C	2 min			
	72°C	3 min			
	4°C	∞			

Um das Vorhandensein von DNA auszuschließen, wird parallel eine Reaktion mit RNA durchgeführt, die nicht zuvor in cDNA umgeschrieben wurde. Da die DNA-Polymerase RNA nicht als Template akzeptiert, wird in diesem Ansatz nur dann ein Produkt amplifiziert, wenn sich noch DNA-Spuren in der RNA befinden. Von beiden Reaktionen werden 5 µl zur Kontrolle in einem 1% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

2.19.1 Avian RT-PCR System

Das Avian-RT-PCR-System (Sigma) nutzt das „enhanced avian myeloblastosis virus reverse transcriptase (eAMV) enzyme“. In Kombination dieses Enzyms mit einer geeigneten Polymerase können sehr geringe Mengen mRNA detektiert werden. Um größere Mengen und höhere Genauigkeit zu erhalten, wird die 2-Schritt-Methode nach den Angaben des User Manuals angewendet. Im ersten Schritt werden die RNA und die Primer in einem 500 µl Eppendorfgefäß für 10 min lang bei 72°C denaturiert und anschließend nach Zugabe von 2 µl eAMV-RT-Puffer, 100mM Deoxynucleotidemix, 1 U Reverser Transkriptase, 0,5 pmol RNase Inhibitor und Wasser bis zu einem Volumen von 20 µl 50 min lang bei 42°C inkubiert.

Direkt im Anschluss wird eine zweite PCR-Reaktion, mit 3 µl des ersten Ansatzes als Template durchgeführt.

PCR-Programm:

94°C	4	min	
94°C	45	sec	} 35 x
64°C	1	min	
72°C	1,5	min	
72°C	4	min	
4°C	∞		

2.20 RACE-PCR

Die RACE-PCR (5' and 3'-Rapid Amplification of cDNA Ends) ist eine Methode, mit der auch cDNA-Fragmente von seltenen Transkripten in voller Länge erzeugt werden können [CHENCHIK *ET AL.* 1995; CHENCHIK *ET AL.* 1996]. Alle Reaktionen werden nach den Angaben des User Manuals für das SMART™ RACE cDNA Amplifikation Kit durchgeführt.

Mit mindestens 1 µg aus Gesamt-RNA isolierter mRNA wird die reverse Transkription durch eine MMLV-Reverse Transkriptase durchgeführt.

Bei der 5'-RACE-PCR beginnt die reverse Transkription von einem Oligo-dT-Primer ausgehend in Richtung Translationsstart der mRNA. Erreicht die Reverse Transkriptase das Ende der mRNA, werden einige dC-Reste an den neusynthetisierten Strang angehängt. An dieses Cytosin-reiche Ende kann das dem Ansatz der reversen Transkription zugesetzte 3'-dG-reiche SMART™-Oligonukleotid binden. Das Enzym wechselt das Template von der mRNA zum Oligonukleotid, und es entsteht eine cDNA Kopie der RNA mit einem terminalen Oligonukleotid-Anhang (5'-Race-Ready cDNA). Das SMART™-Oligonukleotid liefert in der nachfolgenden PCR die Bindestelle für den „Universal Primer Mix“ (UPM), während der genspezifische zweite Primer eine selektive Amplifikation in Richtung 5'-Ende ermöglicht.

Bei der 3'-RACE-PCR beginnt die reverse Transkription auch von einem Oligo-dT-Primer ausgehend in Richtung Translationsstart der mRNA hin. Dieser Primer hat jedoch im Vergleich zur 5'-RACE-PCR bereits an seinem 3'-Ende die SMARTII-Sequenz, welche nachfolgend wiederum die Bindestelle für den „Universal Primer-Mix“ liefert. Der genspezifische Primer Richtung 3'-Ende gewährleistet in den folgenden Zyklen eine gezielte Amplifikation des gesuchten Gens. Im Anschluss gibt es zwei Möglichkeiten, einen die vollständige Sequenz der mRNA bzw. cDNA (den Vollklon) zu erhalten:

- durch Long Distance PCR (LD-PCR). Dazu werden Primer vom ermittelten 5'- und 3'-Ende abgeleitet und als Template die 5'-Race-Ready-cDNA eingesetzt.
- durch Klonierung überlappender 5'- und 3'-Fragmente. Hierbei wird eine Schnittstelle in dem gemeinsamen Bereich (falls vorhanden) genutzt.

RACE-PCR-Programm:

94°C	1 min	}	25x
94°C	5 sec		
68°C	10 sec		
72°C	3 min		
72°C	4 min		

Nested-PCR:

94°C	1 min	}	35 x
94°C	5 sec		
60°C	10 sec		
72°C	2 min		
72°C	4 min		

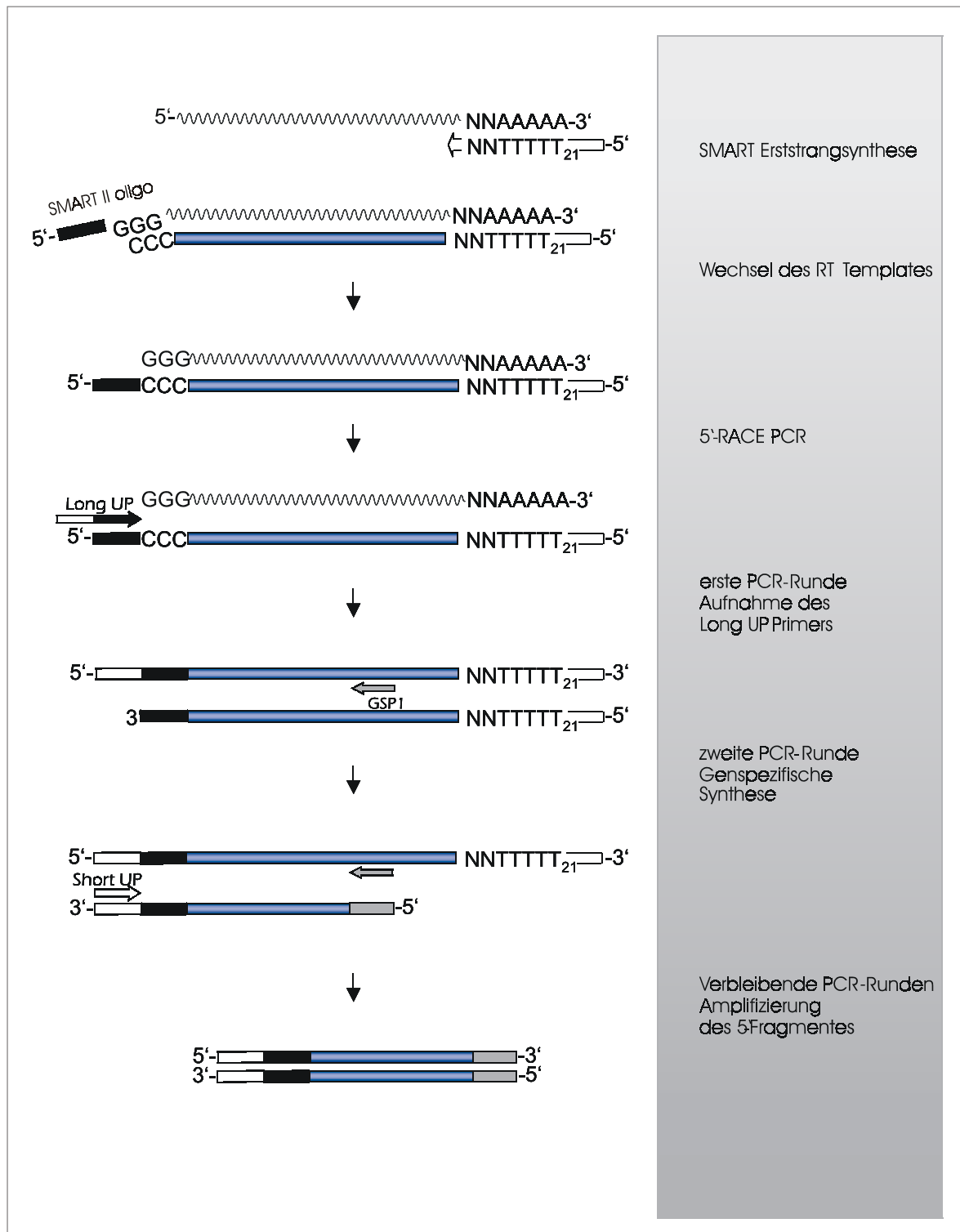


Abb. 2.2: Schematische Darstellung der 5'-RACE

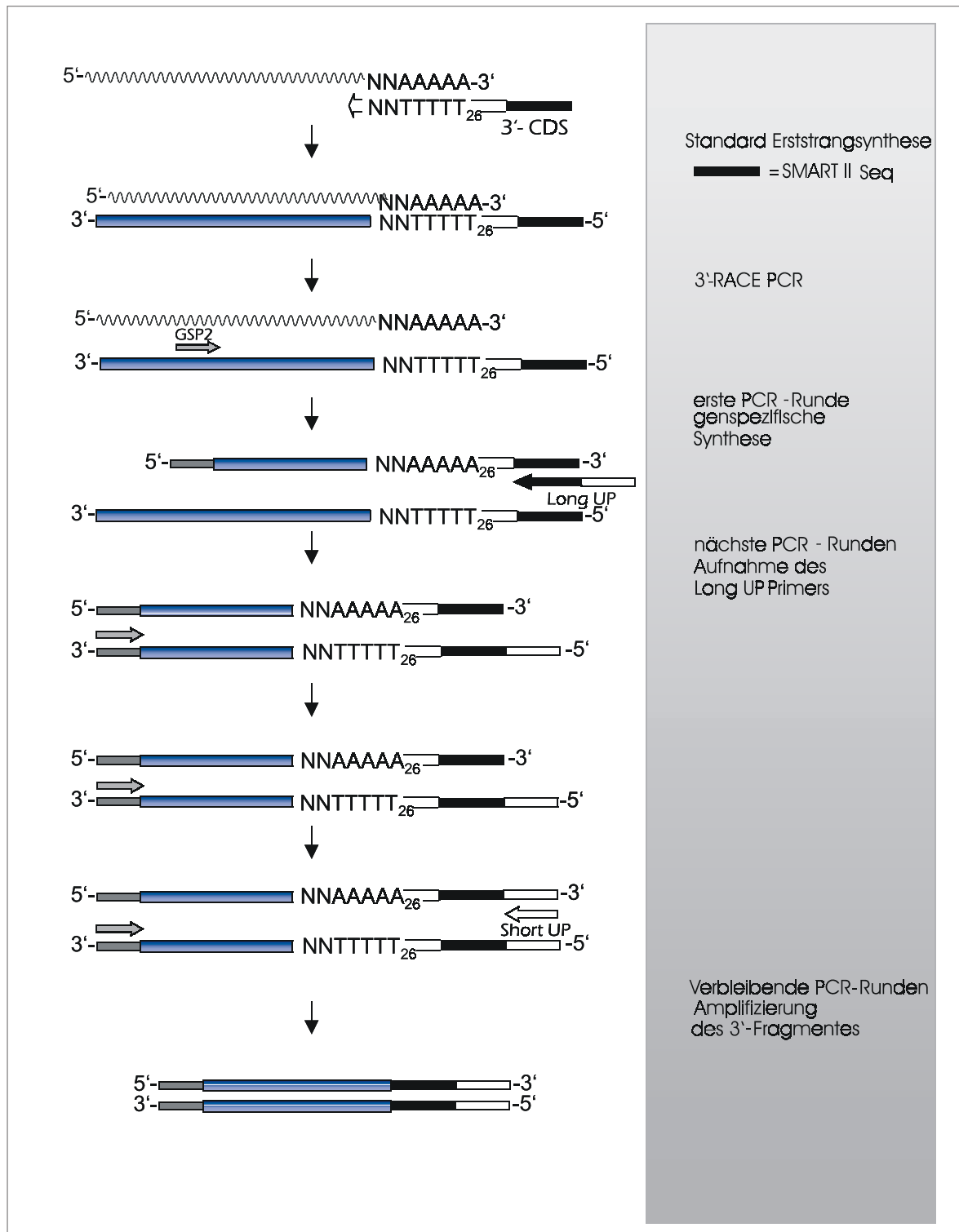


Abb. 2.3: Schematische Darstellung der 3'RACE

2.21 NORTHERNBLOT (RNA/RNA-HYBRIDISIERUNG)

RNA wird nach elektrophoretischer Auftrennung in denaturierenden Gelen, analog der DNA im Southern-Blot (siehe 2.16.1), durch Kapillarkräfte auf Nylonmembranen übertragen [SAMBROOK *ET AL.* 1989; SOUTHERN 1975]. Durch Hybridisierung mit DIG-markierten RNA-Sonden können dann spezifische Transkripte nachgewiesen werden. Es wird wie beim Southern-Blot-Verfahren (siehe 2.16) detektiert.

2.21.1 Herstellung einer RNA-Sonde durch *in vitro*-Transkription

RNA-Sonden werden von einer RNA-Polymerase durch *in vitro*-Transkription bei Zugabe von DIG-markiertem UTP gleichzeitig synthetisiert und markiert.

Das Fragment, welches als Sonde eingesetzt werden soll, wird in einen Vektor kloniert, der über Promotoren für eine RNA-Polymerase (T3-, T7- oder Sp6-Polymerase) verfügt. Um mit dem auf der Membran fixierten Transkript hybridisieren zu können, muss die Sonde aus der komplementären Antisense-Sequenz bestehen. Dieses wird bei bekannter Orientierung des Inserts im Vektor durch die Wahl der entsprechenden RNA-Polymerase gewährleistet. Der Klonierungsvektor wird durch eine Restriktion mit einem Enzym, das außerhalb des Inserts schneidet, linearisiert. Die Schnittstelle wird so ausgewählt, dass die RNA-Polymerase nach Synthese des Antisense-Transkriptes abfällt, und keine störenden Vektorsequenzen mit in die Sonde einbezogen werden („Run-off-Transkription“). Da neben den unmarkierten Nukleotiden DIG-markierte UTP zugesetzt wird, baut die Polymerase diese mit ein und bewirkt so eine gleichzeitige Markierung der Sonde.

Ansatz für die *in vitro*-Transkription: 1 µg Template DNA

2 µl DIG-NTP-Markierungsmix

2 µl 10x Transkriptionspuffer

1 µl RNase-Inhibitor (20 U/µl)

2 µl RNA-Polymerase (20 U/µl)

ad 20 µl DMDC-H₂O

Der Ansatz wird bei 37°C mindestens 3 h lang oder über Nacht inkubiert.

2.21.2 Hybridisierung und immunologische Detektion

Die auf der Nylonmembran immobilisierte RNA wird mit der DIG-markierten RNA-Sonde hybridisiert und anschließend unter Standardbedingungen im Puffer „DIG Easy Hyb“ (Roche) immunologisch detektiert. Alternativ wird die Hybridisierung nach der Vorschrift der Firma Roche mit dem verbesserten Puffer „Ultra Hyb“ durchgeführt. Dieses Reagenz sieht eine Hybridisierung des Blots unter sehr stringenten Bedingungen vor: Die Sonde wird mit der Membran in Ultra-Hyb bei 68°C über Nacht inkubiert. Gewaschen wird anschließend stringent mit einem Waschpuffer mit 0,1x SSC und 0,1% SDS (siehe 2.16.1.3.).

2.22 HETEROLOGE EXPRESSION DES MVTPS1 IN *E. COLI*

Der gesamte codierende Bereich von *mvtps1* wurde mit Hilfe des tet-Promotor/Operator-induzierbaren pASK-Systems in *E. coli*-Zellen rekombinant exprimiert. Das rekombinante Gen ist carboxyterminal mit einem Streptavidin-Tag versehen. Dadurch kann das Enzym leicht aufgereinigt (Festphasenreinigung mit immobilisierten *Strep*-Tactin) und über Westernblot detektiert werden. Die Polylinker des pASK-IBA Expressionsplasmids bieten die Möglichkeit, ein beliebiges Strukturgen gerichtet mit den im Vektor codierenden funktionellen Elementen (*Strep*-tag, Start- und Stoppcodon) zu klonieren. Der pASK IBA7-Vektor verfügt über eine asymmetrische *Eco31I*-Schittstelle, über die das zu exprimierende Gen im richtigen Leserahmen in den Vektor eingefügt werden kann.

2.22.1 Herstellung der Primer

Die vollständige cDNA (d.h. mit Translationsstart und –stopp) wird mittels Primern amplifiziert, an deren Ende die Schnittstellen angefügt sind, mit welchen die cDNA in den Expressionsvektor (pASK IBA 7) kloniert wird. Mittels des Programms „Primer D'Signer“ 1.1 (IBA Göttingen) werden diese Primer abgeleitet. Das im gefundenen Gen vorliegende Stoppcodon TAA wird hierbei durch das von *E.coli* besser lesbare TAG ersetzt. Bedingt durch die Asymmetrie der in die Primer integrierten Schnittstelle, kann das Gen gerichtet in den Vektor einkloniert werden.

2.22.2 Amplifizierung der vollständigen cDNA

Mit 3 µl cDNA (siehe 2.19), die mittels eines oligo-dT-Primers hergestellt wurde, wird eine PCR mit je 25 pmol der Primer „5'-*Eco* 31I“ und „3'-*Eco*31I“, 10 mM Tris, 15 mM MgCl₂, und je 100 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP in einem 50 µl-Ansatz durchgeführt. Es wird als DNA-Polymerase die *Pfu*-Turbo-Polymerase (Promega) eingesetzt, da sie die Fähigkeit des Korrekturlesens („Proof-Reading“) besitzt. Auf diese Weise wird die Wahrscheinlichkeit eines Fehlers reduziert, der möglicherweise das Leseraster verschieben und zur Entstehung eines Nonsens-Produktes führen würde. Die PCR-Reaktion wird nach Angaben des User-Manuals für die *Pfu*-Turbo-Polymerase (Promega) durchgeführt.

PCR-Programm:	95°C	5 min	} 35 x
	95°C	45 sec	
	64°C	45 sec	
	72°C	2 min	
	72°C	3 min	

2.22.3 Klonierung im Expressionsvektor pASK-IBA 7

20 µl des PCR-Amplifikats des Vollklons (s.o.) werden in einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und die entsprechende Bande anschließend in 10 µl Wasser eluiert. Das entstandene Eluat wird mit *Eco*31I geschnitten und direkt gerichtet in den Vektor pASK-IBA 7 inseriert und dieser in *E. coli* kloniert. Die Tandem-Ribosom-Bindestelle gewährleistet eine effektive Initiierung und Translation (siehe Abb. 2.4). Durch die anschließende Sequenzierung wird die Identität des Inserts und die fehlerfreie Amplifizierung überprüft.

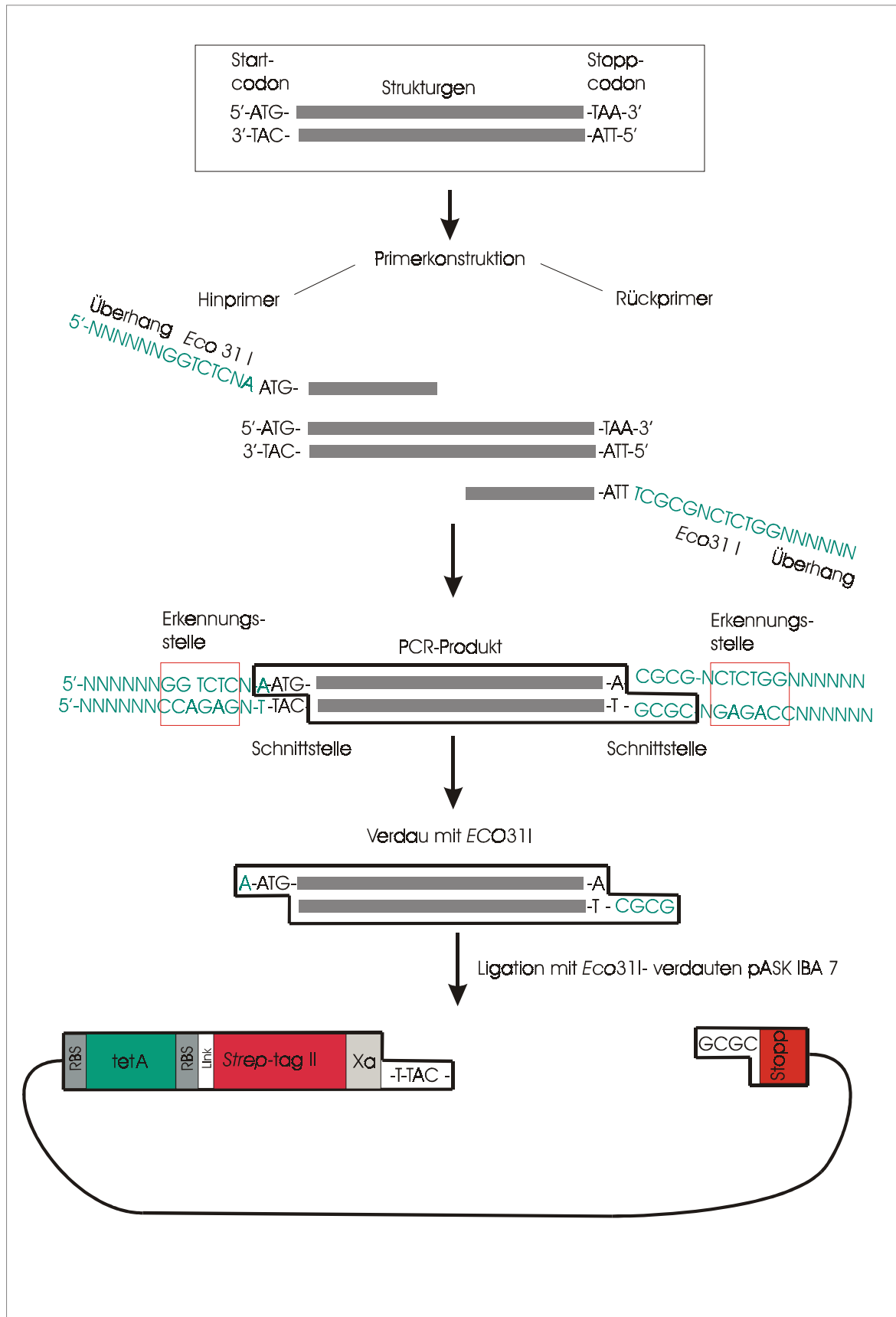


Abb. 2.4: Schema für die Klonierung in den Vektor pASK IBA 7. Abkürzungen: RBS: Ribosom-Bindestelle; tetA: Tetracyclin-Resistenz; link: Linker; *Strep-tag II*: für Streptavidin codierende Sequenz; Xa: für proteolytische Erkennungssequenz codierende Sequenz.

2.22.4 Transformation in *E. coli* BL21(D3)pLysS-Zellen

Es wurden für die Transformation kompetente Zellen der Firma Stratagene (Epicurian Coli® BL21 Gold(D3)pLysS Competent Cells) verwendet (siehe 2.11.3).

Positive Transformanten wurden durch PCR-Kolonie-Screening (siehe 2.12.1) und anschließende Sequenzierung identifiziert.

2.22.5 Expression des Vollklons

Die Expressionskassetten des pASK-IBA-Systems unterliegen der transkriptionellen Kontrolle des *tetA* Promotors/Operators. Eine Tandem-Ribosom-Bindestelle gewährleistet eine effektive Initiierung und Translation (siehe Abb.2.1).

3 ml LB-Medium (mit 600 mM Sorbitol und 100 µg/ml Ampicillin) wurden mit einer Kolonie transformierter BL21(D3)pLysS-Zellen, die den in pASK-IBA 7 inserierten Vollklon enthielten, inokuliert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 150 µl dieser Vorkultur in 6 ml LB-Medium gegeben und 2 h angezogen. Sobald die Kultur eine $OD_{600} = 0,5-0,6$ erreicht hatte, wurde die Expression des gewünschten Inserts durch Zugabe von 0,6 µl Anhydrotetrazyklin (2mg/ml) induziert und bei 37°C weiter wachsen gelassen. 1 ml der Kultur wurde nach einer Stunde 1 min bei 10000 x g zentrifugiert und nach jeder Stunde ein weiteres Aliquot (insgesamt 4 mal). Die entstandenen Pellets wurden in 50 µl Probenpuffer resuspendiert und 3 min lang bei 90 °C denaturiert. Diese Rohlysate wurden bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Für den Test der enzymatischen Aktivität (siehe 2.25) wurde die über Nacht gewachsene Vorkultur vollständig (3 ml) in 200 ml LB-Medium (mit 600 mM Sorbitol, 2,5 mM Betain und 100 µg/ml Ampicillin) überführt und anschließend 4-5 h bei 37°C bis zu einer OD von 0,5-0,6 wachsen gelassen. Nachdem die Kultur auf 18°C abgekühlt war, wurde sie mit 20 µl Anhydrotetrazyklin (2 mg/ml) induziert und über Nacht bei 18°C unter Schütteln inkubiert.

2.23 SDS-PAGE

2.23.1 Probenvorbereitung

Das Zell-Lysat wird 3 min lang bei 90°C erhitzt und anschließend 30 sec bei 10000 x g abzentrifugiert. 20 µl des jeweiligen Ansatzes werden ohne diesen vorher abzukühlen in die Taschen des Proteingels pipettiert. Mit Hilfe eines Proteinmarkers (Prestained

Protein Marker, Broad Range (6-175kb), New England Biolabs), der vor dem Auftragen mit 5 µl Probenpuffer versetzt und ebenfalls denaturiert wird, kann die ungefähre Größe des Proteins abgeschätzt werden.

Probenpuffer:	100	mM	Tris / HCl pH 6,8
	4	mM	EDTA
	2	%	SDS (w/v)
	16	%	Glycerin (v/v)
	0,05	%	Bromphenolblau
	2	%	Mercaptoethanol (v/v)
	8	M	Harnstoff

2.23.2 Polyacrylamidgel

Trenngel 10 % (2x klein)

4,8	ml	H ₂ O
2,5	ml	1,5 M Tris pH 8,8
2,5	ml	40% Acrylamidlösung (37,5 : 1 Acryl-:Bisacrylamid)
0,1	ml	10% SDS
0,1	ml	10% APS
4	µl	TEMED

Sammelgel (2x klein)

3,6	ml	H ₂ O
630	µl	1 M Tris pH 6,8
630	µl	40% Acrylamidlösung (37,5 : 1 Acryl- : Bisacrylamid)
50	µl	10% SDS
50	µl	10% APS
5	µl	TEMED

Das Trenngel wird zuerst hergestellt und mit Butanol dünn überschichtet. Nach 45 min ist das Acrylamid polymerisiert, und das Butanol wird mit Wasser abgespült. Anschließend wird das Sammelgel gegossen, welches ebenfalls vor dem Probenauftrag 45 min polymerisiert.

2.23.2.1 Gelelektrophorese

An das Gel wird bis die Proben das Trenngel erreichen eine Stromstärke von 5 mA angelegt. Dann wird der Stromfluss auf 3 mA reduziert. Die Elektrophorese wird beendet, wenn die Bromphenolblau-Front nach etwa 2 h das Trenngel verlässt.

Elektrodenpuffer:	192	mM	Glycin
	25	mM	Tris-HCl, pH 8.3
	0,1	%	SDS

2.23.3 Coomassie-Färbung

Das Polyacrylamidgel (siehe 2.23.2.1) wird für ca. 30 min in 10x-Entfärber überführt. Es wird dann für 1 h in Färbelösung inkubiert und Proteinbanden werden gefärbt. Anschließend wird das Gel in 1x Entfärber unter mehrmaligem Wechseln der Lösung so lange gewaschen, bis die Proteinbanden deutlich hervortreten und der Hintergrund nur noch eine schwache Blaufärbung aufweist. Das Gel kann in PE-Folien in 5-10% Essigsäure aufbewahrt werden.

Entfärber(10 x): 45% Ethanol
 45% H₂O
 10% Essigsäure

für die Arbeitslösung wird die o.a. Lösung 1:10 mit Wasser verdünnt

Färbe-Lösung: gesättigte Lösung von Coomassie-Blue R250 in 10x Entfärber

2.24 WESTERNBLOT

Proteine können nach einer SDS-PAGE mit Hilfe einer Fastblot-Kammer (Biometra) elektrophoretisch (halbtrocken) auf eine PVDF-Membran übertragen werden.

