

Molekulare Charakterisierung und funktionelle
Analyse der Isogene der
1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat-Synthase
aus *Solanum lycopersicum*

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Biowissenschaften
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Heike Paetzold

geb. am 21. Mai 1981 in der Hansestadt Rostock

Gutachter:

1. PD Dr. M. H. Walter
2. Prof. Dr. R. B. Klösgen
3. Prof. Dr. T. J. Bach

verteidigt am 18.01.2010 in Halle (Saale)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die Stoffklasse der Isoprenoide	1
1.2	Vorkommen von Isoprenoiden in Blatthaaren (Trichomen)	3
1.2.1	Nicht-glanduläre Trichome	4
1.2.2	Glanduläre Trichome	4
1.2.3	Trichome von Tomatenpflanzen	5
1.3	Biosynthese von Isoprenoidvorstufen	7
1.3.1	Der klassische Acetat-Mevalonat-Weg (MVA-Weg)	7
1.3.2	Der Methylerythritolphosphat-Weg (MEP-Weg)	9
1.3.3	Stoffaustausch zwischen den Biosynthesewegen der Isoprenoidvorstufen	11
1.4	Isogene der <i>DXS</i>	11
1.5	Zielstellung der Arbeit	14
2	Material und Methoden	15
2.1	Material	15
2.1.1	Pflanzen	15
2.1.2	Mikroorganismen	15
2.1.3	Verwendete Primerpaare	16
2.1.4	Vektoren	17
2.2	Methoden	17
2.2.1	Pflanzenanzucht	17
2.2.2	Anzucht und Transformation von Mikroorganismen	18
2.2.3	Molekularbiologische Arbeiten mit Nukleinsäuren	19
2.2.4	Arbeiten mit Proteinen	26
2.2.5	Heterologe Expression in <i>E. coli</i> und Aufreinigung der rekombinanten Proteine	27

2.2.6	Transiente Expression in <i>Nicotiana benthamiana</i>	28
2.2.7	Herstellung spezifischer Peptid-Antikörper	29
2.2.8	Dot Blot-Analysen	29
2.2.9	Western Blot-Analysen	29
2.2.10	Immunlokalisierung	30
2.2.11	Nachweis der Enzymaktivität	31
2.2.12	Stabile Transformation von Tomatenpflanzen	32
2.2.13	Isolierung von Blatttrichomen	34
2.2.14	Trichomzählung	34
2.2.15	ESEM	35
2.2.16	Mykorrhizierung	35
2.2.17	Pollenanalyse	36
2.2.18	Analyse flüchtiger Metabolite	36
2.2.19	Modellierung der 3-D-Strukturen	38
2.2.20	Statistische Auswertung	38
3	Ergebnisse	41
3.1	Molekulare Charakterisierung von zwei DXS-Isoenzymen aus Tomate	41
3.1.1	Klonierung von Tomaten <i>DXS</i> -Sequenzen der Klasse 1 und Klasse 2	41
3.1.2	Promotoranalysen der beiden <i>SIDXS</i> -Gene	43
3.1.3	Nachweis der Funktionalität der rekombinanten Proteine	46
3.1.4	Modellierung der 3-D-Strukturen der beiden Isoenzyme	51
3.2	Bestimmung der Transkriptmengen und Proteinabundanzen	55
3.2.1	Analysen der <i>SIDXS</i> -Transkriptmengen	55
3.2.2	Untersuchung der <i>SIDXS</i> -Proteinabundanzen	59
3.3	Generierung stabil transformierter <i>SIDXS2</i> -RNAi-Pflanzen	62
3.3.1	Reduktion der <i>SIDXS2</i> -Transkriptmengen	63
3.3.2	Bestimmung der Kopienzahl der RNAi-Pflanzen	64
3.3.3	Auswirkung der <i>SIDXS2</i> -Transkriptmengenreduktion auf die Mykorrhizierung	66
3.3.4	Verwundung der transgenen Pflanzen	67
3.3.5	Weitere phänotypische Auffälligkeiten der <i>SIDXS2</i> -RNAi-Pflanzen	68

3.3.6	Untersuchung der Terpene der Trichome, sowie ihres biogenetischen Ursprungs	70
3.3.7	Beeinflussung des Fraßverhaltens von <i>Spodoptera littoralis</i> Raupen	73
4	Diskussion	75
4.1	Isogene im MEP-Biosyntheseweg und in späteren Schritten der Isoprenoidbiosynthese	75
4.2	Hinweise auf die Beteiligung von Isoprenoiden an der Befruchtung	83
4.3	<i>SDXS2</i> -Transkriptreduktion verändert die Produktion flüchtiger Isoprenoide und den Beitrag von MEP- und MVA-Weg	85
4.4	Reduktion der <i>SDXS2</i> führt zu einer erhöhten Anzahl glandulärer Trichome	88
4.5	Fazit und Ausblick	90
5	Zusammenfassung	93
	Literaturverzeichnis	96
A	Anhang	111

Abbildungsverzeichnis

1.1	Trichomtypen der Tomatenarten	6
1.2	Stoffwechselwege der Isoprenoidbiosynthese	8
1.3	DXS-katalysierte Reaktion	10
3.1	Exon-Intron-Strukturen	42
3.2	Überexpression und affinitätschromatische Aufreinigung	46
3.3	HPLC-Chromatogramme der Aktivitätsbestimmung durch Derivat- tisierung	47
3.4	Aktivitätsnachweis durch Detektion von radioaktiv-markiertem DXP	49
3.5	Komplementation des <i>E. coli</i> -Stammes EcAB4-2	51
3.6	Strukturmodelle	52
3.7	RT-PCR verschiedener Tomatenproben	55
3.8	Real-Time RT-PCR verschiedener Tomatenproben	56
3.9	Real-Time RT-PCR von Tomatenblüten und Früchten	57
3.10	Real-Time RT-PCR der <i>SIDXS</i> -Transkriptmengen in <i>jai1</i>	58
3.11	Dot Blot-Analysen	59
3.12	Western Blot-Analysen mit <i>SIDXS</i> -Isoform-spezifischen Antikörpern	60
3.13	Immunlokalisierung des <i>SIDXS2</i> -Proteins im Tomatenblatt	62
3.14	Real Time RT-PCR der <i>SIDXS2</i> -RNAi-Pflanzen	64
3.15	Southern Blot-Analysen der <i>SIDXS2</i> -RNAi-Pflanzen	65
3.16	Mykorrhizierung der <i>SIDXS2</i> -RNAi Pflanzen	66
3.17	Transkriptmengenanalysen nach Verwundung	67
3.18	Pollenschlauchlänge der <i>SIDXS2</i> -RNAi-Pflanzen	68
3.19	Anzahl der glandulären Trichome	69
3.20	Terpene der Trichome	70
3.21	¹³ C/ ¹² C-Isotopenverhältnisse der Duftstoffe	71
3.22	Duftstoff- und Raupenfraßanalysen	73

