

Die Biosynthese von acetylierten Monoterpenen in Thymian (*Thymus vulgaris*)

Dissertation

zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg

Vorgelegt

von Frau Natalie Wiese (geb. Arndt)

geb. am 09.09.1987 in Gera

1. Gutachter: Prof. Dr. Jörg Degenhardt

2. Gutachter: Prof. Dr. Alain Tissier

3. Gutachterin: Prof. Dr. Maike Petersen

Datum der öffentlichen Verteidigung: 23.06.2020

Zusammenfassung

Das ätherische Öl vom Echten Thymian (*Thymus vulgaris*) ist bekannt für seine hohe Vielfalt an unterschiedlichen Terpenen, insbesondere Monoterpenen, die ihm seine antibakterielle und spasmolytische Wirkung verleihen. Aus diesem Grund gilt er schon lange als traditionelle Heilpflanze und wichtiger Bestandteil der aktuellen Phytomedizin. Im mediterranen Mittelmeerraum wurden sechs verschiedenen Chemotypen von *T. vulgaris* charakterisiert. Sie differenzieren sich hinsichtlich des dominierenden Monoterpens und werden auch nach diesem benannt: Geraniol (G) -, α -Terpineol (A) -, *trans*-Sabinenhydrat (U) -, Linalool (L) -, Carvacrol (C) - und Thymol (T) - Chemotyp. Parallel zu den Hauptmonoterpenen sind in einigen Chemotypen die Monoterpenacetate Geranylacetat (G-Typ), α -Terpinylacetat (A-Typ) und Linalylacetat (L-Typ) in vergleichbaren Größenordnungen detektierbar. Während die Aufklärung der Monoterpen-Biosynthesewege schon lange Gegenstand der aktuellen Forschung ist, sind die Modifizierungen der Terpene in Thymian, im Speziellen die Acetylierung, kaum untersucht.

Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung und Charakterisierung der Enzyme, welche den Schritt zu den Monoterpenacetaten katalysieren. Mit Hilfe von Transkriptom-Sequenzierungen und der Verwendung von Referenzgenen konnten sieben potentielle Gene identifiziert und diese der Familie der BAHD-Acyltransferasen zugeordnet werden (*tvaat1-7*). Vier der sieben Enzyme sind nach heterologer Expression in *E. coli* aktiv und imstande die Acetylierung von Geraniol umzusetzen. Allein TvAAT3 akzeptiert zusätzlich Thymol, Carvacrol und Borneol als weitere Substrate und ist in der Lage nach transienter Expression in Tabak (*Nicotiana benthamiana*) Linalylacetat zu bilden. Die Wahl des Expressionsorganismus ist für die AATs aus Thymian demnach von großer Bedeutung, möglicherweise aufgrund der unterschiedlichen posttranslationalen Modifizierungsmöglichkeiten und Faltmechanismen in Pro- und Eukaryoten. Weiterführende Transkriptanalysen ergaben, dass die aktiven Gene in allen Chemotypen exprimiert werden, obwohl Geranylacetat nur im G-Typ nachweisbar ist. Zusätzlich wurden organspezifische und von der Jahreszeit abhängige Expressionswerte detektiert. Diese abweichenden Muster deuten darauf hin, dass das Funktionsspektrum der Enzyme durchaus vielfältiger sein kann als angenommen und sie möglicherweise noch weitere Substrate umsetzen können oder Produkte bilden, die mit den verwendeten Detektionssystemen nicht nachweisbar waren.

Mit dieser Arbeit konnte der Grundstein für das Verständnis der Monoterpenacetat-Biosynthese in Thymian gelegt werden. Dennoch sind weiterführende Experimente nötig um

einerseits das Wissen über die möglichen Funktionen der TvAATs zu erweitern und zum anderen die noch fehlende Komponente für die Bildung von α -Terpinylacetat zu identifizieren.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden qualitative und quantitative Untersuchungen in Nektar und Pollen bezüglich der Hauptmonoterpene und ihrer Acetate durchgeführt. Anschließend wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe „Molekulare Ökologie“ der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg ihre antibiotische Wirkung auf die Pathogene analysiert, die mit dem Auftreten der Europäischen Faulbrut, einer verbreiteten Bienenkrankheit, assoziiert sind. Die Konzentrationswerte sind terpenabhängig und liegen für den Pollen mit bis zu 742,06 ppm deutlich höher als die vom Nektar (0,24 - 7,67 ppm). Für Thymol und Carvacrol konnte die höchste Aktivität gegenüber dem Bakterienwachstum festgestellt werden. Die drei acetylierten Verbindungen hingegen zeigen nahezu keine wachstumshemmende Wirkung. Dies deutet auf einen Zusammenhang zwischen chemischer Struktur des Terpens und seiner Wirkung hin. Möglicherweise besitzen dadurch Nektar und besonders Pollen von *T. vulgaris* mit seinen Monoterpenanteilen das Potential, die Aktivität von Bienen-assoziierten Pathogenen einzudämmen und somit einen Beitrag zur Bienengesundheit zu leisten.

Summary

The essential oil of the common thyme (*Thymus vulgaris*) is a traditional medicinal plant and an important component of current phytomedicine due to its antibacterial and spasmolytical monoterpene alcohols. In the Mediterranean region, a distinction can be made between six different chemotypes of *T. vulgaris* that each differ in their essential oil. Each of the chemotypes produce a dominant monoterpene alcohol and is named according to this compound: geraniol (G) -type, α -terpineol (A) -type, *trans*-sabinen hydrate (U) -type, linalool (L) -type, carvacrol (C) -type und thymol (T) -typ. Some chemotypes also contain comparable amounts of the corresponding acetat: geranyl acetate (in G-type), α -terpinyl acetate (in A-type) and linalyl acetate (in L-type). Whereas the clarification of the biosynthetic pathway of monoterpenes in thyme has been an important research subject for a long time, little is known about the modified terpenes, especially the acetylated ones.

The aim of this work was the identification and characterization of the enzymes which catalyze the step to the monoterpene acetates. By means of transcriptome profiling it was possible to identify seven putative BAHD acyl transferases (*tvaat1-7*). After heterologous expression in *E. coli*, four of the seven enzymes were able to catalyze the acetylation of geraniol. Only TvAAT3 accepted thymol, carvacrol and borneol as additional substrates. After transient expression in tobacco, the enzyme also produces linalyl acetate. The choice of expression system seems crucial for enzyme activity, maybe due to different post-translational modifications and folding mechanisms in prokaryotes and eukaryotes. Transcript analyses showed that the active genes are expressed in all chemotypes, even though geranyl acetate is only detectable in the G-type. Organ-specific expression in leaves and flowers in different seasons indicates that the enzymes fulfil various functions. The enzymes might accept additional substrates or can form products which were not detected in this study.

This work lays the foundation to understanding the biosynthetic pathway of monoterpene acetates in thyme. Further experiments are required for a comprehensive insight into functions of the TvAATs and to identify the missing enzyme for the production of α -terpinylacetate.

In the second part of this work, nectar and pollen samples from thyme were qualitatively and quantitatively analyzed for their concentration of dominant monoterpenes and their acetates. The compounds were used to determine their antibiotic activity against European foulbrood (EFB) associated pathogens. EFB is a widespread disease of the honey bee (*Apis mellifera*). The terpene concentrations in pollen with up to 742,06 ppm were significant higher than in nectar (0,24 – 7,67 ppm). Thymol and carvacrol showed the highest activity against bacterial

growth whereas the three acetylated compounds caused nearly no effect in growth inhibition. This indicates a possible connection between chemical structure and effect. Therefore, the nectar and particularly the pollen of thyme might reduce the activity of bee-associated pathogens due to their monoterpene content.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	I
Summary	III
Abkürzungsverzeichnis	IX
Abbildungsverzeichnis	XII
Tabellenverzeichnis.....	XIV
1 Einführung.....	1
1.1 <i>Thymus vulgaris</i> – mehr als nur ein Küchenkraut	1
1.2 Die sechs Chemotypen von <i>T. vulgaris</i>	2
1.3 Terpene und ihre Biosynthese in pflanzlichen Organsimen	3
1.4 Pflanzliche Acyltransferasen	6
1.4.1 BAHD-Acyltransferasen	7
1.4.2 Weitere pflanzliche Acyltransferasen	9
1.5 Blütenbau sowie Nektar und Pollen von <i>T. vulgaris</i>	9
1.6 Europäische Faulbrut (EFB) – eine gefürchtete Krankheit der Honigbiene	11
1.7 Ziel der Arbeit	13
2 Material und Methoden	15
2.1 Pflanzenmaterial	15
2.1.1 Herkunft und Kultivierung von <i>T. vulgaris</i>	15
2.1.2 Ernte von Blättern, Nektar und Pollen von <i>T. vulgaris</i>	15
2.1.3 Kultivierung von <i>Nicotiana benthamiana</i>	16
2.2 Mikrobiologische Methoden.....	16
2.2.1 Bakterienstämme und ihre Kultivierung	16
2.2.2 Antibiotika.....	17
2.2.3 Medien.....	17
2.2.4 Transformation in <i>E. coli</i>	17
2.2.5 Transformation in <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	18
2.3 Molekularbiologische Methoden.....	18
2.3.1 Isolation von Gesamt-RNA aus <i>T. vulgaris</i>	18
2.3.2 Isolation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	18
2.3.3 DNA-Verdau	19
2.3.4 cDNA-Synthese.....	19

2.3.5	Oligonukleotide	19
2.3.6	Amplifikation von DNA mittels PCR	21
2.3.7	Quantitative real-time PCR (QRT-PCR).....	21
2.3.8	Agarose-Gelelektrophorese	22
2.3.9	Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen oder PCR-Reaktionen	23
2.3.10	Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA.....	23
2.3.11	Restriktion von DNA	23
2.3.12	Ligation von PCR-Produkten	24
2.3.13	Sequenzierung und Sequenzanalyse.....	25
2.3.14	Phylogenetische Analyse.....	25
2.3.15	Transkriptom-Sequenzierung von <i>T. vulgaris</i>	26
2.4	Proteinbiochemische Methoden	26
2.4.1	Heterologe Expression von Alkohol-Acetyltransferasen in <i>E. coli</i>	26
2.4.2	Herstellung eines Proteinrohextraktes.....	26
2.4.3	His-Tag Aufreinigung zur Herstellung hochreiner Proteine	27
2.4.4	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	28
2.4.5	Transiente Expression von Alkohol-Acetyltransferasen in <i>Nicotiana benthamiana</i>	28
2.4.6	SDS-PAGE.....	29
2.5	Chromatographische Methoden.....	30
2.5.1	Aktivitätsbestimmung von rekombinanten Proteinen	30
2.5.2	Terpenextraktion von Thymianblätter.....	31
2.5.3	Terpenextraktion von Thymiannektar und -pollen.....	32
2.5.4	Terpenextraktion von infiltrierten Tabakblättern	32
2.5.5	Gaschromatographische Trennung mittels GC/MS und GC/FID	32
2.5.6	Sensitivität der GC/FID Methode	33
3	Ergebnisse	35
3.1	Acetylierte Monoterpene in <i>T. vulgaris</i>	35
3.1.1	Das ätherische Öl von <i>T. vulgaris</i> enthält abhängig vom Chemotyp verschiedene acetylierte Monoterpene	35
3.1.2	Die Hauptmonoterpene und ihre jeweiligen Acetate sind in unterschiedlichen Verhältnissen im ätherischen Öl vertreten	38
3.2	Identifizierung von Alkohol-Acetyltransferasen aus <i>T. vulgaris</i>	39
3.2.1	Es wurden sieben BAHD-ähnliche Sequenzen identifiziert.....	39

3.2.2	Alle identifizierten TvAATs können der Familie der BAHD-Acyltransferasen zugeordnet werden	40
3.3	Transkriptanalyse der Alkohol-Acetyltransferase-Gene aus <i>T. vulgaris</i>	45
3.3.1	Die Alkohol-Acetyltrasferasen sind in den Blättern der sechs Chemotypen exprimiert	45
3.3.2	Die Alkohol-Acyltransferasen sind in den Blättern und Blüten unterschiedlich stark exprimiert	46
3.3.3	Es gibt jahreszeitliche Unterschiede in der Expression der TvAATs in einigen Chemotypen	48
3.4	Biochemische Charakterisierung der Alkohol-Acetyltransferasen	49
3.4.1	TvAAT1, TvAAT3, TvAAT4 und TvAAT5 sind aktive Alkohol-Acetyltransferasen.....	50
3.4.2	TvAAT3 kann neben Geraniol noch weitere Substrate umsetzen	51
3.4.3	Transiente Expression der TvAATs in <i>N. benthamiana</i>	53
3.4.4	Bestimmung der optimalen Assaybedingungen für TvAAT1.....	55
3.4.5	Bestimmung des K_m -Wertes und der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit (V_{max}) für TvAAT3	57
3.5	Analyse von Nektar- und Pollenvolatilen aus <i>T. vulgaris</i>	59
3.5.1	Makro- und mikroskopische Betrachtung der floralen Nektarien in <i>T. vulgaris</i>	59
3.5.2	Nektar und Pollen der Chemotypen von <i>T. vulgaris</i> enthalten die entsprechenden Hauptmonoterpene und Acetate	60
3.5.3	Die quantitative Analyse der Monoterpene ergab große Unterschiede zwischen Pollen und Nektar.....	64
4	Diskussion	67
4.1	Acetylierte Monoterpene bestimmen neben den Hauptmonoterpenen das ätherische Öl von <i>T. vulgaris</i>	67
4.2	Identifizierung und Eingruppierung der Alkohol-Acyltransferasen in die BAHD-Enzymfamilie	68
4.3	Monoterpenacetat-Biosynthese in <i>T. vulgaris</i>	70
4.3.1	Die Acetyltransferasen aus <i>T. vulgaris</i> sind stark substratspezifisch.....	70
4.3.2	Das Produktspektrum von TvAAT3 ist abhängig vom Expressionssystem	71
4.3.3	Es konnte keine α -Terpineol-Acetyltransferase identifiziert werden.....	73
4.4	TvAATs besitzen möglicherweise noch weitere Funktionen.....	74
4.5	Monoterpene und ihre Acetate in Pollen und Nektar	76
4.5.1	Monoterpene sind in Nektar und Pollen nachweisbar.....	76

4.5.2	Die ermittelten Konzentrationen der Monoterpene in Nektar und Pollen sind wirksam gegen Bienenpathogene.....	77
5	Literaturverzeichnis.....	81
6	Anhang	89

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AAT	Alkohol-Acyltransferase
<i>A. dest.</i>	Aqua destillata – destilliertes Wasser
AFB	Amerikanische Faulbrut
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
A-Typ	α -Terpineol-Chemotype
BLAST	„Basic Local Alignment Search Tool“
BSA	„bovine serum albumin“, dt. Rinderserumalbumin
cDNA	„complementary DNA“, dt.: komplementäre DNA
C-Typ	Carvacrol Chemotyp
CoA	Coenzym-A
dATP	Desoxy-Adenosintriphosphat
DNA	„deoxyribonucleic acid“, dt.: Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleotidtriphosphat
DMAPP	Dimethylallyldiphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DS	Drüsenschuppe
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EFB	Europäische Faulbrut
FID	Flammenionisationsdetektor
FPP	Farnesyldiphosphat
GAP	Glycerinaldehyd-3-Phosphat
GC	Gaschromatographie
Gent	Gentamicin
GGPP	Geranylgeranyldiphosphat
GPP	Geranyldiphosphat
G-Typ	Geraniol-Chemotyp
His-Tag	Polyhistidin-Tag
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration

Abkürzungsverzeichnis

IPP	Isopentenylidiphosphat
IS	interner Standard
Kan	Kanamycin
K _m	Michaeliskonstante
LB	Lysogeny Broth (Nährmedium)
LD ₅₀	mittlere letale Dosis
L-Typ	Linalool-Chemotyp
LOD	„limit of detektion“, dt.: Detektionsminimum
LOQ	„limit of quantification“, dt.: Quantifizierungsminimum
MEP	2C-Methyl-D-Erythrithol-4-Phosphat
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MS	Massenspektrometrie
MVA	Mevalonsäure
OD	Optische Dichte
ORF	„open reading frame“, dt.: offener Leserahmen
PAGE	„polyacrylamide gel electrophoresis“, dt.: Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	„polymerase chain reaction“, dt.: Polymerasekettenreaktion
PDMS	Polydimethylsiloxan
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
qRT-PCR	quantitative Real-Time-PCR
Rif	Rifampicin
RNA	„ribonucleic acid“, dt. Ribonukleinsäure
RNASeq	RNA-Sequenzierung
RT	Raumtemperatur
SDS	„sodium dodecyl sulfate“, dt.: Natriumdodecylsulfat
SOC	„Super Optimal broth with Catabolite repression“ (Nährmedium)
SPME	„solid phase micro extraction“
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TIC	„total ion chromatogram“
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
T-Typ	Thymol-Chemotyp
Tv	<i>Thymus vulgaris</i>
X	

U-Typ	<i>trans</i> -Sabinenhydrat-Chemotyp
V _{max}	Maximale Umsatzgeschwindigkeit
VOC	„volatile organic compounds“

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Glanduläre Trichome von <i>T. vulgaris</i> -Blättern.	2
Abb. 1.2: Epistatische Reihe der sechs Chemotypen von <i>T. vulgaris</i> aus Südfrankreich.	3
Abb. 1.3: Überblick zur Terpenbiosynthese in der pflanzlichen Zelle.....	6
Abb. 1.4: Blütenbau von <i>T. vulgaris</i>	11
Abb. 3.1: Gaschromatografische Analyse der Blatt-Hexanextrakte der drei Acetate bildenden Chemotypen des <i>T. vulgaris</i> (G-, A- und L-Typ).	36
Abb. 3.2: Gaschromatografische Analyse der Blatt-Hexanextrakte der drei Chemotypen des <i>T. vulgaris</i> , welche keine Acetate bildenden (U-, C- und T-Typ).	37
Abb. 3.3: Dendrogramm der <i>tvaat</i> -Gene.	42
Abb. 3.4: Aminosäuresequenz aller identifizierten TvAATs aus <i>T. vulgaris</i>	44
Abb. 3.5: Transkriptanalyse der identifizierten Alkohol-Acetyltransferasegene <i>tvaat1</i> (A), <i>tvaat3</i> (B), <i>tvaat4</i> (C) und <i>tvaat5</i> (D) in den Blättern aller Chemotypen von <i>T. vulgaris</i>	46
Abb. 3.6: Transkriptanalyse der identifizierten Alkohol-Acyltransferasegene <i>tvaat1</i> (A), <i>tvaat3</i> (B), <i>tvaat4</i> (C) und <i>tvaat5</i> (D) im Vergleich zwischen Blatt (blaue Balken) und Blüte (rote Balken) der Chemotypen G, A, und L von <i>T. vulgaris</i>	47
Abb. 3.7: Transkriptanalyse der identifizierten Alkohol-Acetyltransferasegene <i>tvaat1</i> (A), <i>tvaat3</i> (B), <i>tvaat4</i> (C) und <i>tvaat5</i> (D) im Vergleich zwischen den verschiedenen Erntezeitpunkten.....	49
Abb. 3.8: Gaschromatografische Analyse der Aktivitätsassays der Enzyme TvAAT1, TvAAT2, TvAAT3, TvAAT4, TvAAT5 und TvAAT6 mit Geraniol und Acetyl CoA.	50
Abb. 3.9: Gaschromatografische Analyse der Aktivitätsassays des Enzyms TvAAT3 mit den Substraten α -Terpineol (A), Thymol (B) und Carvacrol (C) zusammen mit Acetyl CoA.....	52
Abb. 3.10: Gaschromatografische Analyse der Enzymaktivität der transient exprimierten Enzyme TvAAT1 (A), TvAAT3 (B), TvAAT4 (C) und TvAAT5 (D) mit dem Substrat Geraniol im Vergleich zum Leervektor.....	54
Abb. 3.11: Gaschromatografische Analyse der Enzymaktivität des transient exprimierten Enzyms TvAAT3 mit bzw. ohne dem Substrat Linalool im Vergleich zum Leervektor.....	55
Abb. 3.12: Optimale Assaybedingungen für TvAAT1 repräsentativ für alle aktiven TvAATs.	56
Abb. 3.13: Linearisierungsverfahren zur Berechnung der kinetischen Parameter K_m und V_{max}	58

Abb. 3.14: Makro- und Mikroskopische Aufnahmen der Blüten bzw. der floralen Nektarien von <i>T. vulgaris</i>	59
Abb. 3.15: GC/MS-Analyse des Nektars der sechs Chemotypen von <i>T. vulgaris</i>	62
Abb. 3.16: GC/MS-Analyse des Pollens der Chemotypen G, A und L von <i>T. vulgaris</i>	64
Abb. 4.1: Primäre und tertiäre Monoterpenalkohole, welche in <i>T. vulgaris</i> zu den entsprechenden Monoterpenacetaten umgesetzt werden.	74
Abb. 4.2: Antimikrobielle Aktivität der Hauptterpene des ätherischen Öls von <i>T. vulgaris</i> ..	79
Abb. 6.1: SDS-PAGE der mittels His-Tag aufgereinigten TvAATs.....	95
Abb. 6.2: Gaschromatografische Analyse der GC-Standards.	96
Abb. 6.3: Linearer Bereich der Produktentwicklung von TvAAT3.....	97

Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1: Übersicht über die Klassifikation der Terpengrundgerüste.	4
Tab. 2.1: Auflistung verwendeter Chemotypen von <i>Thymus vulgaris</i>	15
Tab. 2.2: Verwendete Bakterienstämme.	16
Tab. 2.3: Eingesetzte Antibiotika.	17
Tab. 2.4: Verwendete Oligonukleotid-Primer.	20
Tab. 2.5: Verwendete Vektorsysteme.	25
Tab. 2.6: Für die Gaschromatographie verwendeten Temperatur-Programme.	33
Tab. 3.1: Konzentration der Hauptmonoterpene in den Chemotypen G, A und L von <i>T. vulgaris</i>	38
Tab. 3.2: Auflistung aller identifizierten Sequenzen putativer Alkohol-Acetyltransferasen aus <i>T. vulgaris</i>	40
Tab. 3.3: Kinetische Parameter K_m und V_{max} für TvAAT3.....	58
Tab. 3.4: Quantitative Analyse der Hauptmonoterpene in Pollen und Nektar.	65
Tab. 6.1: Sequenzübereinstimmung (Aminosäuresequenzen) der sieben Acyltransferase aus <i>T. vulgaris</i>	94
Tab. 6.2: Validierungsparameter für die Quantifizierung von Geraniol mittels GC/FID.	97

1 Einführung

1.1 *Thymus vulgaris* – mehr als nur ein Küchenkraut

Wenn von der Pflanze „Thymian“ die Rede ist, denken die meisten Menschen an ein ausgesprochen gutes Gewürz mit charakteristischem Aroma. Jedoch ist das Einsatzgebiet dieses Krautes um einiges vielfältiger und geht weit über die Nutzung in der Küche hinaus.

Die Gattung *Thymus* ist der Familie der Lippenblütengewächse (Lamiaceae) angehörig und auf Grund der hohen Anzahl an Arten und Unterarten (ca. 250) eine der wichtigsten dieser Pflanzenfamilie (Morales, 2002). Kommerziell ist hauptsächlich der Echte Thymian (*Thymus vulgaris*) von Bedeutung, welcher im westlichen europäischen Mittelmeerraum beheimatet und als kleiner ausdauernder Halbstrauch gut an heißes und trockenes Sommerwetter angepasst ist (Morales, 2002). Neben der Nutzung von Thymian in der Lebensmittel-, Parfüm-, Aroma- und Kosmetik-Industrie ist die Pflanze traditionell eine wichtige Droge der Phytomedizin und wird nahezu weltweit eingesetzt. Das ätherische Öl bzw. der Pflanzenextrakt des Thymians hat eine antibakterielle und spasmolytische Wirkung, was auf den hohen Gehalt der darin enthaltenen Monoterpene zurückzuführen ist (Zaruelo and Crespo, 2002). Besonders die phenolischen Monoterpenverbindungen Thymol und Carvacrol spielen dabei eine vorrangige Rolle.

In den Lamiaceae wird das ätherische Öl in glandulären Trichomen gebildet und gespeichert. Bei *T. vulgaris* treten zwei Formen der glandulären Trichome auf, die Drüenschuppen und die Drüsenhaare, welche sich sowohl auf der Blattoberseite als auch auf der Blattunterseite befinden (Abb. 1.1 A-B). In den 8-12 sekretorischen Zellen der Drüenschuppe bzw. der einzelnen sekretorischen Zelle des Drüsenhaars wird das ätherische Öl gebildet und anschließend in den subkutikularen Raum, dem Speicherort, abgegeben (Yamaura *et al.*, 1992; Stahl-Biskup, 2002; Schimmel, 2014).

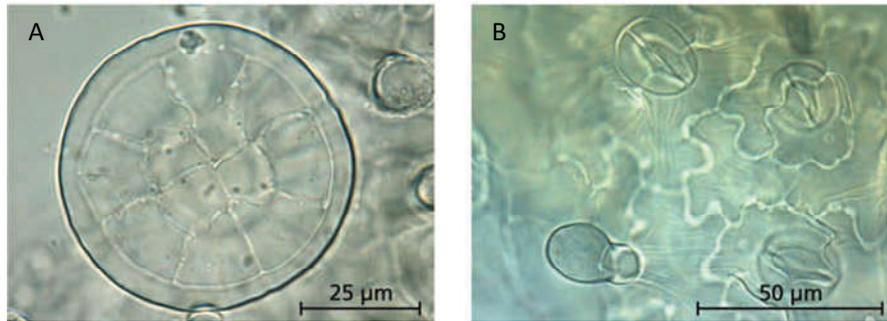


Abb. 1.1: Glanduläre Trichome von *T. vulgaris*-Blättern. Drüsenschuppe mit 12 sezernierenden Zellen (A), Drüsenhaar mit einzelligem Stiel und einzelligem Köpfchen (B). Bilder aus: Mikroskopischer Farbatlas pflanzlicher Drogen, Bettina Rahfeld, Spektrum Akademischer Verlag, 2011.

1.2 Die sechs Chemotypen von *T. vulgaris*

Die Variabilität der sekundären Metabolite, welche in den verschiedensten Pflanzenarten gebildet werden, ist enorm groß. Auch innerhalb einer Art kann die chemische Zusammensetzung der gebildeten Sekundärstoffe trotz des sehr ähnlichen genetischen Hintergrundes stark voneinander abweichen und führt zur Untergliederung einer solchen Spezies in verschiedene Chemotypen (Rohde *et al.*, 2012; Schimmel, 2014). Das Phänomen, welches auch chemischer Polymorphismus genannt wird, ist in vielen Pflanzenfamilien zu finden (Schimmel, 2014).

Der aus Südfrankreich stammende Thymian (*T. vulgaris*) ist schon lange bezüglich der Diversität seines ätherischen Öls im Fokus diverser Untersuchungen (Granger *et al.*, 1963; Granger & Passet, 1973). In der mediterranen Region konnten sechs verschiedene Chemotypen charakterisiert werden. Sie unterscheiden sich hinsichtlich des jeweils dominanten Monoterpens und werden auch nach diesem benannt: Geraniol (G) -, α -Terpineol (A) -, *trans*-Sabinenhydrat (U) -, Linalool (L) -, Carvacrol (C) - und Thymol (T) - Chemotyp (Granger & Passet, 1973).

Die verschiedenen Chemotypen sind keinesfalls gleichmäßig in ihrem Habitat verteilt. Vielmehr existiert eine Korrelation zwischen Chemotyp und verschiedensten Umweltfaktoren, was zeigt, dass der chemische Polymorphismus eine Form der Anpassung an die Umwelt darstellen kann (Gouyon *et al.*, 1986; Ganger & Passet, 1973). Vernet *et al.* (1986) gab erstmals Einblicke in die genetische Grundlage der Chemotypbildung in *T. vulgaris* und entwickelte mit Hilfe von Kreuzungsversuchen die These einer epistatischen Reihe (Abb. 1.2). Der Geranioltyp verhält sich dabei dominant gegenüber den anderen Chemotypen, während der Thymoltyp rezessiv ist. Als Grund für diese Ausprägung wird ein Locus im Genom des Thymians vermutet.

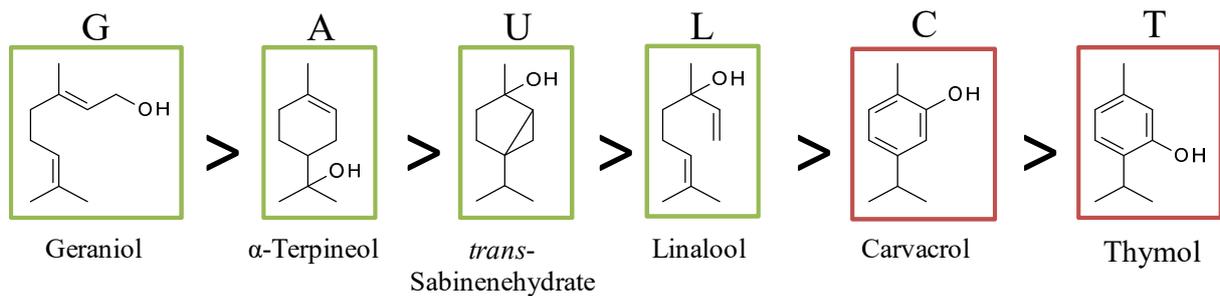


Abb. 1.2: Epistatische Reihe der sechs Chemotypen von *T. vulgaris* aus Südfrankreich. Die nicht-phenolischen Chemotypen sind grün umrandet und die phenolischen Chemotypen rot.

1.3 Terpene und ihre Biosynthese in pflanzlichen Organismen

Terpene besitzen eine enorme strukturelle Vielfalt und bilden mit mehr als 30.000 Verbindungen die größte Gruppe in der Welt der Naturstoffe, wobei mehr als die Hälfte davon von Pflanzen produziert werden (Trapp & Croteau, 2001). Ein relativ kleiner Anteil der pflanzlichen Terpene wird dem Primärstoffwechsel zugeordnet, wie z.B. die Gibberellin-Phytohormone oder die Carotinoide, während der Großteil zu den sekundären Pflanzenstoffen zählt (Trapp & Croteau, 2001). Entsprechend ihrer chemischen Diversität besitzen die Terpene ein enorm weites funktionelles Spektrum. Sie spielen eine große Rolle in der intra- und interspezifischen Interaktion von pflanzlichen Organismen, indem sie Bestäuber anlocken, Fraßfeinde abwehren, gegen Pathogene wirksam sind oder die Kommunikation zwischen Pflanzen ermöglichen (Dudareva *et al.*, 2013; Raguso, 2008; Degenhardt *et al.*, 2009; Bakkali *et al.*, 2008; Baldwin *et al.*, 2006). Im Umgang mit abiotischen Stressoren können sie ebenfalls von großer Bedeutung sein (Dudareva *et al.*, 2013). Ihre Funktion im Primärstoffwechsel ist eher von struktureller bzw. physiologischer Natur wie z.B. Phytosterole in der Zellmembran oder Carotinoide in der Photosynthese (McGarvey & Croteau, 1995).

Klassifiziert sind die Terpene nach der Anzahl der zu Grunde liegenden Isopreneinheiten (Tab. 1.1) und untergliedern sich in Hemiterpene, Monoterpene, Sesquiterpene, Diterpene, Triterpene, Tetraterpene und Polyterpene (Langenheim, 1994). Während beispielsweise Hemiterpene mit nur einer Isopreneinheit (C-5) die simpelste Form darstellen, besteht das Monoterpen aus 10 C-Atomen bzw. zwei Isopreneinheiten oder die Sesquiterpene aus 15 C-Atomen bzw. drei Isopreneinheiten. Des Weiteren wird von einigen Autoren zwischen den Begriffen Terpen und Terpenoid unterschieden, wobei ein Terpen nach Definition ein reines

Kohlenwasserstoffgerüst und ein Terpenoid zusätzlich sauerstoffhaltige funktionelle Gruppen besitzt (IUPAC, 1997; <http://goldbook.iupac.org/>).

Tab. 1.1: Übersicht über die Klassifikation der Terpengrundgerüste.

Name	Isopreneinheiten (C-5)	Beispiel
Hemiterpen	1 (C-5)	Isopren
Monoterpen	2 (C-10)	Geraniol, Thymol
Sesquiterpen	3 (C-15)	Caryophyllen
Diterpen	4 (C-20)	Zingiberen
Triterpen	6 (C-30)	Betulin
Tetraterpen	8 (C-40)	Lycopin, β -Carotin
Polyterpen	>8 (C-5) _n , n >8	Kautschuk

Grundlegend wird das Terpengerüst aus den Isopreneinheiten Isopentenylidiphosphat (IPP) und sein Isomer Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) zusammengesetzt. Die beiden C5-Verbindungen werden in der pflanzlichen Zelle auf zwei verschiedenen Synthesewegen gebildet, der Mevalonsäure (MVA)- und der 2C-Methyl-D-Erythrithol-4-Phosphat (MEP)-Weg (Abb. 1.3). Während der MVA-Weg im Cytoplasma lokalisiert ist und letztendlich zu den Sesqui- und Triterpenen führt, spielt sich der MEP-Weg in den Plastiden ab und ermöglicht die Bildung von Hemi-, Mono- und Diterpenen (Dudareva *et al.*, 2013). Trotz der Kompartimentierung der Stoffwechselwege ist ein Austausch von Intermediaten zwischen den Kompartimenten beschrieben worden (Eisenreich *et al.*, 1998; Hemmerlin *et al.*, 2003; Orlova *et al.*, 2009).

Der MVA-Weg beginnt mit der schrittweisen Kondensation von drei Molekülen Acetyl CoA zu 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA (HMG-CoA), was anschließend zu dem namensgebenden Intermediat Mevalonsäure reduziert wird. Zwei darauffolgende Phosphorylierungs- und einer Decarboxylierungsreaktion führen schließlich zu der Grundisopreneinheit IPP.

Anders als im Cytosol wird der plastidäre MEP-Weg durch die Kondensation von Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP) initiiert. Das dabei gebildete 1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat wird durch Isomerisierung und Reduktion in das Intermediat 2C-Methyl-D-Erythrithol-4-Phosphat (MEP) umgewandelt. Weitere darauf folgende Zwischenschritte lassen letztlich IPP und DMAPP entstehen (Dudareva *et al.*, 2013; McGarvey & Croteau, 1995).

Prenyldiphosphate, welche die Terpenvorstufen darstellen, werden in beiden Kompartimenten mittels Prenyltransferasen gebildet. Diese kurzkettigen Enzyme katalysieren die Kondensation der aktivierten Isopreneinheiten DMAPP und IPP, wodurch zunächst das C₁₀-Molekül Geranyldiphosphat (GPP) entsteht, was durch weitere Kondensationsschritte um jeweils eine Isopreneinheit erweitert wird und dadurch Farnesyldiphosphat (FPP, C₁₅) bzw. Geranylgeranyldiphosphat (GGPP, C₂₀) entsteht (Pichersky *et al.* 2006).

Die nachgeschalteten Terpensynthasen sind in der Lage, unter der Nutzung der wenigen Prenyldiphosphat-Grundbausteine als Substrat, Terpene in ihrer enormen Vielfalt zu bilden (Bohlmann *et al.*, 1998). Durch weitere Modifizierungen wie z.B. Oxidation, Reduktion, Isomerisierung oder Acylierung wird die Mannigfaltigkeit der Terpene nochmals erweitert (McGarvey & Croteau, 1995).

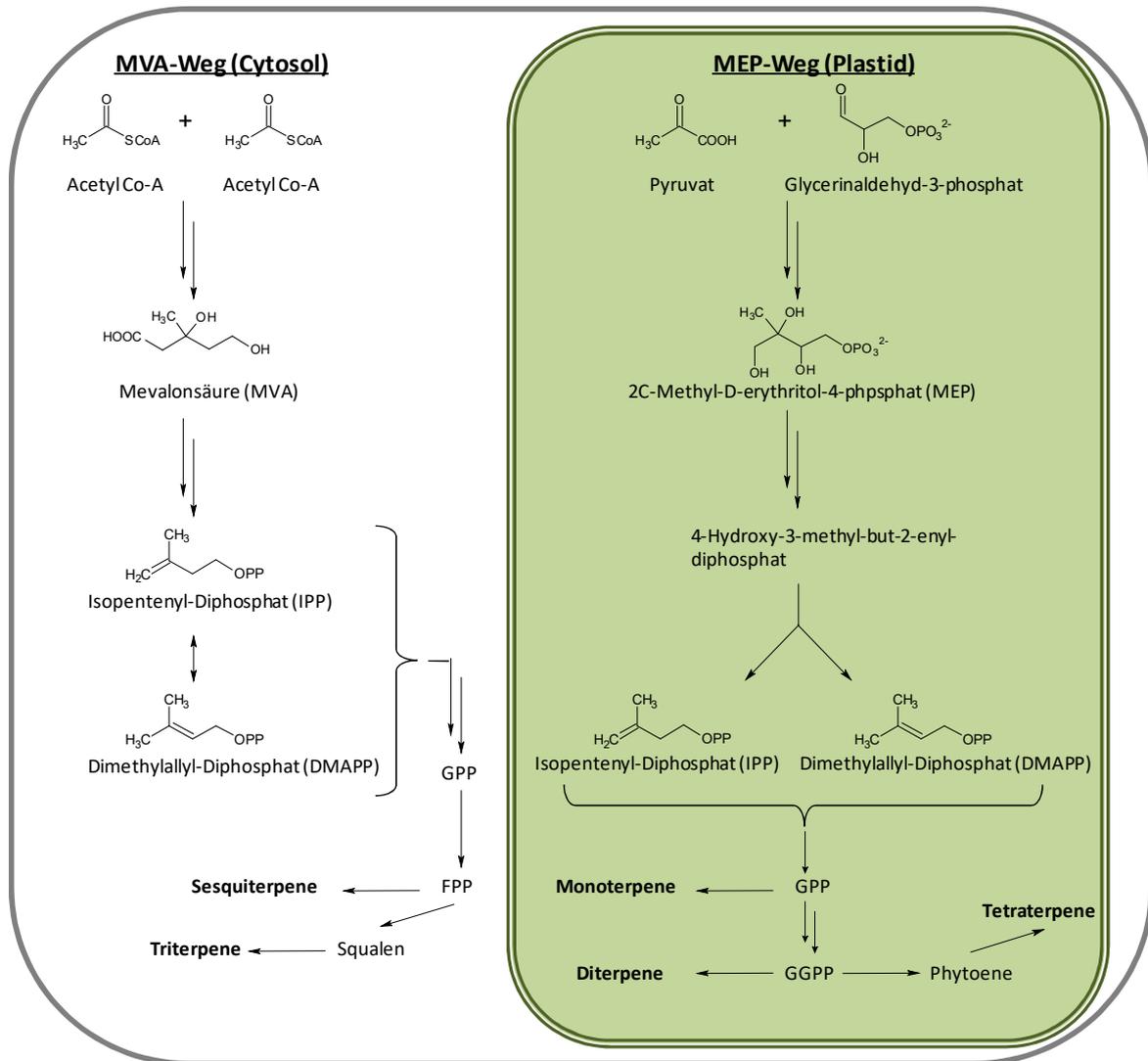


Abb. 1.3: Überblick zur Terpenbiosynthese in der pflanzlichen Zelle. Abgebildet sind der cytosolische Mevalonsäure (MVA)-Weg und der plastidäre 2C-Methyl-D-Erythritol-4-Phosphat (MEP)-Weg. Beide Synthesewege enden mit der Bildung von Isopentenylidiphosphat (IPP) und sein Isomer Dimethylallyldiphosphat (DMAPP). Prenyltransferasen synthetisieren anschließend durch Kondensation von IPP und DMAPP die Prenylidiphosphate (GPP, FPP und GGPP). Diese werden mittels Terpensynthasen in eine Vielzahl unterschiedlicher Terpene umgewandelt. Bild modifiziert nach (Dudareva *et al.*, 2013) und (Krause, 2015).

1.4 Pflanzliche Acyltransferasen

Pflanzen können eine enorm große Zahl an unterschiedlichen sekundären Pflanzenstoffen produzieren, obwohl nur wenige Hauptbiosynthesewege existieren. Diese Vielfalt wird durch eine große Anzahl an modifizierenden Reaktionen bzw. Enzymen ermöglicht, welche das Grundgerüst in unterschiedlicher Weise verändern und erweitern. Dazu zählen unter anderen Oxidation-, Reduktion-, Methylierungs-, Glycosylierungs- und Acylierungsreaktionen (St-

Pierre & De Luca, 2000; Pichersky *et al.*, 2006). Letztere ist dabei eine der häufigsten Modifizierungsreaktionen in der Pflanzenwelt (D'Auria, 2006).

Bei der enzymatischen Acylierung wird ein aliphatischer oder aromatischer Acylrest über ein aktiviertes Donor-Molekül auf ein Akzeptor-Molekül übertragen unter Bildung einer Esterbindung (Mugford & Milkowski, 2012). Aktuell sind drei Enzymfamilien bekannt, die diese Acylierung von sekundären Pflanzenstoffen in Gefäßpflanzen katalysieren, die BAHD-Acyltransferasen, die Serin Carboxypeptidase-Like (SCPL)-Acyltransferasen und die Tyramin N-Hydroxycinnamoyltransferase / Serotonin N-hydroxycinnamoyltransferasen (THT/SHT).