Dazu wird das Gel zunächst 15-20 min in Transfer-Puffer äquilibriert. Die PVDF (Polyvinylidendifluorid)-Membran wird kurz mit Methanol benetzt, gewässert und gleichfalls in Transferpuffer überführt. Blotting-Papier (MN 827B; Macherey &Nagel) wird mit Transferpuffer getränkt und auf der Fastblot-Anode (+) positioniert. Die Membran wird auf das Papier gelegt, das Proteingel auf die Membran gelegt und abschließend mit einer weiteren Lage mit Puffer benetztem Blotting-Papier bedeckt. Der Fastblot-Kathodendeckel (-) wird geschlossen und ein Strom von 5 mA/cm² angelegt. Bereits nach 20 min sind über 80% des Proteins auf die Membran transferiert worden.

Transfer-Puffer: 25 mM Tris/HCl pH 8,3
 10 mM Glycin
 10 % Methanol

2.24.1 Immunologische Detektion

Durch die Verwendung des Streptavidin-markierten pASK-Systems ist es möglich, mittels Westernblot die Expression des insertierten Gens zu kontrollieren [SCHMIDT &

SKERRA 1993; TSIOSIS *ET AL.* 1995], ohne spezifische Antikörper gegen das Protein zu verwenden. Der primäre polyklonale Antikörper ist dabei das *Strep*-Tactin Alkalische Phosphatase-Konjugat.

Zur Blockierung unspezifischer Bindungen wird die Membran zunächst 1 Stunde lang bei Raumtemperatur mit 20 ml 3% BSA und 0,5 % Tween in PBS-Puffer abgesättigt. Danach wird die Membran drei mal 5 min lang mit PBS-Tween (PBS mit 0,1 % v/v Tween 20). Anschließend wird die Membran in 10 ml PBS-Tween und 2,5 µl „*Strep*-Tactin alkaline phosphatase conjugate“ (ST-AP, IBA GmbH Göttingen) 60 min lang bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend werden überschüssige Antikörper durch zweimaliges Waschen in PBS gefolgt von zweimaligem Waschen in PBS-Tween für jeweils 1 min entfernt.

Die chromogene Reaktion auf der Membran wird in 20 ml 100mM NaCl, 5 mM MgCl₂ und 100mM Tris/HCL pH 8.8 durch Zugabe von 10 µl 7,5 % w/v Nitrotetrazolium Blau (gelöst in 70 % v/v Dimethylformamid) und 60 µl 5 % w/v 5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl-Phosphat (gelöst in Dimethylformamid) gestartet [BLAKE *ET AL.*, 1984]. Im Lumi-Imager sind nach wenigen min bei 1 sec Exposition deutliche Signale erkennbar.

PBS-Puffer: 4 mM KH₂PO₄
 16 mM Na H₂PO₄

2.25 ENZYMATISCHE AKTIVITÄT DES EXPRIMIERTEN ENZYMS

Für den Nachweis der enzymatischen Aktivität werden zu dem in pASK IBA 7 exprimierten Enzym (siehe 2.22.5) unterschiedliche Substrate hinzugegeben, und die entstandenen Produkte im Anschluss detektiert.

2.25.1 Zellernte

Die über Nacht bei 18°C gewachsenen induzierten Zellen (siehe 2.22.5) werden 10 min lang bei 4°C und 6000 x g zentrifugiert. Nachdem der Überstand abgeschüttet worden ist, werden die Zellen in 10 ml Extraktionspuffer gewaschen und erneut zentrifugiert. Das entstandene Pellet wird in 5 ml Extraktionspuffer aufgenommen.

2.25.2 Zellaufschluss

Die Zellen werden mit einem Ultraschallgerät 4 mal 30 Sekunden aufgeschlossen. Die Zelltrümmer werden bei 11 000 x g abzentrifugiert. 3 ml des Überstands werden über eine vorher mit 10 ml Assaypuffer äquilibrierte Ionenaustauschersäule (EconoPac® 10DG, BIORAD) gegeben und mit 4 ml Testpuffer eluiert.

Testpuffer:			Extraktionspuffer:		
MOPSO-Puffer (pH7)	10	mM	MOPSO-Puffer (pH7)	10	mM
Glycerin	10	%	Glycerin	10	%
DTT	1	mM	DTT	5	mM
pH 7			MgCl ₂	50	mM
			KCl	100	mM
			Na-Ascorbat	5	mM
			PMSF	0,5	mM

2.25.3 Inkubation und Isolierung der Produkte

Je 300 µl des eluierten Enzymextrakts werden mit 662 µl Testpuffer, 20 µl 1 M MgCl₂, 2 µl 0,1 M NaWO₄ und 1 µl NaF gemischt und alternativ mit 15 µl [1-³H]GPP, [1-³H]FPP oder [1-³H]GGPP (37 GBq mol⁻¹; America Radiolabeled Chemicals, St.Louis, Mo., USA) zu einer Endkonzentration von 15 µM versetzt. NaWO₄ und NaF wurden dem Ansatz zugesetzt, um die im Rohextrakt in großer Menge vorhandenen Phosphorylasen zu inhibieren und somit den Verlust an Substrat gering zu halten. Der Ansatz wird mit 1 ml Pentan überschichtet und ca. 2 h lang in einem 30°C-warmen Wasserbad inkubiert. Danach werden noch 2 ml Pentan hinzugefügt und der Ansatz durchmischt (Vortex-Gerät). Nachdem 5 min lang bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert wurde, wird die Pentanphase mit einer Pasteurpipette abgehoben und in ein neues Reagenzglas überführt. Die verbleibende wässrige Phase wird mit 2 ml Ether ausgeschüttelt und die Etherphase mit einer Pasteurpipette in ein neues Reagenzglas überführt. Die Pentan- und die Etherphase werden (unter N₂-Strom) bis auf 1 ml eingedampft und in ein GC-Vial überführt, in dem sie vor der Messung durch Radio-GC bzw. GC/MS noch mal auf ein Volumen von ca. 0.5 ml eingedampft werden.

2.25.4 Geräteparameter

Radio-Gaschromatographie (Radio GC):

Die Radio-GC wurde an einem Hewlett-Packard 6890 Gaschromatograph durchgeführt (H_2 -Trägergas 2 ml^{-1} ; Splitloser Injektor, Temperatur: 220°C ; Injektionsvolumen: $2 \mu\text{l}$). Es wurde eine DB-WAX-Säule (Polyethylenglycol, $30 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm i.d.} \times 0,25 \mu\text{m}$ Filmdicke; J&W, Folsom, Kalifornien, U.S.A.) und ein Radioaktivitätsdetektor (TCD; 250°C) verwendet.

Temperaturprogramm:

1. 3 min bei 40°C
2. in 5°C -Schritten pro min auf die Endtemperatur von 240°C heizen
3. 10 min 240°C halten

Der Ausgang des TCD war an einen Radioaktivitätsdetektor gekoppelt. Das Eluat der Säule (9 ml pro min) wurde durch einen Konversionsreaktor mit 740°C heißen Platin-Platten geleitet. Nach Zugabe von Methan (Quenchgas; 12 ml pro min) gelang das Eluat in zwei unterschiedlich große (10 ml und 2 ml) in Serie geschaltete Behälter, in denen die Signale gezählt wurden. Signale Ergebnisse vom TCD und vom Radioaktivitätsdetektor wurden mit dem Hewlett-Packard Chemstation data system bearbeitet. Die radioaktiven Komponenten wurden durch Vergleich ihrer Retentionszeiten mit denen der unmarkierten Standards, die mit dem TCD aufgenommen wurden identifiziert. Der Gehalt an Radioaktivität jedes Peaks wurde prozentuell zur gesamten Radioaktivität der Probe (gemessen durch „liquid scintillation counting“) durch Vergleich jeden Peaks im Lauf bestimmt. Durch die Standardisierung der Peak-Höhe im Vergleich mit den co-injizierten unmarkierten und mit TCD gemessenen Standards wurde der Verlust an Radioaktivität während Probenkonzentration und der Injektion korrigiert.

Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS)

Gaschromatographie/Massenspektrometrie wurde an einem Hewlett-Packard 6890 Gaschromatographen durchgeführt (Trägergas: He mit 1 ml pro min ; Säule, Injektionsparameter und Temperaturprogramm: s.o.). Der GC/MS war mit einem Hewlett-Packard 5973 Quadrupol Massenspektrometer verbunden (Transferverbindungstemperatur: 230°C ; Temperatur der Quelle: 230°C ; Quadrupol-Temperatur: 150°C ; Ionisierungspotential: 70 eV ; Scanbereich: $50\text{-}400 \text{ amu}$). Die Terpene wurden durch Ver-

gleich der Retentionszeiten mit Standards und durch Spektrenvergleich mit Terpenen aus Bibliotheken (Wiley und NIST) identifiziert.

3 ERGEBNISSE

3.1 GENOMISCHE DNA

Ziel war es, größere Fragmente der genomischen DNA zu erhalten um daraus neue, homologe, Primer für RT-PCR ableiten zu können. In PCR-Versuchen mit genomischer DNA und degenerierten Primern war es bereits gelungen, kleine Fragmente der genomischen DNA mit hohen Homologien zu Terpensynthesen zu amplifizieren [KNÖß 1996]. Die Primer der PCR-Reaktion wurden mittels einer Strategie zu Bildung von Primern entwickelt, welche bereits erfolgreich zur Amplifizierung anderer Terpensynthesefragmente angewendet wurde [WILDUNG M.R. & CROTEAU 1996; BOHLMANN J. *ET AL.* 1997] (siehe 3.1.1.). Terpensynthesen besitzen eine stark konservierte Intron-Exon-Struktur (siehe 3.1.3). Deshalb konnte im Vergleich mit anderen bereits bekannten Terpensynthesesequenzen eine Bereiche Exons abgeschätzt werden, aus welchen dann homologe Primer für RT-PCR abgeleitet werden konnten.

3.1.1 PCR mit degenerierten Primern

Die degenerierten Primer, welche für die ersten PCR-Versuche im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt wurden, wurden aus den vorherigen Untersuchungen [KNÖß 1996] übernommen. In diesen Untersuchungen waren die Sequenzen von 5 bereits charakterisierten Terpensynthesen (epi-Aristolochensynthase aus *Nicotiana tabacum* [FACCHINI & CHAPPELL, 1992], Limonensynthase aus *Mentha piperita* [COLBY *ET AL.*, 1993], Casbensynthase aus *Rhcinus communis* [MAU & WEST, 1994], Cadinensynthase aus *Gossypium arboreum* [CHEN, 1995] und Vetispiradiensynthase aus *Hyoscyamus muticus* [BACK & CHAPPELL, 1995]) verglichen und aus den zugehörigen Gensequenzen dreier konservierter Bereiche degenerierte Primer abgeleitet worden.

Die Primersequenzen wurden bestimmt, indem zu einen Nukleotide übernommen wurden, die in allen zum Vergleich vorliegenden Sequenzen übereinstimmten. In den anderen Fällen wurden wegen ihrer verwandtschaftlichen Nähe zu *M. vulgare* die Nukleotide der Terpensynthesen aus Lamiaceae und Solanaceae stärker gewichtet oder die Primer wurden so synthetisiert, dass aufgrund des degenerierten genetischen Codes an bestimmten Stellen unterschiedliche Nukleotide in die Primer eingebaut wurden. Die abgeleiteten Primer wurden als Primer A, B und C bezeichnet.

Zu Beginn dieser Arbeit wurde die bereits von KNÖß durchgeführte PCR wiederholt und die erhaltenen Fragmente anschließend sequenziert. Es wurden die Primer A und B sowie jeweils der Gegenstrangprimer C eingesetzt. Während die Primerkombination B und C keine Amplifikate ergab, konnte mit den Primern A und C ein 505 bp großes Fragment amplifiziert werden (AZ3). Dieses Fragment besaß eine Identität von 56%-59% mit bereits bekannten Terpensynthesesequenzen aus Angiospermen (z.B. epi-Aristolochensynthase aus *Nicotiana tabacum* [FACCHINI & CHAPPELL, 1992], Vetispiradiensynthase aus *Hyoscyamus muticus* [BACK & CHAPPELL, 1995]). Berücksichtigt man den konservativen Aminosäureaustausch, der vermutlich nicht zu einer Änderung in Struktur und Funktion führt („Ähnlichkeit“), stimmen sie sogar zu 70%-73% überein (siehe Tab. 3.1).

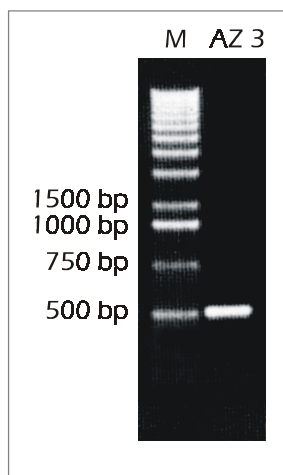


Abb. 3.1: Elektropherogramm des AZ3-Fragmentes
M: λ-DNA-Leiter; AZ3: PCR-Fragment mit Primern A/B

Es wurden versucht, weitere Primer mittels der o.a. Strategie abzuleiten. Der Schwerpunkt dabei lag auf Sequenzen von Diterpensynthesen. Da jedoch keine ausreichende Menge bekannter Diterpensynthesesequenzen aus Angiospermen vorlag, konnten keine Diterpensynthase-spezifischen Primer abgeleitet und daraus Amplifikate erhalten werden.

3.1.2 Fragmentverlängerung durch partielle inverse PCR

Die inverse PCR ist eine gängige Methode, um die Sequenz flankierender Bereiche einer bekannten Sequenz genomischer DNA zu erhalten [OCHMAN H. *ET AL*, 1988; TRIGLIA T. *ET AL*, 1988]. Da die Restriktionsschnittstellen der flankierenden Bereiche von AZ3 nicht bekannt waren, wurde eine partielle inverse PCR durchgeführt (siehe

2.13). Die dafür eingesetzten Primer I1 und IR2 wurden vom 5'- und vom 3'-Ende des durch Primer A und C amplifizierten Fragments (AZ3) in Richtung des unbekannten Bereichs abgeleitet. Die Position der Primer wurde so gewählt, dass eine ausreichende Überlappung mit der bekannten Sequenz zu erwarten war (siehe Abb. 3.2). Somit konnte durch Vergleich mit AZ3 überprüft werden, ob neu erhaltene Fragmente tatsächlich die flankierenden Bereiche des Ausgangsfragments sind.

Es konnte ein 843bp großes Fragment amplifiziert (AZ5) werden. Dieses Fragment erweiterte die bekannte Sequenz zum 5'-Ende um 54bp und zum 3'-Ende hin um 474bp. Die Überlappung mit AZ3 betrug zum 5'-Ende hin 148bp und zum 3'-Ende hin 167bp. In diesem Bereich stimmten die Sequenzen von AZ3 und AZ5 zu 100% überein.

Mit Hilfe des erhaltenen Fragments konnten weitere neue Primer nach beiden Richtungen abgeleitet werden.

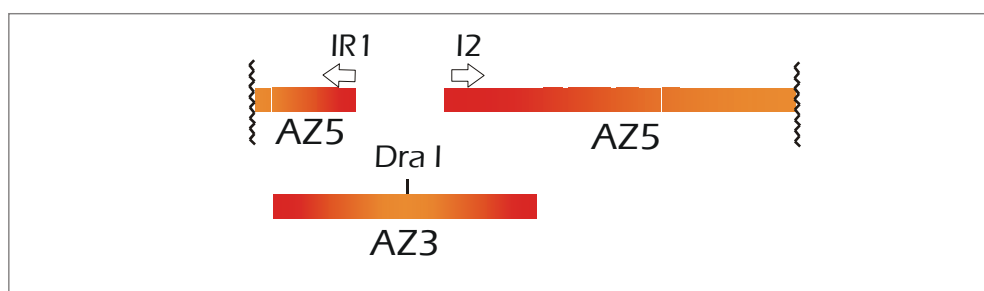


Abb. 3.2: Position des aus der partiellen inversen PCR gewonnenen Fragmentes AZ5 in Relation zu dem bereits bekannten Fragment AZ3. Die Zickzacklinie zeigt die *Sau3AI*-Schnittstelle, an der das Fragment AZ5 enzymatisch geschnitten wurde (siehe Abb. 2.1)

3.1.3 GenomeWalker™

Aufgrund des Vergleichs mit anderen genomischen Sequenzen bereits identifizierter und charakterisierter Terpensynthasen wurden für die Sequenz des Gens auf genomischer Ebene Fragmente über 2 kb erwartet. Die partielle inverse PCR erwies sich aufgrund der großen Anzahl an *Sau3A1*-Schnittstellen als eine ungeeignete Methode zur Amplifizierung großer Fragmente (siehe 2.13 unten). Mit Hilfe der Methode des „Genome Walkings“ [POPPE *ET AL* 1999; SIEBERT *ET AL* 1995] (siehe 2.14) war es möglich, das 5'- und das 3'-Ende mit jeweils zwei PCR-Reaktionen zu erhalten. Die mittels der Methode des „Genome Walkings“ erhaltenen genomischen Bibliotheken wurden mit

den Restriktionsenzymen *Dra* I und *Hinc* II hergestellt (siehe 2.14.). Nachdem die Adaptoren ligiert wurden, konnten mit dem Adapter-Primer und unterschiedlichen genspezifischen Primern insgesamt 4 Fragmente (siehe Abb. 3.3) isoliert werden.

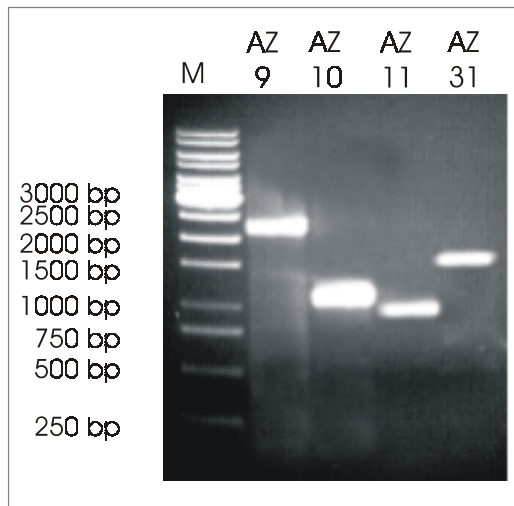


Abb. 3.3: Elektropherogramm der durch GenomeWalker™ amplifizierten Fragmente

M: λ -DNA-Leiter; AZ9 Fragment mit den Primern 534/AP1 , AZ10 mit den Primern I2/AP1, AZ11 mit den Primern IR1/AP1 und AZ32 mit den Primern 1.PCR/AP1 amplifiziert

Zum 3'-Ende hin konnte aus der *Dra* I - Bibliothek (siehe 2.14) mit der Primerkombination 534 / AP1 ein 2,15 kb großes Fragment amplifiziert werden (AZ9). Aufgrund seiner Größe wurden zur vollständigen Sequenzierung aus diesem Fragment Subklone (AZ9a-f) hergestellt (siehe 3.1.3.1). Die Position von AZ9 im Vergleich mit cDNA-Sequenzen anderer Terpensynthasen ließ vermuten, dass dieses Fragment höchstwahrscheinlich das Tanslationsende enthält. Aus der *Hinc* II – Bibliothek wurde zum 3'-Ende hin mit der Primerkombination I2 – AP1 ein 1028 bp großes Fragment (AZ10) isoliert. Die Sequenz dieses Fragmentes bestätigte die Sequenz des Fragmentes aus der *Dra* I-Bank. Die Größe des aus der *Dra* I – Bank isolierten Fragmentes zum 5'-Ende hin betrug 910 bp (AZ11). Es gelang nicht, über diese Sequenz hinaus weitere Fragmente zum Translationsstart hin zu amplifizieren. Erst nach Erhalt des Translationsstarts aus der cDNA über die Methode der RACE-PCR (siehe 2.20) ist es gelungen, mittels eines Primers am 5'-Ende und dem Adaptorenprimer aus der *Dra* I –Bank ein 1,6kb - Fragment zu amplifizieren. Dieses Fragment verband den putativen Translationsstart mit dem Rest der bereits bekannten Sequenz (AZ31). Es ist zu vermuten, dass durch die Existenz einer AT-reichen Region direkt hinter dem 910 bp-Fragment die Amplifizierung von der 3'-Richtung aus bis zum 5'-Ende hin erschwert wurde. Die einzelnen erhaltenen Fragmente überschneiden

sich hinreichend, sodass angenommen werden kann, dass alle Teilbereiche aus derselben Terpensynthase stammen. Die nach Zusammensetzen der Teilfragmente erhaltene genomische Sequenz besitzt eine Größe von 3976 bp.

3.1.3.1 Herstellung von Subklonen des pAZ9

Das Plasmid pAZ9 enthielt ein Fragment mit einer Größe von 2,15 kb. Um die gesamte Sequenz eindeutig identifizieren zu können, wurde das Plasmid mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut, die entstandenen Fragmente in pGemT-Easy inseriert, kloniert und die erhaltenen sequenzierten Fragmente zu einer vollständigen Sequenz zusammengesetzt.

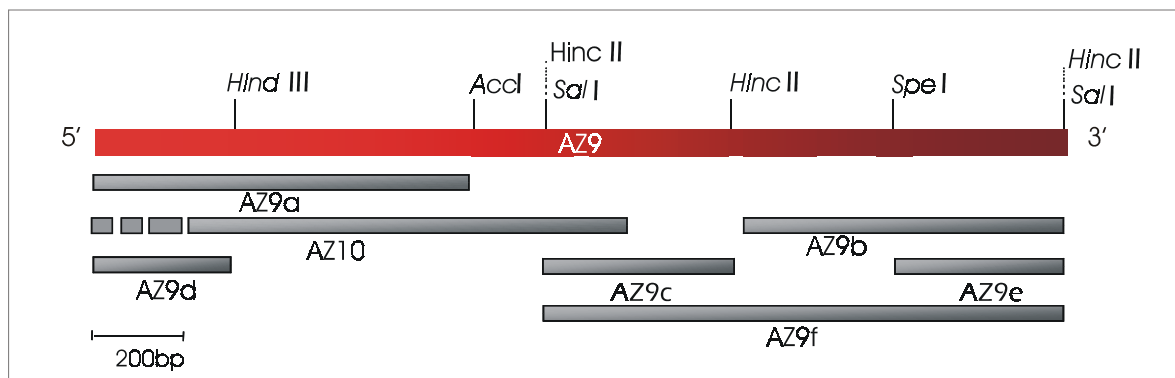


Abb. 3.4: Sequenzierschema des pAZ9

Die rote Box zeigt das durch Genome Walker™ gewonnene Fragment AZ9. Die durch Restriktion von pAZ9 mit verschiedenen Restriktionsenzymen gewonnenen Subklone sind grau dargestellt. Der überlappende Teil von AZ10 bestätigt die Sequenz von AZ9.

Die aufgestellte Sequenz der genomischen DNA (siehe Anhang) wurde mit mehreren bereits bekannten Terpensynthase-Sequenzen auf cDNA-Ebene verglichen. Da die Exon-Intron-Strukturen in Terpensynthasen stark konserviert sind [MAU & WEST 1994, BACK & CHAPPELL 1995, BOHLMANN *ET AL.* 1998 (A), CSEKE *ET AL.* 1998], konnte durch diesen Vergleich eine vermutliche Intron- und Exonstruktur der genomischen Sequenz angenommen werden (siehe Abb. 3.5). Aus den putativen Exonbereichen wurden daraufhin neue Primer für RT-PCR entwickelt.

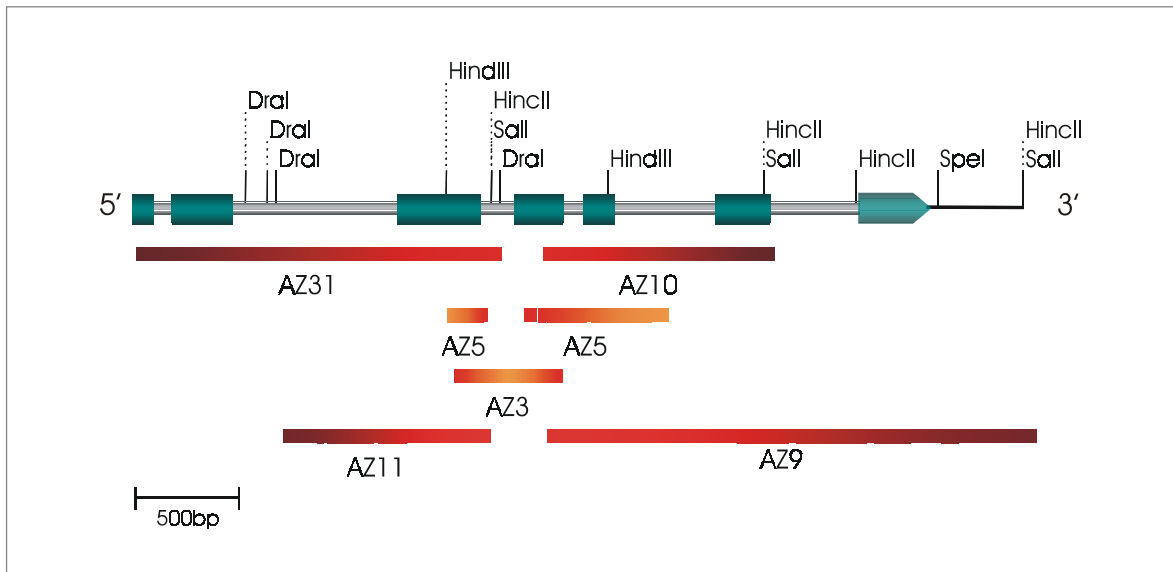


Abb. 3.5: Vermutete genomische Struktur des putativen Terpensynthase- Gens und die zugrunde liegenden DNA-Fragmente. Vermutete Exonbereiche sind als grüne und die dazwischen liegenden Intronbereiche als schmale graue Boxen gekennzeichnet. Die Positionen der genomischen Klone, aus denen die genomische Sequenz zusammengesetzt wurde, sind mit roten Balken wiedergegeben.

3.1.4 Southern Blot Analyse

Es wurden Southern Blot Analysen durchgeführt, um Informationen über die Kopienzahl des Gens der putativen Terpensynthase zu erhalten. Besitzt ein Organismus mehrere Kopien eines Gens, so sind diese in den seltensten Fällen identisch. Diese Kopien sind im Laufe der Evolution aus einem in dieser Form nicht mehr vorhandenen Gen hervorgegangen. Die Ursprungssequenz ist, ebenso wie die Kopien, Mutationsereignissen ausgesetzt. Besonders bemerkbar machen sich solche Mutationen in intergenischen Regionen und Intronbereichen, da sie dort keinem Selektionsdruck unterliegen [DEAN C. & SCHMIDT R. 1995].

Die isolierte genomische DNA aus *M. vulgare* wurde mit den Restriktionsendonukleasen *Dra* I, *Hinc* II und *Sau* 3AI geschnitten, aufgetrennt und die Restriktionsfragmente auf eine Membran übertragen. Anschließend wurde die Membran bei stringenten Bedingungen (65°C) mit einem Subklon aus pAZ9 (pAZ9d; siehe Abb. 3.4) hybridisiert. Die Sonde wurde aus dem am höchsten konservierten Bereich ausgewählt. Dieser ergab sich aus dem Vergleich der Sequenz der genomischen DNA mit cDNA-Sequenzen anderer pflanzlicher Terpensynthasen. Abb. 3.6 zeigt die Position der Sonde

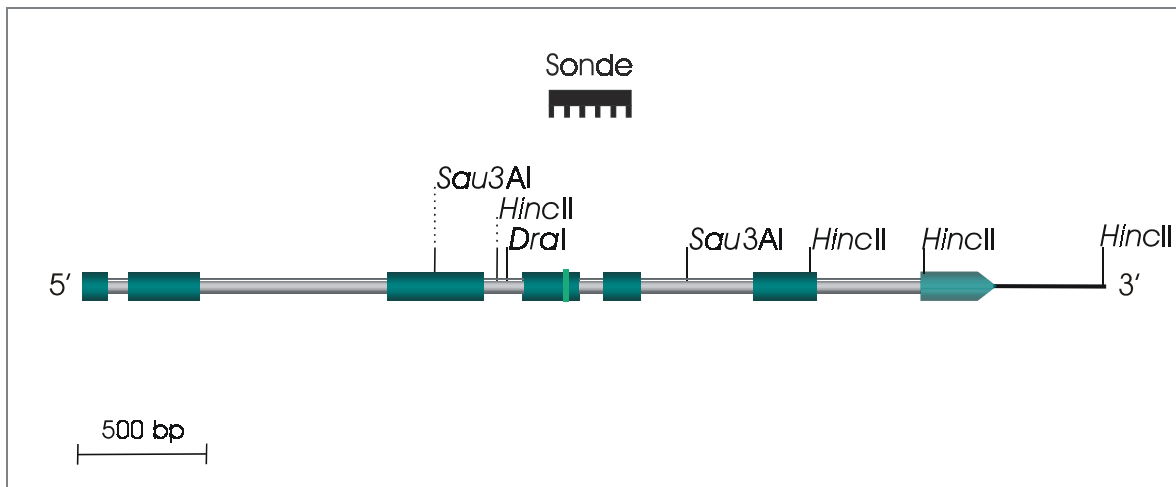


Abb. 3.6: Position der für den Southernblot verwendeten Sonde auf der genomischen DNA
Eingezeichnet sind die für den Southernblot relevanten Schnittstellen der verwendeten Enzyme und die Position der Sonde AZ9d auf der genomischen DNA. Der grüne Balken markiert den hochkonservierten Bereich in Terpensynthasen (DDxxD-Motiv).