4.1	Ähnlichkeitsdiagramm der DXS-Proteine	77
4.2	Isogene in der Carotinoidbiosynthese	82
A.1	Aminosäuresequenzen beider <i>SIDX</i> S-Proteine im Vergleich	111
A.2	Nukleotidsequenz beider <i>SIDX</i> S-Gene im Vergleich	112
A.3	Karte des binären RNAi-Vektors pHellgate8	119

Tabellenverzeichnis

1.1	Einteilung der Trichomtypen von Tomatenpflanzen	5
2.1	Verwendete Bakterienstämme	15
2.2	Genutzte Primerpaare	16
2.3	Verwendete Vektoren	17
2.4	Schema eines PCR-Programms	21
2.5	Reaktionsansatz der Real Time RT-PCR	22
2.6	Programm der Real Time RT-PCR	22
3.1	Promotoranalysen	44
3.2	Mutationsrate des <i>dxs</i> -defizienten <i>E. coli</i> Stammes DXM3	50
3.3	Vergleich der Aminosäuren des putativen aktiven Zentrums	53
3.4	Auswertung der Western Blot-Analysen	61
3.5	Screening transgene Pflanzen	63
A.1	<i>cis</i> -regulatorische Elemente mit putativer gewebespezifischer Nutzung	115
A.2	putativ Licht-regulierte <i>cis</i> -regulatorische Elemente	116
A.3	putative Phytohormon-regulierte <i>cis</i> -regulatorische Elemente	117
A.4	putative <i>cis</i> -regulatorische Elemente ohne spezielle Zuordnung	118

Abkürzungsverzeichnis

<i>DXS/DXS</i>	pflanzliches Gen/Protein	IPP	Isopentyldiphosphat
<i>dxs/dxs</i>	prokaryotisches Gen/Protein	IPTG	Isopropyl- β - D-galactopyranosid
ANOVA	'Analysis of variance'	IRMS	'isotopic ratio mass spectrometry'
AOC	Allenoxidcyclase	kb	Kilobasenpaare
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>	MEP	2- <i>C</i> -Methyl-D-erythritol- 4-phosphat
bp	Basenpaare	Mt	<i>Medicago truncatula</i>
CaMV	'Cauliflower mosaic virus'	MVA	Mevalonat
cDNA	komplementäre DNA	MW	Molekulargewicht
CMK	4-(Cytidin-5-diphospho)-2- <i>C</i> -methyl-D-erythritol-Kinase	OD ₆₀₀	optische Dichte 600 nm
Ct	'threshold cycle'	PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
DNA	Deoxyribonukleinsäure	PCR	Polymerasekettenreaktion
DMAPP	Dimethylallyldiphosphat	PDS	Phytoendesaturase
DXS	1-Deoxy-D-xylulose-5- phosphat-Synthase	PLACE	'Plant <i>cis</i> -acting regulatory DNA elements'
DXR	1-Deoxy-D-xylulose-5- phosphat-Reduktisomerase	PlantCARE	'Plant <i>cis</i> -acting regulatory element'
dNTP	Deoxyribonukleotide	PSY	Phytoensynthase
E	PCR-Effizienz	RG	Referenzgen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	RNA	Ribonukleinsäure
EMBL	'European Molecular Biology Laboratory'	RNAi	RNA-Interferenz
EST	'expressed sequence tag'	RT-PCR	Reverse Transkription gefolgt von PCR
EV	'empty vector'	Sl	<i>Solanum lycopersicum</i>
FPP	Farnesyldiphosphat	SDS	Natriumdodecylsulfat
GC/MS	Gaschromatographie gefolgt von Massenspektrometrie	T _m	Schmelztemperatur
GGPP	Geranylgeranyldiphosphat	SPME	'solid phase micro extraction'
GPP	Geranyldiphosphat	TD	Thermodesorption
HDR	1-Hydroxy-2-methyl-2- <i>E</i> - butenyl-4-diphosphat-Reduktase	UTR	untranslatierte Region
HPLC	Hochdruckflüssigkeits- chromatographie	WT	Wildtyp
		35S	CaMV 35S-Promotor
		∅	Durchmesser

1 Einleitung

1.1 Die Stoffklasse der Isoprenoide

Isoprenoide, auch Terpenoide genannt, kommen bei Pro- und Eukaryoten vor und stellen eine umfangreiche Klasse natürlicher Substanzen mit sehr verschiedenen Strukturen und biochemischen Eigenschaften dar (Chappell, 1995; Sacchettini & Poulter, 1997). Alle Isoprenoide werden ausgehend von den isomeren C₅-Grundkörpern Isopentenylidiphosphat (IPP) und Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) gebildet (Ruzicka, 1953). In Pflanzen haben einige Isoprenoide essentielle Funktionen. Sie sind im Primärstoffwechsel, z.B. an der Photosynthese, Photorespiration oder an der Phytohormonbiosynthese beteiligt (Gray, 1987; McGarvey & Croteau, 1995).

Die Phytol-Seitenkette des Chlorophylls und Carotinoide gehören zu den Isoprenoiden, die essentiell für die Lichtreaktion der Photosynthese sind. In den Redoxsystemen der Elektronentransportketten der Photorespiration und der Photosynthese besitzen die Isoprenoide Ubichinon und Plastochinon wichtige Funktionen (Threlfall *et al.*, 1967; Wiss & Gloor, 1969).

