

**„ Funktionelle Charakterisierung einer
Isoprenyldiphosphat-Synthase
aus *Arabidopsis thaliana*“**

Dissertation
zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der
Naturwissenschaftlichen Fakultät I-Biowissenschaften
der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg

vorgelegt
von Frau M. Sc. Carolin Bernholz
geb. am 08.08.1986 in Lutherstadt Wittenberg

Erstgutachter: Prof. Dr. Alain Tissier
Zweitgutachter: Prof. Dr. Jörg Degenhardt
Drittgutachter: Prof. Dr. Jonathan Gershenzon

Eingereicht am: 01.03.2018
Tag der Verteidigung 19.10.2018

... meiner Familie 

Inhaltsverzeichnis	
Zusammenfassung	IX
Summary	XI
Abkürzungsverzeichnis	XIII
Abbildungsverzeichnis	XIV
Tabellenverzeichnis	XVI
1 Einleitung	1
1.1 Isoprenoidstoffwechsel	2
1.2 Prenyltransferasen	4
1.3 Isoprenyldiphosphat-Synthasen (IDS)	5
1.3.1 IDS-Genfamilie aus <i>A. thaliana</i>	6
1.3.2 Klassifizierung der Enzyme der IDS Familie.....	8
1.3.2.1 <i>cis-</i> und <i>trans-</i> IDS	8
1.3.2.2 Kurzketten-, Mittelketten- und Langketten- IDS	9
1.3.3 Dimerisierung der IDS	10
1.3.4 Organspezifische und subzelluläre Lokalisation der IDS.....	10
1.3.4.1 Organspezifische Lokalisation	10
1.3.4.2 Subzelluläre Lokalisation.....	11
1.3.5 Motive der <i>trans</i> -IDS	12
1.3.6 Reaktionsmechanismus der IDS	15
1.4 Terpensynthasen	16
1.4.1 Terpene: Produkte der TPS.....	16
1.4.2 Nomenklatur der TPS	17
1.5 Zielsetzung	18
2 Material und Methoden	20
2.1 Pflanzenanzucht	20
2.2 Bakterienstämme	21
2.3 Molekularbiologische Methoden	22
2.3.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>A. thaliana</i>	22
2.3.2 Reverse Transkription.....	23
2.3.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	23
2.3.3.1 Erzeugung der Zielgen-Fragmente.....	23
2.3.3.2 Test der Insertion von Zielsequenzen im Vektor oder stabil transformierten Pflanzen	25
2.3.4 Klonierung von Genen.....	26

Inhaltsverzeichnis

2.3.5 Verdau von DNA mit Restriktions-Endonukleasen.....	28
2.3.6 Transformation von Plasmid-DNA in Agrobakterien	28
2.3.7 Generierung transgener Pflanzen.....	29
2.3.7.1 Arabidopsis thaliana	29
2.3.7.2 Nicotiana tabacum.....	30
2.3.8 Bestimmung der Anzahl der Insertionen in stabil transformierten Pflanzen.....	31
2.3.8.1 mittels quantitativer PCR (qPCR).....	31
2.3.8.2 mittels Keimungs-Assay.....	32
2.3.9 Bestimmung der Wurzellänge	32
2.3.10 Behandlung der Pflanzen mit GA3.....	33
2.4 Proteinbiochemische Methoden	33
2.4.1 Transiente Expression von Proteinen in <i>N. benthamiana</i>	33
2.4.2 Aufreinigung der <i>6xHisTag-AtIDS9</i> mittels Immobilisierter- Affinitäts- chromatographie (IMAC).....	34
2.4.3 Quantifizierung des Proteingehaltes	35
2.4.4 SDS-Gelelektrophorese	35
2.4.5 Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen	36
2.4.6 Westernblotanalyse.....	37
2.4.7 <i>In vitro</i> Assay der AtIDS9	38
2.4.7.1 Nachweis der Aktivität der AtIDS9	38
2.2.7.2 Test verschiedener Substrate der AtIDS9	39
2.2.7.3 Bestimmung des pH-Optimums der AtIDS9	39
2.2.7.4 Bestimmung des zeitlichen Verlaufs der kinetischen Reaktion der AtIDS9.....	39
2.4.8 Nicotiana tabacum	39
2.4.9 Deglykosylierung der AtIDS9	40
2.5 Mikroskopische Methoden	40
2.5.1 Beschichtung von Objektträgern mit Poly-L-Lysin.....	40
2.5.2 GUS-Färbung.....	41
2.5.3 Einbettung von Pflanzenmaterial in Polyethylenglykol (PEG).....	41
2.5.4 Herstellung von Pflanzenschnitten	42
2.5.5 Mikroskopische Analyse.....	42
2.5.5.1 Konfokalmikroskopische Aufnahmen.....	42
2.5.5.2 Durchlicht- und Auflichtmikroskopische Aufnahmen	42
2.6 Analytische Methoden.....	43
2.6.1 LC/MS	43
2.6.2 GC/MS	44

3 Ergebnisse	45
3.1 Rekombinante Expression und Aufreinigung der AtIDS9	45
3.2 Substrate und Produkte der AtIDS9	50
3.2.1 Transiente Expression in <i>N. benthamiana</i>	50
3.2.2 Analyse möglicher Substrate und der Produkte der AtIDS9	53
3.3 Kinetische Charakterisierung der AtIDS9	55
3.3.1 pH-Optimum.....	56
3.3.2 Vorbetrachtung der kinetischen Eigenschaften der AtIDS9 mit ausgewählten Substraten.....	57
3.3.3 Bestimmung der apparenten Km-Werte für Substrate verschiedener Länge	58
3.4 Lokalisation der AtIDS	60
3.4.1 Organspezifische und zelluläre Lokalisation der AtIDS9	60
3.4.2 Subzelluläre Lokalisation	62
3.4.3 Subzelluläre Lokalisation weiterer AtIDS, die GFDP produzieren	64
3.4.4 Transitpeptid-Studie	67
3.4.5 Interaktion der AtIDS9 mit der Terpensynthase AtTPS28.....	69
3.4.5.1 Lokalisation der AtTPS28.....	67
3.4.5.2 Abstand der AtIDS9 zur AtTPS28.....	70
3.5 Erste Einblicke in die biologische Funktion der AtIDS9	72
3.5.1 Identifizierung und Charakterisierung von T-DNA Insertionsmutanten.....	72
3.5.2 AtIDS9 Überexpressionslinien- eine phänotypische Analyse.....	74
3.5.3 Ektopische Expression durch den verwendeten trichom-spezifischen Promotor..	75
3.5.4 Bestimmung der Anzahl an Insertionen in den transgenen Pflanzen mittels qPCR	76
3.5.5 Bestimmung der Anzahl an Insertionen in den transgenen Pflanzen mittels Segregationsanalysen	77
3.5.6 Phänotypische Charakterisierung der transgenen Pflanzen.....	78
3.6 Analyse der Umsetzung von GFDP durch die AtTPS28	80
3.6.1 Transiente Koexpression der AtIDS9 und AtTPS28.....	82
3.6.2 stabile Koexpression der AtIDS9 und der AtTPS28	84
3.6.2.1 Phänotypische Charakterisierung der stabil transformierten Doppel-expressionslinien	84
3.6.2.2 Produktanalyse der AtTPS28 in den stabil transformierten Doppel-expressionslinien	85
4 Diskussion	88
4.1 Aufreinigung der AtIDS9	88
4.2 Glykosylierung und Homodimerisierung der AtIDS9	89
4.2.1 Glykosylierung	90

Inhaltsverzeichnis

4.2.2 Homodimerisierung	90
4.3 Produktion von GFDP durch die AtIDS9	92
4.3.1 AtIDS9 ist ein Multisubstrat Enzym.....	93
4.3.2 AtIDS9 ist ein Multiprodukt Enzym.....	94
4.4 Ermittlung von apparenten <i>in vitro</i> Km-Werten der AtIDS9	95
4.5 Lokalisation von GFDP synthetisierenden AtIDS in den Wurzeln und in den Plastiden	97
4.5.1 AtIDS9 ist hauptsächlich in den Wurzeln lokalisiert.....	97
4.5.2 AtIDS9 und die anderen GFDP synthetisierenden IDS sind hauptsächlich in den Plastiden lokalisiert.....	99
4.5.3 Für den Transport der AtIDS9 in die Plastoglobuli wird die gesamte Transportsequenz benötigt	99
4.6 Phänotyp der AtIDS9 Überexpressionslinien	99
4.6.1 AtIDS9 Überexpression führt zu einem Chlorophyllmangel	100
4.6.2 AtIDS9 Überexpression führt zu Zwergenwuchs und verzögerter Seneszenz	100
4.7 GFDP synthetisierende können an der Synthese von Sesterterpenen beteiligt sein	103
5 Ausblick	106
6 Literaturverzeichnis	108
7 Danksagung.....	126
8 Eidesstattliche Erklärung	126
9 Anhang.....	126

Zusammenfassung

Isoprenyldiphosphat-Synthasen (IDS) produzieren in jedem lebenden Organismus essentielle Metabolite des Primär- und Sekundärstoffwechsels. Diese Gruppe von Enzymen nutzt Isopentenylidiphosphat (IDP) und Dimethylallyldiphosphat (DMADP) als Baustein, um längerkettige Isoprenyldiphosphate wie Geranylidiphosphat (GDP; C10), Farnesyldiphosphat (FDP; C15), Geranylgeranylidiphosphat (GGDP; C20) oder Geranyl-farnesyldiphosphat (GFDP; C25) zu produzieren. In Pflanzen werden diese Metabolite zum Beispiel von Terpensynthasen genutzt, um Terpene zu synthetisieren, die eine große Rolle in der Kommunikation der Pflanze mit anderen Organismen und in der Verteidigung gegen Fraßfeinde spielen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Frage nachgegangen, ob in höheren Pflanzen, speziell in der Modellpflanze *Arabidopsis*, Isoprenyldiphosphate mit 25 Kohlenstoffatomen existieren. Bislang waren aus höheren Pflanzen nur Kurzketten-IDS bekannt, die Isoprenyldiphosphate mit bis zu 20 Kohlenstoffatomen synthetisieren. Von den 13 in *A. thaliana* existierenden IDS sind bisher jedoch nur wenige ausreichend charakterisiert. Um ein generelles Verständnis über diese Gruppe von Enzymen zu erhalten, ist eine ausführliche Charakterisierung aller AtIDS jedoch unabdingbar. In der vorliegenden Arbeit wurde die AtIDS9 (At3g29430), die in der Literatur nur sehr oberflächlich beschrieben ist, näher betrachtet. Dies geschah mit besonderem Augenmerk auf die synthetisierten Produkte dieses Enzyms.

Die Charakterisierung der AtIDS9 gibt einen Hinweis darauf, dass in höheren Pflanzen Isoprenyldiphosphate mit 25 Kohlenstoffatomen existieren. Aus dieser Erkenntnis heraus wurden weitere Experimente durchgeführt, durch die die AtIDS9 näher beschrieben wurde. Die Ermittlung der von der AtIDS9 verwendeten Substrate zeigt, dass das Enzym DMADP, GDP, FDP und GGDP ausschließlich in (*E*)- Konformation als Substrat verwendet. Ebenso konnte gezeigt werden, dass neben GFDP in geringeren Mengen auch GGDP produziert wird. Kinetische Daten über die AtIDS9 ergaben eine geringere Affinität des Enzyms zu DMADP als zu den Substraten GDP, FDP und GGDP.

Die weiteren Ergebnisse beschreiben dann die Lokalisation der AtIDS9 hauptsächlich in den Wurzelspitzen auf organspezifischer Ebene und in den Plastiden auf subzellulärer Ebene. Des Weiteren liefern die Ergebnisse Hinweise darauf, dass sich die AtIDS innerhalb der Plastiden in den Plastoglobuli befindet. Die durchgeführten Lokalisations-

Zusammenfassung

studien ergaben außerdem, dass die gesamte Proteinsequenz der AtIDS9 für den Transport in die Plastoglobuli benötigt wird.

Der letzte Teil der Arbeit befasst sich mit der biologischen Funktion der AtIDS9. Hier zeigten stabil transformierte *AtIDS9* Überexpressionslinien (*N. tabacum*) Zwergenwuchs und eine verzögerte Seneszenz sowie eine partielle Gelbfärbung der Blätter, was auf einen GGDP-Mangel hinweist. Um die weitere Umsetzung des GFDPs zu untersuchen, wurden zusätzlich Überexpressionslinien (*N. tabacum*) und *in vivo* Assays (*N. benthamiana*) genutzt, bei denen neben der *AtIDS9* auch eine Terpensynthase (TPS) aus *A. thaliana* exprimiert wurde. Diese gaben erste Hinweise, dass GFDP von Terpensynthasen verwendet werden kann, um Sesterterpene zu synthetisieren. Als ein Kandidat für die Synthese dieser Sesterterpene wurde die AtTPS28 (At1g48800) näher untersucht.

Alles in allem stellt die vorliegende Arbeit eine umfassende Charakterisierung der AtIDS9 dar und liefert als eine der ersten Arbeiten einen Hinweis auf die Synthese von GFDP in höheren Pflanzen. Obgleich die Funktion von GFDP für die Pflanzen bislang nicht geklärt werden konnte, kann die vorliegende Arbeit als ein wichtiger Schritt in der Analyse einer neuen Klasse an Isoprenyldiphosphaten in höheren Pflanzen betrachtet werden.

Summary

Isoprenyl diphosphate synthases (IDSs) produce essential metabolites of primary and secondary metabolism in every living organism. This group of enzymes uses isopentenyl diphosphate (IDP) and dimethylallyl diphosphate (DMADP) as components to produce longer chained isoprenyl diphosphates such as geranyl diphosphate (GDP; C10), farnesyl diphosphate (FDP; C15), geranylgeranyl diphosphate (GGDP; C20) or geranylgeranyl diphosphate (GFDP; C25). In plants these metabolites are used e.g. by terpene synthases to synthesize terpenes, which play an important role in the communication of a plant with other organisms and in defence against herbivores.

In the context of this work the question was asked, whether isoprenyl diphosphates, with 25 carbon atoms, exist in higher plants, especially in the model organism *Arabidopsis*. Until today, only short chain IDS synthesizing isoprenyl diphosphates with up to 20 carbon atoms have been reported from higher plants. 13 isoprenyl diphosphate synthases are known from *A. thaliana*. However, only a few of these IDSs are sufficiently characterized. In order to obtain a general understanding of this group of enzymes, a detailed characterization of all AtIDS is essential. In the present work, the AtIDS9, which is only superficially described in the literature, was investigated in more detail, with a main focus on the products synthesized by this enzyme.

The characterization of AtIDS9 indicates that isoprenyl diphosphates with 25 carbon atoms exist in higher plants. Based on this indication, subsequent experiments were carried out to further characterize the AtIDS9. The kinetic data revealed that AtIDS9 uses DMADP, GDP, FDP and GGDP in (*E*)- conformation as a substrate. Isoprenyldiphosphates in (*Z*)- conformation were not used. Furthermore it was showed, that in addition to GFDP also GGDP produces is produced in smaller amounts. Kinetic data of the AtIDS9 revealed a lower affinity for DMADP than for the substrates GDP, FDP and GGDP.

The results reveal a localization of AtIDS9 mainly in the root tips on the organ-specific level and in the plastids on the subcellular level. Furthermore, the results suggest that the enzyme is localized within the plastoglobules of the plastids. Further, the localization studies showed that the entire protein sequence of AtIDS9 is required for transport into the plastoglobules.

Summary

The last part of the thesis focused on the biological function of AtIDS9. Stable transformed *AtIDS9* overexpression lines (*N. tabacum*) showed dwarfism, delayed senescence and partial yellowing of leaves, which indicates a GGDP lack. For investigation further conversion of GFDP overexpression lines (*N. tabacum*) and in vivo assays (*N. benthamiana*) additionally to the *AtIDS9* a terpene synthase from *A. thaliana* was used. This results give first indications for the use of GFDP by terpene synthases to synthesize sesterterpenes. As a candidate for synthesis of these sesterterpenes, the AtTPS28 (At1g48800) was investigated more closely.

Summarizing, the present study comprehensively characterizes the AtIDS9 and provides as one of the first studies an indication of the synthesis of GFDP in higher plants. Although the function of GFDP for plants has not yet been clarified, this study presents an important step in the analysis of a new class of isoprenyl diphosphates in higher plants.

Abkürzungsverzeichnis

AS	Aminosäure
AtIDS	<i>A. thaliana</i> Isoprenyldiphosphat-Synthasen
AtTPS	<i>A. thaliana</i> Terpensynthase
BAP	Benzylaminopurin
CaMV	<i>Cauliflower mosaic virus</i> (deutsch: Blumenkohlmosaikvirus)
CBB	Coomassie Brilliant Blau
cDNA	<i>complementary DNA</i> , (deutsch: komplementäre DNS)
Da	Dalton (Masseneinheit: 1Da = 1u = 1,660538782 * 10 ⁻²⁷ kg)
DMADP	Dimethylallyldiphosphat
eGFP	<i>enhanced</i> (=verbessertes) grün fluoreszierendes Protein
FARM	<i>first aspartic rich motif</i>
FDP	Farnesyldiphosphat
FDPS	Farnesyldiphosphat-Synthase
FG	Frischgewicht
FOH	Farnesol
GC	Gaschromatographie
GDP	Geranyldiphosphat
GFDP	Geranylfarnesyldiphosphat
GFOH	Geranylfarnesol
GGDP	Geranylgeranyldiphosphat
GGDPS	Geranylgeranyldiphosphat-Synthase
GGOH	Geranylgeraniol
IDP	Isopentenylidiphosphat
IDS	Isoprenyldiphosphat-Synthasen
IES	Indol-3-Essigsäure
Km	Michaelis-Konstante
LC	<i>Liquid Chromatography</i>
m/z	Masse-zu-Ladungsverhältnis
MS	Massenspektrometrie
NES	1-Naphthylessigsäure
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
SARM	<i>second aspartic rich motif</i>
T-DNA	Transferierte DNA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TPS	Terpensynthase
UTR	Untranslatierte Region eines Gens
XIC	<i>Extracted-ion Chromatogram</i> (deutsch: extrahiertes Ionenchromatogramm)

Abbildungsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der aus Isoprenyldiphosphaten synthetisierten Substanzen.	2
Abbildung 2: Grundbausteine der Isoprenoide.	3
Abbildung 3: Konsekutive Kondensationsreaktion der IDS.	6
Abbildung 4: Subzelluläre Lokalisation der IDS und deren Produkte innerhalb einer <i>A. thaliana</i> Zelle.	12
Abbildung 5: Multiples Aligment diverser aus <i>Arabidopsis</i> stammender IDS.	14
Abbildung 6: Reaktionsmechanismus der IDS.	15
Abbildung 7: Aufreinigung des 6xHisTag-AtIDS9 Proteins aus <i>N. benthamiana</i> Blättern.	46
Abbildung 8: Deglykosylierung der 6xHisTag-AtIDS9 mittels EndoH.	47
Abbildung 9: Analyse des Laufverhaltens der 6xHisTag-AtIDS9/C110S/C114S Mutante.	48
Abbildung 10: Analyse des Laufverhaltens der mit β -Mercaptoethanol behandelten 6xHisTag-AtIDS9.	49
Abbildung 11: <i>In vivo</i> Enzymassay der AtIDS9 in <i>N. benthamiana</i> Blättern.	52
Abbildung 12: Detektion der <i>in vitro</i> produzierten Produkte der AtIDS9 mittels LC/MS im negativ Modus.	53
Abbildung 13: Darstellung der verwendeten Substrate in der jeweiligen Konformation.	54
Abbildung 14: pH-Abhängigkeit der von der AtIDS9 katalysierten Reaktion beim Umsatz von GGDP und IDP.	56
Abbildung 15: Zeitlicher Verlauf der Produktbildung der AtIDS9 mit den Substraten (A) DMADP und IDP bzw. (B) GGDP und IDP.	57
Abbildung 16: Lineweaver-Burk- Diagramme zur Berechnung der apparenten <i>in vitro</i> Km-Werte der AtIDS9 mit verschiedenen Substraten.	59
Abbildung 17: Histochemische Lokalisation der <i>AtIDS9</i> Promotoraktivität in 5 und 10 Tage alten transgenen <i>A. thaliana</i> Pflanzen.	61
Abbildung 18: Histochemische Schnitte von stabil transformierten und GUS gefärbten <i>A. thaliana</i> Wurzeln (12 Tage alt) zur Ermittlung der Promotoraktivität der <i>AtIDS9</i>	62
Abbildung 19: Subzelluläre Lokalisation des AtIDS9- eGFP Fusionsproteins.	63

Abbildung 20: Subzelluläre Lokalisation des AtIDS9-eGFP Fusionsproteins im Inneren der Plastiden.	64
Abbildung 21: Subzelluläre Lokalisation der GFDP synthetisierenden Enzyme aus <i>A. thaliana</i>	66
Abbildung 22: Transitpeptidstudie der AtIDS9.	68
Abbildung 23: Subzelluläre Kolokalisation der Fusionsproteine AtTPS28-mCherry und AtIDS9-eGFP.	70
Abbildung 24: Abstandsmessungen zwischen den Fusionsproteinen AtIDS9-eGFP und TPS28-mCherry.	71
Abbildung 25: Phänotypische Analyse von <i>AtIDS9</i> T-DNA Insertionslinien.	73
Abbildung 26: Verwendete Konstrukte zur Generierung von <i>AtIDS9</i> Überexpressionslinien (<i>N. tabacum</i>).	74
Abbildung 27: GUS Färbung von vier Wochen alten stabil transformierten <i>N. tabacum</i> Pflanzen.	76
Abbildung 28: Bestimmung der Anzahl an Insertionen in den <i>AtIDS9</i> überexprimierenden <i>N. tabacum</i> Pflanzen.	77
Abbildung 29: Phänotypische Analyse der <i>AtIDS9</i> überexprimierenden stabil transformierten <i>N. tabacum</i> Pflanzen.	79
Abbildung 30: Phänotypische Analyse von <i>AtIDS9</i> Überexpressionslinien (mit <i>35S Enhancer</i>) ohne und mit 60 μ M GA3 Behandlung im Vergleich zu Wt Pflanzen ohne und mit GA3 Behandlung.	81
Abbildung 31: GC/MS Analyse transienter Assays der <i>AtIDS9</i> in Kombination mit der <i>AtTPS28</i> in <i>N. benthamiana</i>	83
Abbildung 32: Effekt der Überexpression der <i>AtIDS9</i> in Kombination mit der <i>AtTPS28</i> auf den Phänotyp von <i>N. tabacum</i> Pflanzen.	85
Abbildung 33: Blattoberflächenextrakte stabil transformierter <i>N. tabacum</i> Überexpressionslinien.	87
Abbildung 34: Modell zur Erklärung des durch die Überexpression der <i>AtIDS9</i> entstandenen Phänotyps in den Plastiden von <i>N. tabacum</i>	102
Abbildung 35: Schematische Darstellung der katalytischen Reaktion der <i>AtIDS9</i> und der <i>TPS28</i> , bei der die <i>AtTPS28</i> die Produkte der <i>AtIDS9</i> zur Synthese von Sesterterpenen nutzt.	103

Tabellenverzeichnis

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung aus <i>A. thaliana</i> stammender IDS.	7
Tabelle 2: verwendete Bakterienstämme.	21
Tabelle 3: verwendete Primer für die Klonierung von Genen mittels des Golden Gate Systems.	24
Tabelle 4: verwendete Primer zur Überprüfung der Insertion der T-DNA in der Salk Linie N769707 oder den stabil transformierten <i>N. tabacum</i> Pflanzen.	25
Tabelle 5: verwendete Plasmide.	27
Tabelle 6: verwendete Primer für qPCR.	32
Tabelle 7: T-DNA-Insertionslinie die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde.	33
Tabelle 8: Zusammensetzung Sammel- und Trenngels der SDS-Page.	36
Tabelle 9: Zusammensetzung Laufpuffer.	37
Tabelle 10: Für den Westernblot verwendete Puffer.	38
Tabelle 11: Zusammensetzung der x-Gluc Färbelösung.	41
Tabelle 12: MRM Übergänge der analysierten Isoprenoiddiphosphate.	44
Tabelle 13: Analyse der Substratspezifität der AtIDS9.	54
Tabelle 14: Übersicht über die apparenten, in vitro Km-Werte der rekombinant-hergestellten 6xHisTag-AtIDS9 für verschiedene Substrate.	58
Tabelle 15: Analyse putativer Transitpeptide GFDP produzierender IDS aus <i>A. thaliana</i>	65
Tabelle 16: Segregationsverhältnis der stabil transformierten Pflanzen, die laut qPCR Analyse nur eine Insertion des Zielgens tragen.	78
Tabelle 17: Chlorophyll- und Carotenoidgehalt der gelben und grünen Bereiche in der <i>AtIDS9</i> Überexpressionslinie mit <i>35S Enhancer</i>	80
Tabelle 18: Wurzellänge und Frischgewicht der <i>AtIDS9</i> Überexpressionslinien (mit <i>35S Enhancer</i>) ohne und mit 60 µM GA3 Behandlung im Vergleich zu Wt Pflanzen.	80

1 Einleitung

Sekundärmetabolite sind Stoffe, die unter anderem von Pflanzen, Pilzen und Mikroorganismen produziert werden und den produzierenden Organismen verschiedene Vorteile in der Interaktion mit ihrer Umwelt verschaffen können. Im Gegensatz zu den Primärmetaboliten, wie etwa den Intermediaten der Glykolyse oder des Zitronensäurezyklus, sind sie jedoch für das Überleben des jeweiligen Organismus nicht essentiell. Die größte Diversität an Sekundärmetaboliten ist zweifelsfrei im Reich der Pflanzen vorzufinden (Hartmann, 1996). So sind viele Pflanzen in der Lage, hunderte verschiedene Sekundärmetabolite zu produzieren, wobei sich die jeweilige Struktur und Zusammensetzung sowohl zwischen verschiedenen Pflanzenfamilien als auch zwischen verschiedenen Pflanzen einer Art stark voneinander unterscheiden kann (Hartmann, 1996). Die Produktion der Sekundärmetabolite erfolgt dabei zumeist in individuellen Organen oder spezialisierten Zellen, wie zum Beispiel den glandulären Trichomen (Turner *et al.*, 2000; Weathers *et al.*, 2011; Glas 2012) und ist oftmals auf ein bestimmtes Entwicklungsstadium der Pflanze beschränkt. Die Funktion der Sekundärmetabolite kann sehr vielseitig sein. So können sie der Pflanze etwa als Schutz vor Fraßfeinden (Hartmann, 1991, Gershenzon und Dudareva, 2007) oder als Lockstoffe für Bestäuber dienen (Wecker *et al.*, 2000). Weiterhin können sie zum Überleben der Pflanze beitragen, indem sie ihre Fitness erhöhen und eine Kommunikation zwischen verschiedenen Pflanzen bzw. zwischen Pflanzen und anderen Organismen ermöglichen (Taiz und Zeiger, 2000; Buchanan, Grissem und Jones, 2000). Obgleich diese Beispiele die Bedeutung dieser Stoffklasse in der Pflanzenwelt erkennen lassen, ist die Funktion des überwiegenden Teils an pflanzlichen Sekundärmetaboliten bislang noch völlig unbekannt und daher Gegenstand der aktuellen Forschung.

Neben ihrer biologischen Funktion spielen Sekundärmetabolite auch aus ökonomischer Sicht eine große Rolle. So werden sie als Medikamente eingesetzt (Scinto *et al.*, 1994; Kutchan, 1995; Wagner und Elmadfa, 2003; Weathers *et al.*, 2011) oder in der Kosmetik- und Parfümindustrie (Buchanan, Grissem und Jones, 2000) als Duftstoffe verwendet. Des Weiteren finden sie in der Nahrungsmittelindustrie in Form von Nahrungsergänzungsmitteln Verwendung, die die Gesundheit der Menschen fördern bzw. erhalten sollen (Niggeweg *et al.*, 2004; Schillmiller *et al.*, 2008).

Chemisch oder biosynthetisch betrachtet lassen sich die pflanzlichen Sekundärmetabolite in zahlreiche Gruppen einteilen. Zu ihnen zählen unter anderem die Terpenoide, die Phenylpropanoide, die Alkaloide, die cyanogenen Glykoside, Glycosinolate etc. (Wink,

Einleitung

1999a). Von diesen Stoffklassen stehen die Terpene im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit, wobei der Fokus insbesondere auf die Synthese der Vorläufer dieser Sekundärmetabolite und der hierbei beteiligten Enzyme gerichtet ist.

1.1 Isoprenoidstoffwechsel

Der Isoprenoidstoffwechsel der Pflanzen stellt die Grundbausteine (= Isoprenoide) für die Synthese einer Vielzahl von Produkten bereit, die für zahlreiche biochemische Funktionen im Organismus benötigt werden (Abbildung 1). So werden unter anderem die Photosynthesepigmente wie Carotinoide und Chlorophylle, einige Substanzen der photosynthetischen Elektronentransportkette, wie Plastochinone, Phylloquinone und der Atmungskette (Ubiquinone) oder Phytohormone, wie Gibberelline, Brassinosteroide und Abszinsäure mit Hilfe der Intermediate des Isoprenoidstoffwechsels synthetisiert.

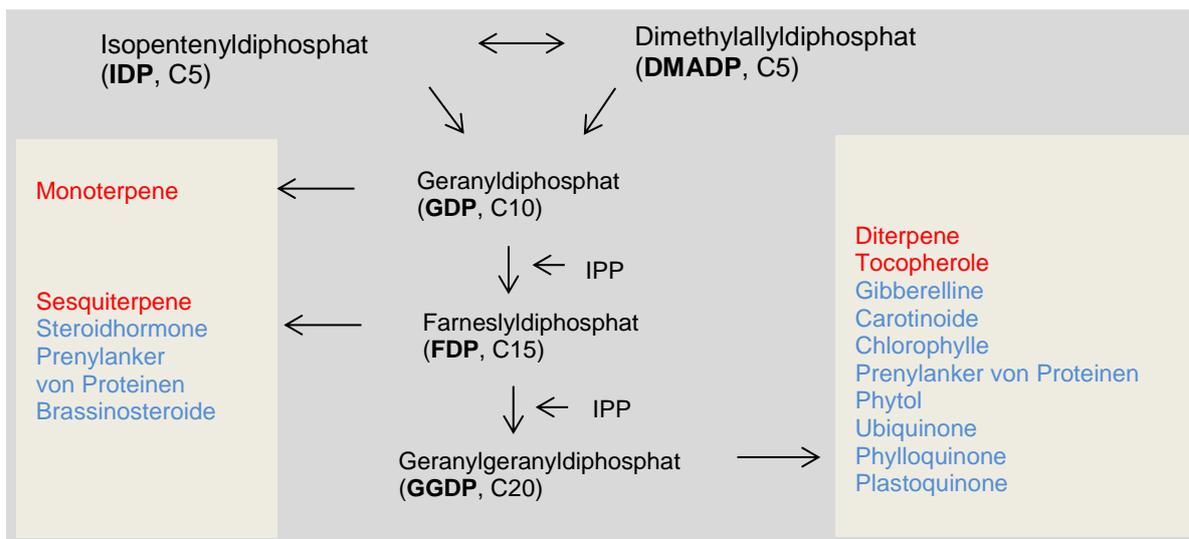


Abbildung 1: Schematische Darstellung der aus Isoprenyldiphosphaten synthetisierten Substanzen. Die verschiedenen Isoprenyldiphosphate werden als Substrat genutzt, um unter anderem Pflanzenhormone, Komponenten der Photosynthese oder verschiedene Terpene zu synthetisieren. In Blau sind Metabolite des Primärmetabolismus dargestellt, in Rot Metabolite des Sekundärmetabolismus.

Bis zum heutigen Zeitpunkt wurden mehr als 50.000 verschiedene Isoprenoide identifiziert, wodurch sie die funktionell und strukturell vielseitigste Gruppe an Metaboliten bilden (Thulasiram *et al.*, 2007). Die universellen Intermediate Isopentenyl-diphosphat (IDP) und Dimethylallyldiphosphat (DMADP) stellen die Grundbausteine für alle Isoprenoide dar (Abbildung 2; Lange *et al.*, 2000).

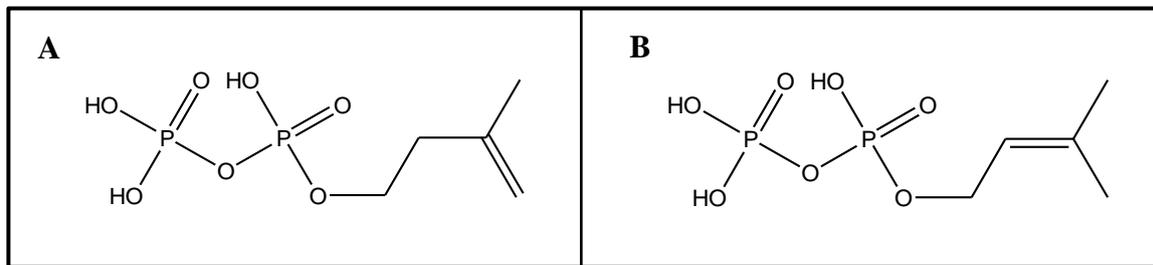


Abbildung 2: Grundbausteine der Isoprenoide. (A) Isopentenyl diphosphat (IDP), (B) Dimethylallyl diphosphat (DMADP).

In Pflanzen werden sie über zwei voneinander unabhängige Stoffwechselwege produziert. So können sie sowohl durch den zytosolisch lokalisierten Mevalonatweg (MVA-Weg; Vranová, 2013) als auch durch den in den Plastiden befindlichen Methylerythritolphosphatweg (MEP-Weg bzw. DXP-Weg; Arigoni *et al.*, 1997; Rodríguez-Concepción, 2006) gebildet werden. Diese universellen Intermediate stehen dem Organismus für die Synthese der verschiedensten Primär- und Sekundär-Isoprenoidmetabolite zur Verfügung. IDP und DMADP können sowohl für die Synthese verschiedenster Terpene, die unter anderem aus zehn Kohlenstoffatomen (Monoterpene), 15 Kohlenstoffatomen (Sesquiterpene), 20 Kohlenstoffatomen (Diterpene) oder 30 Kohlenstoffatomen (Triterpene) bestehen, verwendet (Tholl, 2006; Degenhardt *et al.*, 2009), als auch an Metabolite anderer Stoffklassen angefügt werden (Sinensky, 2000; Hougland und Fierke, 2009). Das durch den MEP-Weg gebildete IDP und DMADP wird dabei vorwiegend für die Synthese von Isoprenen, Monoterpenen, Diterpenen, Carotinoiden, Tocopherolen und Chlorophyllen verwendet, wohingegen das durch den MVA-Weg gebildete IDP und DMADP hauptsächlich für die Herstellung von Sesquiterpenen, Triterpenen und Phytosterolen genutzt wird (Banthorpe *et al.*, 1972; Lichtenthaler, 1999; Rohmer, 1999a). Dies bedeutet jedoch nicht, dass beide Wege völlig voneinander getrennt agieren. So konnte ein sogenannter *metabolic crosstalk*, der aus dem

Austausch von IDP zwischen dem Zytosol und den Plastiden besteht, nachgewiesen werden (Bick und Lange, 2003; Laule *et al.*, 2003; Hampel *et al.*, 2005; Dudareva *et al.*,

Einleitung

2005). Das Vorkommen beider Stoffwechselwege in einem Organismus, wie es in Pflanzen der Fall ist, ist jedoch für die meisten Lebewesen nicht typisch. So verwenden *Archaeen* (Smit *et al.*, 2000), Hefen (Kovacs WJ, 2002), Tiere (Rohmer *et al.*, 1993) und einige gram-positive Bakterien wie *Enterococcus*, *Staphylococcus* und *Streptococcus* (Wilding *et al.*, 2000) ausschließlich den MVA-Weg. Organismen, wie Cyanobakterien (Proteau, 1998), Grünalgen (Disch *et al.*, 1998) und der größte Teil der gram-negativen Bakterien, wie *Bacillus subtilis* und *Escherichia coli* (Röhmer *et al.*, 1993), stellen IDP und DMADP hingegen ausschließlich über den MEP-Weg her.

1.2 Prenyltransferasen

Prenyltransferasen stellen eine bedeutende Gruppe an Enzymen dar, die in allen lebenden Organismen anzutreffen sind und sowohl am Primär- als auch am Sekundärstoffwechsel beteiligt sein können. Sie lassen sich in drei Gruppen einteilen: die Proteinprenyltransferasen, die aromatischen Prenyltransferasen und die im Rahmen dieser Arbeit näher betrachteten Isoprenyldiphosphat-Synthasen (IDS; Liang *et al.*, 2002).

Proteinprenyltransferasen katalysieren die posttranslationale Modifikation von Proteinen, die zum größten Teil in der Membran integriert werden und Aufgaben im Bereich der Signaltransduktion übernehmen (Maurer-Stroh, 2003). Je nachdem, ob von der Prenyltransferase FDP oder GGDP als Substrat zur Prenylierung genutzt wird, spricht man von Farnesytransferase (FTase) oder Geranylgeranyltransferase (GGTase) (Maurer-Stroh *et al.*, 2003; Zverina *et al.*, 2012). Bei den Proteinen, die von den Proteinprenyltransferasen prenyliert werden, handelt es sich hauptsächlich um Ras (*Rat sarcoma*)-, Rab (*Ras-related in brain*)- und andere GTP (Guanosintriphosphat)-bindende Proteine sowie um Protein-kinasen (Roskoski 2003; Crowell und Huizinga, 2009). Das Anfügen von Prenylresten an Proteine wurde von Nguyen *et al.*, (2010) als essentiell für die biologische Funktion des jeweiligen Proteins beschrieben, da durch die hydrophoben Isoprenoidreste die Verankerung von Proteinen in oder an der Membran ermöglicht wird. Darüber hinaus spielen die Prenylierungen auch eine wichtige Rolle bei Protein-Protein-Wechselwirkungen (Sinensky, 2000; Hougland und Fierke, 2009).

Aromatische Prenyltransferasen übertragen vom Prenyldonor DMADP (C5), GDP (C10) oder FDP (C15) allylische Isopreneinheiten auf aromatische Substrate (Prenylakzeptor). Hierbei entsteht eine Vielzahl an aromatischen Substanzen, die sowohl im Primär- als auch im Sekundärmetabolismus involviert sind. Im Unterschied zu den generell membran-gebundenen Proteinprenyltransferasen kommen aromatische Prenyltransferasen sowohl

membrangebunden als auch zytosolisch vor. Zwei sehr gut charakterisierte Vertreter der membrangebundenen aromatischen Prenyltransferasen sind die Proteine UbiA (4-Hydroxybenzoesäure Oligoprenyltransferase) aus *E. coli* und Coq2 (Hydroxy-benzoat Polyprenyltransferase) aus *Saccharomyces cerevisiae*, welche beide eine zentrale Rolle in der Biosynthese von Ubichinon einnehmen (Ashby *et al.*, 1992; Melzer und Heide, 1994). Zu den Vertretern der zytosolischen aromatischen Prenyltransferasen gehören unter anderem CloQ aus *Streptomyces roseochromogenes*, ein Enzym, was an der Biosynthese von Clorobiocin beteiligt ist (Pojer *et al.*, 2003) und NovQ aus *Sporomusa spheroides*, was zur Biosynthese von Novobiocin benötigt wird (Steffensky *et al.*, 2000). Aber auch in Pflanzen existieren aromatische Prenyltransferasen. Hier sind sie an der Biosynthese von verschiedenen Sekundärmetaboliten wie zum Beispiel dem prenylierten Flavonoid Xanthohumol aus Hopfen (Stevens und Page, 2004) oder Hyperforin, einem Phloroglucinol des echten Johanniskrauts (*Hypericum perforatum*; Beerhues, 2006) beteiligt.

Die dritte Klasse an Prenyltransferasen sind die Isoprenyldiphosphat-Synthasen (IDS). Zu dieser Enzymklasse gehört die im Rahmen dieser Arbeit charakterisierte AtIDS9, weshalb diese Klasse im nachfolgendem Absatz ausführlicher behandelt wird.

1.3 Isoprenyldiphosphat-Synthasen (IDS)

Wie beschrieben wurde, gehören die IDS einer Untergruppe der Prenyltransferasen an, deren Reaktionsmechanismus auf einer Übertragung von Isopreneinheiten beruht (Abbildung 3). Hierbei werden Prenylgruppen, die von allylischen Prenyldiphosphaten wie DMADP, (C5); GDP, (C10); FDP, (C15) oder längeren Isoprenyldiphosphaten stammen, auf andere Isopreneinheiten transferiert. Die Gruppe der IDS kommt sowohl in Pilzen und Bakterien als auch in Pflanzen vor (Ferriols *et al.*, 2015). Sie spielen in der Biosynthese vieler Produkte des Sekundärstoffwechsels eine Rolle, wo sie die aufeinanderfolgende Kondensation von Isopentenylidiphosphat (IDP, C5) mit allylischen Substraten [DMADP, (C5); GDP, (C10); FDP, (C15) oder längeren Isoprenyldiphosphaten] katalysieren (Abbildung 3). Bei dieser Reaktion entstehen jeweils um C5 verlängerte Isoprenoid-Verbindungen.

Einleitung

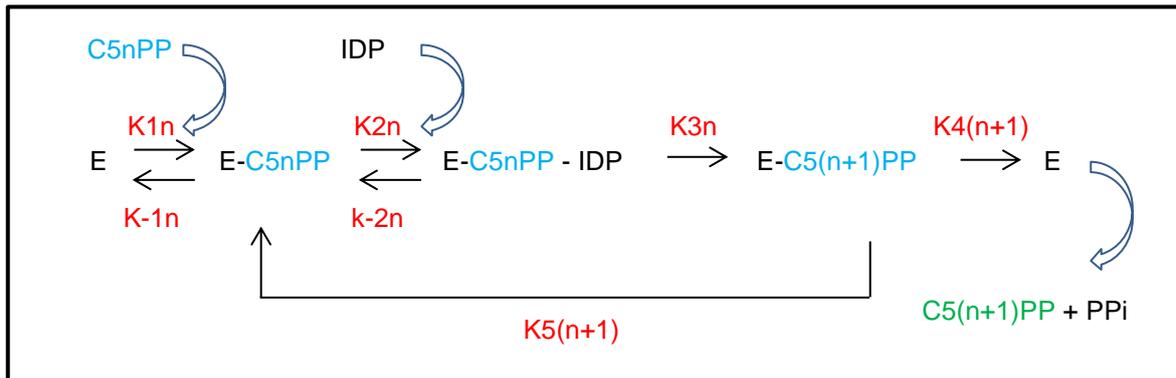


Abbildung 3: Konsekutive Kondensationsreaktion der IDS. Durch die sukzessive Addition von IDP Molekülen an das allylische Substrat (blau) entsteht ein Produkt (grün), das aus zusätzlichen C5-Isopreneinheiten besteht. n = Anzahl der addierten IDP Moleküle, $5(n+1)$ = Anzahl der Kohlenstoffatome des Produktes, $K5(n+1)$ = kinetische Geschwindigkeitskonstante der gesamten Reaktion, E = Enzym, K1-K4 Geschwindigkeitskonstanten der Teilschritte.

1.3.1 IDS-Genfamilie aus *A. thaliana*

Ein Sequenzvergleich des *A. thaliana* Genoms ergab, dass 15 Gene in der Pflanze für Kurzketten-trans-IDS kodieren könnten (Tabelle 1; Lange und Ghassemian, 2003). Die Enzyme, die von den Genloci *At3g14510* und *At4g38460* kodiert werden, scheinen dabei Pseudogene zu sein, die für nicht katalytisch aktive Proteine kodieren (Okada *et al.*, 2000; Wang und Dixon, 2009; Beck *et al.*, 2013). Die anderen 13 IDS produzieren unterschiedlich lange Isoprenyldiphosphate. So produziert die IDS *At2g34630* GDP (Bouvier *et al.*, 2000; van Schie *et al.*, 2007), während zwei weitere AtIDS FDP (*At4g17190*, *At5g47770*) produzieren (Closa *et al.*, 2010). Die verbleibenden 10 AtIDS sind ursprünglich als GGDP synthetisierende IDS charakterisiert worden (Lange und Ghassemian, 2003). Der Nachweis der Produkte dieser IDS erfolgte dabei lediglich indirekt durch genetische Komplementation eines *Escherichia coli* Stammes, der eine Mutation im Carotinoidstoffwechsel aufwies und der durch eine GGDP Synthase komplementiert werden konnte (Zhu *et al.*, 1997a,b; Wang und Dixon, 2009; Beck *et al.*, 2013). Ein direkter Nachweis der Produkte, wie er in dieser Arbeit experimentell durchgeführt wurde, ist demnach für eine exaktere Charakterisierung der IDS essentiell.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die bisherigen Informationen über die IDS aus *A. thaliana* als unvollständig angesehen werden müssen und diese Wissenslücken durch weitere Analysen, wie etwa der Ermittlung des Substratspektrums und der Bestimmung der kinetischen Parameter, verringert werden sollten.

Tabelle 1: Auflistung aus *A. thaliana* stammender *IDS*. GDPS= Geranyldiphosphat-Synthase; FDPS= Farnesyldiphosphat-Synthase; GGDPS= Geranylgeranyldiphosphat-Synthase. Die rot markierten Gene wurden als inaktive Pseudogene beschrieben. Modifiziert nach Lange und Ghassemian, (2003).

Name des Gens	AT Nummer	Subzelluläre Lokalisation
Geranyldiphosphat-Synthase		
<i>GDPS</i>	At2g34630	Plastid
Farnesyldiphosphat-Synthasen		
<i>FDPS1</i>	At4g17190	Zytosol
<i>FDPS2</i>	At5g47770	Zytosol / Mitochondrien
Geranylgeranyldiphosphat-Synthasen		
<i>GGDPS1 (IDS1)</i>	At1g49530	Mitochondrien
<i>GGDPS2</i>	At2g18620	Plastid
<i>GGDPS3</i>	At2g18640	Zytosol / Endoplasmatisches Retikulum
<i>GGDPS4</i>	At2g23800	Zytosol / Endoplasmatisches Retikulum
<i>GGDPS5</i>	At3g14510	Plastid
<i>GGDPS6 (IDS6)</i>	At3g14530	Plastid
<i>GGDPS7 (IDS7)</i>	At3g14550	Plastid
<i>GGDPS8</i>	At3g20160	Plastid
<i>GGDPS9 (IDS9)</i>	At3g29430	Plastid
<i>GGDPS10 (IDS10)</i>	At3g32040	Plastid
<i>GGDPS11</i>	At4g36810	Plastid
<i>GGDPS12</i>	At4g38460	Plastid

Einleitung

1.3.2 Klassifizierung der Enzyme der IDS Familie

Die am häufigsten in Pflanzen vorkommenden Isoprenoid-Vorläufer sind die allylischen Isoprenyldiphosphate FDP (C15) und GGDP (C20). Die Pools dieser beiden Metabolite repräsentieren den Hauptknotenpunkt der Isoprenoidbiosynthese. In Pflanzen wird FDP und GGDP dabei von bis zu zwölf IDS synthetisiert. Die Benennung dieser Enzyme erfolgt nach zwei etablierten Nomenklaturen. Zum einen werden IDS nach der Kettenlänge ihrer Produkte bezeichnet, zum anderen erfolgte die Bezeichnung nach der Konfiguration der neu geformten Doppelbindung (*cis-trans*-Isomerie). Für beide Nomenklaturregeln werden in den folgenden Abschnitten Beispiele an schon charakterisierten Enzymen aufgeführt.

1.3.2.1 *cis*- und *trans*- IDS

Aufgrund der Isomerie ihrer Produkte können die IDS in *cis*- oder *trans*- IDS eingeteilt werden (Liang *et al.*, 2002). Eine Analyse der Sequenzhomologie zeigte dabei, dass die Aminosäuresequenz der *cis*- und *trans*- IDS nur eine geringe Ähnlichkeit aufweist. Das Gleiche gilt auch für die Sekundärstruktur, woraus sich eine unterschiedliche Evolution der *cis*- und *trans*- IDS schließen lässt (Wang und Ohnuma, 2000; Liang *et al.*, 2002; Liang, 2009).

Die am häufigsten vorkommenden Kurzketten-IDS synthetisieren Produkte mit *trans*-Doppelbindungen. Dies bedeutet, dass der Hauptteil der natürlich vorkommenden Kurzketten-Isoprenyldiphosphate, wie GDP, FDP und GGDP, in *trans*- Konformation vorliegen. Zu den bisher bekannten Ausnahmen gehört die IDS zFPS (*Z*-Isoprenyldiphosphat-Synthase) und Neryldiphosphat-Synthase aus der wilden Tomate *Solanum habrochaites*, deren Produkte in *cis*- Konformation ermittelt wurden (Sallaud *et al.*, 2009; Schillmiller *et al.*, 2009). Die Forschung von Burke *et al.* (1999) und Tholl *et al.*, (2004) ergab weiterhin, dass *trans*- Kurzketten-IDS sowohl als Homodimer als auch als Heterodimer vorliegen können. Der Hauptteil dieser IDS liegt jedoch in der homodimeren Form vor.

Die meisten *cis*-IDS können langkettige Isoprenyldiphosphate bilden. Diese können bis zu 5000 C5 Einheiten haben, wie die Struktur von Naturkautschuk zeigt (Wang und Ohnuma 2000, Liang *et al.*, 2002). Dies ist aber keine generelle Regel. Zu den beschriebenen Ausnahmen gehören unter anderem die in verschiedenen Tomatenarten gefundenen Kurzketten-IDS, die zur Gruppe der *cis*-IDS gehören (Sallaud *et al.*, 2009; Schillmiller *et al.*, 2009; Akhtar *et al.*, 2013).

1.3.2.2 Kurzketten-, Mittelketten- und Langketten- IDS

Neben der Klassifizierung anhand der Stereochemie ihrer Produkte können IDS auch durch die Länge ihrer Produkte klassifiziert werden. So lassen sich Kurzketten- (C10-C25), Mittelketten- (C30-C40) oder Langketten- (≥ 40) IDS unterscheiden (Wang und Ohnuma, 2000; Liang *et al.*, 2002). Die IDS sind im Hinblick auf die Länge ihrer Produkte sehr spezifisch. So katalysieren einige dieser Enzyme, wie die Geranyldiphosphat-Synthasen (GDPS), nur eine einzelne Übertragung von IDP auf das allylische Substrat, wohingegen andere IDS mehrere Elongationen mit IDP katalysieren und somit Produkte erzeugen, die mehr als 10 C- Atome besitzen (Koyama und Ogura 1999; Wang und Ohnuma 1999).

Kurzketten-IDS, zu denen die in dieser Arbeit beschriebene AtIDS9 gehört, sind Enzyme, die Isopentenylidiphosphat (IDP, C5) und Dimethylallyldiphosphat (DMADP, C5) als Hauptsubstrat nutzen, um zentrale Intermediate des Isoprenoidstoffwechsels zu synthetisieren. Sie werden nach ihren Produkten in drei Gruppen eingeteilt: die Geranyldiphosphat-Synthasen (GDPS), die Farnesyldiphosphat-Synthasen (FDPS) und die Geranylgeranyldiphosphat-Synthasen (GGDPS). Durch die Arbeiten von Tachibana *et al.*, (1994, 2000) und Ogawa *et al.* (2010) konnte gezeigt werden, dass es in *Archaeen* zusätzlich auch noch Kurzketten-IDS gibt, die Geranylfarnesyldiphosphat (GFDP) produzieren. Diese Gruppe an IDS wurde jedoch bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht in höheren Pflanzen, wie *A. thaliana* detektiert. Für ihre Existenz spricht aber, dass in höheren Pflanzen, die zur Familie der Nachtschattengewächse (*Solanaceae*, Toyoda *et al.*, 1969; McDowell *et al.*, 2011), der Lippenblütler (*Lamiaceae*, Dal Piaz *et al.*, 2010; Luo *et al.*, 2010), der Lindengewächse (*Gossypium hirsutum*; *Malvaceae*; Stipanovic *et al.*, 1977), der Wolfsmilchgewächse (*Croton hieronymi*; *Euphorbiaceae*; Catalan *et al.*, 2003) und der Liliengewächse (*Aletris farinosa*; *Liliaceae*; Challinor *et al.*, 2013) gehören, bereits Sesterterpene nachgewiesen und identifiziert wurden. In der vorliegenden Arbeit sollte daher am Modellorganismus *A. thaliana* überprüft werden, ob auch IDS aus höheren Pflanzen GFDP produzieren können.

Einleitung

1.3.3 Dimerisierung der IDS

Die meisten IDS (unabhängig, ob es sich um *cis*- oder *trans*- IDS handelt) liegen als Homodimer vor (Bouvier *et al.*, 2000; van Schie *et al.*, 2007; Schmidt und Gershenzon, 2008; Schmidt *et al.*, 2010). Es wurden jedoch auch bereits heterodimere IDS aus *Mentha* × *piperita*, *Anthriscum majus*, *Ciarkia breweri* und *Humulus lupulus* beschrieben (Burke *et al.*, 1999; Tholl *et al.*, 2004; Wang und Dixon, 2009). Analysen zeigten, dass die heterodimeren IDS generell die Synthese von kurzkettigen Produkten wie GDP und GGDP katalysieren (Burke *et al.*, 2004; Troll *et al.*, 2004; Wang und Dixon, 2009; Chang *et al.*, 2010) und aus einer großen Untereinheit (*large subunit*, LSU) und einer kleinen Untereinheit (*small subunit*, SSU) bestehen. Die große Untereinheit besitzt zwei Aspartat-reiche Motive (1.3.5) und ist somit für die katalytische Aktivität verantwortlich, während die kleine Untereinheit, bei der es sich um eine kürzere IDS ähnliche Proteinsequenz handelt, kein Aspartat-reiches Motiv hat und demnach nicht zur katalytischen Aktivität des Proteinkomplexes beiträgt, aber dafür die Länge der synthetisierten Isoprenylkette (Produkt) festzulegen scheint (Tholl *et al.*, 2004; Orlova *et al.*, 2009; Wang und Dixon, 2009).