Anhand der unter 3.1.3 beschriebenen Charakterisierung der genomischen Sequenz wurde für *DraI* ein Fragment mit einer Größe von >2000 bp, für *HincII* ein 1213 bp großes Fragment und für *Sau3AI* ein 917 bp großes Fragment erwartet.



Abb. 3.7: Southernblot-Analyse (siehe 2.16.1)
Genomische DNA wurde mit den angeführten Restriktionsenzymen verdaut, mit einer Sonde aus AZ9d hybridisiert und mit dem AlkPhos-Sytem (siehe 2.16.2) detektiert.

In allen Spuren zeigten sich die erwarteten Fragmente (siehe Abb. 3.7). Weitere Fragmente waren nicht zu erkennen. Aufgrund dieses Ergebnisses liegt vermutlich lediglich eine Kopie dieser Terpensynthase im gesamten Genom vor (Single-copy-gene).

3.2 ISOLIERUNG DER cDNA-SEQUENZ AUS *MARRUBIUM VULGARE*

Nachdem die genomische Sequenz einer putativen Terpensynthase nun vorlag, wurde der Frage nachgegangen, ob dieses Gen tatsächlich transkribiert wird.

Terpensynthasen des Sekundärmetabolismus werden in geringeren Mengen als die des Primärmetabolismus gebildet. Daher wurden in den meisten in der Literatur beschriebenen Fällen Terpensynthasen untersucht, deren Bildung experimentell induziert werden kann [FACCHINI & CHAPPELL 1993; CHEN *ET AL* 1995; BACK & CHAPPELL 1995; MAU & WEST 1994; LOIS & WEST 1994]. Bis jetzt ist es noch nicht gelungen, die Terpenproduktion in *M. vulgare* durch Elicitoren oder andere Faktoren zu beeinflussen [GORMANN R. 1994; WILHELM S. 1993]. Falls die auf genomischer Ebene gefundene Terpensynthase tatsächlich transkribiert wird, musste davon ausgegangen werden, dass sie nur in geringen Mengen in der Pflanze vorkommt.

Aus diesem Grunde wurden verschiedene Strategien angewendet, um trotz dieses Nachteils ein Transkript bzw. die cDNA zu erhalten:

1. RT-PCR (siehe 3.2.1)
2. die Herstellung einer λ -gt-cDNA-Bibliothek (siehe 3.2.2)
3. RACE-PCR (siehe 3.2.3)

3.2.1 RT-PCR

Die RT-PCR ist eine geeignete Methode, Fragmente aus einer in cDNA umgeschriebenen mRNA zu amplifizieren. Durch RT-PCR mit entsprechenden Primern amplifizierte Fragmente geben daher zum einen die Bestätigung, dass die vorliegende genomische DNA transkribiert wird, zum anderen eignen sich diese Fragmente als Sondenmatrizen für Northernblot-Analysen.

Terpensynthasen besitzen stark konservierte Exon–Intron-Strukturen [FACCHINI & CHAPPELL J. 1992; MAU & WEST 1994; AUBOURG *ET AL* 1997]. Daher konnten durch Vergleich der genomischen Sequenz mit der cDNA verschiedener Terpensynthasen Exonbereiche angenommen werden (siehe 3.1.3), aus denen Primer für die RT-PCR abgeleitet wurden. Die Primer wurden anhand ihrer Position innerhalb der genomischen

schen DNA benannt. Die Primerkombinationen wurden so ausgewählt, dass zwischen beiden Primern jeweils ein angenommener Intronbereich lag.

3.2.1.1 Amplifizierung von cDNA-Fragmenten aus *M. vulgare*

Nach der ersten RT-PCR mit den Primerkombinationen 798/2643c und A2/2643c (A2 ist ein homologer Primer, welcher aus dem degenerierten Primer A abgeleitet wurde) wurde mit der cDNA aus der ersten PCR eine Nested PCR durchgeführt. In dieser PCR wurde Primer 798 gegen Primer 1252 und Primer A2 gegen Primer 798 ausgetauscht. Damit gelang es ein 453bp großes (AZ13) und ein 757 bp großes Fragment (AZ14) aus der cDNA zu amplifizieren (siehe Abb. 3.8).

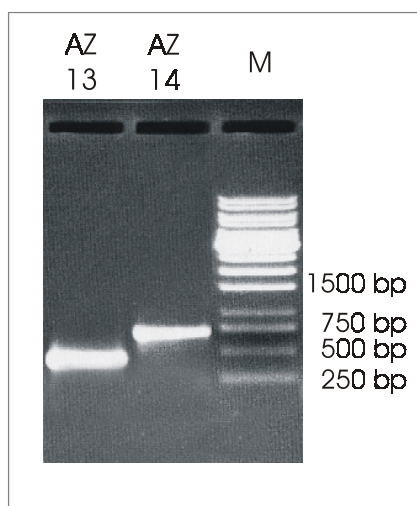


Abb. 3.8: Gelelektrophoretische Auftrennung der Fragmente AZ13 und AZ14 nach der Nested PCR
M: λ -DNA-Leiter; Primer AZ13: 1252/2643c; Primer AZ14: 798/2643c

Diese Fragmente sind identisch mit der Sequenz des angenommenen Exonbereiches der genomischen Sequenz (siehe Abb. 3.11). Sie bestätigten die im Vergleich mit anderen Terpensynthasen für die genomische Sequenz vermuteten Exon/Intron-Strukturen.

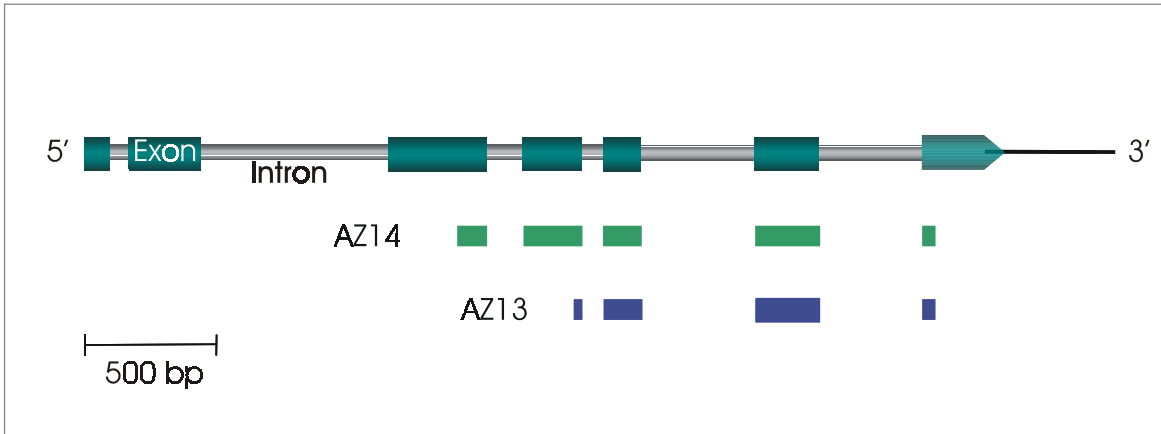


Abb. 3.9: Vergleich der genomischen DNA aus *M. vulgare* mit den durch RT-PCR gewonnenen cDNA-Fragmenten. Die aus anderen Terpensynthasesequenzen abgeleiteten Exonbereiche sind als rote Boxen die Intronbereiche als graue schmale Boxen dargestellt. Die schwarze Linie gibt den nichttranslatierten Bereich wieder. Die blauen Boxen zeigen die Übereinstimmungen mit der Sequenz von AZ13, die grünen Boxen die Übereinstimmungen mit AZ14.

3.2.1.2 Isolierung von Fragmenten der kleinen Untereinheit der Ribulose-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (RubisCO)

Die primäre Zielsetzung der Isolierung der kleinen Untereinheit der Ribulose-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (RubisCO) war es, geeignete Primer und Sonden zu entwickeln, mit denen die Qualität der mRNA bzw. RNA kontrolliert werden konnte: Wenn es gelang, aus der gewonnenen mRNA bzw. RNA Fragmente der RubisCO zu amplifizieren, war es aussichtsreich, aus dieser mRNA bzw. RNA Fragmente von Terpensynthasen amplifizieren zu können. Die RubisCO ist ein Enzym des Primärmetabolismus in Pflanzen und katalysiert die Schlüsselreaktion für die photosynthetische CO₂-Assimilation. Sie besteht aus acht identischen großen Untereinheiten und acht identischen kleinen Untereinheiten. In Pflanzen ist die genetische Information für die große Untereinheit in den Plastiden codiert und für die kleine Untereinheit im Zellkern [ANDREWS & LORIMER 1987].

Zur Ableitung geeigneter Primer wurden mehrere bekannte Sequenzen der kleinen Untereinheit der RubisCO aus verschiedenen Pflanzen miteinander verglichen. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Sequenzen aus Pflanzen von Familien stammten, welche phylogenetisch möglichst nah mit der Familie von *Marrubium vulgare* (Lamiaceae) verwandt sind (*Lycopersicon esculentum* [PICHESKY, E. ET AL. 1986], *Solanum tuberosum*

[WOLTER, F.P. *ET AL.* 1988] , *Nicotiana tabacum* [MAZUR B.J. UND CHUI C.F. 1985]. Neben diesen wurden zum Vergleich auch noch die Sequenzen von *Pyrus malus* [BEUNING L.L 1994] und *Glycine max* [CHO T.-J. 1992] herangezogen. Aus zwei daraus hervorgegangenen konservierten Bereichen wurden ein Hin- und ein Rückprimer abgeleitet (R1 und R2). Mit diesen Primern gelang es, aus *M. vulgare* isolierter RNA ein 255 bp großes Fragment zu amplifizieren. Das Fragment besitzt im Vergleich mit kleinen Untereinheiten der RubisCO aus unterschiedlichen Pflanzen Identitäten von 75-82% und Ähnlichkeiten von 83-86%. Damit konnte mit Hilfe dieses Fragments und dieser Primer die Qualität isolierter mRNA und RNA überprüft werden.

3.2.2 cDNA-Bank

Die RT-PCR-Versuche haben gezeigt, dass die amplifizierte genomische DNA auch transkribiert wird. Für die Charakterisierung einer Terpensynthase war es zunächst erforderlich, die vollständige mRNA-Sequenz bzw. die entsprechende cDNA zu isolieren. Dazu können mehrere Methoden angewendet werden. Eine Möglichkeit ist das Erstellen einer cDNA-Bank. Diese Methode bietet den Vorteil, mit verschiedenen Sonden oder mit der selben Sonde, aber variabler Stringenz nach unterschiedlichen Genen suchen zu können. Sie wurde bereits erfolgreich für die Isolierung von Terpensynthasegenen verwendet [BOHLMANN *ET AL* 1997; FACCHINI & CHAPPELL 1992]. Diese cDNA-Banken wurden aus der mRNA vorher elicierter Pflanzen oder aus der mRNA angereicherten Materials (z.B. aus Drüsenschuppen) hergestellt.

Für *M. vulgare* sind bislang noch keine effektiven Elicitoren, welche die Terpenbiosynthese beeinflussen, gefunden worden [GORMANN. R. 1994, WILHELM S. 1993]. Auch die Isolierung der Drüsenschuppen, dem Syntheseort vieler Terpensynthasen [GERSHENZON 1989; CHAPPELL 1995], aus *M. vulgare* zur Anreicherung der Terpensynthasen ist aufgrund der Behaarung schwierig. Im Gegensatz zu den von den o.a. Terpensynthasen gebildeten Produkten ist jedoch davon auszugehen, dass die meisten Terpene in *M. vulgare* voraussichtlich konstitutiv gebildet werden. Somit konnte angenommen werden, dass die Suche nach Terpensynthasen in einer cDNA-Bank aus Blatt-mRNA von *M. vulgare* erfolgreich sein könnte.

Es ist gelungen, eine cDNA-Bank mit einem geeigneten Titer ($1,56 \cdot 10^6$) herzustellen (siehe 2.18). Diese wurde mit einer radioaktiv markierten Sonde aus pAZ8 (300 bp) bei einer Temperatur von 60°C hybridisiert. Bei diesem Screening zeigte sich eine relativ hohe Zahl positiver Signale. Die Plaques, welche positive Signale hervorbrachten,

wurden für die *in-vivo*-Excision des ZAP-Express-Vektors eingesetzt und die daraus hervorgegangenen Klone sequenziert (siehe 2.18). Die positiven Signale ergaben sich nach der Sequenzierung entweder überhaupt keine Homologien oder keine Homologien zu Terpensynthasen. Die hergestellte cDNA-Bank wurde jedoch für weitere Screenings nach den Angaben des Herstellers (siehe 2.18) konserviert.

3.2.3 RACE-PCR

Eine weitere Möglichkeit, die vollständige cDNA-Sequenz zu erhalten, ist die RACE-PCR. Durch diese Methode können die Sequenzen zum 5'- und zum 3'-Ende hin erhalten werden. Aus diesen können dann Primer abgeleitet werden, mit denen die vollständige cDNA amplifiziert werden kann. Im Unterschied zur cDNA-Bank wird bei dieser Methode die gesuchte cDNA schon bei der Erststrangsynthese angereichert, sodass geringere Mengen RNA ausreichen, um die gewünschten Amplifikate zu erhalten. Wie schon bei der RT-PCR (siehe 3.2.1) wurden verschiedene Primer verwendet, die aus den angenommenen Exonbereichen der genomischen Sequenz abgeleitet worden waren. Mit diesen Primern gelang es, mehrere Fragmente zum 5'- und zum 3'-Ende hin zu amplifizieren. Diese Sequenzen ergaben zusammengesetzt eine 1932bp große Sequenz (siehe Abb. 3.10). In ihren überlappenden Bereichen zeigten die einzelnen Sequenzen im Rahmen der Sequenzier-Ungenauigkeit keine Unterschiede.

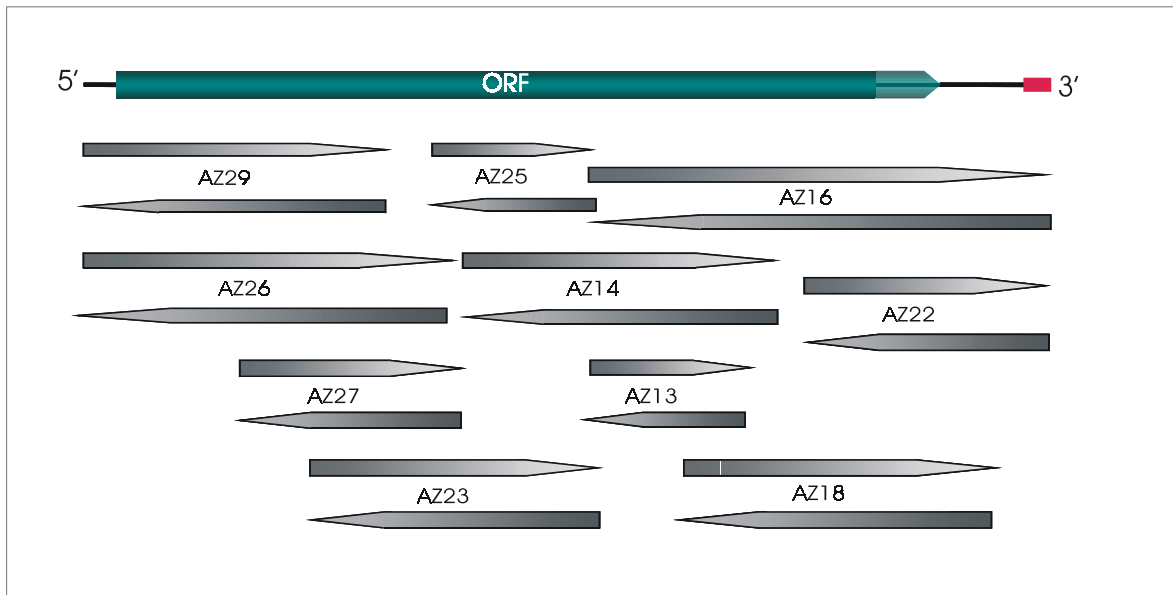


Abb. 3.10: Zuordnung der aus mRNA von *M. vulgare* mit RACE-PCR gewonnenen Fragmente zur vollständigen cDNA. Der offene Leserahmen ist als grüner Pfeil dargestellt. Die kleine rote Box zeigt die poly-A⁽⁺⁾-Region. Die schwarze Linie kennzeichnet den nicht-translatierten Bereich. Die sequenzierten Klone mit Fragmenten der RACE bzw. RT-PCR, aus denen die Sequenz der cDNA zusammengesetzt wurde sind als graue Pfeile (geben die Richtung der Sequenzierung an) dargestellt.

Die erhaltene cDNA wurde mit der genomischen DNA von MVTPS1 verglichen. Die daraus hervorgegangenen Exonbereiche und bestätigten die durch den Vergleich der genomischen DNA mit cDNA-Sequenzen bereits bekannter Terpensynthasen abgeschätzte Position der Exonbereiche (siehe Abb. 3.11).

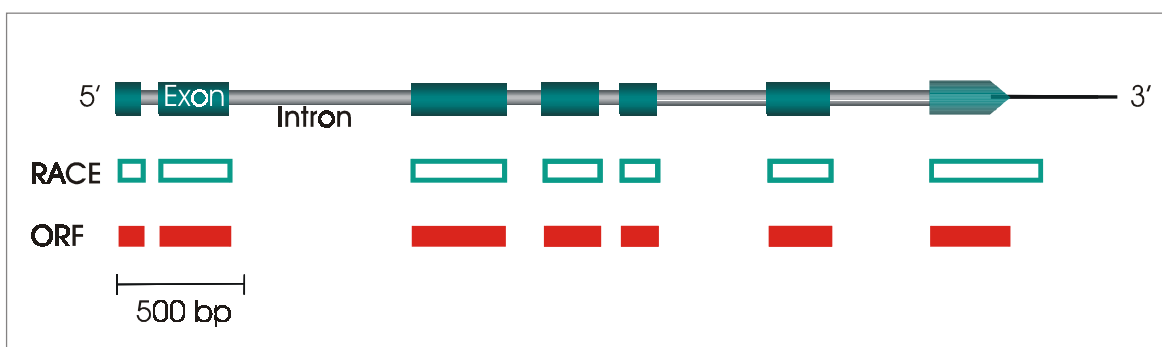


Abb. 3.11: Vergleich der aus der RACE-PCR erhaltenen zusammengesetzten cDNA-Sequenz und des daraus bestimmten ORF mit den angenommenen Exonbereichen der genomischen DNA von MVTPS1. Die angenommenen Exon-Bereiche auf der genomischen DNA sind als grüne Boxen und die daraus resultierenden Intron-Bereiche als schmale graue Boxen dargestellt. Die mit der genomischen DNA homologen Bereiche der aus der RACE-PCR erhaltenen Sequenz sind als Boxen mit grünen Umriss und die homologen Bereiche des ORF als rote Boxen dargestellt.

Aus der durch die RACE-PCR erhaltenen zusammengesetzten Sequenz wurden am 5'- und am 3'-Ende Primer abgeleitet, welche für die Amplifizierung der vollständigen cDNA eingesetzt werden konnten. Dabei wurde die Technik der Nested-PCR angewendet: Nach der ersten PCR mit Primern, die außerhalb des ORF lagen, wurde eine zweite (Nested-) PCR mit dem Produkt der ersten PCR als Template durchgeführt. Die Primer der Nested-PCR beinhalten neben Restriktionsschnittstellen, mit denen sie im Anschluss in die entsprechenden Expressionsvektoren kloniert werden konnten, jeweils das Start- bzw. das Stoppcodon des ORF. In Abb. 3.12 ist das Elektropherogramm mit dem Amplifikat des ORF der vollständigen cDNA gezeigt

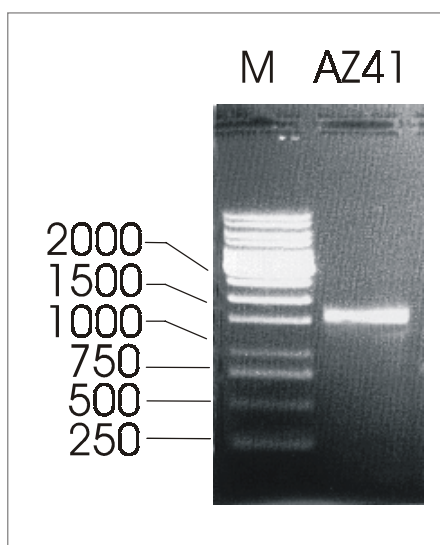


Abb. 3.12: Elektropherogramm des durch RT-PCR gewonnenen ORF der vollständigen cDNA von MVTPS1 aus *M. vulgare*. Agarose-Gelelektrophorese der Nested PCR mit den Primern 5'*Eco*31I und 3' *Eco*31I. Als Marker (M) wurde eine 1kb-λ-DNA-Leiter verwendet (siehe 2.19).

3.3 UNTERSUCHUNGEN DER MVTPS1 IN *MARRUBIUM VULGARE*

3.3.1 Charakterisierung der MVTPS1

Innerhalb der aus *M. vulgare* isolierten cDNA-Sequenz mit der exakten Länge von 1907 bp (1879 bp ohne PolyA⁺-Anhang) wurde mittels des Programms Sci Ed Central for Windows 95 Vers 1.2 (Scientific & Educational Software) ein 1641bp großer offener Leserahmen (ORF) identifiziert. Ein Vergleich der vollständigen cDNA-Sequenz mit der genomischen Sequenz ergab, dass die Sequenzen in den Exonbereichen der genomischen DNA mit der cDNA übereinstimmten (siehe Anhang). Demnach enthält die genomische Sequenz 7 Exons und 6 Introns (siehe Abb. 3.11).

Die putative Terpensynthase wird im Folgenden als MVTPS1 bezeichnet. Die Aminosäuresequenz des ORF wurde mit Sequenzen bereits charakterisierter Terpensynthasen aus Angiospermen verglichen. Diese Sequenzen besitzen zu der Aminosäurese-

quenz von MVTPS1 Identitäten von 55-37% und Ähnlichkeiten von 74-56% (siehe Tab. 3.1).

Tab. 3.1: Ähnlichkeiten und Identitäten der Aminosäuresequenz bereits charakterisierter Terpensynthasen zu der Aminosäuresequenz der putativen Terpensynthase MVTPS1
Id.= Identität; Ähnl. = Ähnlichkeit (konservativer Basenaustausch)

Synthase von	Pflanze	Id.	Ähnl.	Quelle
Vetispiradien	<i>Solanum tuberosum</i> L.	55%	74%	YOSHIOKA ET AL (1999)
Vetispiradien	<i>Lycopersicon esculentum</i> L.	54%	73%	PORTO LE BLANCH ET AL
5-Epi-Aristolochen	<i>Nicotiana tabacum</i> L.	55%	73%	FACCHINI & CHAPPELL (1992)
Vetispiradien	<i>Hyoscyamus muticus</i> L.	55%	73%	BACK UND CHAPPELL (1995)
(+)-Δ-Cadinen	<i>Gossypium hirsutum</i> L.	44%	63%	TOWNSEND UND LLEWELLYN
Germacren C	<i>Lycopersicon esculentum</i> L.	41%	62%	COLBY ET AL (1998)
(E)-β-Farnesen	<i>Citrus junos</i> L.	41%	60%	MARUYAMA ET AL
8-Epi-Cedrol	<i>Artemisia annua</i> L.	40%	59%	HUA UND MATSUDA (1999)
Amorpha-4,11-dien	<i>Artemisia annua</i> L.	37%	56%	MERCKE ET AL (2000)

Ein Multi-Way Alignment der in der Tabelle 3.1 aufgeführten Terpensynthasen mit dem in Aminosäuren übersetzten ORF der putativen Terpensynthase zeigte in vielen Bereichen eine signifikante Ähnlichkeit (siehe Abb. 3.13). Obwohl für das Alignment nur die durch BLAST-Search festgestellten sieben ähnlichsten Terpensynthasen ausgewählt wurden, ist zu erkennen, dass zum aminoterminalen und zum carboxyterminalen Ende die Sequenzen der Synthasen differieren. Im mittleren Bereich, in welchem sich das aktive Zentrum befindet [BOHLMANN *ET AL.* 1998 (A)], sind die Aminosäuren stark konserviert. Die größte Ähnlichkeit mit MVTPS1 wiesen die Sesquiterpensynthasen Epi-Aristolochensynthase (aus *Nicotiana tabacum*) und Vetispiradiensynthase (aus *Solanum tuberosum*) auf.



Abb. 3.13: Multi-Way Protein Alignment von zu MVTPS1 ähnlichen Terpessynthasen

Die Boxen stellen die Bereiche signifikanter Ähnlichkeit dar. Abk.: VSt: Vetispiradiensynthase (*Solanum tuberosum*); EASnt: Epi-Aristolochensynthase (*Nicotiana tabacum*); ECSAa: Epi-Cedrolsynthase (*Artemisia annua*); ADSAa: Amorpha-4,11-diensynthase (*Artemisia annua*); DCSGh: Δ -Cadinensynthase (*Gossypium hirsutum*); GSLc: Germacren C Synthase (*Lycopersicon esculentum*); BFSCj: (E)- β -Farnesensynthase (*Citrus junos*). Parameter: Scoring Matrix: Blosum62; Similarity significance value cutoff: $\geq 60\%$ Literatur zu Sequenzen: siehe Tab. 3.1

Diese Daten bestätigten, dass die isolierte Sequenz mit hoher Wahrscheinlichkeit das Gen einer Terpessynthase ist.

Der Start der Translation ist durch das Triplett ATG und der Stopp durch TAA gekennzeichnet. Es liegen keine Anzeichen für eine Signalpeptidsequenz im N-terminalen Bereich vor. Da Mono- und Diterpene nach dem derzeitigen Kenntnisstand in den Plastiden synthetisiert werden [GERSHENZON UND CROTEAU 1993; BOHLMANN *ET AL* 1997; COLBY *ET AL* 1993] und somit ihre Synthasen eine Transitpeptidsequenz aufweisen, ist die aus *M. vulgare* isolierte Synthase aufgrund der fehlenden Signalpeptidsequenz vermutlich eine Sesquiterpessynthase.

3.3.2 Expression von *mvtps1*

Zur Kontrolle der Aktivität des aus *mvtps1* exprimierten Enzyms wurde das Gen in *Escherichia coli* BL21 (D3) pLysS heterolog exprimiert und das entstandene Protein anschließend durch Zusatz unterschiedlicher Substrate mehreren Tests der enzymatischen Aktivität unterzogen.

3.3.2.1 Amplifikation der vollständigen cDNA-Sequenz

Es wurde im Anschluss einer RT-PCR mit RNA aus den obersten beiden Blattkreisen von *M. vulgare* eine Nested PCR durchgeführt, um die vollständige cDNA-Sequenz der

mRNA für die Ligation in den Expressionsvektor zu erhalten. Die RT-PCR wurde mit den Primern 1.PCR / 1.PCRc durchgeführt und ergab ein ca. 1.6 kb großes Fragment, welches der vermuteten Größe entsprach. In der anschließenden Nested PCR wurde *mvtps1* mit durch die Schnittstelle *Eco31I* erweiterten Oligonukleotiden (5'-*Eco31I* / 3'-*Eco31I*) vom Start- bis zum Stoppcodon amplifiziert und *in frame* in den Vektor pASK-IBA7 inseriert. Aufgrund der asymmetrischen Schnittstelle *Eco31I* konnte das Gen gerichtet in den Vektor inseriert und dieser kloniert werden (siehe Abb. 2.4 und Abb. 3.14).