1.4.1 BAHD-Acyltransferasen

Die Familie der BAHD-Acyltransferasen wurde nach den ersten vier Enzymen benannt, die aus dieser Enzymfamilie biochemisch charakterisiert wurden (St-Pierre & De Luca, 2000). Zu diesen gehören die Benzylalkohol *O*-Acetyltransferase (BEAT) (Dudareva *et al.*, 1998), die Anthocyanin *O*-Hydroxy- Cinnamoyltransferase (AHCT) (Fujiwara *et al.*, 1998), die Anthranilat *N*-Hydroxycinnamoyl /Benzoyltransferase (HCBT) (Yang *et al.*, 1997) sowie die Deacetylvindolin 4-*O*-Acetyltransferase (DAT) (St-Pierre *et al.*, 1998).

BAHD-Enzyme sind monomere Proteine, besitzen eine molekulare Masse von 48 – 55 kDa und nutzen Acyl-CoA Thioester als energiereiches Donormolekül. Da bisher keine Enzyme mit Signalpeptid identifiziert wurden, ist davon auszugehen, dass die Mitglieder dieser Enzymfamilie cytosolisch lokalisiert sind (D'Auria, 2006).

Die Proteinsequenzen der BAHD-Acyltransferasen weisen mit 10 – 30 % eine geringe Identität auf (St-Pierre & De Luca, 2000). Alle bisher identifizierten Enzyme haben jedoch trotz der geringen Identität zwei hoch konservierte Domänen gemein, das HXXXD- und das DFGWG- Motiv (D'Auria, 2006). Ma *et al.* (2005) veröffentlichte die erste Kristallstruktur eines BAHD-Mitglieds (Vinorin Synthase), und ermöglichte somit ein besseres Verständnis über den katalytischen Mechanismus dieser Enzymfamilie und die Wichtigkeit der konservierten Domänen. Während das DFGWG-Motiv in der Nähe des C-Terminus lokalisiert ist und eher eine Strukturfunktion als eine katalytische Rolle inne hat (Unno *et al.*, 2007), liegt das HXXXD-Motiv im Zentrum des Enzyms und ist unverzichtbar für die katalytische Funktion des Enzyms (Suzuki *et al.* 2003). Das Sauerstoff- bzw. Stickstoffatom des jeweiligen Akzeptors wird durch den konservierten Histidinrest des HXXXD-Motivs deprotoniert, was einen nukleophilen Angriff auf den Carbonyl-Kohlenstoff des CoA-Thioesters ermöglicht. Im Anschluss bildet sich ein Intermediat zwischen dem CoA-Thioester

und dem Akzeptormolekül. Durch Deprotonation des Intermediates wird ein freies CoA und ein acetylierter Ester bzw. acetyliertes Amid gebildet (D'Auria, 2006, Ma *et al.*, 2005).

Phylogenetische Analysen innerhalb einer Enzymfamilie ermöglichen die Untersuchung evolutionärer Beziehungen aller Mitglieder dieser Familie und können für Enzyme, welche noch nicht biochemisch charakterisiert sind, zum Teil ihre mögliche katalytische Funktion vorhersehen. D'Auria (2006) hat alle bis dahin charakterisierten BAHD-Acyltransferasen mittels Proteinsequenz phylogenetisch analysiert und ein Kladogramm entwickelt, welches die Enzymfamilie in fünf Haupt-Kladen unterteilt.

Mitglieder der Klade I acylieren phenolische Glykoside, insbesondere Anthocyane. Eine weitere Besonderheit ist, dass unabhängig von den bereits erwähnten konservierten Domänen eine für diese Klade exklusive Domäne existiert (YFGNC), die in fast allen Mitgliedern dieser Gruppe vorhanden ist (D'Auria, 2006). Klade II ist eine sehr kleine Gruppe von zwei Enzymen (Glossy2 und CER2), welche an der Biosynthese epikutikulärer Wachse beteiligt sind (Negruk *et al.*, 1996; Tacke *et al.*, 1995). Enzyme der Klade III können ein großes Spektrum an Alkohol-Substraten umsetzen und als Hauptdonor dient in den meisten Fällen Acetyl CoA. Innerhalb dieser Klade können zwei Subgruppen unterschieden werden. Während die Mitglieder der einen Subgruppe an der Modifikation von Alkaloid-Komponenten beteiligt ist, gehören zur zweiten Untergruppe Acyltransferasen, die in die Biosynthese von volatilen Estern beteiligt sind (D'Auria, 2006). RhAAT1 aus *Rosa hybrida*, was Geraniol zu Geranylacetat umsetzt, ist ein Beispiel für diese Gruppe (Shalit *et al.*, 2003). Der Klade IV ist die Agmatin Coumaryltransferase aus Gerste zugeordnet (ACT), welche wie alle BAHD Acyltransferasen das HXXXD-Motiv besitzt. Das DFGWG-Motiv weicht jedoch leicht ab, indem das Glycin (G) durch ein Tryptophan (Y) ersetzt ist (Burhenne *et al.*, 2003). Die letzte Klade des Kladogramms von D'Auria (2006), Klade V, kann wie Klade III in weitere Untergruppen unterteilt werden. Die erste Untergruppe enthält hauptsächlich Acyltransferasen, welche eine Rolle in der Biosynthese von volatilen Estern spielen und zumindest funktionell denen aus der Untergruppe der Klade III ähnlich sind. Alle Acyltransferasen der zweiten Untergruppe stammen aus der Spezies *Taxus* und sind an der Synthese von Paclitaxel beteiligt (Walker *et al.*, 2002) während sich die dritte Gruppe dadurch kennzeichnen lässt, dass alle den gleichen Acyldonor, das Hydroxycinnamoyl/Benzoyl CoA, nutzen.

Die von D'Auria beschriebene Aufteilung der BAHD-Acyltransferasen in fünf Kladen wurde nach 2006 bis heute auf Grund von zahlreichen neu identifizierten und zum Teil auch charakterisierten Enzymen dieser Enzymfamilie ständig erweitert (Sharma *et al.*, 2013,

Chedgy *et al.*, 2015, Schmidt *et al.* 2015) und teilweise neu untergliedert (Yu *et al.*, 2009; Tuominen *et al.*, 2011). Da bei allen Analysen die grundlegende Aufteilung der fünf Kladen weitestgehend bestehen bleibt, gilt sie bis heute als grundlegend.

1.4.2 Weitere pflanzliche Acyltransferasen

Neben den BAHD-Acyltransferasen gibt es noch weitere Enzymfamilien, die Acylierungsreaktionen in Pflanzen katalysieren. Serin Carboxypeptidase-Like (SCPL)-Acyltransferasen sind erst seit 2000 bekannt und wurden von Steffens (2000) erstmalig beschrieben. Sie unterscheiden sich dahingehen von den BAHD-Acyltransferasen, dass sie unterschiedliche energiereiche Donor-Moleküle nutzen. Während BAHD-Acyltransferasen Acyl-CoA Thioester verwenden, wird die Reaktion bei den SCPL-Acyltransferasen durch 1-*O*- β -Glukoseester ermöglicht (Bontpart *et al.*, 2015, Mugford & Milkowski, 2012). Die bis jetzt charakterisierten SCPL-Acyltransferasen besitzen ein N-terminales Signalpeptid, was darauf hindeutet, dass das Protein in die Vakuole transportiert wird und unterscheiden sich daher von den cytosolischen BAHD-Enzymen deutlich (Mugford *et al.*, 2009).

Tyramine *N*-Hydroxycinnamoyltransferase / Serotonin *N*-Hydroxycinnamoyltransferase (THT/SHT) sollen der Vollständigkeit halber als dritte Gruppe von Acyltransferasen aufgelistet werden. Diese Enzyme sind cytosolische Enzyme mit einer Molekularen Masse von 26 – 28 kDa und wurden in verschiedensten Pflanzenspezies (z.B Kartoffel, Tabak und Tomate) identifiziert (Kang *et al.*, 2006).

1.5 Blütenbau sowie Nektar und Pollen von *T. vulgaris*

Die Blüten von *T. vulgaris* haben die in der Familie der Lamiaceae typische zygomorphe und fünfzählige Blütenstruktur (Blütenformel: $\downarrow K_{(5)}[C_{(5)}A_4]G_{(2)}$) (Abb. 1.4 A-B). Die Kronblätter sind verwachsen und bilden die charakteristischen zwei Ober- und drei Unterlippen aus (Abb. 1.4 A). Der Blütenkelch ist ebenfalls verwachsen und besitzt fünf Kelchzähne (Abb. 1.4 B). Die zwei Fruchtblätter bilden einen verwachsenen, oberständigen viergeteilten Fruchtknoten mitsamt Griffel, welcher in einer zweigeteilten Narbe endet (Abb. 1.4 A) (Sitte *et al.*, 2002).

T. vulgaris bildet neben dem im Kapitel 1.2 beschriebenen chemischen Polymorphismus eine weitere Form des Polymorphismus aus. In Thymian-Populationen koexistieren männlich-sterile Individuen neben Pflanzen mit einem hemaphroditen (zwitterigen) Blütenbau. Dieses Phänomen wird Gynodiözie genannt und ist neben Thymian in über 500 Arten von 71

Pflanzenfamilien vertreten (Thompson *et al.*, 1998; Arnan *et al.*, 2014). Die vier fertilen Staubblätter mitsamt den hexacolpaten Pollenkörnern sind aus diesem Grund nur in den zwittrigen Blüten vorhanden (Abb. 1.4 A).

Das Bestäuberspektrum für Thymian ist groß und umfasst Bienen, Wespen, Schwebfliegen und Schmetterlinge. Bienen spielen jedoch diesbezüglich eine übergeordnete Rolle (Arnan *et al.*, 2014), wobei Nektar sowie Pollen gesammelt werden.

Floraler Nektar wird durch Nektarien, spezielle Drüsenorgane, sekretiert, die sich anatomisch enorm zwischen den Pflanzenspezies unterscheiden. Mitglieder der Lamiaceae besitzen meist Diskusdrüsen an der Basis des Fruchtknotens (Mačukanović-Jocić *et al.*, 2007). Die Zusammensetzung des Nektars im Allgemeinen richtet sich hauptsächlich nach den Bedürfnissen der entsprechenden Bestäuberorganismen. Während z.B. Schmetterlinge, Motten und Bienen mit langen Zungen eher zuckereichen Nektar bevorzugen, präferieren Fliegen eher Nektar mit einem hohen Hexose-Anteil (González-Teuber & Heil, 2009). Auch Aminosäuren haben einen großen Einfluss auf die Attraktivität des Nektars. Neben Zucker spielen auch Aminosäuren eine große Rolle für die Attraktivität von Nektar. Viele ausgewachsene Bestäuberinsekten ernähren sich hauptsächlich von Nektar und sind daher auf ihn als Aminosäurequelle angewiesen (Heil, 2011). Petanidou *et al.* (2006) hat die Zusammensetzung von verschiedenen Nektarproben diverser mediterraner Pflanzen analysiert (darunter auch eine Thymus-Art) und konnte ebenfalls einen Zusammenhang mit den jeweiligen Vorlieben der Bestäuber feststellen.

Während Zucker und Aminosäuren eine essentielle physiologische Rolle für die Bestäuber spielen, ist die Funktion von sekundären Pflanzenstoffen, welche ebenfalls im Nektar von ca. 21 Pflanzenfamilien enthalten sind, weniger offensichtlich. Zum einen werden durch die sekundären, teils „giftigen“ Substanzen Nektarräuber abgehalten oder dienen auf Grund ihrer antimikrobiellen Wirkung als Schutz gegen Abbauprozesse durch Mikroorganismen (Herrera *et al.*, 2008; Heil, 2011). Flüchtige Substanzen („volatile organic compounds“, VOCs) wiederum locken Bestäuber an und in Kapitel 1.6 wird ihre gesundheitsfördernde Funktion für Bestäuber, im speziellen der Honigbiene, erläutert.

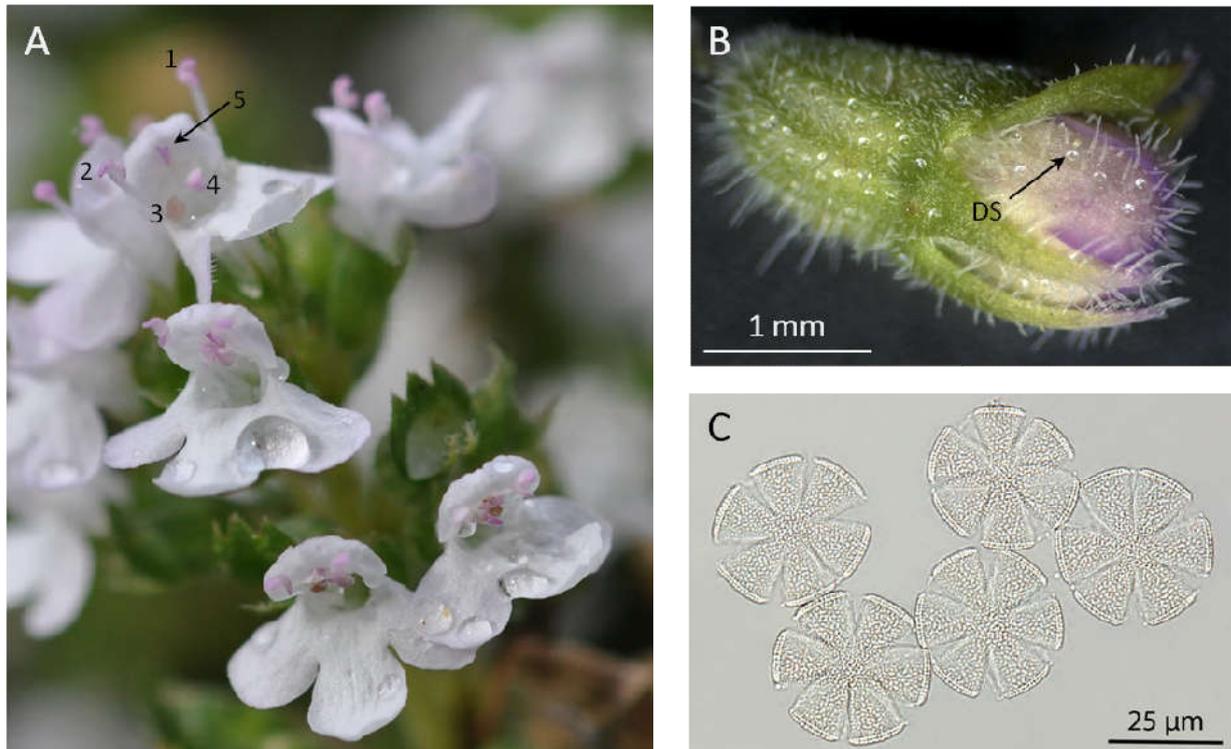


Abb. 1.4: Blütenbau von *T. vulgaris*. Blütenstand mit zwittrigen Blüten (A), geschlossene Blütenknospe mit Kelch (B), mikroskopische Aufnahme der hexacolpaten Pollenkörner (in Chloralhydrat präpariert) (C). 1-4: Antheren mit Pollensäcken, 5: zweigeteilte Narbe, DS: Drüsenschuppe.

1.6 Europäische Faulbrut (EFB) – eine gefürchtete Krankheit der Honigbiene

Die Honigbiene (*Apis mellifera*) ist bekannt für ihre Rolle als Honiglieferant sowie ihre außerordentlich große Bedeutung als Bestäuberorganismus in Landwirtschaft und Gartenbau. Gleichzeitig ist sie ständig einer Vielzahl an Krankheitserregern ausgesetzt, zu denen Bakterien, Viren, Pilze, Protozoen, Pilze sowie Milben zählen. Aus ökonomischer Sicht gehören die Amerikanische Faulbrut (AFB) und die Europäische Faulbrut (EFB) mit zu den bedeutendsten Bienenkrankheiten, da sie weit verbreitet sind und im schlimmsten Fall zum Absterben der infizierten Kolonie führen können (Forsgren, 2010). Lange Zeit wusste man nicht, dass es bei den auftretenden Symptomen um zwei unterschiedliche Krankheiten handelt. Dies wurde erst Anfang des 20. Jahrhunderts erkannt (White, 1912). Während die EFB durch das grampositive, mikroaerophile bis anaerobe Bakterium

Melissococcus plutonius ausgelöst wird, verursacht die Infektion mit *Paenibacillus larvae*, ebenfalls ein gram positives Bakterium, die AFB (Genersch *et al.*, 2006; Bailey, 1983).

Die EFB ist überall dort verbreitet, wo Bienen gezüchtet werden und äußert sich durch ein Absterben der Larven im Alter von 4-5 Tagen. Ist ein großer Anteil der Brut befallen, erscheint das Muster der Brutzellen auf Grund der verfärbten Larven fleckig und kann zusätzlich einen fauligen Geruch verströmen, was ausschlaggebend für die Namensgebung war. Ein visuelles Erkennen von infizierten Kolonien auf dem Feld ist zwar prinzipiell möglich, es besteht jedoch Verwechslungsgefahr mit anderen Krankheiten. Mittlerweile existieren diverse Methoden für die korrekte Bestimmung, wie z.B. ein Kit zur Detektion von *M. plutonius* direkt auf dem Feld (Tomkies *et al.*, 2009).

Neben dem Hauptpathogen *M. plutonius* sind stets noch weitere Bakterien mit Auftreten von EFB assoziiert. Zu ihnen zählen *Bacillus pumilus*, *Brevibacillus laterosporus*, *Enterococcus faecalis*, *Paenibacillus alvei* sowie *Paenibacillus dendritiformis*, die auch sekundäre Eindringlinge („secondary invader“) genannt werden. Die Larven selbst werden durch kontaminiertes Futter infiziert und sind gleichzeitig Reproduktionsort für die Erreger (Shimanuki & Knox, 1997). Eine enorme Dichte an Individuen und die homöostatischen Bedingungen bezüglich Temperatur und Luftfeuchtigkeit in den Bienenkolonien bieten eine hervorragende Umgebung für die Verbreitung der pathogenen Bakterien. Durch das Entfernen der befallenen Larven mitsamt den darin enthaltenen Sporen des Pathogens durch Ammenbienen tragen die Bienen selbst auch dazu bei die Krankheit ungewollt weiter zu verteilen (Forsgren, 2010; Erler *et al.*, 2014).

Honigbienen sind Krankheiten nicht schutzlos ausgeliefert. Das eigene Immunsystem, individuelle Verteidigungsmechanismen (z.B. die Insektenkutikula) und ihr soziales Verhalten (Hygiene-Verhalten) verhilft ihnen dabei, sich zu wehren (Erler & Moritz, 2016; Erler *et al.*, 2014; Wilson-Rich *et al.* 2009). Ein nicht zu unterschätzendes Potenzial birgt das Sammeln von Pflanzenprodukten wie Pollen, Nektar und Propolis, welche einen hohen Anteil an sekundären Pflanzenstoffen enthalten. Diese Stoffe wirken antibiotisch, antiviral und fungizid und können daher eine große Rolle in der Krankheits-Prophylaxe der Honigbiene spielen (Gherman *et al.*, 2014). Zusätzlich gibt es Hinweise, dass *A. mellifera* durch angepasstes Verhalten befähigt ist, aktiv den schon bestehenden Befall eines Pathogens zu bekämpfen. Bienenkolonien, welche mit der Kreidebrut infiziert sind, sammeln signifikant mehr Propolis und verringern somit die Intensität der Infektion (Simone-Finstrom & Spivak, 2012) und Ammenbienen zeigen nach Befall der Kolonie mit *Nosema ceranae* ein anderes Fütterungsverhalten bezüglich des eingelagerten Honigs und nutzen den Honig, der die

Infektionsstärke eindämmen kann (Gherman *et al.*, 2014). Dieses Verhalten ist unter dem Begriff „Selbstmedikation“ zusammengefasst und gehört zu den sozialen Verteidigungsmechanismen der Honigbiene (Erlor & Moritz, 2016).

1.7 Ziel der Arbeit

Das ätherische Öl von *T. vulgaris* ist reich an pharmazeutisch wirksamen Monoterpenen und daher eine wichtige Arzneipflanze in der Phytomedizin. Lange Zeit lag der wissenschaftliche Fokus hauptsächlich in der Aufklärung der Biosynthese der Hauptmonoterpene. Das ätherische Öl des Thymians ist jedoch weitaus komplexer und enthält neben weiteren Substanzen zusätzlich noch große Mengen an Monoterpenacetaten.

Ziel der Arbeit war es, das Verständnis der Biosynthesewege um den Schritt der Acetylierung zu erweitern, indem die an dieser Reaktion beteiligten Enzyme identifiziert werden sollten. Darüber hinaus sollte die phylogenetische Klassifizierung, biochemische Charakterisierung und Transkriptanalyse dieser Enzyme einen Einblick in deren biochemische Eigenschaften und Funktion geben.

Nicht nur die Blätter des Thymians enthalten ätherisches Öl, auch in Nektar und Pollen sind Monoterpene und Monoterpenacetate nachweisbar. Die Honigbiene (*Apis mellifera*) gilt als wichtigster Bestäuber der mediterranen Pflanzengattung *Thymus* und sammelt dabei sowohl Nektar als auch Pollen. Die qualitative und quantitative Analyse der Monoterpene und ihrer Acetate sollte die Frage klären, ob nicht nur der Mensch von der pharmazeutischen Wirksamkeit des Thymians profitiert, sondern die enthaltenen sekundären Pflanzenstoffe auch in der Lage sind, einen positiven Einfluss auf die Bienengesundheit zu haben. Dies wurde am Beispiel der mit der Europäischen Faulbrut assoziierten mikrobiellen Erreger analysiert und sollte einen Beitrag zum Verständnis des komplexen Pathogen-Bestäuber-Pflanzen Netzwerks leisten.

2 Material und Methoden

2.1 Pflanzenmaterial

2.1.1 Herkunft und Kultivierung von *T. vulgaris*

Alle verwendeten Chemotypen (Tab. 2.1) von *Thymus vulgaris* wurden ursprünglich am CNRS (Centre national de la recherche scientifique), Montpellier in Südfrankreich gesammelt und im Feld in Halle (Saale), Deutschland im Sommer 2013 ausgepflanzt. Pflanzen eines Chemotyps sind vegetative Klone die aus Spross-Stecklingen einer ursprünglichen Pflanze gezogen wurden.

Tab. 2.1: Auflistung verwendeter Chemotypen von *Thymus vulgaris*.

Chemotyp	Hauptmonoterpen(e)
G-Typ (<i>Thymus vulgaris</i>)	Geraniol, Geranylacetat
A-Typ (<i>Thymus vulgaris</i>)	α -Terpineol, α -Terpinylacetat
U-Typ (<i>Thymus vulgaris</i>)	<i>trans</i> -Sabinenhydrat
L-Typ (<i>Thymus vulgaris</i>)	Linalool, Linalylacetat
C-Typ (<i>Thymus vulgaris</i>)	Carvacrol
T-Typ (<i>Thymus vulgaris</i>)	Thymol

2.1.2 Ernte von Blättern, Nektar und Pollen von *T. vulgaris*

Die Ernte der Thymianblätter erfolgte sowohl im Frühjahr als auch in den Sommermonaten. Hierfür wurden die jungen Triebspitzen abgeschnitten und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das Blütenmaterial wurde während der Hauptblütezeit im Mai 2017 geerntet und ebenfalls direkt in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung des Blatt- bzw. Blütenmaterials erfolgte bis zur Verwendung bei -80°C . Nektar und Pollen wurden während der Blütezeit im Mai 2017 gesammelt. Die Nektarproben wurden von allen Chemotypen mittels 1 μl Mikrokapillaren (Brand, Wertheim, Deutschland) geerntet und auf Grund der geringen Volumina von jedem Chemotyp in kleinen Glasgefäßen vereinigt. Während des Ernteprozesses wurden die Proben auf Eis aufbewahrt und später bei -20°C gelagert. Das Sammeln von Pollen war nur für den G-, A-, und L-Chemotyp möglich, da die anderen Chemotypen (C, T und U) nur weibliche Blüten besaßen und keine Antheren ausbildeten. Der

Pollen wurde mit Hilfe einer sauberen Pinzette gesammelt indem die Pollensäcke von den Filamenten gezupft wurden. Es wurde versucht, keine Filamente mit in die Pollenprobe zu überführen. Wie auch beim Nektar wurde der Pollen von verschiedenen Pflanzen eines Chemotyps vereinigt, während der Ernte auf Eis aufbewahrt und später bei -20°C gelagert.

2.1.3 Kultivierung von *Nicotiana benthamiana*

Nicotiana benthamiana wurde aus Samen gezogen und in Tonsubstrat (Klasmann-Deilmann GmbH, Geeste, Deutschland) für ca. 3-4 Wochen bis zum 6-8 Blattstadium in Pflanztöpfen (10x10x12 cm) kultiviert. Gleichbleibende Wachstumsbedingungen ermöglichte ein Klimaraum mit folgenden Parametern: 150 $\mu\text{mol (m}^2)^{-1} \text{ s}^{-1}$ photosynthetisch aktive Strahlung bei Lang-Tag Bedingungen (16 h Licht), Temperatur: 22°C, relative Luftfeuchte 65 %.

2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.1 Bakterienstämme und ihre Kultivierung

Escherichia coli (*E. coli*) wurde in flüssigem LB-Medium im Schüttler oder auf LB-Agar-Platten im Inkubator bei 37°C kultiviert. *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*) wurde bei 28°C ebenfalls mit Hilfe der gleichen Medien wie *E. coli* angezogen.

Tab. 2.2: Verwendete Bakterienstämme.

Bakterienstamm	Genotyp	Anwendung
<i>E. coli</i> TOP10 (Invitrogen, Carlsbad, USA)	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 deoR</i> <i>recA1 araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1</i> <i>nupG</i>	Klonierung und Sequenzierung von Genen
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) (Novagen, Madison, USA)	F- <i>ompT gal dcm lon hsdSB</i> (rB- mB-) (DE3)	Expression rekombinanter Proteine
<i>A. tumefaciens</i> GV3101 (van Larebeke <i>et al.</i> , 1974)	mit „nopaline vir helper plasmid“ pMP90	Einführen von TvAAT- Genen in <i>N. benthamiana</i>

2.2.2 Antibiotika

Tab. 2.3: Eingesetzte Antibiotika.

Antibiotikum	Konzentration der Stammlösung [mg ml ⁻¹]	Konzentration im Medium [µg ml ⁻¹]
Kanamycin	50	50
Ampicillin	100	100
Gentamycin	50	50
Rifampicin	30 (in Methanol)	30

2.2.3 Medien

LB-Medium:	20 g	LB-Medium (AppliChem, Darmstadt, Deutschland) in 1 l <i>A. dest.</i>
LB-Agar:	32 g	LB-Agar (AppliChem, Darmstadt, Deutschland) in 1 l <i>A. dest.</i>
SOC-Medium:	2 % [w/v]	Trypton (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
	0,5 % [w/v]	Hefeextrakt (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
	0,5 % [w/v]	Glucose
	10 mM	Natriumchlorid
	2,55 mM	Kaliumchlorid
	21,6 mM	Magnesiumchlorid
	20 mM	Magnesiumsulfat

2.2.4 Transformation in *E. coli*

3-10 µl Ligationsansatz wurden auf 50 µl chemisch kompetente *E. coli* TOP10 Zellen gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einer Hitzebehandlung bei 42°C für 40 s wurden die Zellen anschließend für 2 min auf Eis runter gekühlt und mit 200-1000 µl SOC-Medium versetzt. Transformierte Zellen schüttelten mindestens 1 h bei 220 rpm und 37°C bevor 100 µl des Ansatzes auf LB-Agar Platten mit entsprechendem Antibiotikum aufgebracht und über Nacht bei 37°C inkubiert wurde. Positive Klone konnten mittels PCR und gen- oder vektorspezifischen Primern ermittelt werden (2.3.6).

2.2.5 Transformation in *Agrobacterium tumefaciens*

Die Transformation von kompetenten Agrobakterien (*A. tumefaciens*) erfolgte nach dem modifizierten Protokoll der „freeze-thaw“-Methode (Hofgen und Willmitzer, 1988). Dafür wurden 200 µl kompetente Zellen auf Eis aufgetaut und mit 500 ng Plasmid-DNA versetzt. Es folgten Inkubationsschritte für je 5 min auf Eis, in flüssigem Stickstoff und 37°C. Anschließend wurde 1 ml LB-Medium zugegeben und für 30 min auf Eis erneut inkubiert. Der Transformationsansatz schüttelte daraufhin für 2 h bei 220 rpm und 28°C bevor die Zellen bei 7000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert und in 100 µl LB wieder resuspendiert wurden. 100 µl transformierte Agrobakterien wurden auf LB-Platten mit Rifampicin, Gentamycin, Kanamycin ausgestrichen und für zwei Tage bei 28°C inkubiert. Positive Klone konnten mittels PCR und gen- oder vektorspezifischen Primern ermittelt werden (2.3.6).

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Isolation von Gesamt-RNA aus *T. vulgaris*

Für die RNA-Extraktion wurden ausschließlich junge Blatttriebspitzen von *Thymus vulgaris* verwendet. Das Pflanzenmaterial wurde direkt nach der Ernte in flüssigem Stickstoff gefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Das gefrorene Pflanzenmaterial wurde mittels Mörser in flüssigem Stickstoff zu feinem Pulver zerrieben. Zur Isolation von Gesamt-RNA wurden je nach Verwendungszweck zwei verschiedene RNA-Kits verwendet. Zur Weiterverarbeitung als Vorlage für PCR wurden 90 – 100 mg des Pflanzenpulvers mittels „RNeasy® Mini Kit“ (Quiagen GmbH, Hilden, Deutschland) gemäß Herstellerprotokoll isoliert. Um Gesamt-RNA zur Weiterverarbeitung und Verwendung für Real-time PCR zu isolieren wurde für eine größere Ausbeute das „Spectrum™ Plant Total RNA Kit“ (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) gemäß Herstellerprotokoll angewandt. Hierzu wurden 50 – 70 mg des gemörserten Pflanzenpulvers eingesetzt. Die Lagerung von RNA erfolgte kurzfristig bei -20°C und langfristig bei -80°C.

2.3.2 Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Um Plasmid-DNA aus Bakterien zu isolieren, wurde das „Nucleo Spin Plasmid Kit“ (Macherey&Nagel, Düren, Deutschland) gemäß Herstellerprotokoll verwendet.

2.3.3 DNA-Verdau

Isolierte RNA wurde mit Promega DNase (Promega, USA) nach Herstellerprotokoll behandelt. Hierfür wurden 1,9 µg RNA für 30 min bei 37°C verdaut. Die Reaktion wurde mit 1 µl Stopplösung und anschließender Inkubation für 10 min bei 65°C beendet.

2.3.4 cDNA-Synthese

Die Synthese von cDNA, welche als Vorlage für qualitative und quantitative PCR dient, wurde mit Hilfe des „RevertAid First Strand cDNA Synthesis“-Kits (Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland) durchgeführt. 0,69 µg DNase-verdaute RNA (2.3.3) wurden mit 0,5 µl Oligo (dT)18 Primer und 0,5 µl Random Hexamer Primer gemixt und mit *A. dest.* auf 12 µl aufgefüllt. Der Reaktionsansatz wurde für 5 min bei 65°C inkubiert und anschließend kurz auf Eis abgekühlt. Darauf folgend wurden 4 µl Reaktionspuffer, 2 µl dNTPs, 1 µl RiboLock Rnase Inhibitor und 1 µl RevertAid H Minus M-MuIV Reverse Transkriptase hinzugefügt. Der gesamte Ansatz wurde zunächst für 5 min bei 25°C, dann bei 42°C für 60 min und schließlich zum Stoppen der Reaktion für 5 min bei 70°C inkubiert. Die Lagerung der cDNA erfolgte bis zur Verwendung bei -20°C.

2.3.5 Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von Eurofins Genomic (Ebersberg, Deutschland) bezogen und sind in Tab. 2.4 aufgelistet.

Tab. 2.4: Verwendete Oligonukleotid-Primer.

Name	Sequenz	Anwendung
AAT1_iba_F	ATGGTAGGTCTCAGCGCATGGCGGGGATAATCATCGCAAG	AAT1 Klonierung
AAT1_iba_R	ATGGTAGGTCTCATATCACAGTTCGGAGAATTGGTCAGTAC	AAT1 Klonierung
AAT2_iba_F	ATGGTAGGTCTCAGCGCATGGAGTCAGCCGAAGCATTGAC	AAT2 Klonierung
AAT2_iba_R	ATGGTAGGTCTCATATCACAGCGCCGACGATATGAACACC	AAT2 Klonierung
AAT3_iba_F	ATGGTAGGTCTCAGCGCATGGCGCAGATAATCGCAAGCC	AAT3 Klonierung
AAT3_iba_R	ATGGTAGGTCTCATATCAATTAAGGAGGTTAGTGTATTTGGCT	AAT3 Klonierung
AAT4_iba_F	ATGGTAGGTCTCAGCGCATGGTTGAGATGATAATCGCAACTC	AAT4 Klonierung
AAT4_iba_R	ATGGTAGGTCTCATATCAAGAAAACAAGGAATTGAACTCCTTAT	AAT4 Klonierung
AAT5_iba_F	ATGGTAGGTCTCAGCGCATGGCAAATAAAACCCTAGGCCG	AAT5 Klonierung
AAT5_iba_R	ATGGTAGGTCTCATATCAAAGGGCCGAACTCCTCCGAAC	AAT5 Klonierung
AAT5_F	ATGGCAAATAAAACCCTAGGCCG	AAT5 Klonierung
AAT5_R	AAAGGGCCGAACTCCTCCGAAC	AAT5 Klonierung
AAT1_infu_F	CGACCTGCAGGCTGATTATGGCGGGGATAATCATCGC	AAT1 Klonierung
AAT1_infu_R	AGCTCCCGGGGCTGATCACAGTTCGGAGAATTGGT	AAT1 Klonierung
AAT3_infu_F	CGACCTGCAGGCTGATTATGGCGCAGATAATCGCAAG	AAT3 Klonierung
AAT3_infu_R	AGCTCCCGGGGCTGATTAGAGGTTAGTGTATTTGG	AAT3 Klonierung
AAT4_infu_F	CGACCTGCAGGCTGATTATGGTTGAGATGATAATCGC	AAT4 Klonierung
AAT4_infu_R	AGCTCCCGGGGCTGATTAAGAAAACAAGGAATTGA	AAT4 Klonierung
AAT5_infu_F	CGACCTGCAGGCTGATTATGGCAAATAAAACCCTAGG	AAT5 Klonierung
AAT5_infu_R	AGCTCCCGGGGCTGATTAAGGGCCGAACTCCTCC	AAT5 Klonierung
AAT1_qrt_F	TGCGGCAGCTTCTCTATCGGC	QRT-PCR für AAT1
AAT1_qrt_R	CGTGATTTCCTCTCTCGTGGTC	QRT-PCR für AAT1
AAT3_qrt_F	CAGCAGGCGGGCGAAATGTC	QRT-PCR für AAT3
AAT3_qrt_R	GTTTCGAAGGAGTCGTCGTTATC	QRT-PCR für AAT3
AAT4_qrt_F	CAGCTTAAGGTGAGGGTAAG	QRT-PCR für AAT4
AAT4_qrt_R	TCTCGTCACTCCCAGGCAC	QRT-PCR für AAT4
AAT5_qrt_F	CGAAGTTGCGGAATCGAACAA	QRT-PCR für AAT5
AAT5_qrt_R	GAAGAATCCGATCTCCTCATC	QRT-PCR für AAT5
AAT5_mut_F	CCGATATCGACTGTGAAAAGGTGATCCGATG	Mutations-PCR ATT5
AAT5_mut_R	CATCGGATCACCTTTTCACAGTCGATATCGG	Mutations-PCR ATT5
AAT4_mut_F	CACCGCGGAGAAATCTCGCGGCGTCTGAAAC	Mutations-PCR ATT4
AAT4_mut_R	GTTTCAGACGCCGCGAGATTTCTCCGCGGTG	Mutations-PCR ATT4
AAT1_seq_F	GCGACTTCGGATCCAACCTC	Sequenzierung von AAT1
AAT1_seq_R	GAGGTTGGATCCGAAGTCGC	Sequenzierung von AAT1
AAT3_seq_F	CGAAGACGAGATCGCGACG	Sequenzierung von AAT3
AAT3_seq_R	CGTCGCGATCTCGTCTTCG	Sequenzierung von AAT3
AAT4_seq_F	CTTCCTTCGACCTGGCGCTC	Sequenzierung von AAT4
AAT4_seq_R	GAGCGCCAGGTCAAGGAAG	Sequenzierung von AAT4
AAT5_seq_F	CGAAGTTGCGGAATCGAAC	Sequenzierung von AAT5
AAT5_seq_R	GTTCGATTCGCAACTTCG	Sequenzierung von AAT5

2.3.6 Amplifikation von DNA mittels PCR

Die Amplifikation von spezifischen DNA-Abschnitten wurde mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) in einem Thermocycler Primus 96 plus (MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland) bzw. peqSTAR-Thermocycler (peqSTAR 96 Universal Gradient, Peqlab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland) durchgeführt. Ein PCR Reaktionsansatz (25 μ l) enthielt folgende Komponenten: 1 μ l Primer 1 (10 pmol/ μ l), 1 μ l Primer 2 (10 pmol/ μ l), 1 μ l dNTPs (10 mM), 0,2 – 0,5 μ l Polymerase (0,4 – 2,5 U), 1x Polymerasepuffer sowie 0,5 – 3 μ l DNA Template (5 – 250 ng). Je nach Zielsetzung wurden unterschiedliche Polymerasen eingesetzt. Die Standard-PCR erfolgte mit Hilfe der GoTaq® DNA-Polymerase (Promega, Madison, USA), während die PCR zur Amplifikation von Genen für anschließende Klonierungsreaktionen mit der Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (NEB GmbH, Ipswich, MA, USA) durchgeführt wurde, welche eine Korrekturlese-Funktion innehat. Für Mutations-PCR wurde die Pfu Turbo DNA Polymerase AD (Agilent, Santa Clara, USA) verwendet. Folgendes Temperaturprogramm wurde standardmäßig für die PCR verwendet:

	95°C	2 min	initiale Denaturierung	
20-35 Zyklen	{	95°C	30 s	Denaturierung
		50 – 69°C	30 s	Annealing
		68/72°C	1 – 12 min	Elongation / Extension
	68/72°C	5 min	finale Extension	

Während die ersten beiden Denaturierungsschritte in allen durchgeführten PCR konstant blieben, richtete sich die Annealing-Temperatur nach der Schmelztemperatur der Primer. Für die Berechnung der Annealing-Temperatur wurden von der spezifischen Schmelztemperatur des jeweiligen Primers 1 – 5°C abgezogen. Die Einstellung der Elongationstemperatur erfolgte in Abhängigkeit der verwendeten Polymerase und der Elongationszeit von der Länge des erwarteten Produkts sowie der Geschwindigkeit der Polymerase (1 kbp/min). Eine Auflistung der verwendeten Primer ist in Tab. 2.4 zu finden.

2.3.7 Quantitative real-time PCR (QRT-PCR)

Die QRT-PCR ermöglicht das Ermitteln und Auswerten von Transkriptmengen spezifischer Gene in verschiedenen Pflanzenproben. In dieser Arbeit wurde dafür der iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) verwendet. Der darin

enthaltene Farbstoff SYBR Green I lagert sich unspezifisch in doppelsträngige DNA ein und absorbiert Licht bei einer Wellenlänge von 494 nm und emittiert es bei 521 nm. Die Signalstärke des emittierten Lichts wird gemessen, um die Konzentration des ursprünglichen Transkripts eines spezifischen Gens zu ermitteln. Ein Standard-Ansatz einer real-time PCR enthält folgende Komponenten: 10 µl SYBR Green-Mix, 5 µl cDNA (1:5 verdünnt), 0,5 µl Primer 1 (0,25 mM), 0,5 µl Primer 2 (0,25 mM) und 4 µl *A. dest.* Die Durchführung der PCR erfolgte in einem CFX96 (Bio-Rad, Hercules, USA) unter folgendem Temperaturprogramm:

	95°C	30 s	initiale Denaturierung	
40 Zyklen	{	95°C	5 s	Denaturierung
		57,4 - 60°C	30 s	Annealing
		72°C	30 s	Elongation
	95°C	1 min	Schmelzkurve	
	56-95°C	0,5°C/30 s	Schmelzkurve	

Zur Berechnung des Genexpressionslevel wurde eine Standardkurve herangezogen, die für jedes Gen aus einem Pool an cDNA von allen Proben in gleichen Teilen generiert wurde. Als Referenzgen diente das Gen *y/s8* (yellow leaf specific gene 8), welches in jeder Probe annähernd gleiche Expressionslevel aufwies. Die Transkriptmenge wurde mit Hilfe des Programms „Bio-Rad CFX Manager 3.1“ (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) anhand des automatisch berechneten Schwellenwerts (threshold) berechnet. Relative Expressionslevel wurden durch den Quotient des Schwellenwerts des Gens und des Referenzgens angegeben. Für alle Proben wurden mindestens 3 technische Replikate gemessen.