1.3.4 Organspezifische und subzelluläre Lokalisation der IDS

IDS weisen eine hohe Homologie der Aminosäuresequenzen auf. Jedoch lässt sich aus dieser Ähnlichkeit weder die Produktaktivität noch die Lokalisation vorhersagen (Okada *et al.*, 2000; Wang und Dixon 2009). Um ein besseres Verständnis für die Funktion der IDS im pflanzlichen Isoprenoidstoffwechsel zu erlangen, sind Kenntnisse über die subzelluläre Lokalisation, aber auch über die räumliche Expression in den einzelnen Organen erforderlich.

1.3.4.1 Organspezifische Lokalisation

Durch die Forschung von Beck *et al.*, (2013) konnten bei *A. thaliana* Transkripte der verschiedenen IDS-Gene in Wurzel, Rosette, Stängel, Blüte, Schote, Stängelblatt aber auch im Keimling detektiert werden. Genexpressionsanalysen mittels RT-qPCR ergaben dabei, dass die *AtIDS1*, 3, und 6 bis 11 in 18 Tage alten *A. thaliana* Pflanzen hauptsächlich in der Wurzel exprimiert werden. Nur die *AtIDS4* zeigte keine Expression in der Wurzel. Auch in anderen Organen, wie den Schoten und den Blüten, konnten Transkripte aller IDS (außer *AtIDS10* bzw. *AtIDS4*, 6, 7), nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass die IDS ubiquitär in den verschiedenen Pflanzenorganen auftreten und es interessant wäre, zu ermitteln, ob sie vielleicht auch unterschiedliche biologische Funktionen erfüllen.

1.3.4.2 Subzelluläre Lokalisation

Die IDS sind in den Zellkompartimenten mit ihren jeweiligen Produkten kolokalisiert. Zu diesen Orten gehören, wie aus Abbildung 4 ersichtlich wird, unter anderem das Zytosol, das endoplasmatische Retikulum, die Peroxisomen, die Mitochondrien und die Plastiden (Gray, 1987; Kleining, 1989), wobei die meisten IDS in den Plastiden lokalisiert sind (Beck *et al.*, 2013).

Die subzelluläre Lokalisation der aus *A. thaliana* stammenden GGPP produzierenden IDS innerhalb der verschiedenen Kompartimente der pflanzlichen Zelle wurde bisher für alle Enzyme mittels GFP Fusionsproteinen analysiert (Beck *et al.*, 2013). Hierbei konnte gezeigt werden, dass die einzelnen *AtIDS* eine unterschiedliche räumliche Expression aufweisen (Beck *et al.*, 2013).

Weitere Untersuchungen ergaben, dass die Geranyldiphosphat-Synthase (GDPS) und das von ihr produzierte GDP in den Plastiden vorkommt. Hier kann GDP als Substrat für die Synthese von Monoterpenen fungieren oder von IDS als Substrat für die Produktion des längerkettigen Isoprenyldiphosphats GGDP genutzt werden. Die Farnesyldiphosphat-Synthasen (FDPS) aus *A. thaliana* sind dagegen im Zytosol und in den Mitochondrien lokalisiert. Hier wird FDP für die Synthese von Sterolen, Brassinosteroiden und Sesquiterpenen verwendet, die in den entsprechenden Organellen nachgewiesen wurden (Vranová *et al.*, 2011). Die Geranylgeranyldiphosphat-Synthasen (GGDPS) und deren Produkt GGDP konnten hingegen in allen Zellkompartimenten, in denen Isoprenyldiphosphate anzutreffen sind, nachgewiesen werden. GGDP wird dabei nicht nur für die Herstellung von Diterpenen, sondern auch für die Synthese von Ubiquinonen, Carotinoiden und Gibberellinen benötigt und ist darüber hinaus auch bei der Prenylierung von Proteinen beteiligt (Beck *et al.*, 2013). Hier ist besonders die *AtIDS11* hervorzuheben. Wie die neusten Forschungs-ergebnisse zeigten, tritt dieses Enzym als einzige aus *A. thaliana* stammende IDS in zwei Isoformen, einer kurzen zytosolischen und einer langen plastidären Form, auf. Der grösste Teil des GGDP's in den Plastiden wird durch sie synthetisiert (Beck *et al.*, 2013) und somit ist ihre Aktivität in den Plastiden für die Chloroplasten Entwicklung und Photosynthese unersetzlich. Die zytosolische *AtIDS11* produziert ebenfalls GGDP und stellt so den Vorläufer für einen bis zum heutigen Zeitpunkt unbekanntem Isoprenoidmetabolit bereit, der essentiell für die Embryoentwicklung zu sein scheint (Ruiz-Sola *et al.*, 2016).

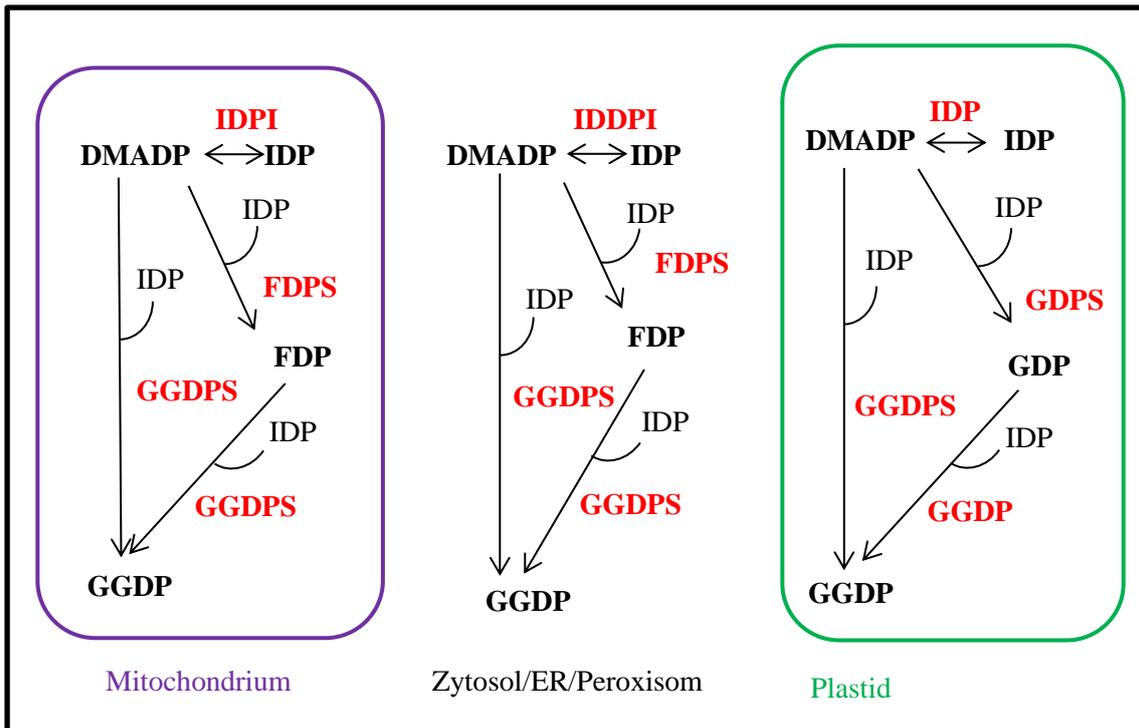


Abbildung 4: Subzelluläre Lokalisation der IDS und deren Produkte innerhalb einer *A. thaliana* Zelle. Die Abbildung basiert auf dem Stoffwechselnetzwerk, das von Vranová *et al.*, (2011) erstellt wurde. Die Lokalisation der IDS steht im engen Zusammenhang mit dem Bedarf der gebildeten Isoprenyldiphosphate in den jeweiligen Kompartimenten. Enzyme sind in rot und Isoprenoiddiphosphate sind in schwarz dargestellt. In den Plastiden sind GDP und GGDP lokalisiert. In den Mitochondrien, dem Zytosol, dem endoplasmatischen Retikulum und den Peroxisomen sind FDP und GGDP lokalisiert. Die Hauptsynthese von GGDP findet dabei in den Mitochondrien und in den Plastiden statt (Beck *et al.*, 2013). IDPI= Isopentenylidiphosphat-Isomerase; GDPS= Geranyldiphosphat-Synthase; FDPS= Farnesyldiphosphat -Synthase; GGDPs= Geranylgeranyldiphosphat-Synthase; IDP= Isopentenylidiphosphat; DMADP= Dimethylallyldiphosphat; GDP= Geranyldiphosphat; FDP= Farnesyldiphosphat; GGDP= Geranylgeranyldiphosphat.

1.3.5 Motive der *trans*- IDS

Die *trans* IDS, zu deren Gruppe auch die in dieser Arbeit analysierte AtIDS9 gehört, besitzen zwei Aspartat-reiche Motive (Liang *et al.*, 2002), das FARM (*first aspartic rich motif*) und das SARM (*second aspartic rich motif*). Beide Motive sind für die Aktivität essentiell. Bei dem FARM Motiv handelt es sich um die Aspartat-reichen Sequenzen DDx₂₋₄ (x kann jede beliebige Aminosäure sein), wohingegen das SARM Motiv immer die Aminosäuresequenz DDxxD besitzt. An diese Aspartat reichen Motive sind jeweils drei Mg²⁺-Ionen gebunden, die einerseits zur Bindung von IDP und dem allylischen Substrat (DMADP, GDP, FDP), andererseits auch zur Bildung des Produktes benötigt werden (Aaron und Christianson, 2010).

Das DDxxD Motiv ist nicht spezifisch für IDS. So wurde es ebenfalls in Proteinprenyltransferasen, Monoterpen-Synthasen, Sesquiterpen-Synthasen und Diterpen-Synthasen gefunden (Ashby und Edwards, 1990; Chen *et al.*, 1994). Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass dieses Motiv ein allgemeines Motiv darstellt, was von Enzymen, die allylische Isoprenyldiphosphate als Substrat nutzen, verwendet wird.

Kurzketten *trans*- IDS regulieren die Länge der Produkte mit Hilfe der Identität der Aminosäuren, die sich N-terminal des FARM's befinden. Diese Sequenz wird als "CLD" - Region ("*chain-length-determination-region*") bezeichnet und folgt der "molekularen Regel Theorie". Diese Theorie beinhaltet, dass die Größe dieser Aminosäuren die Größe des aktiven Zentrums und damit die Länge des Produktes bestimmt (Ohnuma *et al.*, 1997; Wang und Ohnuma, 2000; Liang *et al.*, 2002).

Zusätzlich zu den Aspartat-reichen Motiven besitzen IDS noch ein CxxxC Motiv (x kann jede beliebige hydrophobe Aminosäure sein; Wang und Dixon, 2009). Dieses Motiv spielt zum einen eine Rolle bei der physikalischen Interaktion der einzelnen Untereinheiten, die für die Dimerisierung der IDS benötigt werden. Zum anderen konnte gezeigt werden, dass dieses Motiv ebenfalls die Länge der Produkte bestimmen kann. So führt etwa ein Aminosäureaustausch der Cysteine im CxxxC Motiv bei der GDP-synthetisierenden IDS aus *A. thaliana* (At2g34630) zur Bildung von C25 - C45 langen Produkten. Hieraus lässt sich eine Beteiligung des CxxxC Motives bei der Produktspezifität schließen (Bouvier *et al.*, 2000; Van Schie *et al.*, 2007).

In der Abbildung 5 sind die eben beschriebenen Motive für ausgewählte IDS aus *A. thaliana* dargestellt.

Einleitung

	1					60
AtIDS1M	RPRYSLILSA	MRLIRPSNRR	LSSIASSDSE		
AtIDS6	MATTVHLSSS	SLFSQSRGRR	DNSISSVKSL	RKRTVLSLSS	ALTSQDAGHM	IQPEGKSNDR
AtIDS7	MATTVHLSSF	SLFIQSRGRR	DNSISSVKSL	KKRTGLSPSS	ALTSQGGDRM	IDPEGKCNDR
AtIDS9	MATT..LSSS	SLFIQFRGRR	YNSLSSFNNL	QKRTVLSLSC	ALSSQGG.DM	IDPEGKSNDR
AtIDS10	MANTVHLSSS	SLFIQTRGRK	YNSILSFNNL	QKRTVLSLSC	ALTSQGGKDM	IDPKGKSNDR
	61					130
AtIDS1	FISYMKNKAK	SINKALDNSI	PLCNNFVPLW	EPVLEVHKAM	RYTLLPGGKR	VRPML CLVAC
AtIDS6	NSAF.DFKLY	MIRKAESVNA	AL.DVSVPLL	KP.LTIQEAV	RYSLLAGGKR	VRPLL CIAAC
AtIDS7	NSAF.DFKLY	MIRKAESVNA	AL.DVSVPLR	EP.LTVQEAV	RYSLLAGGKR	VRPLL CIAVC
AtIDS9	NSAF.DFKSY	MIRKAESVSA	AL.NVSVPLQ	EP.LTIQEAV	RYSLLAGGKR	VRPLL CIAAC
AtIDS10	NFAF.DFKSY	MIRKAESVSM	AL.NVSVPPQ	DP.LAIQEAV	RYSLLAGGKR	VRPLL CIAAC
	131					180
AtIDS1	ELVGGQESTA	MPAACAVEMI	HAASLIL DDL	PCM DDDSLRR	GKPTNHKVFG	EKTSILASNA
AtIDS6	ELVGGDEATA	MSAACAVEMI	HTSSLI HDDL	PCM DNADLRR	GKPTNHKVYV	EDMAVLAGDA
AtIDS7	ELVGGDEATA	MSAACAVEMI	HTSSLI HDDL	PCM DNADLRR	GKPTNHKVYV	EDMAVLAGDA
AtIDS9	ELVGGDEATA	MSAACAVEMI	HTSSLI HDDL	PCM DDADLRR	GKPTNHKEFG	EDMAVLAGDA
AtIDS10	ELVGGDEATA	MSAACAVEMI	HTSSLI HDDL	PCM DDADLRR	GKPTNHKVFG	EHMAVLAGDA
			FARM			
	181					240
AtIDS1	LRSLAVKQTL	ASTSLGVTSE	RVLRAVQEMA	RAVGTEGLVA	GQAADLAGER	MSFKNEDDEL
AtIDS6	LLALAFEHMT	VVSSGLVAPE	KMIRAVVELA	RAIGTTGLVA	GQMIDLASER	LN..PDKVGL
AtIDS7	LLALAFEHMT	FVSSGLVAPE	RMIRAVVELA	RAIGTTGLVA	GQMIDLASER	LN..PDKVGL
AtIDS9	LLALAFEHMT	FVSNGLVAPE	RMIRAVMELA	KAIGTKGLVA	GQVTDLCSQG	LN..PDDVGL
AtIDS10	LLALAFEHMT	VVSSGLVAPE	RMIRSVTELA	KAIGTKGLVA	GQVSDLCSQG	LN..PYDVGL
	241					300
AtIDS1	RYLELMHVHK	TAVLVEAAAV	VGAIMGGGSD	EEIERLKSYA	RCVGLMFQVM	DDVLD ETKSS
AtIDS6	EHLEFIHLHK	TAALLEAAAV	LGVIMGGGTE	QEIEKLRKYA	RCIGLLFQVV	DDILD VTKST
AtIDS7	EHLEFIHLHK	TAALLEAAAV	LGVIMGGGTE	EEIEKLRKYA	RCIGLLFQVV	DDILD VTKST
AtIDS9	ERLEFIHLHK	TAALLEAAAV	LGAIMGGGTE	EEIEKLRKYA	RCIGLLFQVV	DDILD VTEST
AtIDS10	ERLEFIHLHK	TAALLEAAAV	LGAIIGGGTE	EIEKLRKYG	RCIGLLFQVV	DDIID VTEST
				SARM		
	301					360
AtIDS1	EELGKTAGKD	LITGKLTYPK	VMGVDNAREY	AKRLNREAQE	HLQGFDSQV	VPLLSLADYI
AtIDS6	EELGKTAGKD	VMAGKLTYPK	LIGLEGSREV	AEKLRREAEE	QLLGFDPKSA	APLVALASYI
AtIDS7	EELGKTAGKD	VMAGKLTYPK	LIGLERSKEV	AEKLRREAEE	QLLGFDPKSA	APLVALASYI
AtIDS9	KELGKTAGKD	VMAGKLTYPK	LIGLERSREV	AEKLRREAEE	QLLGFDSKSA	APLVALASYI
AtIDS10	EELGKTAGKD	VMARKLTYPK	LIGLERSREV	AEKLRREAEE	QLLGFDSQV	APLVALASYI
	365					
AtIDS1	VKRQN					
AtIDS6	ACRHN					
AtIDS7	ACRHN					
AtIDS9	ACRHN					
AtIDS10	ACRHN					

Abbildung 5: Multiples Alignment diverser aus *Arabidopsis* stammender IDS. Dargestellt ist das FARM und SARM Motiv (rot) bzw. das CxxxC Motiv (blau) der AtIDS1, AtIDS6, AtIDS7, AtIDS9 und AtIDS10.

1.3.6 Reaktionsmechanismus der IDS

Der grundlegende Reaktionsmechanismus, der von den IDS ausgeführt wird, wurde in den 70er und 80er Jahren durch die Forschung von Poulter und Rilling aufgeklärt (Poulter und Rilling, 1981). Er kann in drei Schritte eingeteilt werden (Abbildung 6).

Im ersten Schritt der katalytischen Reaktion bindet das Enzym zwei Substrate. Das eine Substrat stellt dabei immer IDP dar. Das andere allylische Substrat hingegen kann DMADP, GDP, FDP oder ein anderes Isoprenyldiphosphat sein. Nach der Substratbindung wird bei der katalytischen Reaktion ein allylisches Kation am C1-Atom des allylischen Substrates gebildet. Für die Katalyse dieses Schrittes wird die Bindung eines zweiwertigen Metallions wie zum Beispiel Mg^{2+} als Kofaktor benötigt. Im zweiten Schritt führt das neu gebildete Karbokation einen elektrophilen Angriff auf das vierte Kohlenstoffatom des IDP durch. Dies resultiert in der Ausbildung einer C-C Bindung zwischen IDP und dem allylischen Substrat. Im dritten und finalen Schritt der Katalysen wird nun das im Vergleich zum allylischen Substrat um fünf Kohlenstoffatome längere Produkt aus dem aktiven Zentrum des Enzyms entlassen.

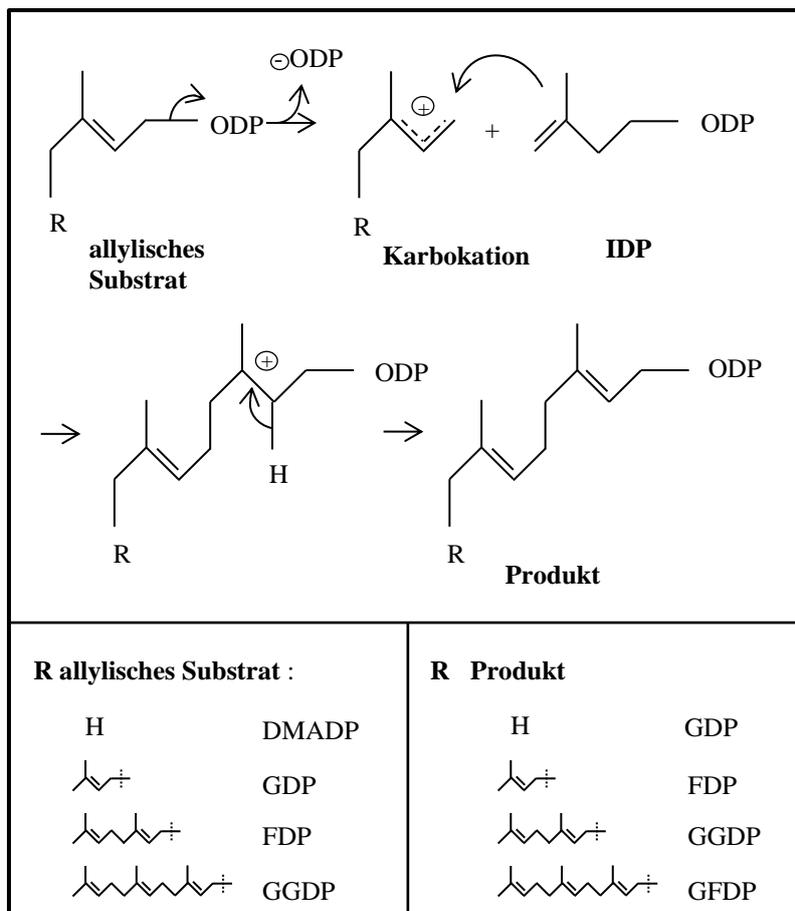


Abbildung 6: Reaktionsmechanismus der IDS.

Dargestellt ist die Kondensationsreaktion, die von GDP-Synthasen, FDP-Synthasen, GGDP-Synthasen oder GFDP-Synthasen katalysiert wird. Der elektrophile Reaktionsmechanismus umfasst die initiale Ionisation des allylischen Diphosphat-esters mit anschließender Bildung eines Karbokations. Dieses geht anschließend eine C4-C1 Bindung über die terminale Doppelbindung des IDPs ein. Daraus entsteht ein tertiäres Karbokation, gefolgt von einer finalen Deprotonierung. R= Rest

Einleitung

1.4 Terpensynthesen

Die Produkte der IDS können von verschiedenen Terpensynthesen (TPS) als Substrate zur Produktion von Terpenen verwendet werden. Aus diesem Grund soll in diesem Abschnitt ein kurzer Einblick in die große Familie der TPS gegeben werden.

1.4.1 Terpene: Produkte der TPS

Terpene stellen mit weit über 60.000 verschiedenen Substanzen die strukturell vielfältigste und weit verbreitetste Familie von Naturprodukten dar (Köksal *et al.*, 2011). Die größte Vielfalt an Terpenen kommt im Reich der Pflanzen vor. Hier haben sie eine essenzielle Funktion als pflanzliche Hormone, wie zum Beispiel Gibberelline und Brassinosteroide sowie als Plastochinone, Phyllochinone und Ubichinone (Bueno *et al.*, 2012; Piller *et al.*, 2012). Auch Carotinoide oder die Phytol-Seitenkette des Chlorophylls (Shibata *et al.*, 2004; Cazzonelli und Pogson, 2010) sind Beispiele für die mannigfaltige Funktion. Sie nehmen darüber hinaus wichtige Funktionen sowohl in der Interaktion zwischen Pflanzen (Arimura *et al.*, 2000) als auch zwischen Pflanzen und anderen Organismen, wie z. B. bei der Pflanzen – Pathogen Kommunikation oder der Pflanzen-Herbivore Signalübertragung ein (Hammerschmidt, 1999; Pare und Tumlinson, 1999; Kessler und Baldwin, 2001; Unsicker *et al.*, 2009; Hall *et al.*, 2011; Schmelz *et al.*, 2011, Huang *et al.*, 2012; Mithöfer und Boland 2012; Quintana- Rodriguez *et al.*, 2015).

Die große Vielfalt an verschiedenen Terpenen in der Natur wird unter anderem dadurch ermöglicht, weil TPS Multiproduktenzyme sind. Dies bedeutet, dass sie aus einem Substrat viele verschiedene Produkte bilden können. Für die Synthese von Terpenen nutzen die TPS dabei Isoprenyldiphosphate, wie DMADP, GDP, FDP oder GGDP als Substrate. Viele der aus *A. thaliana* stammenden TPS sind gut charakterisiert wie zum Beispiel die TPS2 (At4g16730) die (*E*)- β -Ocimene / Myrcene und (*E/E*)- α Farnesen produziert (Huang *et al.*, 2010) oder die (*Z*)- γ Bisabolen produzierende AtTPS13 (At4g13300; Ro *et al.*, 2006). Jedoch gibt es in *A. thaliana* auch putative Terpensynthesen, die bislang noch nicht im Hinblick auf ihr Substrat- und Produktspektrum untersucht wurden (TPS5, 7, 28 usw.). Deshalb sollen im Rahmen dieser Arbeit auch erste Untersuchungen an der TPS28 durchgeführt werden, um Aufschluss darüber zu erhalten, ob diese Terpensynthase die Produkte der AtIDS9 als Substrat weiter umsetzen kann.

1.4.2 Nomenklatur der TPS

Wie im Falle der IDS lassen sich auch die TPS auf zwei Wegen klassifizieren. So können sie zum einen nach der Anzahl der Kohlenstoffatome ihrer Produkte eingeteilt werden, zum anderen kann eine Klassifizierung nach dem Mechanismus der Reaktion, den sie katalysieren, erfolgen.

Durch die unterschiedliche Anzahl an Kohlenstoffatomen der gebildeten Produkte werden die TPS als Hemiterpen- (C₅), Monoterpen- (C₁₀), Sesquiterpen- (C₁₅), Diterpen- (C₂₀), Sesterterpen- (C₂₅), Triterpen- (C₃₀), Tetraterpen- (C₄₀) und Polyterpen-Synthesen (>C₄₀) klassifiziert (Tholl, 2006; Degenhardt *et al.*, 2009). Aufgrund ihres Reaktionsmechanismus erfolgt hingegen eine Klassifizierung in Klasse I und Klasse II TPS. Hierbei wird von den TPS entweder eine protonierungs-induzierte Zyklisierung (TPS Klasse II) oder eine ionisierungs-induzierte Zyklisierung (TPS Klasse I) katalysiert (Trapp und Croteau, 2000; Whittington *et al.*, 2002; Thoma *et al.*, 2004; O'Maille *et al.*, 2008).

Einleitung

1.5 Zielsetzung

IDS spielen eine zentrale Rolle im Primär- und im Sekundärmetabolismus. Hier sind sie unter anderem an der Synthese von Substraten für TPS beteiligt und regulieren durch die Menge an synthetisierten Produkten die Menge an produzierten Terpenen.

Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurden jedoch von den 13 bekannten IDS der Modelnpflanze *A. thaliana* nur wenige dieser Enzyme umfangreich charakterisiert. Das bedeutet, dass die bisherigen Informationen nur wenige Informationen über die biologische Funktion einiger der 13 AtIDS zulassen. Um ein klareres Bild von der Substrat- und Produktspezifität, der Lokalisation und der biologischen Funktion der IDS zu erhalten, sollten daher auch die anderen AtIDS genauer charakterisiert werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll dabei insbesondere die AtIDS9 (At3g29430) näher beschrieben werden. Dabei wird zum einen eine Analyse der Substratspezifität sowie der Erhebung kinetischer Parameter durchgeführt. Zum anderen soll der Fokus auf die Ermittlung der subzellulären Lokalisation gelegt werden. Darüber hinaus soll mit Hilfe von stabil transformierten *N. tabacum* Pflanzen, die die *AtIDS9* überexprimieren, ein Einblick in die biologische Funktion des Enzyms gewonnen werden.

Im ersten Teil der Arbeit sollen die Substratpräferenzen und die Produkte der AtIDS9 analysiert werden. Hierfür muss das Enzym zunächst heterolog exprimiert und aufgereinigt werden. Anschließend soll das Enzym in einem *in vitro* Assay mit verschiedenen allylischen Substraten (DMADP, GDP, FDP, GGDP) auf die Substratpräferenzen getestet und das entstandene Produktspektrum mittels LC/MS analysiert werden. Zusätzlich soll die Bestimmung apparenter kinetischer Konstanten für mehrere Substrate erfolgen.

Der zweiten Teil der Arbeit befasst sich mit der Lokalisation der AtIDS9. Diese Untersuchung soll durchgeführt werden, um Aufschluss darüber zu erhalten, in welchem Pflanzenorgan und Zellorganell die *AtIDS9* exprimiert wird. Die Lokalisation des Pflanzenorgans, in der die *AtIDS9* exprimiert wird, soll mit Hilfe von stabil transformierten *A. thaliana* Pflanzen, die das β -Glucuronidase Gen unter der Kontrolle des putativen *AtIDS9* Promotors exprimieren, erfolgen. Zur Bestimmung der subzellulären Lokalisation der AtIDS9 sollen *N. benthamiana* Pflanzen verwendet werden, die transient ein *AtIDS9-eGFP* Fusionskonstrukt exprimieren.

Nach erfolgreicher Identifizierung der AtIDS9 Produkte soll im dritten Teil deren weitere Verstoffwechslung untersucht werden. In der Natur werden Isoprenyldiphosphate unter anderem von Terpensynthasen als Substrat genutzt. Deshalb sollen mittels stabil transformierter *N. tabacum* Pflanzen und *in vivo* Assays, in denen jeweils die *AtIDS9* sowie eine *Terpensynthase* aus *A. thaliana* koexprimiert wird, erste Schlüsse gezogen werden, ob die Produkte der *AtIDS9* von der Terpensynthase genutzt werden können, sprich entsprechende Terpene identifizierbar sind. Außerdem sollen erste Hinweise auf die biologische Funktion des Proteins mit Hilfe von stabil transformierten *N. tabacum* Pflanzen gewonnen werden. Hierbei soll die phänotypische Charakterisierung Aufschluss über die Funktion der produzierten Isoprenyldiphosphate geben.

Die im Umfang dieser Arbeit erhaltenen Erkenntnisse sollen einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung der Funktion der *AtIDS9* und damit zu einem tieferen Verständnis der IDS aus *Arabidopsis* liefern. Ebenso sollen sie zum gesamten Verständnis des komplexen Netzwerks der Isoprenyldiphosphatsynthese und der biologischen Funktion der Isoprenyldiphosphate in höheren Pflanzen beitragen.

Material und Methoden

2. Material und Methoden

2.1 Pflanzenanzucht

Anzucht von *A. thaliana* auf Erde

A. thaliana Saatgut wurde auf einer Erdmischung [CL Ton Kokos Profisubstrat Classic (Einheitserdewerke Werkverband e.V., Sinnatal-Altengronau, Deutschland) gemischt mit Vermiculite, Körnung 2-3 mm (Gärtnereibedarf Kammlott, Erfurt, Deutschland); Mischung 4:1] ausgebracht, gegossen und anschließend für 48 h bei 4 °C dunkel und feucht inkubiert. Durch die Kältebehandlung wurde die Synchronität der Keimung erhöht. Die Anzucht erfolgte unter kontrollierten Bedingungen in einer Phytokammer (AR-66L, CLF Plant Climatics, Wertingen, Deutschland). Nach 14 Tagen unter Kurztag-Bedingungen (Tag: 8 h; 22 °C / Nacht: 16 h; 19 °C) wurden die Sämlinge in Töpfe (8x8 cm) mit Erde pikiert und gegossen. Die weitere Anzucht erfolgte unter definierten Langtag-Bedingungen (Tag: 16 h; 22 °C / Nacht: 8 h; 20 °C; 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 55% relative Luftfeuchtigkeit).

Anzucht von *A. thaliana* auf MS-Medium

Die Anzucht von *A. thaliana* Pflanzen auf MS-Platten wurde sowohl für die T-DNA Insertionslinie (Sulfadiazin Resistenz) als auch für die Analyse der im Rahmen dieser Arbeit generierten stabil transformierten *A. thaliana* Pflanzen (Kanamycin-Resistenz) genutzt. Zur Sterilisation der *A. thaliana* Samen wurde die Oberfläche der Samen für 1 min mit 70% (v/v) Ethanol behandelt und anschließend für 1 min mit 6% (v/v) Natriumhypochlorit (Roth, Karlsruhe, Deutschland) sterilisiert. Im nächsten Schritt wurden die Samen viermal mit sterilem Leitungswasser gewaschen. Nach der Sterilisation wurden die Samen unter sterilen Bedingungen auf MS-Medium [4,3 g/l Murashige & Skoog Medium ohne Vitamine (Duchefa Biochemie, Haarlem, Niederlande), 8 g/l Phytoagar (Duchefa Biochemie, Haarlem, Niederlande), 20 g/l Saccharose, pH 5,7 / KOH] ausgebracht. Es folgte eine zweitägige Kältebehandlung im Dunkeln bei 4 °C, bevor die Pflanzen in der Phytokammer unter Langtag-Bedingungen angezogen wurden.

Anzucht von *N. benthamiana* bzw. *N. tabacum* auf Erde

N. benthamiana Samen wurden auf Erde ausgesät und in der Klimakammer bei einem 16 h Hell- (90 $\mu\text{mol/s/m}^2$, 20 °C) und 8 h (18 °C) Dunkel- Rhythmus bei einer konstanten Luftfeuchtigkeit von 60% angezogen. Die Anzucht von *N. tabacum* erfolgte aufgrund ihrer Größe im Gewächshaus unter kontrollierten Bedingungen (Tag: 16 h; 18-20 °C, mindestens 20 kLux /Nacht: 8h; 18-20 °C). Die Erdmischung war die gleiche wie die, die zur Anzucht von *A. thaliana* genutzt wurde.

Anzucht von *N. tabacum* auf MS-Medium

Für die Anzucht von *N. tabacum* Pflanzen auf MS-Medium [4,3 g/l Murashige & Skoog Medium ohne Vitaminen (Duchefa Biochemie, Haarlem, Niederlande), 9 g/l Phytoagar (Duchefa Biochemie, Haarlem, Niederlande), pH 5,7 / KOH] wurden die Samen im ersten Schritt oberflächensterilisiert. Hierfür wurden die Samen für 2 min mit 70% (v/v) Ethanol behandelt, anschließend erfolgte eine 5- minütige Behandlung mit 6% (v/v) Natriumhypochlorid. Danach wurden die Samen mit sterilem Leitungswasser gewaschen und auf dem Medium in sterilen quadratischen Petrischalen (120x120x17 mm, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) ausgesät. Es erfolgt eine Kältebehandlung, wie schon für *A. thaliana* beschrieben. Anschließend wurden die Pflanzen im Phytoschrank unter Langtag-Bedingungen angezogen (Tag: 16 h hell; 20 °C / Nacht: 8 h; 18 °C).

2.2 Bakterienstämme

Tabelle 2: verwendete Bakterienstämme

Bakterienstamm	Spezies	Genotyp, Referenz
DH5 α	<i>E. coli</i>	F ⁻ , ϕ 80dlacZ Δ M15, Δ (lacZYA -argF)U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17 (rK ⁻ , mK ⁺), phoA, supE44, λ^- , thi -1, gyrA96, relA1 (Hanahan, 1983)
GV3101::pMP90	<i>A. tumefaciens</i>	Rif ^R , Gent ^R pMP90RK (pTiC58DT-DNA) (Koncz und Schell, 1986)
DH10B/TOP10	<i>E. coli</i>	F ⁻ endA1 deoR ⁺ recA1 galE15 galK16 nupGrpsL Δ (lac)X74 ϕ 80lacZ Δ M15 araD139 Δ (ara, leu)7697 mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Str ^R λ^- (Invitrogen)

Material und Methoden

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus *A. thaliana*

Für die Klonierung der *AtIDS9* und *AtTPS28* aus *A. thaliana* Wurzeln (col-0) bzw. *AtPSY* aus *A. thaliana* Blättern (col-0) wurde zunächst die Gesamt-RNA mittels TRIzol Reagenz (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) isoliert. Hierfür wurde im ersten Schritt das Pflanzenmaterial mit einem Mörser unter ständiger Kühlung durch flüssigen Stickstoff zu einem feinen Pulver gemörsert. Davon wurden 100 mg in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt, 1 ml TRIzol Reagenz hinzugegeben und sofort gemischt. Nach 5 min Inkubationszeit wurde die Probe für 10 min bei 12000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand, in dem sich die Gesamt-RNA befindet, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, während das Pellet verworfen wurde. Anschließend erfolgte die Zugabe von 200 µl Chloroform zum Überstand und mehrmaliges Invertieren. Nach 3 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Probe erneut zentrifugiert (15 min, 12000 x g, 4 °C). Dabei bildeten sich 2 Phasen aus. Die obere wässrige Phase enthält die Gesamt-RNA und wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 500 µl Isopropanol versetzt. Anschließend wurde die Probe erneut durch Invertieren gemischt, dann für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und nochmals für 10 min (12000 x g bei 4 °C) zentrifugiert. Das gebildete Pellet beinhaltet die Gesamt-RNA. Der Überstand wurde verworfen. Im darauffolgenden Schritt wurde das RNA Pellet gewaschen. Dafür wurden 1 ml 75% (v/v) iger kalter Ethanol auf das Pellet gegeben. Anschließend wurde die Probe erneut zentrifugiert (5 min, 7500 x g, 4 °C) und der Überstand wieder abgenommen. Im finalen Schritt wurde das Pellet an der Luft getrocknet und zum Schluss in RNase freiem Wasser resuspendiert. Die Quantifizierung der RNA erfolgt am NanoDrop (Thermo Fischer Scientific, Darmstadt, Deutschland). Um mögliche Verunreinigung der isolierten RNA mit genomische DNA zu entfernen, wurde das *Turbo DNA free* Kit der Firma Thermo Fischer Scientific (Deutschland, Darmstadt) nach Herstelleranweisung verwendet.

2.3.2. Reverse Transkription

Das Umschreiben der *A. thaliana* Wurzel-mRNA in cDNA erfolgte mittels *Revert Aid TM Premium First Strand cDNA Synthesis Kit* von Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) nach Herstellerangaben. Hierfür wurden die im Kit enthaltenen Oligo (dT)18 Primer verwendet. Umgeschrieben wurden je 1 µg der Gesamt-RNA. Nach der cDNA Synthese wurden 2 µl cDNA auf ein 1% (w/v) Agarosegel gegeben, um die Qualität der cDNA zu beurteilen.

2.3.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die PCR wurde zur Erzeugung der Zielgen-Fragmente, die kloniert werden sollten und zur Kontrolle der Insertion von Fragmenten in den Zielvektor bzw. zum Test der Insertion von Genen in den stabil transformierten Pflanzen verwendet.

2.3.3.1 Erzeugung der Zielgen-Fragmente

Die Amplifikation der Fragmente zur Klonierung von Genen wurde mit Hilfe der *KOD Hot Start DNA Polymerase* (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Hierbei handelt es sich um eine „high fidelity“ DNA Polymerase mit 3'5'Exonuklease-Aktivität, die eine unspezifische Amplifikation minimiert. Der PCR-Ansatz (Gesamtvolumen 50 µl) bestand aus 5 µl 10x KOD Reaktionspuffer, 3 µl 25 mM MgSO₄, 5 µl dNTPs (je 2 mM), je 1,5 µl *sense* und *antisense* Primer (10 µM), 1 µl *KOD Hot Start DNA Polymerase* (1 U/µl) und 2 µl cDNA sowie 31 µl PCR Wasser. Die für die einzelnen Fragmente verwendeten Primer sind in Tabelle 3 aufgelistet. Für die PCR wurde folgendes Temperaturprogramm verwendet: (1.) Aktivierung der Polymerase für 2 min bei 95 °C, (2.) Denaturierung bei 95 °C für 20 sek, (3.) Primer Anlagerung bei niedrigster Schmelz-temperatur der Primer für 10 sek und (4.) Elongation bei 70 °C für 15 sek (500-1000 bp). Die Schritte 2 bis 4 wurden für 30 Zyklen wiederholt. Das entstandene Produkt wurde durch das *QIAquick PCR Purification Kit* nach Herstellerangaben aufgereinigt (Qiagen, Hilden, Deutschland) und mittels Agarosegelelektrophorese auf Reinheit kontrolliert.

Material und Methoden

Tabelle 3: verwendete Primer für die Klonierung von Genen mittels des Golden Gate Systems. Die Primer wurden mit "geneious" (Geneious version 6.0.5 ; <http://www.geneious.com>, Kearsse *et al.*, 2012) designiert und von Eurofins MWG (Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg, Deutschland) hergestellt.

Primer	Sequenz 5`-3`
IDS1/F1/FW	TTGGTCTCAACATAATGCGGCCGCGTTACAGTCTG
IDS1/F1/RV	TTGGTCTCAACAATAGACGGCGGTTGGACGGTCG
IDS1/F2/FW	TTGGTCTCAACATTCTAAGTTCGATCGCAAGCTCCG
IDS1/F2/RV	TTGGTCTCAACAAGTTCTTAAACTCATCCTTTC
IDS1/F3/FW	TTGGTCTCAACATGAACGAGGACGACGAATTGAG
IDS1/F3/RV	TTGGTCTCAACAAATCGAGTACATCATCCATC
IDS1/F4/FW	TTGGTCTCAACATCGATGAAACCAAATCTTCCGAGG
IDS1/F4/RV(ohne Stopcodon)	TTGGTCTCAACAAAAGCTCCGTTTTGTCTCTTG
IDS6/F1/FW	TTGGTCTCAACATAATGATGGCTACTACTG
IDS6/F1/RV	TTGGTCTCAACAAAGAGAGAGATAAAACGG
IDS6/F2/FW	TTGGTCTCAACATCTCTTCTGCCCTCACCTCAC
IDS6/F2/RV	TTGGTCTCAACAACCTCTCCATATACCTTGTG
IDS6/F3/FW	TTGGTCTCAACATAGAGGACATGGCGGTTTTGG
IDS6/F3/RV(ohne Stopcodon)	TTGGCAGACACAAAAGCGCTTTTGTGAGACCAA
IDS7/F1/FW	TTGGTCTCAACATAATGATGGCTACTACTGTTC
IDS7/F1/RV	TTGGTCTCAACAAAGAGGGAGACAAACCTGTGCG
IDS7/F2/FW	TTGGTCTCAACATCTCTTCTGCCCTCACCTCACAAG
IDS7/F2/RV	TTGGTCTCAACAACCTCTCCATATACCTTGTGGTTGG
IDS7/F3/FW	TTGGTCTCAACATAGAGGACATGGCGGTTTTGGC
IDS7/F3/RV(ohne Stopcodon)	TTGGTCTCAACAAAAGCTCCGTTGTGTCTG
IDS9 /F1/ FW (ohne TP)	TTGGTCTCAACATAATGCTCCAAAAGCGCACCGTTTTG
IDS9 /F1 /FW (mit TP)	TTGGTCTCAACATAATGGCTACTACTCTCAGCTCATCC
IDS9 /F1/ RV	TTGGTCTCAACAACCTCCAAATCTTTATGGTTGG
IDS9 /F2 /FW	TTGGTCTCAACATGGAGAGGACATGGCGGTTTTG
IDS9 /F2 /RV (mit Stopcodon)	TTGGTCTCAACAATCAGTTGTGTCTGCAGGCAATGTAGCTG
IDS9 /F2 /RV (ohne Stopcodon)	TTGGTCTCAACAAAAGCTCCGTTTTGTCTCTTG
IDS9/1-27/RV	TTGGTCTCACGAATTGTTGAATGATGATAGGG
IDS9/1-42/RV	TTGGTCTCACGAATTGATGAGGATAGAGCACAAGAAAG
Promotor IDS9/FW	TTGGTCTCAGCTTCTCCAAAAGCGCACCGTTTTGTGCG
Promotor IDS9/RV	TTGGTCTCACATTACCTTCTCCGATATAATATTATATTAAGTG
IDS10/F1/FW	TTGGTCTCAACATAATGATGGCTAATACTG
IDS10/F1/RV	TTGGTCTCAACAACCTTACGGATCATATAAGAC
IDS10/F2/FW	TTGGTCTCAACATAAAGCCGAATCTGTAAGTATGG
IDS10/F2/RV(ohne Stopcodon)	TTGGTCTCAACAAAAGCTCCGTTGTGTCTG
PSY/ FW	TTGGTCTCAACATAATGTCTTCTTCTGTAGCAGTGTTATGG
PSY/ RV(ohne Stopcodon)	TTGGTCTCAACAAAAGCAATATCGATAGTCTTGAAC

2.3.3.2 Test der Insertion von Zielsequenzen im Vektor oder in stabil transformierten Pflanzen

Für die PCR, die zur Überprüfung der Geninsertion in Plasmiden oder pflanzlicher DNA (aus stabil transformierten *N. tabacum* oder *A. thaliana* Pflanzen) genutzt wurde, wurde der *Dream Taq Green PCR Master Mix* (Thermo Scientific, Darmstadt, Deutschland) genutzt. Der PCR Reaktionsansatz bestand aus 5 µl Green Tag PCR-Mix, 3,5 µl PCR Wasser, je 0,2 µl *sense* und *antisense* Primer (10 µM, Tabelle 4) und 1 µl extrahierter DNA. Die PCR wurde nach dem von der Firma vorgeschriebenem Protokoll durchgeführt. Die PCR Konditionen waren folgende: (1.) Initiale Denaturierung: 95 °C für 3 min, (2.) Denaturierung: 95 °C für 30 sek, (3.) Primeranlagerung :Schmelztemperatur Primer -5 °C, für 30 sek, (4.) Elongation: 72 °C 1 min/kb und (5.) Finale Elongation: 72 °C für 5 min. Die Schritte 2-4 wurde für 30 Zyklen wiederholt. Als DNA *Template* für die PCR zum Test von stabil transformierten Pflanzen diente genomische DNA, die mittels *DNeasy Plant Mini Kits* (Quiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben isoliert wurde.

Tabelle 4: verwendete Primer zur Überprüfung der Insertion der T-DNA in der Salk Linie N769707 oder den stabil transformierten *N. tabacum* Pflanzen. Die Primer wurden mit "geneious" designt und von Eurofins MWG (Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg, Deutschland) hergestellt.

Primer-Name	Sequenz 5'-3'
WT,AtIDS9 FW	GACGAGGCTACTGCCATGTCAG
WT,AtIDS9 RV	CAAAAACGTAATACTAAAATGCAAGC
LB-GKpAC161	ATATTGACCATCATACTCATTGC
Tub5FW	CATCTGCGACGAGCACGGCA
Tub5 RV	GAGGGGCGCAAACCCACCA
Kan FW	ACCCGTGATATTGCTGAAGAG
Kan RV	TCGTCAAGAAGGCGATAGAAG
AtIDS9 FW	GACTGACTTATGTAGCCAAG
AtIDS9 RV	CGCTGCCTCCAACAAGGCGG
AtTPS28 FW	GAGGTCGAAAGCCTCGCTGC
AtTPS28 RV	GAGGTCGAAAGCCTCGCTGC

Material und Methoden

2.3.4 Klonierung von Genen

Da die Klonierung des Zielgens mittels *Golden Gate Systems* (Engler *et al.*, 2014) durchgeführt wurde, wurden zunächst durch Zerlegung der Gensequenz in Fragmente die *BsaI* und *BpiI* Schnittstellen in der Zielsequenz entfernt. Die Erzeugung der Fragmente mittels PCR ist unter 2.3.3.1 beschrieben. Die für die einzelnen Klonierungsschritte verwendeten Konzentrationen an Fragment bzw. Plasmid erfolgte nach den Vorgaben von Engler *et al.*, (2014), genauso wie die verwendeten Enzyme dem Standard *Golden Gate* Klonierungsprotokoll entsprachen (Werner *et al.*, 2012). Hierbei wurde, je nach Klonierungslevel, das Restriktionsenzym *BsaI* (New England Biolabs, Frankfurt a. M., Deutschland) oder *BpiI* (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) sowie die T4 DNA Ligase (Promega, Mannheim, Deutschland) verwendet. Die Isolation der Plasmide aus *E. coli* erfolgte mit Hilfe des *QIAprep Spin Miniprep Kits* (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstelleranweisung.

Im ersten Klonierungsschritt wurden die Fragmente in den Vektor pAGM1311 (Engler *et al.*, 2014) kloniert (Level -1), außer die Gensequenz des AtIDS9 Promotors (mit den für die weitere Klonierung wichtigen Schnittstellen), diese wurde in den pUC18 Vektor (Thermo Fischer Scientific, Darmstadt, Deutschland) kloniert. Für die transiente Expression der 6xHisTag-AtIDS9 in *N. benthamiana* wurde die AtIDS9 Sequenz ohne das putative Transitpeptid (-81 bp laut TargetP, Emanuelsson *et al.*, 2000) kloniert. Anschließend erfolgte die Kontrolle der richtigen Basenabfolge des in dem Vektor befindlichen Fragments durch Sequenzierung (Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg, Deutschland). Im nächsten Klonierungsschritt wurden die einzelnen Fragmente des Zielgens in den Vektor pAGM41308 (Weber *et al.*, 2011) zusammengefügt (Level 0). Dies galt nicht für die Promotorsequenz der AtIDS9. Sie wurde sofort in den Level 1 Vektor pICH7544 kloniert, da sie keine *BsaI* oder *BpiI* Schnittstellen besaß und somit nicht in Fragmente zerlegt werden musste.

Im finalen Klonierungsschritt wurde die Zielgensequenz, zum Beispiel für die Lokalisationsbestimmung an eGFP oder für die heterologe Expression des Zielproteins an einen 6xHisTag, fusioniert. Außerdem wurden in diesem Schritt der jeweilige Promotor und der gewünschte Terminator, in den T-DNA Endvektor pICH75044, kloniert (Level 1). Die Expression der 6xHisTag-AtIDS9 fand unter dem *Actin2* Promotor und dem *Nos* Terminator (pICH41541) statt, die der AtIDS9-eGFP, AtTPS28-mcherry und AtPSY-mCherry unter der Kontrolle des 35S *CaMV* Promotors (pICH51266) und des *Ocs* Terminators (pICH41432). Für die transiente Expression der AtIDS9 bzw. AtTPS28 in *N. benthamiana* wurde ebenfalls der 35S *CaMV* Promotor (pICH51266) und der *Nos*

Terminator (pICH41421) genutzt. Hier war der Endvektor der pICH47732. Für die Erstellung der Konstrukte zur Generierung stabil transformierter *N. tabacum* Pflanzen, wurde folgendermaßen vorgegangen: Der *NtCPS2* oder *CBTS2a* Promotor (mit oder ohne *35S Enhancer*) wurde an die *AtIDS9* oder *AtTPS28* mit dem *CBTS* Terminator in den Vektor pICH47742 (erste Position im Endvektor) bzw. pICH47751 (zweite Position im Endvektor) fusioniert. Das aus dem Tabakmosaikvirus stammende Replikon (*35S Enhancer*; Vektor pICH18722, Marillonnet *et al.*, 2005) wurde in einigen Konstrukten verwendet, um die Amplifikation der RNA bei zusätzlicher Steigerung der Genexpression zu erlauben. Anschließend wurden in einem weiteren Klonierungsschritt diese beiden Konstrukte genutzt, um die Gene *AtIDS9* und *AtTPS28* in einen Vektor (pICH50505) zu klonieren. Bei alleiniger Klonierung der *AtIDS9* wurde das zweite Gen durch einen Linker (pICH41722) ersetzt. Die Klonierung des *AtIDS9* Promotors, fusioniert an das β -*Glucuronidase*gen und den *Nos* Terminator (pICH41421) erfolgte in den Kanamycin- und Basta-Resistenzgen enthaltenen Endvektor pICH45066.

Die zur Klonierung verwendeten Plasmide mit zum Beispiel der jeweiligen Promotor, 5'UTR oder auch Fusionssequenz wurden von der AG Marillonnet, (IPB, Halle Saale) zur Verfügung gestellt und sind in Tabelle 5 aufgelistet.

Tabelle 5: verwendete Plasmide

Plasmid	Funktion	Resistenz	Referenz
Promotor			
pAGT167	<i>35S Enhancer</i> CBTS2a	Spec	
pICH51266	35S CaMV Promotor+ 5'UTR omega TMV	Spec	Engler et al., 2011
pICH41295 / pAGT164	<i>NtCPS2</i> Promotor	Spec	
pAGT166 / pICH41295	<i>CBTS2a</i> Promotor (<i>ohne 35S Enhancer</i>)	Spec	
pICH50581	Act2 (Actin 2)/At3g18780	Spec	
5'UTR			
pAGM3981	5'UTR	Spec	
Fusionssequenzen			
pAGT279	GFP	Spec	
pAGM7692	6xHis-Tag	Spec	
pAGT1234	mCherry	Spec	
Kodierende Sequenzen (CDS)			
pICH75111	GUS / β - <i>Glucuronidase</i>	Amp	Engler et al., 2014
pICH67131	<i>Kanamycin</i> Resistenzgen	Spec	
pAGT1642	<i>AtIDS9/C110S/C114S</i>	Amp	

Material und Methoden

Plasmid	Funktion	Resistenz	Referenz
Terminator (T)			
pAGT168	CBTS Terminator	Spec	
pICH41421	3'UTR, Polyadenylierungssignal/Terminator, <i>Nos</i> (<i>A. tumefaciens</i>)	Spec	
pICH41541	<i>Nos</i> Terminator	Spec	
pICH41432	3'UTR, Polyadenylierungssignal/Terminator, <i>Ocs</i> (<i>A. tumefaciens</i>)	Spec	
Leervektoren			
pAGM1287	Level 0	Spec	Weber <i>et al.</i> , 2011
pICH75044	Level 1, Binärer T-DNA Vektor	Amp	Engler <i>et al.</i> , 2014
pICH50505	Level 2, Binärer T-DNA Vektor	Kan	Weber <i>et al.</i> , 2011
pICH45066	Level 2, Binärer T-DNA Vektor	Kan	
pICH47732	Level 1, Position 1	Amp	Weber <i>et al.</i> , 2011
pICH47742	Level 1, Position 2	Amp	Weber <i>et al.</i> , 2011
pICH47751	Level 1, Position 3	Amp	Weber <i>et al.</i> , 2011
Linker			
pICH41722	Level 2 End Linker Position 1	Spec	
pICH41744	Level 2 End Linker Position 2	Spec	
pICH41766	Level 2 End Linker Position 3	Spec	
pICH50872	Level M End Linker Position 1	Amp	

2.3.5 Verdau von DNA mit Restriktions-Endonukleasen

Der Restriktionsansatz zur Überprüfung der klonierten Konstrukte bestand aus 16 µl Nuklease freiem Wasser, 2 µl 10x Puffer, 1 µl DNA (~100 ng/µl) und 0,5 µl *BpiI* (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) oder *BsaI* (New England Biolabs, Frankfurt a. M., Deutschland). Dieser Ansatz wurde für eine Stunde bei 37 °C inkubiert, bevor 2 µl dieses Ansatzes auf einem 1% (w/v) Agarose-Gel analysiert wurden.