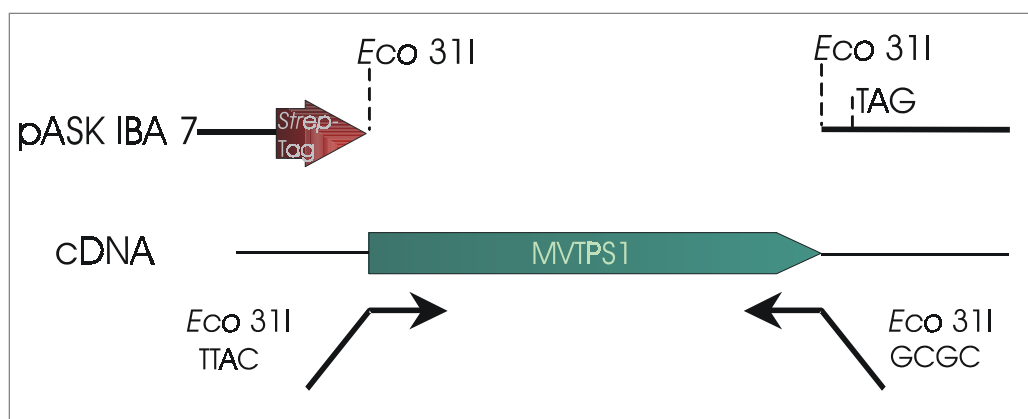


Abb. 3.14: Schema der Klonierung der vollständigen cDNA in den Vektor pASK IBA7
bedingt durch die assymetrische Schnittstelle *Eco31I* lässt sich das Gen direkt gerichtet inserieren.

In Bakterien, die den Vektor pASK IBA 7 mit der vollständigen cDNA (d.h. das Gen *mvtps1*) enthielten, wurde die Proteinbiosynthese von MVTPS1 induziert. Aus diesem Ansatz wurden nach 1h, 2h, 3h und 4h Rohextrakte gewonnen. Parallel wurde aus einem nicht induzierten Ansatz ein Rohextrakt gewonnen (siehe 2.22.5).

3.3.2.2 SDS-PAGE

In einem denaturierenden Proteingel (siehe 2.23) wurden die 4 Rohextrakte 1 bis 4 h nach der Induktion (siehe 2.22.5) und der nicht induzierte Rohextrakt elektrophoretisch aufgetrennt und die Proteine im Anschluss mit Coomassie-blue angefärbt (siehe 2.23.3). Im Vergleich mit dem nicht induzierten Rohextrakt ist deutlich eine überexprimierte Bande etwas unterhalb von 62 kDa zu sehen (siehe Abb. 3.15). Das SDS-Polyacrylamidgel (SDS-PAGE) zeigt somit, dass das Konstrukt (pAZ34) in *E.coli*-Zellen des Stammes BL21 (D3) pLysS erfolgreich heterolog exprimiert wurde.

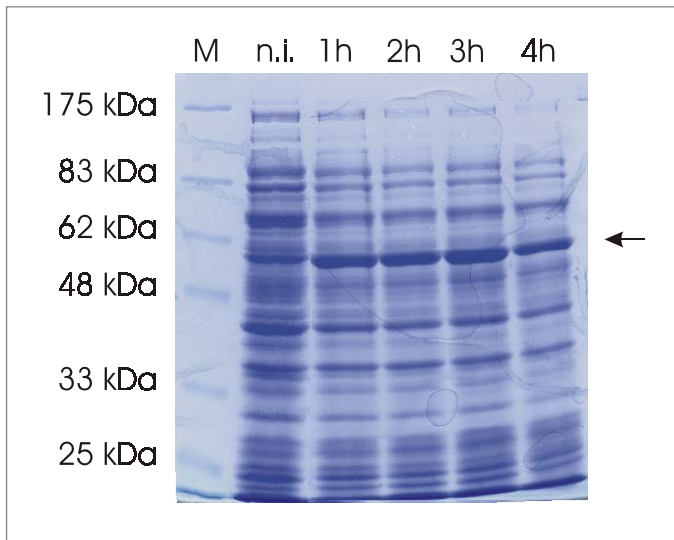


Abb. 3.15: mit Coomassieblue gefärbtes SDS-PAGE des überexprimierten Enzyms M: vorgefärbter Protein Marker (NEB, U.S.A.), n.i: nicht induziert (nach 0 h); es wurden der Rohextrakt 1-4 h nach Induktion in einem SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt; der Pfeil kennzeichnet die Bande des überexprimierten Enzyms.

3.3.2.3 Westernblot

Der für die heterologe Expression eingesetzte Vektor ist so konstruiert, dass das exprimierte Protein c-terminal eine Streptavidin-Extension enthält.

Wie bereits zur Herstellung der coomassieblue gefärbten SDS-PAGE (siehe 3.3.2.2) wurde ein Aliquot der überexprimierten Zellen 1, 2, 3 und 4 h nach der Induktion in harnstoffhaltigen Probepuffer aufgeschlossen und die Lysate (siehe 2.22.5) anschließend in einem 8%igen SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt. Der daraus hergestellte Westernblot (siehe Abb. 3.16), zeigt deutliche Banden auf einer Höhe unterhalb von 62 kDa. Dieser Wert ist nur eine ungefähre Angabe. Wechselwirkungen mancher Aminosäuren mit dem Polyacrylamidgel können dazu beitragen, dass das Protein im Gel nicht auf der Höhe entsprechend seiner tatsächlichen Masse läuft. Daher kann der Unterschied zu der errechneten Masse von MVTPS1 (64 kDa) vernachlässigt werden.

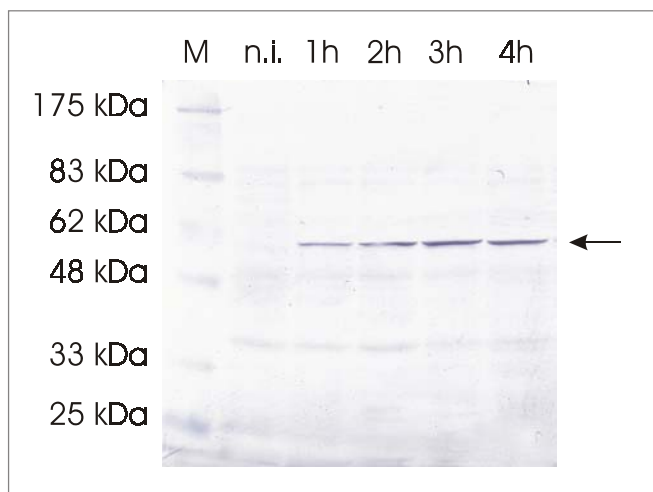


Abb. 3.16: Westernblot

M: vorgefärbter Proteinmarker (NEB, U.S.A.); n.i.: nicht induziert; der Blot zeigt das Rohextrakt von 1 bis 4 Stunden nach der Induktion; der Pfeil kennzeichnet die Bande des überexprimierten Enzyms. Als Antikörper wurde das *Strep*-Tactin alkalische Phosphatase-Konjugat benutzt.

3.3.3 Nachweis der enzymatischen Aktivität des exprimierten Proteins

Mittels SDS-PAGE und Westernblot (siehe Abb. 3.15 und Abb. 3.16) konnte gezeigt werden, dass das gefundene Gen erfolgreich in dem Vektor pASK IBA 7 kloniert wurde und heterolog exprimiert wird. Der letzte noch notwendige Schritt, um eine Aussage über die Aktivität des Enzyms oder über die Produkte zu erhalten, ist der Nachweis der enzymatischen Aktivität. Es können - z.B. durch die PCR- Basenaustausche stattgefunden haben, die zwar auf die Überexpression keinen Einfluss haben, jedoch auf die Proteinfaltung und somit auf die Funktionalität des Enzyms. Außerdem erlaubt ein Sequenzvergleich von MVTPS1 mit Sequenzen bereits charakterisierter Terpensynthasen aufgrund der hohen Ähnlichkeit der Terpensynthasen untereinander noch keine eindeutige funktionelle Charakterisierung des Enzyms [BOHLMANN *ET AL.* 1998 (A)].

Terpensynthasen sind in der Lage, abhängig von den Vorstufen ihrer Produkte, Geranyldiphosphat (GPP), Farnesyldiphosphat (FPP) oder Geranylgeranyldiphosphat (GGPP) umzusetzen. GPP wird zu Monoterpenen [WISE *ET AL.* 1998], FPP zu Sesquiterpenen [CANE D.E. 1998] und GGPP wird zu Diterpenen [MACMILLAN J. 1998] umgesetzt.

Daher wurden in drei unterschiedlichen Ansätzen Proteinrohextrakte mit [1-³H]GPP, [1-³H]FPP oder [1-³H]GGPP versetzt und die entstandenen Produkte mit Radio-GC analysiert (siehe 2.25). Die Produkte wurden im Rahmen eines Forschungsaufenthalts am Max-Planck-Institute für chemische Ökologie in Jena in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Degenhardt identifiziert.

Wie aus dem Radiochromatogrammen deutlich zu erkennen ist, ist MVTPS1 in der Lage, mehrere unterschiedliche Terpene zu synthetisieren. Damit wurde belegt, dass MVTPS1 *in vitro* hauptsächlich Sesquiterpene und in geringen Mengen Monoterpene synthetisiert. Da MVTPS1 GGPP als Substrat nicht akzeptiert, ist es unwahrscheinlich, dass dieses Enzym eine Diterpensynthase ist.

3.3.4 Identifizierung der Hauptterpenkomponente

Zur Identifizierung des durch das heterolog exprimierte Enzym synthetisierten Hauptproduktes wurde der unter 3.3.3 hergestellte Ansatz mit $[1\text{-}^3\text{H}]\text{FPP}$ mittels eines Gaschromatographen (GC) aufgetrennt und die Hauptkomponente, d.h. der größte Peak, durch den an den GC angeschlossenen Massenspektrometer (MS) identifiziert. Dazu wurde das erhaltene Spektrum mit Spektren aus verschiedenen Spektrenbibliotheken verglichen.

Daraus ging hervor, dass das Massenspektrum der Hauptterpenkomponente, die MVTPS1 *in vitro* synthetisiert, dem bityklischen Selinen ähnlich ist. In Abb. 3.19 ist das Chromatogramm mit dem entsprechenden Massenspektrum der Hauptterpenkomponente von MVTPS1 dargestellt. Die molare Masse beträgt 204 g/mol. Dieses Ergebnis stimmt mit der Summenformel von Selinen ($\text{C}_{15}\text{H}_{24}$) überein. Die Retentionszeit der Vergleichssubstanz weicht jedoch um 15 sec von der Retentionszeit der Haupt-Terpenkomponente von MVTPS1 ab. Zur eindeutigen Identifizierung werden Spektrenvergleiche mit weiteren Referenzsubstanzen vorgenommen werden, die andere Positionen der Doppelbindungen aufweisen oder durch ähnliche bityklische Ringsysteme charakterisiert sind.

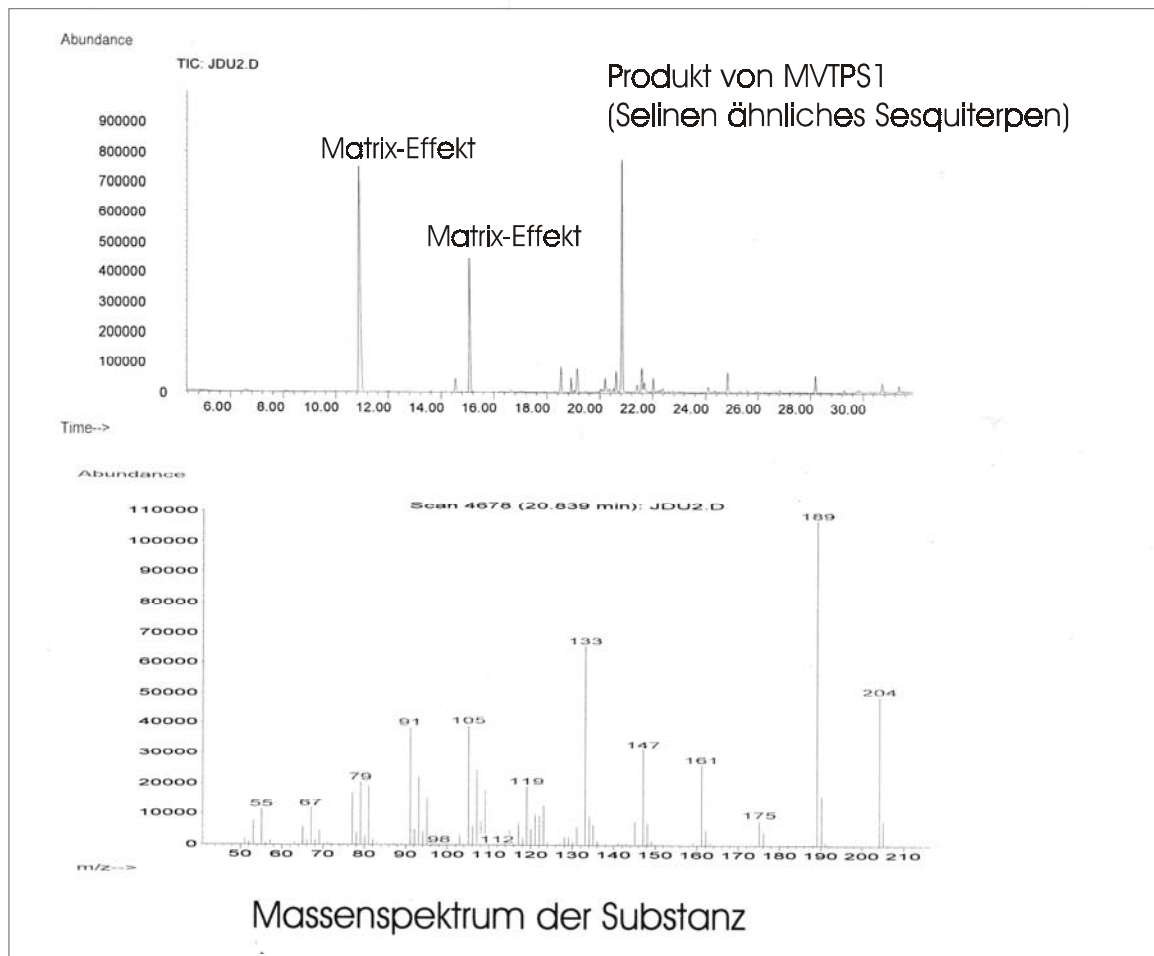


Abb. 3.19: Chromatogramm und Massenspektrum der GC/MS-Analyse des Hauptproduktes von MVTPS1. (Geräteparameter siehe 2.25.4)

3.3.5 Zeitlicher Expressionsstart in *Marrubium vulgare*

Viele Terpensynthasen werden adaptiv gebildet. Ihre Synthese wird zu einem bestimmten Zeitpunkt oder durch äußeren Einfluss (z.B. Stress, Elicitoren etc.) „angeschaltet“. Daher stellte sich die Frage, ob mit den nun zur Verfügung stehenden Sonden der Expressionsstart von MVTPS1 beobachtet werden kann. Zu diesem Zweck wurden im Gewächshaus Pflanzen aus Früchten von *M. vulgare* angezogen. Die Pflanzen wurden Ende Juli ausgesät und keimten in der Regel zwischen dem sechsten und siebten Tag nach der Aussaat. Nach 10 (Kotyledonen), 20, 30, 40 und 50 Tagen wurde RNA aus den obersten zwei Blatträumen isoliert und mit diesen RNA-Präparationen eine RT-PCR durchgeführt.

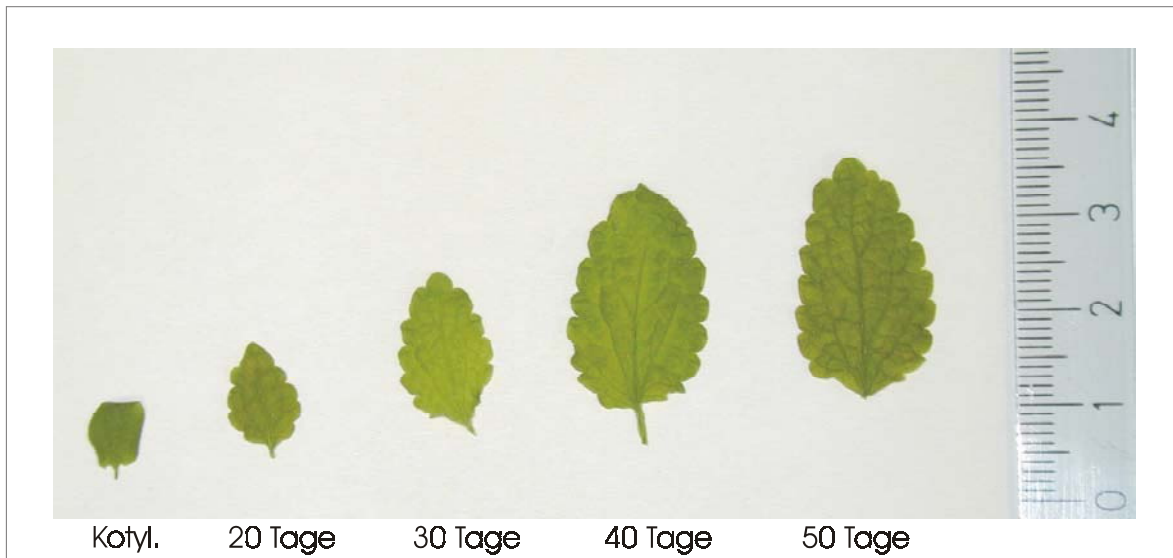


Abb. 3.20: Blätter aus den jeweils obersten Blattkreisen von *Marrubium vulgare* unterschiedlichen Alters

Kotyl.: Kotyledonen (10 Tage alte Pflanze); deutlich zu erkennen ist die stärkere Blattdifferenzierung nach 50 Tagen.

Die Parameter der RT-PCR entsprachen denen, die zur Amplifikation von AZ14 geführt hatten (s.3.2.1.1). Jedoch wurde keine Nested PCR angeschlossen, sondern stattdessen mit den Ergebnissen der ersten PCR ein Southern Blot durchgeführt.

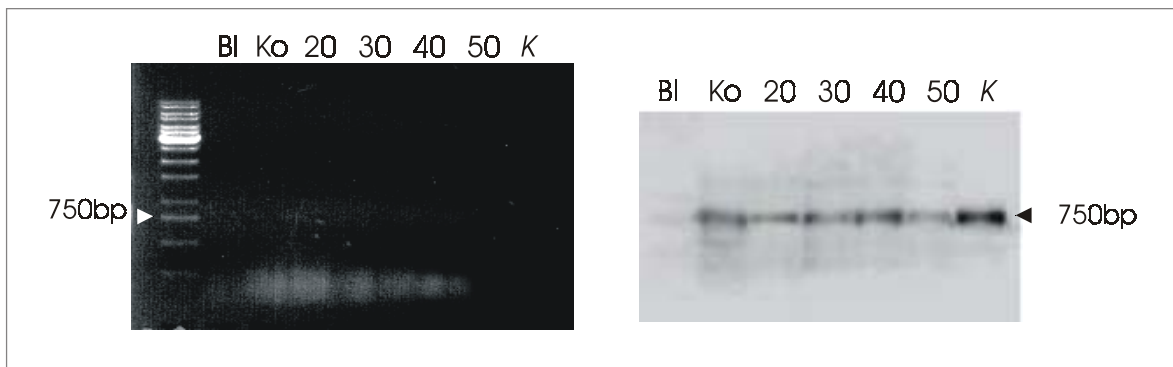


Abb. 3.21: Elektropherogramm und Southern Blot der RT-PCR der Gesamt-RNA

M: 1kb λ -DNA Marker; Bl: Blindprobe (ohne Template); Ko: Kotyledonen (RNA aus Blättern 10-Tage-alter Pflanzen); K: Kontrolle (AZ14); die Zahlen geben das Alter der Pflanzen (in Tagen) an, aus denen jeweils die RNA isoliert worden ist; Primer der PCR: A2 und 2643c; Sonde: AZ14 (cDNA-Fragment aus *M. vulgare*)

Die Abb. 3.19 zeigt ein Elektropherogramm und einen Southern Blot von RT-PCR-Produkten mit RNA-Templates verschiedener Wachstumsstadien. Als Sonde wurde eine cDNA-Fragment aus *M. vulgare* (AZ 14) verwendet. Bereits in der Probe der Kotedonen (Keimblätter aus 10-Tage alten Pflanzen) ist ein Signal zu erkennen, das mit hoher Wahrscheinlichkeit von MVTPS1 hervorgerufen wird. Damit konnte gezeigt werden, dass MVTPS1 schon in der frühen Entwicklungsstufe von *M. vulgare* expriert wird.

4 DISKUSSION

M. vulgare wurde in der AG Knöß als Modellsystem ausgewählt, um den Biosyntheseweg von Diterpenen zu untersuchen und den Terpenstoffwechsel und seine Regulation in differenzierten (Pflanzen aus dem Gewächshaus und Sprosskulturen) und undifferenzierten (Suspensions- und Kalluskulturen) Systemen zu vergleichen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten nun die Terpensynthasen, die die Zyklisierung von Terpenen katalysieren, untersucht werden. Da Terpensynthasen häufig in der Pflanze nur in geringen Mengen gebildet werden sind detaillierte biochemische Untersuchungen schwierig. Die effektive Isolierung der Drüsenschuppen, der vermutliche Synthesort vieler Terpensynthasen in Lamiaceen [FAHN 1979; GERSHENZON *ET AL.* 1989; MCCASKILL *ET AL.* 1992], ist in *M. vulgare* aufgrund der starken Behaarung der Blätter schwierig; die Ausbeuten sind gering. Auch konnte eine signifikante Steigerung der Bildung von Terpenen und somit indirekt der Menge an Terpensynthasen durch Zusatz von Elicitoren bzw. Stressfaktoren nicht beobachtet werden [GORMANN 1994; WILHELM 1993]. Daher wurde ein molekularbiologischer Ansatz dem biochemischen Ansatz, der größere Mengen Enzym benötigt, vorgezogen.

4.1 DIE GENSTRUKTUR VON *MVTPS1**

Die Exon- und Intronbereiche der genomischen Sequenz von *mvtps1* wurden durch den Vergleich der genomischen Sequenz mit der Sequenz der cDNA festgelegt. Demnach besitzt die 3976 bp große genomische Sequenz von *mvtps1* 6 Introns und 7 Exons. Die Größe der Introns variiert zwischen 83 bp und 733 bp.

Ein Vergleich der ersten drei charakterisierten Sequenzen von pflanzlichen Terpensynthasen zeigte, dass eine sehr hohe Ähnlichkeit zwischen ihnen vorliegt, obwohl diese Gene von phylogenetisch weit entfernt liegenden Pflanzenarten stammen (Monoterpensynthase: Limonensynthase aus *Mentha spicata* L. [COLBY *ET AL.* 1993]; Sesquiterpensynthase: Epi-aristolochensynthase aus *Nicotiana tabacum* L. [FACCHINI & CHAPPELL 1992] und Diterpensynthase: Casbensynthase aus *Gossypium arboreum* L. [MAU & WEST 1994]). Diese Feststellung wurde bereits zu diesem Zeitpunkt von den Analysen der Intron-Anzahl und Intron-Position der wenigen vorliegenden genomi-

* *Marrubium vulgare* Terpensynthase 1

schen Terpensynthesesequenzen unterstützt [MAU & WEST 1994; BACK & CHAPPELL 1995; CHAPPELL 1995].

Zur genaueren Untersuchung der phylogenetischen Entwicklung der Terpensynthasen verglichen TRAPP & CROTEAU (2000) genomische Sequenzen von Terpensynthasen aus Gymnospermen und Angiospermen miteinander. Diese Auswahl an Genen repräsentierte konstitutive und induzierbare Terpensynthasen aus den Subklassen der Mono-, Sesqui- und Diterpene. Die Exon-Intron-Grenzen der genomischen DNA wurden durch Sequenz-Vergleiche mit der entsprechenden cDNA ermittelt. TRAPP & CROTEAU (2000) nehmen an, dass sich die Terpensynthasen des Sekundärmetabolismus aus denen des Primärmetabolismus entwickelt haben. Weiter vermuten sie, dass es im Verlauf der Entwicklung von Terpensynthasen zu Verlusten mehrerer Introns gekommen ist, sodass genomische Sequenzen von Terpensynthasen phylogenetisch jüngerer Pflanzen weniger Introns enthalten. Basierend auf der Bewertung der Anzahl der Introns und ihrer Position sowie der Exongröße teilten TRAPP & CROTEAU die Terpensynthasen in 3 Klassen ein (siehe Tab. 4.1). Diese drei Klassen unterscheiden sich hauptsächlich in der Intron-Anzahl bzw. in dem entwicklungsbedingten Intronverlust der genomischen Sequenzen. Zusätzlich besitzen alle genomischen Sequenzen der Diterpensynthasen in Klasse 1 eine CDIS (Conifer diterpene internal sequence) Region. Über die Funktion dieser Region ist bis jetzt nichts näheres bekannt. Jedoch ist anzunehmen, dass aufgrund der Tatsache, dass diese Region in den Mono- und Sesquiterpensynthasen von Gymnospermen und in allen drei Terpensynthase-Arten von Angiospermen nicht vorhanden ist, die CDIS-Region für die Enzymaktivität nicht essentiell ist.

Tab. 4.1 Klassifizierung der Terpensynthasen nach TRAPP & CROTEAU

Klasse	Intronanzahl	Art der Terpensynthasen	Herkunft
I	11-14	→ Di- und Sesquiterpensynthasen → Synthasen aus Primärmetabolismus	Gymnospermae Angiospermae
II	9	→ Mono- und Sesquiterpensynthasen	Gymnospermae
III	6	→ Mono-, Sesqui- und Diterpensynthasen aus dem Sekundärmetabolismus	Angiospermae

TRAPP & CROTEAU konnten anhand der ihnen vorliegenden genomischen Strukturen kein offensichtliches Muster in der Größe oder der Sequenz der Introns erkennen. Sie stellten allerdings fest, dass die Introns der Gene der Gymnospermen mit durchschnittlich 150 bp kleiner als die der Angiospermen, die teilweise auch extrem große Introns von 698 bis 2850 bp enthalten. Trotz der relativ hohen Anzahl an Sequenzen, die zu diesem Vergleich herangezogen wurden, lässt sich daraus lediglich eine grobe Einteilung und Tendenz in der Abstammung ableiten. Um die Aussagen über die Abstammung der Terpensynthasen und über die evolutionsbedingten Änderungen verifizieren und verbessern zu können, bedarf es der Bewertung einer größeren Menge an Terpensynthasen aus dem ganzen Pflanzenreich (einschließlich Tetra- und Triterpenen) [TRAPP & CROTEAU 2001]. MVTPS1 stammt aus einer Pflanze, deren Terpensynthasen bis jetzt noch nicht molekularbiologisch untersucht worden sind. Im Vergleich mit anderen aus dem Sekundärmetabolismus von Angiospermen stammenden Terpensynthase lässt sich MVTPS 1 nach der Klassifizierung von TRAPP & CROTEAU der Klasse III zuordnen.

Ein Vergleich der Exongrößen des MVTPS1-Gens mit Terpensynthasegenen des Sekundärmetabolismus aus Angiospermen zeigt hohe Ähnlichkeiten. Abb. 4.1 vergleicht die Exon-Intron-Struktur einiger Terpensynthasen der Klasse III nach TRAPP & CROTEAU mit den korrespondierenden Strukturen des MVTPS1 Gens. Deutlich zu erkennen ist, dass die entsprechenden Exongrößen nur geringfügig voneinander abweichen.

Untersuchungen an Terpensynthasen und ein Vergleich der Aminosäuresequenzen pflanzlicher Terpensynthasen zeigen mehrere konservierte Bereiche [CHEN *ET AL.* 1994]. Die konservierten Histidine (in MVTPS1 His⁷⁷, His¹¹⁶, His¹⁹⁸), das konservierte Cystein (in MVTPS1 Cys⁴⁶⁷) das RR- bzw. RP-Motiv und das DDXXD-Motiv (siehe 4.3.1) von MVTPS1 befinden sich an vergleichbaren Stellen in den gleichen Exons. Diese konservierten Bereiche sind auch in Abb 4.1 wiedergegeben.