2.3.8 Agarose-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese können DNA-Fragmente ihrer Größe nach aufgetrennt und dargestellt werden. Dafür wurden 1,5 %ige TAE-Agarosegele (1,5 % (w/v) Agarose (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA), 0,5 x TAE-Puffer) verwendet, die zusätzlich 1 µg/ml Ethidiumbromid enthielten. Den Proben wurde jeweils 5-fach Ladepuffer beigelegt. Durchgeführt wurde die Elektrophorese bei einer konstanten Spannung von 100 V in einer „Mupid[®]-One“ (Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, Deutschland). Zur Bestimmung der Fragmentgröße wurde neben den Proben noch ein DNA-Marker „Gene Ruler[™] 1 kb DNA Ladder“ (Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA) aufgetragen.

Aufgetrennte DNA-Fragmente konnten anschließend unter UV-Licht (Syngene G:Box, Syngene, Cambridge, Großbritannien) analysiert werden.

TAE-Puffer:	40 mM	Tris-HCl (pH 8.0)
	20 mM	Natriumactetat
	2 mM	EDTA

Ladepuffer	200 mM	Tris-HCl (pH 8.0)
	120 mM	EDTA
	50 %	Glycerol
	0,1 % (w/v)	Bromphenolblau

2.3.9 Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen oder PCR-Reaktionen

Die gewünschten PCR-Produkte wurden nach der Auftrennung aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten oder direkt nach der PCR-Reaktion und mit dem „NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up“-Kit (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) gemäß Herstellerprotokoll aufgereinigt.

2.3.10 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren erfolgte photometrisch in einem „Infinite® 200 PRO NanoQuant“ (Tecan, Männedorf, Schweiz). Dafür wurden jeweils 2 µl der Probe auf eine „NanoQuant Plate™“ (Quarzglasplatte) gegeben und gemessen.

2.3.11 Restriktion von DNA

Um eine erfolgreiche Ligation der DNA Fragmenten mit dem Zielvektor durch kompatible Enden zu gewährleisten, wurden PCR-Produkte sowie Vektoren mit Restriktionsenzymen behandelt. Die Enzyme und die dazugehörigen Puffer wurden von NEB (Ipswich, USA) oder Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA) bezogen. Ein Standard-Reaktionsansatz enthielten 5-30 U Enzym, 0,1-3 µg DNA sowie eine angemessene Menge an Puffer in einem Reaktionsvolumen von 10-20 µl. Die Inkubation erfolgte bei 37°C für 1-2 h.

2.3.12 Ligation von PCR-Produkten

DNA-Fragmente wurden mit dem TOPOTM TA CloningTM Kit (Invitrogen, Carlsbad, USA) in den pCR[®]4-TOPO[®]-Vektor oder dem CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA) in den pJET1.2/blunt-Vektor je nach Herstellerprotokoll ligiert. Die Ligationmethode des TOPOTM TA CloningTM Kits basiert auf dem Vorhandensein von 3'-A-Überhängen am DNA-Fragment. Polymerasen mit Korrekturlesefunktion entfernen diese Überhänge und verringern somit die Ligationseffizienz. Für solche PCR-Produkte musste vor der Klonierung eine Polyadenylierungsreaktion durchgeführt werden. Hierfür wurden zu 18,5 µl des Gelextrakts (siehe 2.3.9) 1 µl dATP (10 mM), 0,5 µl TaKaRa TaqTM DNA Polymerase (5 U/µl), 2,5 µl entsprechender Puffer und 2,5 *A. dest* hinzugefügt und für 15 min bei 72°C inkubiert.

Für die Ligation von TvAAT-Genen in den pASK-Iba37plus-Vektor wurden das jeweilige Fragment und der Vektor mit BsaI (NEB GmbH, Ipswich, MA, USA) für 1,5 h bei 37°C verdaut und anschließend zusammen mit 2 µl ATP (10 mM, Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA) und 0,5 µl T4-Ligase (Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA) für 2 h bei 37°C ligiert.

Für die transiente Expression wurden TvAAT-Gene mithilfe des „In-Fusion[®] HD Cloning“-Kits“ (TaKaRa Holdings Inc., Kyoto, Japan) in den pflanzlichen Expressionsvektor pCambia230035Su gemäß Herstellerprotokoll eingebracht. Eine Liste aller verwendeten Vektoren und ihre Eigenschaften sowie Verwendung ist in Tab. 2.5 zu finden.

Tab. 2.5: Verwendete Vektorsysteme.

Vektor	Ausgewählte Eigenschaften	Verwendung
pCR [®] 4-TOPO [®] (Invitrogen, Carlsbad, USA)	Bakterieller Klonierungsvektor, 3956 bp, Amp ^r , Km ^r , Plac-Promotor	Klonierung von PCR-Produkten
pJET1.2/blunt (Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA)	Bakterieller Klonierungsvektor, 2974 bp, Amp ^r , T7-Promotor	Klonierung von PCR-Produkten
pASK-Iba37plus (Iba, Göttingen, Deutschland)	Bakterieller Expressionsvektor mit His ₆ -Tag, 3270 bp, Amp ^r , Tetrazyklin-Promotor	Heterologe Expression von AAT-Proteinen in <i>E. coli</i>
pCambia230035Su (Cambia, Brisbane, Queensland)	Pflanzlicher Expressionsvektor, 9500bp, Kan ^r , CaMV 35s Promoter	Transiente Expression von AAT-Proteinen in <i>N. benthamiana</i>

2.3.13 Sequenzierung und Sequenzanalyse

Alle verwendeten Plasmide und PCR Produkte wurden von Eurofins Genomics GmbH (Ebersberg, Deutschland) sequenziert. Dazu wurden die Proben nach Vorgabe der Firma verdünnt und zugesendet. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit den Programmen: „DNASTAR Lasergene“ (Madison, USA), „BioEdit“ (Ibis Therapeutics, Carlsbad, USA) und „Clone Manager“ (Scientific & Educational Software, Denver, USA). Des Weiteren wurde zur vergleichenden Sequenzdarstellung „Multalin“ (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) als frei zugängliche Software benutzt. Das Suchen und Vergleichen von Sequenzen in und mit der Datenbank erfolgte über BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

2.3.14 Phylogenetische Analyse

Für die identifizierten Acyltransferasen wurde eine Phylogenetische Analyse auf Basis der Nukleinsäuresequenz mit Hilfe des Programms „MEGA Version 6“ (Tamura *et al.*, 2013) durchgeführt. In die Analyse wurden die sieben identifizierten Sequenzen aus *T. vulgaris* und weitere 46 schon bekannte und funktionell analysierte Gene der pflanzlichen BAHD-Enzymfamilie integriert. Als statistische Methode wurde die Maximum Likelihood-Methode

und für den Phylogenetest die “Bootstrap”-Methode mit 1000 “Bootstrap”-Wiederholungen verwendet.

2.3.15 Transkriptom-Sequenzierung von *T. vulgaris*

Die Transkriptom-Sequenzierung (RNASeq) für den Geraniol-, den Thymol- und den Carvacrol Chemotyp von *T. vulgaris* wurde durch das Max Planck Genomzentrum (Köln, Deutschland) durchgeführt. Hochreine Gesamt-RNA Proben der benannten Chemotypen wurden isoliert (2.3.1) und für die RNASeq bereitgestellt. Die Sequenzierung erfolgte mittels Illumina MiSeq mit einem halben Lauf und 7,5 Mio „reads“ (Länge der „reads“: ca. 500 bp) pro Probe. Die erhaltenen „reads“ wurden assembliert und auf einem Sequenceserver (Priyam *et al.*, 2015) bereit gestellt (<http://bioinform.at:63703/>).

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Heterologe Expression von Alkohol-Acetyltransferasen in *E. coli*

Um eine proteinbiochemische Analyse der TvAATs zu ermöglichen, wurden die jeweiligen Gene zunächst in den pASK-Iba37plus-Vektor (Iba, Göttingen, Deutschland) ligiert (2.3.12) und in *E. coli* BL21 (DE3) (Novagen, Madison, USA) transformiert (2.2.4). Dafür wurden 5 ml LB-Medium, versetzt mit 100 µg/ml Ampicillin, mit einem positiven Klon angeimpft und über Nacht bei 37°C und 220 rpm inkubiert. Im Anschluss wurden 400 ml LB-Medium, versetzt mit 100 µg/ml Ampicillin, mit der gesamten Starterkultur von 5 ml inokuliert und solange konstant bei 37°C und 220 rpm inkubiert bis eine Optische Dichte (OD₆₀₀) von 0,4-0,6 erreicht war. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte durch Zugabe von Anhydrotetrazyklin (Endkonzentration 200 µg/l). Die Proteine wurden über Nacht bei 18°C und konstantem schütteln bei 220 rpm exprimiert und anschließend je nach Verwendungszweck weiter aufgereinigt.

2.4.2 Herstellung eines Proteinrohextraktes

Für das einfache Testen der Aktivität eines Proteins, wurde im Anschluss an die Proteinexpression (2.4.1) ein Proteinrohextrakt hergestellt. Die gesamte Zellkultur wurde bei 9240 x g für 10 min bei 4°C zentrifugiert und das Pellet in Extraktionspuffer gelöst. Zum

Aufschließen der Zellen wurde die Probe mit Ultraschall für 4 x 30 s auf Eis behandelt („Branson Sonifier 250“, Dietzenbach, Germany) und die Zelltrümmer anschließend bei 12000 x g und 4°C für 20 min sedimentiert. Der Proteinrohextrakt wurde mit Hilfe einer 10 DG Säule (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) gemäß Herstellerprotokoll in den Assaypuffer überführt.

Extraktionspuffer:	50 mM	Tris-HCl, pH 7.5
	10 %	Glycerol
	5 mM	MgCl ₂
	5 mM	DTT
	5 mM	Natriumascorbat, pH 7.0
	0,5 mM	PMSF

Assaypuffer:	50 mM	Tris-HCl, pH 7.0
	1 mM	DTT
	10 %	Glycerol

2.4.3 His-Tag Aufreinigung zur Herstellung hochreiner Proteine

Alle verwendeten Alkohol-Acetyltransferasen wurden mit Hilfe des pASK-Iba37plus-Vektor (Iba, Göttingen, Deutschland) in *E. coli* exprimiert (2.4.1) und besaßen somit am N-Terminus einen Polyhistidin-Tag (His-Tag). Dieser wurde mit Hilfe seiner hohen Affinität zu Nickelionen benutzt um hochreine Proteine, wie nachfolgend beschrieben, aufzureinigen. Nach der Proteinexpression wurde die gesamte Zellkultur bei 9240 x g für 10 min bei 4°C zentrifugiert und das Pellet in Lysepuffer resuspendiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit Ultraschall (4 x 30 s) auf Eis aufgeschlossen („Branson Sonifier 250“, Dietzenbach, Germany) und die Zelltrümmer bei 12000 x g und 4°C für 20 min sedimentiert. Der Überstand enthielt die lösliche Fraktion aller Proteine. 1 ml Ni-NTA Profinity™ IMAC Resin (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) wurde 3-mal mit 15 ml Waschpuffer gewaschen und anschließend zur löslichen Fraktion gegeben. Die Protein-Ni-NTA-Lösung wurde leicht schwenkend für 2 h bei 4°C inkubiert und anschließend auf eine „Poly-Prep® Chromatography“-Säule (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) gegeben. Im Anschluss wurde die Säule 3-mal mit 6 ml Waschpuffer gewaschen. Die Elution erfolgte in 6 Fraktionen mit je 500 µl Elutionspuffer.

Um eine sichere Lagerung der Proteinlösungen zu gewährleisten, wurde vor dem Einfrieren zu den Proteinfractionen Glycerol (10 % Endkonzentration) hinzugegeben.

Waschpuffer: 50 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (pH 8.0)
 300 mM NaCl
 10 mM Imidazol

Lysepuffer: Waschpuffer
 1 mM PMSF
 0,16 U DNase I (Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland)

Elutionspuffer: 50 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (pH 8.0)
 300 mM NaCl
 500 mM Imidazol

2.4.4 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit dem Roti[®]-Quant Reagenz (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) auf Mikrotiterplatten. Dafür wurden die Proteinproben 1:20 bzw. 1:40 verdünnt und mit dem Bradford-Reagenz versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 5 min erfolgte die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 590 nm. Zur Berechnung der Konzentrationen wurde eine Standardkurve mit BSA (Albumin Fraktion V, AppliChem, Darmstadt, Deutschland) erstellt und die Werte darauf bezogen.

2.4.5 Transiente Expression von Alkohol-Acetyltransferasen in *Nicotiana benthamiana*

Für die Vorbereitung der transienten Expression wurden 10 ml LB-Medium (Kan/Gent/Rif) mit einer positiv transformierte Kolonie von *A. tumefaciens* (2.2.5) angeimpft und über Nacht bei 28°C mit 220 rpm geschüttelt. 1 ml der Kultur wurde verwendet um erneut 10 ml LB-Medium (Kan/Gent/Rif) zu beimpfen. Anschließend wuchs diese Kultur ebenfalls über Nacht schüttelnd bei 28°C und 220 rpm. Die Bakterien wurden bei 4000 x g für 10 min zentrifugiert und das Pellet in Infiltrationspuffer resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde anschließend bis zu einer OD_{600} von 0,5 mit Infiltrationspuffer verdünnt und für 3 h bei RT

leicht geschüttelt. Eine Stunde vor Infiltration der Agrobakterien, wurden die Tabakpflanzen (*N. benthamiana*) mit Wasser besprüht, um die Blätter aufnahmefähiger zu machen.

Jedes zu infiltrierende Gen wurde mit einem „silencing supressor protein“ P19 (Qiu *et al.*, 2002) zusammen infiltriert, wobei die jeweiligen Bakterienlösungen direkt vor der Infiltration 1:1 vermischt wurden. Das Injizieren erfolgte mit Hilfe von 1 ml Omnifix®-F Spritzen ohne Kanüle (Braun, Melsungen, Deutschland). Um ein Blatt vollständig zu infiltrieren, wurden ca. 2 – 3 ml benötigt. Nach der Infiltration wurden die Pflanzen unter den gleichen Bedingungen wie vor der Behandlung (2.1.3) für 4 Tage weiter kultiviert. Im Anschluss wurden die Blätter geerntet.

Infiltrationspuffer:	10 mM	MES (pH 5.6)
	10 mM	MgCl ₂
	100 µM	Acetosyringon

2.4.6 SDS-PAGE

Die aufgereinigten Proteine (2.4.3) wurden unter denaturierenden Bedingungen mit Natriumdodecylsulfat („sodium dodecyl sulfate“, SDS) mittels Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) aufgetrennt. Die Herstellung der Gele erfolgte nach Laemmli (1970). Die Proteinproben wurden mit 5x Probenpuffer entsprechend vermischt, für 15 min bei 95°C inkubiert, anschließend bei 11400 x g zentrifugiert und auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine wurde bei 25 mA pro Gel durchgeführt und das Gel direkt im Anschluss über Nacht mit Färbelösung gefärbt. Die Entfärbung erfolgte für mehrere Stunden mittels Entfärbelösung. Um die Größe der Proteine abzuschätzen wurden die Banden mit denen des Proteinmarkers „PageRuler Plus Prestained Protein Ladder“ (Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland) verglichen.

Trenngel (12,5 %):	12,5 %	Acrylamid
	0,375 M	Tris HCl (pH 8.8)
	0,1 %	SDS [w/v]
	0,1 %	APS [w/v]
	0,15%	TEMED [v/v]

Sammelgel (5%):	5 %	Acryamid
	0,125 M	Tris HCl (pH 6.8)
	0,1 %	SDS [w/v]
	0,1 %	APS [w/v]
	0,2 %	TEMED
10 x SDS Puffer:	250 mM	Tris
	1,9 M	Glycin
	1 %	SDS [w/v]
5 x SDS Ladepuffer:	0,125 M	Tris HCl (pH 6.8)
	2 %	SDS [w/v]
	50 %	Glycerol [v/v]
	0,001 %	Bromphenolblau
	5 %	β -Mercaptoethanol
Färbelösung:	50 %	Methanol
	10 %	Essigsäure
	0,25 %	Coomassie Brilliant Blue R250® [g/v] (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Entfärbelösung:	40 %	Ethanol
	10 %	Essigsäure

2.5 Chromatographische Methoden

2.5.1 Aktivitätsbestimmung von rekombinanten Proteinen

Für die qualitative Auswertung der Enzymaktivität von TvAATs wurden 10 μ l Proteinrohextrakt (2.4.2) mit 500 μ M Substrat (Sigma-Aldrich, Stocklösung: 25 mM in Methanol), 100 – 160 μ M Acetyl-CoA (Sigma-Aldrich) und Assaypuffer 1 in einem Endvolumen von 50 μ l für 45 min bei 30°C inkubiert und die volatilen Produkte mittels Polydimethylsiloxan (PDMS) - SPME Faser (Supelco, Bellefonte, USA) extrahiert. Um die quantitative Bestimmung der Enzymaktivität durchzuführen, wurden 0,3 – 4 μ g hochreines Protein (2.4.3) mit 500 μ M Substrat (Sigma-Aldrich, Stocklösung: 25 mM in Methanol oder

DMSO), 100 μ M Acetyl CoA und Assaypuffer 1 zu einem Endvolumen von 100 μ l vermischt und sofort mit 100 μ l Hexan (mit 10 μ g/ml Nonylacetat als interner Standard) überschichtet. Die Inkubationszeit betrug je nach Enzym und Zielsetzung 2 – 30 min bei 30°C.

Transient exprimierte TvAATs in *N. benthamiana* wurden ebenfalls für Enzymassays eingesetzt. Hierfür wurden die infiltrierte Tabakblätter geerntet und pro Blatt eine Blattscheibe (\varnothing 35 mm) ausgestanzt und in eine Petrischale, gefüllt mit Assaypuffer 2, gegeben. Mittels Vakuumpumpe wurde der Assaypuffer 2 in die Blattscheibe infiltrierte und diese anschließend für 45 min bei 30°C leicht schütteln inkubiert. Das Blattmaterial wurde nach dem Assay trocken getupft und in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Extraktion bei -80°C gelagert.

Abweichungen der Inkubationszeit, des pH-Wertes oder der Substrat- bzw. Cosubstratkonzentration wurde im Ergebnisteil (Kapitel 3) entsprechend gekennzeichnet.

Assaypuffer 1:	50 mM	Tris-HCl (pH 7.0)
	10 %	Glycerol
	1 mM	DTT
Assaypuffer 2:	50 mM	Tris-HCl (pH 8.0)
	10 %	Glycerol
	1 mM	DTT
	500 μ M	Monoterpensubstrat (Geraniol, α -Terpineol oder Linalool, Stocklösung: 100 mM in DMSO)

2.5.2 Terpenextraktion von Thymianblätter

Junge Blätter des jeweiligen Chemotyps von *T. vulgaris* wurden in flüssigem Stickstoff mittels Mörser und Stößel zu einem feinen Puder zerrieben. Für eine Extraktion in Hexan wurden 3 – 25 mg Blattmaterial abgewogen und mit 200 – 1000 μ l Hexan (mit 10 μ g/ml Nonylacetat als interner Standard) versetzt. Die Extraktion erfolgte für 1 h bei RT. Anschließend wurden alle Blattbestandteile vom Hexan mittels Zentrifugation bei 120 x g und Raumtemperatur getrennt und das Hexan abgenommen. Alternativ wurden die Blattvolatile mit Hilfe einer PDMS - SPME Faser (Supelco, Bellefonte, USA) extrahiert. Dafür wurde die Faser für ca. 3 s über das gemörserte Blattmaterial exponiert.

2.5.3 Terpenextraktion von Thymiannektar und -pollen

Für die Extraktion von Nektar wurde eine Probenmenge von 5 bis 10 µl mit 20 µl Hexan (mit 10 µg/ml Nonylacetat als interner Standard) in einem Glas-Mikrogefäß vermischt und für 2 min bei Raumtemperatur gevortext. Anschließend wurde der Extrakt in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und das Hexan von der festen Wasserphase des Nektars getrennt. Die meisten Chemotypen (G, A, U, C und T) besaßen eine genügend große Nektarmenge, um 2 – 3 Replikate pro Chemotyp zu extrahieren. Für den L-Chemotyp konnte nur eine einzelne Extraktion durchgeführt werden. Für die Extraktion von Pollen wurden 16 – 18 mg mit 200 µl Hexan (mit 10 µg/ml Nonylacetat als interner Standard) gemischt und für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde das Hexan mittels Zentrifugation bei 120 x g für 1 min vom Pollen getrennt.

Alternativ wurde für die qualitative Analyse 6 – 10 µl Nektar bzw. 16 – 20 mg Pollen für 1 h bei 40°C mittels PDMS - SPME Faser (Supelco, Bellefonte, USA) extrahiert.

2.5.4 Terpenextraktion von infiltrierten Tabakblättern

Für die Extraktion der gebildeten Terpenprodukte wurden die tiefgefrorenen Tabakblattscheiben unter flüssigem Stickstoff gemörsert, mit 600 µl Hexan (mit 10 µg/ml Nonylacetat als interner Standard) versetzt und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Das Hexan wurde durch ein Zentrifugationsschritt bei 1000 x g für 30 s vom Blattmaterial getrennt, abgenommen und für weitere Analysen verwendet.

2.5.5 Gaschromatographische Trennung mittels GC/MS und GC/FID

Die Produkte der Enzymassays sowie die volatilen Substanzen der Extraktionen wurden mittels eines Gaschromatographen (GC-2010, Shimadzu, Kyoto, Japan), gekoppelt mit einem Massenspektrometer (MS) (GCMS-QP 2010 Plus, Shimadzu, Kyoto, Japan), aufgetrennt und identifiziert. 1 – 2 µl Hexan wurde bei einer Injektionstemperatur von 220°C manuell oder mittels Autosampler im „splitless mode“ injiziert. Alternativ wurde eine PDMS-SPME Faser direkt in den Injektor eingeführt. Die Trennung der volatilen Substanzen erfolgte über eine EC™-5 ((5% Phenyl) - 95% Methylpolysiloxan Säule, 30 m Länge, 0,25 mm Innendurchmesser, 0,25 µm Filmdicke) (Grace, Columbia, USA) unter Verwendung eines der in Tab. 2.6 aufgelisteten Temperatur-Programme. Als Trägergas diente Wasserstoff mit einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min. Die Identifizierung der Terpenprodukte erfolgte mit Hilfe der Shimadzu Software „GCMS Postrun Analysis“ mit authentischen Standards oder der

Massenspektren-Bibliotheken „Adams“ (Shimadzu, 2007, Kyoto, Japan) und „Wiley 8“ (Hewlett&Packard, Palo Alto, USA).

Für quantitative Analysen wurden die volatilen Substanzen der Hexanextrakte mit Hilfe eines Gaschromatographen (GC-2010, Shimadzu, Kyoto, Japan), der an einen Flammenionisationsdetektor (FID, Detektortemperatur: 250 °C) (FID-2010 Plus, Shimadzu, Kyoto, Japan) gekoppelt war, aufgetrennt und analysiert. Hierfür wurde das gleiche Temperaturprogramm wie für die MS verwendet. Die Quantifizierung des jeweiligen Terpens erfolgte durch Integration des entsprechenden Peaks mit Hilfe der Shimadzu Software „GC Postrun Analysis“. Die errechneten Peakflächen wurden dann mit der Fläche des internen Standards bekannter Konzentration verglichen.

Tab. 2.6: Für die Gaschromatographie verwendeten Temperatur-Programme.

Temperaturphase	SPME-Extraktion	Hexan-Extraktion
Phase 1	50°C für 3 min	40°C für 3 min
Phase 2 (erste Rampe)	7°C/min bis 150°C	6°C/min bis 180°C
Phase 3 (zweite Rampe)	100°C/min bis 300°C	100°C/min bis 300°C
Phase 4	300°C für 2 min	300°C für 2 min

2.5.6 Sensitivität der GC/FID Methode

Im Fall der Hexanextraktion des Thymiannektars und der anschließenden Quantifizierung der volatilen Bestandteile, ergaben sich zum Teil sehr geringe Konzentrationen. Eine Verifizierung der GC/FID-Methode war notwendig, um diese Werte exakt auszuwerten zu können. Es wurde die Genauigkeit der Methode, die Substanzverwertung („substance recovery“), das Detektionsminimum (LOD, „limit of detektion“) und das Quantifizierungsminimum (LOQ, „limit of quantification“) für Geraniol exemplarisch für alle quantifizierten Monoterpene bestimmt, indem eine Verdünnungsreihe von Geraniol (in Hexan) mittels GC/FID quantifiziert wurde (1000, 750, 500, 250, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.563, 0.781, 0.391, 0.195, 0.098, 0.049 ppm). Für die Bestimmung der LOD und LOQ (Berechnung nach Shrivastava & Gupta (2011)) wurde das Hintergrundrauschen (Amplitude der Basislinie) für die letzten 7 Verdünnungsstufen gemessen (hohe Korrelation von Substratkonzentration und normalisierter Peakhöhe, $r = 0,9998$).

3 Ergebnisse

3.1 Acetylierte Monoterpene in *T. vulgaris*

3.1.1 Das ätherische Öl von *T. vulgaris* enthält abhängig vom Chemotyp verschiedene acetylierte Monoterpene

Echter Thymian (*T. vulgaris*) aus Frankreich weist je nach Standort sechs verschiedene Terpenzusammensetzungen in seinem ätherischen Öl auf, weshalb diese Variationen auch als Chemotypen bezeichnet werden (Granger *et al.*, 1973). Die Benennung des Chemotyps richtet sich nach dem jeweiligen Hauptmonoterpen, welches im entsprechenden ätherischen Öl dominiert. Im G-Typ ist Geraniol das Hauptmonoterpen, im A-Typ α -Terpineol, im U-Typ *trans*-Sabinenhydrat und im L-Typ Linalool. Thymol und Carvacrol bilden jeweils das Hauptmonoterpen des T- bzw. C-Typs (Granger *et al.*, 1973).

Neben den Hauptmonoterpenen bilden einige Chemotypen zusätzlich noch acetylierte Formen des Hauptmonoterpens, in ebenfalls bedeutend großer Menge. So konnte im ätherischen Öl des G-Typs neben Geraniol auch Geranylacetat, im L-Typ auch Linalylacetat und im A-Typ α -Terpinylacetat nachgewiesen werden (Abb. 3.1). Das ätherische Öl aller Chemotypen, welche neben dem Hauptmonoterpen noch dessen Acetat bildet, wurde qualitativ analysiert, um das Verhältnis beider Substanzen zueinander chromatographisch darzustellen (Abb. 3.1). Weiterhin wurde auch das ätherische Öl der Chemotypen analysiert, die keine Acetate bilden (Abb. 3.2). Die Hexanextraktion der Blattvolatilen wurde wie in Kapitel 2.5.2 beschrieben, durchgeführt und die Proben der entsprechenden Chemotypen mittels GC/MS aufgetrennt und analysiert (2.5.5). In Abb. 3.1-1 ist für die drei Chemotypen G, L und A ein jeweils typisches Chromatogramm dargestellt. Der G-Typ enthält zwei dominante Monoterpene, das Geraniol und das Geranylacetat (Abb. 3.1). Im A-Typ sind ebenfalls zwei Hauptterpene (α -Terpineol und α -Terpinylacetat) sichtbar, wenngleich für das acetylierte Monoterpen eine deutlich größere Signalstärke zu verzeichnen ist (Abb. 3.1). Auch Im L-Typ wurden zwei vorherrschende Monoterpene detektiert, das Linalool und das Linalylacetat (Abb. 3.1). Im Vergleich zum A-Typ ist das Verhältnis der Signalstärke jedoch konträr und Linalool deutlich intensiver detektierbar als sein Acetat.

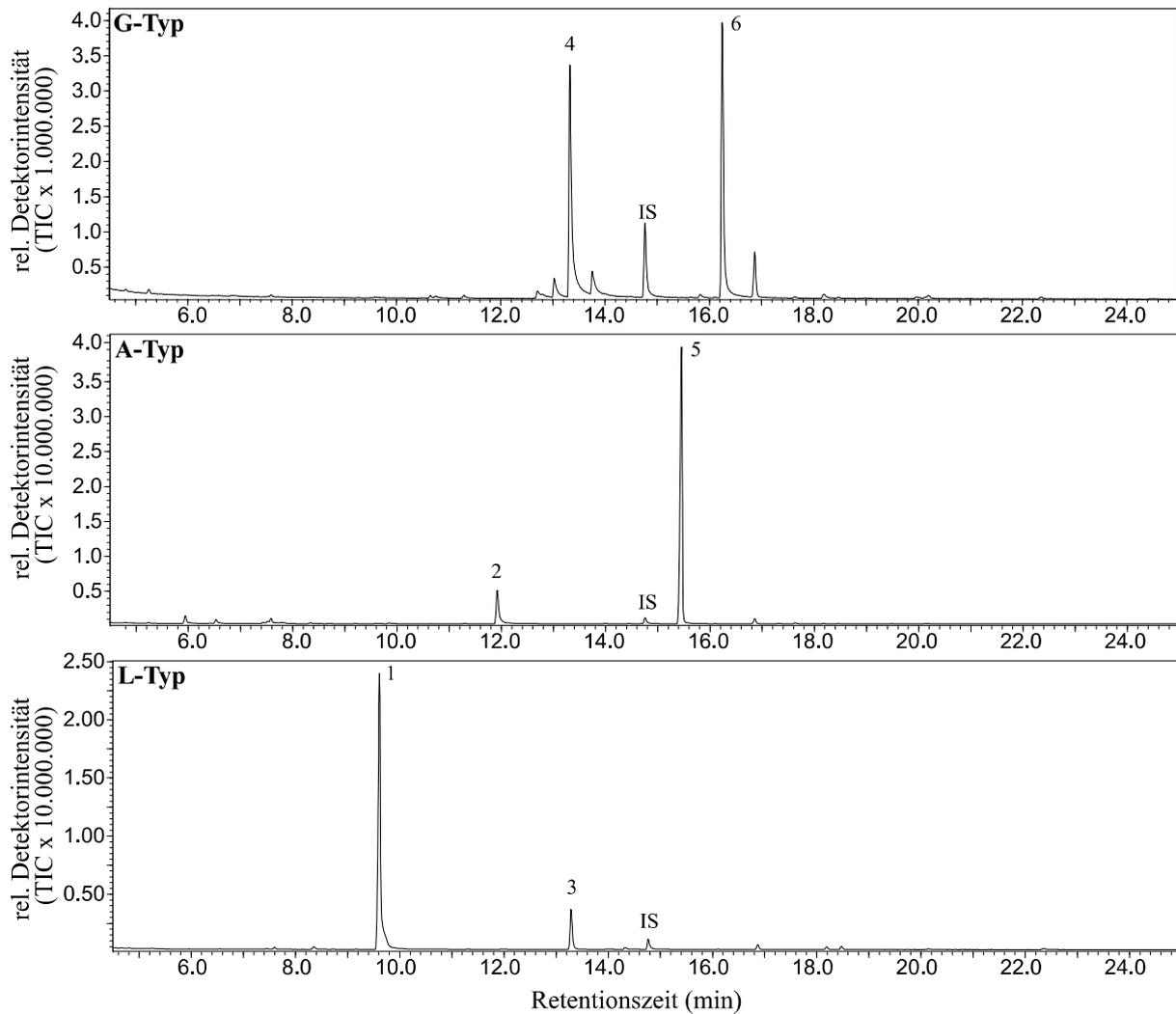


Abb. 3.1: Gaschromatografische Analyse der Blatt-Hexanextrakte der drei Acetate bildenden Chemotypen des *T. vulgaris* (G-, A- und L-Typ). Es wurden 3-25 mg Blattmaterial mit 200-1000 μ l Hexan (mit internem Standard) extrahiert und 1 μ l des Extraktes mittels GC/MS analysiert. Folgende Hauptmonoterpene wurden im ätherischen Öl detektiert: 1: Linalool, 2: α -Terpineol, 3: Linalylacetat, 4: Geraniol, 5: Terpinylacetat, 6: Geranylacetat, IS: Interner Standard (Nonylacetat, 10 ng/ μ l)

Analysiert man die Chromatogramme der GC/MS-Analyse semiquantitativ, indem man die Peakflächen integriert, wird deutlich, dass die beiden Hauptmonoterpene des jeweiligen Chemotyps zusammengenommen immer mindestens über 66 % der insgesamt detektierten Volatile ausmacht. Geraniol und Geranylacetat ergeben zusammen 74,0 % (\pm 8,2; n=3) aller Volatile, für α -Terpineol und sein entsprechendes Acetat sind es 88,2 % (\pm 0,5; n=3) und für die zwei Hauptmonoterpene des L-Typs (Linalool, Linalylacetat) sind es 91,9 % (\pm 1,2; n=3). Die Chemotypen U, C und T enthalten im ätherischen Öl keine detektierbaren Mengen an acetylierten Monoterpenen, jedoch das für den jeweiligen Chemotyp typische Hauptmonoterpene (Abb. 3.2). Alle sechs Chemotypen bilden neben den Hauptmonoterpenen

und deren Acetate weitere Terpene, welche ebenfalls im ätherischen Öl nachgewiesen werden können (Schimmel, 2014), was auch in Abb. 3.1 und Abb. 3.2 durch kleinere nicht beschriftete Peaks ersichtlich wurde. Da in der Dissertation von Frau Schimmel (2014) bereits eine komplette Analyse des ätherischen Öls aller sechs Chemotypen durchgeführt wurde und somit eine Auflistung aller analysierbarer Substanzen bereits existiert, sei an dieser Stelle auf diese Arbeit verwiesen.

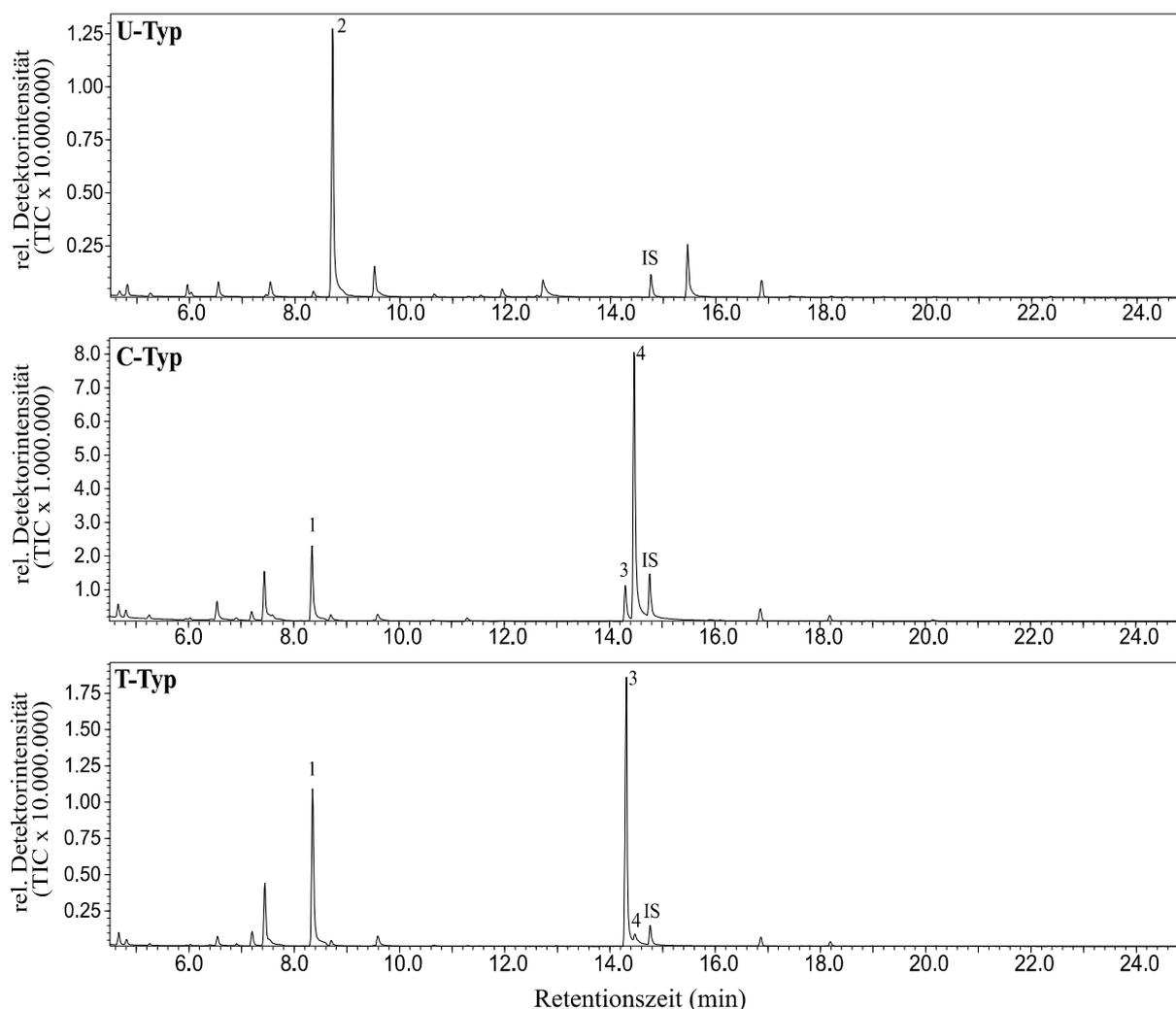


Abb. 3.2: Gaschromatografische Analyse der Blatt-Hexanextrakte der drei Chemotypen des *T. vulgaris*, welche keine Acetate bildenden (U-, C- und T-Typ). Es wurden 3-25 mg Blattmaterial mit 200-1000 μl Hexan (mit internem Standard) extrahiert und 1 μl des Extraktes mittels GC/MS analysiert. Folgende Hauptmonoterpene wurden im ätherischen Öl detektiert: 1: γ -Terpinen, 2: *trans*-Sabinenhydrat, 3: Thymol, 4: Carvacrol, IS: Interner Standard (Nonylacetat, 10 ng/ μl)

3.1.2 Die Hauptmonoterpene und ihre jeweiligen Acetate sind in unterschiedlichen Verhältnissen im ätherischen Öl vertreten

Die in Kapitel 3.1.1 dargestellten Chromatogramme (Abb. 3.1, Abb. 3.2) können nur einen qualitativen Überblick über das Terpenspektrum des jeweiligen Chemotyps geben. Um eine qualitative Aussage bezüglich der Terpenkonzentrationen zu treffen, wurden die Proben parallel mittels GC/FID gemessen und analysiert (2.5.5) und mit Hilfe des internen Standards (Nonylacetat) die Konzentrationen berechnet (Tab. 3.1). Geraniol und Geranylacetat sind mit 4873,8 ppm bzw. 3855,8 ppm in etwa zu gleichen Anteilen im ätherischen Öl des Geraniol-Chemotyps vorhanden. Das Verhältnis entspricht 1,3:1, während im A-Typ das Verhältnis von α -Terpineol und Terpinylacetat mit 1:4,7 deutlich auf die Seite des Acetats verschoben ist. Linalool ist mit 18067,5 ppm das höchst konzentrierte Terpen aller gemessenen Substanzen der Chemotypen G, A und L, die Acetate bilden können. Das Verhältnis von Linalool zu Linalylacetat (2195,5 ppm) liegt bei 8,2:1 und bestätigt das schon in Abb. 3.1 hindeutende Verhältnis der beiden Terpene.

Tab. 3.1: Konzentration der Hauptmonoterpene in den Chemotypen G, A und L von *T. vulgaris*. Es wurden 3-25 mg Blattmaterial mit 200-1000 μ l Hexan (mit Nonylacetat als IS, 10 ng/ μ l) inkubiert und 1 μ l des Extraktes mittels GC/FID aufgetrennt und analysiert. n=3

Chemotyp	Monoterpen	Konzentration im Blatt (ppm) \pm Stabw.
G-Typ	Geraniol	4873,8 \pm 685,1
G-Typ	Geranylacetat	3855,8 \pm 259,2
A-Typ	α -Terpineol	3765,2 \pm 544,5
A-Typ	α -Terpinylacetat	17624,2 \pm 1503,9
L-Typ	Linalool	18067,5 \pm 2919,1
L-Typ	Linalylacetat	2195,5 \pm 371,8

3.2 Identifizierung von Alkohol-Acetyltransferasen aus *T. vulgaris*

3.2.1 Es wurden sieben BAHD-ähnliche Sequenzen identifiziert

Im Gegensatz zu vielen anderen pflanzlichen Organismen wie z.B. Mais, Tomate oder Gerste (<http://www.gramene.org/>) ist für Thymian noch keine komplette genomische Sequenz vorhanden, was das Suchen, Identifizieren und Analysieren von Genen deutlich erschwert. Um dennoch eine unkomplizierte Identifizierung von Genen zu ermöglichen, wurde das Transkriptom der Chemotypen G, C und T von *T. vulgaris* sequenziert (2.3.15) und die erhaltenen Daten über den Server (<http://bioinform.at:63703/>) in einer Form bereit gestellt, mit der gezielt Referenzgene eingesetzt werden können, um innerhalb dieser RNASeq-Datenbank ähnliche Sequenzen zu identifizieren (Priyam *et al.*, 2015).