2.3.6 Transformation von Plasmid-DNA in Agrobakterien

Die Transformation des Zielplasmids in den Agrobakterienstamm GV3101::pMP90 erfolgte mittels Elektroporation (Koncz *et al.*, 1986). Hierfür wurden 2 µl Plasmid (15 µg/µl) auf 50 µl Agrobakterien gegeben. Dieser Ansatz wurde in eine Transformationsküvette überführt und mittels Elektroporation (BioRad Micro Pulser 411BR, Kalifornien, Vereinigte Staaten) bei 25 µF, 2,5 kV und 200 Ω transformiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1 ml LB Medium zu den Zellen, bevor sie für 2-3 Stunden bei 28 °C unter ständigem Schütteln inkubiert wurden. Dann wurde ein Verdünnungsausstrich aus 5 µl dieses Ansatzes auf LB-Agar Platten, die die Agrobakterien- und Vektor-spezifischen Antibiotika Rifampicin (25 µg/ml), Gentamycin (50 µg/ml) und Carbenicillin (50 µg/ml) enthielten, angefertigt. Die Zellen wuchsen für 2-3 Tage bei 28 °C. Die Selektion von positiv transformierten Kolonien erfolgte über PCR (3.3.3.2).

2.3.7 Generierung transgener Pflanzen

2.3.7.1 *Arabidopsis thaliana*

Um zu analysieren, in welchen Pflanzenorganen der putative Promotor der *AtIDS9* aktiv ist, wurde ein Konstrukt genutzt, das 1,2 kb dieses Promotors an das Gen β -Glucuronidase (*gus*) fusioniert und für die spätere Selektion positiv transformierter Pflanzen das *bar*-Gen (kodiert für eine Phosphinotricin-Acetyltransferase) für die BASTA Resistenz enthielt, genauso wie das *kan* (*nptII*-Gen) Resistenzgen für die Bestimmung der Anzahl der Insertionen (pAGT1119). Die Klonierung dieses Konstruktes, welches diese eben genannten Sequenzen enthält, erfolgte mit dem unter 2.3.4 beschriebenen *Golden Gate* Klonierungssystem. Der Zielvektor war pICH45066. Nach der Fertigstellung des Zielvektors wurde dieser in den Agrobakterienstamm GV3101::pMP90, wie unter 2.3.6 beschrieben, transformiert und positive Kolonien selektiert.

Die stabile Transformation von *A. thaliana* Pflanzen erfolgte nach dem von Clough und Bent (1998) beschriebenen Protokoll. Hierfür wurde von einer positiven Agrobakterienkolonie eine 5 ml Vorkultur, bestehend aus 5 ml LB-Medium mit Rifampicin (25 μ g/ml), Gentamycin (50 μ g/ml) und Carbenicillin (50 μ g/ml) angelegt, die bei 28 °C über Nacht unter ständigem Schütteln angezogen wurde. Diese gesamte Kultur wurde am darauffolgenden Tag genutzt, um die Hauptkultur, die aus 100 ml LB-Medium und dem oben genannten Antibiotika bestand, anzusetzen. Diese wuchs für 24 h und wurde dann für 20 min bei 5000 x g bei 4 °C geerntet. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet in einer Lösung, die 5% (w/v) Saccharose mit 0,05% (w/v) Silvet L77 enthielt, resuspendiert. Hierbei wurde eine OD_{600nm} von 0,8 eingestellt.

Für die stabile Transformation wurden pro Konstrukt 24 *A. thaliana* Pflanzen verwendet. Die Anzucht der Pflanzen erfolgte wie im vorherigen Text beschrieben (2.1). Es wurden je fünf Pflanzen pro Topf (Durchmesser 12 cm) gepflanzt. Der primäre Blütenstand wurde entfernt, um das Austreiben sekundärer Infloreszenzen zu fördern. Sobald die sekundären Blütenstände eine Höhe von etwa 2-10 cm erreichten (nach ungefähr einer Woche), waren die Pflanzen zur Transformation bereit. Diese *A. thaliana* (col-0) Pflanzen wurden für 30 sek kopfüber in diese Lösung getaucht und mit Papiertüten abgedeckt, um sie dann über Nacht im Dunkeln zu lagern. Im nächsten Schritt wurden die Pflanzen unter Standardanzuchtbedingungen gehalten (2.1), bis sie Schoten bildeten. Die aus den transformierten Pflanzen gewonnenen Samen wurden auf Erde ausgesät und nach der Keimung unmittelbar mit einer 1:5000 Verdünnung einer Glufosinat-Lösung (Stammlösung 200 g/L Glufosinat-Ammonium; Bayer Crop Science, Monheim, Deutschland) besprüht. Die positiv

Material und Methoden

transformierten Pflanzen wuchsen im Gegensatz zu nicht-transformierten Pflanzen weiter. Diese Pflanzen wurden nach einer Woche vereinzelt. Um die Pflanzen auf eine positive stabile Transformation zu testen, wurde mittels PCR die Insertion des Kanamycin-Resistenzgens ermittelt.

2.3.7.2 *Nicotiana tabacum*

Die stabile Transformation von *N. tabacum* (3H02; besitzt keine funktionelle *NtCPS2* und *NtCBTS* und produziert dadurch keine Diterpene) wurde zum einen genutzt, um zu analysieren, ob die Überexpression der *AtIDS9* bzw. der *AtIDS9* und der *AtTPS28* einen Phänotyp aufzeigt oder nicht. Dabei wurde die *AtIDS9* unter dem *CBTS2a* Promotor (mit und ohne *35S Enhancer*) und *CBTS2a* Terminator exprimiert, während die *AtTPS28* unter dem *NtCPS2* Promotor und *CBTS2a* Terminator exprimiert wurde. Zur Selektion positiv transformierter Pflanzen besaß der Zielvektor pICH50505 eine Kanamycin-Resistenz. Zum anderen wurde die Aktivität des *CBTS2a* Promotors durch stabil transformierte Pflanzen analysiert. Diese Pflanzen exprimierten das *gus* Gen konstitutiv unter Kontrolle des *CBTS2a* Promotors und des *GCRP* Terminators. Hierfür wurden die eben genannten Elemente ebenfalls in den Kanamycin-Resistenzgen besitzenden pICH50505 Vektor kloniert. Die Klonierung der Konstrukte erfolgte, wie unter 2.3.4 beschrieben, nach dem *Golden Gate System*, genau wie die unter 2.3.6 beschriebene Transformation der Plasmide in den Agrobakterienstamm GV3101::pMP90.

Mit Hilfe einer positiven Agrobakterienkultur wurde eine 5 ml Vorkultur (5 ml LB-Medium, Rifampicin 25 µg/ml, Gentamycin 50 µg/ml und Kanamycin 50 µg/ml), die bei 28 °C unter ständigem Schütteln über Nacht angezogen wurde, angelegt. Am nächsten Tag wurde 1 ml dieser Kultur genutzt, um eine 50 ml Hauptkultur (50 ml LB-Medium, Rifampicin 25 µg/ml, Gentamycin 50 µg/ml und Kanamycin 50 µg/ml) anzulegen. Diese wuchs unter den gleichen Bedingungen wie die Vorkultur. Nach 24 Stunden wurde von der Kultur das Volumen geerntet (5000 x g, 4 °C für 30 min), was für eine finale Suspension mit einem Endvolumen von 50 ml und einer $OD_{600nm} = 0,5$ benötigt wurde. Der Überstand wurde verworfen, und das Pellet wurde in 25 ml 2x Infiltrationsmedium [10% (w/v) Saccharose; 10 mM Glukose; 8,6 g/l Murashige & Skoog basaler Salz Mix (pH 5,6)], 12,5 ml sterilem bidest Wasser, 12,5 ml LB-Medium und 20 µM Acetosyringon resuspendiert. Diese Suspension wurde für 20 min auf ausgestanzte *N. tabacum* Blattscheiben, mit einem Durchmesser von 1,3 cm, gegeben. Danach wurde überschüssige Suspension durch Abtupfen der Blattscheiben auf sterilem Filterpapier entfernt und die Blattscheiben auf

sterilem Kallus-Medium [3% (w/v) Saccharose; 0,6% (w/v) Pflanzen Agar (Duchefa, Biochemie, Haarlem, Niederlande); 4,4 g/l Murashige & Skoog mit Vitaminen (M0222, Duchefa, Biochemie, Haarlem, Niederlande), pH 5,6; 1 mg/l BAP; 1 mg/l NES] für 2 Tage inkubiert. Im nächsten Schritt wurden die Agrobakterien durch Hinzugabe von Antibiotika (100 µg/ml Carbenicillin, 100 µg/ml Kanamycin) zum Kallus-Medium von den Blattscheiben entfernt. Die Blattscheiben wurden wöchentlich auf neue Platten transferiert, bis eine Kallusbildung sichtbar war. Nach der Bildung der Kalli wurden diese von den Blattscheiben entfernt und einzeln auf dem Spross-Medium [3% (w/v) Saccharose; 0,6% (w/v) Pflanzen Agar (Duchefa); 4,4 g/l Murashige & Skoog mit Vitaminen (M0222, Duchefa, Biochemie, Haarlem, Niederlande), pH 5,6; 0,5 mg/l Zeatin; 100 µg/ml Carbenicillin; 100 µg/ml Kanamycin] kultiviert. Auch hier erfolgte eine wöchentliche Umsetzung auf neue Platten bis die ersten Blätter erkennbar waren. Dann wurde durch die weitere Verwendung des Wachstums-Mediums [3% (w/v) Saccharose; 0,6% (w/v) Pflanzen Agar (Duchefa Biochemie, Haarlem, Niederlande); 4,4 g/l Murashige & Skoog mit Vitaminen (M0222, Duchefa, Biochemie, Haarlem, Niederlande), pH 5,6; 0,05 mg/l IES; 0,1 mg/l Kinetin; 100 µg/ml Carbenicillin; 100 µg/ml Kanamycin] die Wurzelbildung der jungen Pflanzen gefördert. Sobald die Pflanzen eine gut ausgebildete Wurzel und Blätter besaßen, wurden sie auf Erde gesetzt. Anschließend wurden sie im Gewächshaus weiter kultiviert, bis sich Samen ernten ließen. Die Selektion positiver Pflanzen erfolgte mittels Kanamycin spezifischer Primer durch PCR (2.3.3.2).

2.3.8 Bestimmung der Anzahl der Insertionen in stabil transformierten Pflanzen

2.3.8.1 mittels quantitativer PCR (qPCR)

Die Charakterisierung der transgenen *N. tabacum* Pflanzen erfolgte mittels qPCR. Hierzu wurde gDNA nach Herstelleranweisung mit Hilfe des *DNeasy Plant Mini Kits* (Qiagen, Hilden, Deutschland) isoliert. Anschließend wurde eine quantitative Echtzeit-PCR (qPCR) mittels *CFX Connex Real-Time PCR System* (Biorad, Hercules, Kalifornien) durchgeführt und die Anzahl der Insertionen nach Yang *et al.*, (2005) bestimmt. Für die qPCR wurde *5x QPCR Mix EvaGreen* (kein ROX; Bio & Sell GmbH, Feucht, Deutschland) verwendet. Als Referenzgen wurde der Elongationsfaktor 1- alpha aus *N. tabacum* genutzt (Produkt 131 bp) und als Proben-Gen die AtIDS9 (Produkt 107 bp). Die verwendeten Primer sind in Tabelle 6 aufgelistet. Die Konzentration an eingesetzter genomischer DNA betrug 10 ng/µl bei einem finalen Probenvolumen von 20 µl. Das Temperaturprogramm setzte sich aus

Material und Methoden

Initialisierung (95 °C, 15 min), Denaturierung (95 °C, 15 sek) und Elongation (60 °C, 30 sek) zusammen (50 Zyklen). Für diese Bestimmung wurden je Pflanze zwei technische und zwei biologische Replikate angefertigt.

Tabelle 6: verwendete Primer für qPCR. Die Primer wurden mit "geneious" designt und von Eurofins MWG (Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg, Deutschland) hergestellt.

Primer-Name	Sequenz 5`-3`
NtEF 1alpha FW	TACCACCCCCAAGTATTCCA
NtEF 1alpha RW	TGTTGTCACCTTCCAAACCA
AtIDS9 FW qPCR	ACGGAGGTCGGCATCGTCCA
AtIDS9 RV qPCR	GTGGCGACGAGGCTACTGCC

2.3.8.2 mittels Keimungs-Assay

Hierfür wurden ca. 300 sterile *N. tabacum* Samen auf Agar mit Kanamycin (50 µg/ml) ausgesät und in der Phytokammer angezogen (2.1). Nach ca. 10 Tagen wurde die Anzahl der gekeimten und nicht gekeimten Pflanzen durch Auszählen bestimmt. Für Pflanzen, in denen das Zielgen nur einmal eingebaut wurde, wurde bei der Folgegeneration ein Verhältnis von resistenten zu sensitiven Pflanzen von 3:1 (75% : 25%) erwartet. Wäre das Zielgen zweimal im Genom eingebaut worden, würde ein Segretationsverhältnis von 15:1 (93,75% : 6,25%) erwartet werden. Die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von drei Integrationsverhältnissen wurde nicht mit in die Betrachtung einbezogen.

2.3.9 Bestimmung der Wurzellänge

Zur phänotypischen Charakterisierung der *AtIDS9* T-DNA Insertionslinie (Salk N769707) wurde die Länge der Wurzeln bestimmt. Hierfür wurden homozygote Pflanzen [T2-Generation, PCR (2.3.3.2)] verwendet. Als Kontrolle wurden Pflanzen, die in der T1 Generation keine T-DNA Insertion besaßen (WT-Pflanzen) genutzt. Es wurde je 15 Vertikalplatten mit T-DNA Insertionsmutante bzw. Kontrollpflanzen verwendet. Auf jeder Platte wurden 6 Pflanzen auf Agar angezogen. Die Anzucht geschah wie unter 2.1 beschrieben. Ab dem zweiten Tag nach dem Keimen wurden Fotos von den Pflanzen aufgenommen. Dies geschah dann jeden zweiten Tag zur gleichen Uhrzeit, bis die Pflanzen 10 Tage alt waren. Anschließend wurde mit Hilfe des Computerprogramms „rootDetection 0.1.2“ (<http://www.labutills.de>) die Wurzellänge bestimmt. Der Versuch wurde dreimal durchgeführt. Zur statistischen Auswertung wurde Exel genutzt. Es wurde für jeden Tag ein studentscher t-Test (Matrix1;Matrix2;2;2) durchgeführt.

Tabelle 7: T-DNA-Insertionslinie die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde.

Zielgen	Organismus	Ort der Insertion	Herkunft / Referenz	Resistenz
AtIDS9 (At3g29430)	<i>A. thaliana</i> (Col-0)	T-DNA-Insertion im 3'UTR Bereich	Salk N769707	Sulfadiazin

2.3.10 Behandlung der Pflanzen mit GA3

Um zu ermitteln, ob der Phänotyp der generierten transgenen *N. tabacum* Pflanzen die die *AtIDS9* überexprimieren durch einen verringerten Gehalt an Gibberellinsäuren hervorgerufen wurde, wurden Pflanzen mit bzw. ohne GA3 auf mit Agar gefüllten Vertikalplatten behandelt. Auf jeder Platte wurden je 6 Pflanzen angezogen. Es wurden je 15 Vertikalplatten mit *AtIDS9* überexprimierenden Pflanzen und Kontrollpflanzen angefertigt. Dem Agar wurden 60 µM GA3, welches in 10% (w/v) Ethanol gelöst wurde, zugesetzt. Nach 2 Wochen wurden Fotos von den Pflanzen gemacht und mit Hilfe des Computerprogramms „rootDetection 0.1.2“ (<http://www.labutills.de>) wurde die Länge der Wurzeln bestimmt. Außerdem wurde ihr Frischgewicht durch Wiegen der Pflanzen ermittelt. Das Experiment wurde dreimal durchgeführt.

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Transiente Expression von Proteinen in *N. benthamiana*

Das Zielkonstrukt wurde im ersten Schritt in den Agrobakterienstamm GV3101::pMP90 mit Hilfe von Elektroporation eingebracht (2.3.6). Nach Test der erfolgreichen Transformation durch PCR (2.3.3.2) wurde eine positive Kolonie zum Animpfen einer Vorkultur, die aus 5 ml LB-Medium, Rifampicin (25 µg/ml), Gentamycin (50 µg/ml) und Carbenicillin (50 µg/ml) bestand, genutzt. Von dieser Vorkultur wurden 5 ml verwendet, um eine Hauptkultur von 50 ml anzulegen. Beide Kulturen wuchsen bei 28 °C unter Schütteln (180 rpm) für je 16 Stunden.

Im nächsten Schritt wurde die Kultur für die Infiltration in *N. benthamiana* vorbereitet. Dafür wurde die OD_{600nm} der Kultur bestimmt und ermittelt, welches Volumen an Kultur benötigt wird, um eine 20 ml Kultur mit OD_{600nm} = 0,5 herzustellen. Diese Menge an Hauptkultur wurde dann bei 5000 x g, 4 °C für 30 min abzentrifugiert. Wenn zwei Konstrukte koinfiltriert wurden, dann wurde von beiden Kulturen separat das Volumen bestimmt, was für eine 20 ml Kultur mit einer OD_{600nm} = 0,5 benötigt wurde. Die beiden Kulturen wurden gemischt und dann erst zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 5 ml LB-Medium durch Schwenken vorsichtig resuspendiert, die Kultur mit 10 ml 2x

Material und Methoden

Infiltrationsmedium [10% (w/v) Saccharose, 20 mM Glukose, 8,6 g/l Murashige & Skoog basaler Salz Mix (pH 5,6)] versetzt und mit 5 ml bidest Wasser aufgefüllt. Im finalen Schritt wurde die Bakteriensuspension in die äußere (abaxiale) Seite der Blätter von 3-4 Wochen alten *N. benthamiana* Pflanzen mit Hilfe einer Spritze (1 ml) infiltriert.

Die Pflanzen die die 6xHisTag-AtIDS9 exprimieren wurden nach der Infiltration für 6 Tage im Gewächshaus unter Standard-Anzuchtbedingungen gehalten. Nach Ablauf der 6 Tage wurden die infiltrierten Blätter geerntet und sofort in flüssigen Stickstoff eingefroren, um sie bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung zu lagern. Die konfokalmikroskopische Analyse der Fusionsproteine erfolgte dagegen am dritten Tag nach der Infiltration, genauso wie die Analyse der Produkte der transienten Assays .

2.4.2 Aufreinigung der 6xHisTag-AtIDS9 mittels Immobilisierter-Affinitätschromatographie (IMAC)

Die 6xHisTag-AtIDS9 wurde mittels Ni-NTA aus *N. benthamiana* Blättern aufgereinigt. Hierfür wurden die infiltrierten Blätter (2.4.1) unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff gemörsert. Anschließend wurden auf 300 mg Pflanzenmaterial 0,9 ml Extraktionspuffer [50 mM NaH₂PO₄ (pH 7,0), 1 mM β- Mercaptoethanol, 10 mM EDTA] gegeben. Danach wurde die Probe durch Vortexen durchmischt und für 5 min auf Eis inkubiert. Im nächsten Schritt wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation bei 13000 x g, 4 °C für 15 min präzipitiert. Das Zellpellet wurde verworfen während der Überstand mit Hilfe einer Spritze (1 ml) auf eine Ni-NTA Säule (*HisTrap FF crude* 1 ml, GE Healthcare, Little Chalfont, Vereinigtes Königreich) geladen wurde. Nach dem Durchlaufen des Überstandes wurde die Säule mit 3 ml Waschpuffer [50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol (pH 8,0/ NaOH)] gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Im letzten Schritt wurde das Zielprotein mit 4 ml Elutionspuffer [50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol (pH8,0/ NaOH)] von der Ni-NTA Säule eluiert.

Um das eluierte Protein für Aktivitätsassays verwenden zu können, musste anschließend das Imidazol, welches der Elutionspuffer enthält, entfernt werden. Dies geschah mit Hilfe von PD10 Säulen (1-2,5 ml Volumen, GE Healthcare, Little Chalfont, Vereinigtes Königreich) laut Herstelleranweisung. Zuerst wurde die Säule mit dem Zielpuffer (Assaypuffer/siehe 2.4.7.1) äquilibriert. Nachdem die Probe auf 2,5 ml mit Assaypuffer aufgefüllt wurde, wurde sie auf die Säule gegeben. Anschließend wurde das Protein durch die Hinzugabe von 3,5 ml Assaypuffer eluiert. Die Aufkonzentration des Proteins erfolgte dann durch Amicon 10 kDa Filter (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte

Staaten). Die Konzentration des aufgereinigten Proteins wurde mittels Bradford Test bestimmt (2.4.3). Die Reinheit des Proteins konnte an Hand des Coomassie gefärbten SDS-Gels beurteilt werden (2. 4.4).

2.4.3 Quantifizierung des Proteingehaltes

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der heterologen 6xHisTag-AtIDS9 erfolgte photometrisch mittels Bradford Test (Bradford, 1976) am Beckman coulter DU 800 UV/Vis Spektro-photometer (Krefeld, Deutschland). Die gemessene Absorption bei 595 nm des Leerwertes (1 ml Bradford-Reagenz) wurde von der Absorption der Probe [995 µl Bradford-Reagenz (BioRad Laboratories, München, Deutschland) + 5 µl Proteinlösung] abgezogen und an Hand der mit BSA erstellten Eichgeraden konnte anschließend die Konzentration an Protein bestimmt werden.

2.4.4 SDS-Gelelektrophorese

Für die Überprüfung der Reinheit der aufgereinigten Proteine wurde eine denaturierende diskontinuierliche Gelelektrophorese (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) durchgeführt. Hierfür wurde eine BioRad Apparatur (PowerPac Basic Power Supply, München, Deutschland) verwendet. Nach dem Aufbau der Apparatur wurde zunächst ein Trenngel (12% ig; Tabelle 8) gegossen und mit Isopropanol überschichtet, um einen gleichmäßigen Abschluss des Gels zu erhalten. Nach dem Auspolymerisieren des Trenngels wurde das Isopropanol entfernt und das Sammelgel (Tabelle 8) gegossen. Die Proben wurden mit dem gleichen Volumen 5x Probenpuffer [250 mM Tris; 10% SDS; 0,5% Bromphenolblau (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland); 50% Glycerol; bei 50 °C lösen] versetzt. Bei dem Experiment, indem die mögliche Dimerisierung der AtIDS9 im SDS-Gel näher analysiert wurde, wurde zum Probenpuffer zusätzlich 5% β-Mercaptoethanol hinzugefügt. Nach dem Durchmischen der Proben mit dem Probenpuffer wurden die Proben für 1 min bei 95 °C erhitzt und erst nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur auf das Gel geladen. Die Laufzeit des Gels lag bei ca. 30 min mit 20 mA pro Gel und dann weitere 90 min mit 60 mA pro Gel.

Material und Methoden

Tabelle 8: Zusammensetzung des Sammel- und des Trenngels der SDS-Page

1x Sammelgel:		1x Trenngel (12%):	
0,5 M Tris/HCL (pH 6,8)	500 µl	1,5 M Tris/HCL (pH 8,8)	1,25 ml
H ₂ O	1,6 ml	H ₂ O	2,2 ml
Acrylamid (37,5 : 1) 40%	200 µl	Acrylamid (37,5 : 1) 40%	1,5 ml
10% (w/v) SDS	20 µl	10% (w/v) SDS	50 µl
10% (w/v) APS	20 µl	10% (w/v) APS	50 µl
TEMED	5 µl	TEMED	5 µl

Tabelle 9: Zusammensetzung des Laufpuffers

10x Laufpuffer	
Tris	250 mM
Glycin	2 M
SDS	1% (w/v)
ad bidest. Wasser	

2.4.5 Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen

Um die Proteine, die mit Hilfe der Gelelektrophorese aufgetrennt wurden, sichtbar zu machen, wurden die Gele mit Coomassie-Brilliant-Blau angefärbt. Hierfür wurden die Gele für 20-30 min in einer Lösung aus 45% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure, 0,25% (w/v) und Coomassie-Brillant-Blau G250 (Serva Blue G, Elektrophoresis GmbH, Heidelberg Deutschland) unter ständigem Schütteln inkubiert. Anschließend erfolgte die Entfärbung des Gels mit einer Entfärbelösung aus 10% (v/v) Essigsäure und 30% (v/v) Methanol. Die Dokumentation der Gele erfolgte an einem Fusion FX7 (Vilber, Eberhardzell, Deutschland).

2.4.6 Westernblotanalyse

Der Nachweis der aufgereinigten 6xHisTag-AtIDS9 erfolgte mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers durch Westernblots. Hierfür wurde die Trans-Blot Turbo Apparatur (Bio Rad, München, Deutschland) verwendet, durch deren Hilfe die Proteine mittels des *Semidry-Blotting* Verfahrens aus dem Gel auf die Blotmembran übertragen wurden. Zur Vorbereitung des *Blots* wurden das Whatmann-Papier (Thermo Scientific, Rockford, U.S.A), das Gel und die vorher mit Methanol gewaschene PVDF-Membran (Roche, Mannheim, Deutschland) in Transferblotpuffer (Tabelle 10) inkubiert. Anschließend wurde der Blot in folgender Reihenfolge luftblasenfrei zusammengebaut: Whatman Papier, PVDF-Membran, Gel, Whatman-Papier. Der Proteintransfer erfolgt bei 25 V mit 1,0 A für 30 min. Nach dem Entfernen der PVDF-Membran, auf der sich nach dem *Blotten* die Proteine befinden, wurde die Membran für 1 Stunde in 10 ml Westernblotpuffer (Tabelle 10) inkubiert. Anschließend wurde zu dem Westernblotpuffer der Anti-His6-Peroxidase Antikörper im Verhältnis 1:10.000 gegeben und ebenfalls 1 Stunde oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Entfernung nicht gebundener Antikörper erfolgte durch dreimaliges Waschen der Membran mit je 15 ml Westernblotpuffer für 10 min. Anschließend wurde die Membran ebenfalls dreimal für 10 min mit 1x PBS Puffer (Tabelle 10) gewaschen. Im finalen Schritt wurde die Membran mit bidest Wasser gespült, um überschüssige Salze des PBS Puffers zu entfernen. Nach dem Trocknen der Membran erfolgte die Detektion des Zielproteins. Dies wurde mit Hilfe des *ECL Prime Western Blotting Detection Reagent Kits* (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) laut dem beigefügten Protokoll durchgeführt. Die Detektion der 6xHisTag-AtIDS9 basiert auf der Oxidation von Luminol durch die an den Antikörper gebundene Peroxidase. Durch diese Oxidationsreaktion wird Licht emittiert, das mit Hilfe der Fusion FX7 der Firma Vilber (Eberhardzell, Deutschland, Programm Chemilumineszens) detektiert wurde.

Tabelle 10: Für den Westernblot verwendete Puffer

1x PBS (1 l)		Transferblotpuffer (1 l):		Westernblotpuffer (100 ml)	
KCL	0,2 g	Tris	25 mM, pH 8,3	Tween 20	0,1% (w/v)
KH ₂ PO ₄	0,2 g	Glycerin	192 mM	Milchpulver (Bio Rad)	5% (w/v)
Na ₂ HPO ₄	1,15 g	Methanol	20% (v/v)	ad 1x PBS	
NaCl	8 g	ad bidest. Wsser			
ad bidest. Wasser					

Material und Methoden

2.4.7 *In vitro* Assay der AtIDS9

2.4.7.1 Nachweis der Aktivität der AtIDS9

Die katalytische Aktivität der AtIDS9 wurde durch die Messung der Produkte GFDP und GGDP nachgewiesen. Der Assay-Mix bestand aus dem Assaypuffer [25 mM MOPSO Puffer (pH 7,5); 2 mM MgCL₂; 10% (v/v) Glycerol], 50 µM IDP, 50 µM DMADP und 1 µg heterolog exprimierte 6xHisTag-AtIDS9. Das finale Volumen des Assays betrug 200 µl. Die Reaktion wurde bei 37 °C für 10 min unter ständigem Schütteln durchgeführt und durch Einfrieren der Probe in flüssigem Stickstoff gestoppt. Die Aktivität des Enzyms wurde durch drei unabhängige Ansätze bestätigt. Die Analyse des Produktes erfolgte wie unter 2.7.1 beschrieben mit Hilfe der LC/MS.

2.4.7.2 Test verschiedener Substrate der AtIDS9

Bei dem Test möglicher Substrate betrug die Menge an DMADP, GDP, FDP oder GGDP konstant 50 µM, wohingegen die Menge an IDP je nach Kettenverlängerung entsprechend angepasst wurde (50-200 µM). Das finale Volumen des *in vitro* Assays lag auch hier bei 200 µl. Je Substrat wurden drei unabhängige Proben angefertigt. Die Parameter und Analysemethoden waren die selben, wie bei dem im vorherigen Text beschriebenen Aktivitätsassay.

2.4.7.3 Bestimmung des pH-Optimums der AtIDS9

Die Bestimmung des pH-Optimums wurde mit Hilfe eines *in vitro* Assays, bei dem GGDP (50 µM) und IDP (150 µM bzw. 50 µM) verwendet wurden, durchgeführt. Die Reaktion fand bei 20 °C für 20 sek statt. Der pH-Wert des Assaypuffers variierte zwischen 4,5 und 9,8. Die Proben wurden in Triplikaten angefertigt und mittels LC/MS analysiert.

2.4.7.4 Bestimmung des zeitlichen Verlaufs der kinetischen Reaktion der AtIDS9

Der zeitliche Verlauf der kinetischen Reaktion der AtIDS9 mit dem Substrat DMADP (25 µM) bzw. GGDP (25 µM) und IDP (150 µM) fand bei einem pH-Wert von 7,5 und 20 °C mit 1 µg Protein pro 200 µl Assayvolumen unter ständigem Rühren der Probe statt. Das Gesamtvolumen des Assays betrug 5 ml. Der Anstieg der Konzentration an GFDP wurde im Zeitraum zwischen 0 und 500 sek bestimmt, indem für die ersten 260 sek alle 20 sek und ab der 300sten sek alle 100 sek eine Probe genommen wurde. Auch hier wurden für alle Proben Triplikate angefertigt und mittels LC/MS analysiert.

2.4.8 Kinetische Charakterisierung der AtIDS9

Um die apparenten *in vitro* Km-Werte zu bestimmen, wurden die Konzentrationen der Substrate DMADP (0-100 μ M), GDP (0-50 μ M), FDP (0-50 μ M) oder GGDP (0-50 μ M), bei konstanter Konzentration an IDP (50 μ M) variiert. Ebenso wurde die Konzentration an IDP (0-50 μ M), bei konstanter Konzentration an GGDP (50 μ M) variiert. Die Menge an Enzym betrug in jedem Assay 1 μ g in einem finalen Volumen von 200 μ l. Die Inkubation wurde mit dem in 2.4.7.1 beschriebenen Assaypuffer bei 20 °C für 20 sek durchgeführt. Anschließend wurde die Reaktion durch sofortiges Einfrieren der Probe in flüssigem Stickstoff gestoppt. Die katalytische Aktivität der AtIDS9 wurde durch die Messung der Bildung von GFDP mittels LC/MS ermittelt. Hierzu wurde eine GFDP-Eichgerade mit authentischem Standard angefertigt. Die apparenten *in vitro* Km-Werte für jedes getestete Substrat wurden durch den *Fit* der Daten in ein Lineweaver-Burk-Diagramm erhalten. Die Auswertung erfolgte mittels Microsoft-Excel (Version 2010). Für alle Messpunkte, die für die Bestimmung der Km-Werte benötigt wurden, wurden drei voneinander unabhängige Replikate angefertigt.

2.4.9 Deglykosylierung der AtIDS9

Die Deglykosylierung der AtIDS9 mit der Endo H (New England Biolabs, Deutschland, Frankfurt) bewirkt eine Entfernung von mannosereichen N-Glykanen von Glykoproteinen. Die Behandlung fand nach Herstelleranweisung statt. Es wurden je 6 μ g Protein für zwei Stunden bei 37 °C behandelt und mittels SDS-Page analysiert.

2.5 Mikroskopische Methoden

2.5.1 Beschichtung von Objektträgern mit Poly-L-Lysin

Die Schnitte der GUS gefärbten *A. thaliana* Wurzeln wurden vor dem Mikroskopieren auf Poly-L-Lysin Objektträgern fixiert. Für die Beschichtung der Objektträger (Superfrost-PlusTM, Roth, Karlsruhe) wurden 60 μ l einer 0,1% igen Poly-L-Lysinlösung (Sigma) auf einen Bereich des Objektträgers gegeben. Anschließend wurde ein zweiter Objektträger auf den Ersten gegeben, so dass sich die Poly-L-Lysinlösung gleichmäßig und blasenfrei auf beide Objektträger verteilte. Diese Objektträgerpaare wurden dann 30 min bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die Objektträgerpaare mit Hilfe von dest. Wasser vorsichtig voneinander getrennt und anschließend 3 mal für 5 min mit dest. Wasser gespült. Nach dem Waschen wurde das Wasser von den Objektträgern durch Aufrechtstellen entfernt und die Objektträger zur Trocknung über Nacht bei

Material und Methoden

Raumtemperatur in staubfreier Umgebung gelagert. Anschließend wurden die beschichteten Objektträger bei -20 °C aufbewahrt und vor Gebrauch für 30 min bei 37 °C getrocknet.

2.5.2 GUS Färbung

Diese Methode wurde zur optischen Analyse der Aktivität des *AtIDS9* Promotors (in stabil transformierten *A. thaliana* Pflanzen) und des *CBTS2a* Promotors (in stabil transformierten *N. tabacum* Pflanzen) genutzt. Beide Promotoren wurden hierfür an das β -Glukuronidase Gen fusioniert (2.3.4 und 2.3.7). Für die GUS Färbung wurden fünf und zehn Tage alte, auf MS-Medium angezogene, *A. thaliana* (Col-0) Pflanzen und die Blattscheiben (\varnothing 9 mm) von stabil transformierten, vier Wochen alten, *N. tabacum* Pflanzen verwendet. Zur optischen Detektion der β -Glucuronidase Aktivität wurden auf je fünf *A. thaliana* Pflanzen bzw. zehn *N. tabacum* Blattscheiben 8 ml Färbelösung geben (Tabelle 11). Anschließend erfolgte mittels Exsikkators ein Infiltrationsschritt (viermal je 2 min) und die Lagerung des Pflanzenmaterials in der Färbelösung über Nacht bei 37 °C. Am nächsten Tag wurde die Lösung entfernt. Anschließend wurden die Pflanzen entweder direkt mikroskopiert oder wie in 2.5.3 beschrieben in PEG eingebettet.

Tabelle 11: Zusammensetzung der x-Gluc Färbelösung

x-Gluc Färbelösung	
NaH ₂ PO ₄ , pH 7,0	100 mM
EDTA pH 7,0	10 mM
Ferricyanid	0,5 mM
Ferrocyanid	0,5 mM
X-Gluc	2 mM
Triton X-100	0,1% (w/v)
ad bidest. Wasser	

2.5.3 Einbettung von Pflanzenmaterial in Polyethylenglykol (PEG)

Die Einbettung erfolgte nach Hause *et al.*, (1996). Hierfür wurde das GUS gefärbte Pflanzenmaterial (2.5.2) zunächst mit Formaldehyd vakuuminfiltriert. Dafür wurde das Pflanzenmaterial für 5-10 min mit einer Lösung aus 4% (w/v) Para-Formaldehyd (Merck, Darmstadt, Deutschland) und 0,1% (v/v) Triton-X-100 (Roth, Karlsruhe, Deutschland) in 1xPBS (Tabelle 10) infiltriert. Anschließend wurde das Pflanzenmaterial bei Raumtemperatur unter ständigem leichtem Schütteln für zwei Stunden fixiert. Nun wurde die Probe zweimal für 15 min mit 1x PBS Puffer (Tabelle 10) gewaschen.

Im zweiten Schritt erfolgte die Einbettung der Wurzeln in PEG 1500. Hierbei wurde zuerst das Wasser aus dem Probenmaterial entfernt. Dies geschah durch Inkubation der Probe in einer steigenden Ethanolreihe [30 min 10% (v/v) Ethanol, 60 min 30% (v/v) Ethanol, 60 min 50% (v/v) Ethanol, über Nacht bei 4 °C 70% (v/v) Ethanol, 30 min 90% (v/v) Ethanol, 30 min 100% (v/v) Ethanol, 30 min 100% (v/v) Ethanol bei 55 °C]. Anschließend erfolgte die Infiltration mit PEG 1500 (Merck, Darmstadt, Deutschland) bei 50 °C wie folgt: 30 min 100% (v/v) Ethanol, 60 min 25% (v/v) PEG in Ethanol, 60 min 50% (v/v) PEG in Ethanol, 60 min 75% (v/v) PEG in Ethanol und 60 min 100% (v/v) PEG in Ethanol. Die Einbettung und die Aushärtung des infiltrierten Materials geschah bei Raumtemperatur.

2.5.4 Herstellung von Pflanzenschnitten

Die gewebehaltigen PEG-Blöcke wurden mit Hilfe eines Skalpells so zugeschnitten, dass ein leichter Zugang zum Gewebe gewährleistet werden konnte. Der Block wurde dann auf einem Plastikblock fixiert und im Mikrotom (38160, Leitz, Wetzlar, Deutschland) eingespannt. Die anschließend angefertigten Schnitte hatten eine Dicke von 5 µm und wurden mit Hilfe eines Pinsels auf Poly-Lysin beschichtete Objektträger (Superfrost-Plus TM, Roth, Karlsruhe) überführt und mit 60 µl Citifluor (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, Pennsylvania) beschichtet. Anschließend wurde ein Deckglas über die Probe gelegt und dieses mit Nagellack fixiert.

Material und Methoden

2.5.5 Mikroskopische Analyse

2.5.5.1 Konfokalmikroskopische Aufnahmen

Die Analyse der Lokalisation der Fusionsproteine erfolgte an einem Laser-Scanning-Mikroskop (LSM 710, Zeiss, Jena) unter Verwendung des LD C-Apochromat 40x1.1W Korr Wasser-Immersionsobjektiv. Die Anregung des grünfluoreszierenden Proteins (eGFP) erfolgte bei einer Wellenlänge von 488 nm, die Fluoreszenz wurde im Bereich von 500 bis 550 nm detektiert. Das rotfluoreszierende Protein (mCherry) wurde bei 594 nm angeregt und in einem Wellenlängenbereich zwischen 598 und 632 nm detektiert. Das Chlorophyll a wurde bei 488 nm angeregt und bei 680 bis 740 nm detektiert. Die Dicke der optischen Schnitte betrug 3 μm . Der Mitochondrien-Marker bestand aus den ersten 29 AS der Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) Cytochrom C Oxidase IV (ScCOX4; Köhler *et al.*, 1997), die an C-terminales mCherry fusioniert wurde (Nelson *et al.*, 2007). Der Plastoglobuli-Marker bestand aus der Volllänge der Phytoensynthase aus *A. thaliana* (Shumskaya *et al.*, 2012), an der ebenfalls C-terminal mCherry fusioniert wurde.

2.5.5.2 Durchlicht- und Auflichtmikroskopische Aufnahmen

Die GUS gefärbten Blattscheiben der stabil transformierten *N. tabacum* Pflanzen, die die β -Glukoronidase unter dem *CBTS2a* Promotor exprimieren, wurden im Hellfeld an einem AxioImager Z1 (Zeiss, Jena, Deutschland) analysiert.

Die stabil transformierten *A. thaliana* Pflanzen (Wurzeln und Blätter) die die β -Glukoronidase unter dem *AtIDS9* Promotor exprimieren, wurden sowohl im Durchlichtmodus an einem AxioImager Z1 (Zeiss, Jena, Deutschland) als auch im Auflichtmodus an einem AZ 100 Mikroskop (Nikon Instruments Europe, Amsterdam, Niederlande) analysiert.

2.6 Analytische Methoden

2.6.1 LC/MS

Die Proben der AtIDS9 *in vitro* Assays (2.4.7) und der Kinetik (2.4.8) wurden ohne weitere Aufarbeitung mittels LC/MS analysiert. Dies erfolgte mittels Hilic-LC/MS an einer Aquity-UPLC (Waters, Eschborn, Deutschland) in Kombination mit einem AB Sciex Q-Trap 6500 (Sciex, Toronto, Kanada) unter Verwendung der *Analyst Software* (Version 1.6.2, Sciex). Hierzu wurden 5 µl der Probe auf eine Nucleoshell Hilic Säule (150 x 2 mm, 2,7 µm; Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) injiziert und durch einen Gradienten aus 20 mM Ammoniumformiat in Wasser pH 2,5 (Lösungsmittel A, mit Ameisensäure eingestellt) und 20 mM Ammoniumformiat in 95% /5% Acetonitril/Wasser pH 4,0 (Lösungsmittel B, mit Ameisensäure eingestellt) mit folgendem Profil getrennt: 0-1,5 min isokratisch 100% B; 1,5-9 min linear von 100% auf 30% B; 9-11 min isokratisch bei 30% B; 11-12 min linear von 30% auf 100% B; 12-14 min isokratisch bei 100% B. Die Flussrate betrug dabei 400 µl/min, und die Säulentemperatur lag bei 40 °C. Nach jeder Injektion wurde die Injektionsnadel mit 1,5 ml 10 mM Ammoniumformiat in 80/20 Methanol/Wasser pH 4,0 und 600 µl Acetonitril gewaschen. Die massenspektrometrische Analyse wurde im negativen Modus durch *multiple reaction monitoring* (MRM) durchgeführt (für MRM Übergänge siehe Tabelle 12). Für die Identifikation und Quantifizierung der gemessenen Metabolite wurden Eichgeraden aus authentischen Standards (Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie, Abteilung Bioorganische Chemie, Halle a.d. Saale, Deutschland) erstellt. Die Integration der Peakflächen erfolgte mittels Multiquant Version 3.0.5373.0 (Sciex, Toronto, Kanada).

Tabelle 12: MRM Übergänge der analysierten Isoprenoiddiphosphate. Aufgelistet sind die Masse der Vorläufer- (MS^1) und der Fragment-Ionen (MS^2), die Akkumulationszeit (*accumulation time*, AT) die für die Fragmentierung verwendete Kollisionsenergie (*collision energy*, CE), Teilentclusterungs Potential (*declustering potential*, DP) und Kollisionszellen-austrittspotential (*collision cell exit potential*, CXP).

MS^1 [m/z]	MS^2 [m/z]	AT [ms]	Name der Substanz	DP [V]	CE [V]	CXP [V]
244,849	78,9	20	DMADP	-30	-40	-7
449,069	78,9	20	(E/E/E)-GGDP	-65	-68	-35
517,188	78,9	20	GFDP	-45	-84	-19
244,877	78,9	20	IDP	-40	-54	-31
380,922	78,9	20	(E/E)-FDP	-50	-76	-15
312,958	78,9	20	(E)-GDP	-10	-56	-7

Material und Methoden

2.6.2 GC/MS

Um die Produkte der transient in *N. benthamiana* exprimierten AtIDS9 und der AtIDS9 und AtTPS28 in den stabil transformierten *N. tabacum* Pflanzen zu analysieren, wurden 6 Blattscheiben (\varnothing 11 mm) aus den infiltrierten Bereichen ausgestanzt, in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und 1 ml n-Hexan extrahiert. Danach wurden die Probe für 1 min bei 700 x g geschüttelt. Die Extrakte wurden in neue Reaktionsgefäße überführt und im Stickstoffstrom (Sample Concentrator Techne, Cole-Parmer, Staffordshire, England) eingedampft. Anschließend wurden die Proben in 150 μ l n-Hexan angelöst und bei 16000 x g für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Hierdurch wurden mögliche Zellrückstände entfernt. Von den so erhaltenen Extrakten wurden 100 μ l in GC-Gefäße gegeben und vermessen.

Für die Analyse der Extrakte wurde ein Spuren GC Ultra Gas Chromatograph in Kombination mit einem ISQ Massenspektrometer (Thermo Scientific, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Von den Proben wurden jeweils 1 μ l injiziert und auf einer 30 m x 0,32 mm Kapillare mit einem 0,25 μ m Film ZB-5 ms (Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland) aufgetrennt. Die Injektion wurde bei einer Eingangstemperatur von 250 °C durchgeführt. Der Ofen startete bei 50 °C, hielt diese Temperatur für 1 min; anschließend wurde die Temperatur auf 300 °C angehoben mit einer Rate von 7 °C pro min und danach auf 330 °C mit 20 °C pro min. Diese Temperatur wurde im letzten Schritt für 5 min gehalten. Das verwendete Trägergas war Helium. Dies wurde mit einer Flussrate von 1 ml/min injiziert. Die Elektronenstoßionisation wurde bei 70 eV aufgezeichnet. Die massenspektrometrischen Daten wurden während des Temperaturanstiegs von 50 - 450 m/z aufgenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Rekombinante Expression und Aufreinigung der AtIDS9

Ziel der folgenden Experimente war es, die AtIDS9 heterolog zu exprimieren und das rekombinante Protein aufzureinigen, um dieses Enzym dann in einem *in vitro* Assays zu analysieren. Hierfür mussten zunächst Reinigungsstrategien etabliert werden und die Funktionalität des Proteins überprüft werden. Zur Charakterisierung der AtIDS9, insbesondere im Hinblick auf die kinetischen Eigenschaften und die Substratspezifität, wurde eine Aufreinigung unter nativen Bedingungen als Voraussetzung angesehen. Ebenso musste das Zielprotein in ausreichender Menge gewonnen werden können. Da eine native Isolierung aus *A. thaliana* Wurzeln aufgrund der geringen Proteinkonzentration (*eFP Browser 2.0*, <http://bar.utoronto.ca>) sehr schwierig und langwierig wäre, wurde die AtIDS9 in *N. benthamiana* heterolog exprimiert und dann aus deren Blättern aufgereinigt. Hierbei handelt es sich um ein bereits etabliertes Expressionssystem (Marillonnet *et al.*, 2005).

Das hierfür verwendete Konstrukt beinhaltete die Sequenz der *AtIDS9*, ohne dem putativen Transitpeptid (ermöglicht zytosolische Expression des Zielproteins), mit einem N-terminalen 6xHisTag. Die Expression fand unter dem Arabidopsis *Actin2* Promotor und *Nos* Terminator statt. Zuerst wurden *N. benthamiana* Blätter mit Agrobakterien, die das Konstrukt enthielten, infiziert. Nach sechs Tagen wurde das Zielprotein extrahiert und über Metallaffinitätschromatographie (Ni-NTA) aufgereinigt. Anschließend wurde die Reinheit des Proteins durch ein *Coomassie Brilliant Blue* (CBB) gefärbtes SDS-Gel und eine Westernblot-Analyse ermittelt.

Durch das mit Coomassie gefärbte SDS-Gel in Abbildung 7A wurde ersichtlich, dass es möglich war, das Zielgen *6xHisTag-AtIDS9* (≈ 36 kDa) in *N. benthamiana* zu exprimieren und mit Hilfe des 6xHisTags das Zielprotein aufzureinigen. Die Ausbeute des aufgereinigten Zielproteins betrug im Durchschnitt 3 mg pro 1 g Blattfrischgewicht.

Das Gel zeigt, dass sowohl im Rohextrakt, als auch in der Waschfraktion, keine Bande bei 36 kDa (=Zielprotein) sichtbar war. Diese war nur nach Anreicherung des Proteins in der Elutionsphase bzw. nach der Umpufferung sichtbar (Abbildung 7 roter Rahmen, Fraktionen 6 und 7). Einen Beweis, dass es sich tatsächlich um das gewünschte Zielprotein handelt, liefert dabei die Analyse per Westernblot (Abbildung 7B). Hier zeigte die Detektion des 6xHisTags am Zielprotein, mit einem Anti-His6-Peroxidase-gekoppelten Antikörper, eine Bande bei dem erwarteten Molekulargewicht von ca. 36 kDa, was

Ergebnisse

bedeutet, dass es sich bei dem partiell gereinigten Protein wirklich um die rekombinant hergestellte AtIDS9 handelte.

Das SDS-Gel (Abbildung 7A) und der Westernblot (Abbildung 7B) zeigten jedoch jeweils mindestens eine zusätzliche Bande. Zum einen wurde im SDS-Gel und im Westernblot breite Proteinbanden mit einem Molekulargewicht von 80 kDa und > 100 kDa detektiert. Da dieses Protein das doppelte bzw. sogar das drei- bis vierfache Molekulargewicht wie das Zielprotein aufwies und einen 6xHisTag trug, wurde vermutet, dass das Protein als Dimer bzw. als Tetramer vorliegen könnte (weißer Rahmen). Zum anderen trat im Coomassie gefärbten Gel auch eine Bande in der Elutions- und Umpufferungs-Fraktion auf, die ein anderes Molekulargewicht wie das Zielprotein aufwies (roter Pfeil). Dieses Protein wies die gleiche Laufgeschwindigkeit wie das mengenmäßig sehr prominente Pflanzenprotein Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (Rubisco) auf (große Untereinheit, ca 53 kDa). Demnach besaß das aufgereinigte Zielprotein leichte, jedoch sichtbare Verunreinigungen mit anderen pflanzlichen Proteinen. Trotz dieser leichten Verunreinigungen konnte das Enzym für weitere Experimente, wie die Analyse möglicher Substrate und Produkte sowie für kinetische Messungen, verwendet werden.

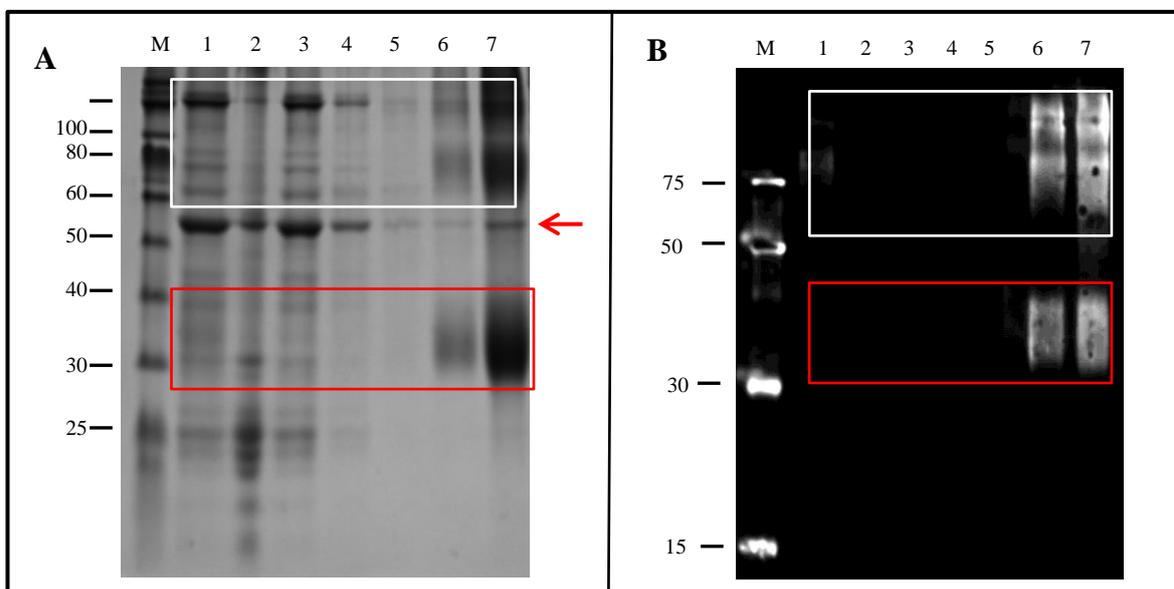


Abbildung 7: Aufreinigung des cytosolisch lokalisierten, verkürzten 6xHisTag-AtIDS9 Proteins aus *N. benthamiana* Blättern. Die Aufreinigung erfolgte mittels Metallaffinitätschromatographie (Ni-NTA). Einzelne Aufreinigungsschritte: (1) Rohextrakt, (2) Pellet, (3) Durchfluss, (4) Waschfraktion 1, (5) Waschfraktion 2, (6) Elution, (7) Entsalzung und Aufkonzentrieren. Die 6xHisTag-AtIDS9 hat ein Molekulargewicht von 36 kDa (roter Rahmen). Die zusätzlich aufgetretenen Banden im Westernblot wurden durch eine weiße Umrahmung markiert und haben das doppelte bzw. das drei- bis vierfache Molekulargewicht des Zielproteins. Die bei ca. 53 kDa auftretende Bande, die mit einem roten Pfeil gekennzeichnet wurde, zeigt Verunreinigungen durch Rubisco an. Es wurden jeweils 1,5 µg Protein aufgetragen. (A) Coomassie gefärbtes Gel (SDS-PAGE). (M) Marker, *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* (Thermo Scientific). (B) Immunodetektion der AtIDS9-6xHisTag mittels Westernblots. (M) Westernblotmarker: *6xHis Protein Ladder* (Qiagen).