Auch Wachstums- und Entwicklungsprozesse werden von Isoprenoid-Derivaten, wie Brassinosteroiden, Gibberellinen, Cytokininen und Abscisinsäure, beeinflusst (Graebe, 1987; Gray, 1987). Die größte Gruppe der Isoprenoiden sind jedoch Metabolite des Sekundärstoffwechsels (Withers & Keasling, 2007). Diese werden zur Kommunikation und zu Adaptationsprozessen zwischen Pflanze-Umwelt, Pflanze-Insekt, Pflanze-Mikroorganismus, sowie zur Kommunikation zwischen Pflanzen genutzt (Gershenzon & Dudareva, 2007). Dabei können Terpenoide sowohl zur Attraktion von Nützlingen, wie zum Beispiel bestäubenden Insekten (Pichersky & Gershenzon, 2002; Shuttleworth & Johnson, 2009) oder zur Abwehr von Fraßfeinden dienen (Turlings *et al.*, 1995). Durch Duftstoffe, die von Pflanzen emittiert

werden, kann die Eiablage von Motten oder Schmetterlingen, dessen Raupen sich von Pflanzen ernähren, verhindert werden (De Moraes *et al.*, 2001; Konstantopoulou *et al.*, 2002).

Ein weiterer interessanter Aspekt der Isoprenoide ist deren Wirken in der Interaktion zwischen Pflanzen und Mikroorganismen. Dabei kann das Wachstum pathogener Bakterien unterdrückt werden (Echeverrigaray *et al.*, 2008; Kotan *et al.*, 2007; Gershenzon & Dudareva, 2007). Die von Pflanzen emittierten Duftstoffe können auch von anderen Pflanzen wahrgenommen werden. Parasitisch lebende Pflanzen nutzen die Isoprenoidemission der Wirtspflanzen, um diese aufzufinden (Runyon *et al.*, 2006).

Anhand dieser und der folgenden Beispiele kann man die Bedeutung der Isoprenoide in der Kommunikation der Pflanzen und deren biotechnologisches Potenzial für die Nutzung durch den Menschen erkennen.

Isoprenoide sind wichtige Ausgangsstoffe der chemischen Industrie. Aus den Harzen der Koniferen wird Terpentin als Verdünnungsmittel und als Lackzusatz gewonnen, während das Harz des Kautschukbaumes (*Hevea brasiliensis*) als Naturkautschuk (Lynen, 1960), oder als Gummi verwendet wird.

Einige Isoprenoide sind ebenfalls für die Pharmaindustrie interessant. Cannabinoide (Terpenphenole, aus *Cannabis sativa* und *Cannabis indica*) und deren Derivate werden bei der Behandlung von Krebspatienten verwendet, da Sie analgetische Wirkung aufweisen und gleichzeitig die Nebenwirkungen, der in der Krebstherapie verwendeten Cytostatika mildern (Smart, 1982; Hiller, 1984; Bifulco, 2002; Guzmán, 2003). Zur Behandlung von tumorösem Gewebe wird Taxol (Paclitaxel), ein Diterpen des Harzes der pazifischen Eibe (*Taxus brevifolia*) eingesetzt. Dieses vermindert die Zellteilung durch die irreversible Stabilisierung der Mikrotubuli (Schiff *et al.*, 1979). Artemisinin ist ein Terpen aus den Blättern des Beifußes (*Artemisia annua*) (Klayman, 1985) unter dessen Verwendung eine erfolgreiche Behandlung der von multiresistenten *Plasmodium falciparum*-Stämmen hervorgerufenen Malaria gelingt (Enserink, 2005).

Eine weitere für die Gesundheit wichtige Funktion der Isoprenoide ist die Biosynthese der Vorläuferstufen der fettlöslichen Vitamine A, D, E, K (Lynen, 1960).

Isoprenoide werden auch als Duft-, Aroma- und Farbstoffe verwendet. Das für den Sehvorgang benötigte β -Carotin wird beispielsweise industriell als Lebensmittelfarbstoff E160 und E160a verwendet (Gordon & Bauernfeind, 1982). Das stark duftende Öl der Lavendelblüten wird in der Parfümindustrie genutzt. In der Heilkunde werden dem Lavendelöl antiseptische und beruhigende Wirkung nachgesagt (Prashar *et al.*, 2004). Andere Vertreter der Gattung *Lamiaceae* werden ebenso in der Heilkunde verwendet und finden zusätzlich auch als Gewürze Eingang in die menschliche Ernährung. So wird Menthol als ätherisches Öl eine analgetische Wirkung zugesprochen (Eccles, 1994), während die Minze, die als Hauptduftstoffkomponente Menthol enthält, als Gewürz verwendet wird. Vertreter derselben Pflanzenfamilie und mit ähnlichen Anwendungen sind Basilikum, Oregano, Salbei und Thymian. Der charakteristische Duft und Geschmack dieser Pflanzen ist auf Isoprenoide zurückzuführen, die in spezialisierten Organen der Blattoberfläche (Trichome) (Hallahan, 2000) vorkommen.

1.2 Vorkommen von Isoprenoiden in Blatthaaren (Trichomen)

Trichome sind laut botanischer Definition ein- oder vielzellige, verzweigte oder unverzweigte, lebende oder tote „Anhangsgebilde“ der Epidermis mit verschiedenen Formen, Strukturen und Funktionen (Werker, 2000). Dazu zählen nicht nur Gebilde der oberirdischen Pflanzenteile wie Papillen, Schuppen, Schutz- und Drüsenhaare sondern auch Wurzelhaare. „Anhangsgebilde“ können auch Emergenzen, wie zum Beispiel Stacheln oder Dornen sein. Während an der Bildung von Emergenzen auch subepidermales Gewebe beteiligt ist, werden Trichome ausschließlich von epidermalen Zellen gebildet (Werker, 2000). Die Funktion der Trichome ist ebenso mannigfaltig wie ihre Form. Zwei große Gruppen von Trichomen werden unterschieden: nicht-glanduläre (ohne Drüsenfunktion) und glanduläre (mit Drüsenfunktion) (Werker, 2000).