Für die Suche nach potentiellen Genen, die für die Acetylierung der Monoterpene in *T. vulgaris* zuständig sind, war es demnach essentiell, relevante Referenzgene zu identifizieren. Wie bereits in Kapitel 1.4.1 beschrieben, sind der Familie der BAHD-Acyltransferasen ebenfalls Enzyme zugehörig, die als Akzeptormolekül Terpenalkohole nutzen (D'Auria, 2006). Insbesondere die Acyltransferase RhAAT1, ein Mitglied der Klade III, rückte in den Fokus, da sie neben anderen Substraten auch Geraniol in Kombination mit Acetyl CoA zu Geranylacetat umsetzt (D'Auria, 2006), was ebenfalls im Geraniol-Typ von *T. vulgaris* zu finden ist. Mit Hilfe dieser Referenzsequenz konnten vier potenzielle Acetyltransferasen in *T. vulgaris* identifiziert werden, *tvaat1* – *tvaat4* (Tab. 3.2). Des Weiteren wurde das Enzym LiAAT-3 aus *Lavandula x intermedia* (Sarker & Mahmoud, 2015) für die Suche verwendet, da Thymian und Lavendel der gleichen Pflanzenfamilie (Lamiaceae) angehören. Die Gene *tvaat5*, *tvaat6* und *tvaat7* wurden mittels dieser Sequenz gefunden (Tab. 3.2). Die cDNA-Sequenzen beider Referenzgene sind in Kapitel 6 (Anhang) aufgeführt.

Tab. 3.2: Auflistung aller identifizierten Sequenzen putativer Alkohol-Acetyltransferasen aus *T. vulgaris*. n.a.: nicht amplifiziert

AAT-Gen (<i>T. vulgaris</i>)	ORF (bp)	Protein (kDa)	Chemotyp	Verwendetes Referenzgen
<i>tvaat1</i>	1224	45,38	Geraniol-Typ	rhaat1 (<i>Rosa</i> hybrid cultivar)
<i>tvaat2</i>	1272	46,98	Linalool-Typ	rhaat1 (<i>Rosa</i> hybrid cultivar)
<i>tvaat3</i>	1263	45,61	Linalool-Typ	rhaat1 (<i>Rosa</i> hybrid cultivar)
<i>tvaat4</i>	1251	46,21	Carvacrol-Typ	rhaat1 (<i>Rosa</i> hybrid cultivar)
<i>tvaat5</i>	1344	49,42	Linalool-Typ	aat3 (<i>Lavandula x intermedia</i>)
<i>tvaat6</i>	1329	49,23	α -Terpineol-Typ	aat3 (<i>Lavandula x intermedia</i>)
<i>tvaat7</i>	1365	49,54	n.a.	aat3 (<i>Lavandula x intermedia</i>)

Alle im Rahmen dieser Arbeit in *T. vulgaris* identifizierten Gene wurden in Tab. 3.2 aufgelistet. Die Länge der Gene von 1224 bp (*tvaat1*) bis 1365 bp (*tvaat7*) sowie die putativen molekularen Massen von 45,38 kDa (*tvaat1*) bis 49,54 kDa (*tvaat7*) sind denen der BAHD-Enzymfamilie sehr ähnlich. Alle Mitglieder dieser Familie weisen eine Sequenzlänge von ungefähr 1335 bp und eine molekulare Masse von 48- 55 kDa auf (D’Auria, 2006). Neben der Bezeichnung, Sequenzlänge (in bp) und Größe (in kDa) des Gens ist der Chemotyp aufgeführt, aus dem die Sequenz isoliert wurde. Die Gensequenz von *tvaat2* konnte nicht komplett sequenziert werden. Es fehlen wenige Basenpaare am Ende des Gens. Das Gen *tvaat7*, dessen Sequenz aus der RNASeq-Datenbank des C-Typs entnommen wurde, konnte aus keinem Chemotyp erfolgreich durch PCR amplifiziert werden. Somit war eine Klonierung, Expression sowie nähere Untersuchung des Gens nicht möglich.

3.2.2 Alle identifizierten TvAATs können der Familie der BAHD-Acyltransferasen zugeordnet werden

Für die sieben putativen Acetyltransferasengene aus *T. vulgaris* sowie das in der Literatur vorhandene Gen *liaat-3* aus *L. x intermedia* wurde eine phylogenetische Analyse auf Basis der Nukleinsäuresequenz durchgeführt (2.3.14) und diese in den schon vorhandenen phylogenetischen Baum der BAHD-Enzymfamilie (D’Auria, 2006) eingegliedert. Der sich daraus ergebene Baum ist in Abb. 3.3 dargestellt. Neben den TvAATs sind hier nur BAHD-Mitglieder integriert, die bereits funktionell analysiert wurden (D’Auria, 2006, Sarker & Mahmoud, 2015). Die BAHD-Acyltransferasen werden in fünf verschiedene Kladen unterteilt, welche sich hinsichtlich des bevorzugten Substrattyps oder der Bedingungen, unter

denen ihre Enzyme aktiv sind, unterscheiden (D'Auria, 2006). Alle *tvaat*-Gene wurden der BAHD-Enzymfamilie zugeordnet. *Tvaat1*, *tvaat2*, *tvaat3* und *tvaat4* konnten in die Klade III eingruppiert werden und bildeten dort eine eigene kleine Untergruppe. Die Aminosäuresequenz von Ss5MaT2, eine Acyltransferase des Feuersalbeis (*S. splendens*), steht diesen vier Sequenzen aus *T. vulgaris* am nächsten. Auch die Referenzsequenz rhaat1 der Gene *tvaat1-tvaat4* aus Rose (*R. hybrid cultivar*) ist in der Klade III zu finden, wenngleich sie weiter von ihnen entfernt eingeordnet wurde. *Tvaat5*, *tvaat6* und *tvaat7* gliedern sich wiederum in Klade V ein und bilden ebenfalls, zusammen mit der Nachbar- und zugleich Referenzsequenz *liaat-3* aus Lavendel (*L x intermedia*) eine kleine separate Untergruppe in dieser Klade. Beide Kladen, Klade III und V, schließen Acyltransferasen ein, die an der Biosynthese von volatilen Estern beteiligt sind (D'Auria, 2006), was ebenfalls für die TvAATs vermutet wird.

Das Alignment der Aminosäuresequenzen aller identifizierten Gene ist in Abb. 3.4 dargestellt und ergibt eine Identität von 8,5 %. Wenn jedoch die Sequenzen, die der Klade III angehören (TvAAT1, TvAAT2, TvAAT3, TvAAT4), ohne die restlichen drei Proteinsequenzen verglichen werden, ergibt sich eine Sequenzidentität von 28,0 %. Die Sequenzübereinstimmung für TvAAT5, TvAAT6 und TvAAT7, welche zur Klade V zählen, ist mit 40,6 % deutlich höher. Ein vollständiger Identitätsabgleich aller Sequenzen untereinander ist im Anhang mittels Tabelle dargestellt (Tab. 6.1). Sehr wahrscheinlich handelt es sich um unterschiedliche Gene und nicht um Allele desselben Gens, da die Sequenzen keine hohe Identität untereinander aufweisen. Alle Proteine besitzen die zwei für die BAHD-Enzymfamilie der pflanzlichen Acyltransferasen typischen konservierten Domänen, das HxxxD- und das DFGWG-Motiv (Abb.3.2-1). Das DFGWG-Motiv weicht jedoch in der Sequenz von TvAAT6 an einer Stelle ab, indem das Phenylalanin (F) durch ein Valin (V) ersetzt ist.

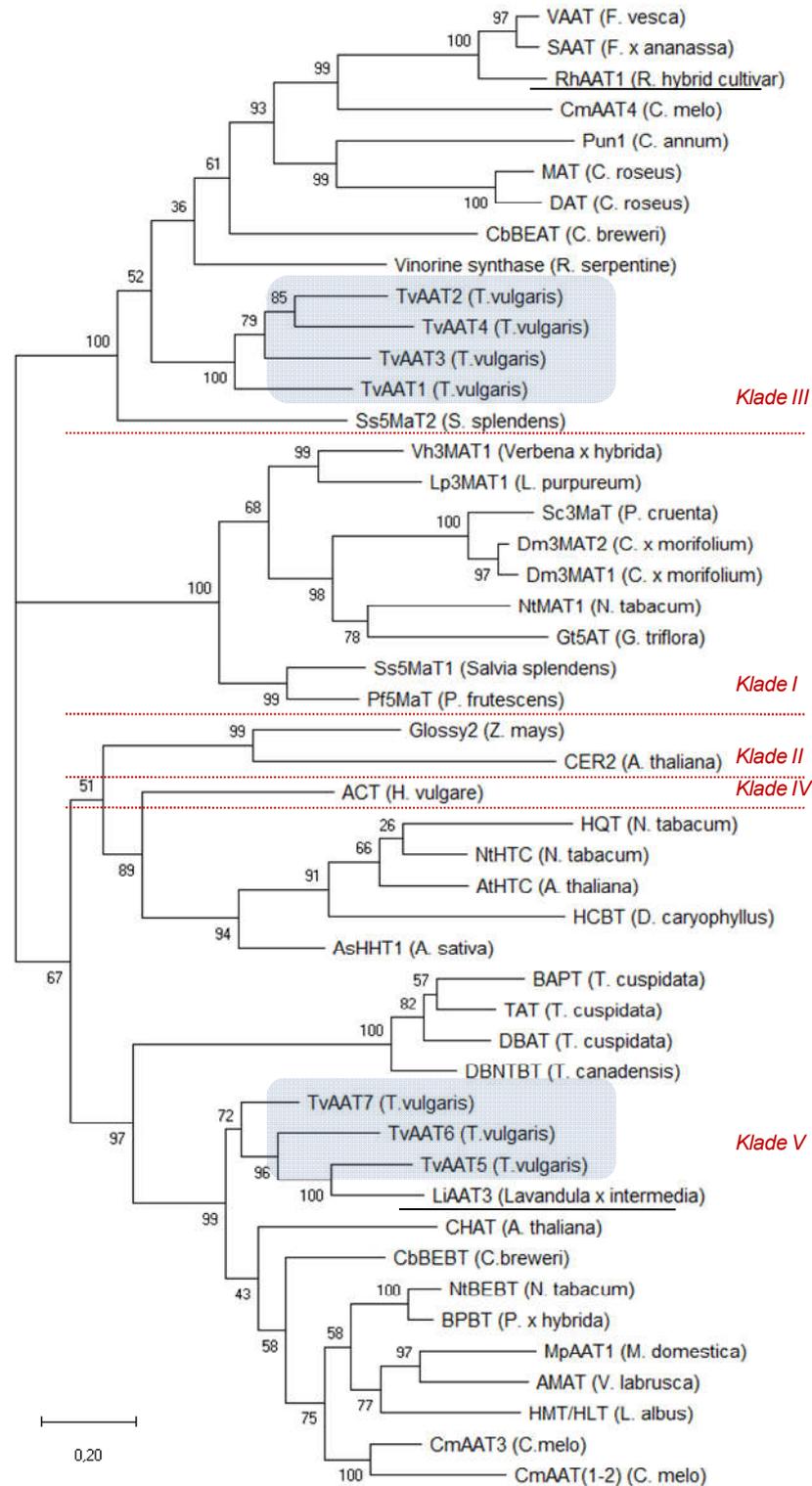


Abb. 3.3: Dendrogramm der *tvaat*-Gene. Die Analyse der Sequenzen wurde mit Hilfe des Programms “MEGA version 6“ durchgeführt (Tamura *et al.*, 2013). Analyse: Phylogenetische Rekonstruktion, Statistische Methode: Maximum Likelihood, Test of Phylogenie: “Bootstrap“-Methode (1000 “Bootstrap“-Wiederholungen), Substitutions Type: Nucleotide, Model/Method: General Time Reversible model, Rates among Sites: Uniform rates, Gaps/Missing Data Treatment: Partial deletion, Site Coverage Cutoff (%): 80

	1				50
TvAAT1	-----MA	GIIIASHTMK	PSSPTPLAKS	KNHKLSFLDQ	TIPPIYLPPII
TvAAT2	-----MA	QIIITNEIVK	PSSPTP-FTS	KTHNLSYLDQ	IAPPIYLPPII
TvAAT3	-----M	AQIIASQIVK	PSTPTP-SST	RNYKLSSIDQ	VAPSIYIPLI
TvAAT4	-----MV	EMIIATHIIK	PSSPTP-PSS	KVHTLSFLDQ	IAPHSYIPIV
TvAAT5	MANKTLGRFK	VSRKSPVLIS	PAEPTPYDFK	FLSDID--CE	KVIRCHLPM
TvAAT6	---MGTATFE	VNRRTAELLR	PAKPTPYELR	PLSDID--DQ	DGLRFQMPVL
TvAAT7	MESAEALTFK	VWRKTPELIA	PAKPTPHEFK	PLSDID--DQ	EGLRFQIPVI
	51				100
TvAAT1	FLYKNDQSIG	REEISRRLKQ	SLSEILTVFY	PLTGVIKQNS	----FVDCGTG
TvAAT2	FFYRNVQSKQ	HEEISRRLKQ	SLSEILTLFY	PLAGTVVQNS	----YVDCND
TvAAT3	FFYESDQSKL	HEQISRCLKK	SLSEALAIFY	PLAGEIEENS	----FVDCND
TvAAT4	FCFENDGQQH	RGEISRRLKQ	SLSEILTVFY	PLAGEVKQNS	----FVDCND
TvAAT5	NFYKRNPME	AKDPVQVVRD	AIKALVFYF	PFAGRLVEYS	GGKLAVECTG
TvAAT6	LIYRNSPME	GKDPARIIRG	AVAKALVFYF	PFAGRLREYA	TRKLAVECTG
TvAAT7	QFYRGSPSAT	EKDPVKVIRD	AIKALVFYF	PFAGRLRERA	ARKLVVECTG
	101				150
TvAAT1	TKGVEMVEAL	VHGPLSQFTE	N--PKIEE-L	DQLLATDPFS	YDENTLLL-I
TvAAT2	-RGADFVEAR	VHARLDQFLQ	N--PKMEEMI	NHLLPTDTSS	YDEAAAQLSV
TvAAT3	-AGVEMVEAR	VGAPLSRFTQ	N--PKMEE-L	KQLLPADTSS	PHGNHAILSL
TvAAT4	-GGVELSEAR	VHARLLQFLK	N--PNLEEDL	KQLLPAAEASS	YRDNAFQLKV
TvAAT5	-EGVVFVEAD	ADVTLLEFGD	DLYPPFPNVE	ELL-PIQSFD	GITNSPIFSF
TvAAT6	-EGVVFVEAD	AGATLQQLGT	LL-PPISNFH	ELLFNVPGSA	GVVNCPMLHI
TvAAT7	-EGVMFIEAD	ADVTLQQFGD	ALQPPFPCL	ELLYDVPGSA	GVLDCPLLLI
	151				200
TvAAT1	KTCFFDCGSF	SIGVSLSHRV	GDVASFSAFM	NAWAATCR--	GEEASS---P
TvAAT2	KASFFDCGGV	SVAVCFPHKI	GDLSSFATFM	NSWTAMCRAA	GEEASRIVRP
TvAAT3	KTSYFDCGGI	AVGVCFSHKV	GDGGSAAAFV	NAWAAACR--	-GEVSKITCP
TvAAT4	RVSYFDGGGV	AVGVCFSHRA	GDLSSLAAFM	NAWAAACR--	GEEVSGLRRP
TvAAT5	QVTRLKCGGF	ILAYIFNHTM	CDGFGIVQFL	NAIGEIARGG	ATPSVLPVWE
TvAAT6	QVTRFLCGGF	VFAFRYNHTM	GDGGGILQFL	TAVGELARGA	ERLSVHPVWE
TvAAT7	QVTRLTCGGF	IFALRLNHTM	CDAGGLVQFM	SAVGEIARGA	DSPSVAPVWE
		Hxx xD			
	201				250
TvAAT1	SFDMALHFPP	RDI-PLGDFG	SNLPTTRE--	--EITTQRLF	FDRDRIEKL
TvAAT2	DFDVARHFPP	RDLPPASGY-	-TLGLTGS--	--GVATKRLV	FDGAKLGKLL
TvAAT3	AFDLALRFPP	RETLSSAA-G	FGLDPVED--	--EIATERFV	FDGKKMEKLL
TvAAT4	SFDLALRFPP	ISSAASAGFG	LCLGVTRE--	--KFLTQRLV	FEREKVEKLL
TvAAT5	RHLLTARGPP	RVSLTHHENE	VAESNNRG--	GGDRKLVRSF	FVSAADISAL
TvAAT6	RHILSARYPP	RVMFAHTEHE	IVHDTKRSTI	PHDRMM-RHF	FFGPTEISAL
TvAAT7	RHLLDARDPP	RVTCTHREYD	DIPDTKGTLI	PLDDMAHRSF	FFGPGEISAL
	251				300
TvAAT1	DEASSDEVKK	PSRVEAVTAF	IWRRFIEANK	SPTTTT----	SFAVSHAVNM
TvAAT2	EELSGDGVVE	PTREEAVSVF	IWRSFIEAYK	SRTKTT---S	SFAASHAVDL
TvAAT3	RAASNGEVKN	PSRVEVVSFA	IWRSFIEAAN	KRNQTAPPPA	SFTAHAHVN
TvAAT4	KKKMK---MN	PSRVEAVSAF	IWRSFIEAYK	STRETPY-S	SFPASHMVG
TvAAT5	RLSLPPHLRS	CSRFEILAGC	VWRCRTIALS	PKPDE-----	EIGFFFVVNF
TvAAT6	HHRLPPHLKN	CSRFEILVAC	MWRCRTLATA	PHPHE-----	EVRLMCMVNV
TvAAT7	RSCLPPHLRG	CSSFELLTAC	LWRCRTIAIA	PEPEE-----	EVRLMCMVNV
	301				350
TvAAT1	RQRAVPPISD	NTFGNCIGFP	TAAISSEEDE	GGI---RVLV	SKLRKAIRGV
TvAAT2	RSRSVPPLPA	HTIGNLFTSA	TAVVTSSGGG	DGVITRGLLV	SKLRAAMREV
TvAAT3	RPRAVPSFPD	QTFGNCVTVA	YAKISSEEDD	GGM---SVLV	SKLRAAIRGV
TvAAT4	RARAAPPLPA	HTFGNCYTFT	TTAVTSSEEE	DDV-----LV	SKLRVAIRGV
TvAAT5	RKSMNPRLPV	GYYGNAIVLA	AAVTTARELL	KNPL--HYAV	ELVRKATAEA
TvAAT6	RKRFNPPLPQ	GYYGNAVIVYP	AAVTTAEKLL	KSPF--HYAV	ELVREAKGRA
TvAAT7	RKRFSPPPLPE	GYYGNAFAFP	VAVAPAGELS	ANPL--PYAL	ELVRKAKADV

	351				400
TvAAT1	DDEYIER--V	VKCEELATNT	LSENGSSRER	NCFFTSWIRF	PLYEVD DFGWG
TvAAT2	EEISYIDNRI	LIKDDDENVR	SSIGGLFKSE	NCYLSSWWRF	PVKEVD DFGWG
TvAAT3	DGEYVNK---	-IVKDEISGD	AAGGEMSAAG	NCVFSSWWRF	PVYD DFGWG
TvAAT4	DSGYF-----	---DGPDKID	VAMNELFQTE	NCIFTSWARA	PVYEV DFGWG
TvAAT5	SQ--VRS---	VEDVMAIRDR	SNIMAAVAE	AYLVSDLTHG	GFEQA DFGWG
TvAAT6	TEEYAKS---	VADLMVTRGR	PDL---TGVR	TYLVSYAN--	GFGEVD DFGWG
TvAAT7	TEEYMRS---	LADLMVTRGR	PHF---AVVR	SYLVSDVTHA	GFGEVD DFGWG
					DFGWG
	401				450
TvAAT1	KPARVCCG--	-TLSFKNGVV	LMSTNPSSDG	IEAWVNVRTD	QFSEL-----
TvAAT2	KPGWVCTA--	-TMPFLNLVL	FMET-PSGDG	IEAWINGP--	DEGFFQIFLD
TvAAT3	KPVWVATA--	-TMPVINTVV	FMAT-PCREG	IEAWVNLSDR	NDDSFETLRA
TvAAT4	RPARVLT--	-GMPYMNLVV	LMDT-PGGDG	LEAWVNVP--	NESFFGFIQA
TvAAT5	TAAYGGMAKG	INWVVPDEAN	WYIPFKNKKG	ESGTVVPICL	PLEPMEVFK
TvAAT6	KPVYGGVARG	GFDSFPRGVS	YMMLIKNDKG	EEGLLVPICL	APKAMDVLVE
TvAAT7	QPAYGGPAKG	GVGAIPGVAS	FYIPFKNSKG	ENGVVVPICL	PANAMEVFK
	451		470		
TvAAT1	-----	-----			
TvAAT2	NYNKL-----	-----			
TvAAT3	KYTNL-----	-----			
TvAAT4	CYNKEFNLSLF	S-----			
TvAAT5	HLRMTITAVR	RSSAL-----			
TvAAT6	ELHKMLLVSG	IASAL-----			
TvAAT7	ELERMLKAGG	NAAVFISSAL			

Abb. 3.4: Aminosäuresequenz aller identifizierten TvAATs aus *T. vulgaris*. Das Alignment wurde mit „Multaline“ (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) durchgeführt. Identische Bereiche der Sequenz wurden grau hinterlegt. Die konservierten Domänen (HxxxD, DFGWG) wurden gelb hinterlegt.

3.3 Transkriptanalyse der Alkohol-Acetyltransferase-Gene aus *T. vulgaris*

3.3.1 Die Alkohol-Acetyltrasferasen sind in den Blättern der sechs Chemotypen exprimiert

Nicht alle sechs der bekannten Chemotypen produzieren in messbaren Mengen Monoterpenacetate. Nur im G-, L- und A-Chemotyp konnten solche modifizierten Substanzen detektiert werden (3.1.1). Mit Hilfe von relativer QRT-PCR wurde untersucht, ob die Expression der *tvaat*-Gene im Blatt spezifisch für die genannten drei Chemotypen erfolgt oder sich das Expressionsmuster anders gestaltet. Die Transkriptanalyse wurde ausschließlich für die Gene der aktiven Enzyme durchgeführt (*tvaat1*, *tvaat3*, *tvaat4*, *tvaat5*) (3.4.1.).

In Abb. 3.5 A-D sind die Transkriptmengen relativ zum Referenzgen *yls8* („yellow leaf specific gene 8“) für alle analysierten Gene in den sechs Chemotypen von *T. vulgaris* dargestellt. Das Referenzgen *yls8* wurde bereits in Salbei getestet und eignete sich ebenfalls für Thymian (Schimmel, 2014).

Aus den QRT-PCR Daten (Abb. 3.5 A-D) ging hervor, dass die getesteten Gene in allen Chemotypen exprimiert wurden und somit keine der Sequenzen Chemotyp-spezifisch war. Wenn die Gene einzeln betrachtet werden, ist erkennbar, dass *tvaat1*, *tvaat4* und *tvaat5* signifikante Unterschiede bezüglich der Expression zwischen den Chemotypen aufzeigten. So war für *tvaat1* (Abb. 3.5 A) im A-Typ eine erhöhte Transkriptmenge gegenüber den anderen Chemotypen, mit Ausnahme des U-Typs, zu verzeichnen. Weiterhin unterschied sich die Expression von *tvaat1* im U-Typ von der im T-Typ. Das Gen wurde im U-Typ signifikant höher exprimiert. Für *tvaat4* (Abb. 3.5 C) zeigte sich im L-Typ, im Vergleich zu den Chemotypen G, U, C und T eine signifikant, bis zu vierfach erhöhte Transkriptmenge des Gens, während es im A-Typ keine Unterschiede sowohl zum L-Typ als auch zu den anderen Chemotypen aufwies. Die Expression des Gens *tvaat5* (Abb. 3.5 D) unterscheidet sich ausschließlich zwischen dem G- und C-Typ, indem sie im letzteren deutlich geringer ausfiel. Die Transkriptmenge von *tvaat5* lag in den anderen Chemotypen (A, U, L und T) zwischen den Werten von G und C. Im Gegensatz zu den anderen drei Genen, war für das Gen *tvaat3* (Abb. 3.5 B) kein signifikanter Unterschied, bezüglich der Expression, in den Chemotypen zu erkennen.

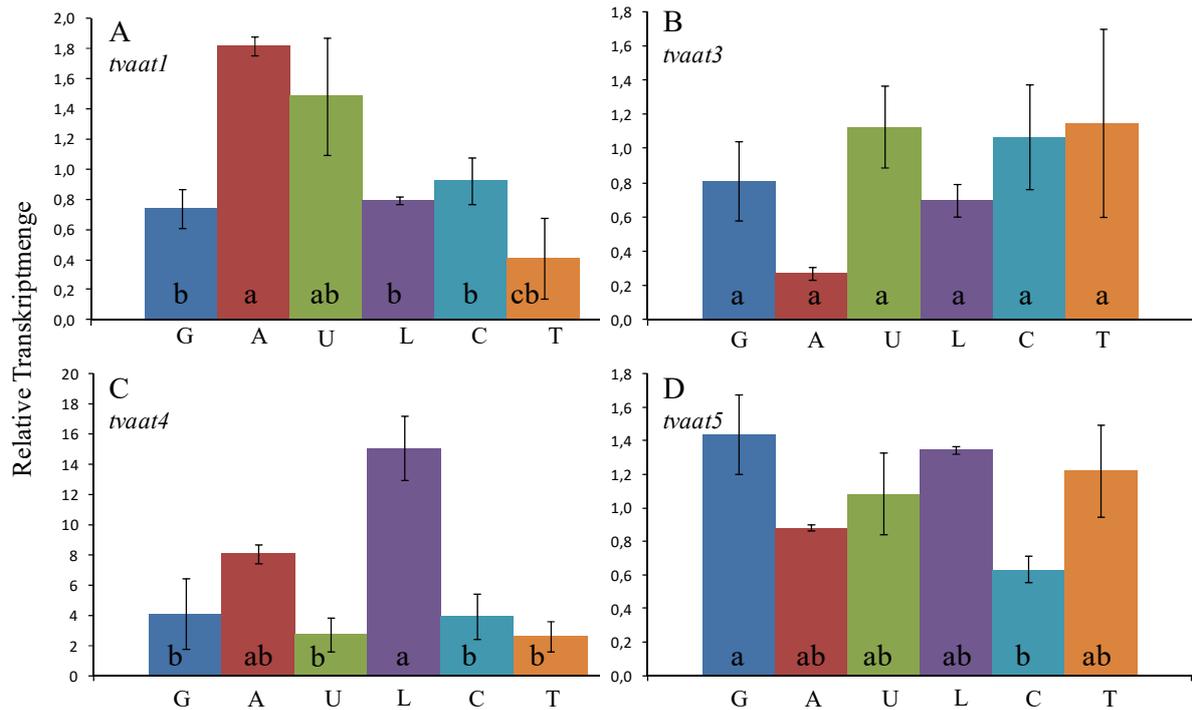


Abb. 3.5: Transkriptanalyse der identifizierten Alkohol-Acetyltransferasene *tvaat1* (A), *tvaat3* (B), *tvaat4* (C) und *tvaat5* (D) in den Blättern aller Chemotypen von *T. vulgaris*. Die Transkriptmengen sind relativ zum Referenzgen *yls8* dargestellt. Das Blattmaterial wurde im August 2017 geerntet. Die dargestellten Daten sind Mittelwerte \pm Standardfehler ($n=3$). Die Mittelwerte wurden mittels One-Way ANOVA und anschließendem Holm-Sidak-Test auf signifikante Unterschiede getestet ($P<0.05$). Signifikante Unterschiede sind durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet.

3.3.2 Die Alkohol-Acyltransferasen sind in den Blättern und Blüten unterschiedlich stark exprimiert

Neben den Unterschieden in der Transkriptmenge zwischen den sechs Chemotypen von *T. vulgaris* wurde untersucht, ob organspezifisch im Blatt bzw. in der Blüte unterschiedliche Expressionsmuster der Gene *tvaat1*, *tvaat3*, *tvaat4* und *tvaat5* vorhanden sind. Vergleichend wurden dafür jeweils Blätter und Blüten der Chemotypen untersucht, die Monoterpenacetate im ätherischen Öl aufweisen (G-, A-, L-Typ). Die relativen Transkriptmengen sind in Abb. 3.6 A-D dargestellt.

Für *tvaat1* (Abb. 3.6 A) wurde deutlich, dass es sowohl im A-Typ als auch im L-Typ im Blatt signifikant höher exprimiert wurde als in der Blüte. Im A-Typ zeigt sich dies mit einer sechs-fach erhöhten Kopienzahl des Transkripts. Im G-Typ war die ermittelte Transkriptmenge in Blatt und Blüte nicht signifikant zu unterscheiden. Die Expression von *tvaat3* (Abb. 3.6 B) war für die untersuchten Chemotypen blattspezifisch, da keine relevanten Mengen des Gens

in der Blüte gefunden wurden. Da der Standardfehler im G-Typ sehr hoch war, konnte allerdings diesbezüglich nur für den A- und den L-Typ eine gesicherte Aussage getroffen werden. Das Gen *tvaat4* (Abb. 3.6 C) zeigt im L-Typ für Blatt und Blüte eine identische Transkriptmenge, während im A-Typ, das Gen im Blatt mit einer doppelten Kopienzahl deutlich höher exprimiert wurde. Für den G-Typ war der Unterschied in der Expression nicht signifikant. Auch für *tvaat5* (Abb. 3.6 D) war der Standardfehler im G-Typ so hoch, dass keine gesicherte Aussage über das Verhältnis der Transkriptmengen getroffen werden konnte. Im L- und A Typ wurde eine erhöhte Expression von *tvaat5* im Blatt deutlich, wengleich im L-Typ der Unterschied geringer ausfiel. Neben dem blattspezifischen Gen *tvaat3* wurde kein Gen identifiziert was exklusiv in der Blüte exprimiert wurde.

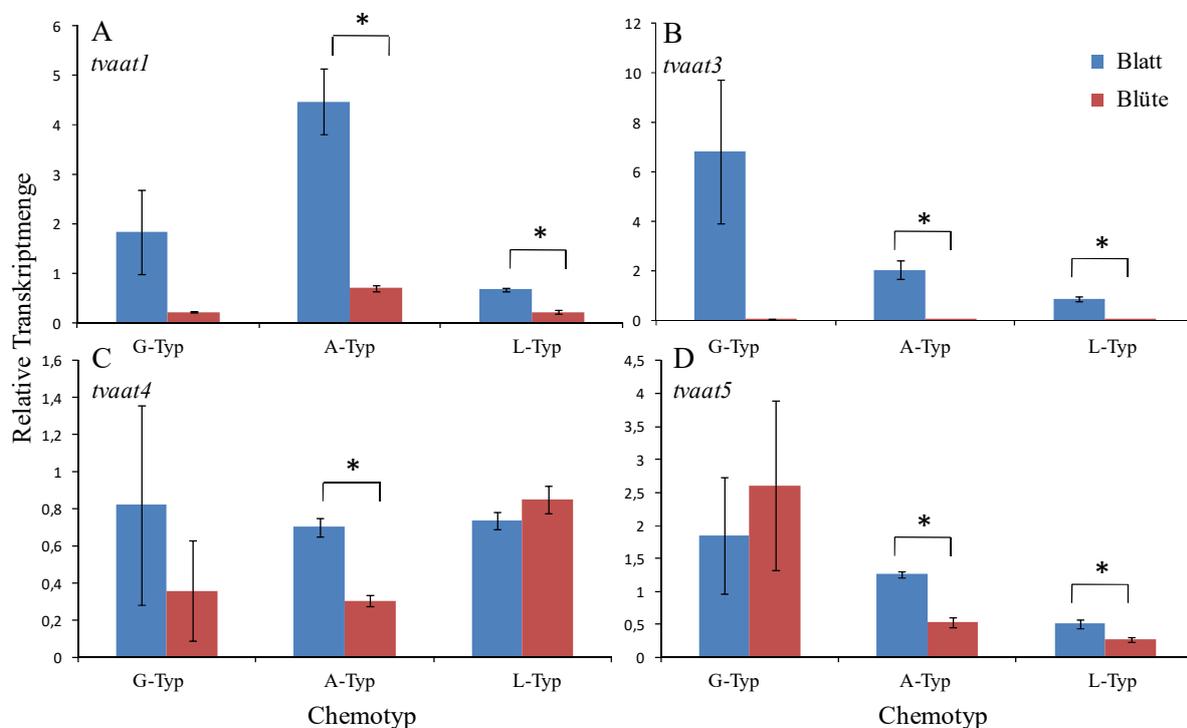


Abb. 3.6: Transkriptanalyse der identifizierten Alkohol-Acyltransferasegene *tvaat1* (A), *tvaat3* (B), *tvaat4* (C) und *tvaat5* (D) im Vergleich zwischen Blatt (blaue Balken) und Blüte (rote Balken) der Chemotypen G, A, und L von *T. vulgaris*. Die Transkriptmengen sind relativ zum Referenzgen *yls8* dargestellt. Das Blatt- bzw. Blütenmaterial wurde im Mai 2017 geerntet. Die dargestellten Daten sind Mittelwerte \pm Standardfehler (n=3). Die Mittelwerte wurden mittels Doppeltem t-Test auf signifikante Unterschiede getestet ($P < 0.05$). Signifikante Unterschiede sind durch Sternchen (*) gekennzeichnet.

3.3.3 Es gibt jahreszeitliche Unterschiede in der Expression der TvAATs in einigen Chemotypen

Unterschiede in den Transkriptmengen in den Blättern der sechs Chemotypen wurden in Kapitel 3.3.1 und der Abb. 3.5 A-D erläutert und dargestellt. Die in Abschnitt 3.3.2 dargestellten Ergebnisse zeigen die Unterschiede der Expression der aktiven *tvaat*-Gene zwischen Blatt und Blüte. Das in diesen Experimenten genutzte Blattmaterial wurde zu unterschiedlichen Jahreszeiten gesammelt. Die Blattproben des Abschnitts 3.3.1 wurden im August gesammelt und die aus Kapitel 3.3.2 während der Blütezeit des Thymians im Mai geerntet. Dadurch wurde deutlich, dass die Jahreszeit einen Einfluß auf die Transkriptmengen in den Blättern haben kann. In Abb. 3.7 A-D sind die Unterschiede bezüglich des Expressionslevels der vier getesteten Gene für die Chemotypen G, A und L im Vergleich zwischen Frühjahr (Mai) und Sommer (August) dargestellt. Die Messdaten für die Bestimmung der Expressionsunterschiede wurden zu unterschiedlichen Zeiten erhoben, jedoch für eine vergleichende Darstellung gemeinsam in einem Diagramm gezeigt. Das Gen *tvaat1* wies in den Chemotypen G und L keine Unterschiede im Expressionswert zwischen Frühjahr und Sommer auf, während der A-Typ das Gen im Frühjahr höher exprimierte (Abb. 3.7 A). Für *tvaat3* waren im August ähnliche Expressionslevel in den drei Chemotypen erkennbar (Abb. 3.7 B). Im Frühjahr jedoch wies der A-Chemotyp im Vergleich zum Sommer eine erhöhte Kopienzahl des Gens auf. Im L- bzw. G-Typ war dahingegen kein signifikanter Unterschied ersichtlich. *Tvaat4* im August deutlich höhere Expressionswerte, zumindest für die Chemotypen A und L. Die hohen Standardfehler für den G- Typ ließen diesbezüglich für *tvaat4* keine präzise Aussage zu (Abb. 3.7 C).

Das Gen *tvaat5* zeigte eine leichte Veränderung im Expressionsmuster, sofern man Blattproben von Mai und August vergleicht (Abb. 3.7 D). Im Mai war die Expression des Gens im A-Typ erhöht gegenüber des Wertes im August, während im L-Typ das Gen, im Vergleich zum Früher, im Sommer höher exprimiert wurde. Im G-Typ lagen die Expressionswerte sowohl im Sommer als auch im Früher gleich hoch und zeigten keinen signifikanten Unterschied.

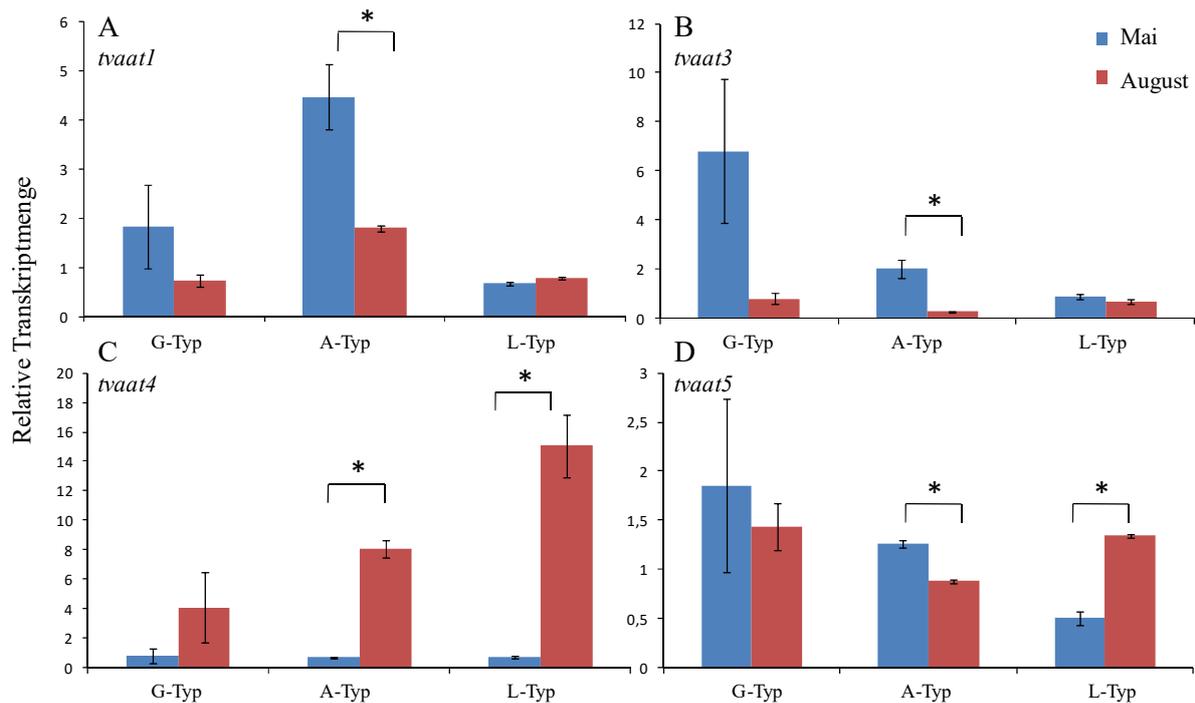


Abb. 3.7: Transkriptanalyse der identifizierten Alkohol-Acetyltransferasegene *tvaat1* (A), *tvaat3* (B), *tvaat4* (C) und *tvaat5* (D) im Vergleich zwischen den verschiedenen Erntezeitpunkten Mai (blaue Balken) und August (rote Balken) im Blatt. Verglichen wurden die Chemotypen G, A, und L von *T. vulgaris*. Die Transkriptmengen sind relativ zum Referenzgen *yls8* dargestellt. Die dargestellten Daten sind Mittelwerte \pm Standardfehler (n=3). Die Mittelwerte wurden mittels Doppeltem t-Test auf signifikante Unterschiede getestet ($P < 0.05$). Signifikante Unterschiede sind durch Sternchen (*) gekennzeichnet.

3.4 Biochemische Charakterisierung der Alkohol-Acetyltransferasen

Alle identifizierten Alkohol-Acetyltransferasen aus *T. vulgaris* wurden auf ihre Aktivität geprüft und anschließend kinetisch charakterisiert. Um die dafür benötigten und jeweils von den Genen *tvaat1*-*tvaat7* kodierten Proteine zu erhalten, wurden die Gene heterolog in *E. coli* exprimiert (2.4.1) und anschließend mittels SDS-PAGE aufgereinigt (2.4.2, 2.4.3, Abb. 6.1.). Die vorangegangene Amplifikation der Gene mittels PCR (2.3.6) war für *tvaat1*-*tvaat6* erfolgreich und ergab, abgesehen von *tvaat2*, Volllängenkonstrukte. Die Sequenz von *tvaat7* konnte dahingegen nicht amplifiziert werden und stand somit nicht für weitere Untersuchungen zur Verfügung.

3.4.1 TvAAT1, TvAAT3, TvAAT4 und TvAAT5 sind aktive Alkohol-Acetyltransferasen

Die sechs amplifizierbaren Gene (*tvaat1* - *tvaat6*) wurden in *E. coli* exprimiert und die jeweiligen Kulturen weiter zu Proteinrohextrakten verarbeitet (2.4.2). Mit diesen Enzymextrakten wurden Aktivitätsassays mit anschließender Analyse mittels GC/MS, wie in Kapitel 2.5.1 beschrieben, durchgeführt. Hierbei wurde zunächst das Monoterpensubstrat Geraniol zusammen mit dem benötigtem Cosubstrat Acetyl CoA getestet. Die Enzyme TvAAT2 und TvAAT6 konnten das Substrat nicht umsetzen. Die anderen vier Enzyme (TvAAT1, TvAAT3, TvAAT4, TvAAT5) zeigten hingegen eine deutliche Aktivität. Sie setzten Geraniol und Acetyl CoA zu Geranylacetat um. In Abb. 3.8 sind für alle Aktivitätsassays die Chromatogramme der GC/MS-Analyse im Vergleich zum Assay mit der Leervektorkontrolle dargestellt. Bei einer Retentionszeit von 11,1 min eluierte das überschüssige Substrat Geraniol und bei 11,4 min das in der Substratlösung mit enthaltene Geranial. Bei 13,6 min war in allen Chromatogrammen der aktiven Enzyme ein klarer Peak zu erkennen, welcher eindeutig mittels GC-Standard als Geranylacetat identifiziert werden konnte. Dieser Peak ist bei der Negativkontrolle nicht vorhanden. Die GC-Analyse und das Massenspektrum aller verwendeten GC-Standards sind im Anhang abgebildet (Abb. 6.2).