Des Weiteren fiel bei näherer Betrachtung der Zielprotein-Bande (Abbildung 7A und B, roter und weißer Rahmen) auf, dass diese diffus erschien. Hierfür gab es zwei Erklärungsmöglichkeiten, die im nachfolgendem getestet wurden. Die erste besagt, dass die undefinierte Bande durch Glykosilierung des AtIDS9 Fusionsproteins entsteht. Das wiederum würde bedeuten, dass durch die Deglykosilierung des Enzyms eine klare, gut definierte Bande entstehen müsste. Die zweite Hypothese besagt, dass das heterolog exprimierte Protein aufgrund der Ausbildung von Disulfidbrückenbindungen dieses Laufverhalten zeigt und, wie schon für andere IDS gezeigt, Dimere ausbildet (Wang *et al.*, 2009).

Um dies zu testen, wurde die aufgereinigte AtIDS9 zunächst zusammen mit der EndoH, einer Endoglykosidase, welche Asparagin verlinkte Mannose-reiche Oligosaccharide spaltet, inkubiert. Anschließend wurde das Laufverhalten des behandelten Proteins im SDS-Gel sowie im Westernblot untersucht und mit dem der unbehandelten AtIDS9 verglichen. Dabei zeigte sich jedoch, wie in Abbildung 8 dargestellt, weder im Coomassie gefärbten SDS-Gel noch im Westernblot ein Unterschied im Laufverhalten zwischen der deglykosilierten und der nicht-deglykosilierten AtIDS9. Dies weist darauf hin, dass die diffuse Bande der AtIDS9 nicht aufgrund einer Glykosilierung hervorgerufen wird.

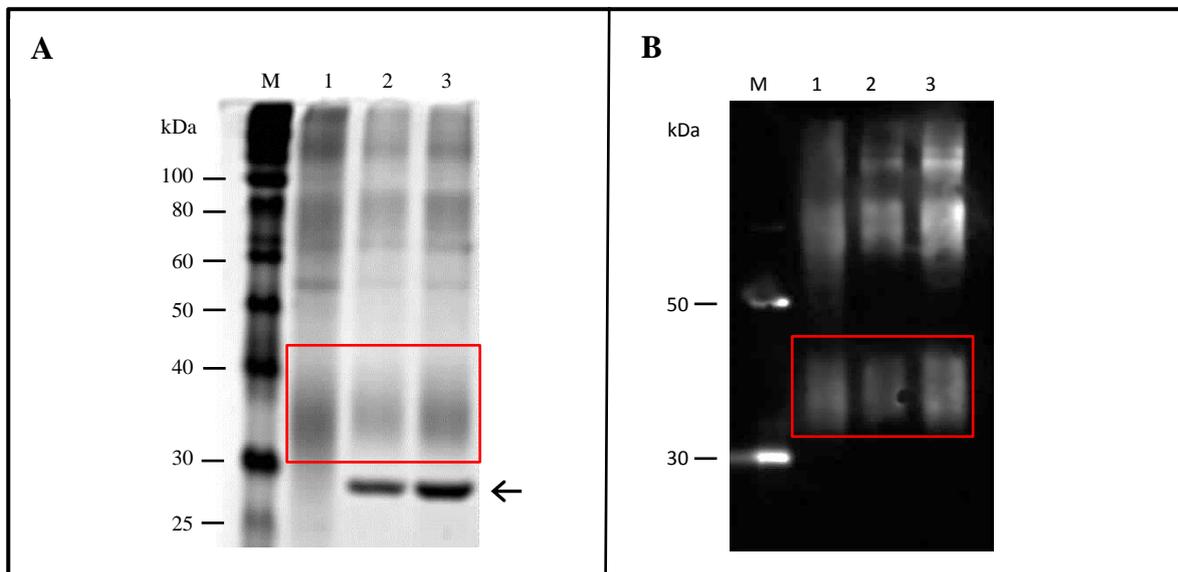


Abbildung 8: Deglykosilierung der 6xHisTag-AtIDS9 mittels EndoH. (1) unbehandelte 6xHisTag-AtIDS9 (1,5 µg, Kontrolle), (2) 1,5 µg und (3) 3 µg mit EndoH behandeltes, aufgereinigtes 6xHisTag-AtIDS9 Protein. Das monomere Zielprotein ist rot umrandet. **(A)** Coomassie gefärbtes SDS-Gel: (M) Marker: *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* (Thermo Scientific). Bei den in (2) und (3) zusätzlich aufgetretene Bande handelt es sich um die EndoH (Schwarzer Pfeil). **(B)** Westernblot: (M) Westernblotmarker: *6xHis Protein Ladder* (Qiagen).

Ergebnisse

Um zu überprüfen ob die diffuse Bande durch Disulfidbrücken hervorgerufen wird, wurden zum einen die von Wang *et al.*, (2009) beschriebenen Cysteine des CxxxC-Motives in Position 110 und 114, mittels gezielter Mutation, durch Serine ausgetauscht. Da diese Cysteine für die Ausbildung von Disulfidbrücken verantwortlich zu sein scheinen und damit zur Dimerisierung zweier AtIDS9-Proteine benötigt werden, sollte der Austausch der beiden Cysteine dazu führen, dass keine Dimerisierung mehr stattfinden kann. Des Weiteren wurde versucht die Disulfidbrücken mittels reduzierenden Reagenzien (wie β -Mercaptoethanol) aufzulösen, was jedoch, im Gegensatz zur eben beschriebenen Mutation, zur vollständigen Denaturierung des Proteins führen würde.

Der Austausch der Cysteine 110 und 114 durch Serine konnten das diffuse Laufverhalten der AtIDS9 im SDS-Gel leicht verringern (Abbildung 9A und B). So zeigte die Zielproteinbande sowohl bei den Monomeren als auch bei den Dimeren eine deutlich geringere Diffusität, im Vergleich zu den Zielproteinbanden in der Abbildung 7. Eine vollständige Monomerisierung, die durch die Mutation der Disulfidbrücken erwartet wurde, trat jedoch nicht auf. Demnach können die ausgewählten Cysteine nicht der einzige Grund für die Multimerisierung sein. Sie scheinen aber eine Rolle zu spielen.

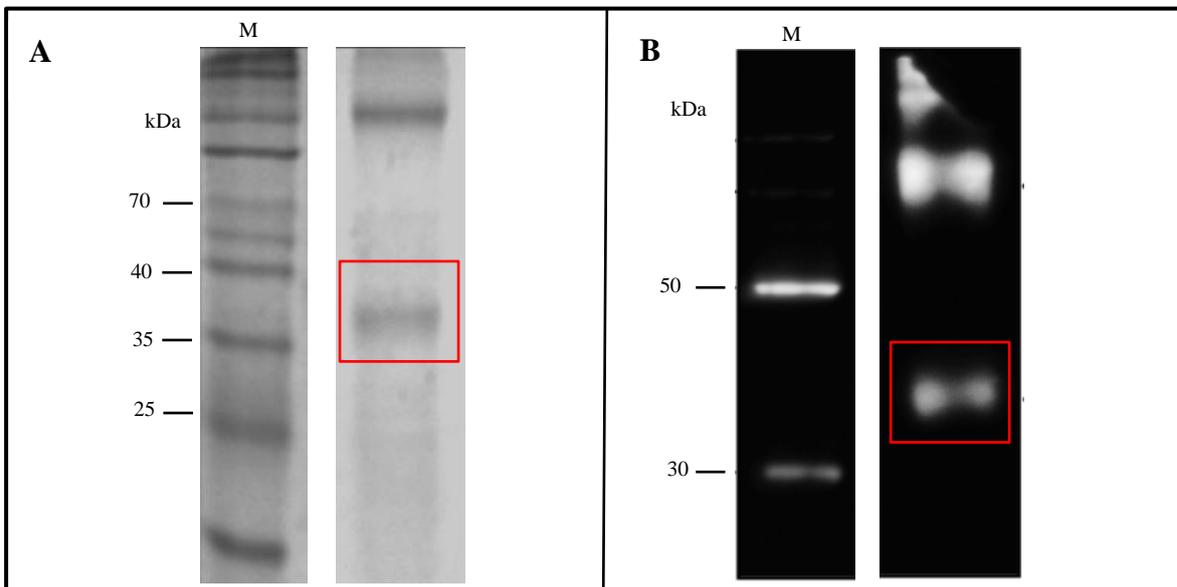


Abbildung 9: Analyse des Laufverhaltens der 6xHisTag-AtIDS9/C110S/C114S Mutante. (A) Coomassie gefärbtes SDS-Gel: (M) Marker: *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* (Thermo Scientific), (B) Westernblot: (M) Westernblotmarker: *6xHis Protein Ladder* (Qiagen). Bild zugeschnitten. Analysiert wurden 1 μ g aufgereinigtes Protein. rote Umrandung = Monomer des Zielproteins.

Die Behandlung der Probe mit dem Reduktionsmittel β -Mercaptoethanol (Abbildung 10A und B) konnte jedoch eine scharfe Bande und somit eine vollständige Monomerisierung des Zielproteins hervorrufen. Durch die Zugabe von β -Mercaptoethanol wurden dabei nicht nur die Disulfidbrückenbindungen, sondern auch die gesamte Sekundärstruktur des Proteins aufgelöst.

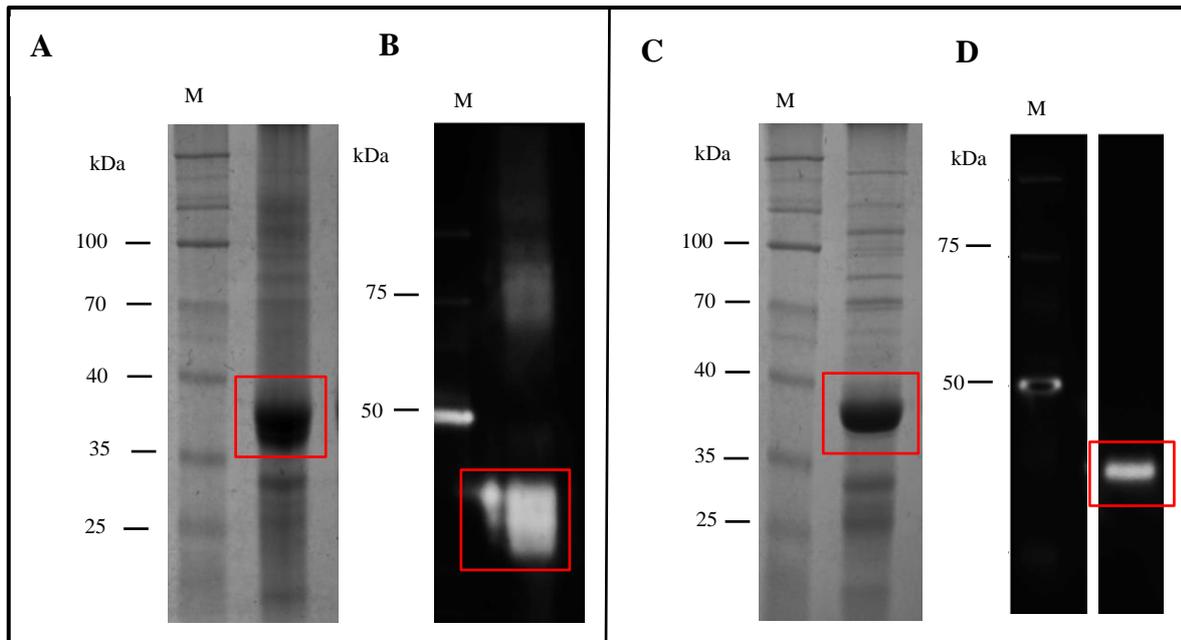


Abbildung 10: Analyse des Laufverhaltens der mit β -Mercaptoethanol behandelten 6xHisTag-AtIDS9. (A) und (C) Coomassie gefärbtes SDS-Gel: Marker (M): *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* (Thermo Scientific) mit je 2 μ g (A) unbehandeltem und (C) mit β -Mercaptoethanol behandeltem Rohextrakt. (B) und (D) Westernblot: (M) Westernblotmarker: *6xHis Protein Ladder* (Qiagen) mit 1 μ g (B) unbehandeltem und (D) mit β -Mercaptoethanol behandeltem Rohextrakt. rote Umrahmung = Monomer des Zielproteins. Das in (D) dargestellte Gel wurde zugeschnitten.

Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass die AtIDS9 sowohl Dimere, als auch Multimere bilden kann und dass die Disulfidbrücken an der Ausbildung der Di- bzw. Multimere beteiligt zu sein scheinen. Jedoch bleibt vorerst unklar, warum die 6xHisTag-AtIDS9 als diffuse Banden im Gel und Westernblott erscheint. Weitere Hinweise hierauf könnten etwa durch die Mutation von weiteren Cysteinen (AtIDS9 besitzt insgesamt acht) gewonnen werden.

Ergebnisse

3.2 Substrate und Produkte der AtIDS9

Aus der Literatur ist bekannt, dass Kurzketten-IDS IDP und DMADP zur Produktion von längerkettigen Isoprenyldiphosphaten verwenden. Jedoch wurden auch bereits IDS beschrieben, die längere allylische Substrate umsetzen können. Diese IDS können in den von ihnen katalysierten Reaktionen unter anderem GDP und FDP als Substrat nutzen. Unabhängig vom verwendeten Substrat sind IDS Enzyme, die meist nur ein Isoprenyldiphosphat als Produkt synthetisieren. Bei den Produkten handelt es sich dabei um GDP (C10), FDP (C15) oder GGDP (C20). Nachdem gezeigt wurde, dass die Aufreinigung der AtIDS9 aus den infiltrierten *N. benthamiana* Blättern mittels 6xHisTag möglich war (siehe 3.1), sollte das Substrat- und Produktspektrum der AtIDS9 analysiert werden. Die Bestimmung der Produkte erfolgte sowohl durch *in vivo* (3.2.1) als auch *in vitro* (3.2.2) Assays. Die Analyse von *in vivo* Assays mittels GC/MS sollte dabei einen ersten Überblick über die Produkte der AtIDS9 geben. Weiterhin wurden zur Ermittlung der Substratspezifität verschieden lange Isoprenyldiphosphate in (*E*)- oder (*Z*)-Konformation in einem *in vitro* Assay getestet und deren Umsetzung mittels LC/MS analysiert.

3.2.1 Transiente Expression in *N. benthamiana*

Um die Produkte der AtIDS9 zu identifizieren, wurde zunächst ein T-DNA Vektor, der eine Volllänge-Sequenz der *AtIDS9* unter Kontrolle des 35S *CaMV* Promotors, enthält, generiert und in den Agrobakterienstamm GV3101::pMP90 transferiert. Anschließend wurden *N. benthamiana* Blätter mit diesem Agrobakterienstamm infiltriert und nach drei Tagen Inkubationszeit geerntet. Von diesen Blättern wurden Oberflächenextrakte mit n-Hexan erstellt und mittels GC/MS auf mögliche Produkte analysiert. Bei der Auswertung möglicher AtIDS9 Produktpeaks muss jedoch beachtet werden, dass mittels GC/MS nur dephosphorylierte Stoffe analysiert werden können. Dies bedeutet wiederum, dass Phosphatreste von dem Produkt der AtIDS9 durch *N. benthamiana* eigene Phosphatasen abgespalten worden sein müssen oder eine spontane Phosphatabspaltung stattgefunden haben muss, um eine Produktdetektion zu ermöglichen.

Wie aus den Gaschromatogrammen in Abbildung 11A ersichtlich wurde, trat in den *AtIDS9* exprimierenden Blättern ein Produkt auf, das in den Kontrollblättern nicht detektiert wurde (29,53 min). Demnach war die *AtIDS9* in den *N. benthamiana* Blättern aktiv. Da GGDP als putatives Produkt vermutet wurde, wurde zunächst die Retentionszeit des detektierten Produktes mit der von GGOH verglichen (Anhang: Abbildung 2A). Hierbei zeigte sich jedoch, dass GGOH eine geringere Retentionszeit (25,91 min) als das putative Produkt der *AtIDS9* hat.

Der Vergleich des Massenspektrums des Produktpeaks (Abbildung 11 B) mit dem von GGOH (Anhang: Abbildung 2B) ergab, dass es sich bei dem Produkt um ein Isoprenyldiphosphat zu handeln scheint, da genau, wie im GGOH Massenspektrum, die für diese Stoffklasse charakteristischen Fragmente von m/z 69, 81 und 161 auftraten. Das Gesamt m/z Verhältnis von GGOH ($M-H_2O = 272$) ist jedoch viel geringer als das des putativen Produktes ($M-H_2O = 340$). Demnach wurde die Vermutung aufgestellt, dass es sich bei dem detektierten Produkt um den nächst größeren Isoprenoidalkohol Geranylarnesol (GFOH) handelt und die *AtIDS9* somit GFDP produziert. Um dies zu überprüfen, wurde ein *in vitro* Assay entwickelt, bei dem das entstandene Produkt mit Hilfe von LC/MS Messungen analysiert wurde. Diese Methode bietet gegenüber der GC/MS den Vorteil, dass auch phosphorylierte, langkettige Isoprenyldiphosphate, wie das zu erwartende GFDP, sehr gut detektiert werden können. Die entsprechenden Ergebnisse werden im folgenden Abschnitt dargestellt.

Ergebnisse

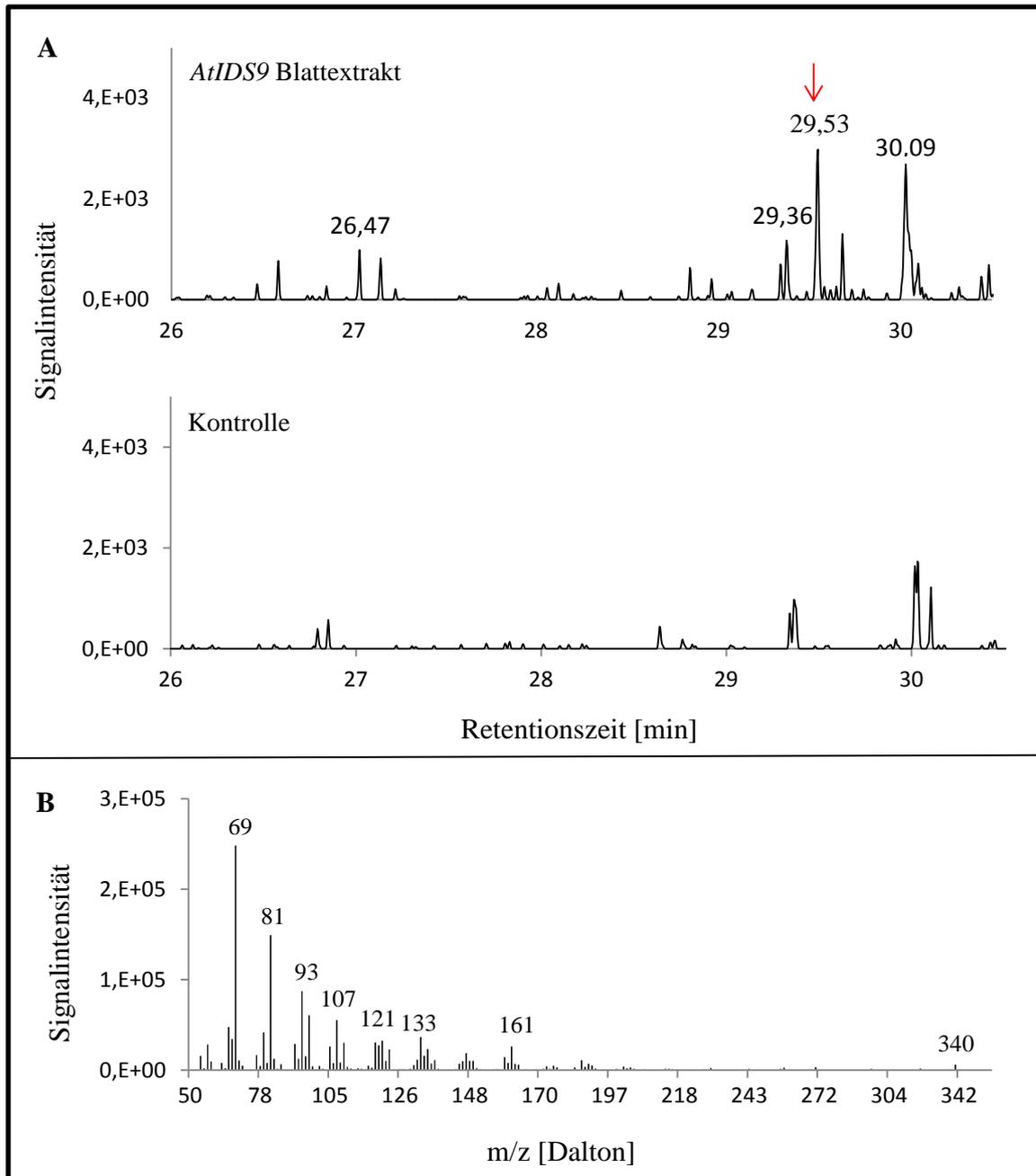


Abbildung 11: *In vivo* Enzymassay der *AtIDS9* in *N. benthamina* Blättern. GC/MS Analyse der Produkte der *AtIDS9* im transienten Assay. **(A)** Extrahiertes Ionenchromatogramm (m/z $340 \pm 0,5$ Da) von n-Hexan Extrakten von *AtIDS9* exprimierenden Blättern sowie von mit Leervektor infiltrierten Blättern (Kontrolle). Peak des putativen Produktes trat bei 29,53 min (roter Pfeil) auf. **(B)** Elektronenstoßionisations - Massenspektrum des Produktpeaks, welches die für Isoprenyldiphosphate charakteristischen Fragmente von 69, 81 und 161 aufweist.

3.2.2 Analyse möglicher Substrate und der Produkte der AtIDS9

Da die transienten *in vivo* Assays in *N. benthamiana* zwar zeigten, dass die AtIDS9 Aktivität in der Pflanze aufweist, aber keine genauen Aussagen über die Länge des entstandenen Produktes gemacht werden konnten, wurde ein *in vitro* Assay mit heterolog exprimierter AtIDS9 durchgeführt. Die Analyse der gebildeten Produkte wurde dabei mittels LC/MS im MRM (*multiple reaction monitoring*) Modus durchgeführt (2.7.1).

Die Auswertung der Daten zeigt, dass es sich bei dem Produkt der AtIDS9 tatsächlich um GFDP, also ein C25 Isoprenyldiphosphat, handelt (Abbildung 12). Der Beweis hierfür wurde durch die Übereinstimmung der Retentionszeit, der exakten Masse und des MS² Fragmentspektrums mit einem authentischen Standard erbracht (Abbildung 12). Neben GFDP produziert die AtIDS9 aber auch zu einem deutlich geringeren Anteil ($12 \pm 5\%$, Tabelle 13) das um fünf Kohlenstoffatome kleinere GGDP.

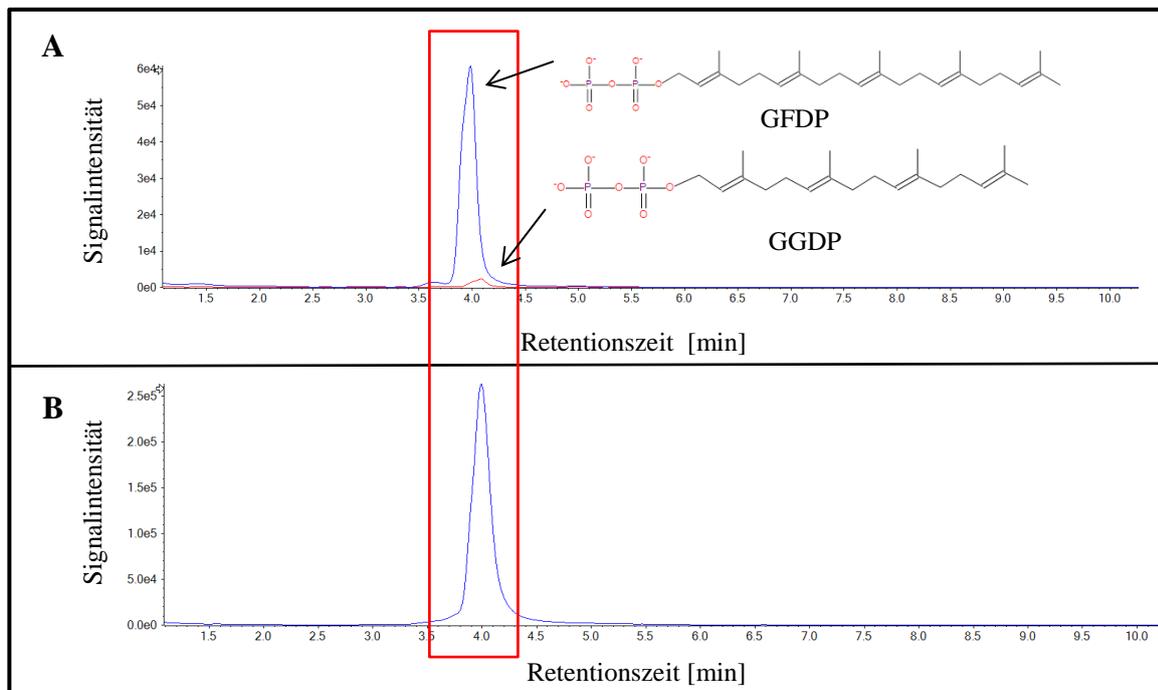


Abbildung 12: Detektion der *in vitro* produzierten Produkte der AtIDS9 mittels LC/MS im negativen Modus. (A) Extrahiertes Ionenchromatogramm des im Assay gebildeten GFDP (blau, $[m-H]^- = 517,248 \pm 0,025$ Da) und GGDP (rot, $[m-H]^- = 449,186 \pm 0,025$ Da). (B) Vergleichschromatogramm eines authentischen GFDP Standard.

Substratvergleichstests vorangegangener Studien haben gezeigt, dass von einigen IDS nicht nur DMADP, sondern auch längerkettige Isoprenyldiphosphate wie GDP, FDP oder GGDP als allylische Substrate verwendet werden können (Vandermoten *et al.*, 2009). Um die von der AtIDS9 genutzten allylischen Substrate zu ermitteln, wurden DMADP, FDP und GGDP in (*E*)- Konformation und GDP in (*E*)- und (*Z*)- Konformation in einem *in vitro*

Ergebnisse

Assay verwendet (Abbildung 13). Als zweites Substrat, das zur Verlängerung der Ketten dient, wurde dabei immer IDP eingesetzt und in der Konzentration variiert. Das allylische Substrat wurde dagegen immer in der gleichen Konzentration eingesetzt.

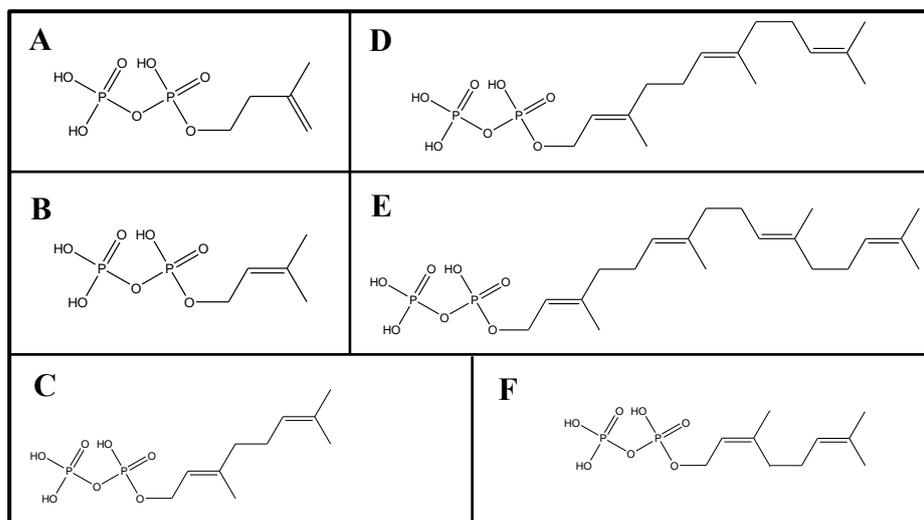


Abbildung 13: Darstellung der verwendeten Substrate in der jeweiligen Konformation. (A) IDP, (B) DMADP, (C) (E)-GDP, (D) (E/E)-FDP, (E) (E/E/E)-GGDP und (F) NDP.

Die Ergebnisse, die in Tabelle 13 dargestellt sind, zeigen, dass die AtIDS9 alle getesteten Substrate, die in (E)- Konformation vorlagen, für die Synthese von GFDP und GGDP verwenden konnte. Das Substrat NDP [Neryldiphosphat, (Z)- GDP] konnte hingegen nicht umgesetzt werden. Unabhängig davon, welches Substrat zur Verfügung stand, wurde dabei von der IDS stets ein ähnlicher Anteil an GGDP ($12 \pm 5\%$) und GFDP ($88 \pm 5\%$) gebildet.

Tabelle 13: Analyse der Substratspezifität der AtIDS9. Der Assay wurde mit den allylischen Substraten DMADP, GDP, FDP, und GGDP bei 37°C , für 5 min mit $1\ \mu\text{g}$ Protein in einem Reaktionsansatz von $200\ \mu\text{l}$ durchgeführt. Die Produktanalyse erfolgte mittels LC/MS. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei voneinander unabhängig durchgeführten Assays.

Substrate		Produkte	
		GGDP (μM)	GFDP (μM)
25 μM DMADP	+ 100 μM IDP	0,3	23,7
25 μM (E)-GDP	+ 75 μM IDP	0,1	20,4
25 μM (E/E)-FDP	+ 50 μM IDP	0,3	21,9
25 μM (E/E/E)-GGDP	+ 25 μM IDP	0,2	21,7
25 μM NDP	+ 75 μM IDP	-	-

3.3 Kinetische Charakterisierung der AtIDS9

Der Reaktionsmechanismus der IDS wurde durch Poulter und Rilling in den 70er und 80er Jahren aufgeklärt. Obgleich dieser Mechanismus bereits beschrieben wurde und für zahlreiche IDS kinetische Daten erhoben werden konnten, wurde bisher keine aus *A. thaliana* stammende GFDP produzierende IDS auf ihre kinetischen Eigenschaften untersucht.

Da detaillierte Informationen, etwa über die Reihenfolge der Bindung der Substrate oder über die einzelnen Geschwindigkeiten der Teilreaktionen, fehlen, mussten im Vorfeld der kinetischen Messungen einige Fragen experimentell beantwortet bzw. einige Annahmen festgelegt werden. So musste zunächst ein erster Eindruck über die Schnelligkeit der von der AtIDS9 katalysierten Reaktion erhalten werden und der lineare Bereich der Reaktion, in dem die apparenten K_m -Werte ermittelt werden können, bestimmt werden. Die hierfür durchgeführten Vorexperimente zeigten, dass die von der AtIDS9 katalysierte Reaktion im *in vitro* Assay sehr schnell abläuft. Um einen realistischen Reaktionszeitraum zur Messung der Kinetik zur Verfügung zu haben, wurde daher der pH-Wert des Reaktionsansatzes so angepasst, dass die Reaktion langsamer abläuft.

Außerdem wurde die Annahme getroffen, dass bei der AtIDS9 davon ausgegangen wird, dass ein geordneter Reaktionsmechanismus vorliegt. Dies bedeutet, dass das Enzym eine Reaktion katalysiert, in dem das allylische Substrat durch die Anlagerung von IDP um fünf Kohlenstoffatome verlängert wird. Diese Verlängerung findet dann so oft statt, bis das C25 Produkt GFDP oder das Nebenprodukt GGDP (C20) entstanden ist. Darüber hinaus muss bei der Auswertung der K_m -Werte beachtet werden, dass es sich bei den hier ermittelten Werten um apparente K_m -Werte handelt. Dies bedeutet, dass die Reaktion, je nachdem welches Substrat verwendet wird, viele einzelne K_m -Werte besitzt, aber bei den durchgeführten Messungen nur die gesamte Affinität des Substrats zum Enzym ermittelt werden konnte.

Ergebnisse

3.3.1 pH-Optimum

Um den Einfluss des pH-Wertes auf die Geschwindigkeit der von der AtIDS9 katalysierten Reaktion zu untersuchen, wurde eine pH-Kurve aufgenommen. Hierfür wurde der pH-Wert des Assaypuffers zwischen 4,5 und 9,8 variiert und die Produktkonzentration nach 30 sek Reaktionszeit (20 °C, 1 µg 6xHisTag-AtIDS9 pro 200 µl Assayvolumen) mittels LC/MS bestimmt.

Wie in Abbildung 14 zu erkennen ist, ist die Aktivität der AtIDS9 vom pH-Wert abhängig und weist ein pH-Optimum bei 6,5-7,0, also im neutralen Bereich, auf. Um die sehr schnelle Produktbildung der AtIDS9 zu verlangsamen, wurden die nachfolgenden kinetischen Messungen bei einem pH-Wert außerhalb des pH-Optimums durchgeführt. Durch die Messung der Kinetik bei einem pH-Wert von 7,5 besaß das Enzym somit nur noch ca. 60-70% seiner Aktivität (Abbildung 14). Dies ermöglichte eine Minimierung des Messfehlers durch Ungenauigkeiten bei der Probenahme in sehr kurzen Zeitabständen.

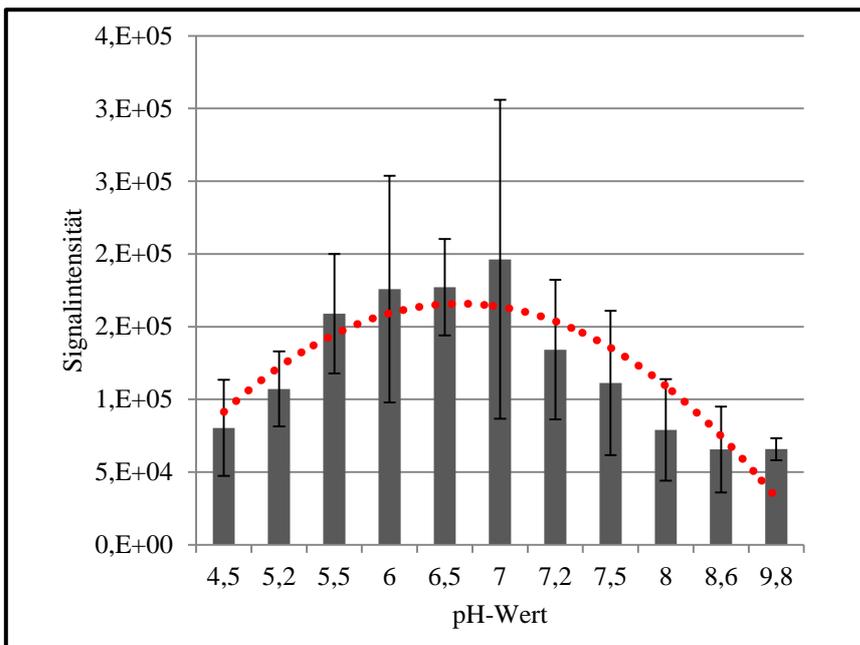


Abbildung 14: pH-Abhängigkeit der von der AtIDS9 katalysierten Reaktion beim Umsatz von GGDP und IDP. Abgebildet sind die Flächen des MS¹ Signals von GFDP, welches durch Enzymassays bei pH-Werten zwischen 4,5 und 9,8 gebildet wurde. Die rot gepunktete Linie zeigt den Trend der Aktivität der AtIDS9 bei den getesteten pH-Werten an. n=3

3.3.2 Vorbetrachtung der kinetischen Eigenschaften der AtIDS9 mit ausgewählten Substraten

Im ersten Schritt wurde der Umsatz von den Substraten DMADP bzw. GGDP mit IDP zu dem Produkt GFDP untersucht (2.4.7.4). Hierfür wurde eine Substratkonzentration von 25 μM DMADP (oder GGDP) und 150 μM IDP in einem Gesamtvolumen von 5 ml verwendet.

Die Daten dieser zwei Assays zeigten einen potenziellen hyperbolen Kurvenverlauf der Produktbildung für beide getestete Substrate (Abbildung 15). Der lineare Anstieg der Reaktion in den ersten 100 sek erlaubte außerdem eine Auswertung der kinetischen Daten mittels des Lineweaver-Burk-Diagramms. Dies ermöglichte das Bestimmen der apparenten *in vitro* Km-Werte der AtIDS9 mit den verschiedenen vom Enzym verwendeten Substraten.

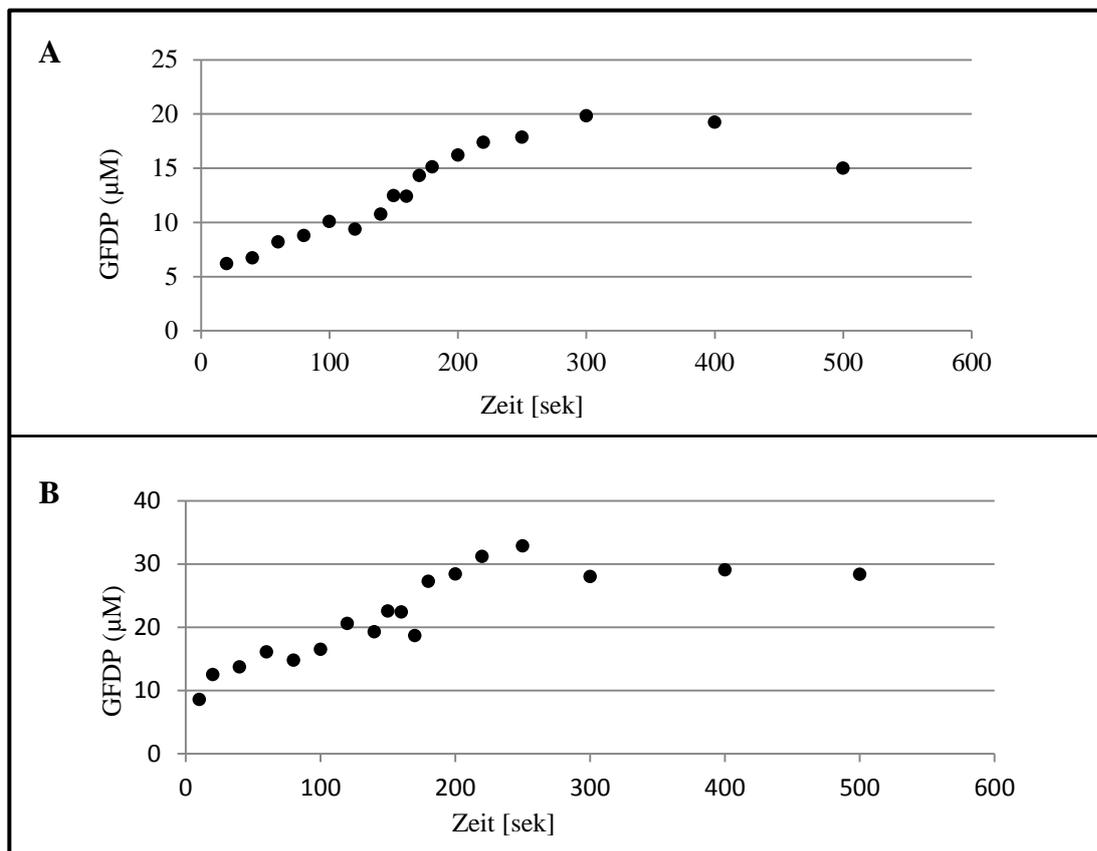


Abbildung 15: Zeitlicher Verlauf der Produktbildung der AtIDS9 mit den Substraten (A) DMADP und IDP bzw. (B) GGDP und IDP. (A) Anstieg der Konzentration an GFDP im Zeitraum zwischen 0 und 500 sek. Im Assay wurden 25 μM DMADP + 150 μM IDP verwendet. (B) Anstieg der Konzentration an GFDP im Zeitraum zwischen 0 und 500 sek. Im Assay wurden 25 μM GGDP + 150 μM IDP verwendet. Der Assay wurde mit 1 μg aufgereinigtem Protein pro 200 μl Assayvolumen bei 20 $^{\circ}\text{C}$ durchgeführt.

Ergebnisse

3.3.3 Bestimmung der apparenten K_m -Werte für Substrate verschiedener Länge

Um einen Eindruck von der Substratpräferenz der AtIDS9 zu bekommen, wurden die apparenten *in vitro* K_m -Werte, die Rückschlüsse über die Affinität des Enzyms zum jeweiligen Substrat zulassen, bestimmt. Die K_m -Werte wurden dabei für alle allylischen Substrate (DMADP, GDP, FDP und GGDP) in Kombination mit IDP ermittelt. Hierfür wurde die Substratkonzentration von 0-100 μM (DMADP) bzw. 0-50 μM (GDP, FDP, GGDP) bei gleichbleibender IDP Konzentration (100 μM), variiert. Zusätzlich wurde in einem Ansatz die Konzentration an GGDP konstant gehalten (50 μM) und die Konzentration an IDP (0-50 μM) variiert. Die Assays wurden bei 20 °C mit einer Enzymmenge von 1 μg in einem Endvolumen von 200 μl (pH 7,5) durchgeführt. Die Reaktion wurde nach 20 sek mit flüssigem Stickstoff abgestoppt. In dieser Inkubationszeit erfolgte die Produktbildung linear pro Zeiteinheit (Abbildung 15). Die Auswertung der Daten erfolgte mittels Lineweaver-Burk-Diagrammen (Abbildung 16).

Die durch lineare Regression erhaltenen apparenten *in vitro* K_m -Werte sind in Tabelle 14 zusammengefasst. Der Vergleich der K_m -Werte zeigt, dass DMADP einen 3-4-fach höheren K_m -Wert im Vergleich zu GDP, FDP und GGDP besitzt. Die K_m -Werte für GDP, FDP und GGDP) sind hingegen annähernd gleich. Dies deutet darauf hin, dass die K_m -Werte mit steigender Kettenlänge der Substrate immer kleiner werden: $K_m(\text{GGDP}) = K_m(\text{FDP}) \leq K_m(\text{GDP}) < K_m(\text{DMADP})$. Das bedeutet wiederum, dass die Affinität des Enzyms zu dem kurzkettingen Isoprenyldiphosphat DMADP viel geringer als für die längerkettingen Isoprenyldiphosphate (GDP, FDP und GGDP) ist.

Tabelle 14: Übersicht über die apparenten, *in vitro* K_m -Werte der rekombinant hergestellten 6xHisTag-AtIDS9 für verschiedene Substrate.

Substrat mit variierter Konzentration	Substrat mit konstanter Konzentration	K_m (μM)
DMADP (0-100 μM)	IDP 100 μM	47
(E) -GDP (0-50 μM)	IDP 100 μM	17
(E/E) -FDP (0-50 μM)	IDP 100 μM	12
(E/E/E) -GGDP (0-50 μM)	IDP 100 μM	14
IDP (0-50 μM)	(E/E/E) -GGDP 50 μM	11

Mittels Lineweaver-Burk-Diagramm ermittelte K_m -Werte. 0-100 μM DMADP, 0-50 μM GDP, FDP und GGDP mit 100 μM IDP bzw 0-50 μM IDP mit 50 μM GGDP wurden mit 1 μg gereinigtem, rekombinatem Protein bei 20 °C in einem Volumen von 200 μl inkubiert.

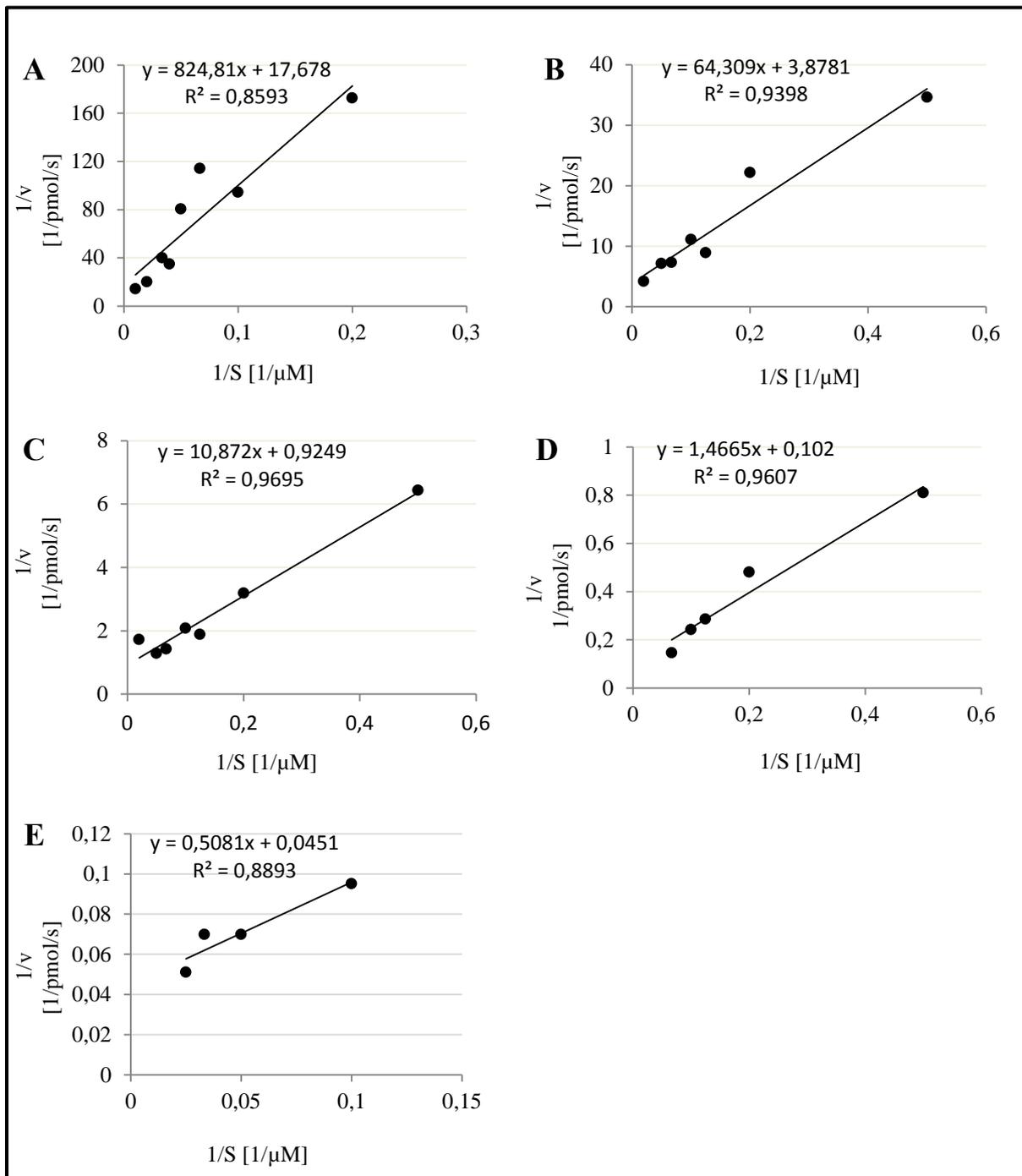


Abbildung 16: Lineweaver-Burk- Diagramme zur Berechnung der apparenten *in vitro* Km-Werte der AtIDS9 mit verschiedenen Substraten. Die doppelt reziproke Geschwindigkeit ($1/v$) und Substratkonzentration ($1/s$) wurden geplottet, um die apparenten *in vitro* Km-Werte durch lineare Regression zu ermitteln. (A) DMADP (0-100 μM) + 100 μM IDP, (B) GDP (0-50 μM) + 100 μM IDP, (C) FDP (0-50 μM) + 100 μM , (D) GGDP (0-50 μM) + 100 μM IDP und (E) IDP (0-50 μM) + 50 μM GGDP wurden als Substrat verwendet.

Ergebnisse

3.4 Lokalisation der AtIDS9

Die Untersuchung der Funktion und physiologischen Bedeutung von noch nicht charakterisierten Proteinen beinhaltet häufig die Ermittlung ihrer Lokalisation. Hierbei gilt es unterschiedliche Arten der Lokalisation zu bestimmen: die organspezifische und die subzelluläre Lokalisation. Bei der ersten Variante wird ermittelt, in welchem Organ bzw. in welchem Zelltyp das Protein zu einem bestimmten Zeitpunkt vorkommt, bei der zweiten Variante wird die Lokalisation des Proteins in den Zellkompartimenten bzw. Membransystemen innerhalb einer Zelle bestimmt.

3.4.1 Organspezifische und zelluläre Lokalisation der AtIDS9

Zunächst stellt sich die Frage in welchem Organ die *AtIDS9* exprimiert ist. Für die Beantwortung dieser Frage sollte die Lokalisation experimentell ermittelt werden. Dazu wurden stabil transformierte *A. thaliana* Pflanzen, die das Gen für die β -Glucuronidase (*gus*) unter Kontrolle des putativen *AtIDS9* Promotors (1,2 kb) exprimieren, mittels „*floral dip*“-Methode (Clough und Bent 1998) generiert (siehe 2.3.7.1). Zur Selektion positiv transformierter Pflanzen wurde dabei das *bar*-Gen, das eine Toleranz gegen das Herbizid BASTA vermittelt, genutzt (Abbildung 17A). Hierdurch konnten gekeimte Samen transformierter heterozygoter Pflanzen (T1-Generation) von nicht-transformierten Wildtyp-Pflanzen selektiert werden. Die Samen dieser Pflanzen wurden erneut ausgesät, und mittels Kanamycinresistenz auf Homozygotie überprüft (T2-Generation). Eine heterozygote Einzelinsertionslinie weist hierbei ein Spaltverhältnis von 3:1 (resistente: nicht resistente Pflanzen) auf, während homozygote Pflanzen keine Segregation zeigen. Es wurden ausschließlich homozygote Pflanzen für die experimentelle Bestimmung der Lokalisation genutzt (T3-Generation). Die Analyse des Gewebes, in denen der *AtIDS9* Promotor aktiv war und bei denen somit eine Blaufärbung auftrat, erfolgte nach GUS-Färbung von homozygoten Pflanzen mittels eines Durchlichtmikroskops.

Die mikroskopische Analyse der stabil transformierten *A. thaliana* Pflanzen zeigte, dass die β -Glucuronidase unter der Kontrolle des putativen *AtIDS9* Promotors in jungen Pflanzen (fünf Tage alt) nahezu in der gesamten Pflanze, hauptsächlich aber in den Keimblättern und in den Wurzelspitzen, exprimiert war (Abbildung 17B). In älteren Pflanzen (zehn Tage alt) hingegen war die Hauptpromotoraktivität in den Wurzeln und in den sich gerade entwickelnden Blättern anzutreffen (Abbildung 17C). Die Promotoraktivität in den Wurzeln beschränkte sich dabei hauptsächlich auf die Spitzen der Haupt- und Seitenwurzel (Abbildung 17C und 17D). Jedoch konnte in einem geringeren Maße

auch in Bereichen der Hauptwurzel β -Glucuronidase Aktivität detektiert werden (Abbildung 17C und E). Ein Vergleich des Expressionsmusters von fünf und zehn Tage alten *A. thaliana* Pflanzen belegt eine zeitlich und räumlich unterschiedliche Expression des *AtIDS9*-Gens in verschiedenen Organen junger und adulter Pflanzen, mit einer Promotoraktivität hauptsächlich in sich entwickelnden Organen.

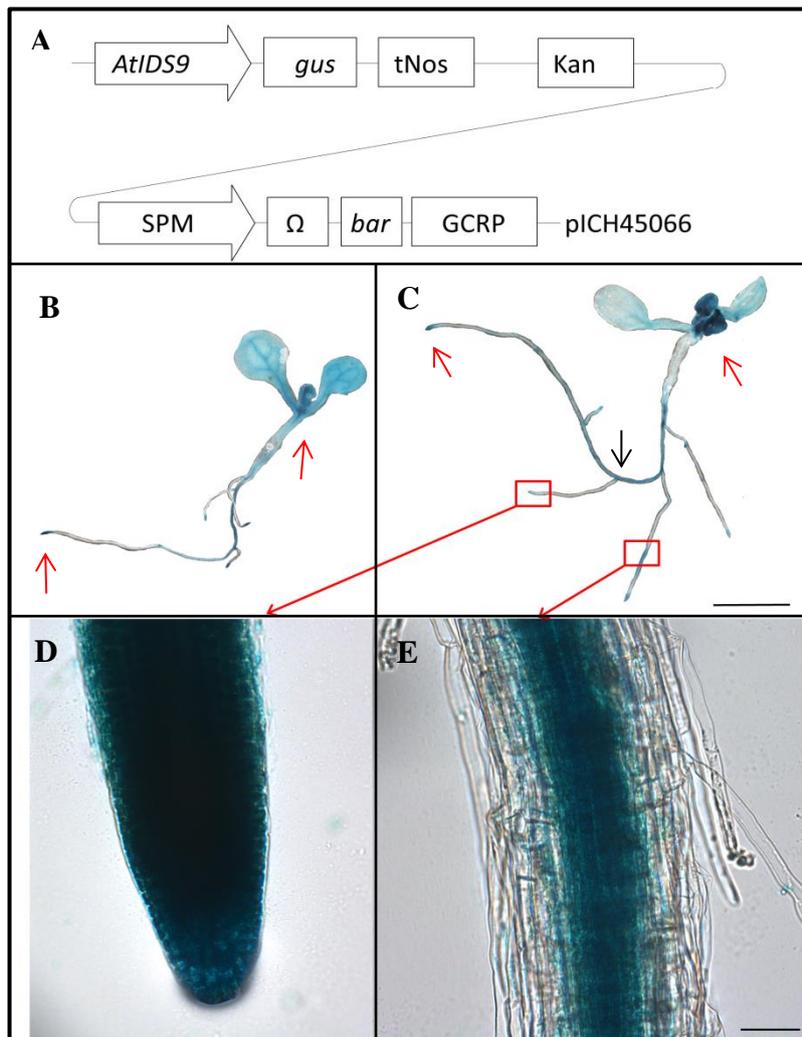


Abbildung 17: Histochemische Lokalisation der *AtIDS9* Promotoraktivität in 5 und 10 Tage alten transgenen *A. thaliana* Pflanzen. (A) *AtIDS9* Promotor::*GUS* Fusionskonstrukt. Ein 1,2 kb Promotorelement abwärts des *AtIDS9*-Genes wurde an das β -Glucuronidase (*gus*) Gen und den *Nos* Terminator gekoppelt und in den T-DNA Vektor pICH45066 kloniert. Zur Selektion positiv transformierter Pflanzen und zum Test auf Homozygotie wurde das *bar* Gen und das Kanamycin Resistenzgen genutzt. (B-C) *GUS*-Aktivitätsmuster des *AtIDS9*-Promotor::*GUS* Fusionskonstrukts in (B) fünf Tage und (C) zehn Tage alten *A. thaliana* Pflanzen. Rote Pfeile markieren Bereiche mit hoher Promotoraktivität, der schwarze Pfeil Bereiche mit geringerer Promotoraktivität. Maßstab: 5 mm. (D) Hauptaktivität des *AtIDS9*-Promotors von zehn Tage alten Pflanzen in der Wurzelspitze. (E) Aktivität des *AtIDS9*-Promotors innerhalb der Hauptwurzel. Maßstab: 50 μ m. SPM Promotor: aus *Zea mays*; GCRP= Glycin-reiches Protein Terminator aus *A. thaliana* (At1g67870), *bar* = Phosphinotricin-Acetyltransferase

Ergebnisse

Um einen detaillierteren Einblick in die zelluläre Expression der *AtIDS9* zu erhalten, wurden die Wurzeln in PEG 1500 eingebettet und Dünnschnitte erstellt (2.5.3 - 2.5.4). Hierbei zeigte sich, dass hauptsächlich das Leitgewebe der Wurzelmitte eine Blaufärbung und damit eine GUS-Aktivität aufwies. Zusätzlich war aber auch im Kortex und der Rhizodermis eine Aktivität detektierbar (Abbildung 18A und C). In den Wurzelspitzen hingegen zeigten alle Zellen eine starke Blaufärbung (Abbildung 18B und D).