1.2.1 Nicht-glanduläre Trichome

Die nicht-glandulären Trichome sind sehr heterogen hinsichtlich ihrer Morphologie, Anatomie und Funktion. Sie können aus einer oder aus mehreren Zellen bestehen und sowohl verzweigt als auch nicht-verzweigt vorkommen. Auf Blättern wird oft mehr als eine Art der nicht-glandulären Trichome gefunden (Werker, 2000). Die Funktion dieser Trichome richtet sich nach ihrer Morphologie. Derbe Borstenhaare dienen als Fraßschutz, während lange, tote Haare vor UV-Licht und vor übermäßigem Wasserverlust in ariden Gebieten schützen (Sitte *et al.*, 1998). Der bekannteste Vertreter mit nicht-glandulären Trichomen ist die Baumwolle. Die zur Baumwollproduktion verwendeten Fasern sind nicht-glanduläre, unverzweigte Trichome auf dem Samen, die die Verbreitung durch den Wind ermöglichen sollen (Lee *et al.*, 2007).

Die Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* besitzt ausschließlich nicht-glanduläre, einzellige Trichome, die drei Verzweigungen ausbilden. Diese dienen als Barriere gegen Insekten (Walker, 2000).

1.2.2 Glanduläre Trichome

Dreißig Prozent aller Gefäßpflanzen besitzen Trichome mit Drüsenfunktion (Fahn, 2000). Dazu gehören auch Pflanzen der Gattung *Lamiaceae*, die wie bereits in Abschnitt 1.1 eingeführt, als aromatische Kräuter bei der Zubereitung von Speisen verwendet werden. Die Aufgabe der glandulären Trichome ist die Sezernierung verschiedenster Sekundärmetabolite, deren Funktion unter anderem der Schutz der Pflanze vor Herbivoren und Pathogenen ist. Hierbei nehmen die sekundären Isoprenoide eine dominierende Stellung ein (Schilmiller *et al.*, 2008). Artemisinin ist ein Sesquiterpen, das in Drüsenzellen von *A. annua* akkumuliert und eine hohe Phytotoxizität (Dayan *et al.*, 1995) zeigt. Ein für Menschen interessantes isoprenoides Naturprodukt wird durch Laticiferen sekretiert. Diese, von der Funktion als Speicherorgan, den Trichomen ähnlichen Zellen werden auf Blättern und Stamm des Kautschukbaumes (*Hevea brasiliensis*) gefunden und produzieren Naturkautschuk, der von großer Bedeutung für die chemische Industrie ist.

Die von glandulären Trichomen sekretierten Substanzen werden zumeist unter einer cuticulären Wachsschicht gespeichert. Neben den Terpenoiden kommen auch Phenylpropanoide, Polyketide und Fettsäure-Derivate vor, während Alkaloide nur selten gefunden werden (Schilmiller *et al.*, 2008). Trichome und Blätter von *Nicotiana*-Arten enthalten das bekannte Alkaloid Nicotin. Dieses wird aber in den Wurzeln gebildet und gelangt durch Translokation in die Blätter (Laue *et al.*, 2000).

Einige Pflanzen sekretieren auch viskose, klebrige sekundäre Metabolite, deren Funktion nicht eindeutig geklärt ist. Es wird vermutet, dass diese als „Klebfallen“ gegen Insekten wirken oder vor erhöhter Sonneneinstrahlung schützen (Duke *et al.*, 2000). Bei carnivoren Pflanzen übernehmen glanduläre Trichome die Funktion des Anlockens, Fangens, Verdauens von Insekten und der Resorption der so erhaltenen Nährstoffe (Werker, 2000). Die Produktion von Nektar ist ebenfalls auf Drüsenzellen zurückzuführen. Diese Zellen sekretieren vor allem Zucker, wie Maltose, Raffinose, Galaktose und Melibiose (Fahn, 2000).

1.2.3 Trichome von Tomatenpflanzen

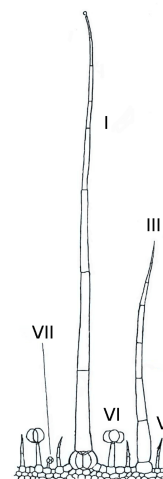
Die zur Gattung der *Solanaceae* gehörenden Tomatenpflanzen besitzt glanduläre und nicht-glanduläre Trichome. Luckwill (1943) definierte sieben verschiedene Trichomtypen, wovon fünf nicht-glandulär sind und eine Klasse (Typ IV) nur bei einer Wildtomaten-Art (*Solanum habrochaites*) dokumentiert wurde (Tabelle 1.1).

Tabelle 1.1: Einteilung der Trichomtypen von Tomatenpflanzen nach Luckwill (1943).

Art	Typ	Beschreibung				Besonderheit
		Länge (mm)	Zellzahl	Basiszellen	Trichomende	
nicht-glandulär	I	1,2-2,5	6-10	4-6	kleiner Vesikel	nur <i>S.habrochaites</i> außer <i>S.habrochaites</i>
	II	0,2-1	6-10	3-5	ohne Vesikel	
	III	0,4-1	4-8	1	spitz zulaufend	
	IV	0,2-4	4-8	1	kleiner Vesikel	
	V	0,1-0,3	1-4	1	gebogen spitz zulaufend	
glandulär	VI	0,1-0,5	1-2	1	2-4 Zellen ø: 0,05-0,08 mm	außer <i>S. piminellifolium</i>
	VII	0,05-0,1	1	1	4-8 Zellen ø: 0,02-0,04 mm	

Spezies	Trichomtyp						
	I	II	III	IV	V	VI	VII
<i>S. lycopersicum</i>	a	-	a	-	a	a	s
<i>S. habrochaites</i>	a	-	s	a	-	a	s
<i>S. peruvianum</i>	a	-	-	-	a	s	s
<i>S. pimpinellifolium</i>	-	ss	-	-	a	a	-

(a) Abundanzen der Trichomtypen in ausgewählten Tomatenarten, a: abundant, s: selten, ss: sehr selten.



(b) *S. lycopersicum* Trichome

Abbildung 1.1: Abundanzen der Trichomtypen verschiedener Tomatenarten und schematische Darstellung der Trichome der Kulturtomate *S. lycopersicum*, (Luckwill, 1943).

Die nicht-glandulären Trichome können aufgrund ihrer Größe, der Zellzahl und der Form unterschieden werden. Dagegen ist die Unterscheidung der glandulären Trichome allein aufgrund der Größe möglich.