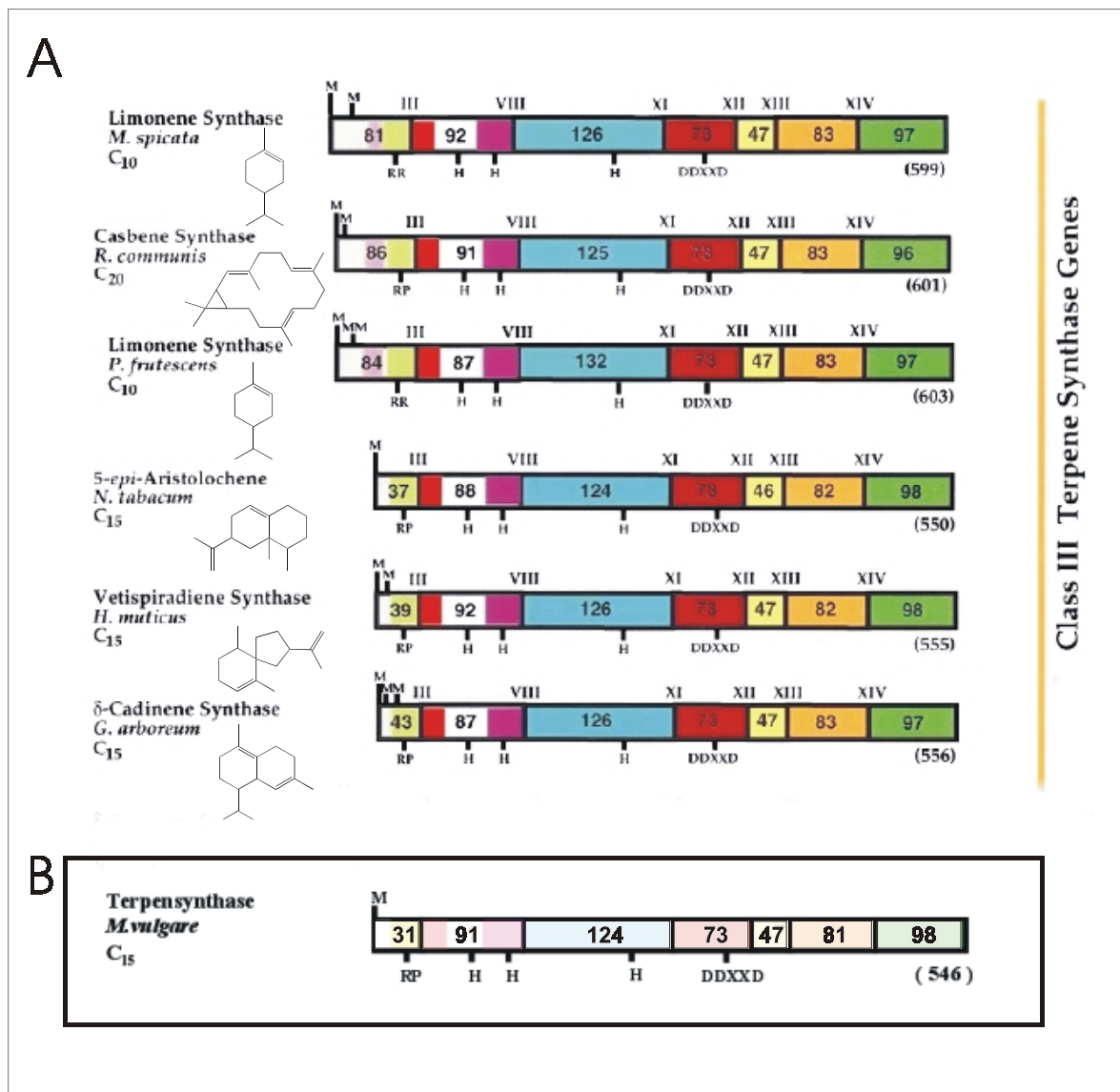


Abb. 4.1 Klasse III Terpensynthasegene nach TRAPP & CROTEAU 2001; im Vergleich zu dem Gen von MVTPS1 aus *M. vulgare* Die Strukturen der aus der Veröffentlichung entnommenen Terpensynthasen sind unter A gezeigt; die Struktur des isolierten Gens aus *M. vulgare* ist unter B gezeigt. Die in Klammern angegebenen Zahlen geben die Größe in Aminosäuren an und die Buchstaben unter den Strukturen deuten einige konservierte Bereiche an.

4.2 MVTPS1, DIE cDNA-SEQUENZ DER TERPENSYNTHASE

Die cDNA-Sequenz der MVTPS1 in *M. vulgare* L. wurde über RACE-PCR erhalten. Die dazu notwendigen Primer in Richtung des Translationsstarts und -stopps wurden aus der genomischen Sequenz abgeleitet. Nach Vergleich der genomischen Sequenz

von *mvtps1* mit cDNA-Sequenzen bereits charakterisierter Terpensynthasen konnten aufgrund der starken Konservierung der Exon- und Intronbereiche [MAU & WEST 1994; BACK & CHAPPELL 1995; CHAPPELL 1995] Exonbereiche angenommen werden. Aus diesen Exonbereichen wurden Primer abgeleitet. Die bei der RACE-PCR entstandenen Fragmente waren in ihren überschneidenden Sequenzbereichen im Rahmen der Sequenzierungenaugkeit identisch. Somit konnten die Fragmente zu einer cDNA mit Translationsstart und –stopp zusammengesetzt werden. Aus dieser zusammengesetzten cDNA-Sequenz wurden für den Erhalt der vollständigen cDNA-Sequenz Primer abgeleitet. Diese an einem Stück amplifizierte vollständige cDNA-Sequenz stimmte mit der zusammengesetzten Sequenz überein.

4.2.1 Die vollständige cDNA-Sequenz

Die aus der RACE-PCR ermittelte Sequenz von *mvtps1* ist 1932 bp lang. Nach 70 bp wurde ein offener Leserahmen (ORF) mit 1638 bp gefunden. Die Größe des ORF liegt im Mittel der ORF-Größen von Sesquiterpensynthasen [BOHLMANN *ET AL.* 1998]. Mono- und Diterpensynthasen von Angiospermen sind aufgrund der zusätzlichen aminoterminalen Transitpeptidsequenz 150 bis 180 bp größer [WILLIAMS *ET AL.* 1998; MAU & WEST 1994].

4.3 MVTPS1 - DAS PROTEIN

cDNA von Terpensynthasen kodieren für 540-850 AS mit errechneten Polypeptidmassen von 50-100 kDa. Der Bereich der isoelektrischen Punkte liegt um pI 5 [BOHLMANN *ET AL.* 1998 (A)]. Der offene Leserahmen der MVTPS1 mit einer Länge von 1641 bp kodiert für ein 546 Aminosäuren (AS) langes Polypeptid. Die errechnete Masse dieses Polypeptids ist 64 kDa und der berechnete pI beträgt 5,3. Die Aminosäuresequenz von MVTPS1 ist zu 37-55% identisch mit Sequenzen anderer, bereits charakterisierter Terpensynthasen von Angiospermen und ist diesen Terpensynthasen zu 56-74% ähnlich (siehe Tab. 3.1). Terpensynthasen sind kernkodiert, jedoch sind alle bis jetzt isolierten und charakterisierten Mono- und Diterpensynthasen in den Plastiden lokalisiert. Daher besitzen diese Terpensynthasen aminoterminalen Signalsequenzen, die den Transport der Proteine in die Chloroplasten ermöglichen [BOHLMANN *ET AL.* 1997 ; COLBY *ET AL.* 1993; RAJAONARIVORI & GERSHENZON 1992; MAU & WEST 1994; STOFER-VOGEL *ET AL.* 1996]. Sesquiterpensynthasen sind daher 50-70 AS kleiner als Monoterpensynthasen. Diese Transitpeptidsequenzen der Mono- und Diterpen-

synthasen sind zwar nicht hoch konserviert, sie besitzen jedoch charakteristische Eigenschaften wie z.B. dass sie reich an Serin, Threonin und kleinen hydrophoben Bereichen sind und dazu einige saure Bereiche enthalten [WILLIAMS *ET AL.* 1998]. Der aminoterminal Bereich der Aminosäuresequenz von MVTPS1 weist diese Charakteristika nicht auf. Somit ist die Existenz eines Transitpeptids unwahrscheinlich. Zusätzlich wird diese Annahme durch mehrere Stoppcodons in jedem Leserahmen vor dem Translationsstart unterstützt.

4.3.1 Vergleich der Aminosäuresequenzen von Terpensynthasen

Verglichen mit den meist nukleophilen Kondensationen im Verlauf anderer Biosynthesewege katalysieren Mono-, Sesqui- und Diterpensynthasen eine eher unübliche, da elektrophile Reaktion [GERSHENZON & CROTEAU 1993]. Nur Prenyltransferasen katalysieren mit der Bildung einer C-C-Bindung zwischen zwei Substratmolekülen zur Synthese von Geranyldiphosphat (GPP), Farnesyldiphosphat (FPP) und Geranylgeranyldiphosphat (GGPP) eine ähnliche elektrophile Reaktion [GERSHENZON & CROTEAU 1993]. Terpensynthasen hingegen katalysieren eine intramolekulare Zyklisierung. Die entsprechenden Prenyldiphosphate (GPP, FPP bzw. GGPP) werden im ersten Schritt mit Hilfe des Cofaktors Mg^{2+} ionisiert. Das entstandene enzymgebundene Carbokation kann einer Vielzahl von Zyklisierungen, Umlagerungen u.a. Reaktionen unterzogen werden bis die Synthese mit der Eliminierung eines Protons oder einer nukleophilen Addition, z.B. von H_2O , beendet wird [CANE 1998; CROTEAU & WISE 1998].

Aufgrund dieser Ähnlichkeiten im Reaktionsmechanismus liegt es nahe, dass auch Ähnlichkeiten in der Aminosäuresequenz der verschiedenen Terpensynthasen bzw. Prenyltransferasen vorhanden sind. Trotz des vergleichbaren Reaktionsmechanismus sind sowohl die Aminosäuresequenzen der Prenyltransferasen als auch die der Terpensynthasen von Mikroorganismen den Sequenzen der pflanzlichen Terpensynthasen wenig bis überhaupt nicht ähnlich [TRAPP & CROTEAU 2001; MCGARVEY & CROTEAU 1995]. So besitzt z.B. die Epi-Aristolochensynthase aus *Nicotiana tabacum* nur eine geringe Ähnlichkeit zu der Epi-Aristolochensynthase in *Penicillium roqueforti* [CHAPPELL 1995]. Die pflanzlichen Terpensynthasen weisen hingegen trotz der strukturellen Unterschiede ihrer Produkte hohe Ähnlichkeiten untereinander auf. Diese Ähnlichkeit ist jedoch zwischen den Terpensynthasen innerhalb der Unterabteilung der phylogenetisch älteren Gymnospermen und innerhalb der Angiospermen wesent-

lich höher als zwischen den beiden Unterabteilungen. So ist z.B. die aus *M. vulgare* L. isolierte Synthase, deren Produkt der Struktur des Selinens ähnlich ist, der δ -Selinensynthase aus *Abies grandis* L. weniger ähnlich als Terpensynthasen aus anderen Angiospermen, z.B. der Vetispiradiensynthase aus *Solanum tuberosum* L. (siehe Tab. 3.1). Dies deutet im Falle der pflanzlichen Terpensynthasen auf eine von einem „Ur-Terpensynthase-Gen“ ausgehende divergente Evolution hin. Die geringe Ähnlichkeit zwischen pflanzlichen Terpensynthasen und Terpensynthasen in Mikroorganismen lässt eine konvergente Entwicklung vermuten [MAU & WEST 1994]. Diese Hypothesen werden jedoch stark diskutiert [BOHLMANN *ET AL.* 1998 (A)]. Es sind vermutlich noch mehr charakterisierte Terpensynthasesequenzen aus allen Reichen notwendig, um bessere Einsichten in die Evolution der Terpensynthasen zu erhalten.

Bereits vor Kenntnis der Aminosäuresequenzen pflanzlicher Terpensynthasen wurde festgestellt, dass Reagenzien, die Histidinreste bzw. Cysteinreste chemisch modifizieren, die Aktivität der Terpensynthasen inhibieren [ALONSO & CROTEAU 1991; RAJAONARIVONY *ET AL.* 1992A; RAJAONARIVONY *ET AL.* 1992B]. Dies ließ bereits vermuten, dass essentielle und damit konservierte Histidin- und Cysteinreste in den Aminosäuresequenzen der Terpensynthasen zu finden sind. BOHLMANN *ET AL.* verglichen 1998 (A) Aminosäuresequenzen von Terpensynthasen aus 12 Gymnospermen und 21 Angiospermen miteinander. Sie charakterisierten die strukturellen Eigenschaften dieser Enzyme und stellten fest, dass die Mono-, Sesqui- und Diterpensynthasen der Gymnospermen untereinander eine höhere Ähnlichkeit aufweisen, als zu den entsprechenden Terpensynthasen der Angiospermen. Trotz dieses Unterschieds stellte sich bei diesem Vergleich heraus, dass Aminosäuresequenzen der Terpensynthasen aus Gymnospermen und aus Angiospermen mehrere absolut konservierte Aminosäuren aufweisen. Es wird angenommen, dass diese stark konservierten Bereiche wichtig für den Reaktionsmechanismus sind [Bohrlay et al. 1998 (A)] und das sogenannte DDXXD-Motiv konserviert [LESBURG *ET AL.* 1997; TARSHIS *ET AL.* 1994]. Trotz der geringen Ähnlichkeit zu Aminosäuresequenzen von Prenyltransferasen und mikrobiellen Terpensynthasen ist dieses Motiv auch dort konserviert [ASHBY & EDWARDS 1990; CHEN *ET AL.* 1994]. Diese Tatsache und Kristallstruktur- und Mutationsanalysen von Terpensynthasen lassen vermuten, dass dieser Bereich am aktiven Zentrum dieser Enzyme beteiligt ist [JOLY & EDWARDS 1993; SONG & POULTER 1994; STARKS *ET AL.* 1997]. Die hydrophobe Tasche des aktiven Zentrums, die reich an aromatischen Aminosäu-

reresten ist, wird durch α - Helices der C-terminalen Domäne geformt. Dort befindet sich während der Katalyse der Farnesylrest des Substrats. Mit Hilfe des DDXXD-Motives komplexieren vermutlich zwei Mg^{2+} -Ionen am Rand des aktiven Zentrums das Diphosphat des Substrats [STARKS *ET AL.* 1997].

Neben diesem DDXXD-Motiv sind noch weitere konservierte Aminosäurereste in den Terpensynthasen vorhanden. Darunter befinden sich drei hochkonservierte Histidine und ein konserviertes Cystein. Dies unterstützt die aus den o.a. Inhibitionsversuchen resultierende Vermutung, dass in Terpensynthasen essentielle Histidin- und Cysteinreste vorhanden sind. Histidin- und Cysteinreste sind bekannt dafür, dass sie mit Metallionen interagieren, z.B. mit sogenannten Zink-Fingern, die in Transkriptionsfaktoren vorkommen [MILLER *ET AL.* 1985]. Es ist anzunehmen, dass diese Aminosäurereste auch am aktiven Zentrum der Terpensynthasen beteiligt sind. Obwohl ihnen bis jetzt noch keine Funktion zugeschrieben werden kann, sind sie attraktive Ziele für gezielte Mutationen zur Untersuchung von Struktur und Funktion der Terpensynthasen.

Auf der Grundlage von Untersuchungen an Limonensynthasen aus Minz-Arten (*Mentha*), nehmen WILLIAMS *ET AL.* (1998) an, dass zwei hintereinander folgende Argininreste, die sich direkt hinter der Signalpeptidsequenz befinden, essentiell für Monoterpensynthasen sind. Sie vermuten, dass dieses Argininpaar den ersten Reaktionsschritt der Limonensynthese, die Isomerisierung von GPP, unterstützt. Vergleiche mit Sesqui- und Diterpensynthasen haben gezeigt, dass in den Aminosäuresequenzen an dieser Stelle nur noch ein Argininrest konserviert und das andere Arginin oftmals durch Prolin oder Alanin ersetzt ist. Ein Vergleich der Aminosäuresequenz von MVTPS1 mit Sequenzen bereits charakterisierter Mono-, Sesqui- und Diterpensynthasen zeigt, dass in MVTPS1 das in den Monoterpensynthasen konservierte Argininpaar durch R^8P^9 ersetzt ist. Die anderen zum Vergleich herangezogenen Sesquiterpensynthasen zeigen ebenfalls das RP-Motiv (siehe Abb. 4.2).

Der Test der enzymatischen Aktivität mit radioaktiv markiertem GPP erwies, dass MVTPS1, wie auch andere Sesquiterpensynthasen [CROCK *ET AL.* 1997; STEELE *ET AL.* 1998; MERCKE *ET AL.* 1999], *in vitro* trotzdem in der Lage ist, Monoterpene zu synthetisieren (siehe 3.3.3). Eine mögliche Erklärung neben dem nicht nötigen Selektionsdruck (siehe 4.4) ist, dass das im Vergleich zu Monoterpensynthasen größere aktive Zentrum auch ohne RR-Motiv die Synthese von Monoterpenen katalysieren kann. Zur Bestätigung dieser Annahme sind jedoch weitere Untersuchungen notwendig, wie

z.B. Röntgenstrukturanalysen von Mono- und weiteren Sesquiterpensynthasen und auf das RR-Motiv gerichtete Mutationsanalysen. In der Aminosäuresequenz von MVTPS1 sind neben dem DDXXD-Motiv (299-303) und His⁷⁷, His¹¹⁶ und His¹⁹⁸ sowie Cys⁴⁶² einige weitere Aminosäurereste konserviert (siehe Abb. 4.2).

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
mvtps1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	AAQIET	RFPA	NFS	SPSPSLWG
msls	MAIKVLSVAT	QMAIPSNLTT	CLQPSHKSS	PKLLSSTNS	SRSR-----	---LRVYC	SQLTTER	RRSG	NYNP--	SRWD
pfls	---MYGTGVM	HMAIPKPAH	YLHNSGRTYA	SQLCGFSST	TRAAIAR--	L	PLCLRFRC	S-	QAQD	RRSG
rccs	---MALPSAA	MQSNPEKLN	PHRLSSLPT	SLEYGNNRP	PFSSSAKSH	KKPTQACLS	THQEV	RPLA	YFPP--	TVWG
ntas	-----	-----	-----	-----	-----	---MASAA	VAN	YEEI	V	REVA
hmvs	-----	-----	-----	-----	-----	-----	DFSP--	SLWG	DQFLS	-FSID
	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
mvtps1	IEVLKNEVKS	MVTAQG-GKM	VDTINFIDTM	ERLGIAM	EFK	DEIETET	QQF	FNLN-TNYE	--DEAYD	LYT
msls	ASELVTLVKM	ELEKET--DQ	IRQLELIDDL	QRMGLSD	EFQ	NEFKEILSSI	YLDHYYKNP	FPKEER	DLYS	TSLAF
pfls	AGELIVQVKM	VMGKET--DP	VVQLELIDDL	HKLALSH	EFQ	KEIKEILFNI	SYDHKIM--	---VERD	LYS	TALAF
rccs	VIVLKKVKD	ILISST-SDS	VETVILIDLL	CRLGVS	YFE	NDIEELLSKI	FNSQPD	LVD--	---EKEC	DLYT
ntas	IEALKEQTRN	MLLATG-MKL	ADTLNLIDTI	ERLGIS	YFE	KEIDDILDQI	YNQN-----	---SNCN	DLCT	SALQF
hmvs	IETLKEQTST	MLSAACGTTL	TEKLNLIIDII	ERLGIAM	YFE	KQIEDMLDHI	YRADPYFEA--	---HEYND	LNT	SSVQF
	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
mvtps1	QESLKSDAKG	LLSLYEASYL	RIHGD	TLDE	AIDFAT	TNLK	SMAPNLG	SP--	-----	LRK
msls	KESLSDDTKG	LLQLYEASFL	LTEGETTLES	AREFAT	KFLE	EKVNEG	VDG	D-----	LLT	RIAYSL
pfls	KESLSDDTKG	LLQLYEASFL	LTEGETTLES	AREFAT	KFLE	EKLNDKT	IDD	DDAD	TNLIS	CVRHSL
rccs	KESLSDDTKG	LLQLYEASFL	LTEGETTLES	AREFAT	KFLE	EKLNDKT	IDD	DDAD	TNLIS	CVRHSL
ntas	KESLSDDTKG	LLQLYEASFL	LTEGETTLES	AREFAT	KFLE	EKLNDKT	IDD	DDAD	TNLIS	CVRHSL
hmvs	KESLSDDTKG	LLQLYEASFL	LTEGETTLES	AREFAT	KFLE	EKLNDKT	IDD	DDAD	TNLIS	CVRHSL
	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
mvtps1	AKLDFNLLQI	LHKEELCELS	RWNKELDFIS	QFPYVR	DRIV	ECFFWS	VGMY	HEPQYS	RARI	MLAKSL
msls	AILDNLIVQA	QFQELKESF	RWNKELDFIS	QFPYVR	DRIV	ECFFWS	VGMY	HEPQYS	RARI	MLAKSL
pfls	AKLDFNLLQI	LHKEELCELS	RWNKELDFIS	QFPYVR	DRIV	ECFFWS	VGMY	HEPQYS	RARI	MLAKSL
rccs	AKLDFNLLQI	LHKEELCELS	RWNKELDFIS	QFPYVR	DRIV	ECFFWS	VGMY	HEPQYS	RARI	MLAKSL
ntas	AKLDFNLLQI	LHKEELCELS	RWNKELDFIS	QFPYVR	DRIV	ECFFWS	VGMY	HEPQYS	RARI	MLAKSL
hmvs	AKLDFNLLQI	LHKEELCELS	RWNKELDFIS	QFPYVR	DRIV	ECFFWS	VGMY	HEPQYS	RARI	MLAKSL
	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
mvtps1	DGLPEYIKKI	YKLMKIYQQ	FEELAMDGK	AVATHY	AIEA	YKELTKGYV	EAKWFIR	GYV	PFPEEY	LSNA
msls	DGLPEYIKKI	YKLMKIYQQ	FEELAMDGK	AVATHY	AIEA	YKELTKGYV	EAKWFIR	GYV	PFPEEY	LSNA
pfls	DGLPEYIKKI	YKLMKIYQQ	FEELAMDGK	AVATHY	AIEA	YKELTKGYV	EAKWFIR	GYV	PFPEEY	LSNA
rccs	DGLPEYIKKI	YKLMKIYQQ	FEELAMDGK	AVATHY	AIEA	YKELTKGYV	EAKWFIR	GYV	PFPEEY	LSNA
ntas	DGLPEYIKKI	YKLMKIYQQ	FEELAMDGK	AVATHY	AIEA	YKELTKGYV	EAKWFIR	GYV	PFPEEY	LSNA
hmvs	DGLPEYIKKI	YKLMKIYQQ	FEELAMDGK	AVATHY	AIEA	YKELTKGYV	EAKWFIR	GYV	PFPEEY	LSNA
	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600
mvtps1	TKRKMIVATQ	TISRLVNDIS	SYKVEKERGQ	PATGIE	GYMK	DKGVTKKEAM	DKFYEMATNA	WKDSNEE	CLG	L-SGNS
msls	KYHDIVRWSS	FVIRLADDLG	TSVEEVS	RGD	VPSLQ	CYMS	DYNASE	AEAR	KHVKNL	AEV
pfls	KYHDIVRWSS	FVIRLADDLG	TSVEEVS	RGD	VPSLQ	CYMS	DYNASE	AEAR	KHVKNL	AEV
rccs	KYHDIVRWSS	FVIRLADDLG	TSVEEVS	RGD	VPSLQ	CYMS	DYNASE	AEAR	KHVKNL	AEV
ntas	KYHDIVRWSS	FVIRLADDLG	TSVEEVS	RGD	VPSLQ	CYMS	DYNASE	AEAR	KHVKNL	AEV
hmvs	KYHDIVRWSS	FVIRLADDLG	TSVEEVS	RGD	VPSLQ	CYMS	DYNASE	AEAR	KHVKNL	AEV
	610	620								
mvtps1	YTQPEKVLKE	HIILAFVDQI	D-							
msls	HGTQHEIIRQ	QMTIRLTFEPF	--							
pfls	HGTQHEIIRQ	QMTIRLTFEPF	--							
rccs	HGTQHEIIRQ	QMTIRLTFEPF	--							
ntas	HGTQHEIIRQ	QMTIRLTFEPF	--							
hmvs	HGTQHEIIRQ	QMTIRLTFEPF	--							

Abb. 4.2: Multi-way Protein Alignment pflanzlicher Terpensynthasen mit MVTPS1

Die Boxen stellen konservierte Bereiche dar, von denen angenommen wird, dass sie essentiell für die Aktivität von Terpensynthasen sind. [ALONSO & CROTEAU 1991; RAJAONARIVONY *et al.* 1992A; RAJAONARIVONY *et al.* 1992B; WILLIAMS *ET AL.* 1998] Abkürzungen: msls: Limonensynthase (*Mentha spicata*) Acc.Nr.: L13459; pfls: Limonensynthase (*Perilla frutescens*) Acc.Nr.: D49368; rccs: Casbensynthase (*Rhcinus communis*) Acc.Nr.: L32134; nteas: Epi-Aristolochensynthase (*Nicotiana tabacum*) Acc.Nr.: L04680; hmvs: Vetispiradiensynthase (*Hyoscyamus muticus*) Acc.Nr.: U20187. Erstellt mit BioEdit Sequence Alignment Editor Tom Hall Dpt. Of Microbiology North Carolina State University.

Ein auf der Grundlage der Sequenzen mehrerer Terpensynthasen aufgestellter Phylogeniebaum lässt die Unterschiede zwischen Terpensynthasen aus Gymnospermen, Angiospermen und Terpensynthasen von Terpenen, die am Primärmetabolismus beteiligt sind, erkennen (siehe Abb. 4.3)

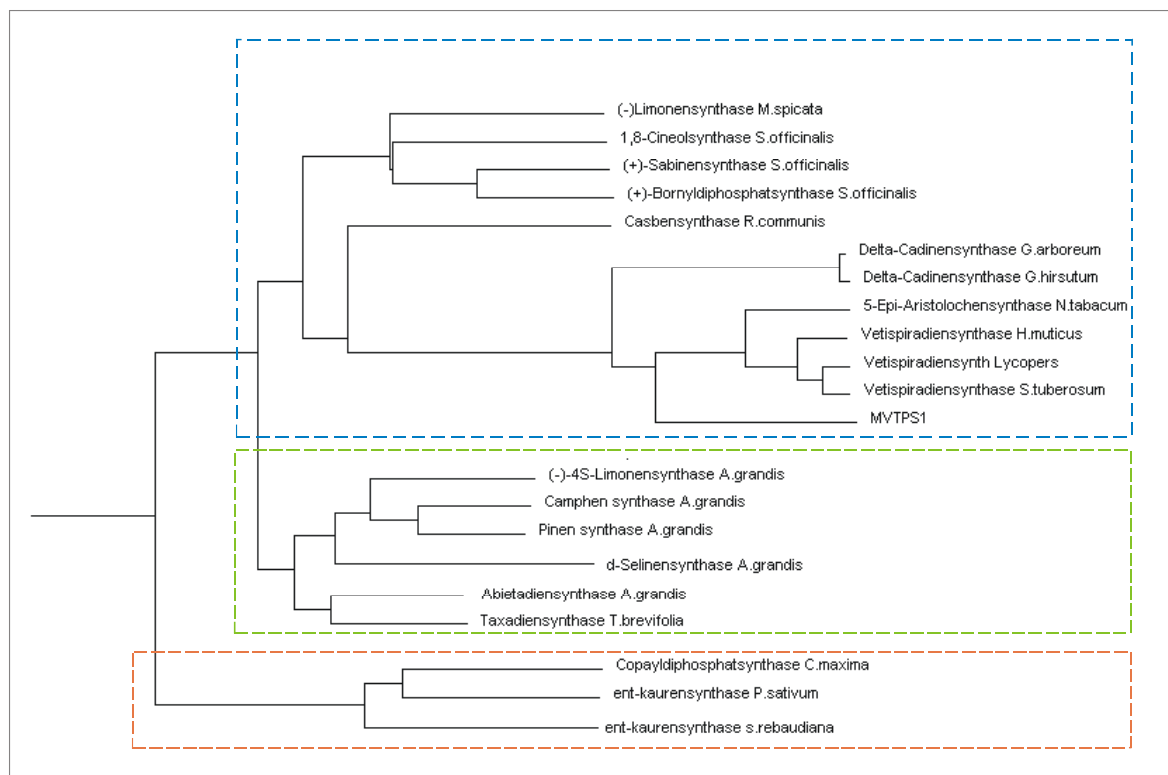


Abb. 4.3: Phylogenetischer Baum mit verschiedenen Terpensynthasen. Die Terpensynthasen aus Angiospermen, Gymnospermen und von Terpenen aus dem Primärmetabolismus sind mit blaue, grün bzw. rot gestrichelten Kästen hervorgehoben. Das Alignment wurde mit Blosum 62 in Align Plus 4 for windows 95 Vers. 4.0 (Scientific & Educational Software) hergestellt. Die Accessionnummern der Terpensynthasesequenzen finden sich im Anhang.