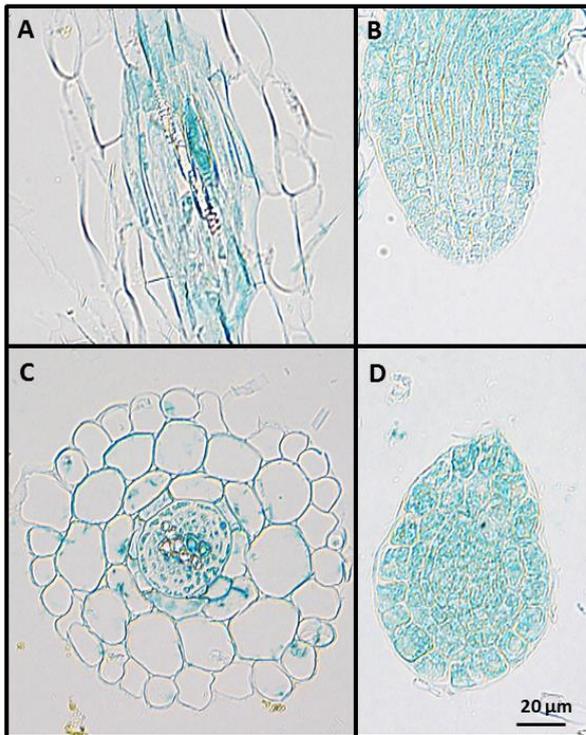


Abbildung 18: Histochemische Schnitte von stabil transformierten und GUS gefärbten *A. thaliana* Wurzeln (zwölf Tage alt) zur Ermittlung der Promotoraktivität der *AtIDS9*. (A) Längsschnitt der Wurzelmitte, (B) Längsschnitt der Wurzelspitze, (C) Querschnitt der Wurzelmitte und (D) Querschnitt der Wurzelspitze.

3.4.2 Subzelluläre Lokalisation

Die IDS sind laut Literaturangaben in der Pflanze dort lokalisiert, wo sie auch katalytisch aktiv sind (Gray, 1987; Kleining, 1989). Demnach können sie im Zytosol, im endoplasmatischen Retikulum, in den Mitochondrien oder in den Plastiden anzutreffen sein, wobei die Mitochondrien und die Plastiden die Hauptkompartimente für die Synthese von Isoprenyldiphosphaten darstellen (Abbildung 4, Stoffwechselnetzwerk von Vranová *et al.*, 2011).

Um Aussagen über die subzelluläre Lokalisation der *AtIDS9* treffen zu können, wurde zunächst die Vollängengensequenz der *AtIDS9* C-terminal mit *eGFP* fusioniert (unter Kontrolle des *CaMV 35S* Promotors) und in einen T-DNA Vektor (pICH75044) kloniert. Dieses Konstrukt wurde für eine transiente Expression des Fusionsproteins in *N. benthamiana* Blättern genutzt. Nach dreitägiger Expression wurden die Fluoreszenzsignale detektiert.

Dabei zeigte sich, dass das Fusionsprotein AtIDS9-eGFP (grün) in den Plastiden (violett) lokalisiert war (Abbildung 19A, B). Hierbei war das Zielprotein jedoch nicht gleichmäßig im Stroma der Plastiden verteilt, sondern bildete punktförmige Aggregate. Um einen Eindruck zu erhalten, ob es sich bei den Aggregaten um Plastoglobuli, den sogenannten Lipid-Protein Partikel der Plastiden, handelt oder um unlösliche Proteinaggregate, wurde die aus *A. thaliana* stammende Phytoensynthase AtPSY, die von Shumskaya *et al.*, (2012) als Plastoglobuli lokalisiert beschrieben wurde, an das Fluoreszenzprotein mCherry fusioniert. Dieses Fusionsprotein konnte dann als Organellmarker genutzt werden (Abbildung 19C). Die Koexpression dieses Organellmarkers mit dem Fusionsprotein AtIDS9-eGFP ergab dabei, dass das eGFP Signal des AtIDS9-eGFP Fusionsproteins mit dem mCherry Signal des Organellmarkerproteins überlagerte (Abbildung 19D). Durch diese Aufnahmen konnten erste Hinweise gewonnen werden, dass die punktförmigen Aggregate, die das Fusionsprotein bildete, auf eine Lokalisation des Zielproteins in den Plastoglobuli zurückzuführen sind.

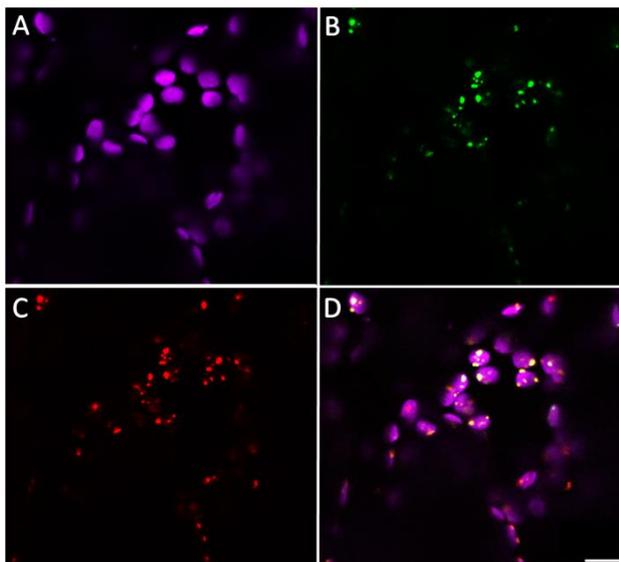


Abbildung 19: Subzelluläre Lokalisation des AtIDS9- eGFP Fusionsproteins. Konfokalmikroskopische Aufnahmen von *N. benthamiana* Plastiden, die das *AtIDS9-eGFP* Fusionskonstrukt transient exprimieren. (A) Chlorophyll a – Autofluoreszenz in violett, (B) *AtIDS9-eGFP* Fusionsprotein in grün, (C) *AtPSY-mCherry* Fusionsprotein als Plastoglobulimarker in rot, (D) Überlagerung der Plastiden Autofluoreszenz und der zwei Fusionsproteine in gelb. Maßstab: 10 µm

Einen deutlichen Hinweis, dass sich das AtIDS9-eGFP Fusionsprotein an einigen Stellen im Plastid auch im Inneren befindet, zeigen die Z-Stack Aufnahmen in Abbildung 20, indem alle drei Bildprojektionen eines dreidimensionalen Bildes (X-Y-Z) dargestellt sind. Im Z-Stack war zu erkennen, dass an mehreren Stellen das eGFP Signal (grün) in allen Dimensionen von der Chlorophyll a Autofluoreszenz der Plastiden (violett) umgeben war, woraus hervorgeht, dass sich das Fusionsprotein auch im Inneren der Plastiden befindet.

Ergebnisse

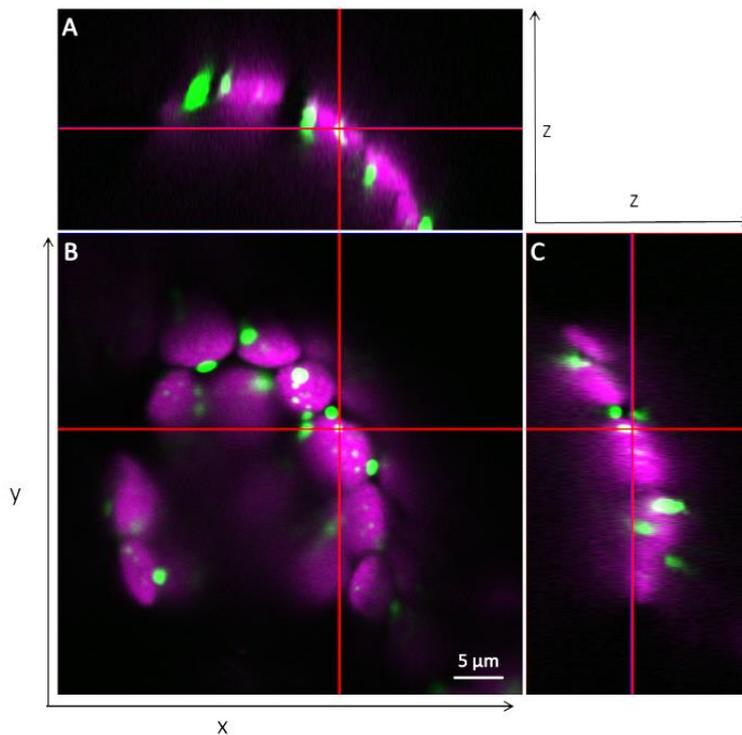


Abbildung 20: Subzelluläre Lokalisation des AtIDS9-eGFP Fusionsproteins im Inneren der Plastiden. Konfokalmikroskopische Z-Stack Aufnahmen von *N. benthamiana* Plastiden (violett), die transient das *AtIDS9-eGFP* Fusionskonstrukt (grün) exprimieren. In (A) ist die X-Z Projektion, in (B) die X-Y Projektion und in (C) die Y-Z Projektion gezeigt. Die roten Linien markieren die jeweils dargestellte Position im dreidimensionalen Bild. Diese Position zeigt das eGFP Signal umgeben von der Chlorophyll a Autofluoreszenz (violett).

3.4.3 Subzelluläre Lokalisation weiterer AtIDS, die GFDP produzieren

Wie von Nagel *et al.*, (2015) postuliert wurde, produziert nicht nur die AtIDS9 GFDP, sondern auch die Isoenzyme AtIDS1, 6, 7 und 10. Die AtIDS9 wurde bereits in Abschnitt 3.4.2 als Plastiden-lokalisiert beschrieben. Um eine Zuordnung weiterer GFDP-synthetisierender Enzyme zu bestimmten Kompartimenten zu treffen, wurde zuerst *in silico* mit Hilfe der Programme TargetP und PSORT die Proteinsequenz dieser Enzyme auf mögliche Transitpeptide untersucht, die für einen Import in Plastiden oder Mitochondrien benötigt werden. Hierdurch sollte ein erster Eindruck von der Lokalisation der Enzyme entstehen. Im zweiten Schritt wurde dann die Lokalisation aller GFDP-synthetisierenden Enzyme, durch die Fusion der Gensequenz der jeweiligen IDS an eGFP, experimentell ermittelt. Die Ergebnisse der *in silico* Analyse der Lokalisation der AtIDS1, 6, 7, 9 und 10 sind in der nachfolgenden Tabelle 15 zusammengefasst. Die TargetP und PSORT Analysen der *A. thaliana* IDS Sequenzen zeigten hierbei, dass alle GFDP produzierenden AtIDS je ein putatives Transitpeptid aufweisen. Die AtIDS6, 7, 9 und 10 weisen dabei ein mögliches plastidäres Transitpeptid auf, während die AtIDS1 ein putatives mitochondriales Transitpeptid besitzt.

Tabelle 15: Analyse der putativen Transitpeptide GFDP produzierender IDS aus *A. thaliana* mittels TargetP und PSORT.

Protein	At-Nummer	TargetP	PSORT
AtIDS1	At1g49530	mitochondrial	mitochondrial
AtIDS6	At3g14530	plastidär	plastidär
AtIDS7	At3g14550	plastidär	plastidär
AtIDS9	At3g29430	plastidär	plastidär
AtIDS10	At3g32040	plastidär	plastidär

Um die *in silico* Daten experimentell zu überprüfen, wurden die ausgewählten IDS, wie bereits zuvor die *AtIDS9* (3.4.2), an die *eGFP* Sequenz (C-terminal) fusioniert und in *N. benthamiana* transient exprimiert. Die subzelluläre Lokalisation wurde dabei mit Hilfe von den entsprechenden koexprimierten Organellmarkern bestätigt. Als Plastoglobuli-Marker wurde erneut die *AtPSY-mCherry* verwendet. Als Marker für die Mitochondrien dienten die ersten 29 Aminosäuren (Transitpeptid) der Cytochrom c Oxidase IV aus Hefe (Nelson *et al.*, 2007).

Wie aus den Mikroskopieaufnahmen in Abbildung 21 deutlich wird, sind die *AtIDS6*, 7 und 10-*eGFP* Fusionsproteine, genau wie die *AtIDS9*, in den Plastiden lokalisiert. Wie bereits bei der *AtIDS9* bilden auch diese Fusionsproteine punktförmige Aggregate. Dadurch lag auch hier die Vermutung nahe, dass es sich bei den Aggregaten um Plastoglobuli handelt. Die deutliche Überlagerung der *eGFP*- und *mCherry* Signale bei gleichzeitiger Expression der *AtIDS-eGFPs* mit dem Organellmarker (*AtPSY-mCherry*) bestätigte diese Annahme. Die *AtIDS1-eGFP* wies dagegen eine andere Lokalisation auf. So zeigte das Fluoreszenzsignal des *AtIDS1-eGFP* Fusionsproteins eine Überlagerung mit der Cytochrom c Oxidase IV woraus sich eine Lokalisation in den Mitochondrien ableiten lässt (Abbildung 21).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse darauf hinweisen, dass in *A. thaliana* zwei Pools an GFDP existieren, die von unterschiedlichen IDS, einerseits in den Plastiden, andererseits in den Mitochondrien, produziert werden.

Ergebnisse

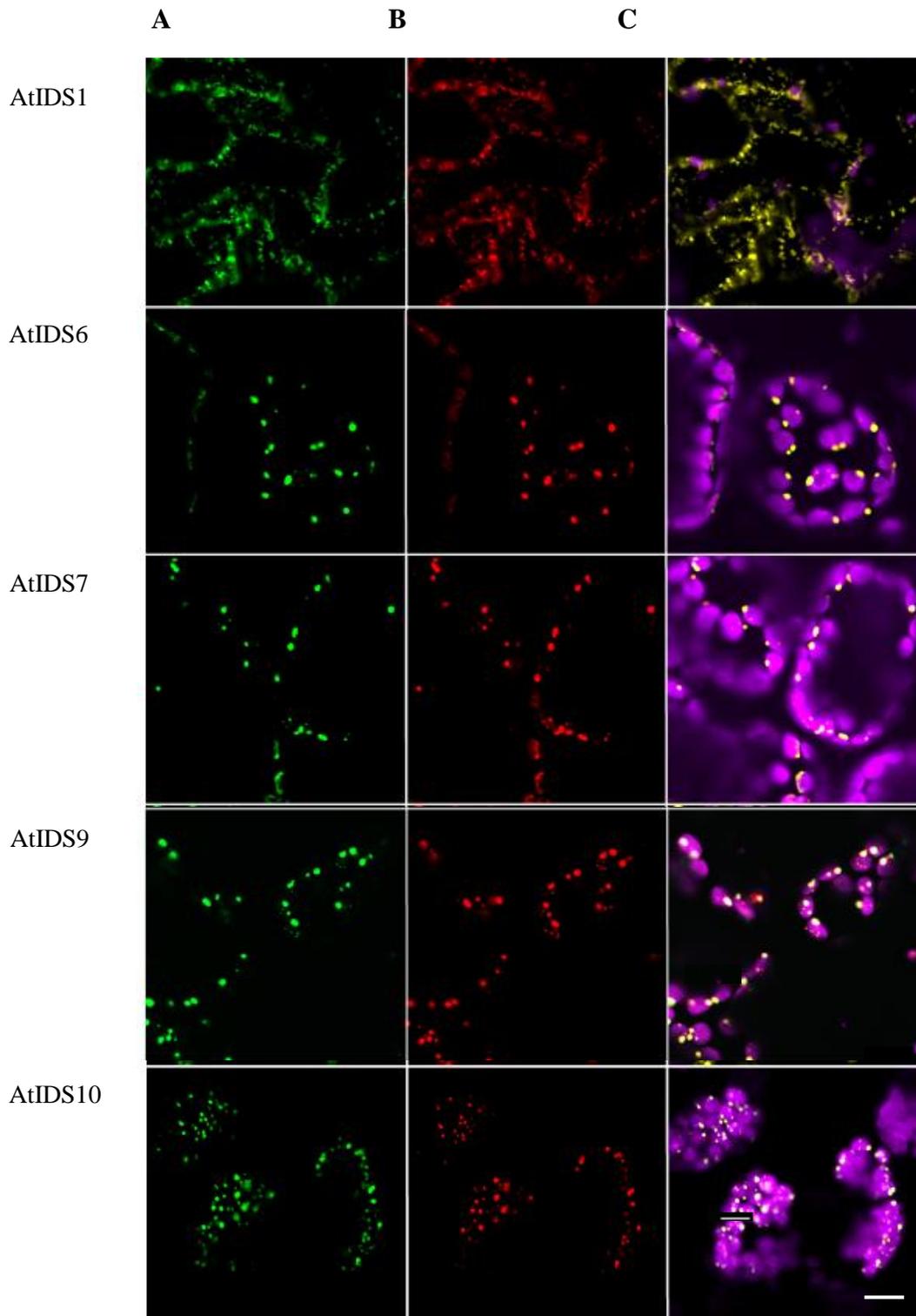


Abbildung 21: Subzelluläre Lokalisation der GFDP synthetisierenden Enzyme aus *A. thaliana*. Konfokalmikroskopische Aufnahmen von *N. benthamiana* Blättern, die je ein *GFDP Synthase-eGFP* Fusionskonstrukt und den entsprechenden Organellmarker transient koexprimieren. Die Spalte (A) zeigt das jeweilige IDS-eGFP Fusionsprotein (grün). Die Spalte (B) zeigt die mCherry Fluoreszenz des Mitochondrien Organellmarkers (AtIDS1) und des Plastoglobuli Organellmarkers (IDS6, 7, 9, und 10, rot). Bei dem Mitochondrien Organellmarker handelt es sich um die ersten 29 AS der Cytochrom c oxidase IV aus Hefe und bei dem Plastoglobuli Organellmarker um die Phytoensynthase AtPSY. Die Spalte (C) zeigt in Gelb die Überlagerung des AtIDS-eGFP Fusionsproteins mit dem jeweiligen Organellmarker und in Violett die Chlorophyll a Autofluoreszenz der Plastiden. Maßstabsbalken 10 μ m.

3.4.4 Transitpeptid-Studie

Bisher ist noch nicht bekannt wie der Transport von Proteinen in die Plastoglobuli abläuft (Bréhélin und Kessler, 2008). Wie in Abschnitt 3.4.2 gezeigt wurde, wird die AtIDS9 in die Plastiden der pflanzlichen Zelle transportiert und bildet dort punktförmige Aggregate, bei denen es sich mit einer hohen Wahrscheinlichkeit um Plastoglobuli handelt. Für diese Lokalisation wird ein Transitpeptid benötigt. Dieses kann in zwei Teile geteilt sein. Hier wird dann der erste Teil beim Transport vom Cytosol in die Plastiden verwendet und anschließend entfernt, der zweite Teil wird für den Übergang von den Plastiden in die Plastoglobuli benötigt. Es könnte aber auch die gesamte Aminosäuresequenz der Plastoglobuli lokalisierten Proteine für den Transport vonnöten sein, wobei die Sekundärstruktur der Proteine eine größere Rolle beim Transport in die Plastoglobuli spielen könnte (Vidi *et al.*, 2007). Um diese Vermutungen experimentell zu überprüfen, wurde zuerst die Länge des putativen Transitpeptides mittels TargetP vorhergesagt. Diese Transitpeptidsequenz wurde dann im darauffolgenden Schritt sukzessiv verlängert, um zu sehen, ob ab einer bestimmten Länge dieser Sequenz, ein Transport in die Plastoglobuli stattfindet.

Das mit TargetP ermittelte Transitpeptids der *AtIDS9* (81 bp bzw. 27 AS) wurde C-terminal an *eGFP* fusioniert. Das so erhaltene Fusionsprotein wurde anschließend transient in *N. benthamiana* exprimiert. Dabei zeigte sich, dass das Fusionsprotein ausschließlich im Zytosol der Zellen detektiert wurde (Abbildung 22B, C und D). Ein Transport in den Plastiden fand demnach nicht statt.

Nach dieser Analyse der Lokalisation des *AtIDS9*_{1-27 AS}-eGFPs wurde im nächsten Schritt ein Fusionsprotein mit einem um 15 Aminosäuren verlängertem Transitpeptid erstellt. Die Analyse der Lokalisation dieses Fusionsproteins zeigte eine Lokalisation im Stroma der Plastiden (Abbildung 22E, F, G). Dies zeigt, dass für den Transport des Proteins in die Plastiden ein Transitpeptid mit einer Länge zwischen 28 und 42 Aminosäuren benötigt wird. Für den Transport der *AtIDS9* in die Plastoglobuli, wird hingegen ein längeres Transitpeptid, oder sogar die gesamte Sequenz, benötigt (Abbildung 22H, I und J).

Ergebnisse

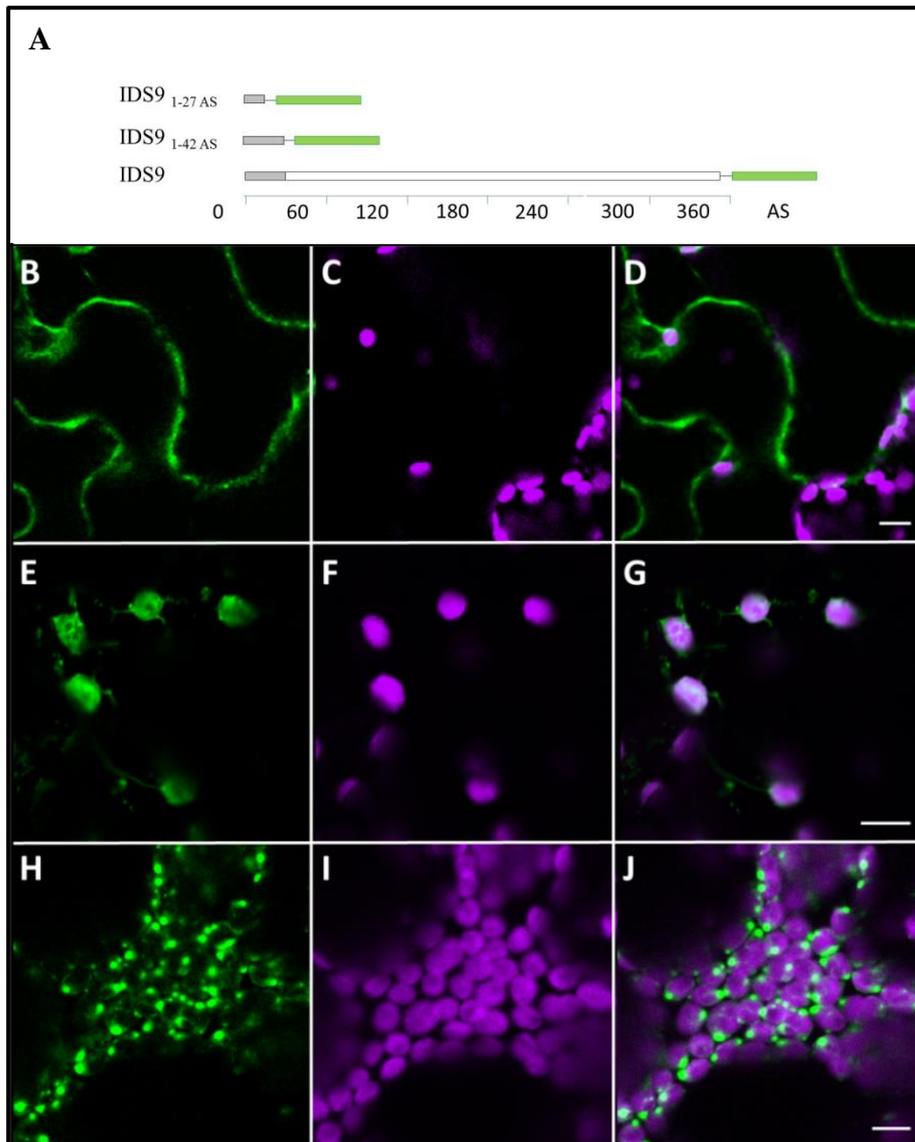


Abbildung 22: Transitpeptidstudie der AtIDS9. (A) Schematische Darstellung der verwendeten Fusionsproteine (putative Transitpeptidsequenz in grau, eGFP-Sequenz in grün). (B-J) Konfokalmikroskopische Aufnahmen von *N. benthamiana* Blättern, die das Fusionskonstrukt (B-D) *AtIDS9*_{1-27 AS}-eGFP, (E-G) *AtIDS9*_{1-42 AS}-eGFP oder (H-J) die Vollängensequenz der *AtIDS9*-eGFP exprimieren. In Grün ist die eGFP Fluoreszenz des jeweiligen Fusionsproteins und in Violett die Chlorophyll a Autofluoreszenz dargestellt. Die Überlagerung beider Fluoreszenzen wird in (D),(G) und (J) gezeigt. Maßstab 10 µm.

3.4.5 Interaktion der AtIDS9 mit der Terpensynthase AtTPS28

Die von den IDS produzierten C₅ - C₂₀ Isoprenyldiphosphate werden von Terpensynthasen (TPS) genutzt, um eine große Bandbreite an Terpenen zu synthetisieren (Degenhardt *et al.*, 2009). Im Rahmen dieser Arbeit sollten, neben der Charakterisierung der AtIDS9, auch Hinweise auf die weitere Verstoffwechslung ihrer Produkte (GFDP siehe 3.2), durch Terpensynthasen wie die AtTPS28 gewonnen werden. Hierfür wurden zunächst Kolokalisations-Experimente durchgeführt.

3.4.5.1 Lokalisation der AtTPS28

Um Anhaltspunkte über die weitere Umsetzung des GFDPs zu erhalten, wurde nach einem Enzym aus der Klasse der Terpensynthasen gesucht, welches das Produkt der AtIDS9 als Substrat verwenden kann, um daraus Sesterterpene zu synthetisieren. Bislang gibt es noch mehr als zwei Dutzend, noch nicht charakterisierte AtTPS. Von diesen kristallisierte sich die AtTPS28 (At1g48800) als besonders vielversprechend heraus, da einerseits eine übereinstimmende zeitlich-räumliche Lokalisation der AtIDS9 mit der AtTPS28 laut *eFP Browser 2.0* (<http://bar.utoronto.ca>) gegeben ist und dies mit den theoretischen Vorhersagen der Koexpression beider Proteine, die sich aus der ATTED-II Datenbank ergeben, übereinstimmen. Andererseits sind die Produkte der AtTPS28 noch unbekannt und somit besteht die Möglichkeit, dass diese AtTPS Sesterterpene produziert. Basierend darauf könnte eine sofortige Umsetzung des GFDPs in Sesterterpene erfolgen, sofern die AtIDS9 das produzierte GFDP an die AtTPS28 weitergibt. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurde experimentell analysiert, ob die AtIDS9 und die AtTPS28 tatsächlich die gleiche Lokalisation aufweisen.

Die experimentelle Analyse der Kolokalisation der AtIDS9 und der AtTPS28 erfolgte dabei auf zwei Wegen, zuerst durch die Koexpression der *AtTPS28* mit dem Plastoglobuli-Organellmarker *AtPSY* (Anhang: Abbildung 1), danach durch die Koexpression mit der *AtIDS9* (Abbildung 23). Die in Anhang: Abbildung 1 dargestellten konfokalmikroskopischen Bilder zeigen die Koexpression der *AtTPS28-eGFP* mit dem Plastoglobuli-Markerkonstrukt *AtPSY-mCherry*. Die Überlagerung beider Fluoreszenzen bestätigt, dass die AtTPS28 mit einer hohen Wahrscheinlichkeit ebenfalls in den Plastoglobuli akkumuliert. Die AtTPS28 hat demzufolge die gleiche Lokalisation in den Plastiden wie die AtIDS9. Dieses Ergebnis wurde durch die Koexpression der *AtIDS9* mit der *TPS28*

Ergebnisse

bestätigt (Abbildung 23). Auch hier zeigten die mikroskopischen Aufnahmen eine deutliche Übereinstimmung beider Fluoreszenzsignale.

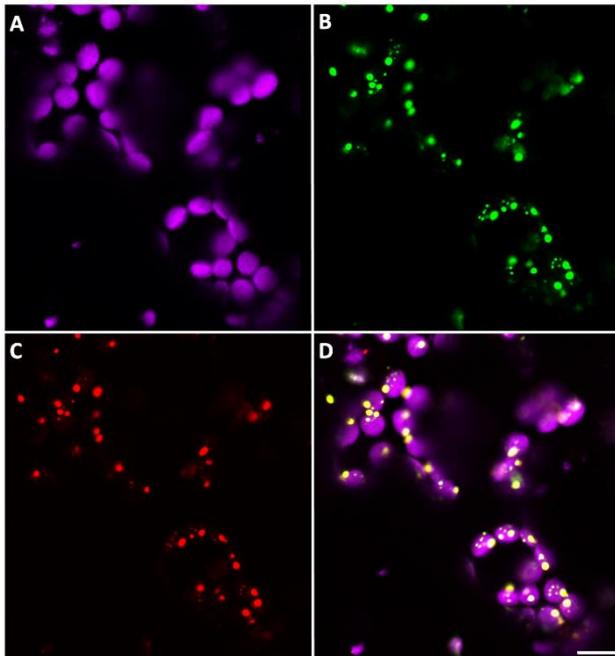


Abbildung 23: Subzelluläre Kolokalisation der Fusionsproteine AtTPS28-mCherry und AtIDS9-eGFP. Konfokalmikroskopische Aufnahmen von *N. benthamiana* Plastiden die die Fusionskonstrukte *AtIDS9-eGFP* und *AtTPS28-mCherry* transient exprimieren. (A) Chlorophyll a Autofluoreszenz in violett, (B) *AtIDS9-eGFP* Fusionsprotein in grün, (C) *AtTPS28-mCherry* Fusionsprotein in rot sowie (D) die Überlagerung beider Fusionsproteine (gelb) und der Chlorophyll a Autofluoreszenz (violett). Maßstab 10 µm.

3.4.5.2 Abstand der *AtIDS9* zur *AtTPS28*

Nachdem durch die Kolokalisationsexperimente gezeigt werden konnte, dass die *AtIDS9* und die *AtTPS28* die selbe Lokalisation aufwiesen, sollte im zweiten Schritt überprüft werden, ob der Abstand beider Proteine gering genug war, um eine direkte Weitergabe der Produkte der *AtIDS9* an die *AtTPS28* zu ermöglichen. Hierfür, wurden Förster-Resonanz-Energietransfer (FRET) Messungen an infiltrierten *N. benthamiana* Blättern durchgeführt. Exprimiert wurden dabei entweder nur die *AtIDS9-eGFP*, nur die *AtTPS28-mCherry* oder beide Konstrukte gleichzeitig. Um eine übersichtliche Darstellung der Ergebnisse zu ermöglichen, werden im nachfolgenden Text nur die konfokalmikroskopischen Aufnahmen, des Experimentes in dem beide Gene koexprimiert wurden, gezeigt und beschrieben.

Die in Abbildungen 24A und D dargestellten Fluoreszenzmessungen zeigten, dass die Anregung der *AtIDS9-eGFP*-Fluoreszenz (488 nm) bei Expression beider Proteine nicht zu einer Anregung der *AtTPS28-mCherry*-Fluoreszenz führte. Dies weist darauf hin, dass zwischen beiden Fluoreszenzproteinen kein Förster-Resonanz-Energietransfer (FRET) stattfand. Dies lässt darauf schließen, dass der Abstand der *AtIDS9* und *AtTPS28* für einen FRET zu groß ist, was wiederum nahelegt, dass eine direkte Weitergabe der *AtIDS9*

Produkte an die AtTPS28 unter den gewählten Bedingungen nicht stattfindet. Die restlichen Abbildungen dienten als Kontrollen und zeigen, dass beide Fusionsproteine gebildet wurden (Abbildung 24C, F und I) und bei der jeweiligen Anregungswellenlänge das jeweils erwartete Fluoreszenzsignal (Abbildung 24B, E, H und C, F und I) zeigten.

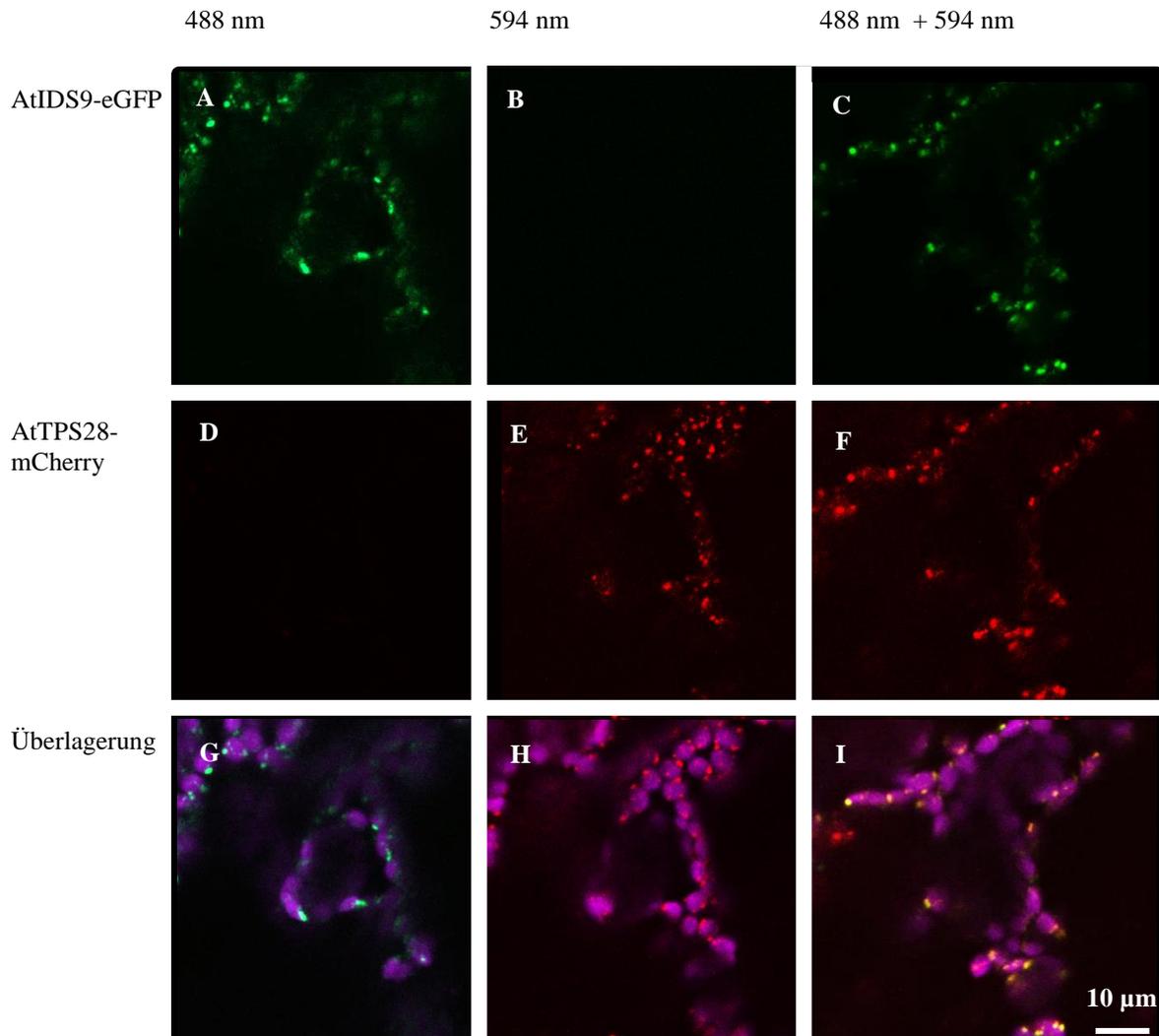


Abbildung 24: Abstandsmessungen zwischen den Fusionsproteinen AtIDS9-eGFP und TPS28-mCherry. Konfokalmikroskopische Aufnahmen von *N. benthamiana* Blättern, die die Fusionskonstrukte *AtIDS9-eGFP* und *AtTPS28-mCherry* transient koexprimieren. In der ersten Reihe (**A, B, C**) ist das *AtIDS9-eGFP* Fluoreszenzsignal in grün, in der zweiten Reihe (**D, E, F**) das *AtTPS28-mCherry* Fluoreszenzsignal in rot dargestellt. In der dritten Reihe (**G, H, I**) ist die Chlorophyll a Autofluoreszenz in violett und die Überlagerung aller aufgetretener Signale dargestellt. In der ersten Spalte (**A, D, G**) wurde nur die eGFP Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 488 nm angeregt. In der zweiten Spalte (**B, E, H**) wurde nur die mCherry Fluoreszenz bei einer Wellenlänge 561 nm angeregt. In der dritten Spalte (**C, F, I**) wurden beide Anregungswellenlängen gleichzeitig verwendet. Die Chlorophyll a Autofluoreszenz wurde bei 488 nm angeregt (**G,H,I**). Beim Auftreten von FRET zwischen den beiden Proteinen, wäre in Abbildung (**D**) nur durch die Anregung des eGFP's das mCherry Signal aufgetreten.

3.5 Erste Einblicke in die biologische Funktion der AtIDS9

Kurzketten-IDS, die GFDP produzieren, wurden im Vergleich zu GDP-, FDP- oder GGDP-synthetisierenden IDS bisher nur unzureichend beschrieben. Demnach ist bislang auch nicht viel über die biologische Funktion von GFDP in den verschiedenen Organismen bekannt. In diesem Abschnitt sollen erste Eindrücke über die biologische Funktion der AtIDS9 in Pflanzen erhalten werden. Hierfür wurden phänotypische Analysen von *A. thaliana* T-DNA Insertionsmutanten (T-DNA Insertion in der 3'UTR der *AtIDS9* Sequenz) und stabil transformierten *N. tabacum* Pflanzen (*AtIDS9* Überexpressionslinien) durchgeführt.

3.5.1 Identifizierung und Charakterisierung von T-DNA Insertionsmutanten

Um die biologische Funktion der *AtIDS9* näher zu charakterisieren, wurden *single* T-DNA Insertionsmutanten von *A. thaliana* (Col-0) aus der Salk Kollektion genutzt (N769707). Die Untersuchung dieser Pflanzen sollte zeigen, welcher Phänotyp in *A. thaliana* auftritt, wenn das Gen durch eine T-DNA Insertion in der 3'UTR unterbrochen und somit potenziell funktionslos wird. Hierbei wurde ein besonderes Augenmerk auf die Morphologie der Wurzel gelegt, da das Gen vermehrt in den Wurzeln exprimiert ist (3.4.1). Das auch eine Insertion in der 3'UTR Konsequenzen auf die Funktionalität des Gens hat wird durch Forschungsergebnisse deutlich die zeigen, dass UTR`s eine wichtige Rolle in der post-transkriptionalen Regulierung der Genexpression spielen. Dies beinhaltet die Regulierung des Transports der mRNAs aus dem Nukleus raus, die Translationseffizienz (Van der Velden *et al.*, 1999), die subzelluläre Lokalisation (Jansen *et al.*, 2001) und die Stabilität der mRNA (Bashirullah *et al.*, 2001).

Im ersten Schritt wurden dafür die vorhandenen T-DNA Insertionsmutanten mittels PCR auf Homozygotie der T-DNA Insertion überprüft (Anhang: Abbildung 5). Von den homozygoten Pflanzen (T1-Generation) wurden Samen geerntet und die T2 Generation angezogen. Pflanzen, die in der T1-Generation keine T-DNA Insertion besaßen, wurden als Kontrollpflanzen für die phänotypische Charakterisierung verwendet. Die Anzucht der Pflanzen erfolgte hierbei auf Vertikalplatten, wodurch eine gute Beobachtung des Wurzelwachstums ermöglicht wurde. Ab dem zweiten Tag nach dem Keimen wurden im Abstand von jeweils zwei Tagen Fotos von den Pflanzen gemacht und die Wurzellänge bestimmt. Die Analyse der Wurzellänge zeigte dabei, dass die T-DNA Insertionsmutanten ein im Vergleich zu den Kontrollpflanzen erhöhtes Wurzelwachstum aufwiesen. Dies konnte

sowohl rein optisch als auch statistisch erfasst werden (Abbildung 25). So wird in Abbildung 25 anhand der roten Linien deutlich, dass die Wurzel jeder T-DNA Insertionslinie länger als die der Kontrollpflanzen war. Zusätzlich zeigten die ermittelten Wurzellängen (Abbildung 25) ein signifikant erhöhtes Wurzelwachstum der T-DNA Insertionslinien an, im Vergleich zum Wildtyp. Die grünen, oberirdischen Organe der T-DNA Insertionsmutanten wiesen dagegen keine sichtbare Veränderung des Phänotyps auf.

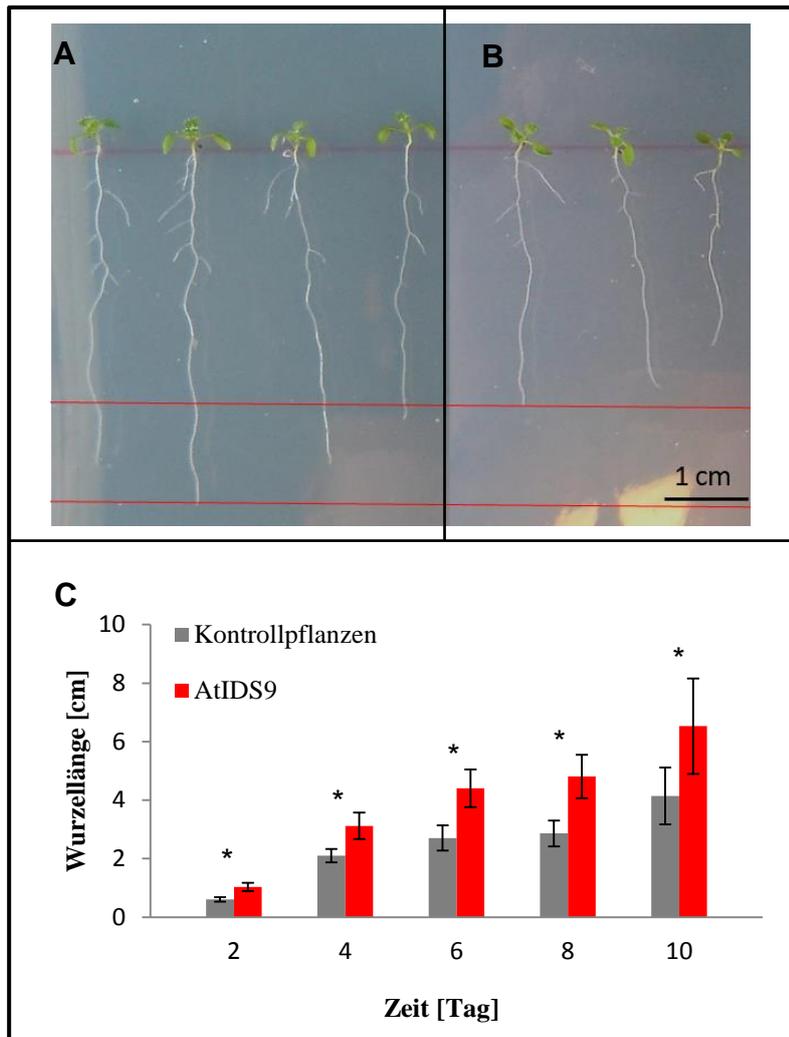


Abbildung 25: Phänotypische Analyse von *AtIDS9* T-DNA Insertionslinien. (A) *A. thaliana* Pflanzen (zwölf Tage alt) mit T-DNA Insertion in der *AtIDS9* und (B) Kontrollpflanzen (Col-0). Die obere rote Linie markiert den Bereich der längsten Wurzel der Kontrollpflanze und die untere rote Linie den der T-DNA Insertionslinie. (C) Grafische Darstellung der Wurzellängen der *AtIDS9* T-DNA Insertionslinie. Die Länge der Hauptwurzel der Kontrollpflanzen (grau) und der *AtIDS9* T-DNA Insertionslinien (rot) wurde für eine Woche fotografisch verfolgt und mit Hilfe des Computerprogramms „rootDetection 0.1.2“ analysiert. n=3, * = p ≤ 0,05.

Ergebnisse

3.5.2 AtIDS9 Überexpressionslinien- eine phänotypische Analyse

Neben der Analyse der T-DNA Insertionslinie wurden auch stabile Überexpressionslinien der *AtIDS9* in *N. tabacum* (3H02; besitzt keine funktionelle *NtCPS2* und *NtCBTS* und produziert dadurch keine Diterpene) generiert und auf phänotypische Veränderungen analysiert.

Hierfür wurden die in Abbildungen 26 dargestellten Konstrukte verwendet. Bei diesen Konstrukten wurde die *AtIDS9* vom *CBTS2a* Promotor und Terminator (*Cembratrienol Synthase* aus *N. sylvestris*) flankiert. Das Konstrukt in Abbildung 26A besaß zusätzlich einen *35S Enhancer* (Tabakmosaikvirus basiertes Replikon, Marillonnet *et al.*, 2005) im Gegensatz zu dem Konstrukt in der Abbildung 26B. Der *35S Enhancer* wurde verwendet, um eine stärkere Expression des Zielproteins zu ermöglichen. Als Kontrolle dienten Pflanzen, die nur das Kanamycin Resistenzgen trugen (Abbildung 26C).

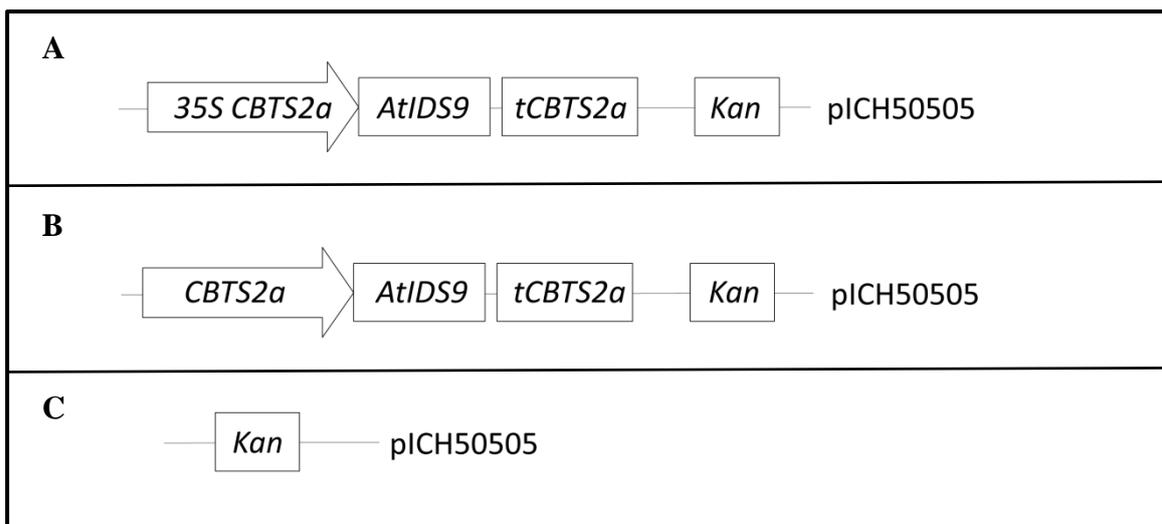


Abbildung 26: Verwendete Konstrukte zur Generierung von *AtIDS9* Überexpressionslinien (*N. tabacum*). Die Gensequenz der *AtIDS9* wurde von dem Promotor und Terminator der *Cembratrienol Synthase* (*CBTS2a*) aus *N. sylvestris* flankiert und in den Vektor pICH50505 mit Kanamycin-Resistenz eingebracht. Das Konstrukt in (A) besaß zusätzlich vor dem Promotor noch einen *35S Enhancer* zur Verstärkung der Expression, während das Konstrukt in (B) keinen *35S Enhancer* besaß. (C) Als Kontrolle wurde der leere pICH50505 Vektor mit Kanamycin-Resistenz verwendet.

3.5.3 Ektopische Expression durch den verwendeten Trichom-spezifischen

Promotor

Der für die Expression der *AtIDS9* genutzte Promotor und Terminator stammte von der *Cembratrienol Synthase (CBTS2a)* aus *N. sylvestris*, die in der Literatur als Trichom-spezifisch beschrieben wird (Ennajdaoui *et al.*, 2010). Ob der verwendete *CBTS2a* Promotor in Kombination mit dem *35S Enhancer* in *N. benthamiana* tatsächlich nur zu einer Expression in den Trichomen führt oder ob er auch außerhalb dieses Expressionsortes (ektopisch) Aktivität aufweist, sollte zunächst experimentell überprüft werden. Dieses Wissen stellt eine Grundlage für die weiteren phänotypischen Analysen der transgenen *N. tabacum* Pflanzen dar.

Zur Ermittlung des Expressionsortes wurde das Gen der β -Glucuronidase unter Kontrolle des *CBTS2a* Promotors mit zusätzlichem *35S Enhancer* und *CBTS2a* Terminator stabil in *N. tabacum* exprimiert (Abbildung 27A). Ein anschließender GUS-Assay gab Aufschluss darüber, in welchen Zellen die β -Glucuronidase und damit auch der *CBTS2a* Promotor aktiv ist. Aus den in Abbildung 27C dargestellten Durchlichtmikroskopaufnahmen wird deutlich, dass nicht nur in den Trichomen (Abbildung 27B), sondern in der gesamten Epidermis (Abbildung 27C) eine Aktivität der β -Glucuronidase vorliegt. In den Kontrollpflanzen, die nur das Kanamycin Resistenzgen trugen, ist hingegen keine β -Glucuronidaseaktivität zu beobachten (Abbildung 27D und E). Demnach ist der Promotor der *CBTS2a* nicht nur in den Trichomen aktiv, sondern es fand zusätzlich eine ektopische Expression in den Blättern statt. Die Betrachtung des Phänotyps der stabil transformierten *AtIDS9* Überexpressionslinien (*N. tabacum*) erfolgt demnach unter dem Gesichtspunkt, dass auch in den Blättern eine Überexpression der *AtIDS9* vorliegen kann.

Ergebnisse

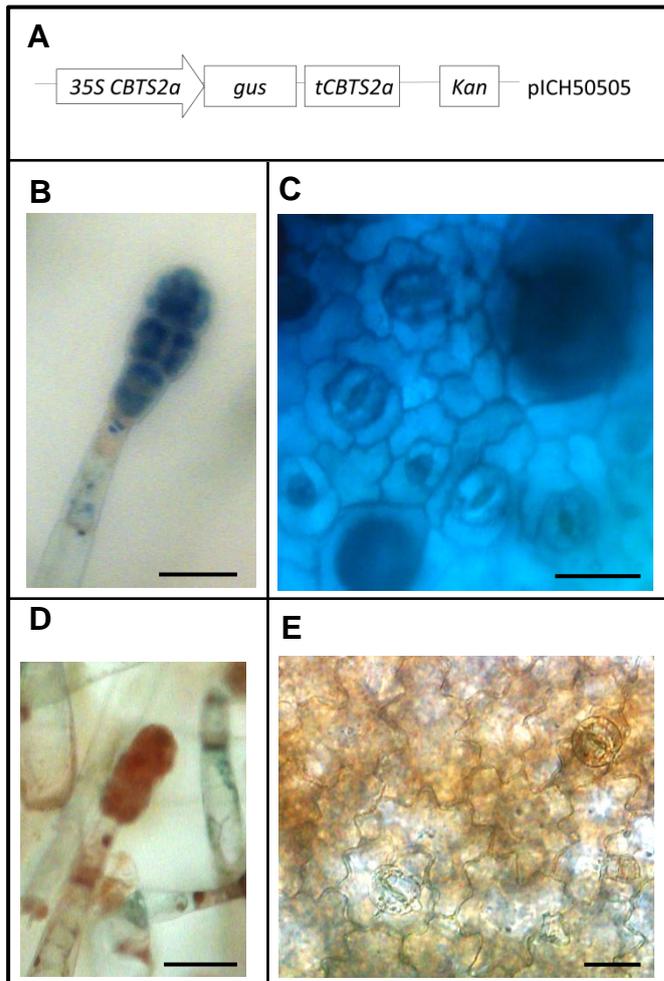


Abbildung 27: GUS Färbung von vier Wochen alten stabil transformierten *N. tabacum* Pflanzen. (A) Konstrukt zur Expression des β -Glucuronidase Gens (*gus*) unter dem putativem Trichom-spezifischem Promotor und Terminator der *CBTS2a* mit *35S Enhancer* und Kanamycinresistenz zur Selektion positiv transformierter Pflanzen. Durchlichtmikroskopische Aufnahmen von (B) GUS gefärbten *N. tabacum* Trichomen und (C) Blättern von Pflanzen die das β -Glucuronidase-Gen unter dem putativem Trichom-spezifischem Promotor und Terminator der *CBTS2a* exprimieren sowie von den (D) Trichomen und (E) Blättern von Pflanzen die nur die Kanamycin-Resistenz besitzen. Maßstabsbalken= 40 μ m

3.5.4 Bestimmung der Anzahl an Insertionen in den transgenen Pflanzen mittels qPCR

Die Ermittlung der Anzahl an Insertionen in den stabil transformierten Pflanzen wurde mittels qPCR durchgeführt. Hierdurch konnte zunächst nachgewiesen werden, dass 16 transformierte Pflanzen mindestens eine Insertion des Zielgens aufwiesen, wobei die Anzahl an Insertionen zwischen den Pflanzen variiert (Abbildung 28).