Einzelne Arten der *Solanaceae* unterscheiden sich durch den Besitz verschiedener Trichomtypen (Luckwill, 1943) (Abbildung 1.1 a). Die Kulturtomate *Solanum lycopersicum* weist eine hohe Anzahl der Trichome der Typen I, III, V und VI auf, während die Klasse VII Trichome nur selten gefunden wurden. Das Übersichtsschema der vorhandenen Trichomtypen der Kulturtomate *S. lycopersicum*, die als Untersuchungsobjekt der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, ist in Abbildung 1.1 b dargestellt. Die Wildsorte *Solanum habrochaites* weist eine ähnliche Verteilung der Trichome wie *Solanum lycopersicum* auf, besitzt aber zusätzlich Typ IV nicht-glanduläre Trichome. Bei einer anderen Wildsorte der Tomate (*Solanum peruvianum*) wurden nur wenige glanduläre Trichome dokumentiert. Dagegen wurde eine hohe Anzahl der nicht-glandulären Trichome des Typs I und V beobachtet. *S. pimpinellifolium* ist die einzige Sorte, bei der, wenn auch nur in sehr geringen Mengen Typ II nicht-glanduläre Trichome gefunden wurden. Darüber hinaus weist diese Tomatenspezies die geringste Diversität der Trichomtypen auf.

Glanduläre Trichome sind auf allen untersuchten Arten dokumentiert worden und wurden schon lange als Ort der Biosynthese von Isoprenoiden vermutet. Die Duftstoffproduktion in glandulären Trichomen ist unter anderem aus Lavendel (*Lavandula latifolia*) und Pfefferminze (*Mentha x piperita*) bekannt. Dabei konnten Duftstoff-produzierenden Enzyme, wie zum Beispiel die Monoterpensynthase Linolensynthase (McConkey *et al.*, 2000) und das die Vorstufe liefernde Enzym Geranyldiphosphat-Synthase (Turner *et al.*, 1999), in diesen spezialisierten Zellen nachgewiesen werden.

1.3 Biosynthese von Isoprenoidvorstufen

Alle Isoprenoide werden aus den isomeren Grundstrukturen IPP und DMAPP synthetisiert (Dewick, 2002; Mahmoud & Croteau, 2002). Diese C₅-Strukturen können durch Kopf-Schwanz-Verbindungen zusammengelagert werden. Dabei entstehen C₁₀-Grundstrukturen (Geranyldiphosphat, GPP) oder größere Moleküle, wie C₁₅-Verbindungen (Farnesyldiphosphat, FPP) und C₂₀-Strukturen (Geranylgeranyldiphosphat, GGPP). Ausgehend von diesen Produkten werden viele andere Isoprenoide synthetisiert. GPP dient als Vorstufe der Monoterpenbiosynthese, während FPP der Ausgangspunkt für die Sesquiterpenbildung ist. Carotinoide, Plastochinone und Gibberelline werden vom GGPP abgeleitet (McGarvey & Croteau, 1995). Die C₅-Grundstrukturen IPP & DMAPP können über zwei Stoffwechselwege synthetisiert werden, über den cytosolischen Acetat-Mevalonat- (MVA-) Weg oder über den plastidären Methylerythritolphosphat- (MEP-) Weg.

1.3.1 Der klassische Acetat-Mevalonat-Weg (MVA-Weg)

Die Entdeckung und Aufklärung dieses Stoffwechselweges erfolgte Mitte des 20. Jahrhunderts an Tieren und Hefen (Bloch *et al.*, 1959; Lynen, 1960). In Pflanzen werden die Produkte des MVA-abgeleiteten IPP als Vorstufen für die Biosynthese von Sterolen, Brassinosteroiden, Sesquiterpenen, Polyprenolen, Dolichol und zur Ubichinon-Biosynthese in Mitochondrien verwendet (Goldstein & Brown, 1990). Durch die Abspaltung von Kohlendioxid und die Anlagerung des Coenzym A