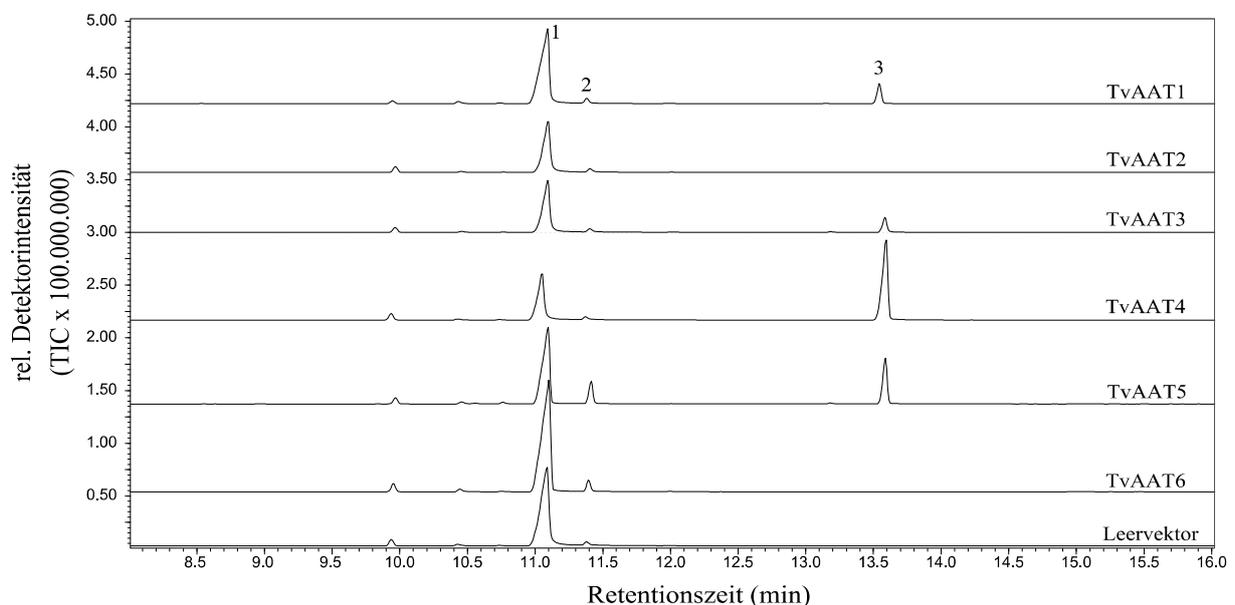


Abb. 3.8: Gaschromatografische Analyse der Aktivitätsassays der Enzyme TvAAT1, TvAAT2, TvAAT3, TvAAT4, TvAAT5 und TvAAT6 mit Geraniol und Acetyl CoA. Der Proteinrohextrakt (10 μ l) wurde jeweils mit 500 μ M Geraniol und 100 μ M Acetyl CoA für 45 min bei 30°C inkubiert und die volatilen Substanzen mittels SPME extrahiert. 1: Geraniol, 2: Geranial, 3: Geranylacetat.

3.4.2 TvAAT3 kann neben Geraniol noch weitere Substrate umsetzen

Für den Test auf Aktivität wurden zusätzlich die Monoterpensubstrate Linalool, α -Terpineol, Thymol und Carvacrol zusammen mit Acetyl CoA als Cosubstrat eingesetzt und getestet. Die Enzyme TvAAT1, TvAAT4 und TvAAT5 konnten, unter den getesteten Bedingungen, diese Substanzen nicht zu ihrem jeweiligen Acetat umsetzen. Auch die Enzyme TvAAT2 und TvAAT6 zeigten in den durchgeführten Tests keinerlei Aktivität (Daten nicht dargestellt). Beide putativen Enzyme konnten, zusammen mit Acetyl CoA, keins der eingesetzten Substrate umsetzen und wurden somit als inaktiv eingestuft.

TvAAT3 hingegen war das einzige Protein, das neben der Umsetzung von Geraniol noch weitere Enzymaktivitäten aufwies. In Abb. 3.9 A-C sind die gebildeten Produkte der Enzymassays mit α -Terpineol (A), Thymol (B) und Carvacrol (C), anhand von GC/MS-Chromatogrammen dargestellt. Unter Verwendung des Substrats α -Terpineol und der anschließenden Auftrennung und Analyse mittels GC/MS wurde deutlich, dass neben α -Terpineol einige Verunreinigungen in der Substratlösung enthalten waren, da weitaus mehr als ein prominenter Peak zu erkennen war (Abb. 3.9 A). Eine der besagten Verunreinigungen konnte als Borneol identifiziert werden, welches zwar nur in Spuren enthalten war aber dennoch als Substrat für TvAAT3 diente und mit Acetyl CoA zu dem entsprechenden Acetat Bornylacetat umgesetzt werden konnte. Das eigentliche Substrat α -Terpineol konnte hingegen nicht zu α -Terpinylacetat umgewandelt werden (Abb. 3.9 A). Neben der Acetylierung von Borneol wies das Enzym TvAAT3 ebenfalls noch deutliche Enzymaktivitäten, bei der Nutzung von Thymol (Abb. 3.9 B) und Carvacrol (Abb. 3.9 C) als Substrat, zusammen mit Acetyl CoA, auf. Thymol wurde dabei zu Thymylacetat und Carvacrol zu Carvacrylacetat umgesetzt. Die Negativkontrollen hingegen zeigten für alle Aktivitätsassays keine Peaks zur Retentionszeit des jeweiligen Produktes (Abb. 3.9 A-C).

Das Monoterpen Linalool konnte, wie auch α -Terpineol, von TvAAT3 nicht umgesetzt werden (Daten nicht dargestellt).

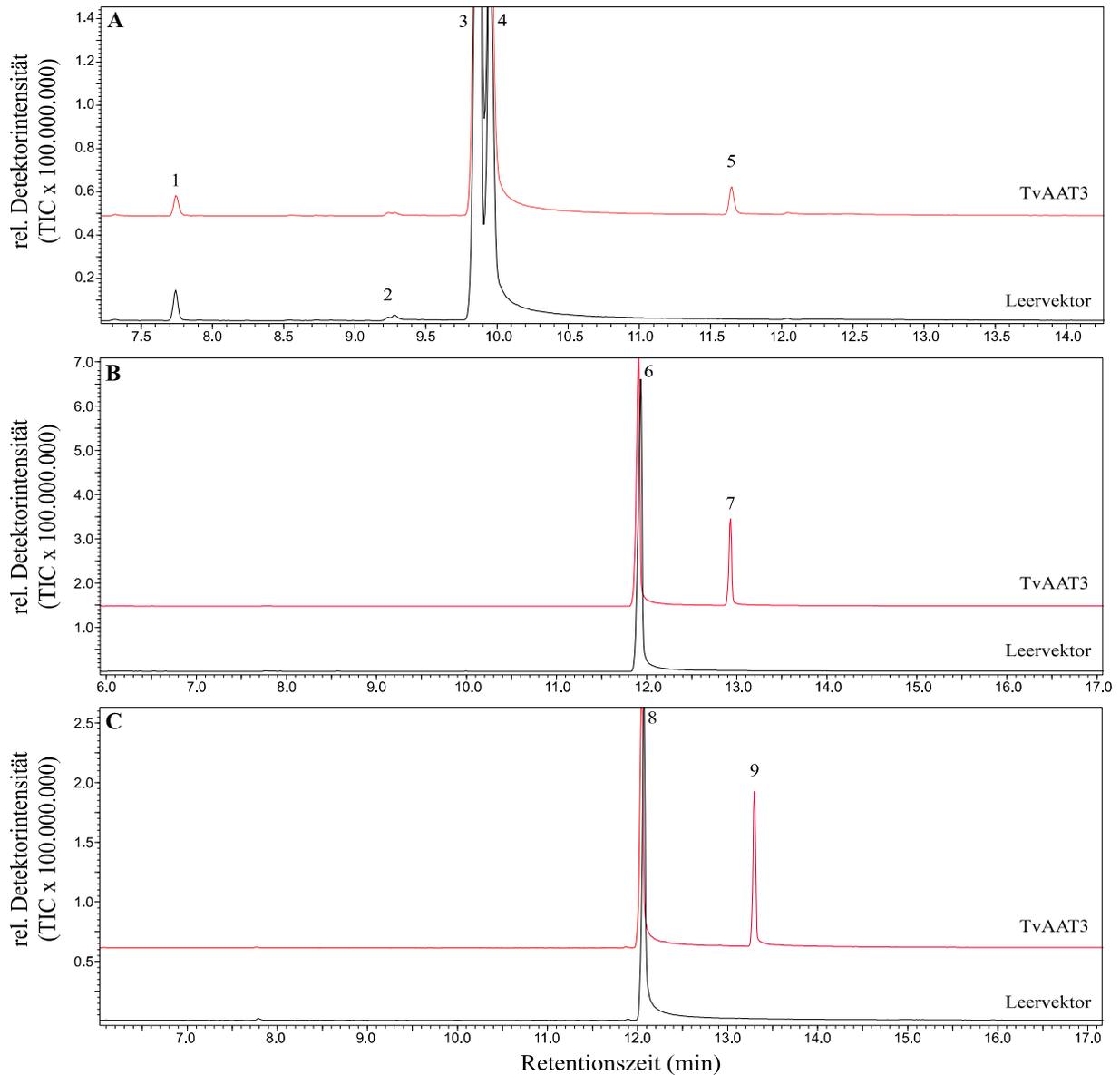


Abb. 3.9: Gaschromatografische Analyse der Aktivitätsassays des Enzyms TvAAT3 mit den Substraten α -Terpineol (A), Thymol (B) und Carvacrol (C) zusammen mit Acetyl CoA. Der Proteinrohextrakt (10 μ l) wurde mit 500 μ M Substrat und 100 μ M Acetyl-CoA für 45 min bei 30°C inkubiert und die volatilen Assayprodukte mittels SPME extrahiert. 1: n-Undecan, 2: Bornylacetat, 3: α -Terpineol, 4: γ -Terpineol, 5: Bornylacetat, 6: Thymol, 7: Thymylacetat, 8: Carvacrol, 9: Carvacrylacetat.

3.4.3 Transiente Expression der TvAATs in *N. benthamiana*

Die Abschnitte 3.4.1 und 3.4.2 beschreiben die Enzymaktivitäten der heterolog in *E. coli* exprimierten TvAAT-Enzyme aus *T. vulgaris*. Im Zuge der kinetischen Charakterisierung der Enzyme wurde neben diesem heterologen Expressionssystem, noch ein zusätzliches Expressionssystem eingesetzt. Die Gene *tvaat1*, *tvaat3*, *tvaat4* und *tvaat5* wurden dafür in *N. benthamiana* transient exprimiert (2.4.5). *N. benthamiana* ist weitaus vergleichbarer mit dem ursprünglichen Organismus *T. vulgaris* als ein Mikroorganismus wie *E. coli*. Es sollte getestet werden, ob das Produkt- bzw. Aktivitätsspektrum der transient in *N. benthamiana* exprimierten TvAATs mit den heterolog exprimierten TvAATs übereinstimmt oder davon abweicht. Nach der Expression der vier Enzyme wurden die enzymatischen Assays, wie in Kapitel 2.5.1 beschrieben, durchgeführt und die aus dem Blättern gewonnenen Terpenextrakte (2.5.4) mittels GC/MS (2.5.5) aufgetrennt und analysiert. In den Aktivitätsassays der transient exprimierten Enzyme wurden jeweils die Substrate Geraniol, Linalool und α -Terpineol eingesetzt. Das Cosubstrat Acetyl CoA wurde nicht zusätzlich zum Assay hinzugegeben, da davon ausgegangen wurde, dass es in ausreichenden Mengen frei in den Zellen des Expressionsorganismus verfügbar war (Tumaney *et al.*, 2004).

Die schon beobachteten Enzymaktivitäten der heterolog exprimierten Enzyme TvAAT1, TvAAT3, TvAAT4 und TvAAT5 unter der Verwendung von Geraniol als Substrat (3.4.1) konnten mit dem transienten Expressionssystem in *N. benthamiana* bestätigt werden (Abb. 3.10 A-D). Mittels GC/MS-Analyse konnte nachgewiesen werden, dass alle vier getesteten Enzyme Geraniol zu dem entsprechenden Acetat umsetzen kann.

Das Monoterpen α -Terpineol wiederum wurde von keinem der getesteten Enzyme als Substrat akzeptiert. TvAAT3 wies als einziges Enzym, im Vergleich zum heterologen System, eine zusätzliche Aktivität auf (Abb. 3.11). Nach Zugabe des Substrats Linalool, konnte nach der Analyse mittels GC/MS bei einer Retentionszeit von 13,3 min ein Peak identifiziert werden, welcher ohne Substrat und in der Leervektorkontrolle nicht erscheint. Dieser Peak wurde mittels Standard als Linalylacetat identifiziert und zeigt somit, dass TvAAT3, in *N. benthamiana* transient exprimiert, zusätzlich auch Linalool als Substrat akzeptiert.

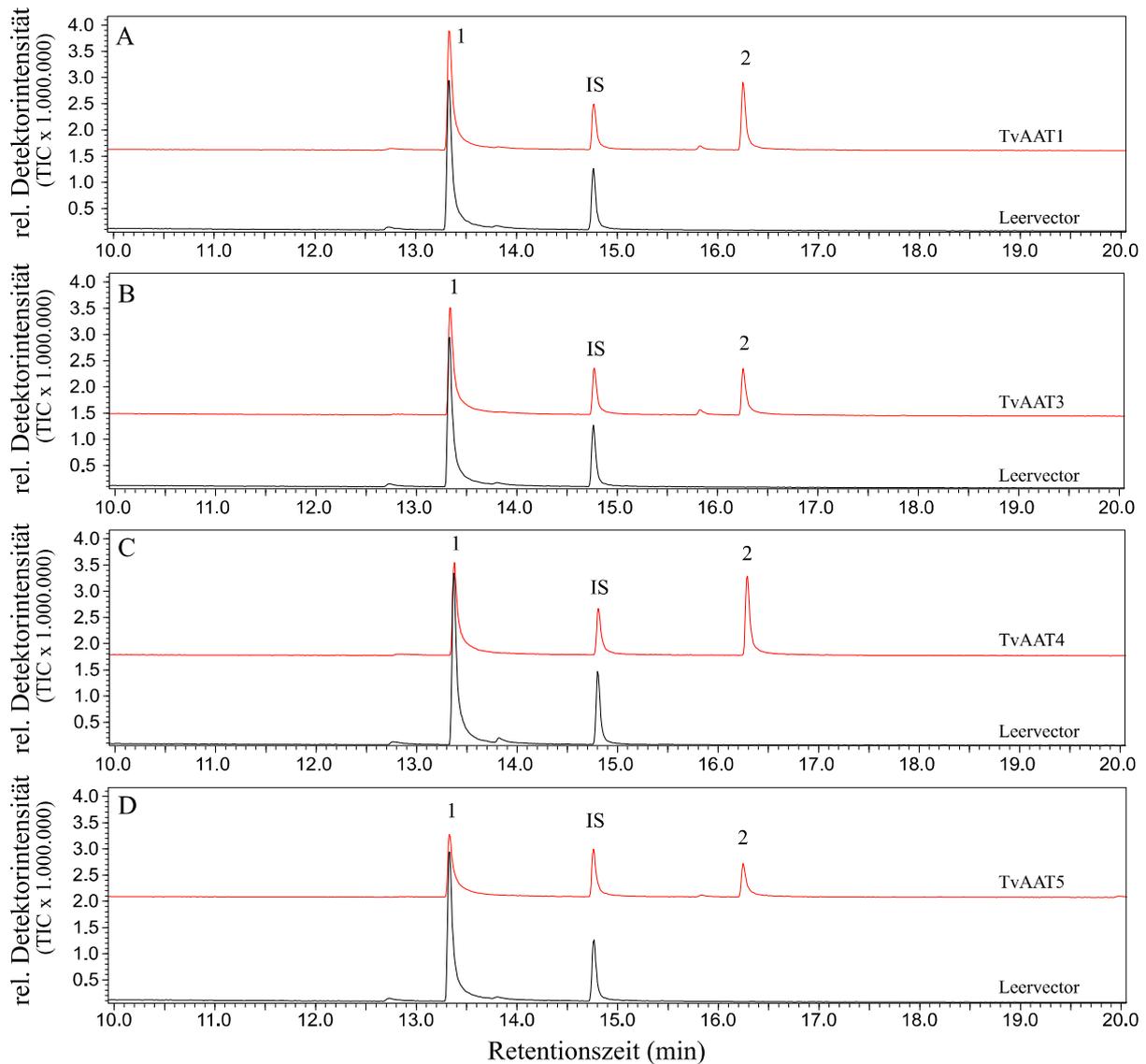


Abb. 3.10: Gaschromatografische Analyse der Enzymaktivität der transient exprimierten Enzyme TvAAT1 (A), TvAAT3 (B), TvAAT4 (C) und TvAAT5 (D) mit dem Substrat Geraniol im Vergleich zum Leervektor. Die für den Assay verwendeten Tabakblattscheiben wurden mit 600 μ l Hexan (mit internem Standard) für 1 h bei Raumtemperatur extrahiert und die volatilen Substanzen mittels GC/MS aufgetrennt und analysiert. 1: Geraniol, 2: Geranylacetat, IS: Interner Standard (Nonylacetat, 10 ng/ μ l)

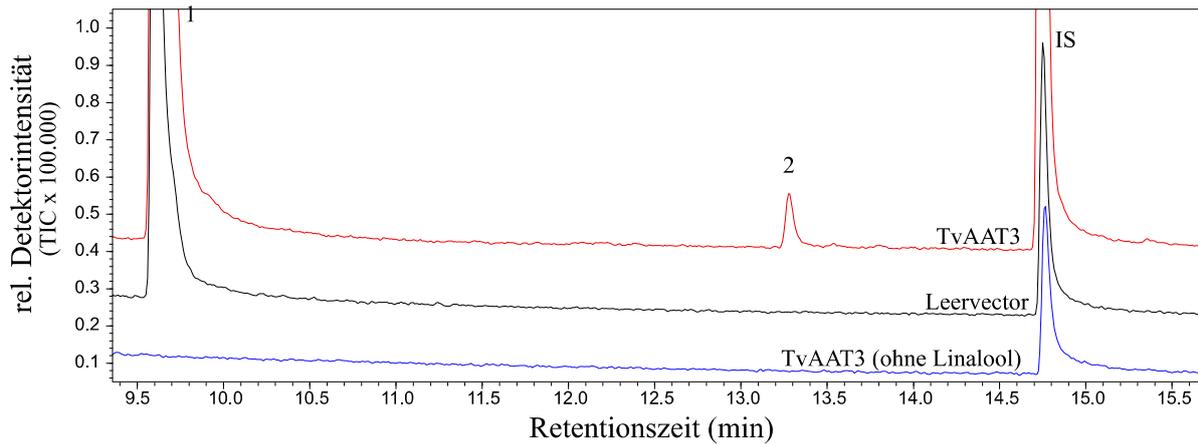


Abb. 3.11: Gaschromatografische Analyse der Enzymaktivität des transient exprimierten Enzyms TvAAT3 mit bzw. ohne dem Substrat Linalool im Vergleich zum Leervektor. Die für den Assay verwendeten Tabakblattscheiben wurden mit 600 μ l Hexan (mit internen Standard) für 1 h bei Raumtemperatur extrahiert und die volatilen Substanzen mittels GC/MS aufgetrennt und analysiert. 1: Linalool, 2: Linalylacetat, IS: Interner Standard (Nonylacetat, 10 ng/ μ l)

3.4.4 Bestimmung der optimalen Assaybedingungen für TvAAT1

Im Rahmen der Charakterisierung der TvAAT-Enzyme wurden die optimalen Assaybedingungen für TvAAT1 ermittelt. Die zu bestimmenden Optima für dieses Enzym wurden repräsentativ für alle aktiven TvAATs erhoben und für weitere Untersuchungen verwendet. Ermittelt wurden das pH-Optimum und die optimale Temperatur. Die für diese Untersuchung benötigten Proteine wurden mittels His-Tag aufgereinigt (2.4.3) und weiter jeweils durch SDS-PAGE (2.4.6) visualisiert (Abb. 6.1).

Der Enzymassay zur Bestimmung des optimalen pH-Wertes wurde wie in Kapitel 2.5.1 beschrieben mit einer Inkubationszeit von 4 min (im linearen Bereich der Produktbildung) durchgeführt. Dabei variierte der pH-Wert des Assaypuffers. Getestet wurde der Bereich zwischen pH 5.0 bis pH 11.0 und die jeweils ermittelte Umsatzeffizienz in gebildetem Geranylacetat pro μ g Protein (ng/ μ g Protein) abhängig vom pH-Wert aufgetragen (Abb. 3.12 A). Den höchsten Umsatz erreichte das Enzym bei einem pH-Wert von 8.0 mit einem Umsatz von 216,4 ng/ μ g Protein. Dieser Punkt stellte somit das pH-Optimum dar. Zwischen dem pH 5.0 und 8.0 stieg die Effizienz stetig, wenngleich zwischen pH 7.0 und 8.0 der Anstieg steiler verlief als zwischen pH 5.0 und 7.0. Ab dem pH-Optimum 8.0 sank die Aktivität von TvAAT1 wieder kontinuierlich bis bei dem pH-Wert 11.0 nur noch ein Umsatz von 17,1 ng/ μ g Protein zu verzeichnen war.

Bei der Bestimmung des Temperaturoptimums wurde der beschriebene Enzymassay (2.5.1) dahingehend modifiziert, dass dieser bei dem identifizierten optimalen pH-Wert von 8.0 und variierender Assaytemperatur für 4 min (im linearen Bereich der Produktbildung) durchgeführt wurde. In Abb. 3.12 B ist die Temperaturkurve für TvAAT1 dargestellt. Gemessen wurde die Aktivität des Enzyms bei den Temperaturen von 5 °C bis 60 °C. Im Gegensatz zum pH-Optimum ist für die Assaytemperatur kein markantes Optimum zu erkennen. Vielmehr konnte ein Bereich zwischen 25 °C und 35 °C festgestellt werden, in dem die höchste Aktivität mit einem Umsatz zwischen 82,3 und 91,6 ng/μg Protein erreicht wurde. Innerhalb dieses Bereichs variierte der Umsatz jedoch kaum. Zwischen 5 °C und 25 °C stieg die Enzymaktivität stetig an. Bei einer Assaytemperatur zwischen 40 °C und 55 °C verringerte sich die Enzymaktivität wieder kontinuierlich und ab 60 °C war keine Enzymaktivität mehr messbar. Für weiterführende Untersuchungen, die bei optimierter Assaytemperatur stattfinden sollten, wurde eine Temperatur von 30 °C festgelegt.

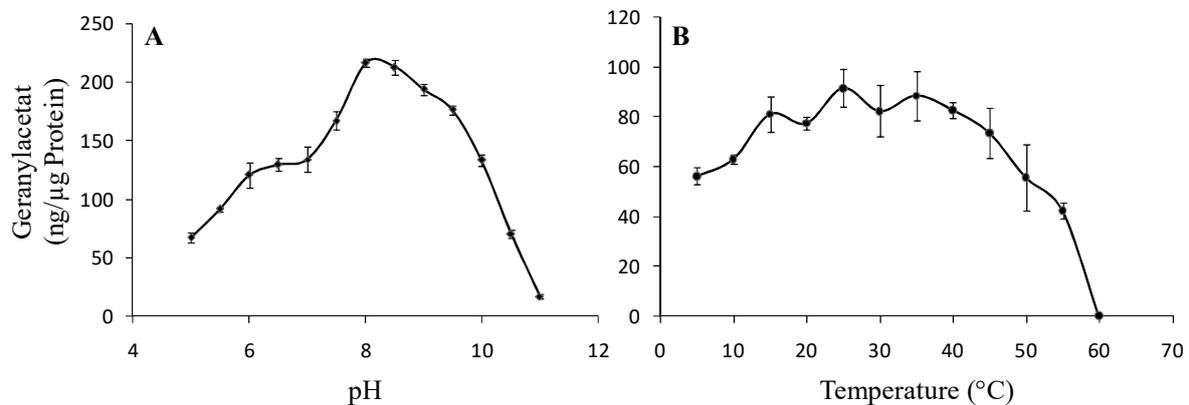


Abb. 3.12: Optimale Assaybedingungen für TvAAT1 repräsentativ für alle aktiven TvAATs. Hochreines Protein (1 μg) wurde mit 500 μM Geraniol und 100 μM Acetyl CoA zusammen im Assaypuffer für 4 min bei 30 °C inkubiert. Die Auftrennung und quantitative Analyse des Produktes erfolgte mittels GC/FID. n=3, Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

3.4.5 Bestimmung des K_m -Wertes und der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit (V_{max}) für TvAAT3

Die rein qualitative Analyse der umgesetzten Substrate bzw. der gebildeten Produkte ermöglicht zwar eine Charakterisierung der möglichen Reaktionswege eines Enzyms, lässt jedoch keine Aussage über dessen Reaktionsgeschwindigkeit und seine Gesamteffizienz zu. Da TvAAT3 das einzige isolierte und aktive Enzym darstellte, welches mehrere in *T. vulgaris* vorkommende Monoterpenacetate bilden kann (Geranylacetat, Linalylacetat und Bornylacetat; 3.4.2, 3.4.3), sollte dieses Enzym weiter biochemisch charakterisiert werden. Dafür wurden die kinetischen Parameter K_m und V_{max} für das besagte Enzym ermittelt.

Die Messungen zur Bestimmung der kinetischen Parameter K_m und V_{max} erfolgte, wie schon für die Bestimmung der optimalen Assaybedingungen (3.4.4), mit aufgereinigtem Enzym und unter optimalen Bedingungen bezüglich des pH-Wertes (pH 8.0) und der Assaytemperatur (30°C). Die Inkubationszeit des Assays betrug 2,5 min und lag im linearen Bereich der Produktbildung (Abb. 6.3). Da für die enzymatische Reaktion der TvAATs sowohl ein Substrat als auch ein Cosubstrat benötigt wird, war es notwendig für beide Substrate jeweils separat die kinetischen Parameter zu bestimmen. Der Enzymassay wurde mit variierender Substratkonzentration des zu berechnenden Substrats zusammen mit dem jeweils anderen Substrat nahe der Sättigungskonzentration durchgeführt. Als Substrat-Cosubstrat-Paar wurde Geraniol und Acetyl CoA ausgewählt. Zwar setzt TvAAT3 auch Thymol sowie Carvacrol zu dem entsprechenden Acetat um, jedoch sind diese Produkte nicht im natürlichen ätherischen Öl von *T. vulgaris* detektierbar. Auch Linalool kam für die Bestimmung der kinetischen Parameter nicht in Frage, da es das heterolog in *E. coli* exprimierte Enzym nicht zu Linalylacetat umsetzen kann. Die Konzentration des eingesetzten Substrats Geraniol reichte von 2,5 μM bis 1000 μM und die des Cosubstrates Acetyl CoA von 0,1 μM bis 500 μM , wobei der jeweils höchste Wert die Sättigungskonzentration darstellte.

Die Ergebnisse der Versuche sind in Tab. 3.3 zusammengefasst. Die Berechnung der kinetischen Parameter für das Substrat bzw. für das Cosubstrat erfolgte mittels unterschiedlicher Linearisierungsverfahren. Für Geraniol wurde die doppelt-reziproke Auftragung nach Lineweaver-Burk gewählt während für das Cosubstrat Acetyl CoA die Auftragung nach Hanes-Woolf angewendet wurde (Abb. 3.13).

Tab. 3.3: Kinetische Parameter K_m und V_{max} für TvAAT3. Die Bestimmung erfolgte mittels quantitativer GC/FID-Analyse des entstandenen Produkts Geranylacetat. Für die Berechnung der beiden Parameter wurden zwei unabhängige Experimente mit jeweils Dreifachmessungen durchgeführt.

	K_m (μM)	V_{max} ($\text{ng}/\mu\text{g} \cdot \text{min}$)
Geraniol (mit Acetyl-CoA)	282,27	9,01
Acetyl-CoA (mit Geraniol)	9,23	7,44

Die K_m -Werte der beiden Substrate für das Enzym TvAAT3 wichen stark voneinander ab. Mit einem K_m -Wert von 282,27 μM für Geraniol war dieser etwa 30-fach höher als der Wert für Acetyl CoA (9,23 μM). Damit war TvAAT3 wesentlich affiner gegenüber seinem Cosubstrat als zu seinem Substrat Geraniol. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit des Enzyms variierte hingegen kaum voneinander. Mit einem V_{max} -Wert von 9,01 $\text{ng}/\mu\text{g} \cdot \text{min}$ für Geraniol bzw. 7,44 $\text{ng}/\mu\text{g} \cdot \text{min}$ für Acetyl CoA lagen diese dicht beieinander und zeigten, dass für beide Substrate die gleiche maximale Umsatzgeschwindigkeit gilt.

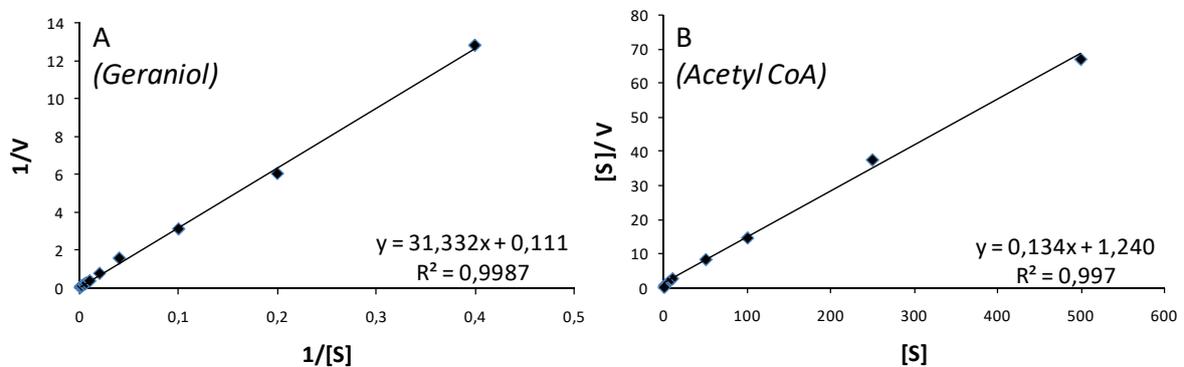


Abb. 3.13: Linearisierungsverfahren zur Berechnung der kinetischen Parameter K_m und V_{max} für das Substrat Geraniol nach Lineweaver-Burk (A) und das Cosubstrat Acetyl CoA nach Hanes-Woolf (B). Die Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit erfolgte anhand eines Enzymassays mit hochgereinigtem Enzym (TvAAT3) und variierender Substratkonzentration des zu berechnenden Substrats zusammen mit dem jeweils anderen Substrat in Sättigungskonzentration. Die Auftrennung und quantitative Analyse des Produktes Geranylacetat erfolgte mittels GC/FID. V = Reaktionsgeschwindigkeit ($\text{ng}/\mu\text{g} \cdot \text{min}$), $[S]$ = Substratkonzentration (μM).

3.5 Analyse von Nektar- und Pollenvolatilen aus *T. vulgaris*

Neben den Blattvolatilen sollten in dieser Arbeit auch die volatilen Substanzen der Nektar- bzw. Pollenfraktion untersucht werden. Der Schwerpunkt lag hierbei in der qualitativen und quantitativen Analyse der Hauptmonoterpene und deren Acetate. Alle Nektar- und Pollenproben wurden während der Blütezeit von *T. vulgaris* im Mai und Juni 2017 geerntet und anschließend mittels GC/MS bzw. GC/FID analysiert. Parallel wurden die Blüten makro- und mikroskopisch hinsichtlich ihrer floralen Nektarien untersucht.

3.5.1 Makro- und mikroskopische Betrachtung der floralen Nektarien in *T. vulgaris*

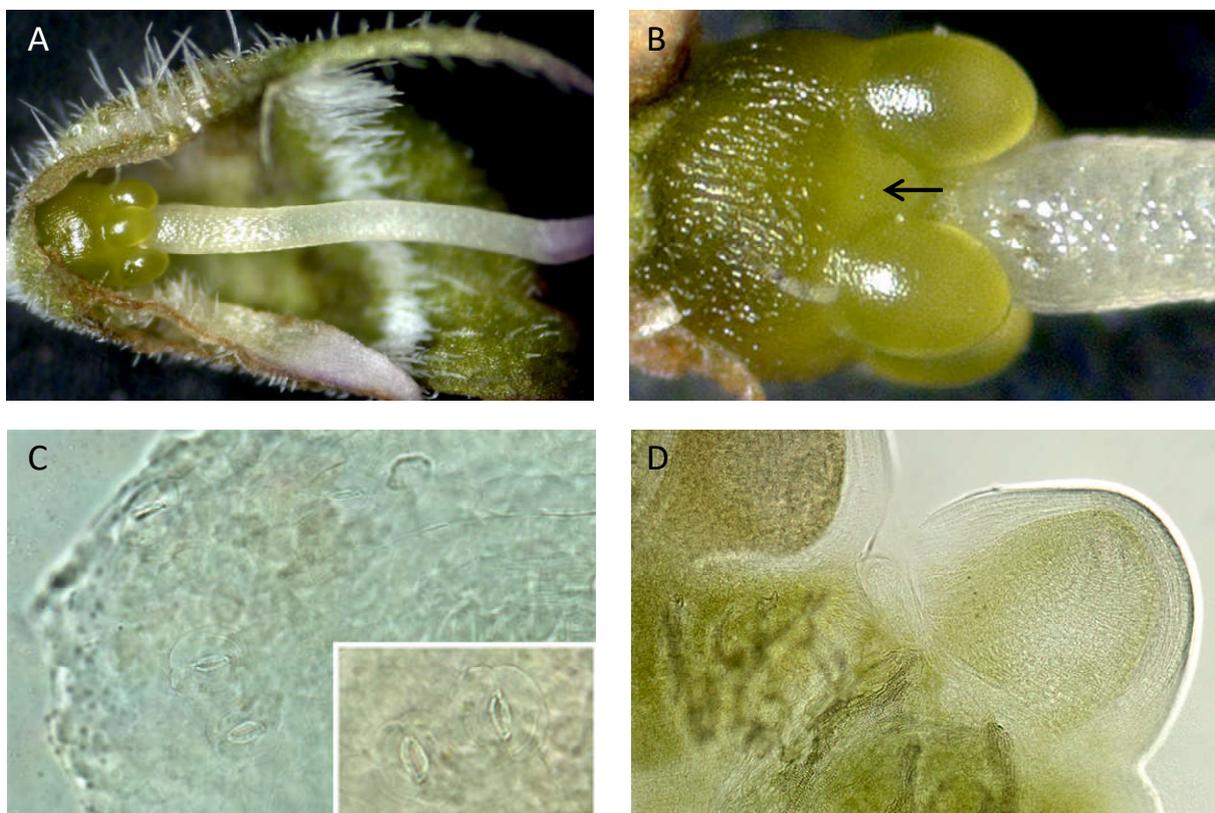


Abb. 3.14: Makro- und Mikroskopische Aufnahmen der Blüten bzw. der floralen Nektarien von *T. vulgaris*. Halbe Blütenknospe mit Samenanlage und Griffel, L-Typ (A), Vergrößerung des Diskus mit Samenanlage und möglicher Sitz der floralen Nektarien (siehe Pfeil), L-Typ (B), Diskusgewebe mit Spaltöffnungen, A-Typ (C), Gefäßanbindung des Diskus, A-Typ (D).

Der Nektar befand sich unabhängig vom Chemotyp innerhalb der Blüte am Blütenboden und konnte mittels Mikrokapillare entnommen werden. Hierfür wurde die Kapillare durch die Blütenröhre bis zum Blütenboden geschoben und der enthaltene Nektar durch den Kapillareffekt abgezogen. In Abb. 3.14 A ist eine makroskopische Aufnahme einer halbierten Blüte von *T. vulgaris* abgebildet. Die Kronblätter und Staubblätter wurden entfernt. Deutlich erkennbar sind die behaarten Kelchblätter, der Blütenboden und Diskus mit den darauf sitzenden Samenanlagen sowie der Griffel. Abb. 3.14 B zeigt die Vergrößerung des Blütenbodens bzw. des Diskus mit den Samenanlagen. Der Pfeil zeigt die Stelle des Diskus, die sehr wahrscheinlich das Nektargewebe bzw. Nektarien enthält. Dort konnten vermehrt Spaltöffnungen (Abb. 3.14 C) sowie zahlreiche Gefäßanbindungen (Abb. 3.14 D) gefunden werden, die auf einen gezielten Transport von Nektar bzw. dessen Inhaltsstoffe und der möglichen Abgabe z.B. über Spaltöffnungen oder das umliegende Diskusgewebe hindeuten.

3.5.2 Nektar und Pollen der Chemotypen von *T. vulgaris* enthalten die entsprechenden Hauptmonoterpene und Acetate

Für alle sechs Chemotypen konnte Nektar geerntet und qualitativ untersucht werden. Die mittels GC/MS erhaltenen Chromatogramme wurden in Abb. 3.15 zusammengefasst und die identifizierbaren Substanzen gekennzeichnet. Der Nektar des G-Typs enthielt das Hauptmonoterpen Geraniol und sein entsprechendes Acetat Geranylacetat. Neben diesen zwei Terpenen wurden noch Benzenacetaldehyd und Linalool identifiziert. Auch die Nektarprobe vom A-Typ wies das für diesen Chemotyp repräsentative Hauptmonoterpen α -Terpineol und das Acetat α -Terpinylacetat auf. Wie schon der G-Typ enthielt auch der A-Typ-Nektar Benzenacetaldehyd sowie Linalool als weitere Substanzen. Der höchste Peak im Chromatogramm der Nektarprobe des U-Typs war das Terpen *trans*-Sabinenhydrat, was das Hauptmonoterpen dieses Chemotyps darstellt. Weiterhin konnten *cis*-Sabinenhydrat, Linalool, und α -Terpineol identifiziert werden. Im Nektar des L-Typs wurden neben Benzenacetaldehyd die zwei Monoterpene Linalool und dessen Acetat Linalylacetat nachgewiesen. Die gemessene Detektorintensität für das Linalylacetat war jedoch im Vergleich zu den anderen Substanzen sehr gering. Das phenolische Monoterpen Carvacrol, welches im C-Typ das Hauptmonoterpen ist, konnte auch im Nektar mit der höchsten Detektorintensität nachgewiesen werden. Weiterhin wurden die Substanzen Benzenacetaldehyd und Linalool auch in dieser Probe identifiziert. Der Nektar des T-Typs enthielt, ebenfalls als höchsten Peak, das entsprechende Hauptmonoterpen für diesen

Chemotyp - das Thymol. Neben diesem konnten noch die Monoterpene Linalool und Carvacrol identifiziert werden.

Für alle Nektarproben galt, dass die für den jeweiligen Chemotyp typischen Monoterpene und deren Acetate, nachgewiesen werden konnte. Linalool war die einzige eindeutig identifizierte Substanz, die in allen Nektarproben vorkam. Ebenso konnten auch Benzenacetaldehyd (G, A, L und C), α -Terpineol (A und U) und Carvacrol (C und T) in mehr als nur einer Probe identifiziert werden.

Neben den Peaks, die eindeutig einer Substanz zugeordnet werden konnten, wiesen die in Abb. 3.15 dargestellten Chromatogramme noch weitere Peaks auf. Diese konnten nicht eindeutig identifiziert werden.