Von den elf Pflanzen, die das Konstrukt ohne *35S Enhancer* ins Genom eingebaut hatten, hatten nur vier Pflanzen lediglich eine Insertion. Die anderen sieben Pflanzen wiesen zwei oder mehr Insertionen auf. Bei den Pflanzen, die mit dem Konstrukt mit *35S Enhancer* transformiert wurden, lag die Anzahl der positiv transformierten Pflanzen hingegen nur bei fünf. Von diesen fünf Pflanzen trug nur eine mehr als drei Insertionen, zwei weitere Pflanzen schienen zwei Insertionen des Zielkonstrukts zu besitzen und die anderen zwei Pflanzen trugen eine Insertion. Da durch die qPCR Analyse bei Pflanze 2 (mit *35S Enhancer*) keine klare Aussage getätigt werden konnte, ob diese Pflanze nur eine Insertion

trug, oder doch zwei wurde auch diese für die weitere Überprüfung der Insertionsanzahl mittels Segregationsanalyse verwendet.

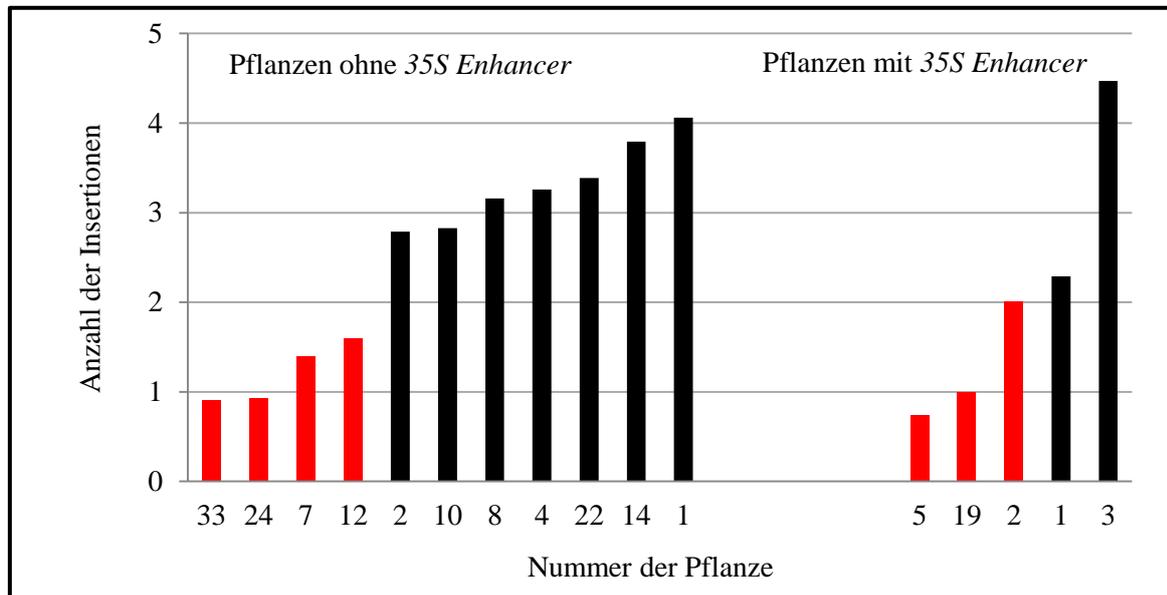


Abbildung 28: Bestimmung der Anzahl an Insertionen in den *AtIDS9* überexprimierenden *N. tabacum* Pflanzen. In schwarz sind Pflanzen dargestellt, die mehr als eine Insertion besitzen und in rot Pflanzen, die laut der qPCR Analyse nur eine Insertion besitzen.

3.5.5 Bestimmung der Anzahl an Insertionen in den transgenen Pflanzen mittels Segregationsanalysen

Um sicher zu sein, dass die transgenen Pflanzen für die phänotypische Analyse wirklich nur eine Insertion des Zielgens trugen, wurde in einem zweiten Ansatz von den Pflanzen, die laut qPCR Analyse nur eine Insertion besaßen, zusätzlich das Segregationsverhältnis resistenter und sensibler Keimlinge bestimmt. Hierfür wurden von jeder dieser Pflanzen ca. 300 Samen (T2-Generation) auf Agar mit Kanamycin angezogen. Bei T1 Pflanzen, bei denen das Zielgen nur auf einem Chromosom eingebaut wurde, würde in der T2 Generation ein Verhältnis von resistenten zu sensiblen Pflanzen von 3:1 (75% : 25%) erwartet werden. Wäre das Zielgen hingegen zweimal im Genom eingebaut worden, würde man ein Segregationsverhältnis von 15:1 (93,75% resistent : 6,25% sensitiv) erwarten. Die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von drei oder mehr Integrationsereignissen wurde nicht in die Betrachtung einbezogen, da dies aufgrund der qPCR-Daten sehr unwahrscheinlich erschien.

Ergebnisse

In der nachfolgenden Tabelle 16 sind die Segregationsverhältnisse der ausgewählten transgenen Pflanzen aufgelistet. Betrachtet man das erhaltene Segregationsverhältnis dieser Pflanzen, die laut qPCR nur eine Insertion besitzen, so wird sichtbar, dass auch die Segregationsanalyse bei allen Pflanzen auf eine einzelne Insertion des Zielproteins hinweist. Demzufolge stimmten die Ergebnisse der Segregationsanalyse mit denen der qPCR Analyse überein. Aus diesem Grund wurde davon ausgegangen, dass die Pflanzen, die für die phänotypische Charakterisierung genutzt wurden, tatsächlich nur eine Insertion des Zielgens trugen.

Tabelle 16: Segregationsverhältnisse der stabil transformierten Pflanzen, die laut qPCR Analyse nur eine Insertion des Zielgens tragen.

Nr. der Pflanze	Verhältnis		Anzahl der Insertionen
	sensitiv	: resistant	
<u>Pflanzen ohne 35S Enhancer</u>			
7	22 %	78 %	1
12	15 %	85 %	1
24	20 %	80 %	1
33	21 %	79 %	1
<u>Pflanzen mit 35S Enhancer</u>			
2	17%	83%	1
5	27%	73%	1
19	24%	76%	1

3.5.6 Phänotypische Charakterisierung der transgenen Pflanzen

Bei der Betrachtung der transgenen *N. tabacum* Pflanzen, welche die *AtIDS9* mit dem *35S Enhancer* als Insertion trugen, fiel als erstes auf, dass die konstitutive *AtIDS9* Expression zu einem, im Vergleich mit den Kontrollpflanzen, stark vermindertem Längenwachstum sowie zu einer verspäteten Seneszenz führte (Abbildung 29A). Des Weiteren konnten an den Blättern der Überexpressionslinien Bereiche mit einer starken Gelbfärbung detektiert werden (Abbildung 29B). Die Pflanzen, die die *AtIDS9* ohne den *35S Enhancer* exprimierten, zeigten hingegen keinen veränderten Phänotyp (Abbildung 29A).

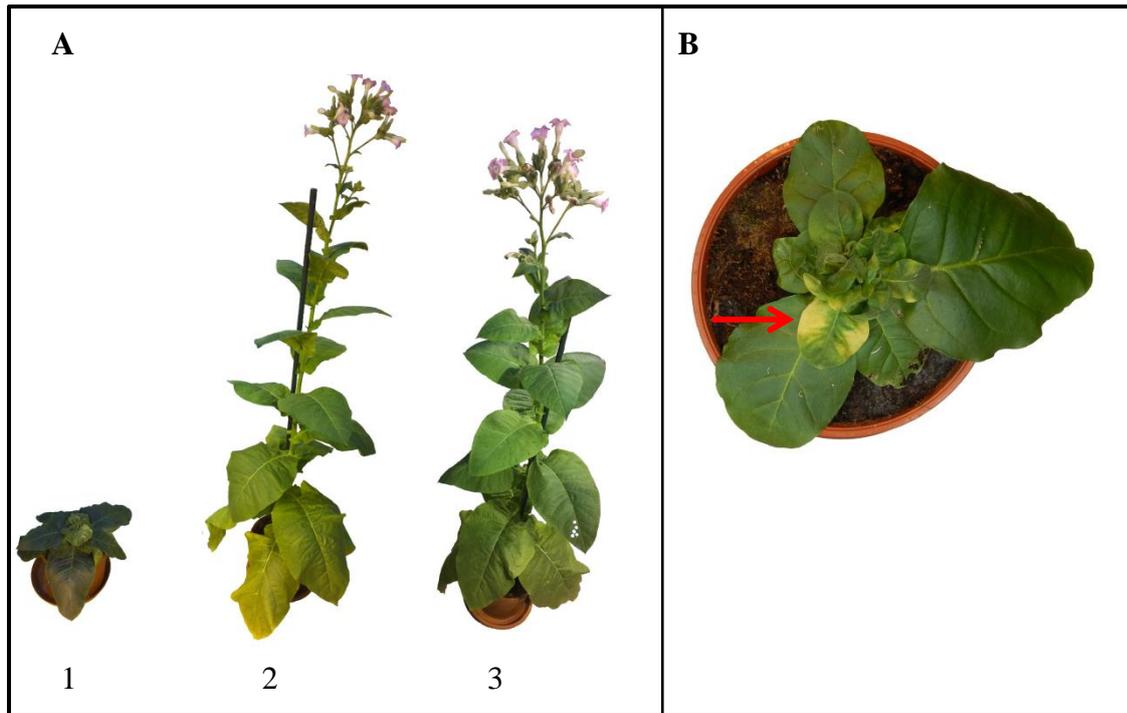


Abbildung 29: Phänotypische Analyse der *AtIDS9* überexprimierenden stabil transformierten *N. tabacum* Pflanzen. (A) Stabil transformierte Pflanze die die *AtIDS9* (1) mit *35S Enhancer* bzw. (2) ohne *35S Enhancer* exprimiert. (3) Kontrollpflanze, die nur die Kanamycinresistenz besitzt. Alle Pflanzen waren zwölf Wochen alt. (B) Phänotypische Analysen der Blätter der transgenen Pflanzen, die die *AtIDS9* mit dem *35S Enhancer* exprimieren, zeigen eine punktuelle Gelbfärbung einiger Blattregionen (roter Pfeil).

Die gelben Bereiche der Blätter der Überexpressionslinien die die *AtIDS9 mit 35S Enhancer* exprimieren ließen vermuten, dass der Gehalt an Chlorophyll in diesen Bereichen erniedrigt war. Aus diesem Grund wurde der Gehalt an Chlorophyll a, b sowie der Gesamt-Chlorophyll-Gehalt und der Gehalt an Carotinoiden in diesen Bereichen analysiert und mit dem Gehalt in den grünen Blattbereichen verglichen. Die Messwerte dieser Analyse sind in Tabelle 17 dargestellt. Der Gehalt an Gesamt-Chlorophyll, Chlorophyll a und b war in den gelblichen Bereichen fünf-fach geringer als in den grünen Bereichen. Das Gleiche galt auch für den Gehalt an Carotinoiden. Auch dieser war in den gelbgefärbten Bereichen um etwa das sechs-fache erniedrigt. Diese verringerte Produktion von Chlorophyll und Carotinoiden, könnte etwa durch eine Verringerung des Gehaltes an GGDP in den Zellen zustande kommen, weil GGDP gleichzeitig als Substrat für die Synthese von Chlorophyll und Carotinoiden als auch als Substrat für die überexprimierte *AtIDS9* benötigt wird.

Ergebnisse

Tabelle 17: Chlorophyll- und Carotenoidgehalt der gelben und grünen Bereiche in der *AtIDS9* Überexpressionslinie mit *35S Enhancer*. FG=Frishgewicht, n=3 (STAW < 5%)

	Chlorophyll a (mg/g FG)	Chlorophyll b (mg/g FG)	Gesamt-Chlorophyll (mg/g FG)	Carotenoide (mg/g FG)
grüner Bereich	0,67	0,41	1,28	0,5
gelber Bereich	0,12	0,1	0,24	0,08

Der Zwergenwuchs der stabil transformierten Pflanzen könnte durch einen Mangel an Gibberellinsäuren entstanden sein, der wiederum durch den Verbrauch des Gibberellinsäure- Vorläufers GGDP hervorgerufen werden könnte. Um dies zu untersuchen, wurden Wildtyp- und transformierte Pflanzen auf Medium mit 60 μ M GA3 für 14 Tage angezogen. Die Bestimmung des Frishgewichts (Tabelle 18) ergab dabei, dass die transgenen Pflanzen durch die Behandlung mit GA3 ein ähnliches Gewicht aufwiesen wie die unbehandelten Wt Pflanzen. Auch die Wurzellänge, die ohne GA3 Behandlung bei den transgenen Pflanzen geringer war als bei den Wt Pflanzen, entsprach durch die GA3 Behandlung der Wurzellänge von unbehandelten Wt Pflanzen (Abbildung 30, Tabelle 18). Somit zeigte sich, dass die Zugabe von GA3 den Zwergenwuchs komplementieren konnte, was einen deutlichen Hinweis darauf liefert, dass der Phänotyp der *AtIDS9* Überexpressionslinie tatsächlich durch einen Mangel an Gibberellinsäure verursacht wird.

Tabelle 18: Wurzellänge und Frishgewicht der *AtIDS9* Überexpressionslinien (mit *35S Enhancer*) ohne und mit 60 μ M GA3 Behandlung im Vergleich zu Wt Pflanzen. GA3 = Gibberellinsäure 3, Wt= Wildtyp, n=3

	ohne GA3 behandelte Pflanzen		mit GA3 behandelte Pflanzen	
	Wt	transgen	Wt	transgen
Wurzellänge [cm]	3,4	2,3	4,5	3,8
Frishgewicht [g]	14,2	12,9	16,3	15,0

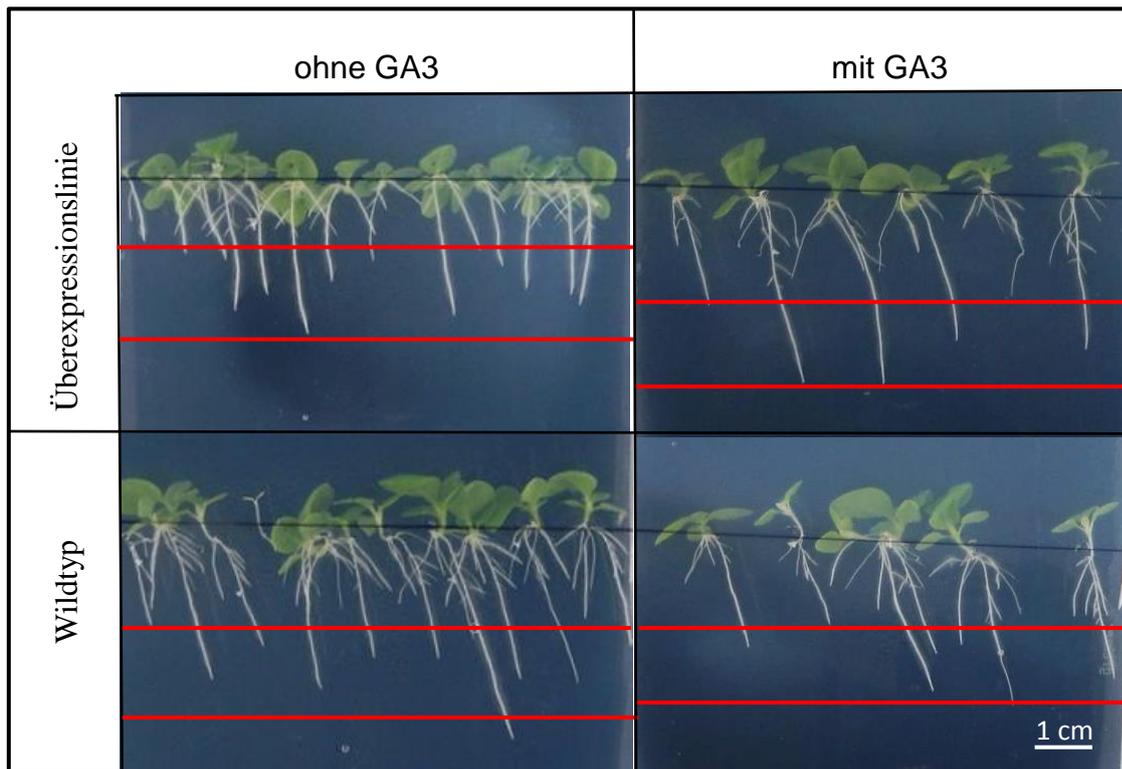


Abbildung 30: Phänotypische Analyse von *AtIDS9* Überexpressionslinien (mit *35S Enhancer*) ohne und mit 60 μ M GA3 Behandlung im Vergleich zu Wt Pflanzen ohne und mit GA3 Behandlung. GA3 = Gibberellinsäure 3, Wt = Wildtyp, n = 3.

Ergebnisse

3.6 Analyse der Umsetzung von GFDP durch die AtTPS28

Das von verschiedenen IDS produzierte GFDP kann von Terpensynthasen zu Sesterterpenen weiter verstoffwechselt werden. So konnte die Produktion von Sesterterpenen zum Beispiel bereits in Pilzen, Bakterien und Insekten, aber auch in Pflanzen, die zur Familie der Nachtschattengewächse, der Lippenblütler, der Lindengewächse, der Wolfsmilchgewächse und der Liliengewächse gehören, detektiert werden. In diesem Abschnitt soll experimentell ermittelt werden, ob das von der AtIDS9 produzierte GFDP von der AtTPS28 zur Produktion von Sesterterpenen genutzt werden kann.

3.6.1 Transiente Koexpression der AtIDS9 und AtTPS28

Um zu testen ob die AtTPS28 Sesterterpene aus GFDP synthetisieren kann, wurde zunächst ein transienter Assay, bei dem die *AtIDS9* und die *AtTPS28* in *N. benthamiana* Blättern exprimiert wurden, durchgeführt. Darüber hinaus wurden auch stabil transformierte *N. tabacum* Pflanzen, die die *AtIDS9* und die *AtTPS28* konstitutiv exprimieren, generiert. Von den Blättern der transienten und der stabilen Transformanten wurden n-Hexan basierte Oberflächenextrakte hergestellt und mittels GC/MS auf das Vorhandensein von Sesterterpenen analysiert. Die transienten Assays wurde viermal voneinander unabhängig durchgeführt, wobei nur in zwei Experimenten eine deutliche Produktbildung sichtbar war.

Die Daten eines transienten Assays, in dem mehrere mögliche Produkte der AtTPS28 sichtbar waren, sind in der Abbildung 31 zu sehen. So konnten im Chromatogramm der infiltrierten Blätter fünf Peaks detektiert werden, die in der Kontrollprobe nicht zu sehen waren (Abbildung 31A). Alle fünf Peaks schienen dabei eine Vorläufermasse von 340 zu haben und zeigten zudem die für Isoprenyldiphosphate charakteristischen Fragmente von 69 und 81 (Abbildung 31B, Anhang: Abbildung 3A und B). Dies deutet darauf hin, dass die AtTPS28 tatsächlich das durch die AtIDS9 produzierte GFDP zur Produktion von verschiedenen Sesterterpenen verwenden kann. Für eine Identifizierung der synthetisierten Produkte wären jedoch weitere Untersuchungen etwa mittels NMR-Analyse erforderlich, die im Zuge dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden konnten.

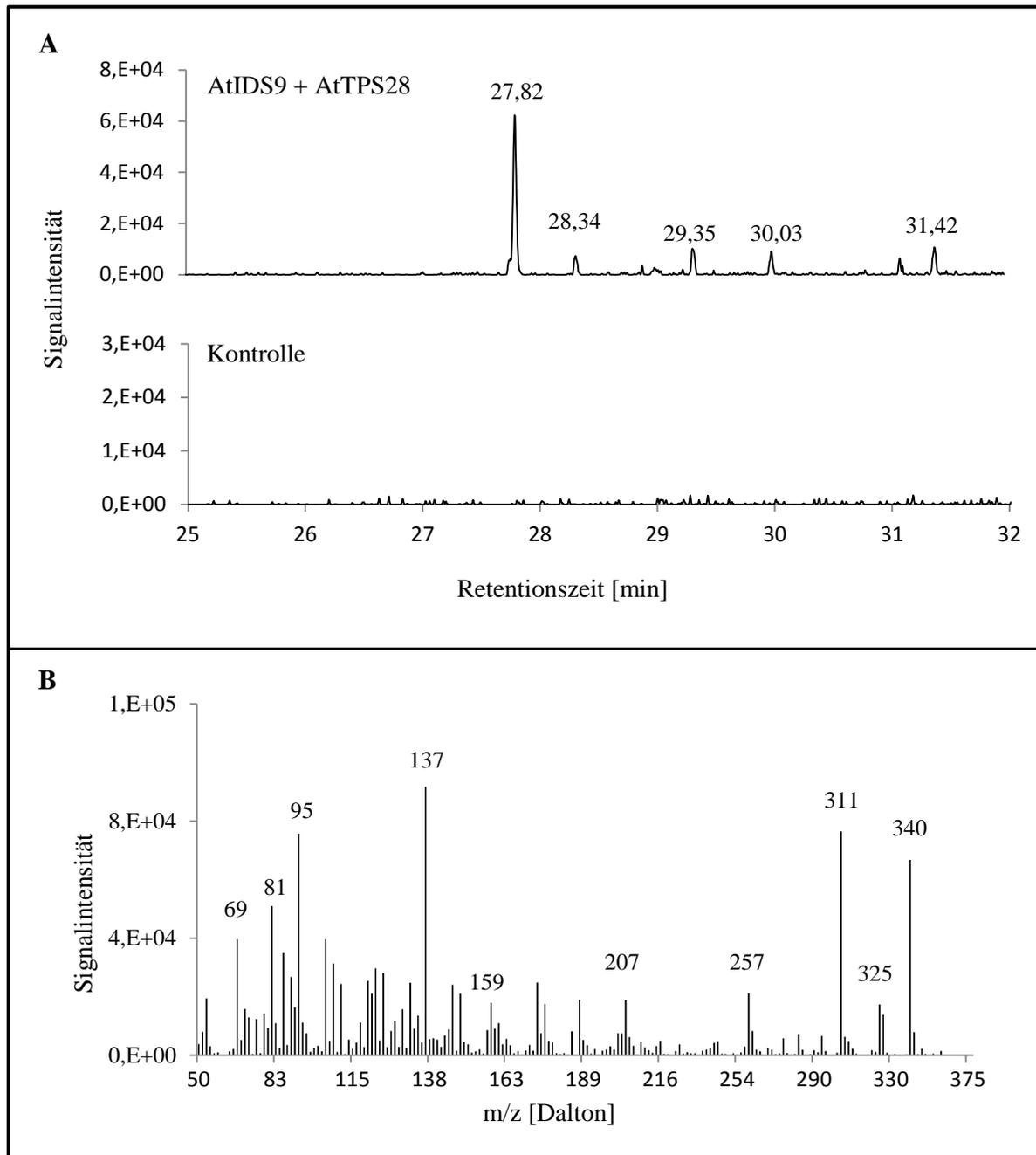


Abbildung 31: GC/MS Analyse transienter Assays der *AtIDS9* in Kombination mit der *AtTPS28* in *N. benthamiana*. (A) Gaschromatogramm (extrahiertes Ionenchromatogramm [m-H₂O]= 340) von n-Hexan Oberflächenextrakten von *N. benthamiana* Blättern die die *AtIDS9* und die *AtTPS28* bzw. nur den Leervektor (Kontrolle) exprimieren. Die putativen Produktpeaks traten bei 27,82; 28,34; 29,35; 30,03 und 31,42 min auf. (B) Elektronenstoßionisations -Massenspektrum des putativen Produktpeaks bei 27,82 min, mit den charakteristischen Fragmenten 69 und 81.

Ergebnisse

3.6.2 Stabile Koexpression der *AtIDS9* und der *AtTPS28*

3.6.2.1 Phänotypische Charakterisierung der stabil transformierten Doppel-expressionslinien

Für die Analyse der Produkte der *AtTPS28* wurden zwei Doppelexpressionslinien generiert. Beide Linien exprimierten dabei sowohl die *AtIDS9* als auch die *AtTPS28*, neben einem Kanamycin-Resistenzgen. Bei einer Linie wurde vor dem *NtCPS2* Promotor, unter der die *AtTPS28* stand, zusätzlich ein *35S Enhancer* (Tabak Mosaik Virus basiertes Replikon, Marillonnet *et al.*, 2005) geschaltet, bei der anderen Linie nicht. Als Kontrolle dienten Pflanzen, die nur die Kanamycin-Resistenz trugen (Abbildung 32A). An den transgenen Tabakpflanzen, die die *AtIDS9* und *AtTPS28* mit *35S Enhancer* exprimieren, waren die selben Merkmalsveränderungen festzustellen wie in den stabil transformierten Pflanzen, die nur die *AtIDS9* mit dem *35S Enhancer* überexprimierten (Abbildung 29). So zeigte die T1 Generation dieser Pflanzen eine verringerte Wuchshöhe, gelbe Flecken auf den Blättern und eine verzögerte Alterung (Abbildung 32B). In der T2 Generation war dieser Phänotyp noch deutlicher ausgeprägt (Abbildung 32C). Da der Phänotyp dieser Doppelexpressionslinien derselbe war, wie der der *AtIDS9* Überexpressionslinien wurde daraus die Schlussfolgerung gezogen, dass dieser Phänotyp allein durch die Überexpression der *AtIDS9* hervorgerufen wurde und der *35S Enhancer*, der vor dem Promotor der *AtTPS28* geschaltet war, auch die Aktivität des Promotors, der die *AtIDS9* exprimiert, verstärkt. Die transgenen Tabakpflanzen, die die *AtIDS9-AtTPS28* ohne *35S Enhancer* exprimieren, wiesen hingegen, wie bereits die *AtIDS9* Überexpressionslinien ohne *35S Enhancer*, keine phänotypische Veränderung auf.

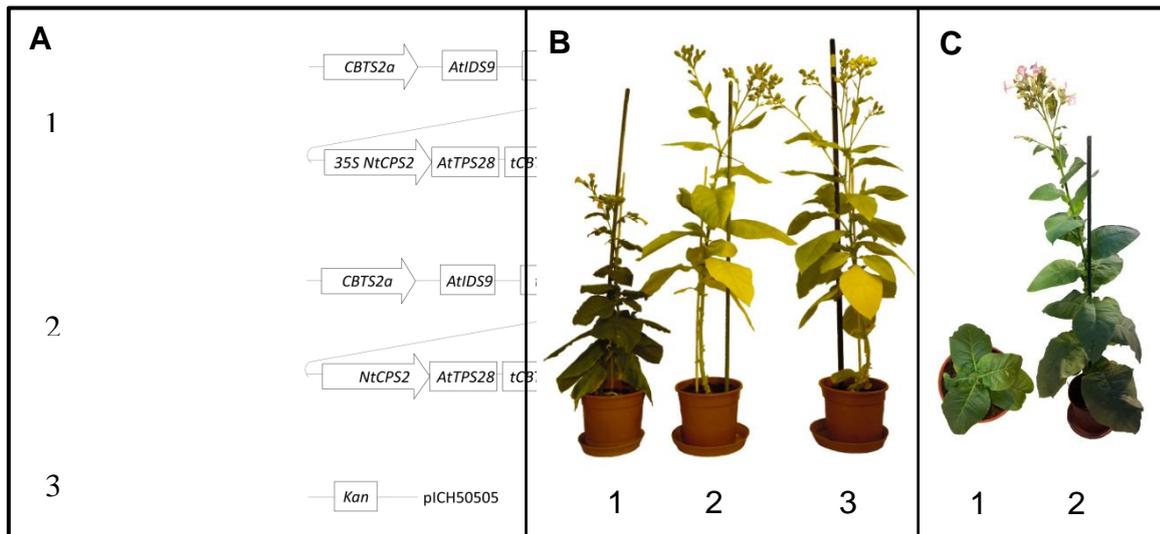


Abbildung 32: Effekt der Überexpression der *AtIDS9* in Kombination mit der *AtTPS28* auf den Phänotyp von *N. tabacum* Pflanzen. (A) Verwendete Konstrukte: (1) *AtIDS9* unter Kontrolle des Promotors und Terminators der *CBTS2a*, *AtTPS28* unter Kontrolle des *NtCPS2* (Copal-8-ol diphosphat Hydrase aus *N. tabacum*) Promotors (mit *35S Enhancer*) und des *CBTS2a* Terminators, Kanamycinresistenz zur Selektion, Endvektor pICH50505, (2) *AtIDS9* unter Kontrolle des Promotors und Terminators der *CBTS2a*, *AtTPS28* unter Kontrolle des *NtCPS2* Promotors und des *CBTS2a* Terminators, Kanamycinresistenz zur Selektion, Endvektor pICH50505, (3) Kontrollpflanzen besaßen Kanamycin-Resistenz, Endvektor 50505. (B) T1-Generation 16 Wochen alter stabil transformierter Pflanzen: (1) *AtIDS9-AtTPS28* (mit *35S Enhancer*) Überexpressionslinie, (2) *AtIDS9-AtTPS28* (ohne *35S Enhancer*) und (3) Kontrollpflanzen. (C) T2-Generation stabil transformierter Pflanzen (14 Wochen alt) mit verstärkt ausgeprägtem Phänotyp: (1) *AtIDS9-AtTPS28* (mit *35S Enhancer*), (2) Kontrollpflanzen.

3.6.2.2 Produktanalyse der *AtTPS28* in den stabil transformierten Doppelsexpressionslinien

Die in Abbildung 33 dargestellten Ergebnisse zeigen die Daten der Oberflächenextrakte der stabil transformierten Pflanzen, die die *AtIDS9* und die *TPS28* koexpressieren. Auch hier konnten, wie in dem transienten Assay, Produkte detektiert werden, die in den Kontrollpflanzen nicht detektierbar waren (Abbildung 33A). In diesem Ansatz konnten jedoch nur zwei anstatt wie in den transienten Assays fünf zusätzlichen Peaks detektiert werden, die zudem auch eine andere Retentionszeit als die Peaks in den transienten Assays besaßen. Jedoch zeigten auch diese beiden potenziellen Produkte die für Isoprenyldiphosphat-Derivate charakteristischen Fragmente bei 69 und 81 (Abbildung 33B, Anhang: Abbildung 4). Da die im transienten Assay detektierten potentiellen Produkte eine höhere Retentionszeit als die in den stabilen Transformanten detektierten Produkte aufwiesen, liegt die Vermutung nahe, dass die im transienten Assay detektierten Produkte (Abbildung 31) eine höhere Kettenlänge besitzen (Abbildung 31B und Anhang: Abbildung 3). Da das Gesamt- *m/z* Verhältnis statt bei den für C₂₅ Terpene erwarteten 340 nur bei 270 lag, handelte es sich bei den hier detektierten Substanzen mit hoher Wahrscheinlichkeit eher

Ergebnisse

um C₂₀-Terpene mit einer zusätzlichen Doppelbindung. Diterpene ohne zusätzliche Doppelbindung würden ein Gesamt- $m/z = 272$ aufweisen.

Zu erwähnen ist auch, dass es sich bei den Peaks, die in den Proben der Blattoberflächenextrakte von *AtIDS9* und *AtTPS28* (mit *35S Enhancer*) zwischen 21,77 und 27,73 min detektiert wurden, laut dem dazugehörigen Massenspektrum um keine potenziellen Produkte der *AtTPS28* handelt.

Fasst man die erhaltenen Ergebnisse der transienten und stabilen Koexpression der *AtIDS9* und der *AtTPS28* zusammen, so ergeben sich Hinweise für eine direkte Umsetzung der *AtIDS9*-Produkte durch die *AtTPS28*. Zudem scheint die *AtTPS28* aus GFDP mehrere verschiedene Produkte synthetisieren zu können. Aufschluss hierrüber könnte letztlich nur die Durchführung weiterer Experimente, wie etwa *in vitro* Assays mit der *AtTPS28* und GFDP als Substrat bzw. die Aufreinigung und Strukturanalyse der potentiellen Produkte, geben.

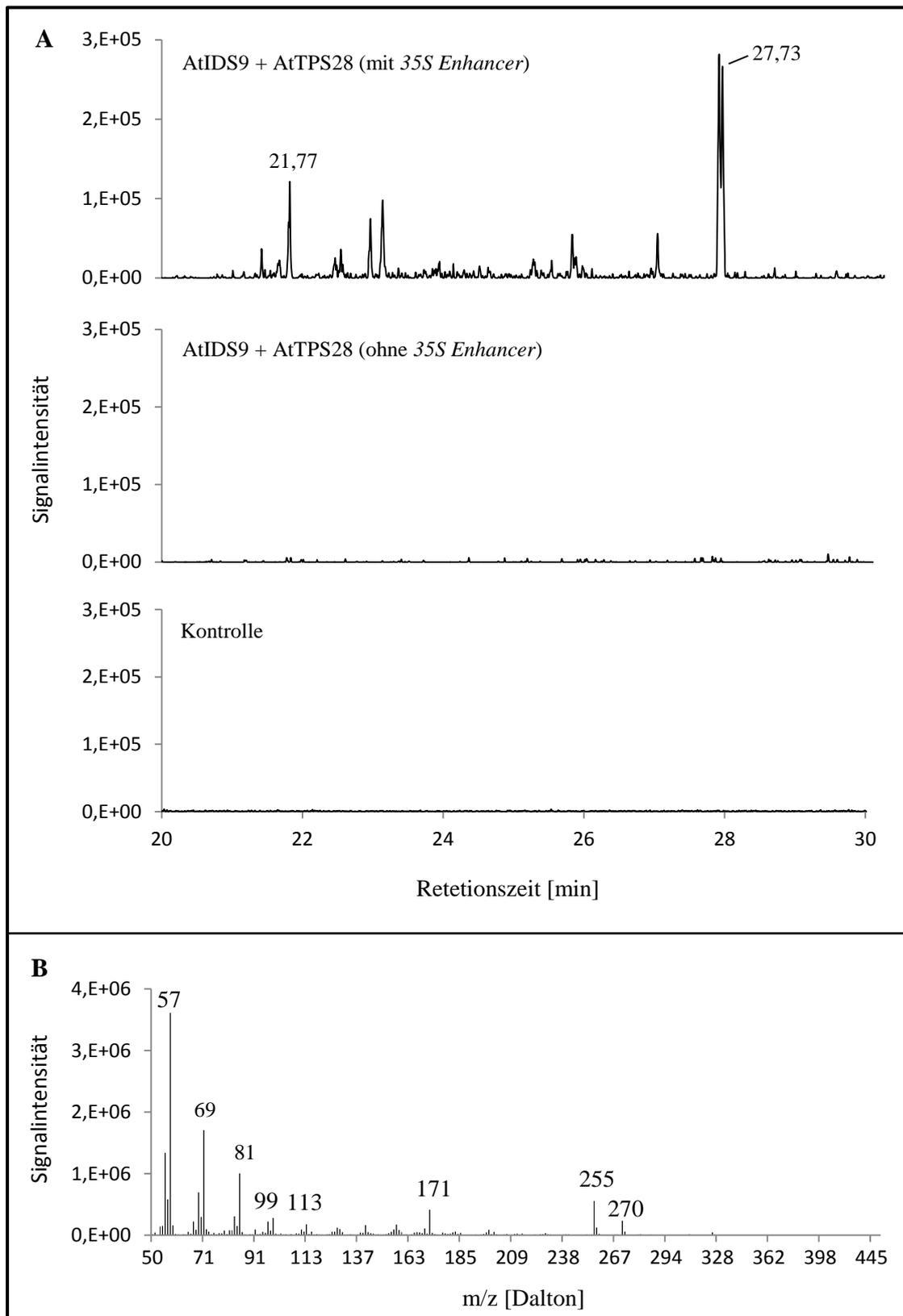


Abbildung 33: Blattoberflächenextrakte stabil transformierter *N. tabacum* Überexpressionslinien. GC/MS Analyse der Produkte der AtTPS28 (A) Extrahiertes Gaschromatogramm (m/z $270 \pm 0,5$ Da) von n-Hexan Blattoberflächenextrakten der AtIDS9-AtTPS28 Überexpressionslinie (mit 35S Enhancer), AtIDS9-AtTPS28 Überexpressionslinie (ohne 35S Enhancer) und der Kontrollpflanze, die nur den Leervektor exprimiert. Die detektierten Produktpeaks traten bei 21,77 min und 27,73 min auf. (B) Elektronenstoßionisations-Massenspektrum des Produktpeaks bei 27,73 min.

4 Diskussion

In *A. thaliana* gibt es 13 Gene, die für katalytisch aktive IDS kodieren (Okada *et al.*, 2000; Lange und Ghassemian, 2003; Wang und Dixon, 2009; Beck *et al.*, 2013). Die in dieser Arbeit charakterisierte AtIDS9 gehört zu den AtIDS, über die bislang kaum etwas bekannt ist. Die wenigen verfügbaren Daten bedürfen zudem einer kritischen Analyse. So wäre zusätzlich zu dem in der Literatur beschriebenen Komplementationassay, der die AtIDS9 als GGDP produzierende IDS identifizierte (Zhu *et al.*, 1997b; Beck *et al.*, 2013), ein Enzymassay unter physiologischen Bedingungen und eine ausführlichere Analyse der Produktbildung erforderlich. Das gleiche trifft auch auf die Bestimmung der Lokalisation der in *A. thaliana* exprimierten IDS zu. Auch hier ist es unerlässlich, einen tieferen Einblick in die organspezifische und subzelluläre Lokalisation der verschiedenen IDS zu bekommen, um erste Aussagen über ihre mögliche biologische Funktion treffen zu können. Durch die vorliegende Arbeit wird eine umfangreiche funktionelle Charakterisierung der AtIDS9 vorgestellt. Hierbei wurden zum einen die Produktbildung, die Substratspezifität und die kinetischen Parameter der AtIDS9 analysiert, zum anderen wurde die Lokalisation des Enzyms auf organspezifischer und subzellulärer Ebene sowie dessen mögliche biologische Funktion untersucht.

4.1 Aufreinigung der AtIDS9

Die Isolation vieler Proteine in einer für weitere Experimente ausreichenden Menge und aktiven Form aus ihrem Wirtsorganismus stellt sich oft als sehr schwierig dar; gerade, wenn es sich bei dem Zielprotein um ein sehr niedrig exprimiertes Protein handelt, wie es bei der AtIDS9 der Fall ist (*eFP Browser 2.0*, <http://bar.utoronto.ca>). Hier bieten Expressionssysteme, etwa in dem Bakterium *E. coli* oder in verschiedenen Hefen, auf den ersten Blick gute Alternativen. Jedoch gibt es für Proteine pflanzlicher Herkunft, wie die AtIDS9, auch einige Nachteile in Bezug auf (a) Abweichungen in der Nutzung des degenerierten genetischen Codes, (b) keiner oder fehlerhafter Proteinmodifikationen (Glykosylierung, Disulfidbrückenbindung, usw.), (c) fehlerhafter Proteinfaltung, (d) fehlender Kofaktoren oder (e) der Aggregation und Inaktivierung des Proteins in sogenannten *inclusion bodies*. Hier bietet die heterologe Genexpression in geeigneten Pflanzen wie *N. benthamiana* (siehe etwa Marillonnet *et al.*, 2005), eine sehr gute Alternative, da die eben genannten Probleme hier vermieden werden können.

In der vorliegenden Arbeit wurde *A. thaliana* Wurzel Gesamt-RNA genutzt, um daraus die kodierende Sequenz der *AtIDS9* zu isolieren. Anschließend wurde diese Sequenz an einen N-terminalen 6xHisTag fusioniert und in einen für die Expression in *N. benthamiana* optimierten Expressionsvektor (Marillonnet *et al.*, 2005; Engler *et al.*, 2014) überführt. Für die Expression wurde der aus *A. thaliana* stammende *Actin2* Promotor verwendet. Nach erfolgreicher Expression des Fusionsproteins und anschließender Aufreinigung konnten etwa 3 mg lösliches Protein pro 1 g Blattfrischgewicht gewonnen werden. Die Analyse der einzelnen Aufreinigungsschritte mit Hilfe von Coomassie gefärbtem SDS Gel und Westernblot zeigten, dass es möglich war, heterologe *AtIDS9* herzustellen und aufzureinigen. Das Fusionsprotein hatte dabei die erwartete Größe von ungefähr 36 kDa (<http://www.sciencegateway.org/tools/proteinmw.htm>) und nur leichte Verunreinigungen mit Proteinen aus dem Ursprungsorganismus, bei denen es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um die große Untereinheit von Rubisco handelt.

Demnach stellt *N. benthamiana* durch die hohe Ausbeute, eine für weitere Analysen ausreichende Reinheit und den genannten Vorteilen gegenüber nicht-pflanzlichen Expressionssystemen, ein gutes Expressionssystem für die *AtIDS9* und damit auch für andere aus Pflanzen stammende IDS, dar. Bisher wurde der größte Teil, der bis zum heutigen Zeitpunkt beschriebenen IDS, entweder in *E. coli* exprimiert oder direkt aus der jeweiligen Pflanze isoliert (Zhu *et al.*, 1997a,b; Okada *et al.*, 2000; Wang und Dixon 2009).

4.2 Glykosylierung und Homodimerisierung der *AtIDS9*

Die Analyse, der aus *N. benthamiana* aufgereinigten *AtIDS9*, zeigte neben der erwarteten Bande bei 36 kDa auch zwei weitere Banden, mit etwa dem zweifachen (ca. 80 kDa) und drei- bis vierfachen Molekulargewicht (>100 kDa). Bei diesen zusätzlichen Banden könnte es sich um Dimere bzw. Tri- bis Tetramere des Fusionsproteins handeln. Zusätzlich fiel auf, dass alle drei Banden sehr diffus dargestellt waren. Diese diffuse Auftrennung könnte wiederum durch Glykosylierung des Proteins zustande kommen (Unal *et al.*, 2008).

Diskussion

4.2.1 Glykosylierung

Zwei Ursachen würden das diffuse Aussehen der Zielproteinbande durch eine Glykosylierung erklären. So kann die Glykosylierung von Proteinen zum einen sehr heterogen sein wodurch die Masse des jeweiligen Proteins um mehrere tausend Dalton variieren kann. Zum anderen wird die Probe durch die Behandlung mit SDS denaturiert und bildet Mizellen aus. Dadurch besitzen alle Proteine das gleiche Masse- zu- Ladungs-Verhältnis und werden nur anhand ihrer Gesamtgröße aufgetrennt. Da diese „Zuckerbäumchen“ jedoch sehr groß sein können und mit SDS anders interagieren als Aminosäuren, kommt es durch die in den Mizellen außenliegenden "Zuckerbäumchen" zu einer ungleichmäßigen Ladungsverteilung. Dies bewirkt, dass sich kein gleichmäßiges Masse- zu- Ladungs- Verhältnis ausbildet (Unal *et al.*, 2008).

Um zu Überprüfen ob solche „Zuckerbäumchen“ für die diffusen Banden verantwortlich sind erfolgte eine Deglykosylierungsbehandlung des heterologen Proteins mit EndoH. Jedoch zeigte auch die Analyse der behandelten AtIDS9 keine klaren Banden, was darauf hinweist, dass die diffusen Banden nicht durch die Glykosylierung des Proteins hervorgerufen werden.

Zur weiteren Analyse dieser Beobachtung könnten Experimente, bei denen eine Anreicherung der AtIDS9 mittels Lektin-Affinitätschromatografie oder HILIC (Gabius *et al.*, 2002) die in Kombination mit anschließender massenspektrometrischer Untersuchung durchgeführt wird, dienen.

4.2.2 Homodimerisierung

In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass die Dimerisierung von IDS über Disulfidbrückenbindungen stattfindet, welche durch das Cystein-reiche Motiv CxxxC ausgebildet werden (Wang und Dixon, 2009). Um Aussagen darüber zu treffen, ob die 6xHisTag-AtIDS9 Oligomere über Disulfidbrückenbindungen ausbilden kann, wurden die zum Cystein-reichen Motiv gehörenden Cysteine 110 und 114 (Wang *et al.*, 2014) der AtIDS9 durch Serine ausgetauscht. Die Ergebnisse dieses Experiments zeigten jedoch, dass auch nach dem Ersetzen der Cysteine C110 und C114 die Banden bei 80 kDa und >100 kDa im SDS-Gel und Westernblot detektiert wurden. Die Schärfe der Banden nahm jedoch erkennbar zu. Dies weist darauf hin, dass nicht nur die in der Literatur beschriebene Cysteine eine Rolle in der Homodimerisierung zu spielen scheinen, sondern auch hydrophobe Interaktionen dabei beteiligt sein könnten (Jones und Thornton, 1996). Dies würde wiederum bedeuten, dass das CxxxC-Motiv zwar für die Homodimerisierung

notwendig ist, aber allein nicht für eine ausreichende physikalische Interaktion der Monomere sorgen kann.

In dem eben beschriebenen Experiment wurde der Probenpuffer ohne den Zusatz von β -Mercaptoethanol verwendet. Nun wurde in einem weiteren Experiment der Probe β -Mercaptoethanol hinzugefügt, um die Disulfidbrücken zu reduzieren, die zur Dimerisierung bzw. Oligomerisierung beitragen. Hierdurch konnte eine vollständige Monomerisierung der Wt 6xHisTag-AtIDS9 durch die Reduktion der Disulfidbrückenbindungen zu freien Thiolen erreicht werden und eine klar definierte Zielproteinbande wurde im Gel sichtbar.

Zusammenfassend deuten die durchgeführten Experimente darauf hin, dass die AtIDS9 durch die Ausbildung von Disulfidbrückenbindungen Homodimere bildet. An der Bildung dieser Dimere (und Trimere bzw. Tetramere) scheinen dabei jedoch nicht nur die beiden Cysteine des CxxxC-Motives beteiligt zu sein. Aus diesem Grund sollten auch die anderen acht Cysteine, die in der Sequenz der AtIDS9 vorkommen, mutiert und das mutierte Protein mittels SDS-Page analysiert werden. Da bereits bekannt ist, dass IDS sowohl in Gymnospermen als auch in Angiospermen als Heterodimere (Wang und Dixon, 2009) und als Homodimer auftreten können (Bouvier *et al.*, 2000; Burke *et al.*, 2002; van Schie *et al.*, 2007; Schmiedt *et al.*, 2008), sollte durch weitere Experimente, wie zum Beispiel durch Gelfiltration, das heterologe Protein für eine weitere Charakterisierung hinsichtlich der Dimerisierung in Monomere, Dimere und vielleicht auch Oligomere aufgetrennt werden.

Eine mögliche Glykosylierung von IDS wurde bislang noch nicht beschrieben und auch die hier gezeigten Ergebnisse liefern keine Hinweise darauf. Da durch die Behandlung mit β -Mercaptoethanol jedoch aus den diffusen Banden der AtIDS9 eine scharfe Bande wurde, liegt die Vermutung nahe, dass die AtIDS9 nicht glykosyliert ist.

4.3 Produktion von GFDP durch die AtIDS9

Pflanzen steht, genau wie Bakterien und Säugetieren, eine Vielzahl an verschiedenen IDS zur Verfügung. Die Kurzketten-IDS werden dabei in der Pflanze durch drei Enzymklassen repräsentiert: Die GDP-Synthasen, die FDP-Synthasen und die GGDP-Synthasen. GFDP-Synthasen hingegen konnten bis zum heutigen Zeitpunkt nicht in Pflanzen detektiert werden. Demnach stellt sich die Frage ob auch höhere Pflanzen, wie zum Beispiel der Modellorganismus *A. thaliana* GFDP produzierende Enzyme besitzt.

Die ersten Hinweise darauf, dass auch *A. thaliana* GFDP produzierende IDS besitzt, ergaben die in *N. benthamiana* Blättern, durchgeführten *in vivo* Assays. In diesem Experiment wurden von transient *AtIDS9* exprimierenden *N. benthamiana* Blättern Oberflächenextrakte erstellt und mittels GC/MS analysiert. Hierbei konnte ein Produkt detektiert werden, das der Größe und Fragmentierung eines GFDP-Derivates entspricht, welches in den Kontrollpflanzen fehlte. Die anschließend, mit Hilfe des aus *N. benthamiana* aufgereinigten 6xHisTag-AtIDS9 Fusionsproteins, durchgeführten *in vitro* Assays zeigten, dass das Hauptprodukt der AtIDS9 tatsächlich GFDP ist und GGDP nur in geringen Mengen als Nebenprodukt produziert wird (4.3.2).

Vergleicht man diese Ergebnisse mit den in der Literatur vorhandenen Daten, so zeigt sich, dass lange Zeit Stoffwechselwege, die GFDP beinhalten, nur von Archaeen bekannt waren (Tachibana, 1994; Tachibana *et al.*, 2000; Ogawa *et al.*, 2010). Erst im Jahr 2009 wurde von Wang und Dixon anhand von Untersuchungen der Produkte der AtIDS6 die Vermutung geäußert, dass auch höhere Pflanzen GFDP produzieren können (Wang und Dixon, 2009). So zeigten sich bei der Charakterisierung der AtIDS6 Produkte, welche größer als GGDP waren, aber nicht genau identifiziert werden konnten. Auch die AtIDS9 wurde bis zum Jahr 2015 als GGDP synthetisierende IDS beschrieben (Zhu *et al.*, 1997b; Okada *et al.*, 2000; Beck *et al.*, 2013). Die Ermittlung der Produkte erfolgte dabei jedoch zum einen durch Komplementationsanalysen (Zhu *et al.*, 1997b; Beck *et al.*, 2013), wodurch nur ein indirekter Nachweis der GGDP Produktion erhalten wurde. Zum anderen wurden *in vitro* Assays mit *E. coli* Rohextrakt, welches die heterolog exprimierte AtIDS9 enthielt von Zhu *et al.*, (1997a) und Okada *et al.*, (2000) durchgeführt. Hier konnte aber durch die Verwendung von Rohextrakt die Detektion von GFDP in der Dünnschichtchromatographie durch die zahlreichen Hintergrundsubstanzen verhindert worden sein. Daher blieb die GFDP Produktion der AtIDS9 und vieler anderer AtIDS bislang unentdeckt. Erst die Forschung von Nagel *et al.*, (2015), in der auch die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Daten veröffentlicht wurden, identifizierte die AtIDS9 als GFDP

produzierende IDS. Unabhängig von den in dieser Arbeit beschriebenen *in vitro* Assays konnte Nagel *et al.*, (2015) auch zeigen, dass das Methanol/Wasser Extrakt von *A. thaliana* Wildtyp Wurzeln GFDP enthält, was ein natürliches Auftreten dieser Substanz in der Pflanze aus dem die AtIDS9 stammt, beweist. Darüber hinaus zeigten auch Extrakte von stabil transformierten AtIDS9 Überexpressionslinien (*A. thaliana*), dass dieses Enzym GFDP produziert was die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse bestätigt.

Dieser Nachweis von GFDP in *A. thaliana*, legt die Vermutung nahe, dass auch in anderen höheren Pflanzen GFDP produzierende IDS existieren. Fraglich bleibt bisher wie das produzierte GFDP weiter verstoffwechselt wird. So wurde in dem Zeitraum, in dem diese Arbeit angefertigt wurde, noch kein Stoffwechselweg identifiziert, in dem GFDP als Ausgangsstoff verwendet wird. Aus diesem Grund wird in Abschnitt 4.6 die Möglichkeit diskutiert, dass GFDP zur Synthese von Sesterterpenen genutzt werden könnte.

4.3.1 AtIDS9 ist ein Multisubstrat Enzym

Im Rahmen dieser Arbeit wurde neben der Produktbildung auch die Substratspezifität der heterolog exprimierten AtIDS9 in einem *in vitro* Assay untersucht. Hierbei wurde getestet, ob die AtIDS9 zur Synthese von GFDP neben DMADP auch GDP, FDP und GGDP in (*E*)-Konformation als allylisches Substrat verwenden kann. Zusätzlich wurde GDP auch in (*Z*)-Konformation verwendet. Die Ergebnisse dieses Experiments zeigten, dass die AtIDS9, mit Ausnahme von GDP in (*Z*)-Konformation, aus allen verwendeten Substraten GFDP bilden konnte. Somit lässt sich feststellen, dass die AtIDS9 ein Multisubstratenzym ist.