4.4 HETEROLOGE EXPRESSION VON MVTPS1

Die Ähnlichkeit unter den Aminosäuresequenzen der Terpensynthasen ist so hoch, dass zur funktionellen Charakterisierung von isolierten Terpensynthasen ein alleiniger Sequenzvergleich mit Aminosäuresequenzen bereits bekannter Terpensynthasen nicht ausreicht [BOHLMANN *ET AL.* 1998 A]. Erst die heterologe Expression als aktives rekombinantes Protein und die Identifizierung der Produkte aus den C₁₀-, C₁₅- oder C₂₀-Prenyldiphosphat-Substraten ermöglichen zumindest *in vitro* diese Charakterisierung. Dem aufgereinigten Rohextrakt des heterolog exprimierten MVTPS1-Gens wurde

radioaktiv markiertes [$1\text{-}^3\text{H}$]GPP, [$1\text{-}^3\text{H}$]FPP oder [$1\text{-}^3\text{H}$]GGPP zugesetzt und die entstandenen Produkte zunächst mit Radio-GC und anschließend mit GC/MS analysiert (siehe 2.25 und 3.3.3). Das Enzym setzte hauptsächlich FPP, wenig GPP und gar kein GGPP um. Somit konnte bereits nach der Radio-GC angenommen werden, dass MVTPS1 vermutlich eine Sesquiterpensynthase ist.

Die Tatsache, dass *in vitro* auch geringe Mengen Monoterpene von MVTPS1 synthetisiert werden, ist bereits bei anderen Sesquiterpensynthasen beobachtet worden [CROCK *ET AL.* 1997; STEELE *ET AL.* 1998; MERCKE *ET AL.* 1999]. Es wird vermutet, dass kein evolutionärer Druck zur Differenzierung der Sesquiterpensynthasen zwischen FPP und GPP besteht, da *in vivo* das in den Plastiden gebildete Substrat GPP der cytosolischen Sesquiterpensynthase gar nicht zur Verfügung steht [STEELE *ET AL.* 1997; BOHLMANN *ET AL.* 1998 A].

Der Test der enzymatischen Aktivität von MVTPS1 und die anschließende GC/MS-Analytik der Produkte (siehe 4.4) zeigte dass diese Terpensynthase mehrere unterschiedliche Sesquiterpene synthetisiert. Die Fähigkeit von Terpensynthasen, verschiedene Produkte zu synthetisieren, ist schon mehrmals beobachtet worden [LEWINSOHN *ET AL.* 1992; SAVAGE *ET AL.* 1995; STEELE *ET AL.* 1998]. Als Grund dafür wird die starke Instabilität und somit hohe Reaktivität des im elektrophilen Reaktionsmechanismus entstehenden Carbokations vermutet [GERSHENZON & CROTEAU 1993; CROTEAU 1991]. Ferner wird angenommen, dass das Vorkommen dieser Multiprodukt-Terpensynthasen eine entwicklungsbedingte Anpassung ist, die mit geringem Aufwand an Genetik und enzymatischen Mechanismus ein Maximum an Produkten ermöglicht [LANGENHEIM 1994] Dieses Prinzip ist zumindest einer der Gründe für die Vielfalt der Terpene.

BOHLMANN *ET AL.* teilten 1998 (B) die Sesquiterpensynthasen von *Abies grandis* in zwei Klassen ein:

Zum einen die Klasse der konstitutiven Multiproduktenzymen, zu der die δ -Selinensynthase und die γ -Humulensynthase gehören, die laut STEELE *ET AL.* (1998) 34 bzw. 54 verschiedene Sesquiterpene produzieren. Diese Enzyme sind für die Produktion vieler Terpenkomponenten im Harz verantwortlich, lassen sich aber nicht durch eine Verletzung des Baumstammes o.ä. induzieren. Die andere Klasse der Sesquiterpensynthasen lässt sich dadurch charakterisieren, dass diese jeweils nur ein einziges spezifisches Produkt synthetisieren. Diese Sesquiterpensynthasen treten erst nach Induktion auf [BOHLMANN *ET AL.* 1998 (B)]. Es ist zu vermuten, dass diese Korrelation

zwischen konstitutiver Bildung und Multiproduktenzymen, sowie zwischen Induktion und Monoproduktenzymen ein weit verbreitetes Muster ist. Zur Bestätigung dieser Hypothese bedarf es jedoch noch weiterer Untersuchungen und Vergleiche von konstitutiven und induzierbaren Terpensynthasen aus derselben Pflanze.

4.4.1 Abgeleitete Proteinstruktur

Untersuchungen an der dreidimensionalen Struktur eines Proteins ermöglichen Einblicke in die Wechselwirkungen mit Substrat-Molekülen und in den Katalysemechanismus. Es sind bis jetzt nur zwei Terpensynthasen kristallisiert und ihre Röntgenstruktur bestimmt worden, darunter auch die Epi-Aristolochensynthase aus *Nicotiana tabacum* [STARKS *ET AL* 1997]. Die Aminosäuresequenz dieser Synthase besitzt eine hohe Ähnlichkeit (73%) und Identität (55%) zu MVTPS1. Daher war es durch den Swiss-Model-Service möglich, die aus der cDNA von MVTPS1 abgeleitete Aminosäuresequenz mit der bereits bekannten Röntgenstruktur der Epi-Aristolochensynthase zu vergleichen und daraus die putative dreidimensionale Struktur des Proteins abzuleiten. MVTPS1 besitzt demnach nur α -Helices und kurze verbindende Loops und Turns. Sie ist ferner in zwei strukturelle Domänen aufgeteilt. In der carboxyterminalen Domäne befindet sich in einer hydrophoben Tasche das aktive Zentrum des Enzyms.

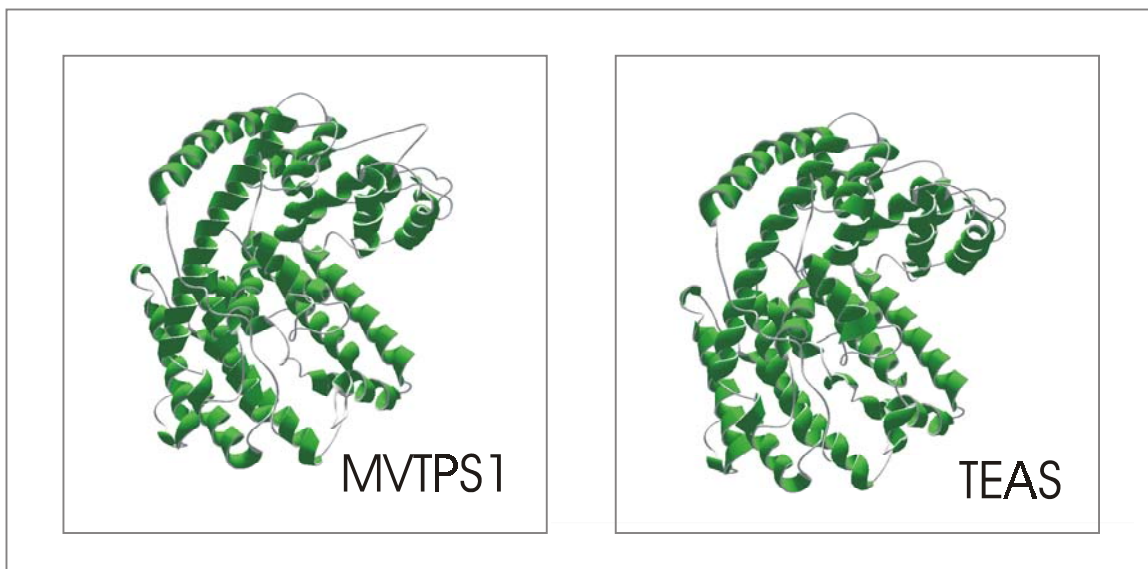


Abb. 4.4: Modell von MVTPS1 aus *Marrubium vulgare*. Dargestellt durch Swiss-Model-Service; links: gemodelte Struktur der isolierten Terpensynthase aus *M. vulgare*, rechts: durch Röntgenstrukturanalyse aufgeklärte Struktur der epi-Aristolochensynthase aus *N. tabacum*.

4.4.2 Identifizierung des Hauptproduktes von MVTPS1

Die im Test der enzymatischen Aktivität von MVTPS1 synthetisierten Produkte des Substrats FPP wurden gaschromatographisch aufgetrennt und mit einem Massenspektrometer detektiert. Die Massenspektren wurden im Anschluss mit mehreren Spektrenbibliotheken verglichen. Dieser Vergleich ergab, dass das Hauptprodukt der aus *M. vulgare* isolierten Terpensynthase eine Selinen-ähnliche Struktur aufweist.

Verschiedene isomere Formen des Selinens kommen in mehreren Pflanzen vor. So ist z.B. Selinen eine Komponente des Sellerieöls und mit an dem für Sellerie (*Apium graveolens* L.) charakteristischen Geruch beteiligt [HÄNSEL ET AL. 1993]. In *Abies grandis* L. werden von der konstitutiv gebildeten Selinensynthase *in vitro* 34 unterschiedliche Terpene synthetisiert [STEELE ET AL. 1998].

Aus dem Chromatogramm der Radio-GC ist bereits zu erkennen, dass MVTPS1 *in vitro* die Synthese von mindestens 5 unterschiedlichen Sesquiterpenen katalysiert. Ein phylogenetischer Baum, welcher aus dem Alignment mehrerer Terpensynthasen aus verschiedenen Pflanzen entstanden ist zeigt, dass die Selinensynthase aus *A. grandis* trotz struktureller Ähnlichkeit ihrer Produkte nur sehr geringe Ähnlichkeit mit der Terpensynthase aus *M. vulgare* aufweist (siehe Abb. 4.3).

Diese Tatsache ist ein Beispiel dafür, dass trotz eines ähnlichen Hauptproduktes die Aminosäuresequenz der Terpensynthasen aus Angiospermen und Gymnospermen nur geringe Ähnlichkeiten besitzen.

4.5 MECHANISMUS DER ZYKLISIERUNG

STEELE ET AL. (1998) haben ein Zyklisierungsschema für das Entstehen der vielen Produkte der δ -Selinensynthase aus *A. grandis* aufgestellt (siehe Abb. 4.5). Es beginnt mit der Ionisierung und anschließenden Isomerisierung von FPP zu dem tertiären, aliphatischen Isomer Nerolidyl-Diphosphat. Dieser Prozess ist auch aus der Biosynthese anderer Sesquiterpene bekannt [CANE 1998]. Den Weg zu dem Hauptprodukt δ -Selinen leiten STEELE ET AL. (1998) von der Bildung anderer Eudesman-Sesquiterpene ab [CANE 1998]: das transoidale Konformer des Nerolidyl-Diphosphats wird ionisiert und durch einen anschließenden Ringschluß zwischen C10 und C1 entsteht nach Deprotonierung Germacren A und B oder, nach Hydrid-Shift, Germacren C und D. Diese Germacrene können akkumuliert werden oder sie werden reprotoniert, so dass zusätzliche Ringschlüsse möglich sind. Reprotonierung am C6 führt zu den Terpenen

des Eudesman-Typs und Protonierung am C3 führt zu den Terpenen des Azulan-(Guaian-) Typs. Die Bildung des Intermediats nach der Protonierung ist abhängig von der jeweiligen Position der während der Germacrensynthese gebildeten Doppelbindung. α -Selinen entsteht demnach nach C6-Protonierung des Germacren A und δ -Selinen durch Protonierung des Germacren C mit anschließendem 2,7-Ringschluß sowie abschließender Deprotonierung beider Intermediate.

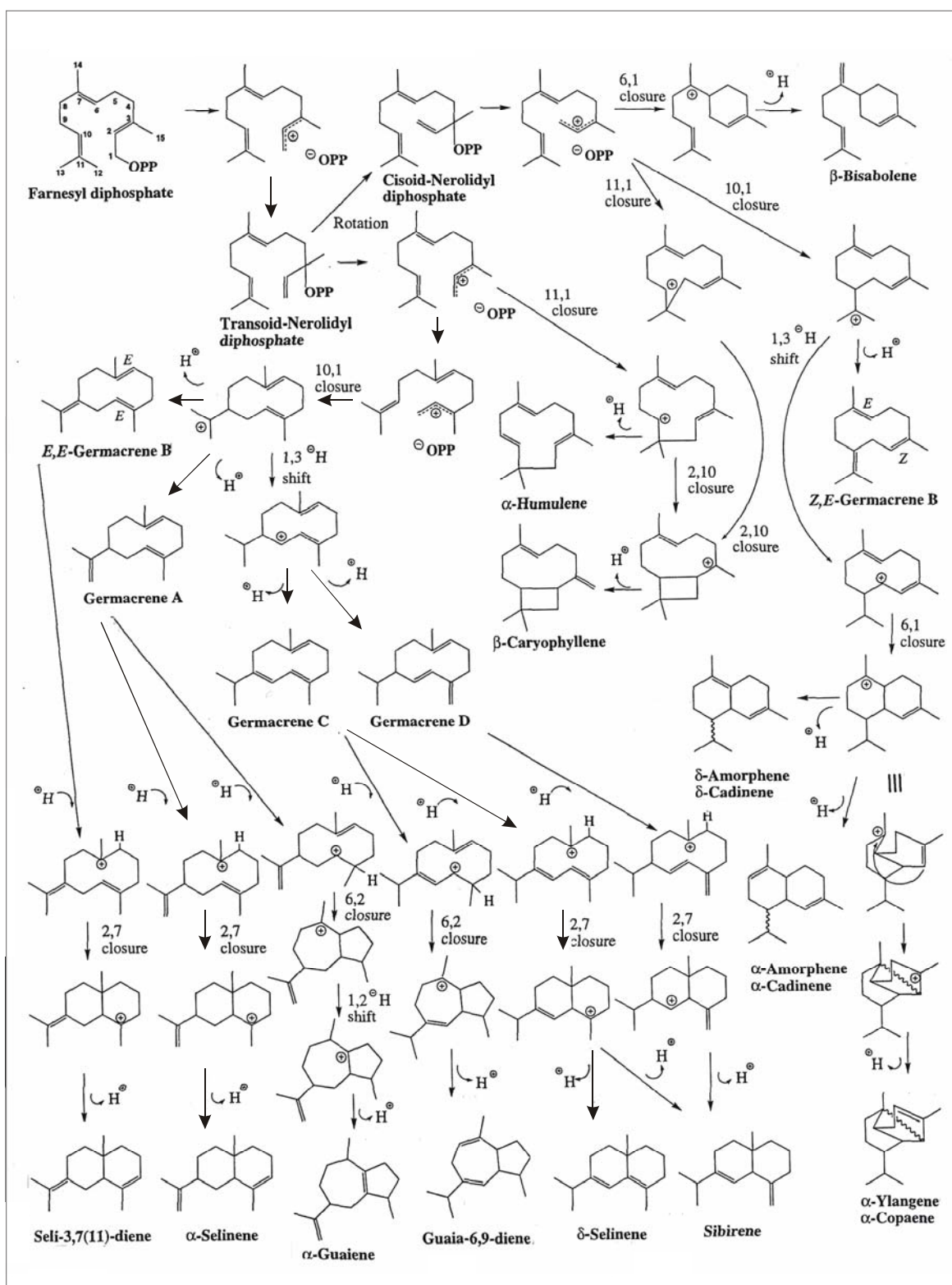


Abb. 4.5: Von STEELE ET AL. (1997) vorgeschlagener Mechanismus der Sesquiterpenbildung durch δ -Selinene-Synthese in *Abies grandis*. Die Nummerierung des Farnesyl-System ist angegeben und OPP bezeichnet das Diphosphat.

Die Frage, welche konkrete Struktur das Hauptprodukt von MVTPS1 produziert, bedarf noch weiterer ausführlicher Arbeiten. In Kooperation mit der AG Degenhardt (MPI für chemische Ökologie, Jena; Abt. J. Gershenzon) wird die Identifizierung mit neuen Referenzsubstanzen mittels GC/MS-Analytik durchgeführt werden.

4.6 REAKTIONSMCHANISMUS DER MVTPS1 ANHAND DES VERGLEICHS MIT DER STRUKTUR VON TEAS

Epi-Aristolochensynthase in Tabak (*Nicotiana tabacum* L.) (TEAS) hat zu MVTPS1 eine Ähnlichkeit von 73% und ist zu 55% mit dieser identisch. *Nicotiana tabacum* stammt aus der Familie der Solanaceae, welche der Familie der Lamiaceae phylogenetisch nahe verwandt ist. Dies, zusammen mit der Annahme, dass der Faltungsprozess in allen Terpensynthasen sehr ähnlich ist [STARKS *ET AL.* 1997], begründet einen Vergleich von MVTPS1 mit TEAS.

Die Aminosäuresequenz von MVTPS1 wurde mit der bereits aufgeklärten Kristallstruktur der TEAS mittels Swiss-Prot verglichen (siehe 4.4.1). Aus dem Vergleich mit dieser Kristallstruktur lässt sich eine strukturelle Basis für eine hypothetische Folge der ersten katalytischen Schritte nach STARKS *ET AL.* (1997) ableiten : Nachdem FPP an die TEAS gebunden und anschließend ionisiert worden ist, wird in der Synthase eine hydrophobe Tasche geformt, welche das entstandene Carbokation vor der Inaktivierung mit H₂O schützt. Diese Tasche wird in TEAS durch die Schließung eines α -helikalen Loops über dem aktiven Zentrum mittels Interaktionen zwischen Trp²⁷³ und Tyr⁵²⁷ gebildet. Diese beiden Aminosäurereste sind in fast allen Terpensynthasen konserviert, in *Marrubium vulgare* als Trp²⁷¹ und Tyr⁵²⁵. Auf der Basis der Annahme eines in allen Terpensynthasen gleich ablaufenden Faltungsprozesses [STARKS *ET AL.* 1997] ist anzunehmen, dass Trp²⁷¹ und Tyr⁵²⁵ die gleiche Funktion in MVTPS1 haben. Die Bildung des Loops positioniert auch die Aminosäurereste Arg²⁶⁴ und Arg⁴⁴¹ der TEAS in die Nähe des C1 des Substrats (siehe Abb. 4.6 A). Zusammen mit den durch das DDXXD-Motiv koordinierten substratgebundenen Metallionen hilft diese Positionierung das Diphosphat-Anion von dem entstandenen Carbokation fernzuhalten und somit eine Rückreaktion zu verhindern. Verglichen mit der Struktur von TEAS, sind in MVTPS1 diese beiden Argininreste als Arg²⁶² und Arg⁴³⁹ konserviert. Mehrere C-Atome der Peptidkette und Thr⁴⁰³ ermöglichen in TEAS einen Angriff von C10 auf C1, sodass ein Germacryl-Intermediat entsteht (siehe Abb. 4.6 B). Tyr⁵²⁷ stabilisiert in der Nähe von C11 das entstandene makrozyklische Carbokation. Dadurch kann

Asp⁵²⁵ am C13 das Molekül deprotonieren, sodass Germacren A entsteht (siehe Abb. 4.6 C+D). In MVTPS1 ist eine solcher Reaktionsschritt durch die konservierten Tyr⁵²⁵- und Asp⁵²³- Reste möglich. Im Anschluss wird in TEAS Germacren A am C6 reprotoniert und ein Carbokation mit Eudesman-Grundgerüst entsteht (siehe Abb. 4.6 E). STARKS *ET AL.* (1997) nehmen an, dass diese Reprotonierung in TEAS von einer katalytischen Triade mit Asp⁴⁴⁴, Tyr⁵²⁰ und Asp⁵²⁵ ermöglicht wird (siehe Abb. 4.6 F). Die Reaktion wird von Asp⁴⁴⁴ initiiert, indem ein Hydroxylion vom Tyr⁵²⁰ entfernt wird. Zur gleichen Zeit bindet der phenolische Sauerstoff ein Proton von Asp⁵²⁵. Tyr⁵²⁰ kann nun die C6-Doppelbindung des Germacren protonieren und in einer konzertierten Aktion ein Proton von der Carboxylgruppe des Asp⁴⁴⁴ aufnehmen. Das entstandene kationische Zentrum wird durch die Hydroxylgruppe von Thr⁴⁰³ stabilisiert.

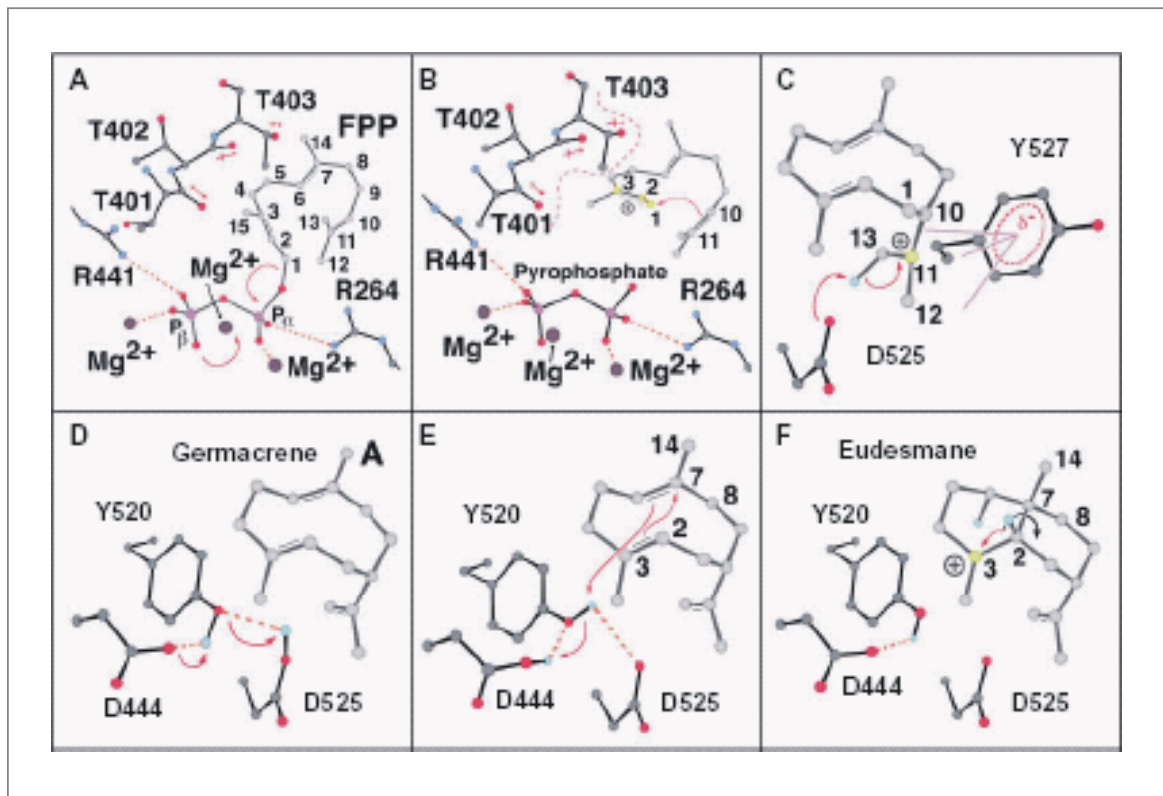


Abb. 4.6: von STARKS *ET AL.* 1997 angenommene Teilschritte des Reaktionsmechanismus der epi-Aristolochensynthese in *N. tabacum* Auszug aus Veröffentlichung. T: Threonin; R: Arginin; Y: Tyrosin; D: Asparaginsäure

In MVTPS1 lässt sich hypothetisch diese katalytische Triade auch identifizieren: Die Position dieser drei Aminosäurereste der TEAS-Struktur (Asp⁴⁴⁴, Tyr⁵²⁰ und Asp⁵²⁵) ist durch das Programm Swiss Model mit der Position der drei entsprechenden Aminosäurereste der abgeleiteten (modellierten) Struktur von MVTPS1 (Asp⁴⁴³, Tyr⁵¹⁸ und

Asp⁵²³) verglichen worden. Abb. 4.7 zeigt, dass die Position dieser beiden Triaden nahezu gleich ist. Das lässt vermuten, dass auch in MVTPS1 dieser Reaktionsmechanismus möglich ist. Es wird angenommen, dass in TEAS das entstandene Carbokation von der Hydroxylgruppe des Thr⁴⁰³ stabilisiert wird. Ein exaktes Analogon dazu, d.h. ein gleichwertiger Thr-Rest in entsprechender Position in MVTPS1, ist zwar nicht zu finden, jedoch könnten andere Aminosäurereste das entstandene Carbokation stabilisieren. Weitere Schritte lassen sich aus der Struktur von TEAS nicht ableiten. Zur Bestätigung dieses für MVTPS1 angenommenen Reaktionsmechanismus und zur Untersuchung der folgenden Schritte sind jedoch weitere Untersuchungen, wie z.B. Mutagenese-Experimente mit den vermutlich beteiligten Aminosäuren und letztendlich eine Strukturaufklärung der MVTPS1 mittels Röntgenstrukturanalyse erforderlich.

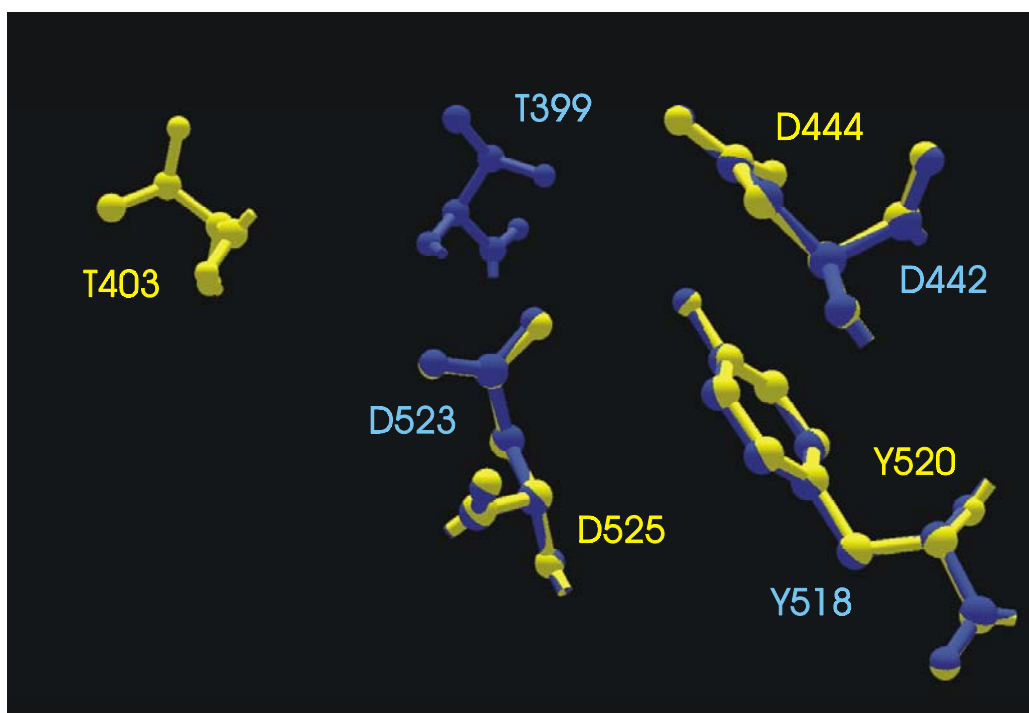


Abb. 4.7: Position der von Starks *et al.* (1997) angenommenen katalytischen Triade im Vergleich blaue Moleküle zeigen die Position der Aminosäurereste in MVTPS1, die gelben Moleküle geben die Position in TEAS wieder.

Der Vergleich der Kristallstruktur von TEAS aus *N. tabacum* mit der aus der Aminosäuresequenz von MVTPS1 abgeleiteten Struktur zeigt, dass trotz dieser hohen Ähnlichkeit der Struktur ein anderes Produkt entstehen kann. In diesem Zusammenhang

ist es auch bemerkenswert, das TEAS laut VÖGELI *ET AL.* 1990 nur ein einziges Produkt synthetisiert

4.7 EXPRESSIONSSTART DER MVTPS1

Ein Southern-Blot mit RT-PCR-Fragmenten aus Gesamt-RNA von Blättern unterschiedlichen Alters zeigte, dass bereits in den Kotyledonen (ca. 10 Tage nach Aussaat (siehe Abb. 3.20)) MVTPS1 transkribiert wird (siehe 3.3.5). Ob das Protein zu diesem Zeitpunkt bereits aktiv d.h. die Translation direkt im Anschluss an die Transkription stattfindet konnte in dieser Arbeit noch nicht gezeigt werden.