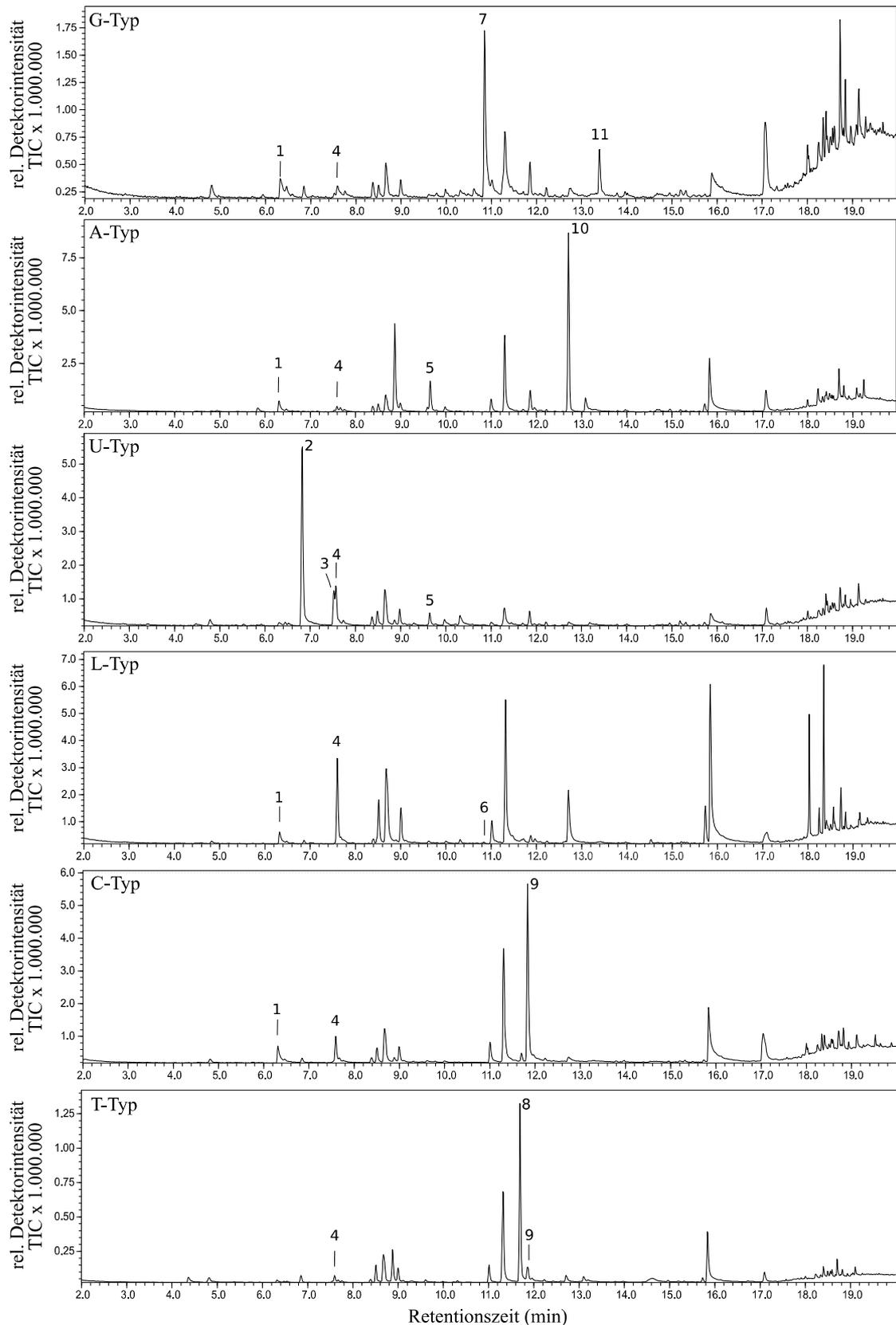


Abb. 3.15: GC/MS-Analyse des Nektars der sechs Chemotypen von *T. vulgaris*. Die Extraktion des Nektars (5-10 μ l) erfolgte mittels SPME für 1 h bei 40°C (2.5.3). Alle eindeutig identifizierbaren Substanzen wurden nummeriert. 1: Benzenacetaldehyd, 2: *trans*-Sabinenhydrat, 3: *cis*-Sabinenhydrat, 4: Linalool, 5: α -Terpineol, 6: Linalylacetat, 7: Geraniol, 8: Carvacrol, 9: Thymol, 10: α -Terpinylacetat, 11: Geranylacetat

Während von allen sechs Chemotypen Nektarproben gesammelt und analysiert werden konnten, war eine Untersuchung der Pollen nach der volatilen Zusammensetzung nur für die Chemotypen möglich, deren Blüten sowohl Antheren als auch Griffel ausbildeten, und somit einen hermaphroditen Bau aufwiesen. Dies traf nur für die Chemotypen G, A und L zu. Die Chemotypen U, C und T bildeten dahingegen nur männlich-sterile Blüten aus. Die aus der Analyse resultierenden Chromatogramme sind in Abb. 3.16 dargestellt.

Im Pollen des G-Typs konnte das Hauptmonoterpen Geraniol und das dazugehörige Acetat Geranylacetat eindeutig nachgewiesen werden. Neben diesen beiden Monoterpenen wurden noch die Substanzen Camphen, Mycren, Camphor, Geranial, (Z)-Caryophyllen und γ -Curcumen in der volatilen Fraktion identifiziert. Wie auch im G-Typ wurden in der Pollenfraktion des A-Typs die entsprechenden Hauptmonoterpene α -Terpineol und α -Terpinylacetat detektiert. Zusätzlich wurden noch die Terpene Mycren, Limonen und (Z)-Caryophyllen gemessen. Die Pollenproben des L-Typs zeigten ein ähnliches Bild, indem die höchsten Peaks das Hauptmonoterpen Linalool und sein Acetat Linalylacetat darstellen und drei weitere Substanzen Mycren, 1,8-Cineol, (Z)-Caryophyllen identifiziert wurden. Mycren und (Z)-Caryophyllen sind die einzigen Terpene, die in allen Pollenproben vorkamen. Auch in der Pollenfraktion, besonders im G-Typ, konnten wie auch schon für die Nektarfraktion nicht alle detektierten Peaks eindeutig einer Substanz zugeordnet werden und wurden daher nicht im Chromatogramm (Abb. 3.16) nummeriert und zugeordnet.

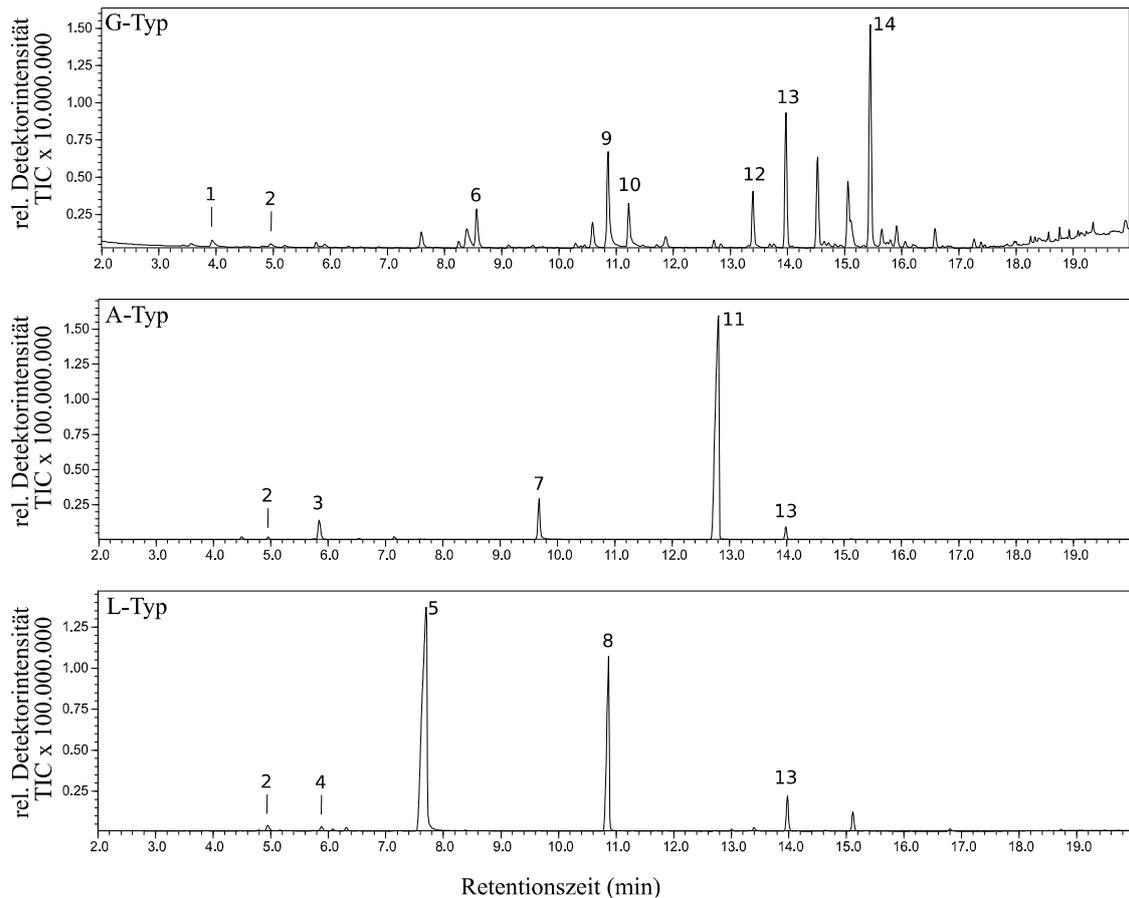


Abb. 3.16: GC/MS-Analyse des Pollens der Chemotypen G, A und L von *T. vulgaris*. Die Extraktion des Pollens (16-20 mg) erfolgte mittels SPME für 1 h bei 40°C (2.5.3). 1: Camphen, 2: Mycren, 3: Limonen, 4: 1,8-Cineol, 5: Linalool, 6: Camphor, 7: α -Terpineol, 8: Linalylacetat, 9: Geraniol, 10: Geranial, 11: α -Terpinylacetat, 12: Geranylacetat, 13: (Z)-Caryophyllen, 14: γ -Curcumen

3.5.3 Die quantitative Analyse der Monoterpene ergab große Unterschiede zwischen Pollen und Nektar

Parallel zu der qualitativen Untersuchung des Nektars und Pollens mittels SPME-Extraktion und Identifikation durch GC/MS wurde auch eine quantitative Analyse aller Proben durchgeführt. Die Gehalte (in ppm) der jeweiligen Hauptmonoterpene und ihrer entsprechenden Acetate wurden in Tab. 3.4 gegenüber gestellt.

Vor der Erhebung aller Daten der quantitativen Analyse von Pollen- und Nektarvolatilen wurde eine Verifizierung der GC/FID-Methode durchgeführt. Hierfür wurde die Substanzverwertung („substance recovery“), das Detektionsminimum (LOD, „limit of detection“) und das Quantifizierungsminimum (LOQ, „limit of quantification“) für Geraniol exemplarisch für alle quantifizierten Monoterpene bestimmt (2.5.6). Das Detektionsminimum mit 0,059 ppm und Quantifizierungsminimum mit 0,072 ppm war eine Größenordnung

geringer als der niedrigste Konzentrationswert, welcher in Nektar und Pollen detektiert wurde (Tab. 3.4). In Relation zum Standard Nonylacetat lag die Substanzverwertung für jede Verdünnung durchschnittlich bei 83,7 % (Tab. 6.2, Anhang). Die letzte Verdünnung (0,049 ppm) wurde für diese Berechnung nicht mit einbezogen, da der Wert unter dem LOD lag. Die verschiedenen Konzentrationen von Geraniol wurden dreifach an drei aufeinander folgenden Tagen vermessen, wobei die mittlere Standardabweichung der Retentionszeit von Geraniol zwischen den Messtagen 0,2 sec betrug (Tab. 6.2, Anhang).

Tab. 3.4: Quantitative Analyse der Hauptmonoterpene in Pollen und Nektar. Die Nektar- und Pollenproben wurden in Hexan extrahiert und anschließend mittels GC/FID analysiert (2.5.3). Alle Konzentrationen sind in ppm angegeben. n.d.: nicht detektiert, n.a.: nicht analysiert.

Chemotyp	Substanz	Pollen			Nektar		
		(ppm)	Stabw. (+/-)	Replikate	(ppm)	Stabw. (+/-)	Replikate
G	Geraniol	43,08		1	0,99	0,21	3
	Geranylacetat	17,11		1	n.d.		
A	α -Terpineol	57,97	3,87	3	2,83	0,55	3
	α -Terpinylacetat	243,37	14,30	3	1,69	0,36	3
U	<i>trans</i> Sabinenehydrat	n.a.			2,45	0,23	3
L	Linalool	742,06	84,22	3	2,18		1
	Linalylacetat	87,64	12,30	3	n.d.		
C	Carvacrol	n.a.			0,24	0,03	2
T	Thymol	n.a.			7,67	0,03	3

Im Vergleich der Hauptmonoterpene in Nektar und Pollen ergaben sich große Unterschiede bezüglich ihrer Konzentration. In der Pollenfraktion waren deutlich größere Mengen der jeweiligen Terpene enthalten als im Nektar. Die Werte lagen teilweise über zwei Zehnerpotenzen auseinander, wie zum Beispiel für α -Terpinylacetat oder Linalool mit Konzentrationen von 243,37 bzw. 742,06 ppm in Pollen und 1,69 bzw. 2,18 ppm in Nektar. Bei der Betrachtung aller gemessenen Nektarproben ergab sich eine Konzentrationsspanne von 0,24 ppm für Carvacrol (C-Typ) bis hin zu 7,67 ppm für Thymol (T-Typ). Die Werte für die ebenfalls detektierbaren Terpene (Geraniol, Linalool, α -Terpineol, *trans*-Sabinenehydrat) lagen zwischen diesen beiden Werten. Von den drei Monoterpenacetaten, konnte nur das α -Terpinylacetat im Nektar des A-Typs, mit einer Konzentration von 1,69 ppm, detektiert werden. Konzentrationsdaten für den Pollen konnten nur für die Chemotypen G, A und L erhoben werden und reichten von 17,11 ppm für Geranylacetat (G-Typ) bis zu 742,06 ppm für Linalool (L-Typ). Anders als im Nektar konnten hier alle Acetate nachgewiesen werden.

4 Diskussion

4.1 Acetylierte Monoterpene bestimmen neben den Hauptmonoterpenen das ätherische Öl von *T. vulgaris*

Der chemische Polymorphismus des ätherischen Öls von *T. vulgaris* aus der mediterranen Region Südfrankreichs wurde vielfach beschrieben und untergliedert diese Spezies aus der Familie der Lamiaceae in sechs verschiedene Chemotypen (Granger *et al.*, 1973, Linhart *et al.*, 1999). Definiert und benannt werden diese Subtypen nach dem Monoterpen, welches in dem jeweiligen ätherischen Öl dominant ist: G-Typ (Geraniol), A-Typ (α -Terpineol), U-Typ (*trans*-Sabinenhydrat), L-Typ (Linalool), C-Typ (Carvacrol) und T-Typ (Thymol) (Granger *et al.*, 1973, Vernet, 1986). Einige Chemotypen sind jedoch nicht ausschließlich durch ihre Hauptmonoterpene gekennzeichnet, sondern bilden weitere Monoterpene, die in hoher Quantität detektierbar und somit ebenfalls kennzeichnend sind. Zum Beispiel findet sich im ätherischen Öl der phenolischen C- und T-Typen zusätzlich in hohen Mengen die Verbindung γ -Terpinen, welches die Vorstufe von Thymol und Carvacrol darstellt (Thomson *et al.*, 2003). Auch der U-Typ weist neben *trans*-Sabinenhydrat noch einen hohen Gehalt von Terpinen-4-ol, Myrcen-8-ol und Linalool auf (Thomson *et al.*, 2003).

Besonders in den Chemotypen G, A und L ist das Hauptmonoterpen in Kombination dem jeweiligen Acetat charakteristisch. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die acetylierte Form des Linalools zusammen mit Linalool über 90 % des Gesamtvolatil-Anteils ausmacht, wobei das Linalool im Vergleich zu seinem Acetat achtfach erhöht detektiert wurde. Granger *et al.* (1973) fassten in ihren Berechnungen ebenfalls das Monoterpen und die acetylierte Form zusammen und kamen für die L-Typ-Population im natürlichen Habitat auf einen ähnlich hohen Wert von 95 % des Gesamtterpengehalts. Geraniol und sein Acetat sind zu annähernd gleichen Teilen im ätherischen Öl vorhanden und das Acetat von α -Terpineol ist sogar deutlich höher konzentriert als die nicht acetylierte Form. Eine vorangegangene Dissertation zu diesem Thema (Schimmel, 2014) befasst sich ausführlich mit der Analyse der Terpengehalte in Blättern von *T. vulgaris*, vergleicht diese mit der Literatur (Granger *et al.*, 1973, Thomson *et al.*, 2003) und kommt zu der gleichen Erkenntnis.

Somit ist die Definition des Hauptmonoterpens, das als dominant im entsprechenden ätherischen Öl gilt, zumindest für die Chemotypen G und A nicht ganz korrekt.

Keefover-Ring *et al.* (2009) weisen in ihren Ausführungen darauf hin, dass das Konzept des Chemotyps Einschränkungen haben kann bzw. eine qualitative Einschätzung ist, bei der die signifikante chemische Diversität innerhalb der Chemotypen nicht deutlich wird. So können

einzelne sekundäre Komponenten des ätherischen Öls in sehr unterschiedlichen Verhältnissen auftreten, was große Unterschiede in der Wirksamkeit gegenüber Fraßfeinden oder Bestäubern haben kann (Keefover-Ring *et al.*, 2009; Langenheim *et al.*, 1994). Weiterhin definieren sie in ihrer Arbeit neue Chemotypen, die in dieser Region bisher unbekannt waren, wie zum Beispiel der α -Terpinylacetat-Typ. Im Fall der in dieser Arbeit untersuchten sechs Chemotypen ist eventuell deren Zugehörigkeit zu überdenken, da in zwei von sechs Chemotypen das ursprüngliche Hauptmonoterpen nicht als dominant gilt bzw. sogar nur die zweithäufigste Komponente im ätherischen Öl darstellt (A-Typ). Zumindest machen die Hauptmonoterpene in den untersuchten *T. vulgaris*-Pflanzen nicht alleine den Chemotyp aus, sondern werden besonders in den Chemotypen G, A und L maßgeblich durch andere Terpene, den Monoterpenacetaten, bestimmt.

4.2 Identifizierung und Eingruppierung der Alkohol-Acyltransferasen in die BAHD-Enzymfamilie

Mit Hilfe der Transkriptom-Sequenzierung der Chemotypen G, C und T von *T. vulgaris* konnte ein RNASeq-Datensatz generiert werden, der es ermöglicht, mittels spezifischer Referenzgene gezielt nach ähnlichen Abschnitten im Transkriptom zu suchen. Die zwei hierfür verwendeten Referenzgene (*rhaat1*, *liat-3*), sind der großen Familie der BAHD-Acyltransferasen zugeordnet (Shalit *et al.* 2003; Sarker & Mahmoud, 2015). Diese für Pflanzen spezifische Enzymfamilie vereint Enzyme, die unter Verwendung von Acyl-CoA viele verschiedene Stoffklassen modifizieren können. Zu ihrem Produktspektrum gehören z.B. Terpenacetate, modifizierte Anthozyane oder Phytoalexine (D'Auria, 2006). Es konnte gezeigt werden das die Enzyme RhaAT1 und LiAAT-3 unter anderem Geraniol bzw. Lavandulol in ihr entsprechendes Acetat umsetzen können (Shalit *et al.* 2003; Sarker & Mahmoud, 2015). Aus diesem Grund ist es wahrscheinlich, dass auch in *T. vulgaris* BAHD-Acetyltransferasen für die Synthese der Monoterpenacetate verantwortlich sind. Die zwei genannten Referenzenzyme besitzen mit Geranylacetat als Produkt ein überschneidendes Produktspektrum mit den potenziellen Acetyltransferasen in Thymian. Im Fall von *liat-3* ist zusätzlich die Zugehörigkeit zur selben Pflanzenfamilie (Lamiaceae) gegeben, weshalb diese für die Suche nach potentiellen AAT-Genen gewählt wurden. Bisher sind keine Sequenzen publiziert, deren Expressionsprodukt Linalool bzw. α -Terpineol zu dem entsprechenden Acetat umsetzen kann. Eine spezifische Suche nach Enzymen mit diesem Produktspektrum war daher nicht möglich.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden sieben potentielle Acetyltransferasen identifiziert. Die sequenzierten Gene besitzen eine Länge zwischen 1224 bp und 1365 bp und die jeweiligen Proteine putative molekulare Massen von 45,38 – 49,54 kDa. Die Mitglieder der BAHD-Familie zeigen eine durchschnittliche Gen-Länge von 1335 bp und eine Molekulare Masse von 48 – 55 kDa (D'Auria, 2006). Somit sind die identifizierten Sequenzen aus Thymian denen der BAHD-Familie sehr ähnlich. Auch die für diese Enzymfamilie charakteristischen konservierten Domänen, das HxxxD-Motiv und die DFGWG-Domäne, sind in allen sieben Genen vorhanden. Jedoch erst mit Hilfe eines erweiterten Kladogramms auf Grundlage von bereits publizierten phylogenetischen Analysen (D'Auria, 2006) konnten die identifizierten Gene der BAHD-Enzymfamilie zugeordnet werden.

Der Phylogenetische Baum der BAHD-Enzymfamilie untergliedert ihre Mitglieder in fünf Hauptgruppen, auch Kladen genannt. Vier der sieben Proteine aus *T. vulgaris* (TvAAT1-4) sind eindeutig der Klade III zugeordnet, in der die Mehrzahl an zugehörigen Enzymen Acetyl-CoA als Acyl-Donator akzeptiert (D'Auria, 2006). Das Enzym RhAAT1, welches das Referenzgen für TvAAT1-4 darstellt, ist ebenfalls dieser Gruppe zugeordnet (Shalit *et al.*, 2003). Klade III umfasst zwei Unterfamilien von denen eine Untergruppe Proteine beinhaltet, die an der Biosynthese von volatilen Estern beteiligt sind (D'Auria, 2006). Dieser sind auch die identifizierten Proteine auf Thymian (TvAAT1-4) und ihr Referenzgen zugeordnet. Da für die Thymian-Proteine ein Produktspektrum innerhalb der Stoffklasse der Monoterpenacetate vermutet wird, ist die Eingruppierung in Klade III bzw. deren Subfamilie erwartungsgemäß. Deutlich ähnlicher als RhAAT1 ist den Enzymen TvAAT1-4 das Protein Ss5MaT2 (*S. splendens*). Dieses katalysiert die Übertragung einer Malonyl-Gruppe auf die Hydroxylgruppe von Anthozyanen und besitzt damit sowohl ein anderes Donor- als auch Akzeptormolekül (Suzuki *et al.*, 2004). Die relative Sequenzähnlichkeit korreliert somit nicht zwangsläufig mit der katalytischen Funktion.

Klade V der BAHD-Familie ist ebenfalls in mehrere Unterfamilien untergliedert, von denen eine fast hauptsächlich aus Enzymen besteht, die an der Ester-Biosynthese von Volatilen, z.B. blütenspezifische Benzenoid-Volatilen, beteiligt sind (D'Auria, 2006). Die Acetyltransferasen TvAAT5-7 sowie ihr Referenzsequenz *liaat-3* sind dieser zugeordnet und bilden dort eine kleine separate Untergruppe. LiAAT-3 und TvAAT5 sind damit die bisher einzigen der Klade V zugeordneten Enzyme, welche nachweislich bzw. potentiell Monoterpenacetate bilden.

4.3 Monoterpenacetat-Biosynthese in *T. vulgaris*

4.3.1 Die Acetyltransferasen aus *T. vulgaris* sind stark substratspezifisch

Ziel dieser Arbeit war es unter anderem, die Biosynthese der in Thymian vorkommenden Monoterpenacetate aufzuklären und die bei der Synthese beteiligten Enzyme zu identifizieren. Es konnten sieben Gene gefunden werden, die der Familie der BAHD-Enzyme angehören und somit potentiell die Biosynthese der acetylierten Bestandteile des ätherischen Öls katalysieren. Bei vier der isolierten Enzyme (TvAAT1, TvAAT3, TvAAT4 und TvAAT5) konnte unter Verwendung des Substrats Geraniol und dem Cosubstrat Acetyl-CoA eine katalytische Aktivität festgestellt werden, während TvAAT2, TvAAT6 inaktiv sind. Da die Sequenz von TvAAT2 nicht ganz vollständig amplifiziert werden konnte, ist möglicherweise hier die Inaktivität durch den verkürzten C-Terminus zu erklären. Neben Geraniol wurden noch weitere Monoterpensubstrate getestet (Linalool, α -Terpineol, Thymol und Carvacrol). Im ätherischen Öl von *T. vulgaris* können die Acetate von Geraniol, Linalool, α -Terpineol in hohen Mengen detektiert werden. Laut verschiedener Literatur, können jedoch sowohl Thymyl- als auch Carvacrylacetat in Spuren vorkommen (Hudaib *et al.* 2002, Raal *et al.* 2005). Jedoch sind weder Thymyl- als auch Carvacrylacetat im ätherischen Öl der in Halle kultivierten *T. vulgaris*-Pflanzen messbar. Nur TvAAT3 ist in der Lage mehrere Substrate zu akzeptieren und setzt neben Geraniol auch Thymol, Carvacrol sowie Borneol zum entsprechenden Acetat um. Die anderen Enzyme (TvAAT1, TvAAT4 und TvAAT5) akzeptieren von den getesteten Substanzen nur Geraniol als Substrat und sind somit sehr spezifisch aktiv. Wenn man diese Erkenntnis mit dem Produktspektrum anderer Mitglieder der BAHD-Enzymfamilie vergleicht, ist die hohe Spezifität der Thymian-Acetyltransferasen außergewöhnlich. PtSABT und PtBEBT, zwei Acyltransferasen aus *Populus trichocarpa* akzeptieren mindestens acht bzw. fünf unterschiedliche Alkohol-Substrate und übertragen entweder Acetyl-, Benzoyl-, bzw. Cinnamoyl-Gruppen auf den jeweiligen Akzeptor (Chedgy *et al.*, 2015). Die identifizierten CmAAT-Enzyme aus *Cucumis melo* sind in der Lage mindestens 11 verschiedene Substrate umzusetzen (El-Sharkawy *et al.*, 2005). Die aus Apfel (*Malus pumila* cv. Royal Gala) stammende Acyltransferase MpAAT1 setzt ebenfalls bis zu 30 unterschiedliche Alkohole um (Souleyre *et al.*, 2005).

Im Genom von *T. vulgaris* existieren somit mindestens vier unterschiedliche Gene, die die gleiche biochemische Reaktion katalysieren. Dass mehrere Enzyme redundante Aktivitäten haben, ist für die Terpenbiosynthese in *T. vulgaris* bereits zuvor beobachtet worden.

Die Terpensynthasen TvTPS3 und TvTPS4 aus dem Linalool-Typ synthetisieren beide ausschließlich das Hauptmonoterpen Linalool (Schimmel, 2014). TvTPS6 und TvTPS7, zwei Terpensynthasen aus dem *trans*-Sabinenhydrat-Typ, bilden ebenfalls beide das Hauptmonoterpen *trans*-Sabinenhydrat (Krause *et al.*, 2013). Bei weiterführenden Untersuchungen ergab sich jedoch, dass TvTPS3 und TvTPS4 ein unterschiedliches Expressionsmuster innerhalb der sechs Chemotypen aufweisen und TvTPS6 bzw. TvTPS7 unterschiedliche Präferenzen in der Stereochemie des Substrats besitzen (Schimmel, 2014; Krause *et al.* 2013). Sarker & Mahmoud (2015) identifizierten zwei Acetyltransferasen der BAHD-Familie in *L. x intermedia* (LiAAT-3 und LiAAT-4), die ebenfalls die gleichen Substrate umsetzen. In diesem Fall, wurde für LiAAT-4 eine bessere katalytische Effektivität festgestellt. Die Expressionsanalyse der Thymian-Acetyltransferasen ergab, dass alle vier aktiven Gene im Geraniol-Typ exprimiert werden und somit an der Biosynthese von Geranylacetat beteiligt sein könnten. Weiterhin wurden im Rahmen dieser Arbeit die kinetischen Parameter (K_m und V_{max}) von TvAAT3 bestimmt. Um jedoch eine Aussage über eventuell unterschiedliche Effizienzen der vier Enzyme zu treffen, müssen weitere Untersuchungen bezüglich der kinetischen Parameter für TvAAT1, TvAAT4 und TvAAT5 durchgeführt werden.

Möglich ist ebenfalls, dass die identifizierten Proteine weitere, noch unbekannt Funktionen ausüben bzw. ein weiteres Produktspektrum als bisher bekannt besitzen. Eventuell ist die Umsetzung von Geraniol zu Geranylacetat bei einigen der untersuchten Enzyme unspezifisch und entspricht nicht der eigentlichen Funktion des Enzyms. Davidovich-Rikanati *et al.* (2007) zeigten, dass die Expression einer Geraniol-Synthase in Tomate, welche ursprünglich aus Basilikum (*Ocimum basilicum*) stammt, zur Bildung von Geranylacetat in der Pflanze führt. Verantwortlich für die Acetylierung sind vermutlich endogene Acyltransferasen der Tomate, die unspezifisch das neue Substrat umsetzen.

4.3.2 Das Produktspektrum von TvAAT3 ist abhängig vom Expressionssystem

Für die funktionelle Charakterisierung der Acetyltransferasen aus Thymian wurden die jeweiligen Gene in *E. coli* exprimiert. Dieses heterologe Expressionssystem wurde vielfältig als effektive Standardmethode für die Untersuchung unterschiedlichster Enzymklassen beschrieben, darunter auch oft für die BAHD-Enzymfamilie (Shalit *et al.*, 2003; Souleyre *et al.*, 2005; Fischer *et al.*, 2013; Burke *et al.*, 2004). Es ist jedoch bekannt, dass sich die Synthese und die posttranslationale Modifikation der Proteine sowie die Beschaffenheit der

Zellen, z.B. das Vorhandensein verschiedener Zellkompartimente oder Transit-Peptide, zwischen Bakterien und höheren Pflanzen unterscheidet (Bach *et al.*, 2014, Young *et al.*, 2004). Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Acyltransferasen daher zusätzlich transient in Tabak, einem gut charakterisierten pflanzlichen Expressionssystem exprimiert.

Es konnte gezeigt werden, dass alle in *E. coli* aktiven Enzyme in Tabak ebenfalls das Substrat Geraniol umsetzen konnten. Werden α -Terpineol und Linalool als Substrat in dem Enzymassay eingesetzt, zeigen TvAAT1, TvAAT4 und TvAAT5 das gleiche Produktspektrum sowohl transient in Tabak als auch heterolog in *E. coli*. Die Umsetzung zu den Acetaten α -Terpinylacetat und Linalylacetat war in beiden Fällen nicht nachweisbar. TvAAT3 allein weist ein anderes Produktspektrum auf, da es in Tabak das Substrat Linalool in geringen Mengen zu Linalylacetat umsetzen kann. Dass sich das Produktspektrum nach Expression in verschiedenen Expressionssystemen unterscheidet, wurde schon für einige Enzyme nachgewiesen. Die Geraniolsynthase (GES) aus *Ocimum basilicum* wurde neben *E. coli* zusätzlich in *Vitis vinifera*, *A. thaliana*, Tabak sowie in Hefe exprimiert. Die Anzahl der isolierten Monoterpene reicht von nur einem Terpen (Geraniol in *A. thaliana*) bis hin zu vier verschiedenen Substanzen (z.B. Geraniol, Linalool, Citronellol und α -Terpineol in *E. coli*) (Fischer *et al.*, 2013). Auch die Acyltransferase MpAAT1 der BAHD-Familie (aus *M. pumila* (cv. Royal Gala)) zeigt ein anderes Produktspektrum, abhängig davon ob es in *E. coli* oder Tabak exprimiert wurde (Souleyre *et al.*, 2005).

Die in den oben genannten Veröffentlichungen beschriebenen Unterschiede in den Expressionssystemen sind vergleichbar mit dem Ergebnis dieser Arbeit und durchaus zu erwarten, da die Prozessierung von Proteinen in eukaryotischen Zellen weitaus komplexer ist als in prokaryotischen Systemen. Es könnten veränderte posttranslationale Modifizierungen bestehen, was zu leicht unterschiedlichen Konformationen des Proteins und somit auch zu veränderten Aktivitäten führen kann (Young *et al.*, 2004; Fischer *et al.*, 2012). Ebenso könnten Faktoren innerhalb der Zelle diese Veränderungen verursachen. In Hinblick auf die detektierten Unterschiede bezüglich des Produktspektrums, wäre es wichtig, die als inaktiv eingestuften Enzyme (TvAAT2 und TvAAT6) ebenfalls in Tabak zu exprimieren. Anhand dieser Untersuchung könnte geprüft werden, ob die Acetyltransferasen unter den veränderten Expressionsbedingungen im pflanzlichen Organismus doch Enzymaktivitäten aufweisen. Des Weiteren wäre es in weiterführenden Studien angebracht, die zu testenden Substrate nicht mit Hilfe von Vakuum in die Zelle einzubringen. Diese Methode zur Bereitstellung des Substrates, stört sehr wahrscheinlich die Integrität der Pflanzenzelle. Besser wäre die Coexpression der jeweiligen Terpensynthasen zusammen mit den identifizierten

Acetyltransferasen in Tabak, wodurch eine natürlichere Verfügbarkeit des Substrats gegeben wäre.

Aufgrund der zwar detektierbaren aber dennoch sehr geringen katalytischen Aktivität von TvAAT3 unter Verwendung von Linalool als Substrat ist es denkbar, dass TvAAT3 in der Pflanze nicht ausschließlich für diesen Biosyntheseschritt verantwortlich ist, sondern mindestens noch ein weiteres Enzym an der Synthese von Linalylacetat beteiligt ist.

4.3.3 Es konnte keine α -Terpineol-Acetyltransferase identifiziert werden

Im ätherischen Öl der Chemotypen L und A von *T. vulgaris* können große Mengen an Linalylacetat bzw. α -Terpinylacetat detektiert werden. Ein oder mehrere Enzyme, die die Acetylierung der entsprechenden Monoterpene katalysieren, konnte bisher allerdings nicht identifiziert werden, trotz der hohen Anzahl an potentiellen Acyltransferase-Genen der BAHD-Familie, die in der Transkriptom-Datenbank identifiziert wurden. TvAAT3 kann zwar in Tabak Spuren von Linalylacetat synthetisieren, aber ist möglicherweise nicht ausreichend für die Produktion der in *T. vulgaris* gefundenen Acetate. Betrachtet man die Struktur der Monoterpene, welche in *T. vulgaris* auch in ihrer acetylierten Form vorkommen, so gibt es deutliche Unterschiede in ihrer Komplexität. Geraniol, welches problemlos von allen aktiven TvAATs umgesetzt werden kann, stellt einen primären Alkohol dar, während Linalool und α -Terpineol tertiäre Alkohole sind (Abb. 4.1). Es wird vermutet, dass sich die Struktur bzw. der Reaktionsmechanismus einer Linalool-Acetyltransferase von den Enzymen unterscheidet, die primäre bzw. sekundäre Alkohole umsetzen (Sarker & Mahmoud, 2015). Auch Larkov *et al.* (2008) weist darauf hin, dass kurze aliphatische bzw. weniger komplexe Alkohole sehr einfach von einer großen Anzahl der bereits charakterisierten AATs umgesetzt werden können, während die Fähigkeit tertiäre Alkohole umzusetzen weitaus spezifischer ist. Neben Thymian finden sich tertiäre Monoterpenacetate wie Linalylacetat, α -Terpinylacetat oder auch Sabinenhydratacetat z.B. auch in verschiedenen Arten von Oregano (*Origanum spec.*), Minze (*Metha spec.*) oder Salbei (*Salvia spec.*) (Larkov *et al.*, 2008; Sarker & Mahmoud, 2015). Nach aktuellem Wissensstand, ist bisher kein Enzym isoliert und charakterisiert worden, welches Linalool bzw. α -Terpineol acetylieren kann. Alle beschriebenen und untersuchten enzymatischen Reaktionen wurden bisher mit Zellextrakten nachgewiesen und das Vorhandensein eines spezifischen Enzyms postuliert (Zaks *et al.*, 2008; Larkov *et al.*, 2008). Da im Rahmen dieser Arbeit nur die Transkriptom-Daten der Chemotypen G, C und T analysiert und für die Suche nach Acyltransferasen genutzt werden konnten, ist es möglich,

dass Gene, welche exklusiv im A- oder L-Typ exprimiert werden, nicht erfasst wurden. Eine Transkriptomsequenzierung dieser Chemotypen wird aktuell durchgeführt und verspricht die Identifikation von Linalool- bzw. α -Terpineol-Acetyltransferasen.

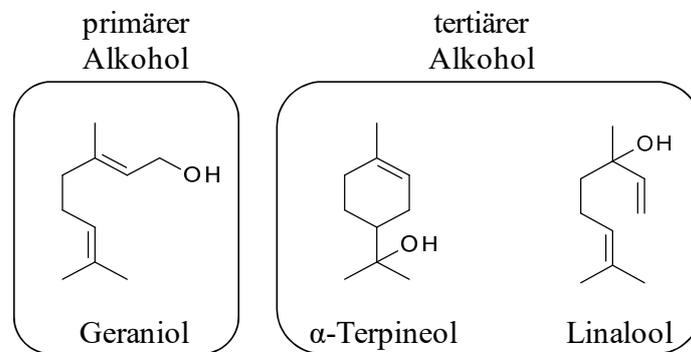


Abb. 4.1: Primäre und tertiäre Monoterpenalkohole, welche in *T. vulgaris* zu den entsprechenden Monoterpenacetaten umgesetzt werden.

4.4 TvAATs besitzen möglicherweise noch weitere Funktionen

Im Zuge der Charakterisierung der vier katalytisch aktiven Acetyltransferasen (TvAAT1, TvAAT3, TvAAT4 und TvAAT5) wurden Expressionsstudien mit den jeweiligen Genen durchgeführt, um mögliche Unterschiede, bezüglich ihrer Chemotyp-, Organ- oder Jahreszeit-spezifischen Expression, zu erkennen. Eine bedeutende Erkenntnis dieser Studien ist, dass die vier Enzyme in allen Chemotypen im Blatt exprimiert werden. Es war somit keine exklusiv Chemotyp-spezifische Expression zu erkennen, während im Vergleich dazu, z.B. für die Terpensynthasegene in *T. vulgaris*, welche für die Synthese der spezifischen Hauptmonoterpene der sechs Chemotypen verantwortlich sind, eine starke Korrelation mit dem Auftreten des Produktes im ätherischen Öl festgestellt wurde (Schimmel, 2014). Die vier Acetyltransferasen setzten hauptsächlich Geraniol zu Geranylacetat um, jedoch ist das Produkt in messbaren Mengen nur im Geraniol-Typ zu finden. Für keins der getesteten Gene gibt es aber eine auffällig erhöhte Expression im G-Typ. *Tvaat1* wird sogar im A-Typ, der weder Geraniol noch Geranylacetat bildet, signifikant höher exprimiert als im G-Typ. Auch *tvaat4* ist im L-Typ wesentlich höher exprimiert als im G-Typ, obwohl das Protein augenscheinlich nur Geraniol umsetzt. Weiterhin ist auffällig, dass TvAAT3, welches bei Vorhandensein des jeweiligen Substrats Thymyl- bzw. Carvacrylacetat bilden kann, zwar sowohl im T- als auch im C-Typ exprimiert wird, aber die Produkte im ätherischen Öl nicht detektiert wurden. All dies lässt vermuten, dass die nachgewiesene Aktivität der TvAAT-

Enzyme nicht die alleinige Funktion sein kann und sie noch weitere, bisher unbekannte Funktionen, ausüben. Da ausschließlich die flüchtigen Stoffe von *T. vulgaris* Gegenstand der Untersuchungen waren, wurden auch nur Methoden verwendet, die explizit Volatile detektieren können. Es ist allerdings denkbar, dass die isolierten Enzyme auch nicht-volatile Produkte bilden können, die mit den in dieser Arbeit verwendeten Methoden nicht gemessen bzw. die entsprechenden Substrate nicht getestet wurden. Der Familie der BAHD-Acyltransferasen sind auch diverse Enzyme zugehörig, die nicht-flüchtige acetylierte Verbindungen herstellen und der gleichen Klade (III, V) angehören (D'Auria, 2006; Suzuki *et al.*, 2004; Grothe *et al.*, 2001; Okada *et al.*, 2005). Schillmiller *et al.* (2012) isolierten eine BAHD-Acyltransferase, welche Acylzucker zur Insektenabwehr in Tomaten-Trichomen herstellt. Auch für Thymian ist es denkbar, dass andere Verbindungen wie z.B. Flavonoid-Glykoside oder Flavonoid-Aglykone acyliert werden. In den Thymianarten *T. hirtus* und *T. serpyllum* wurden solche Acyl-Verbindungen schon detektiert (Vila, 2002).

Was die Organspezifität der TvAAT-Gene betrifft, ist die Transkriptmenge im Blatt entweder signifikant höher (für *tvaat1*, *tvaat3*, *tvaat5*: A- und L-Typ) als in der Blüte oder die Expression ist ähnlich hoch bzw. ist kein signifikanter Unterschied zu erkennen (*tvaat1-4*: G-Typ, *tvaat4*: L-Typ). Da von *tvaat3* in der Blüte kaum Transkripte messbar waren, ist dieses Gen sogar sehr wahrscheinlich exklusiv im Blatt exprimiert. Auch andere BAHD-Enzyme zeigen deutliche Organspezifität. BEBT, eine Acyltransferase aus *Clarkia breweri*, ist ausschließlich in verschiedenen Teilen der Blüte exprimiert und nur bei Herbivorie kommt es zu einer Induktion des Gens in den Blättern (D'Auria *et al.*, 2002). Auch die Expression von *rhaat1*, das Gen der Geraniol-Acetyltransferase aus Rose (*Rosa hybrida*) ist blütenspezifisch (Shalit *et al.*, 2003). Sowohl Benzylbenzoat als auch Geranylacetat, die jeweiligen Produkte der beiden blütenspezifischen Proteine, sind für deren Pflanze wichtige Komponenten der flüchtigen Blütenduftstoffe. Über die Funktion von Geranylacetat und der anderen in Thymian gemessenen acetylierten Verbindungen kann an dieser Stelle nur spekuliert werden. Eventuell spielt im Blatt eine gewisse antibakterielle Funktion dieser Verbindungen eine Rolle, während in der Blüte die Acetate eher der Anlockung von Bestäubern dienen. Einige Studien weisen einzelnen Monoterpenacetaten (z.B. Linalylacetat, Geranylacetat, Nerylacetat) antibiotische Wirkung nach (Hinou *et al.*, 1989; Trombetta *et al.*, 2005). Es wurde jedoch schon mehrfach gezeigt, dass die acetylierten Monoterpene deutlich geringer wirksam sind als die nicht acetylierten Monoterpene (Wiese *et al.*, 2018; Trombetta *et al.*, 2005; Dorman und Deans, 2000; van Zyl *et al.* 2006). Daher könnte man vielleicht eher von einer unterstützenden antibiotischen Funktion der Monoterpenacetate im Blatt sprechen.