Vergleicht man diese Resultate mit den in der Literatur veröffentlichten Daten zur Substratspezifität bereits charakterisierter GGDP-Synthasen oder FDP-Synthasen aus diversen Organismen, so zeigt sich, dass auch aus anderen Pflanzen oder aus Bakterien stammende GGDP-Synthasen, in der Regel keine hohe Substratspezifität aufweisen. So verwenden die bis zum jetzigen Zeitpunkt charakterisierten pflanzlichen und bakteriellen GGDP-Synthasen sowohl DMADP als auch GDP und FDP als allylisches Substrat (Vandermoten *et al.*, 2009). Die geringe Substratspezifität scheint nicht nur für die AtIDS9 und diverse andere pflanzliche GGDP-Synthasen zu gelten. Pflanzliche FDP-Synthasen, wie die *cis*-Prenyltransferase aus der wilden Tomate *S. habrochaites*, produzieren FDP nicht nur aus GDP, sondern auch aus DMADP und IDP (Sallaud *et al.*, 2009). Jedoch zeigte die Literatur auch Beispiele an IDS auf, die sehr substratspezifisch sind. FDP-Synthasen aus Bakterien nutzen hauptsächlich GDP als Substrat, um FDP zu synthetisieren

Diskussion

(Ambo *et al.*, 2008) und auch die GGDP-Synthasen aus Hefe und Säugerzellen wiesen eine hohe Substratspezifität auf und verwendeten nur FDP als allylisches Substrat (Sagami *et al.*, 1993).

4.3.2 AtIDS9 ist ein Multiprodukt Enzym

Wie die LC/MS Analysen der *in vitro* Assays gezeigt haben, bildet die AtIDS9 neben dem Hauptprodukt GFDP ($88\% \pm 5\%$) auch geringe Mengen an GGDP ($12\% \pm 5\%$).

Viele der bislang charakterisierten Kurzketten-IDS synthetisieren nur ein Produkt. Jedoch zeigte sich, dass gerade viele IDS die längere Produkte synthetisieren auch vermehrt als Multiproduktenzym auftreten, wobei neben dem Hauptprodukt jedoch meist ein deutlich geringer Anteil eines Nebenproduktes hergestellt wird. Dieses besitzt in der Regel fünf Kohlenstoffatome, mehr oder weniger als das Hauptprodukt. Ein Beispiel hierfür ist die von Wang *et al.*, (2009) beschriebene AtIDS11. Sie produziert neben dem Hauptprodukt GGDP auch GDP. Die AtIDS9 ist somit nicht die einzige aus *A. thaliana* stammende IDS, die mehrere Produkte synthetisiert.

Zusätzlich zu den aus *A. thaliana* stammenden IDS wurden auch aus anderen Organismen stammende IDS als Multiproduktenzyme charakterisiert. Dazu zählen unter anderem die GDP-Synthasen aus *Abies grandis* und aus *Phalaenopsis bellina*, die neben GDP auch eine geringe Menge an FDP synthetisieren (Burke und Croteau, 2002b; Hsiao *et al.*, 2008) oder eine FDP-Synthase aus Mais (*Zea mays*), die auch in geringen Mengen GGDP herstellt (Cervantes-Cervantes *et al.*, 2006) sowie eine GGDP-Synthase aus dem Kautschukbaum (*Hevea brasiliensis*), die Spuren von FDP synthetisiert (Takaya *et al.*, 2003).

Weiterhin wird aus der Literatur deutlich, dass auch IDS aus nicht-pflanzlichen Organismen Multiproduktenzyme sind. So wurde auch die IDSA aus dem hyperthermophilem Archaeen *Methanobacterium thermoautotrophicum* von Chen und Poulter (1994) als IDS beschrieben, die neben FDP auch GGDP produziert. Ebenso existiert in *Toxoplasma gondii* auch eine FDP-Synthase, bei der zusätzlich GGDP als Produkt nachweisbar ist (Ling *et al.*, 2007). Auch Vandermoten *et al.* (2008) beschrieb eine GDP Synthase aus der Blattlaus (*Myzus persicae*), die nicht ausschließlich GDP, sondern als Nebenprodukt auch FDP synthetisiert. All diese eben genannten Beispiele zeigen, dass es zahlreiche IDS aus den unterschiedlichsten Organismen gibt, die als Multiproduktenzym charakterisiert wurden und untermauern die hier dargestellten Ergebnisse, die die AtIDS9 als ein Multiproduktenzym identifizieren.

4.4 Ermittlung von apparenten *in vitro* Km-Werten der AtIDS9

An der Universität von Utah wurde, in den 70er und 80er Jahren durch Arbeiten von Poulter und Rilling, der allgemeine katalytische Mechanismus der IDS aufgeklärt. Die Erforschung der IDS wurde dabei hauptsächlich anhand der FDP-Synthasen mit Hilfe verschiedener biochemischen Methoden durchgeführt (Laskovics und Poulter 1981). Dabei fand auch eine Analyse der kinetischen Konstanten statt. Hierdurch wurden Michaeliskonstanten für die verschiedenen allylischen Substrate beschrieben, die selten 10 μM übersteigen und Wechselzahlen zwischen 0,03 und 0,3 s^{-1} aufweisen (Croteau und Cane, 1985).

Um die apparenten Km-Werte der AtIDS9 für die einzelnen Substrate bestimmen zu können, wurde im Voraus das pH-Optimum des Enzyms bestimmt und der Bereich in dem ein linearer Verlauf der von der AtIDS9 katalysierten Reaktion stattfindet. Dabei zeigte sich, dass die AtIDS9 ein pH-Optimum im neutralen Bereich (6,5-7,0) besitzt. Dies ist auch für IDS (meist GGDP-Synthasen) aus anderen Organismen, wie zum Beispiel aus *Zea mays* (Cervantes-Cervantes *et al.*, 2006), *Saccharomyces cerevisiae* (Chang *et al.*, 2006), *Taxus baccata* (Laskaris *et al.*, 2000) oder auch aus *Homo Sapiens* (Kavanagh *et al.*, 2006) bekannt. Auch andere in den Plastiden exprimierte Enzyme, wie Monoterpen-Synthasen, haben ein pH-Optimum in neutralen Bereich (Bohlmann *et al.*, 1998). Um den sehr schnellen Substratumsatz der AtIDS9 zu verlangsamen wurde der pH-Wert des Reaktionspuffers leicht außerhalb dieses Optimums gewählt (pH-Wert 7,5), bei dem die Reaktion um 30-40% verlangsamt war. Weiterhin zeigte die von der AtIDS9 katalysierte Reaktion einen linearen Anstieg in den ersten 100 Sekunden weshalb eine Auswertung der erhaltenen Daten mittels Lineweaver-Burk-Diagramm möglich war.

Nach diesen Voruntersuchungen, wurden die apparenten Km-Werte für die Substrate DMADP, (E)-GDP, (E/E)-FDP und (E/E/E)-GGDP mit IDP bestimmt. Dies erfolgte durch *in vitro* Assays, bei dem die Menge an gebildetem GFDP mittels LC/MS ermittelt wurde. Die dann über Lineweaver-Burk-Diagramme erhaltenen apparenten Km-Werte der AtIDS9 zeigten, dass diese für das Substrat DMADP mit IDP bei 47 μM und für die Substrate GDP, FDP und GGDP mit IDP zwischen 17 und 11 μM liegen. Mit steigender Kettenlänge der Substrate nahmen die Km-Werte also ab ($K_{\text{mDMADP}} > K_{\text{mGDP}} \geq K_{\text{mFDP}} \geq K_{\text{mGGDP}}$). Dies bedeutet, dass die Affinität der AtIDS9 für die langkettigeren allylischen Substrate höher ist als für die Kurzkettigen.

Diskussion

Da in der Literatur bisher nur IDS aus *Archaeen* bekannt sind, die GFDP synthetisieren und von diesen bislang keine kinetischen Daten ermittelt worden sind, war es nicht möglich die kinetischen Eigenschaften der AtIDS9 mit denen anderer GFDP synthetisierender IDS zu vergleichen. Deshalb erfolgte, wie auch bei der Diskussion der Substratspezifität (4.3.1), ein Vergleich mit GGDP produzierenden IDS .

Aus *A. thaliana* sind bereits K_m -Werte für das GGDP produzierende Multisubstratenzym AtIDS11 bekannt ($K_{m_{DMAPP}} = 8,8 \mu\text{M}$; $K_{m_{GDP}} = 1,8 \mu\text{M}$; Wang *et al.*, 2009). Die K_m -Werte dieses Enzyms weisen die selbe Größenordnung, wie die K_m -Werte der AtIDS9 auf. Diese Daten der AtIDS11 lassen darüber hinaus erkennen, dass neben der AtIDS9 auch andere IDS aus *A. thaliana* tendentiell eine höhere Affinität zu langkettigeren Substraten besitzen.

Ein Vergleich der erhaltenen apparenten K_m -Werte der AtIDS9 für DMADP (+IDP) mit den Werten der GGDP-Synthasen von den Pflanzen *N. tabacum*, *Taxus canadensis* (Burke und Croteau, 2002; Orlova *et al.*, 2009), *Capsicum annuum* und *Sinapsis alba* sowie der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (Dogbo und Camara, 1987; Laferrière und Beyer, 1991; Lo *et al.*, 2009) zeigte weithin übereinstimmende $K_{m_{DMADP}}$ -Werte. Außerdem gilt auch für diese GGDP-Synthasen, dass mit steigender Kettenlänge der Substrate ($\text{DMADP} < \text{GDP} < \text{FDP}$) die K_m -Werte geringer werden, was zeigt das auch die meisten anderen IDS, eine höhere Affinität für langkettige Substrate aufweisen.

4.5 Lokalisation von GFDP synthetisierenden AtIDS in den Wurzeln und in den Plastiden

4.5.1 AtIDS9 ist hauptsächlich in den Wurzeln lokalisiert

Die in dieser Arbeit durchgeführten Promotor:GUS Experimente zeigen in zehn Tage alten *A. thaliana* Pflanzen eine Hauptaktivität des putativen *AtIDS9* Promotors in den Wurzeln und in neu entstehenden Blättern. Diese Daten stimmen mit den von Beck *et al.*, (2013) und Coman *et al.*, (2014) beschriebenen Ergebnissen überein. So zeigen die von Beck *et al.*, (2013) durchgeführten Lokalisationsexperimente, die Realtime-PCR und Mikroarray Daten ebenfalls, dass die *AtIDS9* hauptsächlich in den Wurzeln exprimiert wird. Demnach scheint GFDP in den Wurzeln als Intermediat benötigt zu werden.

Eine organspezifische Lokalisation ist nicht nur für die *AtIDS9* nachgewiesen. Die histochemische Lokalisationsstudie, die von Okada *et al.*, (2000) mit Hilfe von stabil transformierten Promotor:GUS *A. thaliana* Pflanzen in der T2 Generation und Northern-Blot Analysen durchgeführt wurde, zeigte, dass eine organspezifische Expression vieler *AtIDS* Gene stattfindet. Hier zeigte sich, dass die *AtIDS2* und *AtIDS4* hauptsächlich in den Blüten anzutreffen sind, aber auch mit geringerer Expressionsrate in den Wurzeln. Die Transkripte der *AtIDS3* und *6* wurden hauptsächlich in den Wurzeln der Pflanze detektiert. Nur die *AtIDS11* ist laut den Ergebnissen dieser Experimente in allen getesteten Organen (Wurzel, Rosette, Blüte, stängelständige Blätter und Stängel) exprimiert.

4.5.2 AtIDS9 und die anderen GFDP synthetisierenden IDS sind hauptsächlich in den Plastiden lokalisiert

Die IDS aus *A. thaliana* sind dort lokalisiert, wo ihre Produkte von anderen Enzymen als Substrat genutzt werden können. So sind zum Beispiel die GGDP produzierenden IDS in den Plastiden, Mitochondrien, im Zytosol und im endoplasmatischen Retikulum anzutreffen, da dort ihre Produkte für die Synthese von Diterpenen, Gibberellinen oder auch für die Prenylierung von Proteinen benötigt werden. GDP produzierende IDS dagegen sind nur im Plastid anzutreffen, da sie nur dort für die Produktion von Monoterpenen benötigt werden (Tholl und Lee, 2011).

Die in dieser Arbeit erhaltenen Daten zeigen, dass es mit der *AtIDS9* in *A. thaliana* mindestens eine IDS gibt, die GFDP produziert. Durch die Forschung von Nagel *et al.*, (2015) konnte gezeigt werden, dass neben der *AtIDS9* auch die *AtIDS1*, *6*, *7* und *10* GFDP produzieren. Nun stellte sich auch die Frage nach der subzellulären Lokalisation. Hierfür

Diskussion

wurde zunächst eine transiente Expression eines *AtIDS9-eGFP* Fusionskonstruktes in *N. benthamiana* Blättern durchgeführt. Hierbei konnte eine Plastiden-Lokalisation des Enzyms gezeigt werden. Das Fusionsprotein weist dabei jedoch kein gleichmäßiges eGFP Signal im Stroma der Plastiden auf, sondern bildet punktförmige Aggregate, die sich laut den Z-Stack-Aufnahmen auch im Inneren der Plastiden befinden. Die Untersuchung der Lokalisation der *AtIDS6*, *7* und *10-eGFP* Fusionsproteine zeigen ebenfalls diese punktförmige Plastiden-Lokalisation. Lediglich die *AtIDS1* schien dagegen in den Mitochondrien lokalisiert zu sein.

Diese Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen der stabil transformierten Pflanzen, die von Beck *et al.*, (2013) angefertigt wurden, überein. Demnach scheint es sowohl in den Plastiden als auch in den Mitochondrien einen Pool an GFDP zu geben. Zusätzlich zeigten aktuelle Forschungsergebnisse von Perello *et al.*, (2016), dass neben den *AtIDS6*, *7*, *9* und *10*, auch das für die Herstellung der Substrate der IDS benötigte Enzym 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphat Reduktoisomerase (DXR, aus *A. thaliana*) des MEP- Wegs diese punktförmige plastidäre Lokalisation aufweist.

Um die punktförmige Lokalisation der *AtIDS9* innerhalb der Plastiden näher zu charakterisieren, wurde die in den Plastoglobule lokalisierte Phytoensynthase aus *A. thaliana* (*AtPSY*) als Markerprotein verwendet (Shumskaya *et al.*, 2012). Durch die Koinfiltration der *AtIDS* mit der *AtPSY* konnte so die Lokalisation der *AtIDS6*, *7*, *9* und *10* in den Plastoglobuli bestätigt werden.

Über die Funktion des durch die IDS gebildeten GFDP's in den Mitochondrien und den Plastiden kann momentan nur spekuliert werden. So könnte es sein, dass das GFDP von Terpensynthasen (TPS) genutzt wird, um Sesterterpene (C₂₅) zu synthetisieren. Um dies genauer zu untersuchen wurde die *AtTPS28*, die eine Koexpression (ATTED-II, Aoki *et al.*, 2016) sowie die gleiche plastidäre Lokalisation wie die *AtIDS9* besitzt, analysiert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Koexpression der *AtIDS9* und der *AtTPS28* in *N. benthamiana* zur Bildung eines Produktes führt, dessen Massenspektrum für ein Sesterterpen spricht (4.7). Da bislang keine Terpensynthase aus den Mitochondrien *in planta* beschrieben wurde, muss man davon ausgehen, dass der GFDP Pool in den Mitochondrien nicht zur Synthese von Sesterterpenen dient. Jedoch wäre es denkbar, dass das GFDP hier für die Prenylierung von membrangebundenen Proteinen benötigt wird, um diesen einen hydrophoben Membrananker anzufügen und sie in der Mitochondrienmembran zu verankern. Zu den GFDP produzierenden IDS, die auch in ihrer biologischen Funktion charakterisiert worden sind, gehören die von Tachibana *et al.*, (1994, 2000)

beschriebenen IDS aus *Archaeen*. Das in den beiden *Archaeen* *Aatronobacterium pharaonis* und *Aeropyrum pernix* synthetisierte GFDP wird hier für die Prenylierung von Lipiden, die in die Membran integriert werden, benötigt. Da nach der Endosymbiontentheorie die Mitochondrien von Bakterien abstammen, sollte bei der Frage nach der biologischen Funktion von GFDP-synthetisierenden Enzymen im Reich der Bakterien gesucht werden.

4.5.3 Für den Transport der AtIDS9 in die Plastoglobuli wird die gesamte Transportsequenz benötigt

Plastoglobuli sind Lipid-Protein Partikel, die in allen Plastiden, sowohl in photosynthetisch aktiven als auch nicht-aktiven, zu finden sind (Steinmüller und Tevini, 1985). Über ihre spezifische Funktion ist bislang jedoch nur sehr wenig bekannt (Bréhélin und Kessler, 2008). In den Plastoglobuli aus photosynthetisch aktiven Plastiden sind Carotinoide, Plastoquinone, Tocopherole und verschiedene Proteine nachgewiesen worden. Diese Substanzen werden dabei von einer Lipid-Einzelschicht umhüllt, die der äußeren Thylakoidhülle sehr ähnlich ist (Kessler *et al.*, 1999; Austin *et al.*, 2006; Ytterberg *et al.*, 2006; Zbierzak *et al.*, 2010). Über das Proteom der Plastoglobuli in den photosynthetisch nicht aktiven Plastiden, wie zum Beispiel den Leukoplasten der Wurzeln, gibt es bislang keine Informationen.

Wie unter 4.5.2. beschrieben wurde, weist die AtIDS9 eine potenzielle Lokalisation in den Plastoglobuli auf. Um mehr über diese Lokalisation und den Transport dorthin zu erfahren, wurde das putative Transitpeptid (27 AS) der AtIDS9 an eGFP fusioniert und sukzessiv verlängert. Die Untersuchung der Lokalisation dieser Fusionsproteine zeigte, dass durch die vorhergesagte, 27 AS lange, Transportsequenz gar kein Transport in die Plastiden erfolgte. So konnte das Fusionsprotein ausschließlich im Zytosol detektiert werden. Die Verlängerung der Transportsequenz auf 42 AS ermöglichte hingegen einen Transport von eGFP in das Stroma der Plastiden. Ein Transport in die Plastoglobuli war aber auch bei dieser Sequenzlänge nicht zu beobachten. Demnach muss davon ausgegangen werden, dass für die Lokalisation in den Plastoglobuli eine noch längere Transportsequenz oder die gesamte Proteinsequenz benötigt wird. Die gleiche Beobachtung konnte bereits von Vidi *et al.*, (2007) anhand des *A. thaliana* Proteins Plastoglobulin (34 kDa; PGL34, At3g58010), ein Protein aus der PAP-Fibrillin Familie, gemacht werden. So zeigte sich, dass eine Plastoglobuli-Lokalisation des PGL34-GFP Fusionsproteins nur bei Verwendung der gesamten Sequenz (bis auf eine kurze C-terminale Sequenz) zustande kommt. Hierraus

Diskussion

ergab sich wiederum die Hypothese, dass die korrekte Faltung des Proteins einen höheren Stellenwert beim Import in die Plastoglobuli hat, als die Proteinsequenz, was einige Jahre später durch die Forschung von Shanmugabalaji *et al.*, (2012) durch die Fusion von PGL34 an HIVp24 (Humanes Immundefizienzvirus Kapsid Partikel p24) oder HCV (Hepatitis C Virus Kernprotein) bestätigt werden konnte. Dies könnte auch für den Transport der AtIDS9 gelten und sollte bei weiteren Untersuchungen mit in Betracht gezogen werden.

4.6 Phänotyp der AtIDS9 Überexpressionslinien

Die biologische Funktion von Isoprenoiddiphosphaten und den daraus synthetisierten Substanzen ist breit gefächert. So sind Isoprenoide an der Photosynthese (Carotinoide, Chlorophylle, Plastoquinone), der Respiration (Ubiquinon), aber auch am Wachstum und der Entwicklung der Pflanzen beteiligt (Abszessinsäuren, Gibberelline, Brassinosteroide, Cytokinine, Sterole; Meier *et al.*, 2011). Darüber hinaus können sie auch einen schädlichen oder fördernden Einfluss auf andere Organismen nehmen. So können Pflanzen etwa Phytoalexine zur Abwehr von eindringenden Mikroorganismen, wie Pilzen oder Bakterien, produzieren (Bohlmann, 2006a, Hasegawa *et al.*, 2010, Heiling *et al.*, 2010). Um einen ersten Einblick in die biologische Funktion der AtIDS9 zu bekommen, wurden in dieser Arbeit auch stabil transformierte *N. tabacum* Pflanzen, welche die AtIDS9 konstitutiv exprimieren, generiert und charakterisiert. Diese transgenen Pflanzen, die die AtIDS9 unter Kontrolle eines 35S Enhancers exprimieren, zeigten Zwergenwuchs, verspätete Seneszenz und gebleichte, gelbliche Bereiche der Blätter. Dieser Phänotyp würde sich durch das Zusammentreffen von zwei Effekten erklären lassen. So könnte sowohl ein Mangel an Chlorophyll als auch an Gibberellinsäure den beobachteten Phänotyp erklären.

4.6.1 AtIDS9 Überexpression führt zu einem Chlorophyllmangel

Eine Erklärung für die gelblichen Bereiche der Blätter der AtIDS9-Überexpressionslinien scheint im reduzierten Gehalt von Blattpigmenten zu liegen. So zeigte die Analyse der gelblichen Bereiche einen um das fünf- bis sechs- fache geringeren Gehalt an Chlorophyllen und Carotinoiden im Vergleich zu den grünen Bereichen. Dies bedeutet, dass die AtIDS9 den GGDP Pool, der sonst für die Synthese von Chlorophyllen und Carotinoiden benötigt wird, in einigen Zellen reduziert zu haben, wodurch der Gehalt an Chlorophyll und Carotinoiden verringert wurde (Abbildung 34).

Um eine mögliche Erklärung zu finden warum der Phänotyp in den Blättern und nicht in den Trichomen sichtbar ist, wurde zuerst die Spezifität des Promotors betrachtet. Hier

ergaben die unter 3.5.3 beschriebenen Expressionsexperimente mit Hilfe von stabil transformierten *N. tabacum* Pflanzen eine ektopische Expression des Trichom-spezifischen *CBTS2a* Promotors unter Verwendung des *35S Enhancers*. Demnach ist der Promotor nicht nur in den Trichomen, sondern auch in den Epidermiszellen der Blätter aktiv. Die Tatsache, dass nur einige Bereiche der Blätter gelb sind, und nicht das ganze Blatt kann momentan nur durch Vermutungen begründet werden. Fest steht, dass die Plastidenmembran sehr fragil ist und dass das Gleichgewicht von Sterolen für die Stabilität der Plastiden wichtig ist (Babiyhuk *et al.*, 2008). Demnach kann die Produktion von zum Beispiel Isoprenyldiphosphaten oder Terpenen, wie es in den transgenen Pflanzen stattfindet in den Plastiden die Membran zerstören (Wu *et al.*, 2012), was dann zur Chlorose führt (Huchelmann, Boutry und Hachez, 2017). Eine andere Erklärung für den Phänotyp könnte auch sein, dass auch wenn Trichome nicht essentiell für die Pflanzen sind, sind sie in der Lage Stresssignale an das umliegende Blattgewebe aussenden, die diesen hier beschriebenen Phänotyp hervorrufen können (Wu *et al.*, 2012).

Einen vergleichbaren Phänotyp (Gelbfärbung der Blätter) zeigten von Orlova *et al.*, (2009) beschriebene transgene *N. tabacum* Pflanzen, in denen die kleine Untereinheit einer *GDP-Synthase* aus Löwenmäulchen (*Antirrhinum majus*) überexprimiert wurde und mit großen *GDP-Synthase* Untereinheiten aus *N. tabacum* aktive IDS bildeten. So führte die Überexpression der *GDP-Synthase* zu einem erhöhten Gehalt an Monoterpenen und einer Gelbfärbung der Blätter, die ebenfalls auf einen reduzierten Gehalt an Chlorophyll und Carotinoiden zurückzuführen war. Der reduzierte GGDP Gehalt wurde von Orlova *et al.*, (2009) dabei durch die IDP Limitierung und den GDP Mangel erklärt.

4.6.2 AtIDS9 Überexpression führt zu Zwergenwuchs und verzögerter Seneszenz

Der Zwergenwuchs der *AtIDS9*-Überexpressionslinien und die verzögerte Seneszenz würde sich durch eine verringerte Synthese von Gibberellinsäuren erklären lassen, die durch das reduzierte Angebot an GGDP, einem Substrat der Gibberellinsynthese, verursacht werden könnte (Abbildung 34). Gibberelline sind tetrazyklische Diterpene, die als Pflanzenhormon wirken. Sie kontrollieren die Elongation des Stängels und haben Auswirkungen auf Reproduktionsprozesse in der Pflanze. In *A. thaliana* wurden bislang zwei plastidäre Diterpen-Synthasen charakterisiert, die an der Biosynthese von Gibberellinen beteiligt sind, die Copalyldiphosphat-Synthase (Sun und Kmiya, 1994) und die ent-Kauren Synthase (Yamaguchi *et al.*, 1998). Das erstgenannte Enzym verwendet

Diskussion

GGDP als Substrat, um Copalyldiphosphat zu synthetisieren, welches wiederum durch das zweitgenannte Enzym zur Synthese von ent-Kauren, einer Vorstufe der Gibberellinsäuren, genutzt wird.

Dass der Zwergenwuchs durch den verringerten Gehalt an Gibberellinsäuren hervorgerufen zu werden scheint, zeigte auch die Behandlung der generierten transgenen Pflanzen der T2 Generation mit Gibberellinsäure (GA3). So konnte der Phänotyp der transgenen Tabak Pflanzen durch die Zugabe von Gibberellinsäure komplementiert werden.

Auch die von Orlova *et al.*, (2009) generierten *N. tabacum* Pflanzen, die die kleine Untereinheit der *GDPS* aus Löwenmäulchen exprimierten, zeigten einen Zwergenwuchs der durch die Hinzugabe von GA3 komplementiert werden konnte.

Weitere Experimente, wie etwa der Vergleich der Gehalte an verschiedenen Gibberellinsäuren transgener Pflanzen und Wildtyp Pflanzen mittels LC/MS Messungen, könnten diese Vermutung weiter bekräftigen. Leider konnte dieses Experiment aus zeitlichen Gründen jedoch nicht im Umfang der vorliegenden Arbeit durchgeführt werden.

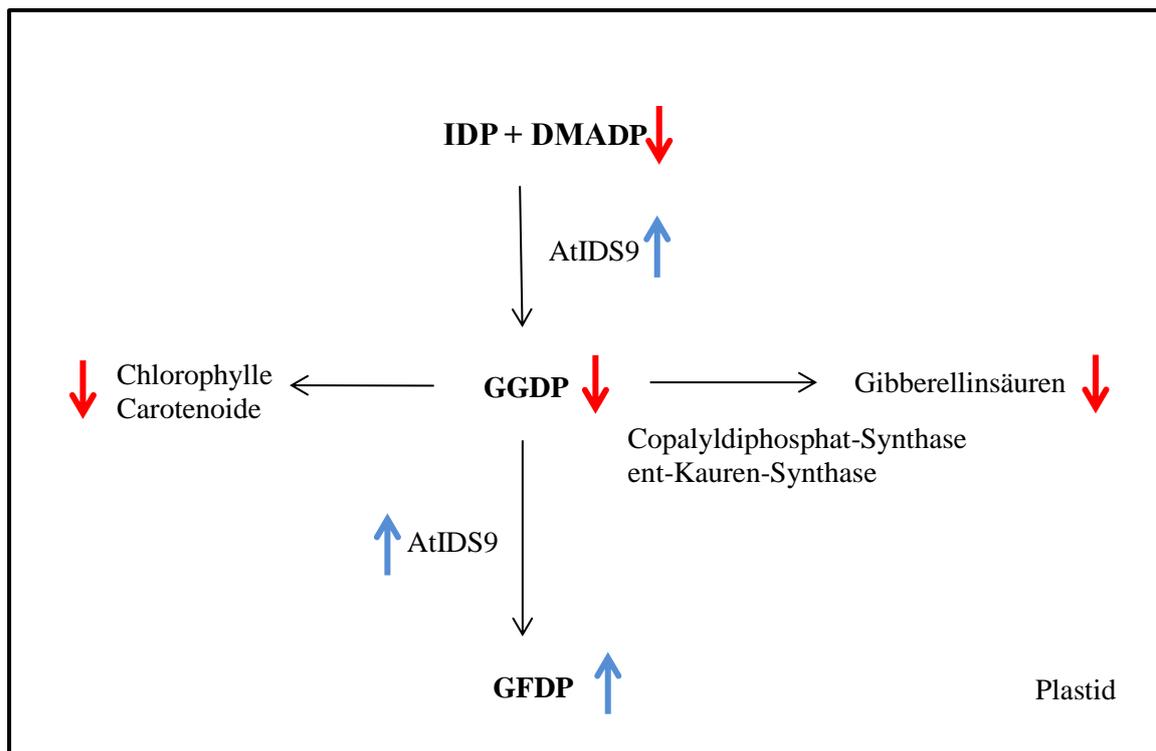


Abbildung 34: Modell zur Erklärung des durch die Überexpression der *AtIDS9* entstandenen Phänotyps in den Plastiden von *N. tabacum*. Durch die Überexpression der *AtIDS9*, nutzt diese neben IDP die in den Plastiden vorhandenen allylischen Substrate DMADP, GDP, FDP und GGDP um GFDP zu synthetisieren. Dies führt zu einer Verringerung des Gehaltes dieser Substrate. Der verringerte Gehalt an GGDP führt wiederum zu einem geringeren Gehalt an Chlorophyllen, Carotenoiden und Gibberellinsäuren. Dies kann das Auftreten von gelblichen Blättern und verringerter Seneszenz bzw. Zwergenwuchs in den stabil transformierten Pflanzen bewirken. roter Pfeil: Verringerung der Gehalte der jeweiligen Substanz, blauer Pfeil: Erhöhung der Gehalte der jeweiligen Substanz bzw. des Enzyms.

4.7 GFDP synthetisierende IDS könnten an der Synthese von Sesterterpenen beteiligt sein

Sesterterpene wurden 1965 entdeckt und bisher in diversen Organismen wie Pilzen (Wang *et al.*, 1998, 2013; Cueto *et al.*, 2002; Nihashi *et al.*, 2002; Chiba *et al.*, 2013), Bakterien (Sato *et al.*, 2013; Shinozaki *et al.*, 2013), Insekten (Rios *et al.*, 1974; Veloz *et al.*, 1975; Kusumi *et al.*, 1979) und einige höhere Pflanzen (Toyoda *et al.*, 1969; Stipanovic *et al.*, 1977; Catalan *et al.*, 2003; Dal Piaz *et al.*, 2010; Luo *et al.*, 2010; McDowell *et al.*, 2011; Challinor *et al.*, 2013) nachgewiesen. Sesterterpene kommen in der Natur eher selten vor. Zu den prominenten Sesterterpenen gehören die phytotoxisch wirkenden Ophiobolane (Ophioboline A, B, C und F), die von den phytopathogenen Pilzen *Cochliobolus miyabeanus* und *Helminthosporium oryzae* produziert werden (Au *et al.*, 2000a).

Der Nachweis der Existenz von GFDP in *A. thaliana*, der im Zuge dieser Arbeit erhalten werden konnte, lässt die Frage aufkommen, in wie weit das gebildete GFDP in der Pflanze zur Produktion von Sesterterpenen durch Terpensynthasen genutzt wird. Bislang gibt es in *A. thaliana* mehr als zwei Dutzend Terpensynthasen, deren Substrate und Produkte noch unerforscht sind und die somit potentiell an der Synthese von Sesterterpenen beteiligt sein könnten (Aubourg *et al.*, 2002). Eines dieser Enzyme ist die AtTPS28 (Abbildung 35).

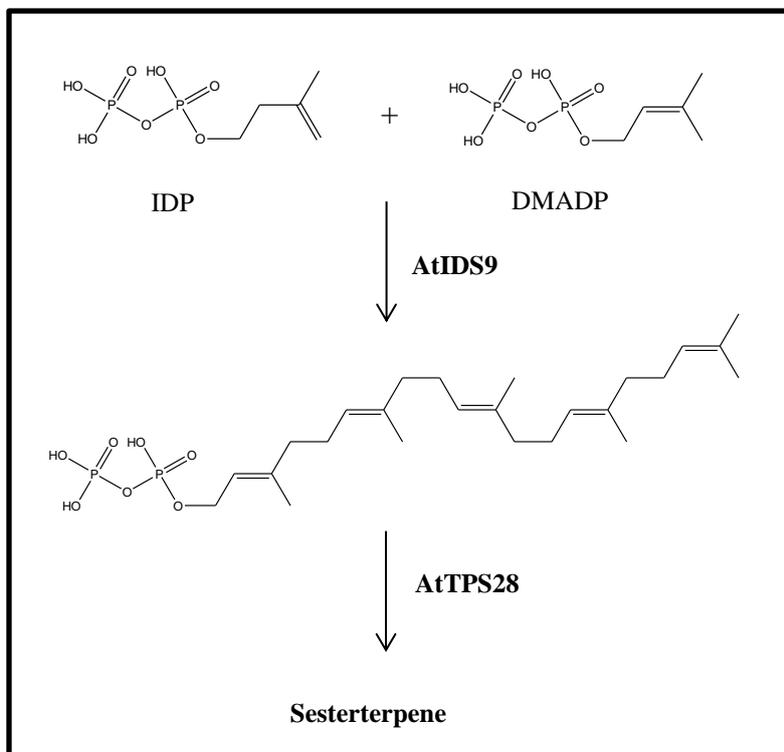


Abbildung 35: Schematische Darstellung der katalytischen Reaktion der AtIDS9 und der TPS28, bei der die AtIDS9 die Produkte der AtIDS9 zur Synthese von Sesterterpenen nutzt.

Diskussion

Diese TPS ist ein besonders vielversprechender Kandidat hierfür, da ihre Produkte noch unbekannt sind, da es eine übereinstimmende zeitlich-räumliche Lokalisation der AtTPS28 mit der AtIDS9 gibt und weil beide Gene koexprimiert sind. Für die Untersuchung, ob die AtTPS28 GFDP als Substrat verwenden kann, wurde zunächst eine transiente (in *N. benthamiana*) bzw. stabile Koexpression (in *N. tabacum*) der AtIDS9 und der AtTPS28 durchgeführt. Anschließend wurden die Produkte der AtTPS28 mittels GC-MS Analysen von Blatt-Oberflächenextrakten untersucht. Dabei konnten in den transienten Assays fünf Produkte, bei denen es sich um Sesterterpene handeln könnte, detektiert werden. Um dies genauer zu untersuchen, sind jedoch weitere Experimente zur Analyse der gebildeten Produkte notwendig. So müsste etwa die AtTPS28 heterolog exprimiert, aufgereinigt und in einem *in vitro* Assay mittels GC/MS und NMR-Analysen auf ihre Substrat- und Produktspezifität untersucht werden. Auch die stabil transformierten Pflanzen zeigten zwei mögliche Produkte der AtTPS28 auf. Hierbei handelte es sich jedoch wahrscheinlich um Diterpene mit einer zusätzlichen Doppelbindung und nicht um die erwarteten Sesterterpene. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte in der viel längeren Expression der AtTPS28 im Vergleich mit dem transienten Assay liegen. So könnte es sein, dass in dem Zeitraum die von der AtTPS28 synthetisierten Terpenen durch in der Pflanze vorhandene Enzyme modifiziert wurden. Hierzu zählen unter anderem Modifikationen wie die Glykosylierung durch Glykosyltransferasen oder die Oxidation durch P450 Oxygenasen. Durch diese Modifikationen wäre das erhaltene Produkt der AtTPS28 gaschromatografisch nicht mehr sichtbar. Ob die AtTPS28 wirklich Sesterterpene synthetisieren kann, konnte somit anhand der erhaltenen Daten nicht eindeutig aufgeklärt werden. Da jedoch bereits in vielen höheren Pflanzen, etwa aus der Familie der Nachtschattengewächse (*Solanaceae*, Toyoda *et al.*, 1969; McDowell *et al.*, 2011), der Lippenblütler (*Lamiaceae*, Dal Piaz *et al.*, 2010; Luo *et al.*, 2010), der Lindengewächse (*Gossypium hirsutum*; Malvaceae; Stipanovic *et al.*, 1977), der Wolfsmilchgewächse (*Croton hieronymi*; Euphorbiaceae; Catalan *et al.*, 2003) und der Liliengewächse (*Aletris farinosa*; Liliaceae; Challinor *et al.*, 2013) Sesterterpene detektiert wurden, liegt die Vermutung nahe, dass auch *A. thaliana* Sesterterpene produzieren könnte.

Neueste Forschungsergebnisse, die erst nach der Anfertigung der in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse veröffentlicht wurden, konnten diese Vermutung bestätigen und einen Nachweis für die Produktion von Sesterterpenen in *A. thaliana* erbringen (Wang *et al.*, 2016, Shao *et al.*, 2017 und Huang *et al.*, 2017). Hierbei wurden die AtTPS17, 18, 19, 25 und 30 als Sesterterpen-Synthase identifiziert. Die AtTPS19, 25 und 30 sind auch in den Wurzeln exprimiert (The Arabidopsis Information Resource, TAIR; [http //arabidopsis.org](http://arabidopsis.org))

und könnten somit das von der AtIDS9 produzierte GFDP zur Synthese von Sesterterpenen nutzen.

Zusammenfassend konnten im Umfang der vorliegenden Arbeit erste Hinweise gewonnen werden, dass die AtTPS28 die Substrate der AtIDS9 unter den untersuchten Bedingungen nutzt, um Sesterterpene zu synthetisieren. Hier sollte in Betracht gezogen werden, dass die Produktion der Sesterterpene auch stressinduziert sein kann (Umweltstress, wie Bakterien- bzw. Pilzinfektion, oder Befall von Insekten oder Herbivore). Zudem kann nicht ausgeschlossen werden, dass nicht noch andere der aktuell 14 TPS, die in *A. thaliana* in den Wurzeln lokalisiert sind und von denen einige noch uncharakterisiert sind (Chen *et al.*, 2003, 2011; Tholl and Lee, 2011), Sesterterpene produzieren können. Auch diese sollten auf Verwendung von GFDP als Substrat getestet werden. Hier scheinen neben der AtTPS28 auch die AtTPS29 (At1g31950) oder die AtTPS26 (At1g66020) geeignete Kandidaten zu sein.

5 Ausblick

Durch die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Daten konnte gezeigt werden, dass in der höheren Pflanze *A. thaliana* mindestens eine GFDP Isoprenyldiphosphat-Synthase existiert. Dieses Intermediat (GFDP) des Terpenstoffwechsels wird sowohl von der in dieser Arbeit charakterisierten AtIDS9 als auch von den Isoenzymen AtIDS1, 6, 7, 10 (Nagel *et al.*, 2015) synthetisiert. Durch diesen Nachweis der Produktion von GFDP in *A. thaliana* werden wiederum eine Reihe neuer Fragen aufgeworfen. So wurde die biologische Funktion von GFDP bisher vordergründig in *Archaeen* untersucht (Tachibana *et al.*, 1994, 2000). Hierbei zeigte sich, dass GFDP in den *Archaeen* *Aatronobacterium pharaonis* und *Aeropyrum pernix*, für die Biosynthese von prenylierten Membran-Lipiden benötigt wird. Welche Funktion GFDP in höheren Pflanzen einnimmt ist hingegen bislang noch unbekannt.

Um ein besseres Verständnis über die Funktion des GFDP's zu gewinnen, sollte zunächst die weitere Verstoffwechslung dieses Intermediates der Terpensynthese näher untersucht werden. Vielversprechende Kandidaten hierfür stellen vor allem die bislang uncharakterisierten, in der Wurzel lokalisierten Terpensynthasen aus *A. thaliana*, wie etwa die AtTPS28 (Chen *et al.*, 2003; Tholl und Lee, 2011) aber auch die AtTPS26 und AtTPS29, dar. Aktuellste Forschungsergebnisse, die erst nach der Fertigstellung der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente publiziert wurden, zeigen, dass in *A. thaliana* tatsächlich TPS (AtTPS17, 18, 19, 25 und 30) existieren, die Sesterterpene synthetisieren können (Wang *et al.*, 2016; Shao *et al.*, 2017; Huang *et al.*, 2017). Da die AtTPS18 jedoch nicht wie die AtIDS9 in den Wurzeln, sondern in den Samen bzw. Schoten exprimiert sind, lässt sich eine Nutzung des von der AtIDS9 produzierten GFDP's durch dieses Enzym ausschließen. Die AtTPS19 hingegen zeigt wie die AtIDS9 eine Lokalisation in den Wurzeln, was sie somit, neben den eben genannten AtTPS, auch zu einem geeigneten Kandidaten für die weitere Verstoffwechslung des in den Wurzeln gebildeten GFDP's macht. Aus diesem Grund sollte die AtTPS28 und die anderen genannten AtTPS in *N. benthamiana* heterolog exprimiert, aufgereinigt und mit Hilfe von *in vitro* Assays mit dem Substrat GFDP auf die Bildung von Sesterterpenen untersucht werden. Sollten hierbei tatsächlich Sesterterpene detektiert werden können, so könnte durch eine anschließende Aufreinigung und Analyse der Produkte mittels NMR die genaue Struktur der Produkte ermittelt werden.

Des Weiteren sollten für ein umfassendes Verständnis des GFDP-Stoffwechsels in *A. thaliana* auch die anderen GFDP synthetisierenden AtIDS funktionell charakterisiert werden. So sollten auch die AtIDS1, 6, 7 und 10 heterolog in *N. benthamiana* exprimiert und aufgereinigt werden. Die so erhaltenen Enzyme könnten dann ebenfalls für die Ermittlung der Substratspektren und kinetischen Eigenschaften verwendet werden.

Außerdem sollten auch Untersuchungen, die einen Einblick in die genomische Organisation von GFDP produzierenden IDS und Sesterterpen-Synthasen ermöglichen, durchgeführt werden. Bereits Huang *et al.*, (2017) identifizierte im Genom einen Pool an kolokalisierten IDS und Sesterterpen-Synthasen aus *A. thaliana*, sowie auch aus anderen Pflanzen (*Capsella rubella*, *Brassica oleracea*). Die TPS25 (At3g29410), die sowohl Diterpen- als auch Sesterterpenaktivität zeigt, wenn sie in *E. coli* exprimiert wird (Wang *et al.*, 2016), liegt auf dem Chromosom 3 sehr nah bei der AtIDS9. Experimentelle Expressionsstudien mittels quantitativer PCR könnten Aufschluss darüber geben, ob beide Gene zur gleichen Zeit in den gleichen Geweben exprimiert werden und sie somit ein Gen-Cluster bilden.

Schlussendlich sollten weitere Experimente erfolgen, um der Frage nachzugehen, welche Funktion die zwei GFDP-Poole in den Mitochondrien und in den Plastiden besitzen. Hier sollte die Generierung (zum Beispiel durch die CRISPR-Methode) von GFDP Mangel Mutanten (*A. thaliana*) aller AtIDS, die in den Plastiden exprimiert werden bzw. der in den Mitochondrien exprimierten AtIDS6 in Betracht gezogen werden, um von diesen Mutanten nicht nur eine phänotypische Analyse, sondern auch einen Vergleich des Metabolit-spektrums von WT und der Mutanten aufzunehmen. Dies könnte zum Beispiel in einem unpolaren, organischen Lösungsmittel, wie n-Hexan, Pentan, Chloroform oder DMSO gelöst werden. Da Terpene keine Phosphatgruppen beinhalten wie GFDP, können diese anschließend gaschromatografisch ermittelt werden.

Alles in allem konnte in der vorliegenden Arbeit eine umfassende Charakterisierung der Lokalisation, Kinetik sowie ein erster Einblick in die biologische Funktion der AtIDS9 gewonnen werden, was eine Grundlage für die Analyse weiterer GFDP produzierender IDS aus *A. thaliana* darstellt. Darüber hinaus konnte ein indirekter Nachweis erbracht werden, dass auch in der Modellpflanze *A. thaliana* GFDP gebildet wird, was wiederum einen Ausgangspunkt für die weitere Untersuchung der Verstoffwechslung von GFDP sowie der biologischen Funktion dieses Terpenvorläufers in *A. thaliana* und anderen höheren Pflanzen darstellt.

6 Literaturverzeichnis

- Aharoni A**, Giri AP, Deuerlein S, Griepink F, de Kogel WJ, Verstappen FW, Verhoeven HA, Jongsma MA, Schwab W, Bouwmeester HJ. (2003). Terpenoid metabolism in wild-type and transgenic *Arabidopsis* plants. *Plant Cell*. 15: 2866–2884.
- Aharoni A**, Giri AP, Verstappen FW, Berteaux CM, Sevenier R, Sun Z, Jongsma MA, Schwab W, Bouwmeester HJ. (2004). Gain and loss of fruit flavor compounds produced by wild and cultivated strawberry species. *Plant Cell*. 16: 3110-3131.
- Aharoni A**, Jongsma MA, Kim T, Ri M, Giri AP, Verstappen FW, Schwab W, Bouwmeester HJ. (2006). Metabolic engineering of terpenoid biosynthesis in plants. *Phytochem. Rev.* 5: 49–58.
- Akhtar TA**, Matsuba Y, Schauvinhold I, Yu G, Lees HA, Klein SE, Pichersky E. (2013) The tomato *cis*-prenyltransferase gene family. *Plant J*. 73: 640–652.
- Ambo T**, Noike M, Kurokawa H, Koyama T. (2008). Cloning and functional analysis of novel short-chain *cis*-prenyltransferases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 375: 536-540.
- Ament K**, Van Schie CC, Bouwmeester HJ, Haring MA, Schuurink RC. (2006). Induction of a leaf specific geranylgeranyl diphosphate synthase and emission of (E,E)-4,8,12-trimethyltrideca-1,3,7,11-tetraene in tomato are dependent on both jasmonic acid and salicylic acid signaling pathways. *Planta*. 224: 1197-1208.
- Aoki Y**, Okamura Y, Tadaka S, Kinoshita K, Obayashi T. (2016). ATTED-II in 2016: a plant coexpression database towards lineage-specific coexpression. *Plant Cell Physiology*. 57: e5.
- Arigoni D**, Sagner S, Latzel C, Eisenreich W, Bacher A, Zenk MH. (1997). Terpenoid biosynthesis from 1-deoxy-d-xylulose in higher plants by intramolecular skeletal rearrangement. *PNAS*. 94: 10600-10605.
- Arimura GI**, Ozawa R, Shimoda T, Nishioka T, Boland W, Takabayashi J. (2000). Herbivory-induced volatiles elicit defence genes in lima bean leaves. *Nature*. 406: 512-515.
- Ashby MN**, Kutsunai SY, Ackerman S, Tzagoloff A, Edwards PA. (1992). COQ2 is a candidate for the structural gene encoding *parahydroxybenzoate*: polyprenyltransferase. *J Biol Chem*. 267: 4128-4136.

- Ashby MN, Edward PA.** (1990). Elucidation of the deficiency in two yeast coenzyme Q mutants: characterization of the structural gene encoding hexaprenyl diphosphate synthetase. *J Biol Chem.* 265: 13157-13164.
- Au TK, Chick WSH, Leung PC.** (2000a). The biology of ophiobolins. *Life Sci.* 67: 733–742.
- Aubourg S, Lecharny A, Bohlmann J.** (2002). Genomic analysis of the terpenoid synthase gene family of *Arabidopsis thaliana*. *Mol Genet Genomics.* 267: 730–745.
- Austin JR, Frost E, Vidi PA, Kessler F, Staehelin LA.** (2006). Plastoglobules are lipoprotein subcompartments of the chloroplast that are permanently coupled to thylakoid membranes and contain biosynthetic enzymes. *Plant Cell.* 18:1693–1703.
- Bashiriiah A, Cooperstock RL, Lipshitz HD.** (2001). Spatial and temporal control of RNA stability. *PNAS.* 98: 7025-7028
- Beck G, Coman D, Herren E, Águila Ruiz-Sola M, Rodríguez-Concepción M, Gruijssem W, Vranová E.** (2013). Characterisation of the GGDP synthase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol.* 82: 393-416.
- Beerhues L.** (2006). Hyperforin. *Phytochemistry.* 67: 2201-7.
- Bick JA, Lange BM.** (2003). Metabolic cross talk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis: unidirectional transport of intermediates across the chloroplast envelope membrane. *Arch Biochem Biophys.* 41: 146-154.
- Birnbaum K, Shasha DE, Wang JY, Jung JW, Lambert GM, Galbraith DW, Benfey PN.** (2003). A gene expression map of the *Arabidopsis* root. *Science.* 302: 1956-60.
- Bohlmann J, Meyer-Gauen G, Croteau R.** (1998a). Plant terpenoid synthases: Molecular biology and phylogenetic analysis. *PNAS.* 95: 4126-4133.
- Bouvier F, Suire, C, d'Harlingue, A, Backhaus, RA, Camara, B.** (2000). Molecular cloning of geranyl diphosphate synthase and compartmentation of monoterpene synthesis in plant cells. *Plant J.* 24: 241–252.
- Bradford MM.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248–254.
- Bruce BD.** (2000). Chloroplast transit peptides: structure, function and evolution. *Trends Cell Biol.* 10: 440-7.
- Bruce BD.** (2001). The paradox of plastid transit peptides: conservation of function despite divergence in primary structure. *Biochim Biophys Acta.* 1541: 2-21.

Literaturverzeichnis

- Brückner K**, Bozic D, Manzano D, Papaefthimiou D, Pateraki I, Scheler U, Ferrer A, de Vos RCH, Kanellis AK, Tissier, A. (2014). Characterization of two genes for the biosynthesis of abietane-type diterpenes in rosemary (*Rosmarinus officinalis*) glandular trichomes. *Phytochemistry*. 101: 52-64.
- Buchanan B**, Gruissem W, Jones RL. (2000). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Merican Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland.
- Bueno E**, Mesa S, Bedmar EJ, Richardson DJ, Delgado MJ. (2012). Bacterial adaptation of respiration from oxic to microoxic and anoxic conditions: redox control. *Antioxidants and Redox Signaling*. 16: 819-852.
- Burke C, Croteau R.** (2002b). Geranyl diphosphate synthase from *Abies grandis*: cDNA isolation, functional expression, and characterization. *Arch Biochem Biophys*. 405: 130–136.
- Burke C, Croteau R.** (2002a). Interaction with the small subunit of geranyl diphosphate synthase modifies the chain length specificity of geranylgeranyl diphosphate synthase to produce geranyl diphosphate. *J Biol Chem*. 277: 3141–3149.
- Burke C**, Klettke K, Croteau R. (2004). Heteromeric geranyl diphosphate synthase from mint: construction of a functional fusion protein and inhibition by bisphosphonate substrate analogs. *Arch Biochem Biophys*. 422: 52–60.
- Campbell M**, Hahn FM, Poulter CD, Leustek T. (1997). Analysis of the isopentenyl diphosphate isomerase gene family from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol*. 36: 323-328.
- Catalan CA**, de Heluani CS, Kotowicz C, Gedris TE, Herz W. (2003). A linear sesterterpene, two squalene derivatives and two peptide derivatives from *Croton hieronymi*. *Phytochemistry*. 2003. 64: 625–629.
- Cazzonelli CI, Pogson BJ.** (2010). Source to sink: regulation of carotenoid biosynthesis in plants. *Trends in Plant Science*. 15: 266-274
- Cervantes-Cervantes M**, Gallagher CE, Zhu C, Wurtzel ET. (2006). Maize cDNAs expressed in endosperm encode functional farnesyl diphosphate synthase with geranylgeranyl diphosphate synthase activity. *Plant Physiol*. 141: 220–231.
- Challinor VL**, Chap S, Lehmann RP, Bernhardt PV, De Voss JJ. (2013). Structure and absolute configuration of methyl-(3R)-malonyl-(13S)-hydroxycheilanth-17-en-19-oate, a sesterterpene derivative from the roots of *Aletris farinosa*. *J Nat Prod*. 76: 485–488.
- Chang TH**, Guo RT, Ko TP, Wang AH, Liang PH. (2006). Crystal structure of type-III geranylgeranyl diphosphate synthase from *Saccharomyces cerevisiae* and the mechanism of product chain length determination. *J Biol Chem*. 281: 14991-5000.

- Chang, TH**, Hsieh, FL, Ko, TP, Teng, KH, Liang, PH and Wang, AHJ. (2010). Structure of a heterotetrameric geranyl diphosphate synthase from mint (*Mentha piperita*) reveals intersubunit regulation. *Plant Cell*. 22: 454–467.
- Chen A**, Kroon PA, Poulter CD. (1994). Isoprenyldiphosphate synthases: protein sequence comparisons, a phylogenetic tree and predictions of secondary structure. *Protein Sci*. 3: 600-607.
- Chen A; Poulter CD**. (1994). Isolation and characterization of *idsA*: the gene for the short chain isoprenyl diphosphate synthase from *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Arch Biochem Biophys*. 314: 399–404.
- Chen F**, Tholl D, D'Auria JC, Farooq A, Pichersky E, Gershenzon J. (2003). Biosynthesis and emission of terpenoid volatiles from *Arabidopsis* flowers. *Plant Cell*. 15: 481–494.
- Chiba R**, Minami A, Gomi K, Oikawa H. (2013). Identification of Ophiobolin F synthase by a genome mining approach: a sesterterpene synthase from *Aspergillus clavatus*. *Org. Lett*. 15: 594–597.
- Closa M**, Vranová E, Bortolotti C, Bigler L, Arro M, Ferrer A, Grissem W. (2010). The *Arabidopsis thaliana* FDP synthase isozymes have overlapping and specific functions in isoprenoid biosynthesis, and complete loss of FDP synthase activity causes early developmental arrest. *Plant J*. 63: 512–525.
- Clough SJ, Bent AF**. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*. 16: 735-43.
- Coman D**, Altenhoff A, Zoller S, Grissem W, Vranová E. (2014). Distinct evolutionary strategies in the GGDPS family from plants. *Front Plant Sci*. 5: 230.
- Croteau R**, Cane DE. (1985). Monoterpene and sesquiterpene cyclases. *Methods in Enzymology*, Academic Press. 110: 383-405.
- Crowell DN; Huizinga DH**. (2009). Protein isoprenylation: the fat of the matter. *Trends Plant Sci*. 14: 163-170.
- Cueto, M**, Jensen, PR and Fenical, W. (2002). Aspergilloxide, a novel sesterterpene epoxide from a marine-derived fungus of the genus *Aspergillus*. *Org Lett*. 4: 1583–1585.
- Dal Piaz F**, Imperato S, Lepore L, Bader A, De Tommasi N. (2010). A fast and efficient LC-MS/MS method for detection, identification and quantitative analysis of bioactive sesterterpenes in *Salvia dominica* crude extracts. *J Pharm Biomed Anal*. 51: 70–77.
- Degenhardt J**, Köllner TG, Gershenzon J. (2009). Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. *Phytochemistry*. 70: 1621-1637.