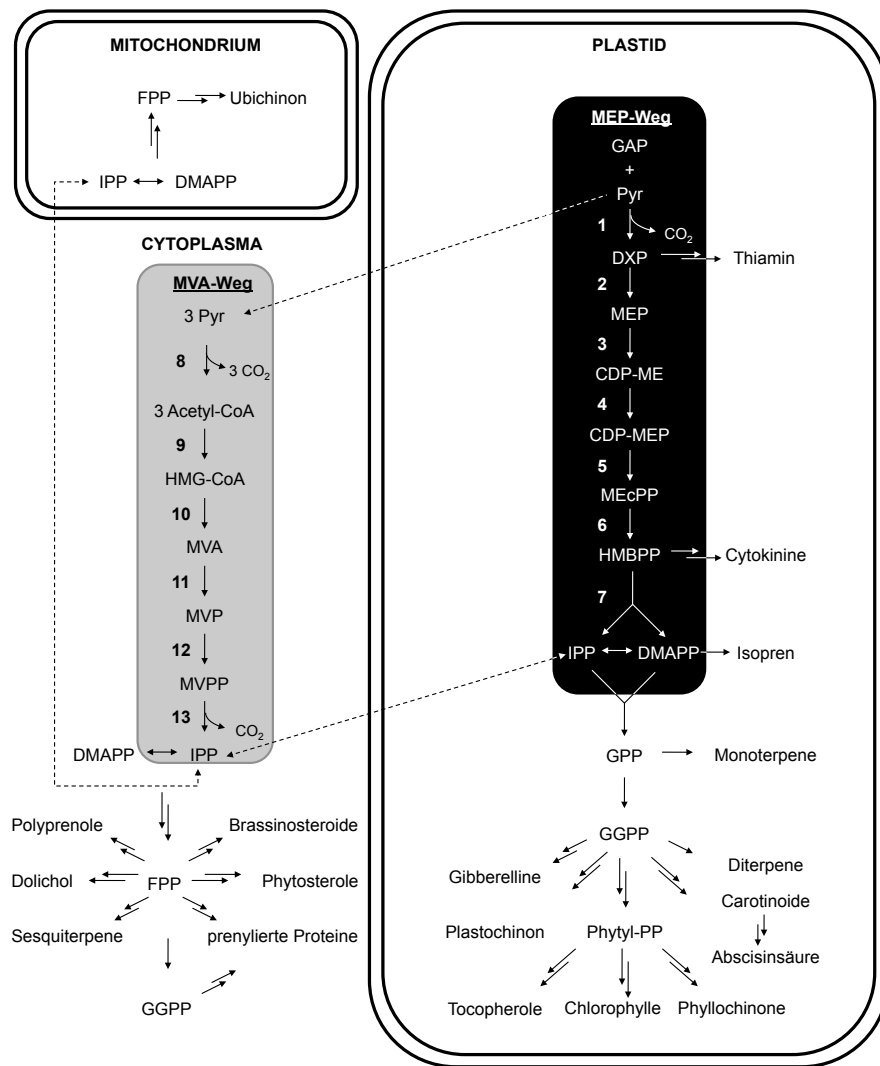


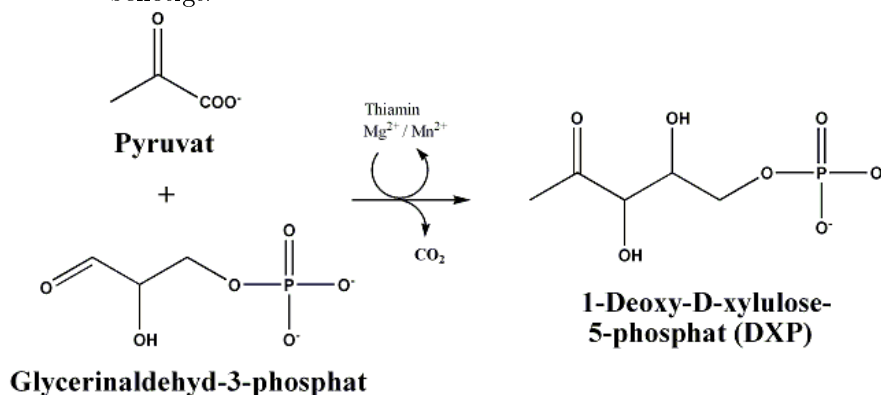
Abbildung 1.2: Wege der Isoprenoidbiosynthese unter besonderer Berücksichtigung der Vorläuferbiosynthese im MVA- oder MEP-Weg, **Acetyl-CoA**: Acetyl-CoenzymA, **CDP-ME**: 4-Diphosphocytidyl-2-*C*-methyl-D-erythritol, **CDP-MEP**: 4-Diphosphocytidyl-2-*C*-methyl-D-erythritol-2-phosphat, **DMAPP**: Dimethylallyldiphosphat, **DXP**: 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat, **FPP** - Farnesyl-diphosphat, **GAP**: Glycerinaldehyd-3-phosphat, **GGPP**: Geranylgeranyl-diphosphat, **GPP**: Geranyl-diphosphat, **HMBPP**: Hydroxymethyl-butenyl-4-diphosphat, **HMG-CoA**: 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA, **IPP**: Isopentenyl-diphosphat, **MEP**: 2-*C*-Methyl-D-erythritol-4-phosphat, **MEcPP**: ME-2,4-cyclodiphosphat, **MVA**: Mevalonat, **MVP**: 5-Phosphomevalonat, **MVPP** - 5-Diphosphomevalonat, **Pyr**: Pyruvat, **1**: 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat-Synthase (DXS), **2**: 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat-Reductoisomerase (DXR), **3**: CDP-ME-Synthase, **4**: CDP-ME-Kinase, **5**: ME-2,4-cyclodiphosphat Synthase, **6**: HMBPP-Synthase, **7**: HMBPP-Reduktase, **8**: Pyruvat-Dehydrogenase, **9**: Acetoacetyl-CoA-Thiolase & HMG-CoA-Synthase, **10**: HMG-CoA-Reduktase, **11**: MVA-Kinase, **12**: MVP-Kinase, **13**: MVPP-Decarboxylase, verändert nach Rodriguez-Concepcion (2006).

(CoA) entsteht aus Pyruvat Acetyl-CoA. Durch die Kondensation zweier Acetyl-CoA-Moleküle durch das Enzym Acetoacetyl Thiolase entsteht Acetoacetyl-CoA. Eine weitere Kondensation mit einem dritten Molekül Acetyl-CoA bildet durch die Aktivität der HMG-CoA-Synthase die C₆-Verbindung 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA). Im nächsten Schritt erfolgt eine NADPH-abhängige Reduktion zu Mevalonat (MVA) durch die HMG-CoA-Reduktase. Dieser Schritt wird als der geschwindigkeitsbestimmende betrachtet. Im Folgenden werden durch Mevalonatkinasen Phosphatgruppen von ATP-Molekülen auf MVA übertragen. Durch Decarboxylierung und ATP-Verbrauch entsteht durch Bildung einer Doppelbindung Isopentenylidiphosphat (IPP), die Grundstruktur der Isoprenoidbiosynthese. Wie in Abbildung 1.2 dargestellt, findet die IPP-Biosynthese des MVA-Weges im Cytosol statt.

1.3.2 Der Methylerythritolphosphat-Weg (MEP-Weg)

Erste Hinweise auf einen MVA-unabhängigen Stoffwechselweg wurde Anfang der 1990er Jahre bei der Hopanoidbiosynthese (Analoge der Sterole) bei Bakterien entdeckt. Nach Fütterungsversuchen mit markierten Substanzen an Bakterienstämmen ergab sich ein nicht mit dem MVA-Weg in Einklang zu bringendes Markierungsmuster (Rohmer *et al.*, 1993). Der Nachweis einer vom MVA-Weg unabhängigen Isoprenoidbiosynthese wurde auch bei der Grünalge *Scenedesmus obliquus* erbracht (Lichtenthaler *et al.*, 1995). Weitere Experimente bewiesen die verbreitete Nutzung dieses Weges in weiteren Algen, Höheren Pflanzen, und in Bakterien, wie zum Beispiel dem Erreger der Malaria (*Plasmodium falciparum*) (Lichtenthaler *et al.*, 1997; Schwender *et al.*, 1997; Disch *et al.*, 1998). Der Nachweis der Biosynthese aller chloroplastidären Isoprenoide über den neu entdeckten Stoffwechselweg unterstreicht die universelle Bedeutung des Stoffwechselweges. Das IPP dieses Stoffwechselweges wird für die Biosynthese von Carotinoiden, Gibberellinen, Abscisinsäure, Monoterpenen und der Seitenkette des Chlorophylls, Phyllochinonen, Plastochinonen, Tocopherolen genutzt (Rodriguez-Concepcion, 2006). Inzwischen sind viele Details dieses MVA-unabhängigen Weges bekannt. Durch Nutzung von *E. coli*-Mutanten, die Defekte im Glukosemetabolismus aufwiesen, gelang die Identifizierung von Glycerinaldehyd-3-phosphat und Pyruvat als Ausgangssubstrate des MEP-Weges. Diese werden in einer Thiamin-