Weiterführende Untersuchungen sind nötig, um Expressionsunterschiede zu spezifizieren. Neben Blatt und Blüte sollten auch andere Organe, wie Wurzel oder Stängel hinsichtlich der Transkriptmenge der TvAAT- Gene untersucht werden. Auch eine detailliertere Expressionsanalyse in verschiedenen Blütenkomponenten (Kelchblätter, Kronblätter, Blütenboden, Griffel oder Staubblätter) wäre sinnvoll, um mit der Analyse einer möglichen Funktion dieser Gene voran zu kommen.

Jahreszeitliche Unterschiede in der Expression der TvAAT-Gene sind zwar deutlich erkennbar (Abb. 3.7) jedoch aufgrund der experimentellen Durchführung nur wage interpretierbar. Eine Wiederholung der Expressionsanalyse aller Gene im jahreszeitlichen Verlauf in einem zusammenhängenden Experiment wäre angebracht, um diesbezüglich eine gesicherte Aussage zu treffen.

4.5 Monoterpene und ihre Acetate in Pollen und Nektar

4.5.1 Monoterpene sind in Nektar und Pollen nachweisbar

Aus der quantitativen Analyse der Nektar- und Pollenproben von *T. vulgaris* geht hervor, dass es deutliche Unterschiede zwischen den Konzentrationen der Terpene in diesen beiden Blütenprodukten gibt. Der höchste gemessene Wert im Nektar ist für Thymol im T-Typ mit 7,67 ppm zu finden, während die anderen Terpene in den anderen Chemotypen im Bereich zwischen 0,99 und 2,83 ppm liegen. Zumindest für Thymol wurden Werte in einer aktuellen Studie gemessen, welche gut mit den in dieser Arbeit gemessenen Werten übereinstimmen (8,2 ppm) und das, obwohl andere Extraktionsmethoden verwendet wurden (Palmer-Young *et al.*, 2016). Währenddessen sind die Konzentrationen im Pollen für alle gemessenen Proben um mindestens eine Zehnerpotenz höher, für einige sogar mehr als zwei (α -Terpinylacetat, Linalool). Auch Palmer-Young und seine Kollegen (2017) zeigten höhere Konzentrationen von Terpenen und anderen sekundären Pflanzenstoffen in Pollen gegenüber dem Nektar. Bei einigen Chemotypen war es nicht möglich Pollenkonzentrationen zu ermitteln, da diese Pflanzen auf dem Versuchsfeld in Halle nur weibliche Blüten ohne Pollensäcke ausbildeten. Rennich *et al.* (2013) veröffentlichten Thymol-Konzentrationen in Pollenproben, welche im Bereich zwischen 0,0263-55,8 ppm lagen und somit gut zu den Werten dieser Arbeit passen.

Der Nektar und Pollen wird von der Honigbiene gesammelt und im Bienenstock als Vorrat eingelagert. Die direkt von der Pflanze und frisch gemessenen Konzentrations-Werte in Nektar und Pollen können stark von denen im Bienenstock abweichen, je nachdem wie die

Lagerung bzw. Verarbeitung durch die Bienen erfolgt (Wiese *et al.*, 2018). Die Lagerung des Nektars kann zum Andicken durch Wasserverlust führen, was eine Aufkonzentrierung der Substanzen zur Folge hätte. Auf der anderen Seite sind die untersuchten Terpene stark flüchtig und könnten schnell in die Umgebung evaporieren und somit die Konzentration verringern (Park, 1925). Weiterführende Experimente hierzu sollten eine detaillierte Analyse der Terpenkonzentrationen in Thymianhonig berücksichtigen, um diese Werte mit denen des Pollen bzw. Nektars zu vergleichen. Bisher gibt es nur wenige Studien, die Terpene in Honig quantifiziert haben. Die gemessenen Werte sind recht gering und werden entweder prozentual zur absoluten Peakfläche (0,9 % Carvacrol, 0,1 % Linalool, 0,1 % α -Terpineol, 0,1 % Thymol) oder besser vergleichbar in ppm (z.B. max. 0,017 ppm Carvacrol oder 0,018 ppm Thymol) angegeben (Alissandrakis *et al.*, 2007; Castro-Vázquez *et al.*, 2009). Werte die etwas höher als diese sind, wurden von Nozal *et al.* (2002) veröffentlicht und liegen für Thymol in Thymianhonig bei 0,27 ppm bzw. 0,12-0,36 ppm in Nicht-Thymian-Honig. Diese recht stark voneinander abweichenden Werte für dieselbe Substanz kommen sehr vermutlich durch unterschiedliche Lagerungsformen der Imker für ihren Honig zustande. Je nach Temperatur, Lichtintensität oder Lagerungsdauer kommt es mehr oder weniger zu einem Evaporieren der flüchtigen ätherischen Öle (Wiese *et al.*, 2018).

4.5.2 Die ermittelten Konzentrationen der Monoterpene in Nektar und Pollen sind wirksam gegen Bienenpathogene

Im Zuge einer Kooperation mit der Forschungsgruppe Molekulare Ökologie (MLU Halle-Wittenberg, Bereich Zoologie) wurden unter der Leitung von PD Dr. Silvio Erler die antimikrobielle Aktivität der Hauptmonoterpene und deren Acetate aus *T. vulgaris* auf verschiedene Bienen-assoziierte Pathogene getestet. Die detektierten inhibitorischen Effekte der Substanzen sind in Abb. 4.2 dargestellt (aus Wiese *et al.*, 2018).

Die phenolischen Verbindungen Thymol und Carvacrol zeigen dabei den größten negativen Effekt auf das Bakterienwachstum. Schon niedrige Konzentrationen von 100-300 ppm (MHK, Minimale Hemm-Konzentration) konnten bei *P. alvei*, *P. dendritiformis* und *E. coli* eine vergleichbare Wachstumshemmung erzielen, wie schon für das gesamte ätherische Öl gezeigt wurde (Alippi *et al.*, 1996; Floris *et al.*; 1996). Dieser starke Effekt im Vergleich zu den anderen Substanzen, könnte mit ihrer phenolischen Struktur zusammenhängen. Generell scheint die chemische Beschaffenheit bzw. chemische Modifikationen einen großen Einfluss auf die Wirksamkeit der getesteten Substanzen zu haben. Die Acetylierung der Terpene Geraniol, α -Terpineol und Linalool führt zu einer vollständigen Inaktivierung des

inhibitorischen Effekts. Eine Ausnahme bildet hier *M. plutonius* der allerdings ebenfalls eine deutlich geringere Wachstumshemmung zeigt, sobald statt des Terpens die acetylierte Substanz eingesetzt wird. Auch bei Pilzen wurde solch ein Effekt, ausgelöst durch die Acetylierung der Substanz, beschrieben (Dorman und Deans, 2000; van Zyl *et al.* 2006). Eine aktuelle Studie konnte zeigen, dass eine Korrelation zwischen der chemischen Struktur (Acylgruppenlänge) von Dihydroflavonolen und ihrer antibiotischen Aktivität in Propolis existiert (Wilson *et al.*, 2017). Die Erkenntnisse, beruhend auf der Analyse der verschiedenen Monoterpene aus *T. vulgaris* bezüglich ihrer antimikrobiellen Aktivität (Abb. 4.2), deuten darauf hin, dass es ebenfalls einen Zusammenhang zwischen chemischer Struktur und Effektivität gegenüber Bakterien gibt (Wiese *et al.*, 2018).

Wodurch genau die antibiotischen Eigenschaften der Terpene zustande kommen, wurde schon in einigen Studien untersucht. Bennis *et al.* (2004) publizierten, dass Thymol und Eugenol zu Veränderungen der Zellwand und Zellmembran von Hefen führen und somit eine antimykotische Wirkung erzeugen. An Bakterien wurden ebenfalls verschiedene Substanzen (z.B. Thymol und Linalylacetat) getestet, welche die bakterielle Zellmembran zerstören und somit deren Permeabilität verändern (Rhayour *et al.*, 2003; Trombetta *et al.*, 2005).

Bezüglich der Effektivität der Substanzen des ätherischen Öls aus Nektar und Pollen von *T. vulgaris* auf verschiedene Bienenpathogene bleibt noch die Frage offen, ob dieselben Verbindungen, wenn sie an Larven verfüttert werden, derartige Wirkung erzielen, dass sie einen Befall von EFB bzw. AFB reduzieren oder sogar kurieren können. Derartige Untersuchungen stehen noch aus. Dabei sollte jedoch berücksichtigt werden, dass Unterschiede zwischen den ermittelten IC₅₀-Werten und der Konzentration der einzelnen Substanzen in Nektar und Pollen existieren (Wiese *et al.*, 2018). Daher sollte die tatsächliche Konzentration der Substanzen im Larvenfutter unter natürlichen Bedingungen untersucht werden. Durch eine Kombination von Pollen und Nektar im Larvenfutter oder die Akkumulation der Terpene bei der Produktion von Honig könnte die hohe *in vitro*-Konzentration erreicht werden. Da aber auf der anderen Seite auch synergistische oder additive Effekte von verschiedenen kombinierten Substanzen eine Rolle spielen könnten (Pei *et al.*, 2009; Iten *et al.*, 2009), ist es möglich, dass sich *in vitro* IC₅₀-Werte von den *in vivo* IC₅₀-Werten unterscheiden.

Weiterhin sollte bei fortführenden Untersuchungen berücksichtigt werden, dass antibakteriell wirksame Substanzen ebenfalls den Bienen bzw. Bienenlarven selbst schaden. Toxische Konzentrationen des ätherischen Öls von *T. vulgaris* für adulte Bienen liegen je nach Studie bei >10000 ppm (Detzel *et al.*, 1993) bzw. 8900 ppm (LD₅₀) (Grobov *et al.*, 1981) und somit

über den ermittelten IC_{50} -Werten der sechs nicht-acteylierten Terpene (Abb. 4.2). Die toxische Wirkung der Einzelsubstanzen kann sich allerdings von der Gesamtheit des ätherischen Öls unterscheiden. Auch gibt es sowohl Unterschiede zwischen adulten Bienen und Larven, bezüglich ihrer Sensitivität (Ebert *et al.*, 2007; Palmer-Young *et al.* 2017) als auch veränderte Effekte bei kurzzeitiger bzw. chronischer Exposition (Charpentier *et al.*, 2014). Larven sind demnach sensitiver gegenüber den Substanzen des ätherischen Öls und die kurzzeitige Exposition schadet weniger als die chronische. Als Einzelsubstanz wurde von den 9 untersuchten Terpenen bisher nur Thymol auf seine toxische Wirkung untersucht (Charpentier *et al.*, 2014). Die chronische Toxizität von Thymol auf Honigbienenlarven lag bei dieser Studie bei 703 ppm (LD_{50}).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Nektar und Pollen von *T. vulgaris* wahrscheinlich ausreichend hohe Mengen an für ihn typische Monoterpene besitzen um potentiell eine Aktivität gegenüber Bienenpathogene (Erreger der EFB und damit assoziierte Bakterien) zu zeigen.

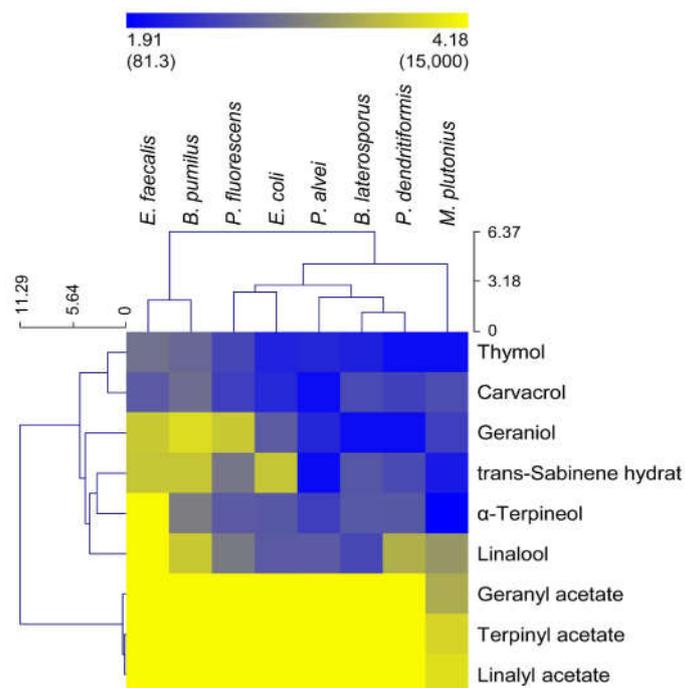


Abb. 4.2: Antimikrobielle Aktivität der Hauptterpene des ätherischen Öls von *T. vulgaris*. Aktivitäten sind für *M. plutonius*, Europäische Faulbrut-assoziierte Bakterien (*B. laterosporus*, *B. pumilus*, *E. faecalis*, *P. alvei* und *P. dendritiformis*) und zwei nicht Bienen-assoziierte Bakterien (*E. coli* und *P. fluorescens*) in IC_{50} -Werten angegeben (log-transformierte Skala und nicht transformierte ppm-Werte (in Klammern)). Die Werte definieren das Wachstum basierend auf der Wachstumsrate ($n=5$, für jede Spezies und jedes Terpen). Hellgelb zeigt an, dass die Substanz keine Wachstumshemmung der Bakterien verursachte. Das Dendrogramm (für Bakterien und Substanzen) wurde mittels hierarchische Cluster-Analyse erstellt (Manhattan-Distanz, „Average linkage clustering“) (Wiese *et al.*, 2018).

5 Literaturverzeichnis

- Alippi, A.M., Ringuelet, J.A., Cerimele, E.L., Re, M.S. & Henning, C.P.** (1996). Antimicrobial activity of some essential oils against *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American foulbrood disease. *J. Herbs Spices Med. Plants* **4**, 9-16.
- Alissandrakis, E., Tarantilis, P. A., Harizanis, P. C., & Polissiou, M.** (2007). Comparison of the volatile composition in thyme honeys from several origins in Greece. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*(20), 8152–8157.
- Arnan, X., Escolà, A., Rodrigo, A., & Bosch, J.** (2014). Female reproductive success in gynodioecious *Thymus vulgaris* : pollen versus nutrient limitation and pollinator foraging behaviour, 395–408.
- Bach, S. S., Bassard, J.-étienne, Andersen-ranberg, J., Møldrup, M. E., Simonsen, H. T., & Hamberger, B.** (2014). Plant Isoprenoids, *1153*, 245–255.
- Bailey, L.** (1983). *Melissococcus pluton*, the cause of European foulbrood of honey bees (*Apis* spp.). *J. Appl. Bacteriol.* *55*, 65–69.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M.** (2008). Biological effects of essential oils - A review. *Food and Chemical Toxicology*, *46*(2), 446–475.
- Baldwin, I. T., Halitschke, R., Paschold, A., Von Dahl, C. C., & Preston, C. A.** (2006). Volatile signaling in plant-plant interactions: “Talking trees” in the genomics era. *Science*, *311*(5762), 812–815.
- Bennis, S., Chami, F., Chami, N., Bouchikhi, T. & Remmal, A.** (2004) Surface alteration of *Saccharomyces cerevisiae* induced by thymol and eugenol. *Lett. Appl. Microbiol.* **38**, 454-458.
- Bohlmann, J., Meyer-Gauen, G., & Croteau, R.** (1998). Plant terpenoid synthases: molecular biology and phylogenetic analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(8), 4126–4133.
- Bontpart, T., Cheynier, V., Ageorges, A., & Terrier, N.** (2015). BAHD or SCPL acyltransferase? What a dilemma for acylation in the world of plant phenolic compounds. *New Phytologist*, *208*(3), 695–707.
- Burhenne, K., Kristensen, B. K., & Rasmussen, S. K.** (2003). A new class of N-hydroxycinnamoyltransferases: Purification, cloning, and expression of a barley agmatine coumaroyltransferase (EC 2.3.1.64). *Journal of Biological Chemistry*, *278*(16), 13919–13927.
- 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. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *422*(1), 52–60.
- Castro-Vázquez, L., Díaz-Maroto, M. C., González-Viñas, M. A., & Pérez-Coello, M. S.** (2009). Differentiation of monofloral citrus, rosemary, eucalyptus, lavender, thyme and heather honeys based on volatile composition and sensory descriptive analysis. *Food Chemistry*, *112*(4), 1022–1030.
- Charpentier, G., Vidau, C., Ferdy, J.B., Tabart, J. & Vetillard, A.** (2014). Lethal and sub-lethal effects of thymol on honeybee (*Apis mellifera*) larvae reared *in vitro*. *Pest Manag. Sci.* **70**, 140-147
- Chedgy, R. J., Köllner, T. G., & Constabel, C. P.** (2015). Functional characterization of two acyltransferases from *Populus trichocarpa* capable of synthesizing benzyl benzoate and salicyl benzoate, potential intermediates in salicinoid phenolic glycoside biosynthesis. *Phytochemistry*.
- D’Auria, J. C.** (2006). Acyltransferases in plants: a good time to be BAHD. *Current Opinion in Plant Biology*.

- D'Auria, J. C., Chen, F., & Pichersky, E.** (2002). Characterization of an Acyltransferase Capable of Synthesizing Benzylbenzoate and Other Volatile Esters in Flowers and Damaged Leaves of *Clarkia breweri*.
- Davidovich-Rikanati, R., Sitrit, Y., Tadmor, Y., Iijima, Y., Bilenko, N., Bar, E., ... Lewinsohn, E.** (2007). Enrichment of tomato flavor by diversion of the early plastidial terpenoid pathway. *Nature Biotechnology*, 25(8), 899–901.
- Degenhardt J., Hiltbold I., Köllner T.G., Frey M., Gierl A., Gershenzon J., Hibbard B.E., Ellersieck M.R., Turlings T.C.J.** (2009). Restoring a maize root signal that attracts insect-killing nematodes to control a major pest. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 106: 13213–13218.
- Detzel, A. & Wink, M.** (1993). Attraction, deterrence or intoxication of bees (*Apis mellifera*) by plant allelochemicals. *Chemoecology* 4, 8-18.
- Dorman, H.J. & Deans, S.G.** (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.* 88, 308-316.
- Dudareva, N., D'Auria, J. C., Nam, K. H., Raguso, R. A., & Pichersky, E.** (1998). Acetyl-CoA:benzylalcohol acetyltransferase - An enzyme involved in floral scent production in *Clarkia breweri*. *Plant Journal*, 14(3), 297–304.
- Dudareva, N., Klempien, A., Muhlemann, J. K., & Kaplan, I.** (2013). Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. *New Phytologist*, 198(1), 16–32.
- Ebert, T. A., Kevan, P. G., Bishop, B. L., Kevan, S. D., & Downer, R. A.** (2007). Oral toxicity of essential oils and organic acids fed to honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Apicultural Research*, 46(4), 220–224.
- Eisenreich, W., Schwarz, M., Cartayrade, A., Arigoni, D., Zenk, M. H., & Bacher, A.** (1998). The deoxyxylulose phosphate pathway of terpenoid biosynthesis in plants and microorganisms. *Chemistry and Biology*, 5(9).
- El-Sharkawy, I., Manríquez, D., Flores, F. B., Regad, F., Bouzayen, M., Latché, A., & Pech, J. C.** (2005). Functional characterization of a melon alcohol acyl-transferase gene family involved in the biosynthesis of ester volatiles. Identification of the crucial role of a threonine residue for enzyme activity. *Plant Molecular Biology*, 59(2), 345–362.
- Erler, S., Denner, A., Bobiş, O., Forsgren, E., & Moritz, R. F. A.** (2014). Diversity of honey stores and their impact on pathogenic bacteria of the honeybee, *Apis mellifera*. *Ecology and Evolution*, 4(20), 3960–3967.
- Erler, S., & Moritz, R. F. a.** (2016). Pharmacophagy and pharmacophory: mechanisms of self-medication and disease prevention in the honeybee colony (*Apis mellifera*). *Apidologie*, 389–411.
- Fischer, M. J. C., Meyer, S., Claudel, P., Perrin, M., Ginglinger, J. F., Gertz, C., ... Karst, F.** (2013). Specificity of *Ocimum basilicum* geraniol synthase modified by its expression in different heterologous systems. *Journal of Biotechnology*, 163(1), 24–29.
- Floris, I., Carta, C. & Moretti, M.D.L.** (1996) Activités *in vitro* plusieurs huiles essentielles sur *Bacillus larvae* White et essai au rucher. *Apidologie* 27, 111-119.
- Forsgren, E.** (2010). European foulbrood in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103, S5–S9.
- Fujiwara, H., Tanaka, Y., Yonekura-Sakakibara, K., Fukuchi-Mizutani, M., Nakao, M., Fukui, Y., ... Kusumi, T.** (1998). cDNA cloning, gene expression and subcellular localization of anthocyanin 5-aromatic acyltransferase from *Gentiana triflora*. *Plant Journal*, 16(4), 421–431.

- Genersch, E., Forsgren, E., Pentikäinen, J., Ashiralieva, A., Rauch, S., Kilwinski, J., & Fries, I.** (2006). Reclassification of *Paenibacillus larvae* subsp. *pulvifaciens* and *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* as *Paenibacillus larvae* without subspecies differentiation. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(3), 501–511.
- Gherman, B. I., Denner, A., Bobiş, O., Dezmirean, D. S., Mărghitaş, L. A., Schlüns, H., ... Erler, S.** (2014). Pathogen-associated self-medication behavior in the honeybee *Apis mellifera*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 68(11), 1777–1784.
- González-Teuber, M., & Heil, M.** (2009). Nectar chemistry is tailored for both attraction of mutualists and protection from exploiters. *Plant Signaling and Behavior*, 4(9), 809–813.
- Gouyon, P. H., Vernet, P., Guillerm, J. L., & Valdeyron, G.** (1986). Polymorphisms and environment: the adaptive value of the oil polymorphisms in *Thymus vulgaris* L. *Heredity*, 57(September 1985), 59–66.
- Granger R, Passet J, Verdier R** (1963) Diversité des essences de *Thymus vulgaris* L. La France et ses Parfums **225**
- Granger, R., & Passet, J.** (1973). *Thymus vulgaris* spontane de France: Races chimiques et chemotaxonomie. *Phytochemistry*, 12(7), 1683–1691.
- Grobov, O.F., Mikitiuk, V.C. & Guseva, L.N.** (1981). Thymol, a substance with a wide spectrum of action. *Apiacta* 2, 64-66.
- Grothe, T., Lenz, R., & Kutchan, T. M.** (2001). Molecular Characterization of the Salutaridinol 7-O-Acetyltransferase Involved in Morphine Biosynthesis in Opium Poppy *Papaver somniferum*. *Journal of Biological Chemistry*, 276(33), 30717–30723.
- Heil, M.** (2011). Nectar: Generation, regulation and ecological functions. *Trends in Plant Science*, 16(4), 191–200.
- Hemmerlin, A., Hoeffler, J. F., Meyer, O., Tritsch, D., Kagan, I. A., Grosdemange-Billiard, C., ... Bach, T. J.** (2003). Cross-talk between the cytosolic mevalonate and the plastidial methylerythritol phosphate pathways in tobacco bright yellow-2 cells. *Journal of Biological Chemistry*, 278(29), 26666–26676.
- Herrera, C.M. Gracia, I.M., Pérez, R.** (2008) Invisible floral larcenies: microbial communities degrade floral nectar of bumble bee-pollinated plants. *Ecology* 89, 2369–2376
- Hinou, J.B., Harvala, C.E., Hinou, E.B.** (1989). Antimicrobial activity screening of 32 common constituents of essential oils. *Pharmazie*, 44(4):302-3.
- Hofgen, R., & Willmitzer, L.** (1988). Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. *Nucleic Acids Research*, 16(20), 9877.
- Hudaib, M., Speroni, E., Maria, A., Pietra, D., & Cavrini, V.** (2002). GC / MS evaluation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) oil composition and variations during the vegetative cycle. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 29, 691–700.
- Iten, F., Saller, R., Abel, G. & Reichling, J.** (2009). Additive antimicrobial effects of the active components of the essential oil of *Thymus vulgaris* - chemotype carvacrol. *Planta Med.* 75, 1231-1236.
- IUPAC.** (1997) Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford. Online version (2019-) created by S. J. Chalk. ISBN 0-9678550-9-8. <https://doi.org/10.1351/goldbook>.
- Kang S, Kang K, Chung GC, Choi D, Ishihara A, Lee DS, Back K** (2006). Functional analysis of the amine substrate specificity domain of pepper tyramine and serotonin N-hydroxycinnamoyltransferases. *Plant Physiol* 140: 704–715
- Keefover-Ring, K., Thompson, J. D., & Linhart, Y. B.** (2009). Beyond six scents: Defining a seventh *Thymus vulgaris* chemotype new to southern France by ethanol extraction. *Flavour and Fragrance Journal*, 24(3), 117–122.

- Krause, S.T.** (2015). Biosynthesis of oxygenated monoterpenes in Thyme, Melaleuca, and Eucalyptus species.
- Krause, S. T., Köllner, T. G., Asbach, J., & Degenhardt, J.** (2013). Stereochemical mechanism of two sabinene hydrate synthases forming antipodal monoterpenes in thyme (*Thymus vulgaris*). *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 529(2), 112–121.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685.
- Larkov, O., Zaks, A., Bar, E., Lewinsohn, E., Dudai, N., Mayer, A. M., & Ravid, U.** (2008). Enantioselective monoterpene alcohol acetylation in *Origanum*, *Mentha* and *Salvia* species. *Phytochemistry*, 69(14), 2565–2571.
- Langenheim, J. H.** (1994). Higher plant terpenoids: a phytocentric overview of their ecological roles. *Journal of Chemical Ecology*, 20(6), 1223–1280.
- Linhart, Y. B., & Thompson, J. D.** (1999). Thyme is of the essence: Biochemical polymorphism and multi-species deterrence. *Evolutionary Ecology Research*, 1(2), 151–171.
- Ma, X., Koepke, J., Panjekar, S., Fritzsche, G., & Stöckigt, J.** (2005). Crystal structure of vinorine synthase, the first representative of the BAHD superfamily. *Journal of Biological Chemistry*.
- Maćukanović-Jocić, M. P., Rančić, D. V., & Dajić Stevanović, Z. P.** (2007). Floral nectaries of basil (*Ocimum basilicum*): Morphology, anatomy and possible mode of secretion. *South African Journal of Botany*, 73(4), 636–641.
- McGarvey, D. J., & Croteau, R.** (1995). Terpenoid metabolism. *Plant Cell*, 7(7), 1015–1026. <http://doi.org/10.1105/tpc.7.7.1015>
- Morales, R.** (2002). The history, botany and taxonomy of the genus *Thymus*. In *Thyme. The genus Thymus*, E. Stahl-Biskup and F. Saez, eds (Taylor & Francis), pp. 1-43.
- Mugford, S. T., & Milkowski, C.** (2012). *Serine carboxypeptidase-like acyltransferases from plants. Methods in Enzymology* (1st ed., Vol. 516). Elsevier Inc.
- Mugford, S. T., Qi, X., Bakht, S., Hill, L., Wegel, E., Hughes, R. K., ... Osbourn, A.** (2009). A serine carboxypeptidase-like acyltransferase is required for synthesis of antimicrobial compounds and disease resistance in oats. *Plant Cell*, 21(8), 2473–2484.
- Negruk V, Yang P, Subramanian M, McNevin JP, Lemieux B** (1996). Molecular cloning and characterization of the CER2 gene of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 9:137-145.
- Nozal, M., Bernal, J., Jiménez, J., González, M., & Higes, M.** (2002). Extraction of thymol, eucalyptol, menthol, and camphor residues from honey and beeswax: Determination by gas chromatography with flame ionization detection. *Journal of Chromatography A*, 954(1), 207–215.
- Okada, T., Hirai, M. Y., Suzuki, H., Yamazaki, M., & Saito, K.** (2005). Molecular characterization of a novel quinolizidine alkaloid O-tigloyltransferase: cDNA cloning, catalytic activity of recombinant protein and expression analysis in *Lupinus* plants. *Plant and Cell Physiology*, 46(1), 233–244.
- Orlova, I., Nagegowda, D. A., Kish, C. M., Gutensohn, M., Maeda, H., Varbanova, M., ... 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(12), 4002–4017.
- Palmer-Young, E. C., Sadd, B. M., Stevenson, P. C., Irwin, R. E., & Adler, L. S.** (2016). Bumble bee parasite strains vary in resistance to phytochemicals. *Scientific Reports*, 6, 1–14.
- Palmer-Young, E. C., Tozkar, C. O., Schwarz, R. S., Chen, Y., Irwin, R. E., Adler, L. S., & Evans, J. D.** (2017). Nectar and Pollen Phytochemicals Stimulate Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Immunity to Viral Infection. *Journal of Economic Entomology*, 110(5), 1959–1972.

- Park, W.** (1925) The storing and ripening of honey by honeybees. *J. Econ. Entomol.* **18**, 405-410
- Pei, R.S., Zhou, F., Ji, B.P. & Xu, J.** (2009). Evaluation of combined antibacterial effects of eugenol, cinnamaldehyde, thymol, and carvacrol against *E. coli* with an improved method. *J. Food Sci.* **74**, M379-M383.
- Petanidou, T., Van Laere, A., N. Ellis, W., & Smets, E.** (2006). What shapes amino acid and sugar composition in Mediterranean floral nectars? *Oikos*, *115*(1), 155–169.
- Pichersky, E., Noel, J. P., & Dudareva, N.** (2006). Biosynthesis of plant volatiles: Nature's diversity and ingenuity. *Science*, *311*(5762), 808–811.
- Priyam, A., Woodcroft, B. J., Rai, V., Munagala, A., Moghul, I., Ter, F., ... Wurm, Y.** (2015). Sequenceserver: a modern graphical user interface for custom BLAST databases. *bioRxiv*, 33142.
- Qiu, W., Park, J.-W., & Scholthof, H. B.** (2002). Tombusvirus P19-mediated suppression of virus-induced gene silencing is controlled by genetic and dosage features that influence pathogenicity. *Molecular Plant-Microbe Interactions : MPMI*, *15*(3), 269–280.
- Raal, A., Arak, E., Orav, A.** (2005). Comparative chemical composition of the essential oil of *Thymus vulgaris* L. from different geographical sources. *Herba polonica*, *51* (1/2), 10-17
- Raguso, R. A.** (2008). Wake Up and Smell the Roses: The Ecology and Evolution of Floral Scent. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, *39*(1), 549–569.
- Rennich, K., Pettis, J., Vanengelsdorp, D., Bozarth, R., Eversole, H., Roccasecca, K., ... Rose, R.** (2013). 2012-2013 national honey bee pests and diseases survey report. Available: <https://beeinformed.org/wp-content/uploads/2014/10/2012-13-End-of-year-final-report.pdf>
- Rhayour, K., Bouchikhi, T., Tantaoui-Elaraki, A., Sendide, K. & Remmal, A.** (2003). The Mechanism of bactericidal action of oregano and clove essential oils and of their phenolic major components on *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *J. Essent. Oil Res.* **15**, 356-362.
- Rohde, S., Gochfeld, D. J., Ankisetty, S., Avula, B., Schupp, P. J., & Slattery, M.** (2012). Spatial Variability in Secondary Metabolites of the Indo-Pacific Sponge *Stylissa massa*. *Journal of Chemical Ecology*, *38*(5), 463–475.
- Sarker, L. S., Mahmoud, S. S.** (2015). Cloning and functional characterization of two monoterpene acetyltransferases from glandular trichomes of *L. x intermedia*. *Planta*, *242*.
- Schillmiller, A. L., Charbonneau, A. L., & Last, R. L.** (2012). Identification of a BAHD acetyltransferase that produces protective acyl sugars in tomato trichomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(40), 16377–16382.
- Schimmel, J.** (2014). Molekulare Mechanismen der Ausprägung von Chemotypen in *Thymus vulgaris*.
- Schmidt, G. W., Jirschitzka, J., Porta, T., Reichelt, M., Luck, K., Torre, J. C. P., ... D'auria, J. C.** (2015). The last step in cocaine biosynthesis is catalyzed by a BAHD acyltransferase [OPEN]. *Plant Physiology*, *167*(1), 89–101.
- Shalit, M., Guterman, I., Volpin, H., Bar, E., Tamari, T., Menda, N., ... Lewinsohn, E.** (2003). Volatile Ester Formation in Roses. Identification of an Acetyl-Coenzyme A Geraniol/Citronellol Acetyltransferase in Developing Rose Petals. *Plant Physiol*, *131*: 1868-1876.
- Sharma, P. K., Sangwan, N. S., Bose, S. K., & Sangwan, R. S.** (2013). Plant Science Biochemical characteristics of a novel vegetative tissue geraniol acetyltransferase from a monoterpene oil grass (Palmarosa , *Cymbopogon martinii* var . Motia) leaf & . *Plant Science*, *203–204*, 63–73.

- Shimanuki, H., & Knox, D. A.** (1997). Bee health and international trade. *OIE Revue Scientifique et Technique*, 16(1), 172–176.
- Shrivastava, A., & Gupta, V.** (2011). Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chronicles of Young Scientists*, 2(1), 21.
- Simone-Finstrom, M. D., & Spivak, M.** (2012). Increased resin collection after parasite challenge: A case of self-medication in honey bees? *PLoS ONE*, 7(3), 17–21.
- Sitte, P., Weiler, E. W., Kadereit, J. W., Bresinsky, A., & Körner, C.** (2002). Strasburger–Lehrbuch der Botanik, 35. Auflage. *Heidelberg, Berlin: Spektrum, Akad. Verlag.*
- Souleyre, E. J. F., Greenwood, D. R., Friel, E. N., Karunairetnam, S., & Newcomb, R. D.** (2005). An alcohol acyl transferase from apple (cv. Royal Gala), MpAAT1, produces esters involved in apple fruit flavor. *FEBS Journal*, 272(12), 3132–3144.
- Stahl-Biskup, E.** (2002). Essential oil chemistry of the genus *Thymus* - a global view. In *Thyme: The genus Thymus*, E. Stahl-Biskup and F. Saez, eds (Taylor & Francis), pp. 75–124.
- Steffens, J. C.** (2000). Acyltransferases in protease's clothing. *Plant Cell*, 12(8), 1253–1255.
- St-Pierre, B., Laflamme, P., Alarco, A. M., & De Luca, V.** (1998). The terminal O-acetyltransferase involved in vindoline biosynthesis defines a new class of proteins responsible for coenzyme A-dependent acyl transfer. *Plant Journal*, 14(6), 703–713.
- St-Pierre, B., & De Luca, V.** (2000). Chapter Nine Evolution of acyltransferase genes: Origin and diversification fo the BAHD superfamily of acyltransferases involved in secondary metabolism. *Recent Advances in Phytochemistry*, 34(C), 285–315.
- Suzuki, H., Nakayama, T., & Nishino, T.** (2003). Proposed mechanism and functional amino acid residues of malonyl-CoA:anthocyanin 5-o-glucoside-6"-O-malonyltransferase from flowers of *Salvia splendens*, a member of the versatile plant acyltransferase family. *Biochemistry*, 42(6), 1764–1771.
- Suzuki, H., Sawada, S., Watanabe, K., Nagae, S., Yamaguchi, M. A., Nakayama, T., & Nishino, T.** (2004). Identification and characterization of a novel anthocyanin malonyltransferase from scarlet sage (*Salvia splendens*) flowers: An enzyme that is phylogenetically separated from other anthocyanin acyltransferases. *Plant Journal*, 38(6), 994–1003.
- Tacke E, Korfhage C, Michel D, Maddaloni M, Motto M, Lanzini S, Salamini F, Doring H-P** (1995). Transposon tagging of the maize Glossy2 locus with the transposable element En/Spm. *Plant J*, 8:907-917.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, and Kumar S** (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*:30 2725-2729.
- Thompson, J. D., Chalchat, J. C., Michet, A., Linhart, Y. B., & Ehlers, B.** (2003). Qualitative and quantitative variation in monoterpene co-occurrence and composition in the essential oil of *Thymus vulgaris* chemotypes. *Journal of Chemical Ecology*, 29(4), 859–880.
- Thompson, J. D., Manicacci, D., & Tarayre, M.** (1998). Years of Thyme : A Thirty-Five Tale of Two Polymorph Why so many females ? Why so many chemotypes ?, *BioScience*, 48(10), 805–815.
- Tomkies, V., Tomkies, V., Flint, J., Flint, J., Johnson, G., Waite, R., ... Brown, M. a.** (2009). Development and validation of a novel field test kit for European foulbrood. *Apidologie*, 40, 63–72.
- Trapp, S. C., & Croteau, R. B.** (2001). Genomic organization of plant terpene synthases and molecular evolutionary implications. *Genetics*, 158(2), 811–832.

- Trombetta, D., Castelli, F., Sarpietro, M. G., Venuti, V., Cristani, M., Daniele, C., ... Grazia, M.** (2005). Mechanisms of Antibacterial Action of Three Monoterpenes. *Journal of Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(6), 2474–2478.
- Tumaney A. W., Ohlrogge J. B., Pollard M** (2004) Acetyl coenzyme A concentrations in plant tissues, *J. Plant Physiol.* 161. 485–488,
- Tuominen, L. K., Johnson, V. E., & Tsai, C. J.** (2011). Differential phylogenetic expansions in BAHD acyltransferases across five angiosperm taxa and evidence of divergent expression among *Populus* paralogues. *BMC Genomics*, 12.
- Unno, H., Ichimaida, F., Suzuki, H., Takahashi, S., Tanaka, Y., Saito, A., ... Nakayama, T.** (2007). Structural and mutational studies of anthocyanin malonyltransferases establish the features of BAHD enzyme catalysis. *Journal of Biological Chemistry*, 282(21), 15812–15822.
- Van Larebeke, N., Engler, G., Holsters, M., Van Den Elsacker, S., Zaenen, I., Schilperoort, R. A., & Schell, J.** (1974). Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall-inducing ability. *Nature*, 252(5479), 169–170.
- van Zyl, R.L., Seatlholo, S.T., van Vuuren, S.F. & Viljoen, A.M.** (2006). The biological activities of 20 nature identical essential oil constituents. *J. Essent. Oil Res.* 18, 129-133.
- Vernet, P., Gouyon, P. H., & Valdeyron, G.** (1986). Genetic-control of the oil content in *Thymus-vulgaris* l - a case of polymorphism in a biosynthetic chain. *Genetica*, 69, 227–231.
- Vila, R.** (2002) Flavonoids and further polyphenols in the genus *Thymus*. In F. Sáez, E. Stahl-Biskup, eds, *Thyme: The genus Thymus*, pp 144-176
- Walker, K., Fujisaki, S., Long, R., & Croteau, R.** (2002). Molecular cloning and heterologous expression of the C-13 phenylpropanoid side chain-CoA acyltransferase that functions in Taxol biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(20), 12715–12720.
- White, G. F.** (1912). The Cause of European Foulbrood, U.S. Department of Agriculture Circular No. 157, pp. 1–15.
- Wiese, N., Fischer, J., Heidler, J., Lewkowski, O., Degenhardt, J., & Erler, S.** (2018). The terpenes of leaves, pollen, and nectar of thyme (*Thymus vulgaris*) inhibit growth of bee disease-associated microbes. *Scientific Reports*, 8(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32849-6>
- Wilson, M.B. et al.** (2017) 3-Acyl dihydroflavonols from poplar resins collected by honey bees are active against the bee pathogens *Paenibacillus larvae* and *Ascosphaera apis*. *Phytochemistry* 138, 83-92.
- Wilson-Rich, N., Spivak, M., Fefferman, N. H., & Starks, P. T.** (2009). Genetic, Individual, and Group Facilitation of Disease Resistance in Insect Societies. *Annual Review of Entomology*, 54(1), 405–423.
- Yang, Q., Reinhard, K., Schiltz, E., & Matern, U.** (1997). Characterization and heterologous expression of hydroxycinnamoyl/benzoyl-coA:anthranilate N-hydroxycinnamoyl/benzoyltransferase from elicited cell cultures of carnation, *Dianthus caryophyllus* L. *Plant Molecular Biology*, 35(6), 777–789.
- Yamaura, T., Tanaka, S., & Tabata, M.** (1992). Localization of the biosynthesis and accumulation of monoterpenoids in glandular trichomes of thyme. *Planta Medica*, 58(2), 153–158.
- Young, J. C., Agashe, V. R., Siegers, K., & Hartl, F. U.** (2004). Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(10), 781–791.