Im Gegensatz dazu wurde bereits vor Beginn der molekularbiologischen Untersuchungen an *Marrubium vulgare* die Akkumulation von Furanolabdanditerpenen (FLD) im zeitlichen Verlauf der Entwicklung der Pflanzen betrachtet [KNÖß 1996]. Dazu wurden Pflanzen aus Früchten von *M. vulgare* im Gewächshaus angezogen. Die Pflanzen keimten durchschnittlich zwischen dem dritten und fünften Tag nach der Aussaat. Die Akkumulation der FLD konnte erst im vierten oder fünften Blattpaar bei etwa 6 Wochen alten Pflanzen detektiert werden. Sie war zunächst relativ gering und stieg dann an.

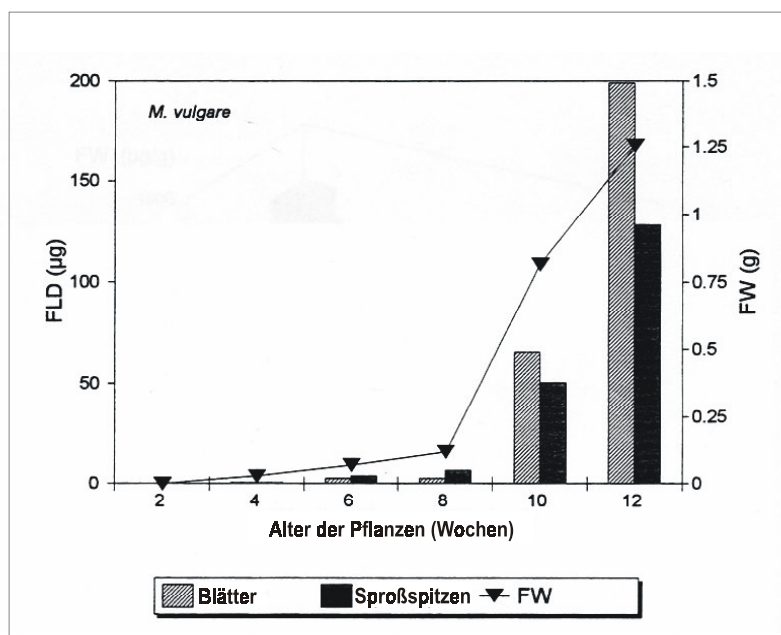


Abb. 4.8: Frischgewicht und Gesamtgehalt an FLD während der ersten 12 Wochen des Wachstums nach der Aussaat in jungen Pflanzen von *M. vulgare* L. Anzucht der Pflanzen aus Früchten im Gewächshaus. Im Abstand von zwei Wochen wurden zwei durchschnittlich gewachsene, unversehrte Pflanzen geerntet und das Frischgewicht bestimmt. Der Gehalt an FLD in dem obersten Blattpaar und in der Vegetationsspitze sowie dem restlichen Teil der krautigen Pflanze wurden getrennt bestimmt. Die Messpunkte geben die Mittelwerte aus zwei Messungen an (Auszug aus Habilitationsschrift von W. KNÖß 1996).

Über die Akkumulation der/des Produkte(es) von MVTPS1 bzw. den Translationsstart des Enzyms *in vivo* kann zu diesem Zeitpunkt noch keine Aussage gemacht werden.

Diese beiden Untersuchungen mit zwei unterschiedlichen Methoden – molekularbiologisch und biochemisch - beinhalten die ersten Teilergebnisse zur Regulation der Akkumulation bzw. der Expression von Terpenen bzw. Terpensynthasen in *M. vulgare*. Sie lassen sich zu diesem Zeitpunkt noch oder überhaupt nicht miteinander vergleichen. Diterpene und Sesquiterpene werden in verschiedenen Kompartimenten synthetisiert, die vermutlich auch verschiedenen Regulationen unterliegen.

Aus den Strukturen der FLD in *Marrubium vulgare* (siehe Abb. 4.9) lässt sich ableiten, dass mehrere Oxidationsreaktionen stattgefunden haben müssen. Es ist daher anzunehmen, dass die Bildung der FLD in *Marrubium vulgare* durch eine Diterpensynthese zwar initiiert wird, jedoch müssen der Bildung des diterpenoiden Intermediats mit Labdangrundgerüst weitere Oxidationsreaktionen folgen, damit am Ende der photo-metrisch detektierbare Furanring entsteht.

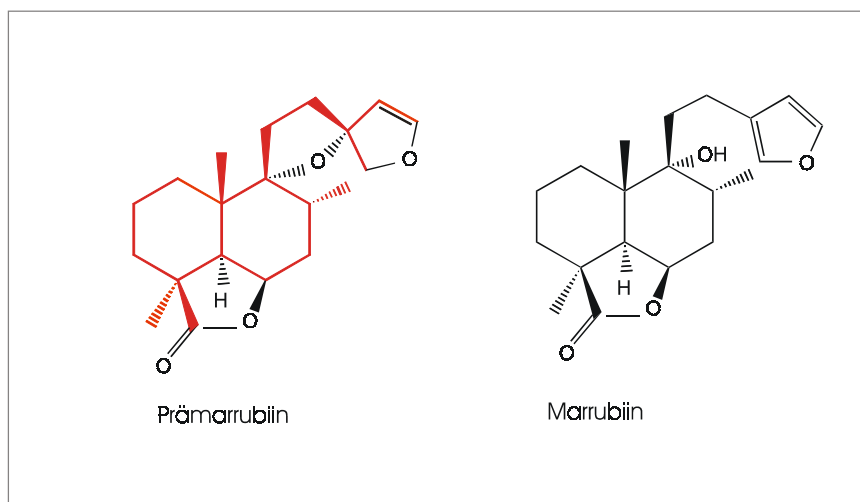


Abb. 4.9: Strukturformeln der FLD aus *Marrubium vulgare*: Prämarrubiin (9 α ,13R15,16-Diepoxyabda-14-en-19,6 β -olid, Marrubiin (15,16-Epoxy-9 α -hydroxyabda-13(16),14-dien-19,6 β -olid). In Prämarrubiin ist das Labdangrundgerüst rot unterlegt.

Die Möglichkeit, dass die anschließenden Reaktionen auch von der Diterpensynthese durchgeführt werden, ist unwahrscheinlich. Das bei diesem elektrophilen Reaktionsmechanismus als Zwischenprodukt entstehende Carbokation ist zwar sehr reaktiv,

kann aber nicht mehrere Oxidationen eingehen, sodass am Ende sowohl ein Furanring als auch ein Lactonring im Molekül entstehen kann.

Viele Terpene werden im Anschluss an die Terpensynthasereaktion weiteren enzymatischen Reaktionen unterzogen bis letztendlich das Endprodukt entstanden ist [z.B. BOUWMEESTER *ET AL.* 1998; HEFNER *ET AL.* 1996; LUO *ET AL.* 2001]. Es ist daher denkbar, dass auch in *M. vulgare* die an die Diterpenbiosynthese angeschlossenen Oxidationen erst später, nach der Bildung des Diterpens, erfolgen. Zur Bestätigung dieser Annahme und zur Untersuchung des allgemeinen zeitlichen Verlaufs der Bildung von Terpenen in *M. vulgare* ist es unter anderem notwendig, die Diterpensynthase in *M. vulgare* auf molekularbiologischer Ebene zu isolieren und ihren Expressionsstartpunkt zu untersuchen. Auch die Isolierung von Cytochrom P450 Terpenhydroxylasen aus *M. vulgare* und die Untersuchung deren Expression in der Pflanze könnten weitere Einblicke in die Synthese von Marrubiin geben.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zum Startpunkt der Expression von MVTPS1 in *M. vulgare* sind der erste Schritt auf molekularbiologischer Ebene zur Aufklärung der Regulation der Bildung von Terpenen in *M. vulgare*.

5 AUSBLICK

Die Untersuchung der Terpenbiochemie ist seit Ruzicka 1953 als erster das „aktive Isopren“ postuliert hat, weit fortgeschritten und hat am Anfang der 90er Jahre mit den neuen molekularbiologischen Möglichkeiten völlig neue Perspektiven erhalten: Der Zugang zu den Genen und überexprimierten Proteinen gibt einen Einblick in mechanistische Details und Beziehungen zwischen Struktur und Funktion. Die Terpensynthase MVTPS1 aus *M. vulgare* konnte aufgrund dieser neuen Techniken isoliert und heterolog exprimiert werden. Die Struktur des Hauptprodukts von MVTPS1 wird momentan durch GC/MS und Cochromatographie mit entsprechenden Referenzsubstanzen im Max-Planck-Institut für chemische Ökologie in Jena von der Arbeitsgruppe Degenhardt (Abteilung Gershenzon) identifiziert. Für die Untersuchung des Reaktionsmechanismus werden zukünftig auch Arbeiten durchgeführt, um die weiteren *in vitro* entstandenen Produkte zu identifizieren und diese zusammen mit dem Hauptprodukt mit einer GC/MS-Analyse des ätherischen Öls aus *M. vulgare* zu vergleichen. Es ist praktisch sicher, dass in *M. vulgare* noch weitere Terpensynthasen zu finden sind. Aufgrund der in dieser Arbeit entwickelten Methoden zur molekularbiologischen Untersuchungen des Terpenstoffwechsels in *M. vulgare* ist es nun möglich, nach weiteren Terpensynthasen in dieser Pflanze zu suchen. Die Ableitung weiterer Primer und die Verwendung der durch Genome WalkerTM erstellten genomischen DNA-Bänke als Template ist eine von mehreren Methoden, Gene anderer Terpensynthasen aus dieser Pflanze zu isolieren.

Die Untersuchungen zum Expressionsstart anderer konstitutiver Terpensynthasen [GERSHENZON *ET AL.* (2000); MIHALIAK & LINCOLN 1989; DELL & MCCOMB 1979] lassen vermuten, dass die Expression und damit die Menge an Terpensynthasen in jungen Blättern sehr hoch ist. Basierend auf dieser Vermutung sollte eine cDNA-Bank aus RNA 10-15-Tage alter Blätter einen ausreichenden Titer aufweisen, um mit heterologen Sonden aus anderen Terpensynthasen oder aus Fragmenten von *mvtps1* erfolgreich nach weiteren Genen von Terpensynthasen suchen zu können. Für die Suche nach Diterpensynthasen sind die bislang angewendeten Strategien gegebenenfalls noch zu modifizieren.

Mit dem heterolog exprimierten und gereinigten Enzym MVTPS1 als Antigen lassen sich Antikörper herstellen, sodass mit Westernblots die Expression des Enzyms in der

Pflanze d.h. *in vivo* untersucht werden kann. Als Teilaspekt zur Aufklärung der Funktion der Terpene lässt sich auch das Verhalten des vermutlich konstitutiv gebildeten Enzyms MVTPS1 unter dem Einfluss von Stressfaktoren und/oder Elicitoren untersuchen. In Suspensionskulturen von *M. vulgare* konnten bislang keine FLD detektiert werden [KNÖß 1996]. Mit Westernblots kann der Frage nachgegangen werden, ob zumindest die Sesquiterpensynthase MVTPS1 in Suspensionskulturen exprimiert wird.

Durch detaillierte Aufklärung der Struktur von MVTPS1 können weitere Einblicke in den Reaktionsmechanismus eines Multiproduktenzyms gewonnen werden.

Die genomische Sequenz von *mvtps1* ist ein Beitrag zur Untersuchung der Entwicklung der Terpensynthesen in Bezug zur phylogenetischen Entwicklung der Pflanzen.

Mit diesen molekularbiologischen Methoden steigt die Anzahl der isolierten und charakterisierten Terpensynthesen aus den verschiedensten Organismen. Es entsteht dadurch ein immer besseres Verständnis der Regulation und des Channelings der Terpenbiosynthese.

Auf der Basis dieses Verständnisses wird es in Zukunft möglich sein, die Terpenbiosynthese gerichtet zu manipulieren um z.B. den Ertrag an essentiellen Inhaltsstoffen wie Phytosterole, Geruch- und Geschmacksstoffe, sowie pharmazeutisch wirksamer Stoffe oder andere Komponenten von wirtschaftlicher Bedeutung in Pflanzen zu erhöhen oder Mittel gegen Schädlinge oder pathogene Organismen zu entwickeln.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zum ersten Mal aus *Marrubium vulgare* L. (Lamiaceae) das Gen einer Terpensynthase isoliert und diesem Gen eine Funktion zugeordnet.

1. Die vollständige cDNA einer putativen Terpensynthase wurde mit der Methode der RACE-PCR amplifiziert. Innerhalb dieser isolierten cDNA-Sequenz mit der exakten Länge von 1907 bp (1879 bp ohne PolyA⁺-Anhang) wurde ein 1641 bp großer offener Leserahmen (ORF) identifiziert, der für 546 AS codiert. Das Gen wurde *mvtps1* (*Marrubium vulgare* Terpensynthase 1) genannt.
2. Mittels Genome WalkerTM konnte die genomische DNA-Sequenz der entsprechenden Terpensynthase aus *M. vulgare* in einer Größe von 3976 bp entschlüsselt werden.
3. Durch den Vergleich der genomischen Sequenz der Terpensynthase mit der Sequenz der cDNA konnten 6 Intron- und 7 Exonbereiche festgesetzt werden. Diese Struktur der genomischen DNA stimmt mit den bisher bekannten Strukturen genomischer Sequenzen pflanzlicher Sesquiterpensynthasen aus Angiospermen überein.
4. Der ORF der cDNA-Sequenz wurde in einen Expressionsvektor inseriert und dieser in *E. coli* kloniert und heterolog exprimiert. Das überexprimierte Enzym wurde in einem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Dieses Gel zeigte im Vergleich mit dem nicht induzierten Rohextrakt eine deutliche Bande unterhalb von 62 kDa.
5. Die enzymatische Aktivität konnte *in vitro* in Inkubationsansätzen mit den radioaktiv markierten Substraten [1-³H]GPP, [1-³H]FPP mittels Radio-GC nachgewiesen werden. FPP (bevorzugtes Substrat der Sesquiterpensynthasen) wurde in der größten Menge und zu mindestens 5 unterschiedlichen Produkten umgesetzt. Aus GPP (Substrat der Monoterpensynthasen) wurde in geringeren

Mengen auch ein Monoterpen gebildet. Der Einsatz von $[1\text{-}^3\text{H}]\text{GGPP}$ (Substrat der Diterpensynthasen) führte hingegen zu keinen Produkten.

6. In GC/MS-Analysen der entstandenen Produkte aus FPP konnte das Hauptprodukt der entstandenen Terpene als bizyklisches Sesquiterpen mit der Summenformel $\text{C}_{15}\text{H}_{24}$ identifiziert werden.
7. Mit Sonden aus cDNA-Fragmenten wurden Untersuchungen an Gesamt-RNA aus Blättern verschiedenen Alters von *M. vulgare* durchgeführt. Diese Untersuchungen ergaben, dass das isolierte Gen bereits in den Kotyledonen exprimiert wird.

7 LITERATUR

- ALONSO, W., CROTEAU, R. (1991)
Purification and characterisation of the monoterpene cyclase gamma-terpinene Synthase from *Thymus vulgaris*
Arch Biochem Biophys **286**(2): 511-517
- ALONSO, W., CROTEAU, R. (1993)
Prenyltransferases and Cyclases
Methods Plant Biochem. **9** 239-260
- ALTSCHUL, S.F., BOGUSKI, M.S., GISH, W. & WOOTTON, J.C. (1994)
Issues in searching molecular sequence databases. *Nat Genet.* **6**, 119-129.
- ALTSCHUL, S.F., MADDEN, T.L., SCHÄFFER, A.A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W. & LIPMAN D.J. (1985).
Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.* **25**, 3389-3402.
- ANDREWS, T.J., LORIMER, G.H. (1987)
RubisCO: Structure, mechanism and prospects for improvement, in: *Biochemistry of Plants* 10, S. 131-218
Academic Press, New York (1987)
- ASHBY M.N.; EDWARD P.A. (1990)
Elucidation of the deficiency in two yeast coenzyme Q mutants: characterization of the structural gene encoding hexaprenyl pyrophosphate synthetase
J. Biol. Chem. **265** 13157-13164
- AUBOURG S, TAKVORIAN A, CHERON A, KREIS M, LECHARNY A. (1997)
Structure, organization and putative function of the genes identified within a 23.9-kb fragment from *Arabidopsis thaliana* chromosome IV.
Gene; **199**(1-2):241-53.
- BACH T.J. (1995)
Some new aspects of isoprenoid biosynthesis in plants-a review
Lipids Vol. 30 **3**, 191-202
- BACK K, CHAPPELL J (1995)
Cloning and bacterial expression of a sesquiterpene cyclase from *Hyoscyamus muticus* and its molecular comparison to related terpene cyclases
J Biol Chem **270**: (13) 7375-7381 Mar 31 1995 Acc.Nr.: AAA86337

- BACK K, CHAPPELL J (1996)
Identifying functional domains within terpene cyclases using a domain-swapping strategy
Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol 93; 6841-6845
- BACK K, HE S, KIM KU, SHIN DH (1998)
Cloning and bacterial expression of sesquiterpene cyclase, a key branch point enzyme for the synthesis of sesquiterpenoid phytoalexin capsidiol in UV-challenged leaves of *Capsicum annuum*.
Plant Cell Physiol.; **39**(9):899-904.
- BACK K, YIN S, CHAPPELL J. (1994)
Expression of a plant sesquiterpene cyclase gene in *Escherichia coli*.
Arch Biochem Biophys.; **315**(2):527-32.
- BEUNING, L.L.(1994)
cDNA sequence of an apple ribulose biphosphate carboxylase small subunit.
Plant Physiol.; **104**(3):1083
- BLAKE, M.S. JOHNSTON, K.H., RUSSEL-JONES, G.J. & GOTSCHLICH, E.C. (1984)
Small antibody-like proteins with described ligand specificities derived from the lipocalin fold
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96**, 1898-1903
- BOHLMANN J, STEELE CL, 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.
J Biol Chem; **272**(35):21784-92
- BOHLMANN J., CROCK J., JETTER R., UND CROTEAU R.(1998 B)
Terpenoid-based defenses in conifers: cDNA-cloning, characterization and functional expression of wound inducible (E)- α -bisabolene synthase from grand fir (*Abies grandis*)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1998 **95**, 6756-6761
- BOHLMANN J., MEYER-GAUEN G. UND CROTEAU R. 1998 (A)
Plant terpenoid synthases: Molecular biology and phylogenetic analysis
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1998, **95**, 4126-4133
- BOUWMEESTER, H.J., GERSHENZON J., KONINGS M.C.J.M UND CROTEAU R.(1998)
Biosynthesis of the monoterpenes Limonene and carvon in the fruit of caraway
Plant Physiol. (1998) **117**:901-912

- BOUWMEESTER, H.J., VERSTAPPEN, F. W.A., POSTHUMUS, M. A.& DICKE M.(1999)
Spider Mite-induced (3S)-(E)-Nerolidol Synthase Activity in Cucumber and Lima Bean. The First Dedicated Step in Acyclic C11-Homoterpene Biosynthesis
Plant Phys. **121**:173-180
- BUCKINGHAM J. (1998)
Dictionary of Natural Products on CD-ROM Vers. 6.1
Chapman & Hall, London
- CANE D.E.(1998)
Sesquiterpene Biosynthesis. Cyclization Mechanisms,
in: "Isoprenoids, Including Carotenoids and Steroids," ed., David E. Cane, "Comprehensive Natural Products Chemistry," Vol. 2, Elsevier, London, 1998
- CASADABAN, M. & COHEN, S.N. (1980)
Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in *Escherichia coli*.
J. Mol. Biol. **138**, 179-207
- CHAPPELL J. (1995)
Biochemistry and molecular biology of the isoprenoid pathway in plants
Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. **46**, 521-547
- CHARLWOOD B.V., CHARLWOOD K.A. (1991)
Terpenoid production in plant cell cultures
In: Proc. PSE **31**: Ecological Chemistry and Biochemistry of Plant Terpenoids, 95-104
Clarendon Press, Oxford
- CHEN A., KROON P.A., POULTER C.D. (1994)
Isoprenyldiphosphate synthases: protein sequence comparisons, a phylogenetic tree and predictions of secondary structure
Protein Sci. **3** 600-607
- CHEN XY, CHEN Y, HEINSTEIN P, DAVISSON VJ. (1995)
Cloning, expression, and characterization of (+)-delta-cadinene synthase: a catalyst for cotton phytoalexin biosynthesis.
Arch Biochem Biophys.; **324**(2):255-66
- CHENCHIK, A., MOQADAM, F. & SIEBERT, P. (1995)
Marathon cDNA amplification: A new method for cloning full-length cDNAs.
Clonetechniques **X**, 5-8.
- CHENCHIK, A., MOQADAM, F. & SIEBERT, P. (1996)
A new method for full length cDNA cloning by PCR. In: A Laboratory Guide to RNA: Isolation, Analysis, and Synthesis (Krieg P.A. ed.)
Wiley-Liss. Inc., 273-321.

- CHO, T.-J., CHUNG, K.A., LEE, K.J., CHUNG, U.S., CHO, N.J. AND CHAE, Q (1992)
Molecular cloning of a cDNA encoding a ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase small subunit in soybean
Korean Biochem. J. **25**, 658-663
- COLBY SM, ALONSO WR, KATAHIRA EJ, MCGARVEY DJ, 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.
J Biol Chem.; **268**(31):23016-24.
- COLBY, S.M., CROCK, J., DOWDLE-RIZZO, B., LEMAUX, P.G. AND 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
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **95** (5), 2216-2221 Acc.Nr.: TO6266
- CONNOLLY J.D., HILL R.A. (1991)
Dictionary of Terpenoids
Chapman & Hall, London
- CROCK J., WILDUNG M. UND CROTEAU R (1997).
Isolation and bacterial expression of a sesquiterpene synthase cDNA clone from peppermint (*Mentha piperita* L.)
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **94** 12833-12838 (1997)
- CROTEAU R. (1987)
Biosynthesis and catabolism of monoterpenoids
Chem. Rev. **87**: 929-954
- CROTEAU R., WISE M.L. (1998)
Monoterpene biosynthesis
in: "Isoprenoids, Including Carotenoids and Steroids," ed., David E. Cane, "Comprehensive Natural Products Chemistry", Vol. 2, Elsevier, London, 1998
- DARVILL A.G., ALBERTSHEIM P. (1984)
Annu. Rev. Plant Physiol. **35** 243-275
- DAWSON F.A. (1994)
The Amazing Terpenes
Naval Stores Rev. März/April 6-12
- DEAN C., SCHMIDT R. (1995)
Plant Genomes: a current molecular description
Annu. Rev. Plant Physiol Plant Mol. Biol. **46** 395-418

- DEHAL, S.S., CROTEAU, R. (1988)
Partial purification and characterisation of two sesquiterpene cyclases from sage (*Salvia officinalis*) which catalyze the respective conversion of farnesyl pyrophosphate to humulene and caryophyllene
Arch Biochem Biophys 261(2): 346-356
- DELL B., MCCOMB A.J. (1978)
Biosynthesis of resin terpenes in leaves and glandular hairs of *Newcastelina viscida*
J. Exp. Bot. **29**: 89-95
- EBEL J. (1998)
Oligoglucoside elicitor-mediated activation of plant defense.
Bioessays 1998 Jul;20(7):569-76. Review
- EISENREICH W., SCHWARZ A., CARTAYRADE A., ARIGONI D., ZENK M.H. (1998)
The deoxyxylulose phosphate pathway of terpenoid biosynthesis in plants and microorganisms
Chem Biol. **5**: R221-R233
- FACCHINI PJ, CHAPPELL J. (1992)
Gene family for an elicitor-induced sesquiterpene cyclase in tobacco.
Proc Natl Acad Sci U S A Nov 15;89(22):11088-92 Acc.No.: Q40577
- FAHN A. (1979)
Secretory Tissue in Plants
Academic Press, London
- FEINBERG, A.P. & VOGELSTEIN, B. (1983)
A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity.
Anal. Biochem. **137**, 266-267.
- FENG DF, DOOLITTLE RF (1996)
Progressive alignment of amino acid sequences and construction of phylogenetic trees from them
Methods Enzymol.; **266**:368-82
- FOLEY, K.P., LEONARD, M.W. & ENGEL, J.D. (1993)
Quantitation of RNA using the polymerase chain reaction.
Trends Genet. **9**, 380-385
- FROHNE D. (1987)
Marrubii herba – Andronkraut
Kooperation Phytopharmaka, Bonn
- GERSHENZON, J. & CROTEAU, R. (1993)
Terpenoid biosynthesis: the basic pathway and formation of monoterpenes, sesquiterpenes and diterpenes. in: Lipid Metabolism in Plants, ed. Moore, T.S., Jr. CRC Press, Boca Raton, FL S. 339-388

- GERSHENZON J., MCCONKEY M.E. UND CROTEAU R. (2000)
Regulation of monoterpene accumulation in leaves of peppermint
Plant Physiol. **122**: 205-213
- GERSHENZON, J., MAFFEI, M., CROTEAU, R. (1989)
Biochemical and histochemical lokalisation of monoterpene biosynthesis
in the glandular trichomes of spearmint (*Mentha spicata*)
Plant Physiol. **89**: 1351-1357
- GIJZEN, M., LEWINSOHN, E. & CROTEAU, R. (1991)
Characterisation of the constitutive and wound-inducible monoterpene
cyclases of grand fir (*Abies grandis*)
Arch. Biochem. Biophys. **289**, 267-273
- GONG, B. & GE, R. (2000)
Using the SMART™ cDNA System to map the transcription initiation
site.
Benchmarks Bio Techniques **28**, 846-852.
- GORMANN, R. (1994)
Furanoditerpene in Sproßkulturen von *Leonorus cardiaca* L.
Diplomarbeit, Bonn,
- GROPPE, J. C. & MORSE, D.E. (1993)
Isolation of full-length RNA templates for reverse transcription from
tissues rich in RNase and proteoglycans.
Anal. Biochem. **210**, 337-343.
- HÄNSEL R., KELLER K., RIMPLER H., SCHNEIDER G. (1993)
Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis
5.Auflage, 777-782, Springer-Verlag
- HANLEY, B.A., SCHULER M.A. (1988)
Plant intron sequences: evidence for distinct groups of introns
Nucleic Acids Res. **16**:7159-7176
- HARBORNE, J.B.
Recent advances in the ecological chemistry of plant terpenoids
in: Ecological Chemistry and Biochemistry of Plant Terpenoids
Editoren: J.B.Harborne und F.A. Tomas-Barberan (Oxford: Claderon
Press) 399-426
- HEFNER J., RUBENSTEIN S.M., KETCHUM R.E., GIBSON D.M. WILLIAMS
R.M., CROTEAU R. (1996)
Cytochrome p450-catalysed hydroxylation of taxa-4(5),11(12)-diene to
taxa-4(20),11(12)-dien-5 α -ol: the first oxygeation step in taxol
biosynthesis
Chem. Biol. 1996 3(6):479-489

- HOHN T.M., BEREMAND P.D. (1989)
Isolation and nucleotide sequence of a sesquiterpene cyclase gene from the trichothecene –producing organism *Fusarium sporotrichioides*
Gene **79**: 131-138
- HOHN T.M. (1999)
Cloning and expression of terpene synthase genes
in: "Isoprenoids, Including Carotenoids and Steroids," pp 201-215,
"Comprehensive Natural Products Chemistry", Vol. 2, Elsevier, ed.,
David E. Cane London, 1998
- HOLMES, D.S. & QUIGLEY, M. (1981)
A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids.
Anal. Biochem. **114**, 193-197.
- HOLMES F.A., KUDELKA A.P., KAVANAGH J.J., HUBER M.H., AJANI J.A.
(1995)
Current status of clinical trials with paclitaxel and docetaxel, pp31-57
in: *Taxane Anticancer Agents: Basic Science and Current Status*
ed.: GEORG G.I., CHEN T.T., OJIMA I., VYAS D.M.
American Chemical Society Symposium Series 583, Washington D.C.
- HUA, L. AND MATSUDA, S.P. (1999)
The molecular cloning of 8-epicedrol synthase from *Artemisia annua*
Arch. Biochem. Biophys. **369** (2), 208-212; Acc.Nr.: AAF80333
- JOLY, A., EDWARDS P.A. (1993)
Effect of sitedirected mutagenesis of conserved aspartate and arginine
residues upon farnesyl diphosphate synthase activity
J. Biol. Chem. **268**: 26983-26989
- KLEINIG H. (1989)
The role of plastids in isoprenoid biosynthesis.
Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. **40**, 39-59
- KNÖß W. (1996)
Bildung der Furanolabdanditerpene in *Leonorus cardiaca* L. und
Marrubium vulgare L.
Habilitationsschrift, Bonn, 1996
- KNÖß W. (1999)
Terpenbiosynthese in Bakterien und Pflanzen- neue Perspektiven
Pharmazie in unserer Zeit **5**, 247-254
- KNÖß W., REUTER B., ZAPP J. (1997)
Biosynthesis of the labdane diterpene marrubiin in *Marrubium vulgare*
via a non-mevalonate pathway.
Biochem J. 1997;**326** (Pt 2):449-54