Abbildung 1.3: Reaktionsschema der DXS. Die DXS katalysiert die Synthese von 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat aus Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-phosphat unter CO_2 -Freisetzung. Als Kofaktoren werden Thiamin und Mg^{2+} - oder Mn^{2+} -Ionen benötigt.



abhängigen Transketolase-ähnlichen Reaktion zu 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat (DXP) verknüpft, in dem Kohlendioxid freigesetzt wird. Diese von der 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat-Synthase (DXS) katalysierten Reaktion benötigt Thiamin und Magnesium- oder Manganionen als Kofaktoren (Lois *et al.*, 1998)(Abbildung 1.3).

DXP bildet nicht nur das erste Intermediat des Stoffwechselweges, es ist gleichzeitig die Vorstufe der Biosynthese von Vitamin B1 (Thiamin) (Julliard & Douce, 1991). Die für den Stoffwechselweg namensgebende Substanz 2-*C*-Methyl-D-erythritol-4-phosphat (MEP) wird durch die Aktivität der 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat-Reduktoisomerase (DXR) unter NADPH-Verbrauch katalysiert. Dies ist der Schritt, welcher die C_5 -Struktur auf dem MEP-Weg festlegt. Im weiteren Verlauf des Stoffwechselweges wird zunächst MEP mit CTP (Cytidintriphosphat) verknüpft, so dass CDP-ME (4-Diphosphocytidyl-2-*C*-methyl-D-erythritol) entsteht. Diese Reaktion wird durch CMS (CDP-ME-Synthase) katalysiert. Die anschließende ATP-abhängige Phosphorylierung zu CDP-MEP (4-Diphosphocytidyl-2-*C*-methyl-D-erythritol-2-phosphat) erfolgt durch die Aktivität der CMK (CDP-ME-Kinase). Die MCS (ME-2,4-cyclodiphosphat-Synthase) spaltet CMP ab und setzt MEcPP (ME-2,4-cyclodiphosphat) frei, welches durch HDS (HMBPP-Synthase) in HMBPP (Hydroxymethyl-butenyl-4-diphosphat) umgewandelt wird. Eine anschließende Reduktion, vermittelt durch die HDR (HMBPP-Reduktase), resultiert in den Endprodukten IPP und DMAPP und liefert somit die Ausgangsmolekü-

le der Isoprenoidbiosynthese. Dieser Stoffwechselweg läuft, wie in Abbildung 1.2 dargestellt, in Plastiden ab.

1.3.3 Stoffaustausch zwischen den Biosynthesewegen der Isoprenoidvorstufen

Die für lange Zeit vorherrschende Meinung, dass es nur begrenzten bis keinen Austausch zwischen den beiden Stoffwechselwegen gibt, schloss die Interpretationen mit ein, dass Verbindungen ausschließlich von einem Stoffwechselweg abgeleitet werden. Diesbezüglich wurde die Biosynthese von Monoterpenen nur auf den MEP-Weg beschränkt (McGarvey & Croteau, 1995; Eisenreich *et al.*, 2001), während Sesquiterpene über den MVA-Weg gebildet werden sollten (Abbildung 1.2). Neue Erkenntnisse belegen, dass in Pflanzen vielfach eine nicht so strenge Aufteilung zu finden ist. Durch Einsatz Isotopen-markierter Vorläuferstufen wurde gezeigt, dass auch der MEP-Weg IPP zur Produktion des Sesquiterpens Nerolidol in Löwenmäulchenblüten (*Antirrhinum majus*) bereitstellt (Dudareva *et al.*, 2005). Darüberhinaus wurde von Skorupinska-Tudek *et al.* (2008) gezeigt, dass für die Biosynthese von Dolichol, einem langkettigem Isoprenoid, IPP beider Stoffwechselwege genutzt wird. Ferner wurde dokumentiert, dass nach spezifischem Stilllegen des MVA-Weges mit Mevinolin, einem Hemmstoff der HMGR, der plastidäre MEP-Weg die verringerten Syntheseaktivitäten des cytosolischen Weges zu komplementieren vermag (Hemmerlin *et al.*, 2003). In der gleichen Arbeit wurde auch gezeigt, dass Wachstumsstörungen durch Fosmidomycin, einem Hemmstoff der DXR, durch Mevalonatzugabe zumindest teilweise ausgeglichen werden können.

1.4 Isogene der *DXS*

Die ersten Klonierungen von *DXS*-Genen erfolgte Ende der 1990er Jahre zunächst für *E. coli* (Sprenger *et al.*, 1997; Lois *et al.*, 1998), kurz darauf auch aus Pfefferminze (*Mentha x piperita*) (Lange *et al.*, 1998). Das *DXS*-Gen aus *A. thaliana* war zu diesem Zeitpunkt bereits identifiziert, wurde aber zunächst als essentielles Gen der Chloroplastenentwicklung beschrieben (Mandel *et al.*, 1996). Durch die hohe