- Yu, X. H., Gou, J. Y., & Liu, C. J.** (2009). BAHD superfamily of acyl-CoA dependent acyltransferases in *Populus* and *Arabidopsis*: Bioinformatics and gene expression. *Plant Molecular Biology*, 70(4), 421–442.
- Zaks, A., Davidovich-Rikanati, R., Bar, E., Inbar, M., & Lewinsohn, E.** (2008). Biosynthesis of linalyl acetate and other terpenes in lemon mint (*Mentha aquatica* var. *citrata*, Lamiaceae) glandular trichomes. *Israel Journal of Plant Sciences*, 56(3), 233–244.
- Zaruelo, A., and Crespo, E.** (2002). The medicinal and non-medicinal uses of thyme. In *Thyme. The genus Thymus*, E. Stahl-Biskup and F. Saez, eds (Taylor & Francis), pp. 263-292.

6 Anhang

cDNA-Sequenzen der identifizierten AATs aus *T. vulgaris*

tvaat1 (1224 bp)

ATGGCGGGGATAATCATCGCAAGCCATACTATGAAGCCATCATCTCCAACCTCCACTAGCAAAATCCAAAAACC
ACAAGCTATCATTCTTGACCAAACGATACCACCAATATACCTCCCCATCATTTTCTTGTACAAAAACGACCAA
TCTATCGGGCGCGAAGAAATCTCGCGACGTCTGAAACAATCTTTGTGCGGAGATCTTGACCGTCTTCTACCCCTT
GACGGGTGTGATCAAACAGAACTCATTTCGTGATTGTACCGGCACCAAAGGTGTAGAGATGGTGGAAGCCCTA
GTTTCATGGCCCCCTCTCACAGTTCACCGAAAACCCTAAAATCGAGGAACTCGATCAGTTACTCGCCACCGACCC
ATTTTCGTACGACGAAAACACCCTCCTCTTGATCAAAACCTGTTTCTTCGACTGCGGCAGCTTCTCTATCGGCGT
TAGCCTGTGCGATAGAGTTGGGGACGTGGCGTCTTTCTCTGCCTTCATGAACGCGTGGGCCGCGACTTGTGCGAG
GGGAGGAAGCTTCTAGTCCTTCCTTCGACATGGCACTCCATTTCTCCAAGAGACATACCTTTAGGCGACTTC
GGATCCAACCTCCCGACCACGAGAGAGGAAATCACGACGCAGAGGTTGTTTTTCGATAGGGATCGGATCGAAA
AGCTAAGAGACGAGGCTTCAAGCGACGAGGTGAAGAAACCGAGCAGAGTGGAAGCTGTTACAGCTTTCATTT
GGCGAAGATTTATCGAGGCCAACAAAAGCCCTACCACAACGACGTCGTTTGCCGTCTCCACGCAGTGAACAT
GCGACAAAAGAGCAGTCCCCCGATTTTCAGACAACACCTTCGGAAACTGCATTGGTTTCCCAACTGCAGCGATC
TCATCAGAGGAAGACGAAGGCGGAATTAGGGTTCTCGTGTGCGAACTGAGGAAAAGCGATTTCGAGGAGTGGAT
GATGAATACATCGAGAGAGTTGTCAAGTGTGAGGAACTAGCAACGAATACTCTGTGCGGAAAACGGTTCATCTA
GAGAGAGAACTGTTTCTTACCAGTTGGATTAGGTTCCATTGTACGAGGTTGATTTTGGATGGGGAAAGCCA
GCTAGGGTTTGTGTGGGACCTTATCCTTCAAAAATGGCGTTGTACTTATGAGTACTAATCCATCGAGCGATGG
TATCGAAGCGTGGGTTAATGTTTCGTA CTGACCAATTCTCCGA ACTGTGA

tvaat2 (1272 bp)

ATGGCGCAGATAATAATCACAAATGAGATAGTGAAGCCATCATCTCCAACCTCCCTTCACATCCAAAACCCACA
ATCTATCATATCTCGACCAAATCGCACCTCCGATTTACCTTCCCCTCATTTTTCTTCTACCGAAATGTCCAATCGA
AGCAGCACGAAGAAATCTCGCGACGTCTGAAACAATCTTTGTCGGAGATCCTAACCTTTTCTACCCTTTAGCC
GGGACGGTCGTCCAAAATTCGTACGTGACTGCAATGACCGAGGCGCGGACTTCGTTGAAGCCCCGAGTCCACG
CCCCGCTTGATCAGTTCTTGCAAAACCTAAAATGGAGGAAATGATCAATCACTTGCTCCCCACGGACACGTGCG
TCGTACGATGAAGCCGCTGCGCAGCTGTCGGTGAAGGCGAGCTTCTTCGACTGCGGAGGCGTCTCCGTGCGCG
TTTGCTTCCCGCACAAAGATCGGCGACCTATCGTCGTTCCGCCAGTTCATGAACTCGTGGACCGCCATGTGTGCGC
GCCGCCGGGAAGAAGCTTCTAGAATCGTCCGCCCTGACTTCGACGTAGCGCGACACTTCCCCCGAGGGACC
TCCCTCCCGCCTCCGGGTATAACCTTGGCCTGACGGGCAGCGGGGTGCGGACGAAAAGGCTCGTTTTTCGACGG
GGCGAAGCTCGGAAGCTTCTAGAAGAACTTTCGGCGACGGGTGGAGGAACCGACTAGAGAGGAAGCCGT
CTCCGTCTTCATCTGGCGGAGCTTCATCGAGGCATATAAATCCCGAACCAAAAACGACGTGCTCCTTTGCCGCCT
CCCATGCTGTGGACCTCCGGTCAAGATCCGTCCCGCCGCTGCCGGCACACACCATCGGAAATTTATTCACGTCA
GCCACCGCCGTTGTGACGTTCATCGGGAGGAGGAGATGGCGTCATCACTCGCGTTTGTCTCGTGTCCAAACTGA
GGGCCGCCATGAGAGAAGTGGAGGAAATCAGCTACATTGATAATAGGATTTTGTATCAAGGACGACGACGAAA
ACGTCCGATCGTCGATAGGCGGTTTGTAAATCGGAAAACCTGCTATCTGAGCAGCTGGTGGCGGTTTCCGGTG
AAGGAGGTGGATTCGGTTGGGAAAACCGGGTTGGGTTTGCACCGCAACGATGCCGTTTTTGAACCTGGTGC
TTTTCATGGAGACTCCAAGTGGGGACGGTATCGAAGCATGGATCAACGGTCCCGATGAAGGCTTTTTTCAAAT
ATTTTTAGATAATTACAATAAGCTC

tvaat3 (1263 bp)

ATGGCGCAGATAATCGCAAGCCAAATCGTGAAGCCGTCGACTCCAACCTCCGTCTTCGACTAGAAACTACAAGC
TATCATCCATCGATCAAGTCGCTCCATCGATCTACATTCCACTCATCTTCTTCTACGAAAGCGATCAGTCCAAA
CTGCACGAGCAAATCTCTCGATGTCTGAAAAATCTCTGTCCGAAGCCCTAGCCATCTTCTACCCTTTAGCCGG
AGAGATTGAGGAAAACCTCATTCTGTCGACTGCAACGACGCCGGCGTGGAGATGGTGGAGGCCCGAGTCCGGCGC
TCCGCTCTCCCGCTTACACAAAACCTAAAATGGAGGAGCTCAAGCAGTTGCTCCCCGCCGACACCTCTTAC
CCCATGGCAACCACGCCATCCTCTCTCTCAAACGAGCTACTTCGACTGCGGTGGGATCGCCGTCCGGCGTCTGC
TTCTCGATAAGGTCGGCGACGGCGGCTCCGCCGCGGCGTTCTGTGAACGCGTGGGCCGCTGCGTGCCGCGGGG
AGGTTTCTAAAATCACCTGTCCCGCCTTCGACCTGGCGCTCCGTTTCCCGCCGAGGGAGACGCTCTCCTCCGCC
GCGGGGTTTCGGCCTCGACCCCGTCAAGACGAGATCGCGACGGAGAGGTTCTGTTTCGATGGGAAGAAGATG
GAGAAGCTGAAGAGAGCGGCATCCAACGGGGAGGTGAAGAACCCTAGCAGGGTGGAGGTCGTCTCGGCATTC
ATCTGGAGAAGCTTCATAGAGGCGGCGAATAAACGGAACCAACGGCGCCTCCGCCGGCGTCTTACCGCCG
CACATGCAGTGAACCTCCGGCCGAGGGCAGTACCGTCATTTCCGGACCAGACCTTCGGAAACTGCGTGACGGT
GGCGTACGCGAAGATCTCATCGGAGGAGGACGACGGCGGGATGAGCGTGTCTGTTCCAAACTGAGGGCGGC
GATCAGAGGGGTCGACGGCGAGTACGTCAACAAAATTGTGAAGGATGAGATCAGCGGCGACGCAGCAGGCGG
CGAAATGTCGGCGGCGGGAAACTGCGTGTTCTCGAGCTGGTGGAGGTTCCGGTGTACGACGTGGATTTCCGT
TGGGGCAAGCCGGTGTGGGTGGCGACGGCGACGATGCCGGTATCAATACCGTAGTGTTCATGGCGACCCCAT
GCAGGGAAGGTATCGAAGCATGGGTCAACCTCTCTCGTGATAACGACGACTCCTTCGAAACGCTCAGAGCCAA
ATACACTAACCTCCTTAATTAA

tvaat4 (1251 bp)

ATGGTTGAGATGATAATCGCAACTCATATTATAAAGCCATCTTCTCCAACCTCCACCTTCTCCAAAGTCCATAC
TCTCTCTTCCCTCGATCAAATCGCTCCTCACTCTTACATCCCCATCGTTTTCTGCTTCGAAAACGACGGGCAGCA
ACACCGCGGAGAAATCTCGCGGCGTCTGAAACAATCTTTGTCCGAGATCCTAACCGTCTTCTACCCTCTAGCCG
GGGAGGTTAAGCAGAACTCCTTCGTCGACTGCAACGACGGAGGGTTGAGCTTTCGGAGGCGCGTGTCCACGC
GCGTCTCCTTCAGTTCCTGAAAAACCCTAATCTCGAGGAGGACCTCAAGCAGTTGCTCCCGGCGGAGGCCTCCT
CGTACCGGGACAACGCGTTTCAGCTTAAGGTGAGGGTAAGTTACTTTGACGGAGGAGGAGTCGCCGTCGGCGT
CTGCTTCTCCACAGAGCCGGCGACCTCTCGTCGTTGGCGGCGTTCATGAATGCATGGGCCCGCGCTTGCCGTG
GGGAGGAGGTTTCCGGGCTCCGCCGCCCTTCTTCGACCTGGCGCTCCGCTTCCCGCCAATATCTCCGCCGCC
TCCGCCGGCTTCGGGCTGTGCCTGGGAGTGACGAGAGAGAAATTTTAAACGAAGAGATTAGTCTTCGAGCGGG
AGAAAGTGGAGAAGCTGAAGAAGAAGAAGATGAAGATGAATCCGAGCAGAGTGGAGGCCGTCTCGGCCTTCA
TATGGCGGAGCTTCATCGAGGCCTACAAATCGACAAGAGAAACGACGCCGTATTCATCGTTCCCCGCTCCCA
CATGGTGGGAGTCAGGGCGCGTGCGGCCCCGCCGCTGCCAGCTCACACCTTCGGGAACTGCTACACGTTACC
ACGACGGCGGTGACATCATCAGAGGAGGAGGATGACGTGCTAGTTTCGAAACTGAGGGTGGCCATAAGAGGG
GTGGACAGCGGTTACTTCGACGGCCCCGACAAAATTGATGTGGCGATGAATGAACTGTTCCAGACGGAGA
ACTGCATATTTACGAGCTGGGCGAGGGCGCCGGTGTACGAGGTGGACTTCGGGTGGGGGAGGCCGGCGAGGGTAC
TTACGACGGGGATGCCGTACATGAATCTGGTGGTGTGATGGACACTCCGGGAGGGGACGGCTTGAGGGCGTG
GGTTAACGTTCCAAATGAAAGTTTCTTCGGTTTCATCCAAGCTTGTATAATAAGGAGTTCAATTCCTTGTTTT
TTAA

tvaat5 (1344 bp)

ATGGCAAATAAAACCCTAGGCCGTTCAAAGTCAGCAGAAAAAGCCCGGTGCTGATCTCGCCGGCGGAGCCG
ACGCCGTATGACTTCAAATTTCTCTCCGATATCGACTGTGAAAAGGTGATCCGATGCCATTTGCCAATGATGAA
TTTCTACAAAAGGAATCCATCCATGGAAGCAAAGATCCGGTGCAAGTTGTTTCGCGACGCTATTGCCAAAGCC
TTGGTGTTTTACTATCCGTTTCGCTGGGCGGTTGGTGGAAATATTCGGTGGGAAGCTAGCGGTGGAATGCACCGG
AGAGGGGGTGGTGTTCGTTGAGGCCGACGCTGACGTGACACTGGAGGAGTTCGGAGATGACCTCTATCCACCT
TTCCCAACGTGGAAGAGCTTCTTCTATTCAAAGTTTGTGATGGAATAACCAATTCTCTATATTTCTTCCAG
GTGACGCGCTTAAAATGTGGCGGATTCATTTTAGCTTACATATTCAACCACACCATGTGCGACGGCTTCGGAAT
TGTGCAATTTCTGAACGCCATCGGCGAAATAGCTCGCGGCGGCGCAACCCCTCCGTTTTGCCAGTTTGGGAGA
GGCACCTCCTCACCGCTCGTGGCCCGCCACGCGTGTCCCTCACGCACCATGAAAACGAAGTTGCGGAATCGAA
CAACCGTGGTGGCGGAGACAGAAAATTAGTCCGCTCCTTCTTCGTCAGCGCCGCCGACATCTCCGCCCTCCGCC
TCAGCCTACCGCCGCACCTACGAAGCTGCTCCAGATTCGAAATCCTCGCAGGGTGCCTGTGGCGCTGCCGCAC
AATCGCTCTCTCTCCAAACCCGATGAGGAGATCGGATTCTTCTTCGTTGTGAATTCAGAAAGAGTATGAATC
CGCGGCTTCCGGTGGGATACTACGGAAACGCTATAGTTCTTGGCGGCGGTTGACGACTGCCCGGGAATTATT
GAAGAATCCGTTACATTACGCGGTGGAGCTGGTGTGAGAAAGGCGACAGCGGAAGCATCGCAGGTGAGATCGGT
GGAGGATGTGATGGCAATAAGAGACAGGAGCAATATCATGGCGGCGGCGGTGGCGGAGGCCATTTAGTGTG
GGATCTGACGCATGGGGTTTCGAGCAAGCGGACTTCGGGTGGGGCACGGCGGCGTACGGCGGGATGGCGAA
AGGCATTAATTGGGTGGTTCGGATGAAGCAAATTGGTACATACCCTTAAGAATAAGAAAGGAGAAAGTGGC
ACCGTGGTTCCGATTTGCCTACCGCTCGAACCCATGGAAGTCTTCGTAACACCTTCGGATGACGATAACCGC
TGTTCCGAGGAGTTCGGCCCTTTAA

tvaat6 (1329bp)

ATGGGAACAGCAACCTTCGAAGTAAATCGGAGAACCGCCGAGCTGCTCCGGCCGGCGAAGCCGACGCCGTAC
GAATTGAGACCTCTCTCCGATATCGACGATCAGGACGGCCTCCGATTTTCAGATGCCGCTGGTGTTAATTTACCG
AAATAGCCCCCTCCATGGAAGGGAAGGATCCTGCTCGGATCATTTCGCGGCCCGCTCGCGAAGGCACTGGTCTTC
TACTACCCTTTTCGCCGGACGGCTGAGGGAATACGCCACCAGGAACTGGCCGTGGAGTGCACCGGCGAAGGG
GTGGTGTTTCGTCGAGGCCGACGCCGGCGCCACTCTGCAGCAGCTCGGCACACTTCTACCGCCGATTTTGAACCT
TCACGAGCTGCTGTTTAACTGCCCTGGCTCGGCTGGAGTCGTCAATTGCCCTTTGATGCATATTCAGGTCACAC
GGTTTCTATGTGGCGGATTTCGTCTTCGCCTTCCGCTACAATCACACCATGGGTGACGGCGGAGGGATTCTCCAA
TTCCTCACGGCCGTAGGCGAACTGGCCCCGGGGTGCCGAACGCCTCTCTGTCCATCCGGTTTGGGAGAGACACA
TCCTCAGCGCTCGTTACCCGCCCCGTGTCATGTTCCGCCACACGGAGCACGAAATTGTGCATGACACCAAGCGA
AGCACCATCCCGCATGATCGCATGATGCGCCACTTCTTCTTCGGCCCTACCGAGATCTCTGCCCTCCACCACCG
CCTGCCTCCCCACCTCAAGAACTGCTCCAGGTTTCGAGCTTGTGCTGCCTGCATGTGGCGGTGCCGGACATTGG
CCACCGCTCCTCACCTCACGAAGAGGTGAGATTGATGTGCGTTGTGAACGTCCGCAAGCGATTCAACCCGCC
ACTCCCTCAGGGTACTATGGAAACGTTATCGTCTACCCAGCTGCCGTCACCACTGCCGAGAAATTATTGAAGA
GCCCTTCCATTATGCAGTGGAGCTCGTGAGAGAGGGCAAGGGCAGAGCAACAGAGGAGTATGCAAAGTCAG
TTGCTGATTTAATGGTGACGAGAGGGCGACCGGATCTGACGGGGTGGCGACTTATTTGGTGTACATACGCGAA
TGGCTTCGGGGAAAGTGGACGTCGGGTGGGGGAAACCAGTGTACGGCGGGGTGGCGAGAGGGCGGCTTCGATTC
GTTCCCGAGAGGGGTGAGTTATATGATGCTGATTAAGAATGACAAGGGCGAAGAAGGGCTATTAGTGCCATA
TGCTTGGCGCCAAAAGCCATGGATGTGCTGGTTGAGGAGCTTACAAGATGCTGTTGGTTTCTGGAATTGCATC
AGCTCTGTAA

tvaat7 (1365 bp)

ATGGAGTCAGCCGAAGCATTGACCTTCAAAGTGTGGAGAAAAACCCAGAGCTGATCGCTCCGGCGAAGCCG
ACGCCACACGAGTTCAAGCCCCTCTCCGACATCGACGATCAAGAGGGCCTCCGTTTCCAGATTCCGGTGATCCA
GTTTACCAGGGGAAGCCCCTCCGCGACGGAGAAGGACCCGGTGAAGGTGATCCGGGACGCCATTGCCAAGGC
CCTGGTTTTTACTACCCTTTTCGCCGGGCGGTTGAGGGAACGCGCCGCCAGGAAGCTGGTGGTGGAGTGCCT
GGCGAGGGCGTGATGTTTCATCGAGGCAGACGCCGACGTGACGCTGCAGCAGTTCCGAGACGCTCTTCAGCCGC
CGTTCCCGTGCTCGAGGAGCTTCTTACGACGTTCCCGGCTCCGCCGGAGTGCTCGATTGTCCCTTGCTATTGA
TTCAGGTCACGCGCCTGACGTGCGGCGGTTTCATCTTCGCCCTCCGCCTCAACCACACCATGTGCGACGCCGGC
GGCCTCGTCCAGTTCATGTCCGCCGTGCGCGAGATCGCCCGCGGCGCCGACTCCCCCTCCGTCGCCCCGCTG
GGAACGCCACCTCCTCGACGCGCGGGACCCGCCGCGGTGACGTGCACGCACCGCGAGTACGACGACATTCCC
GACACCAAGGGAACCCTGATCCCCTCGACGACATGGCCACCGCTCCTTCTTCTTCGGCCCCGGCGAGATCTC
CGCCCTCCGCAGCTGCCTTCCGCCGCACCTGCGCGGCTGCTCCTCCTCGAGCTCCTCACGGCCTGCCTCTGGC
GCTGCCGACCATCGCGATCGCGCCGGAGCCGGAGGAGGAGGTGAGGATCCTCTGCATCGTCAACTCGCGGAA
GCGGTTACAGCCCGCGCTGCCGGAGGGCTACTACGGCAACGCGTTCGCCTTCCCGTCGCGGTGGCCCCCGCC
GGGGAGCTGTTCGGCGAATCCGCTGCCGTACGCGCTGGAGCTCGTGAGGAAGGCGAAGGCCGACGTGACGGAG
GAGTACATGAGGTCCCTCGCCGATCTGATGGTGACGAGGGGCCGGCCGCACTTCGCGGTGGTGGGAGCTACC
TGGTTTCCGATGTCACGCACGCCGCTTCGGAGAGGTGGACTTCGGCTGGGGACAGCCGGCGTACGGCGGCC
AGCCAAAGGCGGCGTCCGGCGGATCCCCGGAGTCGCAAGCTTTTACATTCCTTTAAGAACAGCAAGGGCGAG
AACGGAGTGGTTCGTTCCCGATCTGCTTGGCGGCGAATGCGATGGAAGTGTGTTGTAAGGAGCTCGAGAGGATGC
TGAAGGCCGGCGCAACGCGGCGGTGTTTCATATCGTCGGCGCTGTGA

cDNA-Sequenzen der Referenzgene

***rhaat1* - (*Rosa hybrid cultivar*) (1374 bp)**

(Shalit *et al.*, 2003)

ATGGAGAAAATTGAGGTCAGTATTATTTCCCGAGACACCATTAAACCATCAGCTGCTTCCTCTTCACTACACCC
TTACAAGCTTTCCATCATCGATCAGTTCACTCCCACAACGTATTTCCAGTTATATTCTTCTACCCCATTACTGA
CCGTGTCTTCAATCTTCTCAAACCTTAACCGACTTGAAAAACACTGTTTCCCAGGCTCTCACTTTGTACCATCC
ACTCTCCGGGAGGATAAAAAACAACCTATAACATTGATGATTTTGAAGCAGGCATCCCCTACCTTGAGGCCCGA
GTGAATTTTACATGATTGATTTTCTAAGGCTTCCGAAAAATCGAGTGGCTAAATGAGTTTGTTCGAATGGCTCC
ATATCGCAAGGAAACAATATCTGAGTTTCTCCCTTGCTTGAATCAAGTAAACATTTTCGACTCTGGAATAG
CAATTGGTGTCTTTTCTCTCACAAGATCAACGATGGCCAAACGGCAAGCTGTTTTCTCAAGTCTGGGTTGCT
ATTTTTCGTGGGTATCGTAAACAAAATCATAACCTAATCTCTCTCAAGCTGCATTACTTTTGCCATCGAGGGAT
GACTTGCCTGAAAAGTACGTAGCTATGATGGAAAGGATGTGGTTTGGCGAGAAAAAAGTTGTTACAAGGAGAT
TTGTATTTGATGCGAAAGCCATATCCGCACTTCAAGATGAAGGGAAGAGCGAATACGTGCCCAAGCCATCACG
TGTTCAAGCCCTCACTGGTTTTCTCTGGAAACATCAACTCGCTGCTTCTCGGGCATTATCATCAGGTACTTCAAC
AAGATTTTCCGTAGCATCACAGACAGTGAACCTAAGGTCAAAAATGAACATGAAAACGACGTTGGACAATGCC
ATTGGTAATATCTTTTTGTGGGCTTCGGCACGGCTAGATCTAAATGATACAGCACCAGGGAGCAGTGATCTTAA
GTTGTGTGACTTGGTTAACTTACTCAATGAATCTATCAAAGAATTTAACAGTGATTACTTGGAGATTTTGAAGG
GTAAAGAGGGATATGGAGGCATGTGTGATTTGCTAGATTTTCAATGGAAGAAGGGAGTTTTGTAGAACCAGCACC
AGAGTTTTATTCACTTCTCAAGCTGGACTAGATTTTTTGACCAAGTTGATTTTGGATGGGGGAGGCCATCTTGGG
TTGGATTCTCGGGGAGAGTTGAAACTAGAAATTTTCAATATTCGTTGAAACACAATGCGATGACGGAATTGA
TGCCTGGGTGACTGTAGATGAAAAACAAATGGCTATGCTAGAACAAGATCCACAGTTTTTAGCATTTGCATCTC
CAAACCCCGAATTTCAATAGCCTCTTCAGTTGGTATGGATTAA

aat3 – (Lavandula x intermedia) (1344 bp)

(Sarker & Mahmoud, 2015)

ATGGCATCCACCAAAACCCTGACCTTCAAAGTTACCAGAAAAAACCGAGAGCTAATCTCTCCGGCAGAACCAA
 CGCCTTACGGATTTAAATATCTATCCGACATAGACGATCAGGATTGCCTCCGATTCCGATTTCCGTTGATATTCT
 TCTACCGAGAAAAACATTTCCATGAAAGGAAAAGATCCTATCAAATTATCCGTGATGCTGTGCGAAAAGCCCT
 GGTATTCTACTATCCGTTTGCAGGGCGACTGAGGGAATGCGATAGTCGGAAGCTAGTGGTGGACTGCACAGGC
 GAGGGGGTGGTTTTTGTGGAGGCGGATGCCGACGTGATGCTGCAGCAGTTTGGGGACGCCCTTCATCCACCCCT
 CCCAACTTGGAGAAGCTACTTCTTGATACACCGGATTATGATGGAACATCAATTGTCCAATATTGTTTATTC
 AGGTTACGCGCTAAAATGTGGCGGTTTCATCTTAAGTTATAGCTGCAACCACACAATATGCGATGCGGCTGGC
 TTTGTCCAGTTTATGTCCGCCGTGGGAGAACTGGCTCGCGGCGCAACAGCCCTTCCATTCAACCAGTTTGGGA
 GAGGCATCTTTGACCGCCCGCAACCCTCCACGCGTGCCTTCACGCACCGGAATACGACGTCGTACCCAAA
 ACTAATGGTGAAACCGACAAAATGGTGGTGCCTATTTCTTCTTTGATGCTGCCGACATCTCCGCTCTCCGCCG
 CAGCCTCCCCGATATCTCCAACTTGCTCCAAATTCGACATCGTGGCAGCCTGCGCATGGCGTTGCCGGACAA
 TCGCTCTCTCTCAAACCCGACGAAGAGTGGTATTCGTCAACACCGTGAATATCAGAAACAAAATGAAGCC
 GCCGCTCCCCGTGGGTACTACGGGAATGGTATAGTTTTTCCGGCGGTAGTCACGACTGCCAAGAAATTATCCG
 AAAACCCATTCCAGTACGCGGTGGAGCTGGTGTGAAGGGGAAATACGAAGCAACAGATGATTACGTGAGAT
 CAGTCGCAGATCTTATGGTGATGAGAGATCGGCCGTCTGTGGGAGCAGGGATGAATTATTATATTGTATCGGA
 CACGTCAACTGCGGGTTTTGAGGAAGTGGAGTTGGGTGGGGCAAGCCTGTGTATGGTGGTGTAGCCAAAGGC
 ACGATTGATTGGATTGGTGTGAATTGGTATATACCTTTCAAGAATAAAAAGGGCGAGCAAGGAAAAATAGTTA
 CGGTTTGCCTACCACTTAATGCCATGGAAGAGTTCGAAAACAGTTTAGGATGATGATTACGGCTGCCAGGAC
 TCTCAATCTTTCAGCATTGTGA

Sequenzübereinstimmung der sieben Acyltransferasen aus *T. vulgaris*

Tab. 6.1: Sequenzübereinstimmung (Aminosäuresequenzen) der sieben Acyltransferase aus *T. vulgaris*. Werte sind prozentual angegeben.

	TvATT1	TvAAT2	TvAAT3	TvAAT4	TvAAT5	TvAAT6	TvAAT7
TvAAT1	100	53,3	54,6	55,8	18,6	22,7	21,3
TvAAT2		100	53,0	56,4	19,6	22,5	20,4
TvAAT3			100	53,9	20,7	23,2	20,6
TvAAT4				100	17,2	20,0	18,3
TvAAT5					100	51,6	57,5
TvAAT6						100	62,1
TvAAT7							100

Proteinaufreinigung mittels SDS-PAGE

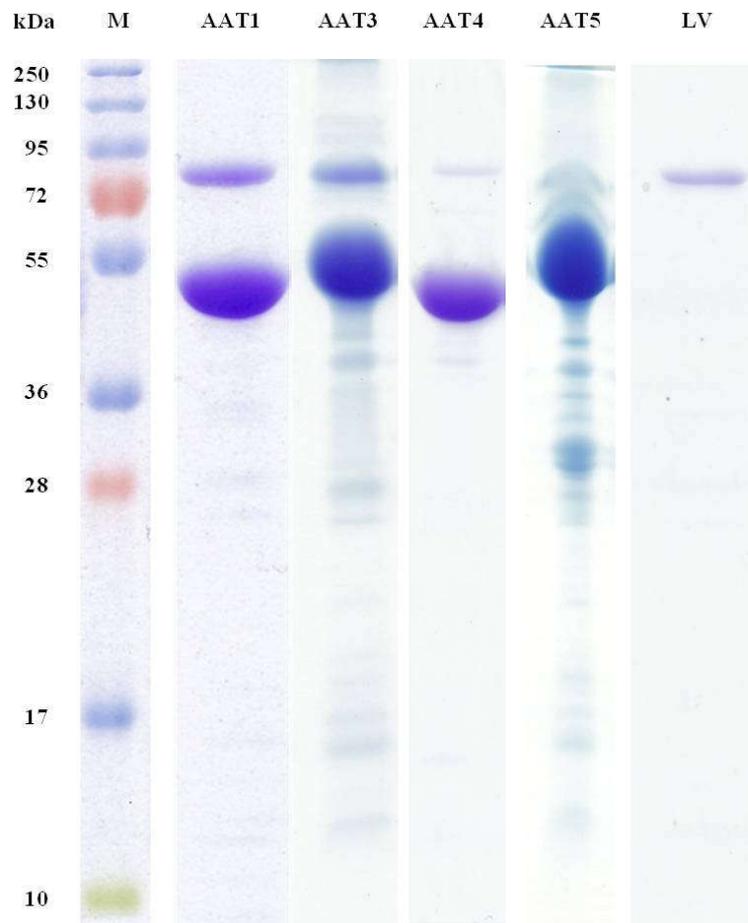


Abb. 6.1: SDS-PAGE der mittels His-Tag aufgereinigten TvAATs. M Marker „PageRuler Plus Prestained Protein Ladder“ (Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland), LV Leervektor pASK-Iba37plus.

Gaschromatografische Analyse der GC-Standards

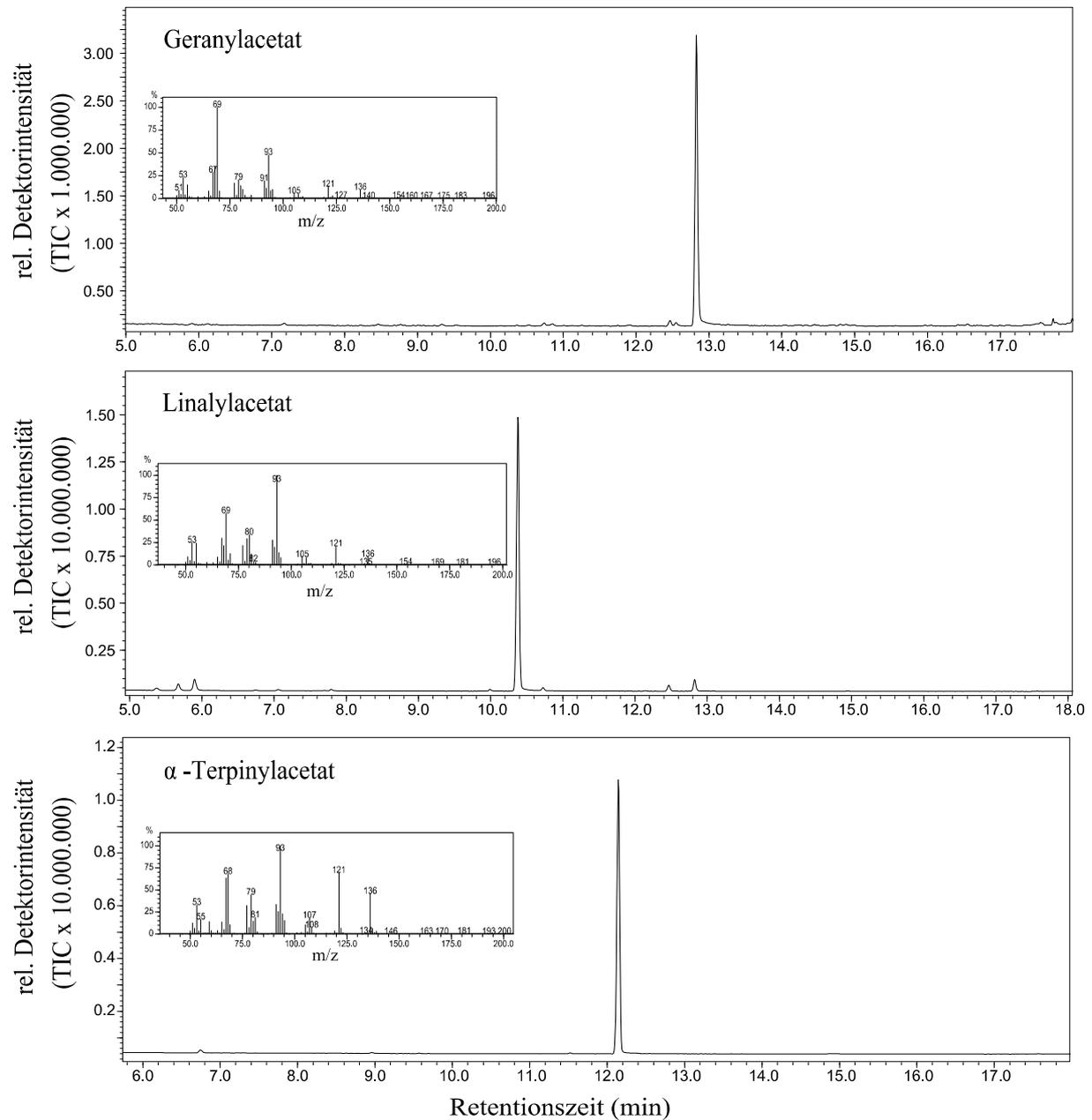


Abb. 6.2: Gaschromatografische Analyse der GC-Standards. Dargestellt sind das jeweilige Chromatogramm und das Massenspektrum des GC-Standards (Geranylacetat, Linalylacetat, A-Terpinylacetat). Die Extraktion erfolgte mittels SPME.

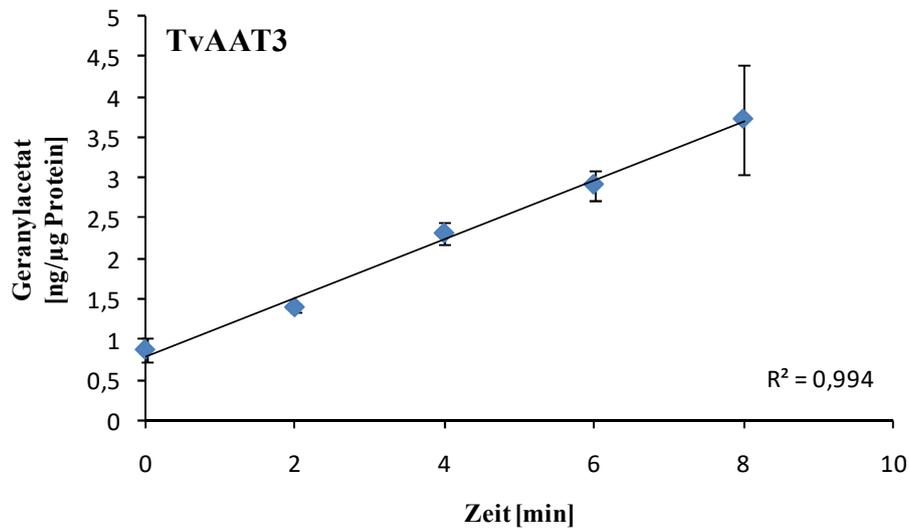


Abb. 6.3: Linearer Bereich der Produktentwicklung von TvAAT3. (n=3)

Verifizierung der GC/FID-Methode

Tab. 6.2: Validierungsparameter für die Quantifizierung von Geraniol mittels GC/FID.

Konzentration (ppm)	Retentionszeit (min)		„substance recovery“ (%)
	MW	Stabw.	
1000	18,57	0,012	89,8
750	18,55	0,002	93,0
500	18,51	0,003	93,2
250	18,47	0,002	90,6
100	18,43	0,003	87,7
50	18,41	0,008	86,1
25	18,40	0,003	83,5
12,5	18,40	0,003	79,0
6,25	18,40	0,002	74,0
3,125	18,40	0,003	73,8
1,563	18,40	0,001	71,6
0,781	18,40	0,002	72,0
0,391	18,41	0,003	78,1
0,195	18,41	0,003	85,0
0,098	18,42	0,003	98,1
0,049	18,43	0,003	139,6

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich besonders bei Herrn Prof. Dr. Degenhardt für die umfassende fachliche Betreuung und Unterstützung während meiner gesamten Doktorandenzeit bedanken.

Meiner kompletten Arbeitsgruppe danke ich herzlich für die stets angenehme Arbeitsatmosphäre und den großartigen wissenschaftlichen Austausch. Ein besonderer Dank geht dabei an Sandra Krause, Sebastian Bley, Jette Schimmel und Bettina Rahfeld.

Ein großes Dankeschön gebührt Claudia Schaff, die als Wissenschaftlerin, Bürokollegin und Freundin unermüdlich für mich da war.

Ein großer Dank gilt Herrn Dr. habil. Silvio Eler. Die Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität der Hauptmonoterpene und deren Acetate aus Thymian erfolgte unter seiner Leitung, was der Anfang einer großartigen Zusammenarbeit war.

Ich danke Kathrin Tomasch für ihre Unterstützung bei allen labortechnischen Fragen und Kathrin Kunth für die tatkräftige Unterstützung bei bürokratischen Angelegenheiten.

Susann Eichler und Claudia Schaff danke ich für das Gegenlesen meiner Arbeit sowie für die zahlreichen Tipps und Hilfestellungen.

Mein besonderer Dank gilt schließlich meinen Eltern und nicht zuletzt meiner geliebten Schwester Christiane, die immer an mich geglaubt und mir Mut gemacht hat. Ohne sie wäre ich nicht dort, wo ich jetzt stehe.

Der größte Dank geht an meinen Mann Georg und meine Kinder, die in allen Höhen und Tiefen dieser Zeit immer für mich da waren.

Veröffentlichungen

Publikationen

Wiese, N., Fischer, J., Heidler, J., Lewkowski, O., Degenhardt, J., & Erler, S. (2018). The terpenes of leaves, pollen, and nectar of thyme (*Thymus vulgaris*) inhibit growth of bee disease-associated microbes. *Scientific Reports*, 8(1), 1–12.

Krause, S.T., Crocoll, C., Förster, C., **Wiese, N.**, Gershenzon, J., Degenhardt, J.
The phenolic monoterpenes thymol and carvacrol are formed by a metabolomic complex consisting of a P450 monooxygenase and a short-chain dehydrogenase. (manuscript)

Poster

Arndt, N., Degenhardt, J (2016) „Characterization of a BAHD like enzyme (TvAAT1) in *Thymus vulgaris*“. Plant Molecular Biology – Gordon Research Conference 2016

Schimmel, J, **Arndt, N.**, Asbach, J, Degenhardt, J (2013) „Mechanisms of chemotype formation in *Thymus vulgaris*“. Terpnet 2013 - The 11th International Meeting on Biosynthesis, Function and Biotechnology of Isoprenoids in Terrestrial and Marine Organisms

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Natalie Wiese (geb. Arndt)
Geburtsdatum	09.09.1987
Geburtsort	Gera
Staatsangehörigkeit	deutsch

Berufliche Tätigkeiten

09/2019 - heute	Sachbearbeiterin Gentechnik Landesverwaltungsamt Sachsen-Anhalt, Halle
03/2013 - 09/2019	wissenschaftliche Mitarbeiterin Martin-Luther-Universität, Abt. Pharmazeutische Biotechnologie, Halle

Ausbildung

03/2013 - heute	Promotionsstudium Martin-Luther-Universität, Abt. Pharmazeutische Biotechnologie, Halle Thema der Promotion: „Die Biosynthese von acetylierten Monoterpenen in Thymian (<i>Thymus vulgaris</i>)”
06/2012	Abschluss als Diplom Biologin Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald
09/2011- 06/2012	Anfertigung der Diplomarbeit: „Proteinkinase AT1G33770: Lokalisierung sowie stickstoffabhängige phänotypische und proteomische Untersuchung in <i>Arabidopsis thaliana</i> ” Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie, Potsdam
05/2011 - 08/2011	Wissenschaftliche studentische Hilfskraft Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie, Potsdam
08/2010 - 09/2010	Berufspraktikum Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie, Potsdam
10/2006 - 07/2012	Studium (Diplom) an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität, Greifswald
09/1998-06/2006	Karl-Theodor-Liebe Gymnasium, Gera Abitur 2006

Halle (Saale), den 27.07.2020

Natalie Wiese

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass diese Arbeit in gleicher oder ähnlicher Form bisher keiner anderen Prüfbehörde zur Erlangung des Doktorgrades vorgelegt wurde. Ferner erkläre ich, gemäß der Promotionsordnung der Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften der Martin-Luther-Universität, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht.

Halle (Saale), den 27.07.2020

Natalie Wiese