Literaturverzeichnis

- Disch A**, Rohmer M. (1998). On the absence of the glyceraldehyde 3 phosphate/pyruvate pathway for isoprenoid biosynthesis in fungi and yeasts. *FEMS Microbiol Lett.* 168: 201–208.
- Disch A**, Schwender J, Müller C, Lichtenthaler HK, Rohmer M. (1998). Distribution of the mevalonate and glyceraldehyde phosphate/pyruvate pathways for isoprenoid biosynthesis in unicellular algae and the cyanobacterium *Synechocystis* PCC. 6714. *Biochem J.* 333: 381–388.
- Dogbo O**, **Camara B.** (1987). Purification of isopentenyl diphosphate isomerase and geranylgeranyl diphosphate synthase from *Capsicum* chromoplasts by affinity chromatography. *Biochim Biophys Acta.* 920: 140–148.
- Dudareva N**, Andersson S, Orlova I, Gatto N, Reichelt M, Rhodes D, Boland W, Gershenzon J. (2005). The nonmevalonate pathway supports both monoterpene and sesquiterpene formation in snapdragon flowers. *PNAS.* 102: 933–938.
- Ebada SS**, Lin WH, Proksch P. (2010). Bioactive sesterterpenes and triterpenes from marine sponges: occurrence and pharmacological significance. *Marine Drugs.* 8: 313–346.
- Emanuelsson O**, Nielsen H, Brunak S, von Heijne G. (2000). Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J Mol Biol.* 300: 1005-1016.
- Emanuelsson O**, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. (2007). Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP, and related tools. *Nat Protoc.* 2: 953-971.
- Engler C**, Kandzia, R, Marillonnet, S. (2008). A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability. *PLoS One.* 3:e3647.
- Engler C**, Youles M, Gruetzner R, Ehnert TM, Werner S, Jones JD, Patron NJ, Marillonnet S. (2014). A Golden Gate modular cloning toolbox for plants. *ACS Synth Biol.* 3: 839–843.
- Ennajdaoui H**, Vachon G, Giacalone C, Besse I, Sallaud C, Herzog M, Tissier A. (2010). Trichome specific expression of the tobacco (*Nicotiana sylvestris*) cembratrienol synthase genes is controlled by both activating and repressing cis-regions. *Plant Mol Biol.* 73: 673-85.
- Ferriols VMEN**, Yaginuma R, Adachi M, Takada K, Matsunaga S, Okada S. (2015). Cloning and characterization of farnesyl diphosphate synthase from the highly branched isoprenoid producing diatom *Rhizosolenia setigera*. *Sci Rep.* 5: 10246.

- Fujii H**, Koyama T, Ogura K. (1982). Hexaprenyl diphosphate synthetase from *Micrococcus luteus* B-P 26. Separation of two essential components. *J Biol Chem.* 257: 14610-14612.
- Gabius HJ**, Andre S, Kaltner H, Siebert HC. (2002). The sugar code: functional lectinomics. *Biochim Biophys Acta.* 1572: 165– 177.
- Gershenson J; Dudareva N.** (2007). The function of terpene natural products in the natural world. *Nat Chem Biol.* 3: 408-14.
- Glas JJ**, Schimmel BC, Alba JM, Escobar-Bravo R, Schuurink RC, Kant MR. (2012). Plant glandular trichomes as targets for breeding or engineering of resistance to herbivores. *Int J Mol Sci.* 13: 17077-103.
- Gray JC.** (1987). Control of isoprenoid biosynthesis in higher plants. *Adv Bot Res.* 14: 25–91.
- Hall DE**, Robert JA, Keeling CI, Domanski D, Quesada AL, Jancsik S, Kuzyk MA, Hamberger B, Borchers CH und Bohlmann J. (2011). An integrated genomic, proteomic and biochemical analysis of (+)-3-carene biosynthesis in Sitka spruce (*Picea sitchensis*) genotypes that are resistant or susceptible to white pine weevil. *The Plant Journal.* 65: 936–948.
- Hammerschmidt R.** (1999). Phytoalexins: what have we learned after 60 years? *Annu Rev Phytopathol.* 37: 285–306.
- Hampel D**, Mosandl A, Wüst M. (2005). Biosynthesis of mono- and sesquiterpenes in carrot roots and leaves (*Daucus carota* L.): metabolic cross talk of cytosolic mevalonate and plastidial methylerythritol phosphate pathways. *Phytochemistry.* 66: 305-311.
- Hartmann T.** (1991). Alkaloids. In *Herbivores: Their Interactions with Secondary Plant Metabolites*, 2nd ed., Vol. I: The Chemical Participants, G.A. Rosenthal and M.R. Berenbaum, eds (San Diego: Academic Press), pp. 79 – 121.
- Hartmann T.** (1996). Diversity and variability of plant secondary metabolism: a mechanistic view. *Entomol. Exp. Appl.* 1996, 80: 177 – 188.
- Heiling S**, Schuman MC, Schoettner M, Mukerjee P, Berger B, Schneider B, Jassbi AR, Baldwin IT. (2010). Jasmonate and ppHsystemin regulate key malonylation steps in the biosynthesis of 17-hydroxygeranylinalool diterpene glycosides, an abundant and effective direct defense against herbivores in *Nicotiana attenuata*. *Plant Cell.* 22: 273–292.
- Hsiao YY**, Jeng MF, Tsai WC, Chuang YC, Li CY, Wu TS, Kuoh CS, Chen WH, Chen HH. (2008). A novel homodimeric geranyl diphosphate synthase from the orchid *Phalaenopsis bellina* lacking a DD(X)₂₋₄ motif. *Plant J.* 55: 719–733.

Literaturverzeichnis

- Hsieh FL**, Chang TH, Ko TP, Wang AHJ. (2011). Structure and mechanism of an *Arabidopsis* medium/long-chain-length prenyl diphosphate synthase. *Plant Physiol.* 155: 1079–1090.
- Huang AC**, Kautsar SA, Hong YJ, Medema MH, Bond AD, Tantillo DJ, Osbourn A. (2017). Unearthing a sesterterpene biosynthetic repertoire in the *Brassicaceae* through genome mining reveals convergent evolution. *PNAS.* 114: 6005-6014.
- Huang M**, Abel C, Sohrabi R, Petri J, Haupt I, Cosimano J, Gershenzon J, Tholl D. (2010). Variation of herbivore-induced volatile terpenes among *Arabidopsis* ecotypes depends on allelic differences and subcellular targeting of two terpene synthases, TPS02 and TPS03. *Plant Physiol.* 153: 1293-310.
- Huang M**, Sanchez-Moreiras AM, Abel C, Sohrabi R, Lee S, Gershenzon J, Tholl D. (2012). The major volatile organic compound emitted from *Arabidopsis thaliana* flowers, the sesquiterpene (E)- β -caryophyllene, is a defense against a bacterial pathogen. *New Phytol.* 193: 997-1008.
- Huchelmann A**, Boutry M und Hachez C. (2017). Plant glandular trichomes: natural cell factories of high biotechnological interest. *Plant Physiology.* 175: 6-22.
- Ishii K**, Sagami H, Ogura K. (1983). Decaprenyl diphosphate synthetase from mitochondria of pig liver. *Biochem Biophys Res Commun.* 116: 500-506.
- Ishii K**, Sagami H, Ogura K.. (1986). A novel prenyltransferase from *Paracoccus denitrificans*. *Biochemical Journal.* 233: 773–777.
- Jarvis P.** (2008). Targeting of nucleus-encoded proteins to chloroplasts in plants. *New Phytol.* 179: 257-285.
- Jansen RP.** (2001). mRNA localization: message on the move. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2: 247-256
- Jiang Z**, Kempinski C, Bush CJ, Nybo SE, Chappell J. (2016). Engineering Triterpene and Methylated Triterpene Production in Plants Provides Biochemical and Physiological Insights into Terpene Metabolism. *Plant Physiology.* 170: 702-716.
- Jones S, Thornton JM.** (1996). Principles of protein-protein interactions. *PNAS.* 93: 13-20.
- Kandutsch AA**, Paulus H, Levin E, Bloch K. (1964). Purification of geranylgeranyl diphosphate synthase from *Micrococcus lysodeikticus*. *J Biol Chem.* 239: 2507-2515.
- Kavanagh KL**, Dunford JE, Bunkoczi G, Russell RG, Oppermann U. (2006). The crystal structure of human geranylgeranyl diphosphate synthase reveals a novel hexameric arrangement and inhibitory product binding. *J Biol Chem.* 281: 22004-2212.

- Kearse M**, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Duran C, Thierer T, Ashton B, Mentjies P, Drummond A (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*. 28: 1647-1649.
- Kessler F**, Schnell D, Blobel G. (1999). Identification of proteins associated with plastoglobules isolated from pea (*Pisum sativum* L.) chloroplasts. *Planta*. 208: 107–113.
- Kessler F, Vidi PA.** (2007). Plastoglobule lipid bodies: their functions in chloroplasts and their potential for applications. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 107: 153–172.
- Kessler A, Baldwin IT.** (2001). Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. *Science*. 291: 2141-2144.
- Kleinig H.** (1989). The role of plastids in isoprenoid biosynthesis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 40: 39–59.
- Ko K, Cashmore AR.** (1989). Targeting of proteins to the thylakoid lumen by the bipartite transit peptide of the 33 kd oxygen-evolving protein. *Embo J*. 8: 3187-3194.
- Köhler RH**, Zipfel WR, Webb WW, Hanson MR. (1997). The green fluorescent protein as a marker to visualize plant mitochondria in vivo. *Plant J*. 11: 613–621.
- Köksal M**, Hu H, Coates RM, Peters RJ, Christianson DW. (2011). Structure and mechanism of the diterpene cyclase ent-copalyl diphosphate synthase. *Nature Chemical Biology*. 7: 431-433.
- Koncz C, Schell J.** (1986). The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol Gen Genet*. 204: 383-396.
- Kovacs WJ**, Olivier LM, Krisans SK. (2002). Central role of peroxisomes in isoprenoid biosynthesis. *Prog. Lipid Res*. 41: 369–91.
- Koyama T; Ogura K.** (1999). Isopentenyl diphosphate isomerase and prenyltransferases. In *Comprehensive Natural Product Chemistry: Isoprenoids Including Carotenoids and Steroids*, Vol. 2, D.E. Cane, ed (Oxford: Pergamon Press), pp. 69–96.
- Kusumi T**, Kinoshita T, Fujita K, Kakisawa H. (1979). A new macrocyclic sesterterpene acid from *Ceroplastes ceriferus*. *Chem Lett*. 9: 1129–1132.
- Kutchan TM.** (1995). Alkaloid biosynthesis -The basis for metabolic engineering of medicinal plants. *Plant Cell*. 7: 1059 –1070.
- Laferrière A; Beyer P.** (1991). Purification of geranylgeranyl diphosphate synthase from *Sinapis alba* etioplasts. *Biochim Biophys. Acta*, 1077: 167–172.

Literaturverzeichnis

- Lange BM, Ghassemian M.** (2003). Genome organization in *Arabidopsis thaliana*: a survey for genes involved in isoprenoid and chlorophyll metabolism. *Plant Mol Biol.* 51: 925-948.
- Lange BM, Rujan T, Martin W, Croteau R.** (2000). Isoprenoid biosynthesis: the evolution of two ancient and distinct pathways across genomes. *PNAS.* 97: 13172-13177.
- Laskaris G, van der Heijden R, Verpoorte R.** (2000). Purification and partial characterisation of geranylgeranyl diphosphate synthase, from *Taxus baccata* cell cultures. An enzyme that regulates taxane biosynthesis. *Plant Sci.* 153: 97-105.
- Laskovics FM, Poulter CD.** (1981). Prenyltransferase; determination of the binding mechanism and individual kinetic constants for farnesyl diphosphate synthetase by rapid quench and isotope partitioning experiments. *Biochemistry.* 20: 1893-901.
- Laule O, Fürholz A, Chang HS, Zhu T, Wang X, Heifetz PB, Grussem W, Lange M.** (2003). Crosstalk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100: 6866-6871.
- Liang PH, Ko TP, Wang AHJ.** (2002). Structure, mechanism and function of prenyltransferases. *Eur. J. Biochem.* 269: 3339–3354.
- Ling Y, Li ZH, Miranda K, Oldfield E, Moreno SN.** (2007). The farnesyl-diphosphate/geranylgeranyl-diphosphate synthase of *Toxoplasma gondii* is a bifunctional enzyme and a molecular target of bisphosphonates. *J Biol Chem.* 282: 30804–30816.
- Lo CH, Chang YH, Wright JD, Chen SH, Kan D, Lim C, Liang PH.** (2009). Combined experimental and theoretical study of long-range interactions modulating dimerization and activity of yeast geranylgeranyl diphosphate synthase. *J. Am. Chem. Soc.* 131: 4051–4062.
- Luo SH, Luo QA, Niu XM, Xie MJ, Zhao X, Schneider B, Gershenzon J, Li SH.** (2010). Glandular trichomes of *Leucosceptum canum* harbor defensive sesterterpenoids. *Angew. Chem. Int. Ed.* 49: 4471–4475.
- Lynen F, Agranoff BW, Eggerer H, Henning U, Möslein EM.** (1959). γ,γ -Dimethyl-allyl-diphosphat und Geranyl-diphosphat, biologische Vorstufen des Squalens Zur Biosynthese der Terpene, VI. *Angewandte Chemie.* 71: 657–663.
- Marillonnet S, Thoeringer C, Kandzia R, Klimyuk V, Gleba Y.** (2005). Systemic *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants. *Nat. Biotechnol.* 23: 718–723.
- Maurer-Stroh S, Washietl S, Eisenhaber F.** (2003). Protein prenyltransferases: anchor size, pseudogenes and parasites. *Biol. Chem.* 384: 977-989.

- McDowell ET**, Kapteyn J, Schmidt A, Li C, Kang JH, Descour A, Shi F, Larson M, Schillmiller A, An L, Jones AD, Pichersky E, Soderlund CA, Gang DR. (2011). Comparative functional genomic analysis of *Solanum glandular trichome* types. *Plant Physiol.* 155: 524–539.
- Meier S**, Tzfadia O, Vallabhanrini R, Gehring C, Wurtzel ET. (2011). A transcriptional analysis of carotenoid, Chlorophyll and plastidial isoprenoid biosynthesis gene during development and osmotic stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Syst Biol.* 19:77.
- Melzer M; Heide L.** (1994). Characterization of polyprenyldiphosphate: 4-hydroxybenzoate polyprenyltransferase from *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta.* 1212: 93-102.
- Mithöfer A und Boland W.** (2012). Plant defense against herbivores: chemical aspects. *Annu. Rev. Plant Biol.* 63: 431–450.
- Nawy T**, Lee JY, Colinas J, Wang JY, Thongrod SC, Malamy JE, Birnbaum K, Benfey PN. (2005). Transcriptional profile of the *Arabidopsis* root quiescent center. *Plant Cell.* 17: 1908–1925.
- Nelson BK**, Cai X, Nebenführ A. (2007). A multi-color set of *in vivo* organelle markers for colocalization studies in *Arabidopsis* and other plants *Plant Journal.* 51:1126-1136.
- Nihashi Y**, Lim CH, Tanaka C, Miyagawa H, Ueno T. (2002). Phytotoxic sesterterpene, 11-epiterpestacin, from *Bipolaris sorokiniana* NSDR-011. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66: 685–688.
- O'Maille PE**, Malone A, Dellas N, AndesHess BJr, Smentek L, Sheehan I, Greenhagen BT, Chappell J, Manning G, Noel JP. (2008). Quantitative exploration of the catalytic landscape separating divergent plant sesquiterpene synthases. *NatChemBiol.* 4: 617–623.
- Ogawa T**, Yoshimura T, Hemmi H. (2010). Geranylgeranyl diphosphate synthase from *Methanosarcina mazei*: different role, different evolution. *Biochem Biophys Res Commun.*, 393: 16–20.
- Okada K**, Saito T, Nakagawa T, Kawamukai M, Kamiya Y. (2000). Five geranylgeranyl diphosphate synthases expressed in different organs are localized into three subcellular compartments in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 122: 1045–1056.

Literaturverzeichnis

- Orlova I**, Nagegowda DA, Kish CM, Gutensohn M, Maeda H, Varbanova M, Fridman E, Yamaguchi S, Hanada A, Kamiya Y, Krichevsky A, Citovsky V, Pichersky E, Dudareva N. (2009). The small subunit of snapdragon geranyl diphosphate synthase modifies the chain length specificity of tobacco geranylgeranyl diphosphate synthase in planta. *Plant Cell*. 21: 4002-4017.
- Pare PW; Tumilson JH.** (1999). Plant volatiles as a defense against insect herbivores. *Plant Physiol*. 121: 325–331.
- Perello C**, Llamas E, Burlat V, Ortiz-Alcaide M, Phillips M, Pulido P, Rodriguez-Concepcion M. (2016). Differential subplastidial localization and turnover of enzymes involved in isoprenoid biosynthesis in chloroplasts. *PLoS ONE*. 11 :e0150539
- Piller LE**, Abraham M, Dörmann P, Kessler F, Besagni C. (2012). Plastid lipid droplets at the crossroads of prenylquinone metabolism. *Journal of Experimental Botany*. 63: 1609-1618.
- Pojer F**, Wemakor E, Kammerer B, Chen H, Walsh CT, Li SM, Heide L. (2003). CloQ, a prenyltransferase involved in chlorobioicin biosynthesis. *PNAS*. 100: 2316-2321.
- Poulter CD**, Rilling HC (1981) Prenyl transferases and isomerase. In Porter, J.W. and Spurgeon, S.L. (eds), *Biosynthesis of Isoprenoid Compounds*. Vol. 1. John Wiley and Sons, New York, NY, pp. 162–209.
- Proost S**, Van Bel M, Sterck L, Billiau K, Van Parys T, Van de Peer Y, Vandepoele K. (2009). PLAZA: a comparative genomics resource to study gene and genome evolution in plants. *Plant Cell*. 21: 3718–3731.
- Proteau PJ.** (1998) Biosynthesis of phytol in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. UTEX 2470: utilization of the non-mevalonate pathway. *J Nat Prod*. 61: 841–43.
- Quintana-Rodríguez E**, Morales-Vargas AT, Molina-Torres J, Adame-Alvarez RM, Acosta-Gallegos JA, Heil M. (2015). Plant volatiles cause direct, induced and associational resistance in common bean to the fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. *J Ecol*. 103: 250–260.
- Rios T**, Quijano L, Calderon J. (1974). Albolineol, a sesterterpene with a novel bicyclic skeleton. *J Chem Soc Chem Commun*. 18: 728–729.
- Rodríguez-Concepción M.** (2006). Early steps in isoprenoid biosynthesis: Multilevel regulation of the supply of common precursors in plant cells. *Phytochemistry Reviews*. 5: 1-15.
- Rohmer M**, Knani M, Simonin P, Sutter B, Sahn H. (1993). Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochem J*. 295: 517–524.

- Rohmer M.** (1999). The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. *Nat Prod Rep.* 16: 565-74.
- Roskoski RJ.** (2003). Protein prenylation: a pivotal posttranslational process. *Biochem. Biophys. Research Comm.* 303: 1-7.
- Ruiz-Sola MA´,** Barja MV, Manzano D, Llorente B, SchIDPer B, Beekwilder J, Rodriguez-Cconception M. (2016). A single arabidopsis gene encodes two differentially targeted geranylgeranyl diphosphate Synthase Isoforms. *Plant Physiol.* 172:1393-1402.
- Sagami H,** Korenaga T, Ogura K. (1993). Geranylgeranyl diphosphate synthase catalyzing the single condensation between isopentenyl diphosphate and farnesyl diphosphate. *J. Biochem.* 114: 118-121.
- Sagami H,** Ogura K, Seto S. (1977). Solanesyl diphosphate synthetase from *Micrococcus lysodeikticus*. *Biochemistry.* 16: 4616-22.
- Sagami H,** Ogura K, Seto S, Kurokawa T. (1978). A new prenyltransferase from *Micrococcus lysodeikticus*. *Biochem Biophys Res Commun.* 85: 572-578.
- Sagami H,** Ogura K. (1981). Geranylgeranyl diphosphate synthetase lacking geranyl-transferring activity from *Micrococcus luteus*. *J Biochem.* 89: 1573-1580.
- Sagami I,** Fujii H, Koyama T, Ogura K. (1985). Heptaprenyldiphosphate synthetase from *Bacillus subtilis*. *Methods Enzymol.* 110: 199-205.
- Sagami I,** Ojima N, Ogura K, Seto S. (1985). Aspulvinone dimethylallyltransferase. *Methods Enzymol.* 110: 320-326.
- Sallaud C,** Rontein D, Onillon S, Jabès F, Duffé P, Giacalone C, Thoraval S, Escoffier C, Herbette G, Leonhardt N, Causse M, Tissier A. (2009). A novel pathway for sesquiterpene biosynthesis from Z,Z-Farnesyl diphosphate in the wild tomato *Solanum habrochaites*. *Plant Cell.* 21: 301-317.
- Sato T,** Yamaga H, Kashima S, Murata Y, Shinada T, Nakano C, Hoshino T. (2013). Identification of novel sesterterpene/triterpene synthase from *Bacillus clausii*. *Chem Bio Chem.* 14: 822–825.
- Schatz G, Dobberstein B.** (1996). Common principles of protein translocation across membranes. *Science.* 271: 1519-1526.
- Schillmiller AL,** Schauvinhold I, Larson M, Xu R, Charbonneau AL, Schmidt A, Wilkerson C, Last RL, Pichersky E. (2009). Monoterpenes in the glandular trichomes of tomato are synthesized from a neryl diphosphate precursor rather than geranyl diphosphate. *PNAS.* 106: 10865–10870.

Literaturverzeichnis

- Schmelz E**, Kaplan F, Huffaker A, Dafoe N, & Vaughan M, Ni XZ, Rocca J T, Alborn H, Teal P. (2011). Identity, regulation, and activity of inducible diterpenoid phytoalexins in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 108: 5455-60.
- Schmidt A**, Wächtler B, Temp U, Kreckling T, Séguin A, Gershenzon J. (2010). A Bifunctional Geranyl and Geranylgeranyl Diphosphate Synthase Is Involved in Terpene Oleoresin Formation in *Picea abies*. *Plant Physiology*. 152: 639–655.
- Schmidt A; Gershenzon J.** (2008). Cloning and characterization of two different types of geranyl diphosphate synthases from Norway spruce (*Picea abies*). *Phytochemistry* 96: 49–57.
- Scinto LFM**, Daffner KR, Dressler D, Ransil BI, Rentz D, Weintraub S, Mesulam M, Potter H. (1994). A potential noninvasive neurobiological test for Alzheimer's disease. *Science*. 266: 1051 – 1054.
- Shanmugabalaji V**, Besagni C, Piller LE, Douet V, Ruf S, Bock R, Kessler F. (2013). Dual targeting of a mature plastoglobulin/fibrillin fusion protein to chloroplast plastoglobules and thylakoids in transplastomic tobacco plants. *Plant Mol Biol*. 81: 13-25.
- Shao J**, Chen QW, Lv HJ, He J, Liu ZF, Lu YN, Liu HL, Wang GD, Wang Y. (2017). (+)-Thalianatriene and (-)-retigeranin B catalyzed by sesterterpene synthases from *Arabidopsis thaliana*. *Org Lett*. 19: 1816-1819
- Shibata M**, Mikota T, Yoshimura A, Iwata N, Tsuyama M, Kobayashi Y. (2004). Chlorophyll formation and photosynthetic activity in rice mutants with alterations in hydrogenation of the chlorophyll alcohol side chain. *Plant Science*. 166: 593-600.
- Shinozaki J**, Shibuya M, Ebizuka Y, Masuda K. (2013). Cyclization of all-E- and 2Z-geranylarnesols by a bacterial triterpene synthase: insight into sesterterpene biosynthesis in *Aleuritopteris* ferns. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 77: 2278–2282.
- Shumskaya M**, Bradbury LM, Monaco RR, Wurtzel ET. (2012). Plastid localization of the key carotenoid enzyme phytoene synthase is altered by isozyme, allelic variation, and activity. *Plant Cell*. 24: 3725–3741.
- Smeekens S**, Bauerle C, Hageman J, Keegstra K, Weisbeek P. (1986). The role of the transit peptide in the routing of precursors toward different chloroplast compartments. *Cell*. 46: 365-375.
- Smit A**, Mushegian A. (2000). Biosynthesis of isoprenoids via mevalonate in archaea: the lost pathway. *Genome Res*. 10: 1468–1484.

- Sparla F**, Costa A, Lo Schiavo F, Pupillo P, Trost P. (2006). Redox regulation of a novel plastid-targeted betaamylase of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 141: 840-850.
- Steffensky M**, Mühlenweg A, Wang ZX, Li SM, Heide L. (2000). Identification of the novobiocin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces spheroides*. NCIB 11891. *Antimicrob Agents Chemother.* 44: 1214-1222.
- Stevens JF**, Page JE. (2004). Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health! *Phytochemistry.* 65: 1317-1330.
- Stipanovic RD**, Bell AA, O'Brien DH, Lukefahr MJ, Drawer PO. (1977). Helioicide H2: an insecticidal sesterterpenoid from cotton *Gossypium*. *Tetrahedron Lett.* 6: 567-570.
- Tachibana A**. (1994). A novel prenyltransferase, farnesylgeranyl diphosphate synthase, from the haloalkaliphilic archaeon, *Aatronobacterium pharaonis*. *FEBS Lett.* 341: 291-294.
- Tachibana A**, Yano Y, Otani S, Nomura N, Sako Y, Taniguchi M. (2000). Novel prenyltransferase gene encoding farnesylgeranyl diphosphate synthase from a hyperthermophilic archaeon, *Aeropyrum pernix* – molecular evolution with alteration in product specificity. *Eur J Biochem.* 267: 321-328.
- Taiz L, Zeiger E**. (2000). *Physiologie der Pflanzen*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Takaya A**, Zhanga W, Asawatreratanakul K, Wititsuwannakul D, Wititsuwannakul R, Takahashi S, Koyama T. (2003). Cloning, expression and characterization of a functional cDNA clone encoding geranylgeranyl diphosphate synthase of *Hevea brasiliensis*. *Biochim Biophys Acta.* 1625: 214-220.
- Tholl D**, Kish CM, Orlova I, Sherman D, Gershenzon J, Pichersky E, Dudareva N. (2004). Formation of monoterpenes in *Antirrhinum majus* and *Clarkia breweri* flowers involves heterodimeric geranyl diphosphate synthases. *Plant Cell.* 16: 977-992.
- Tholl D**. (2006). Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism. *Current Opinion in Plant Biology.* 9: 297-304.
- Tholl D, Lee S**. (2011). Terpene specialized metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Arabidopsis Book.* 9: e0143.
- Thoma R**, Schulz—Gasch T, D'Arcy B, Benz J, Aebi J, Dehmlow H, Hennig M, Stihle M, Ruf A. (2004). Insight into steroid scaffold formation from the structure of human oxidosqualenecyclase. *Nature.* 432:118-122.
- Thulasiram HV**, Erickson HK, Poulter CD. (2007). Chimeras of two isoprenoid synthases catalyze all four coupling reactions in isoprenoid biosynthesis. *Science.* 316: 73-76.

Literaturverzeichnis

- Trapp SC**, Croteau RB. (2001). Genomic organization of plant terpene synthases and molecular evolutionary implications. *Genetics*. 158: 811–832.
- Turner GW**, Gershenzon J, Croteau RB. (2000). Development of Peltate Glandular Trichomes of Peppermint. *Plant Physiology*. 124: 665–680.
- Unal ES**, Zhao R, Qiu A, Goldman, ID. (2008). N-linked glycosylation and its impact on the electrophoretic mobility and function of the human Proton-Coupled Folate Transporter (*HsPCFT*). *Biochimica et Biophysica Acta*, 1778: 1407–1414.
- Unsicker SB**, Kunert G, Gershenzon J. (2009). Protective perfumes: the role of vegetative volatiles in plant defense against herbivores. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12: 478-485.
- Van der Velden AW**, Thomas AA. (1999). The role of the 5' untranslated region of an mRNA in translation regulation during development. *Int J Biochem Cell Biol.* 31: 87-106.
- van Schie CC**, Ament K, Schmidt A, Lange T, Haring MA, Schuurink RC. (2007). Geranyl diphosphate synthase is required for biosynthesis of gibberellins. *Plant J.* 52: 752-62.
- Vandermoten S**, Charlotiaux B, Santini S, Sen SE, Béliveau C, Vandebol M, Francis F, Brasseur R, Cusson M, Haubruge E. (2008). Characterization of a novel aphid prenyltransferase displaying dual geranyl/farnesyl diphosphate synthase activity. *FEBS Lett.* 582: 1928–1934.
- Vandermoten S**, Haubruge E, Cusson M. (2009). New insights into short-chain prenyltransferases: structural features, evolutionary history and potential for selective inhibition. *Cell Mol Life Sci*, 66: 3685-95.
- Velož R**, Quijano L, Calderon JS, Rios T. (1975). Albocerol, a new macrocyclic sesterterpene. *J Chem Soc Chem Commun.* 6: 191–192.
- Vidi PA**, Kessler F, Brehelin C. (2007). Plastoglobules: a new address for targeting recombinant proteins in the chloroplast. *BMC Biotechnol.* 7: 4.
- von Heijne G**, Steppuhn J, Herrmann RG. (1989). Domain structure of mitochondrial and chloroplast targeting peptides. *Eur J Biochem.* 180: 535-545.
- Vranová E**, Coman D, Gruissem W. (2013). Network analysis of the MVA and MEP pathways for isoprenoid synthesis. *Annu Rev Plant Biol.* 64: 665–700.
- Vranová E**, Hirsch-Hoffmann M, Gruissem W. (2011). AtIPD: a curated database of *Arabidopsis* isoprenoid pathway models and genes for isoprenoid network analysis. *Plant Physiol.* 156: 1655-1660.
- Wagner KH**, Elmadfa I. (2003). Biological relevance of terpenoids: Overview focusing on mono-, di and tetraterpenes. *Ann Nutr Metab.* 47: 95-106.

- Wang K, Ohnuma SI.** (1999). Chain-length determination mechanism of isoprenyl diphosphate synthases and implications for molecular evolution. *Trends Biochem Sci.* 24: 445–451.
- Wang KC, Ohnuma S.** (2000). Isoprenyl diphosphate synthases. *Biochim Biophys Acta.* 1529: 33–48.
- Wang Q, Jia M, Huh JH, Muchlinski A, Peters RJ, Toll D.** (2016). Identification of a dolabellane type diterpene synthase and other root-expressed diterpene synthases in *Arabidopsis*. *Front Plant Sci.* 7:1761.
- Wang QX, Yang JL, Qi QY, Bao L, Yang XL, Liu MM, Huang P, Zhang LX, Chen JL, Cai L, Liu HW.** (2013). 3-Anhydro-6-hydroxy-ophiobolin A, a new sesterterpene inhibiting the growth of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and inducing the cell death by apoptosis on K562, from the phytopathogenic fungus *Bipolaris oryzae*. *Bioorg Med Chem Lett.* 23: 3547–3550.
- Wang Y, Dreyfuss M, Ponelle M, Oberer L, Riezman H.** (1998). A glycosylphosphatidylinositol-anchoring inhibitor with an unusual tetracyclic sesterterpene skeleton from the fungus *Codinaea simplex*. *Tetrahedron.* 54: 6415–6426.
- Wang, GD, Dixon RA.** (2009). Heterodimeric geranyl(geranyl)diphosphate synthase from hop (*Humulus lupulus*) and the evolution of monoterpene biosynthesis. *PNAS.* 106: 9914–9919.
- Weathers PJ, Arsenault PR, Covello PS, McMickle A, Teoh KH, Reed DW.** (2011). Artemisinin production in *Artemisia annua*: studies in planta and results of a novel delivery method for treating malaria and other neglected diseases. *Phytochem Rev.* 10: 173-183.
- Werner S, Engler C, Weber E, Gruetzner R, Marillonnet S.** (2012). Fast track assembly of multigene constructs using Golden Gate cloning and the MoClo system. *Bioeng Bugs.* 3: 38–43.
- Whittington DA, Wise ML, Urbansky M, Coates RM, Croteau RB, Christianson DW.** (2002). Bornyldiphosphate synthase: structure and strategy for carbocation manipulation by a terpenoid cyclase. *PNAS.* 99: 15375–15380.
- Wilding EI, Brown JR, Bryant AP, Chalker AF, Holmes DJ, Ingraham KA, Iordanescu S, So CY, Rosenberg M, Gwynn MN.** (2000). Identification, evolution, and essentiality of the mevalonate pathway for isopentenyl diphosphate biosynthesis in gram-positive cocci. *J. Bacteriol.* 182: 4319–27.
- Wink M.** (1999a). *Biochemistry of Plant Secondary Metabolism. Annual Plant Reviews, 2* (Wink M., ed.). Sheffield Academic Press, Sheffi Id.

Literaturverzeichnis

- Wu S**, Jiang Z, Kempinski C, Nybo SE, Husodo S, Williams R, Chappell J. (2012). Engineering triterpene metabolism in tobacco. *Planta*. 236: 867-877.
- Wu S**, Schalk M, Clark A, Miles RB, Coates R, Chappell J. (2006). Redirection of cytosolic or plastidic isoprenoid precursors elevates terpene production in plants. *Nat Biotechnol*. 24: 1441–1447.
- Yamaguchi S**, Sun Tp, Kawaide H, Kamiya Y. (1998). The GA2 locus of *Arabidopsis thaliana* encodes ent-kaurene synthase of gibberellin biosynthesis. *Plant Physiol*. 116: 1271-1278.
- Ytterberg AJ**, Peltier JB, van Wijk KJ. (2006). Protein profiling of plastoglobules in chloroplasts and chromoplasts. A surprising site for differential accumulation of metabolic enzymes. *Plant Physiol*. 140: 984–997.
- Zbierzak AM**, Kanwischer M, Wille C, Vidi PA, Giavalisco P, Lohmann A, Briesen I, Porfirova S, Bréhélin C, Kessler F, Dörmann P. (2010). Intersection of the tocopherol and plastoquinol metabolic pathways at the plastoglobule. *Biochem. J*. 425: 389–399.
- Zhu XF**, Suzuki K, Okada K, Tanaka K, Nakagawa T, Kawamukai M, Matsuda H. (1997a). Cloning and functional expression of a novel geranylgeranyl diphosphate synthase gene from *Arabidopsis thaliana* in *Escherichia coli*. *Plant Cell Physiol*. 38: 357–361.
- Zhu XF**, Suzuki K, Saito T, Okada K, Tanaka K, Nakagawa T, Matsuda H, Kawamukai M. (1997b). Geranylgeranyl diphosphate synthase encoded by the newly isolated gene GGPS6 from *Arabidopsis thaliana* is localized in mitochondria. *Plant Mol Biol*. 35: 331–341.
- Zverina EA**, Lamphear CL, Wright EN, Fierke CA. (2012). Recent advances in protein prenyltransferases: substrate identification, regulation, and disease interventions. *Curr Opin in Chem Biol*. 16: 544-552.

7 Danksagung

Ich möchte mich hiermit bei Herrn Prof. Dr. Alain Tissier, Leiter der Abteilung Stoffwechsel- und Zellbiologie am Institut für Pflanzenbiochemie, bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit unter seiner Leitung durchzuführen.

Weiterhin möchte mich auch bei Prof. Dr. Jonathan Gershenzon und Prof. Dr. Jörg Degenhardt für die Begutachtung dieser Arbeit bedanken.

Außerdem gilt mein besonderer Dank Herrn Dr. Thomas Vogt. Jederzeit brachte er mir bei der Planung, Durchführung und Auswertung der kinetischen Messungen außerordentlich sachkundige, erfahrene und wertvolle Unterstützung entgegen. Dankbar anerkennen will ich hier auch seine immer freundliche und geduldige Art mir gegenüber.

Für die professionelle Einführung in die Konfokalmikroskopie danke ich Prof. Dr. Bettina Hause ganz herzlich. Für ihre konstruktiven Ideen, die zu zahlreichen hier in der Arbeit dargestellten Ergebnissen führten, gebührt ihr ganz besonderer Dank. Vor allem aber ihr moralischer Beistand und der menschliche Halt den sie mir stets entgegengebracht hat, haben mir Kraft und Mut zur Anfertigung und Vollendung meiner Dissertation gegeben.

Ein besonderer Dank gilt auch Dr. Gerd Balke und Dr. Nick Bergau die die Vermessung der LC/MS Proben durchgeführt haben und tatkräftig bei der Auswertung der Daten geholfen haben.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Mitdoktoranden sowie an alle Mitarbeiter und Mitarbeiterinnen des Instituts für die gute Zusammenarbeit. Hier möchte ich mich besonders bei Romy Töpfer, Dr. Kathleen Rothe und Dr. Swanhild Lohse bedanken.

Hagen Stellmach danke ich ganz herzlich für die hilfreichen Tips bei der Einführung in die Konfokalmikroskopie. Auch bei anderen Fragen rund um die Laborarbeit stand er mir immer mit Rat und Tat zur Seite.

Dr. Steve Ludwig danke ich recht herzlich für die Bereitstellung diverser Isoprenyldiphosphate.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei der guten Seele des Labors A120- Anja Henning. In Ihr habe ich nicht nur vom ersten Tag an eine große Unterstützung im Laboralltag gefunden, sondern auch eine sehr gute Freundin.

Meinen Eltern, meinem Bruder und meiner Oma danke ich herzlich für ihre fortwährende Unterstützung und ihr Interesse an meiner Arbeit.

Meinem Mann Nick danke ich von ganzem Herzen für seine unermüdliche Unterstützung, seine Liebe und Motivation. Ich danke auch meinen Töchtern, dass ich durch sie erfahren durfte, dass man Arbeit und Familie erfolgreich verbinden kann und ich hoffe ganz doll, ich bin euch " Schlumpfis" damit ein Vorbild.

Eidesstattliche Erklärung

8 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Weiterhin versichere ich, dass die vorliegende Arbeit noch nicht als Abschlussarbeit an anderer Stelle eingereicht wurde.

Datum, Unterschrift

9 Anhang

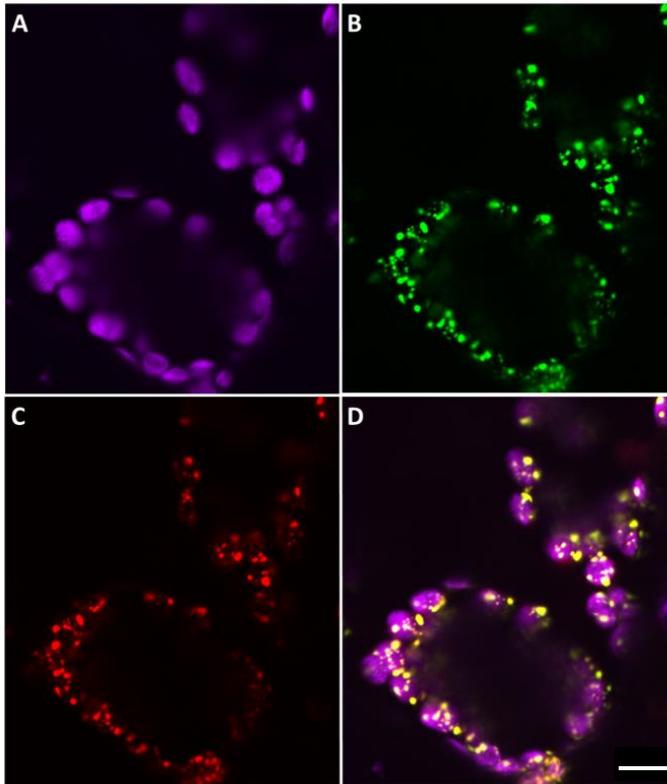


Abbildung 1: Subzelluläre Kolokalisation der Fusionsproteine AtTPS28-eGFP und AtPSY-mCherry. Konfokalmikroskopische Aufnahmen von *N. benthamiana* Plastiden, die die *AtPSY-mCherry* *AtTPS28-eGFP* Fusionskonstrukte transient exprimieren. (A) Plastiden –Auto-fluoreszenz in violett, (B) AtTPS28-eGFP Fusionsprotein in grün, (C) AtPSY-mCherry Fusionsprotein als Plastoglobuli-marker in rot sowie (D) Überlagerung der beiden Fusionsproteine (gelb) und der Chlorophyll Autofluoreszenz (violett). Maßstab:10 µm.

Anhang

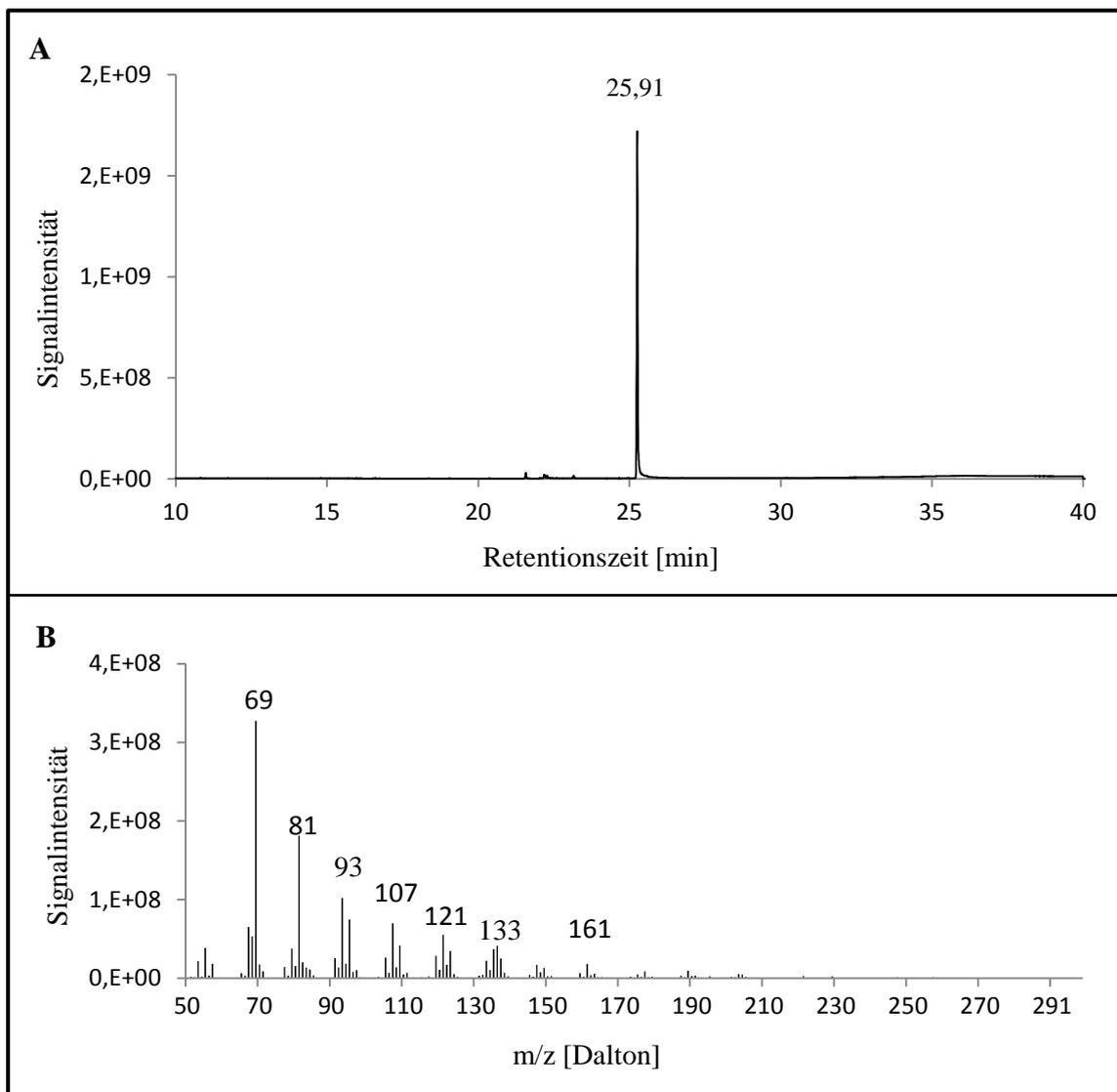


Abbildung 2: GC/MS Analyse von Geranylgeraniol (GGOH) Standard. (A) Totales Ionenchromatogramm von GGOH (B) Elektronenstoßionisations-Massenspektrum von GGOH, welches die für Isoprenyldiphosphate charakteristischen Peaks bei 69, 81 und 161 aufweist.

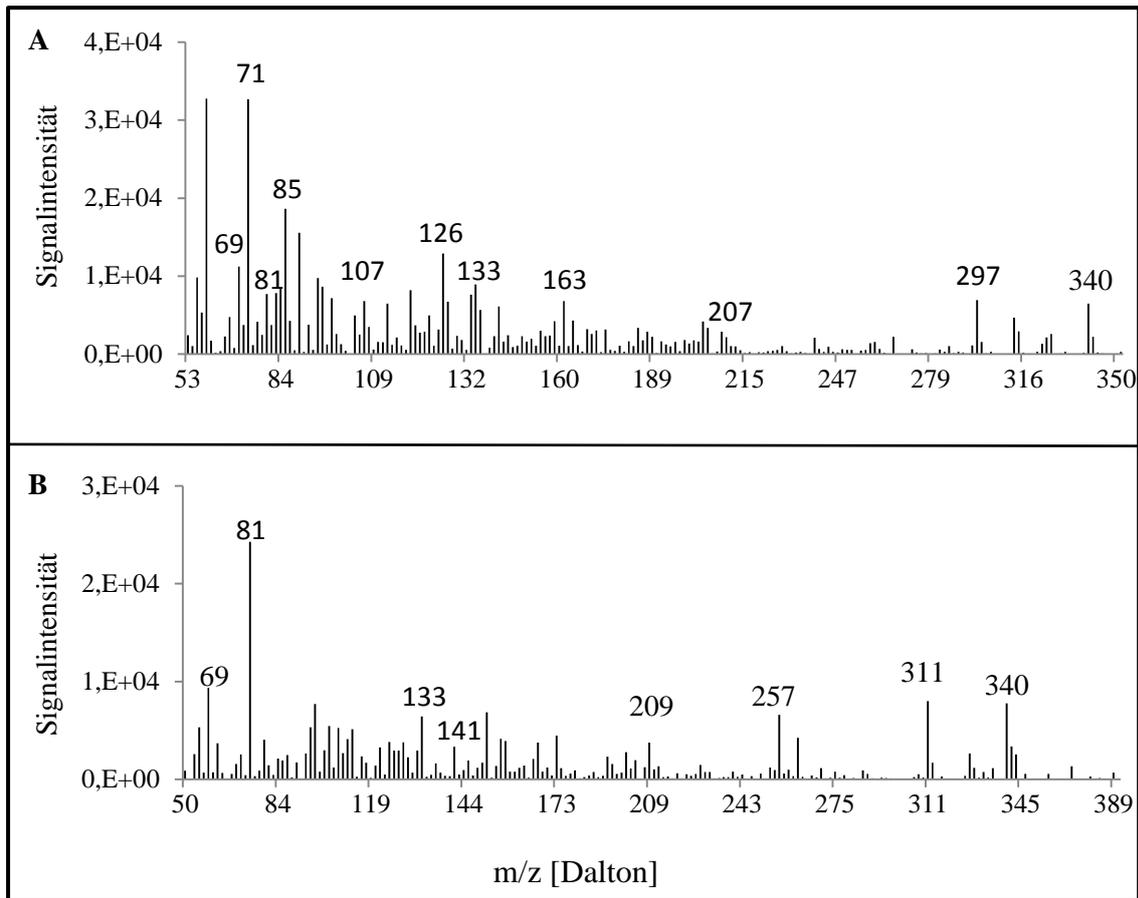


Abbildung 3: GC/MS Messungen transienter Assays bei denen die *AtIDS9* mit der *AtTPS28* in *N. benthamiana* exprimiert wurden. Elektronenstoßionisations - Massenspektrum des putativen Produktpeaks bei (A) 28,34 min und (B) 29,35 min, mit den charakteristischen Peaks bei 69 und 81 und einem gesamt m/z Verhältnis von 340.

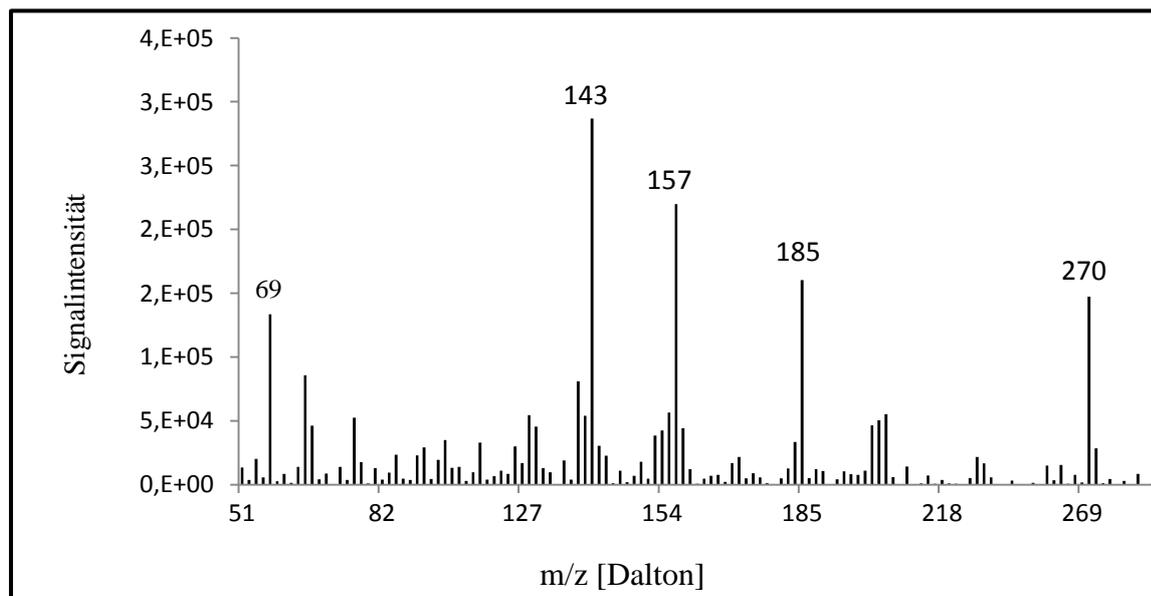


Abbildung 4: Detektion putativer Produkte der *AtTPS28* in stabil transformierten *AtIDS9* und *AtTPS28* überexprimierenden *N. tabacum* Pflanzen. GC/MS Messungen von Blattextrakten zur Detektion von Sesterterpenen. Elektronenstoßionisations -Massenspektrum des putativen Produktpeaks bei 21,77 min.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Geburtsdatum	08.08.1986
Geburtsort	Deutschland, Lutherstadt Wittenberg
Nationalität	deutsch
Familienstand	feste Partnerschaft, zwei Kinder

Studium

07/2015 – 01/2018	Verfassen meiner Dissertationsarbeit in den zwei Elternzeiten
01/2012 -06/2015	Doktorand am Leibnitz Institut für Pflanzenbiochemie in Halle (Saale) in der AG Glanduläre Trichome und Isoprenoid-biosynthese Thema der Dissertation: Funktionelle Charakterisierung einer Isoprenyldiphosphat-Synthase aus <i>Arabidopsis thaliana</i> .
10/2009 - 11/2011	Master of Science (Fach: Biochemie) an der Universität Potsdam Thema der Masterarbeit: Einfluss eines Wurzel-assoziierten wachstumsfördernden <i>Pseudomonas</i> -Stammes auf Transkription und Metabolismus von <i>Arabidopsis thaliana</i> .
10/2006 - 10/2009	Bachelor of Science (Fach: Biochemie) an der Universität Potsdam Thema der Bachelorarbeit: Heterologe Expression von stärkesynthetisierenden Enzymen aus <i>Arabidopsis thaliana</i> in <i>E. coli</i> und deren Enzymaktivität nach nativer Gelelektrophorese.

Schulbildung

1999-2006	Melanchthon-Gymnasium Wittenberg
-----------	----------------------------------

Publikationen

Nagel R, **Bernholz C**, Vranová E, Košuth J, Bergau N, Ludwig S, Wessjohann L, Gershenzon J, Tissier A, Schmidt A. (2015). *Arabidopsis thaliana* isoprenyl diphosphate synthases produce the C25 intermediate geranylarnesyl diphosphate. *Plant J.* 84:847-859.

Schwachtje J, Karojet S, Thormählen I, **Bernholz C**, Kunz S, Brouwer S, Schwochow M, Köhl K, van Dongen JT. (2011). A naturally associated rhizobacterium of *Arabidopsis thaliana* induces a starvation-like transcriptional response while promoting growth. *PLoS One.* 6: e29382