- KOEPP A.E., HEZARI M., ZAJICEK J., STOFER VOGEL B., LAFEVER R., LEWIS N.G., CROTEAU R. (1995)
Cyclisation of Geranyl Diphosphate to Taxa-4(5),11(12)-diene:
Committed Step of Taxol Biosynthesis in Pacific Yew
J. Biol. Chem. **270**, 8686-8690
- KOYAMA T., OGURA K. (1998)
Isopentenyl diphosphate isomerase and prenyltransferases
in: "Isoprenoids, Including Carotenoids and Steroids," 69-96 ed., David E. Cane, "Comprehensive Natural Products Chemistry," Vol. 2, Elsevier, London
- LANGENHEIM J.H. (1994)
Higher plant terpenoids: a phytocentric overview of their ecological roles
J. Chem. Ecol. **20**, No.6, 1223-1280
- LESBURG C.A., ZHAI G., CANE D.E., UND CHRISTIANSON D.W. (1997)
Crystal structure of Pentalene synthase: mechanistic insights on terpenoid cyclisation reactions in Biology
Science **277**, 1820-1824
- LEWINSOHN, E., GIJZEN, M., CROTEAU, R. (1991)
Defense mechanism of conifers: Differences in constitutive and wound-induced monoterpene biosynthesis among species
Plant Physiol. **96**, 44-49
- LICHTENTHALER H.K., SCHWENDER J., DISCH A., ROHMER M.(1997)
Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathway
FEBS Lett Jan 6;**400**(3):271-4
- LIN X, HEZARI M, KOEPP AE, FLOSS HG, CROTEAU R. (1996)
Mechanism of taxadiene synthase, a diterpene cyclase that catalyzes the first step of taxol biosynthesis in Pacific yew.
Biochemistry. Mar 5;**35**(9):2968-77
- LUO P., WANG Y-H, WANG G-D, ESSENBERG M., CHEN X-Y (2001)
Molecular cloning and functional identification of (+)- δ -cadinene-8-hydroxylase, a cytochrome P450 mono-oxygenase (CYP706B1) of cotton sesquiterpene biosynthesis
The Plant Journal **28**(1), 95-104
- MACMILLAN J., BEALE M. (1998)
Diterpene biosynthesis
in: "Isoprenoids, Including Carotenoids and Steroids," ed., David E. Cane, "Comprehensive Natural Products Chemistry", Vol. 2, Elsevier, London, 1998
- MARUYAMA, T., ITO, M. AND HONDA, G.; Direct Submission
AccNr.: AAK54279

- MAU CJ, WEST CA (1994)
Cloning of casbene synthase cDNA: evidence for conserved structural features among terpenoid cyclases in plants.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Aug 30;91(18):8497-501.
- MAURYA R., WAZIR V., TYAGI A., KAPIL R-S. (1995)
Clerodane diterpenoids from *Tinospora cordifolia*
Phytochemistry **38** 659-661
- MAZUR BJ, CHUI CF (1985)
Sequence of a genomic DNA clone for the small subunit of ribulose bisphosphate carboxylase-oxygenase from tobacco.
Nucleic Acids Res. Apr 11;13(7):2373-86
- MCCASKILL D.G., GERSHENZON J., CROTEAU R.(1992)
Morphology and monoterpene biosynthetic capabilities of secretory cell clusters isolated from glandular trichomes of peppermint (*Mentha piperita* L.)
Planta **187**:445-454
- MCPHERSON J.M., JONES K.M. & GURR S.J. (1991)
PCR with highly degenerated Primers. In: PCR - A Practical Approach (McPherson J.M., Quirke P., Taylor G.R. eds.) IRL Press at Oxford
- MERCKE P., CROCK J., CROTEAU R. UND BRODELIUS P.E.(1999)
Cloning, expression and characterisation of *epi*-Cedrol synthase, a sesquiterpene cyclase from *Artemisia annua* L.
Arch. Biochem. Biophys. 369 (2), 213-222
- MERCKE,P., BENGTSSON,M., BOUWMEESTER,H.J., POSTHUMUS,M.A. AND BRODELIUS,P.E (2000)
Molecular cloning, expression, and characterization of amorpha-4,11-diene synthase, a key enzyme of artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L
Arch. Biochem. Biophys. 381 (2), 173-180 (2000); Acc.Nr.: AAF 61439
- MIHALIAK C.A., KARP F., CROTEAU R. (1993)
Cytochrome P-450 terpene hydroxylases
in: Methods in Plant Biochemistry, Vol 9: Enzymes of secondary Metabolism
Editor: Lea P.J.; *Academic Press*, London; Seiten 267-279
- MIHALIAK C.A., LINCOLN D.E. (1989)
Changes in leaf mono- and sesquiterpene metabolism with nitrate availability and leaf age in *Heterotheca subaxillaris* L.
J. Chem. Ecol. **15**: 1579-1588
- MILLER J., MCLACHLAN A.D. UND KLUG A. (1985)
Embo J. **4** 1609-1614

- MULLIS K.B. (1987)
Eine Nachtfahrt und die Polymerase-Kettenreaktion. *Spektrum der Microbiol.* **42**, 465-488.
- NEWMAN J.D., CHAPPELL J. (1999)
Isoprenoid biosynthesis in plants: carbon positioning within the cytoplasmic pathway
Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. **34**:95-106
- OCHMAN H., GERBER A.S., HARTL D.L.(1988)
Genetic Applications of inverse polymerase chain reaction
Genetics **120**: 621-623
- OGURA K., KOYAMA T. (1998)
Enzymatic aspects of isoprenoid chain elongation
Chem. Rev. **98**: 1263-1276
- PICHERSKY, E., LEWINSOHN, E. *ET AL* (1995)
Purification and characterisation of S-linalool synthase, an enzyme involved in the production of floral scent in *Clarkia breveri*
Arch Biochem Biophys **316**(2): 803-7
- POPPE, M., HAHM, B., EICKELBAUM, W., ARAND, M., PAWELETZ, N. & KNEHR, M. (1999)
Use of PCR to screen for protomotor elements in genomic DNA library clones.
Bio Techniques **26**, 718-726.
- PORTO LE BLANCH, A.G.M; Direct Submission Acc.Nr.:AAG09949
- POULTER C.D., RILLING H.C. (1981)
Conversion of Farnesynpyrophosphate to squalene
in: Biosynthesis of Isoprenoid Compounds Vol.1 Seiten 413-441
Editor: Porter J.W. und Spurgeon S.L.; Wiley & Sons, New York
- PYUN HJ, WAGSCHAL KC, JUNG DI, COATES RM, CROTEAU R (1994)
Stereochemistry of the proton elimination in the formation of (+)- and (-)-alpha-pinene by monoterpene cyclases from sage (*Salvia officinalis*).
Arch Biochem Biophys. Feb 1;308(2):488-96.
- QUERSHI N., PORTER J.W. (1981)
Conversion of acetyl-Coenzyme A to isopentenyl pyrophosphate
Biosynthesis of isoprenoid compounds Vol.1 47-94
Editor: Porter J.W., Spurgeon S.L.
John Wiley & Sons, New York
- RAJAONARIVORI, J.I., GERSHENZON, J., MIYAZAKI J., CROTEAU R.(1992)
Evidence for an essential Histidin residue in 4S-Limonene synthase and other terpene cyclases
Arch Biochem Biophys (1992)299(1):77-82

- RALEIGH, E.A., LECH, K. & BRENT, R. (1989)
In: Current Protocols in Mol. Biology (Ausubel F.M. *et al.* eds.)
Publishing Associates and Wiley Interscience New York Unit 1.4
- RAMOS-VALIDVIA A., VAN DER HEIDEN R., VERPOORTE R. (1997)
Isopentenyl diphosphate isomerase: a core enzyme in isoprenoid biosynthesis. A review of its biochemistry and function
Nat. Prod. Rep. **14**: 591-603
- ROBINSON J.A. (2001)
Organische Chemie V: Naturstoff-Chemie und Biosynthese
Internetausgabe der eidgenössischen technischen Hochschule Zürich
<http://www.oci.unizh.ch/edu/lectures/material/OCV/Kap2/kap2.1.html>
- ROHMER M. (1999)
The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher Plants
Nat. Prod. Rep. **16**, 565-574
- ROHMER M., KNANI M., SIMONIN P., SUTTER B., SAHM H. (1993)
Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to IPP
Biochem. J. **295** 517-524
- ROBERT A., CAZELLES J., MEUNIER B. (2001)
Characterisation of the alkylation product of heme by the antimalarial drug artemisin
Angew. Chem. 113 2008
- RODRIGUEZ-HAHN L., ESQUIVEL B., CÁRDENAS J. (1996)
Neo-clerodane diterpenoids from *Scutellaria galericulata*
Phytochemistry 1996 **41** 247-253
- ROHMER M. (1999)
The discovery of an mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants
Nat Prod. Rep. **16** 565-574
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F. & MANIATIS, T. (1989)
Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd Ed.- *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. Cold Spring Harbor, NY.
- SANGER, F., NICKLEN, S. & COULSON, A. (1977)
DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**, 5463-5467.
- SAVAGE TJ, ICHII H, HUME SD, LITTLE DB, CROTEAU R. (1995)
Monoterpene synthases from gymnosperms and angiosperms: stereospecificity and inactivation by cysteinyl- and arginyl-directed modifying reagents.
Arch Biochem Biophys. 1995 Jul 10;320(2):257-65

- SCHEEL, D.; PARKER, J.E. (1990)
Elicitor recognition and signal transduction in plant defense gene activation
Zeitschrift für Naturforschung 45c, 569-575, 1990
- SCHMIDT, T.G. & SKERRA, A. (1993)
The random peptide library-assisted engineering of a C-terminal affinity peptide, useful for the detection and purification of a functional Ig F_v fragment
Prot. Engineering 6 109-122
- SEAMAN F., BOHLMANN F., ZDERO C., MABRY T.J. (1990)
Diterpenes of flowering plants, compositae
Springer-Verlag 1990
- SIEBERT P.D., CHEN S. & KELLOGG D.E. (1995)
The human genome walker DNA walking kit: a new PCR method for walking in uncloned genomic DNA. *CLONTECHniques*
- SILVEIRA E.R., MCCHESENEY J.D. (1994)
6,7-oxygenated neo-clerodane furan diterpenes from *Croton sonderianus*
Phytochemistry 36 1457-1463
- SONG L., Poulter C.D. (1994)
Yeast farnesyl diphosphate synthase: site-directed mutagenesis of residues in highly conserved prenyltransferase domains I and II
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3044-3048
- SOUTHERN, E. (1975)
Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis.
J. Mol. Biol. 98, 503-517.
- STARKS CM, BACK KW, CHAPPELL J, ET AL. (1997)
Structural basis for cyclic terpene biosynthesis by tobacco 5-epi-aristolochene synthase
Science 277: (5333) 1815-1820
- STEELE CL, CROCK J, BOHLMANN J, CROTEAU R. (1998)
Sesquiterpene synthases from grand fir (*Abies grandis*). Comparison of constitutive and wound-induced activities, and cDNA isolation, characterization, and bacterial expression of delta-selinene synthase and gamma-humulene synthase.
J Biol Chem. 1998 Jan 23;273(4):2078-89.
- STEELE CL, LEWINSOHN E, CROTEAU R. (1995)
Induced oleoresin biosynthesis in grand fir as a defense against bark beetles.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 May 9;92(10):4164-8.

- STOFER VOGEL B., WILDUNG M.R., VOGEL G., CROTEAU R. (1996)
Abietadien Synthase from Grand Fir (*Abies grandis*) cDNA isolation
charakterisation and bacterial expression of a bifunctional diterpene
cyclase involved in resin acid biosynthesis *J. Biol. Chem.*; 271(38): 23262-
23268
- SUN T.P., KAMIYA Y (1994)
The Arabidopsis GA1 locus encodes the cyclase Ent-kaurene-synthetase-
A of Gibberelin biosynthesis
Plant Cell 6: (10) 1509-1518 OCT
- TARSHIS L.C., YAN M., POULTER C.D., UND SACCHETTINI J.C. (1994)
Crystal structure of recombinant farnewsyl diphosphate synthase at 2,6-Å
resolution
Biochemistry **33**, 10871-10877
- 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. *Nucl. Acids Res.* **22**, 4673-4680.
- TILLET, D., BURNS, B.P. & NEILAN B.A. (2000)
Optimized rapid amplification of cDNA ends (RACE) for mapping
bacterial mRNA transcripts.
Bio Techniques **28**: 448-456
- TOWNSEND, B.J. AND LLEWELLYN, D.J.; Direct Submission Acc.Nr.:
AAF74977
- TRAPP S., HOHN T.M., MCCORMICK S., JARVIS B.B. (1998)
Characterisation of the gene cluster for biosynthesis of macrocyclic
trichthecenes in *Myrothecium roridum*
Mol. Gen. Genet. **257**: 421-432
- TRIGLIA T., PETERSON M.G., KEMP D.J. (1988)
A procedure for *in vitro* amplification of DNA segments that lie outside
the boundaries of known sequences
Nucleic Acids Res. **16**: 8186
- TSIOTIS, G., HAASE, W., ENGEL, A. & MICHEL, H. (1995)
Isolation and structural characterisation of trimeric cyanobacterial
photosystemI complex with the help of recombinant antibody fragments
Eur. J. Biochem. **231**, 823-830
- VAN GELDRE E., VERGAUWE A., VAN DEN EECKHOUT E. (1997)
State of the art of the production of the antimalarial compound
artemisinin in plants
Plant Mol. Biol. **33**: 199-209

- VÖGELI, U., & CHAPPELL, J. (1988)
Induction of sesquiterpene cyclase and suppression of squalene synthase activities in plant cell cultures treated with fungal elicitor
Plant Physiol. **88**, 1291-1296
- VÖGELI, U., & CHAPPELL, J. (1990)
Regulation of a sesquiterpene cyclase in cellulase-treated tobacco cell suspension cultures
Plant Physiol. **94**, 1860-1866
- VÖGELI, U., FREEMAN J.W. & CHAPPELL, J (1990)
Purification and characterisation of an inducible sesquiterpene cyclase from elicitor treated tobacco cell suspension cultures
Plant Physiol. **93**, 182-187
- VOGELSTEIN, B. & GILLESPIE, S. (1979)
Preparative and analytical purification of DNA from agarose.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**, 615-619.
- WEST C.A. (1981)
Biosynthesis of diterpenes
in: *Biosynthesis of Isoprenoid Compounds* Vol.1 Seiten 375-411
Editor: Porter J.W. und Spurgeon S.L.; Wiley & Sons, New York
- WILDUNG MR, CROTEAU R.A (1996)
cDNA clone for taxadiene synthase, the diterpene cyclase that catalyzes the committed step of taxol biosynthesis.
J Biol Chem. Apr 19;271(16):9201-4.
- WILHELM, S. (1993)
Untersuchungen zum Sterolgehalt und zur Beeinflussung des Sekundärstoffwechsels in Zellkulturen von *Marrubium vulgare* L.
Bonn, 1993
- 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 aminoterminal Arginine-pair
Biochemistry.,37:12213-12220
- WISE, M.L., SAVAGE, T.J., KATAHIRA, E., CROTEAU, R. (1998)
Monoterpene synthases from common sage (*Salvia officinalis*). cDNA isolation, characterisation and functional expression of (+)-sabinene synthase, 1,8-cineole synthase and (+)-bornyl diphosphate synthase
J Biol Chem 273(24): 14891-9
- WOLTER FP, FRITZ CC, WILLMITZER L, SCHELL J, SCHREIER PH (1988)
rbcS genes in *Solanum tuberosum*: conservation of transit peptide and exon shuffling during evolution.
Proc Natl Acad Sci U S A. Feb;85(3):846-50

WOODCOCK, D.M. *ET AL.* (1989)

Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants.

Nucleic Acids Res. 1989 May 11;17(9):3469-78

YOSHIOKA, H., YAMADA, N. AND DOKE, N. (1999)

cDNA cloning of sesquiterpene cyclase and squalene synthase, and expression of the genes in potato tuber infected with *Phytophthora infestans*

Plant Cell Physiol. 40 (9), 993-998 (1999) Acc.No.: BAA Acc.No.: Q82109

ZINKEL D.F., RUSSELL J. (1989)

Naval Stores: Production, Chemistry, Utilisation

Seite 1060ff; Pulp Chemicals Association, New York

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen, die durch ihre Hilfsbereitschaft, guten Tipps und Interesse zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, bedanken:

HERRN PRIV. DOZ. DR. W. KNÖß für die Überlassung dieses Themas.

FRAU PROF. DR. G. KÖNIG für die freundliche Übernahme des Koreferats.

HERRN PROF. DR. H. BÖHME für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes in seiner Abteilung „Molekulare Biochemie“.

HERRN PROF. DR. W. HACHTEL für das Interesse an dieser Arbeit und die freundliche weiterwährende Bereitstellung des Arbeitsplatzes im Biozentrum.

HERRN DR. T. HAPPE für die Einführung in die molekularbiologischen Arbeitstechniken und die vielen Tipps, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

HERRN DR. J. DEGENHARDT und seiner AG am Max-Planck-Institut für ökologische Chemie in Jena für die freundliche Unterstützung bei dem Test der enzymatischen Aktivität und der Identifizierung der entstandenen Produkte.

HERRN WOLFGANG SCHIEFER für seine „Hilfestellungen“ und Diskussionen bei fachlichen und computerbedingten Problemen.

HERRN BURKARD HEIL für die freundliche Hilfsbereitschaft bei der Erstellung der Proteinmodellbilder.

FRAU DR. ANNETTE KAMINSKI für die vielen guten Ratschläge und Tipps „in allen Lebenslagen“.

Der gesamten Abteilung „Molekulare Biochemie“ für die freundliche Aufnahme.

Es hat Spaß gemacht, mit Euch zu arbeiten!

Allen Mitarbeitern des Instituts für pharmazeutische Biologie der Universität Bonn für das „Nichtvergessen“ der Mitarbeiterin, die „in die Ferne zog“.

HERRN DR. HANJO HEINRICH ,

meiner WG und allen anderen Freunden, die mir u.a. immer wieder vor Augen gehalten haben, dass „Arbeiten, um zu leben“ und nicht „Leben, um zu arbeiten“ der richtige Weg ist.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, für ihre Unterstützung „in allen Kategorien“ während des Studiums und der Dissertation.

Accession-Nummern zu Abb. 4.3:

cDNA-Sequenz von:	Accession-Nr.
(-)-Limonensynthase <i>M. spicata</i>	L13459
1,8-Cineolsynthase <i>S. officinalis</i>	AF051899
(+)-Sabinensynthase <i>S. officinalis</i>	AF051901
(+)-Bornylphosphatsynthase <i>S. officinalis</i>	AF051900
Casbensynthase <i>R. communis</i>	L32134
Delta-Cadinensynthase <i>G. arboreum</i>	AF174294
Delta-Cadinensynthase <i>G. hirsutum</i>	Y16432
5-epi-Aristolochensynthase <i>N. tabacum</i>	L04680
Vetispiradiensynthase <i>H. muticus</i>	U20187
Vetispiradiensynthase <i>L. esculentum</i>	U30987
Vetispiradiensynthase <i>s. tuberosum</i>	AB022598
(-)-4S-Limonensynthase <i>A. grandis</i>	AF139207
Camphensynthase <i>A. grandis</i>	U87910
Pinensynthase <i>A. grandis</i>	U87909
Delta-Selinensynthase <i>A. grandis</i>	U92266
Abietadiensynthase <i>A. grandis</i>	AF326516
Taxadiensynthase <i>T. brevifolia</i>	AF326519
Copalylidiphosphatsynthase <i>C. maxima</i>	U43904
Ent-Kaurensynthase <i>P. sativum</i>	U63652
Ent-Kaurensynthase <i>S. rebaudiana</i>	AF097310

Genomische Nukleotidsequenz von *mvtps1* mit Aminosäuresequenz von MVTPS1

```

1  atggctgcac aaatcgaaac tcgccctttc gccaatctct ctcccagtc cagtttgtgg ggtgatcagt
   M A A Q I E T R P F A N F S P S P S L W G D Q

71  ttaccaaaata caattctgat cctcaggtac ttaattttca ccttaataat caaaaaatag atctagtaga
   F T K Y N S D P Q

141  tgttatthaa taaatatgtt tttggtatat atatgcaggt gaaggaaaaa tattccaagc aaattgaagt
      V K E K Y S K Q I E

211  gttgaagaat gaagtgaaga gtatggtaac ggctcaagga ggaaaaatgg tggacacaat taatttcata
   V L K N E V K S M V T A Q G G K M V D T I N F I

281  gatacaatgg agcgtctcgg cattgcttat catttcaaag acgagattga agagacgata caacaatttt
   D T M E R L G I A Y H F K D E I E E T I Q Q F

351  tcaatctcaa tacaaattat gaggatgaag cctatgattt gtacactgtt gcccttcatt ttcgattgtt
   F N L N T N Y E D E A Y D L Y T V A L H F R L

421  caggcagcat ggtcaccccta tatcttgtgg tatgtacaac gaccatattt tatttttagtg tcctcatcta
   F R Q H G H P I S C

491  gtatatthtt tgtttaaact gccctaaac acatgaaaag gaaaatataa atgtcacctt gtctccaata
561  tttaaccttt ttcactgaaa ttgaacaact ataagtcaaa tttaaagtta ctaatatata tatatatata
631  tatatgcatg tttaaacaaa agtcatctct aaatcttaac ctccatttag ttggccctaa ttatttagtc
701  attccaatcg attttgaatg ggcacacatt cactttctca tgtgctcaca taatacactt cactcacata
771  ttttctthaa tgttttttat tttttaatat ctccctctcg ctcatthtct cattctctga atgaatttcg
841  tttcatctaa tttttgtccg ggtgtgagcc tattggctct aataccatga aagaatcttg tctcatataa
911  aagtccgaac ttatagagag attagaaatt aacactctca taccctttat tctcttcctt ttttcttctt
981  tccttccact aattaacaat attaaaaatta aaataatata agtatcatgt gtaattgaaa tacagtttct
1051  tcccgctcca ttcttaaatc aaggactcca ttttttctt tctataatca cataatctag aactacatct
1121  tttttgtatt ttatacattt tatthtgctt atgaatgtat atttactcga ctctcaagca gacatcttcg
      D I F

1191  gtaaatggat cgatgggaat ggaaaattcc aggaaagcct taagagtgat gccaaaggct tgtaagttt
   G K W I D G N G K F Q E S L K S D A K G L L S

1261  gtatgaagca tcatatttga gaatacacgg agacacccaa ctgcagcagg ccattgattt tgctacaacc
   L Y E A S Y L R I H G D T Q L D E A I D F A T T

1331  aatctgaaat ccatggcacc aaacctcgga tcacctctta ggaaacaagt cgaaaatgcc ctcgthcaaa
   N L K S M A P N L G S P L R K Q V E N A L V Q

1401  gcttgcaatt tgggcttcca agagtgaag ctgcgtcatt catctccatc tacgaggagg aacaacaaaa
   S L H F G L P R V E A R H F I S I Y E E E Q Q

1471  aaatcatacc ctcccttagt tcgctaaatt ggactttaat ctattgcaaa tactgcacaa agaagagctc
   K N H T L L R F A K L D F N L L Q I L H K E E L

1541  tgcgaactct cgaggtaaca aataatatat attggactca aattatatat cgctactccg tcgacgacta
   C E L S R

1611  atttatttct taaagtthac aaacaccatt taaaataatt agagacgagc caattaaaaa ttcaagttga

1681  gaaattaatt atttgcaatt ttagggtgtg gaaagaattg gactttatct cgcaatttcc atatgtaagg
      R W W K E L D F I S Q F P Y V R

1751  gatagaattg tggagtgttt cttttggagt gtgggaatgt accatgagcc gcagtactcc cgtgcccgta
   D R I V E C F F W S V G M Y H E P Q Y S R A R

1821  ttatgcttgc taaaagctta gttatgataa ctatattgga tgacacattt gactcttatg gcacaattga
   I M L A K S L V M I T I L D D T F D S Y G T I

1891  agaacttgag cttcttaccg aggcaatgca aaggtaaact tatatgacag cattaatata tatatatata
   E E L E L L T E A M Q R

1961  tatatttttc ataattgtct taatgaattt tttcattgat tcatcaatta ggtgggatac taaagacatt
      W D T K D I

```

2031 gatggactcc ccgagtacat caaggaaatc tataaattaa tgctcaaaat ctaccagcaa tttgaggaag
 D G L P E Y I K E I Y K L M L K I Y Q Q F E E

 2101 aattagctat ggacggaaaa gcttatgcaa cacactacgc aatagaagct gtatgacttt taacccttgc
 E L A M D G K A Y A T H Y A I E A

 2171 tccttaattt aatggtgtct tttcacaatt ttttttaaga gacgctccat tcaaatattt aatgtgaatg
 2241 gtaatgaaaa tctcgtatgt ctgtgttcca caatgcaatg atcagagata tattggagga agagttgttc
 2311 aattagtggg aatattgata gtgttttgat ctaaaattggg aacaaaaaaa attaattagt ggttacgtta
 2381 atagtgtctt gctgtaattt tataataaat taaggggtac aatgatgggt ggtcgaataa ttgaggagaa
 2451 attaatattag atggatgtag gtaaattaac taatgtttga gactcacttg tcattaccat tctcgttgaa
 2521 aaatattctt aagccaagcg ccctcttcaa tatgattata tattttgtgt ataatgttgg ttgtgaatat
 2591 atatatagta taaggaattg acaaagggtc actatgtgga ggccaagtgg ttcattcgag ggtacgtgcc
 Y K E L T K G Y Y V E A K W F I R G Y V

 2661 tccatttgag gaatatctaa gcaatgtctc cgtaactgct ggtagcaaat atcttctattt ttcatcttta
 P P F E E Y L S N A L V T A G S K Y L H F S S L

 2731 ctgggggatga aatccataat gaagaaagac ttggaatggc taagcacaaa acgtaaaatg attgtagcca
 L G M K S I M K K D L E W L S T K R K M I V A

 2801 cacagacaat aagtcgactc gttaatgaca tttctagcta taaggtagct actatatattg tattttttatc
 T Q T I S R L V N D I S S Y K V

 2871 gatataatag atattttttc aacctttttat gttttttcat atatatacca ttatttgaaa ttttaatttt
 2941 cagagttgta tatgataaat ccacggcgctc gattgcttca gcttaaattt taaggagaga atcagtgaac
 3011 atatggcatt atgttataaa atctgcaaac atatataatat gacaatcgag cttaaattggg gcaaaaatgt
 3081 tatgtgagta attgcaccat tgtcatacat ttgtaaatat gggtttggtc taaaatctgt aaatttagga
 3151 cctaatttaa ttcaggatca attttcatgg acctgaaaaa attatttttg tctaaatttt ccaaacttga
 3221 atgtattgtt gacattcatt ttagggttag aaggagaggg gtcagcctgc tactggaata gagtgttaca
 E K E R G Q P A T G I E C Y

 3291 tgaaagataa aggggtgaca aaagaagagg caatggacaa gttttatgaa atggctacaa atgcatggaa
 M K D K G V T K E E A M D K F Y E M A T N A W

 3361 ggatagtaat gaggagtggc ttggttttatc tggcaattcg agggatgttt atatagtagt cctaaatttt
 K D S N E E C L G L S G N S R D V Y I V V L N F

 3431 aatcgcatta tggatgttac ttacaagaac aaagaagatg gatacactca acctgaaaag gttctcaagc
 N R I M D V T Y K N K E D G Y T Q P E K V L K

 3501 cacacattat tgctttgttc gtcgatcaaa ttgacattta agcacttcaa taagtatgtg tcactacaca
 P H I I A L F V D Q I D I
 3571 ataatatatg tttcttctta ctagtattat ttcaattctg acatatgatc gtgtcttagg actactttta
 3641 ttaatttgag ttattggcat gggacttgat aatatatcct atgtacgtag ttgtgtgttt gattcaattc
 3711 ataggcacga ctacttaatt tgcagaattt tccatcaatc cccacgtcat ttttatatcc aagaaaaaga
 3781 aaattatggt ttagtcccaa caaaaaatat taaatattaa aataatcttt acacacaata ttggcttaaa
 3851 atttcaagtc aggttagaga tttcagtatc aaatcagtcg aataatagta tgatatacag tcaaattggg
 3921 tcatactccc tccatcccaa ttttgattat ccattttacc agcccggggc gtcgac