Sequenzähnlichkeit zu anderen pflanzlichen DXS-Sequenzen wurde die Identität des *A. thaliana*-Gens bald aufgedeckt (Estévez *et al.*, 2000). Die Schlüsselfunktion der DXS ist dadurch gekennzeichnet, dass DXP sowohl als Intermediat der IPP/DMAPP Biosynthese dient, aber auch als Vorstufe der Vitamin B1 Synthese genutzt wird (Julliard & Douce, 1991). Rückschlüsse auf die Wichtigkeit eines funktionsfähigen MEP-Stoffwechselweges können aus der Analyse der *A. thaliana cla1*-Mutante gezogen werden. Diese Mutante trägt eine Mutation im *DXS*-Gen (Mandel *et al.*, 1996; Estévez *et al.*, 2000). Der Verlust der funktionellen DXS in *A. thaliana cla1* führt zum vollständigen Fehlen von Chlorophyll und Carotinoiden, was zu stark degenerierten Chloroplasten und einem Albino-Phänotyp führt. Durch Zugabe von Deoxyxylulose können diese phänotypischen Auffälligkeiten aufgehoben werden (Estévez *et al.*, 2000). Weitere Untersuchungen der DXS bewiesen ihr biotechnologisches Potenzial. Die konstitutive Expression eines pflanzlichen *DXS*-Gens in Lavendel (*Lavandula latifolia*) führte zu einem Anstieg in der Produktion essentieller Öle (Munoz-Bertomeu *et al.*, 2006). In transgenen Tomatenpflanzen, die konstitutiv ein bakterielles *dxs*-Gen exprimieren, wurde ein Anstieg der Carotinoide beobachtet (Enfissi *et al.*, 2005). Somit wurde gezeigt, dass die katalytische Aktivität der DXS einen limitierenden Schritt in der Biosynthese von Isoprenoiden darstellt.

Walter *et al.* (2002) beschrieb erstmals das Vorkommen von zwei divergenten Isoformen der *DXS* (*DXS1* und *DXS2*), deren Sequenzen nur zu etwa 70% identisch sind, in mehreren Pflanzengattungen. Die bisher beschriebene DXS von *A. thaliana* konnte in dieser Veröffentlichung der *DXS1*-Klasse zugeordnet werden, hingegen konnte im Genom von *A. thaliana* keine Sequenz für ein Klasse 2-Gen identifiziert werden. Ferner resultierte ein Vergleich der Expressionsmuster von *DXS1*- und *DXS2*-Genen im Vorschlag einer potenziellen Rolle der *DXS1* im Primärstoffwechsel, während der *DXS2* eine Funktion im Sekundärstoffwechsel zugeschrieben wurde (Walter *et al.*, 2002). Eine Duplikation der *DXS*-Sequenzen wurde auch in der Fichte (*Picea abies*) beobachtet. Es konnten sogar drei verschiedene *DXS*-Gene identifiziert werden. Die Einordnung der Gene in die postulierten Klassen wurde aufgrund von Sequenzähnlichkeiten vorgenommen. Eines der Gene kann der Klasse 1, dem Primärstoffwechsel, zugeordnet werden, während die beiden anderen Gene Sequenzähnlichkeiten zu Klasse 2-Genen zeigen. Die beiden der Klasse 2 zugeordneten *DXS*-Gene der Fichte weisen verschiedene Expressions-

muster unter verschiedenen Umwelteinflüssen auf (Phillips *et al.*, 2007), was die putative Rolle der durch diese Gene kodierten DXS2 im Sekundärstoffwechsel unterstreicht. Die vermutete Funktion der DXS1 im Primärstoffwechsel wird durch den Nachweis von *DXS1*-Transkriptmengen während der Fruchtreife von Tomaten *Solanum lycopersicum* unterstützt (Lois *et al.*, 2000). Im Gegensatz dazu scheint DXS2 andere Funktionen zu übernehmen. In mykorrhizierten Wurzeln von *Medicago truncatula* wurden ausschließlich *DXS2*-Transkriptmengen nachgewiesen (Walter *et al.*, 2002). Die spezifische Reduktion der *MtDXS2*-Transkriptmengen in mykorrhizierten Wurzeln resultierte in einer Beeinträchtigung der Mykorrhiza. Somit konnte erstmals der Nachweis der Bedeutung der *DXS*-Diversifikation für die Interaktion zwischen einer Pflanze (*M. truncatula*) und einem Mikroorganismus (*Glomus intrradicis*) und insbesondere der spezifischen Expression des *DXS2*-Isogens gezeigt werden (Floß *et al.*, 2008). In Tomatenpflanzen wurden *SlDXS2*-Transkriptmengen ebenfalls in mykorrhizierten Wurzeln nachgewiesen. Ferner wurden *SlDXS2*-Transkriptmengen in Tomatenblättern detektiert (Walter *et al.*, 2002). Außerdem wurde mehrfach die Induktion der *DXS2*-Transkriptmengen durch Herbivorie beschrieben (Arimura *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2009; Sanchez-Hernandez *et al.*, 2006; Tretner *et al.*, 2008).

Der Nachweis von *SlDXS2*-Transkriptmengen in nicht-verwundeten Tomatenblättern wurde auf das Vorhandensein duftstoffproduzierender (glandulärer) Trichome zurückgeführt (Walter *et al.*, 2002). Die Analyse der Duftstoffe der Kulturtomatensorte *S. lycopersicum* zeigte, dass hauptsächlich ein Monoterpen (β -Phellandren) und ein Sesquiterpen (β -Caryophyllen) gebildet werden (Zhang *et al.*, 2008). Es wird angenommen, dass zumindest die Monoterpene vom DXS2-abhängigen MEP-Weg abstammen, aber der experimentelle Nachweis fehlt bisher.

1.5 Zielstellung der Arbeit

Die Entdeckung von Isogenen der *DXS* stellte einen neuen Aspekt der Forschung dar. Erste Versuche mit *Medicago truncatula*-Pflanzen hatten gezeigt, dass *MtDXS2*-Transkriptmengen ausschließlich in mykorrhizierten Wurzeln nachzuweisen waren und somit *MtDXS2* ein vollständig anderes Expressionsmuster als *MtDXS1* aufwies (Walter *et al.*, 2002). Für die in der vorliegenden Arbeit verwendete Nutzpflanze Tomate waren ebenfalls bereits unterschiedlich auftretende Expressionsmuster beider Isogene während der Mykorrhizierung dokumentiert worden. Ferner gab es erste Hinweise auf eine mögliche Rolle der *DXS2* in Trichomen anhand einer Reihe von EST-Daten (Walter *et al.*, 2002).

In der vorliegenden Arbeit sollten die molekularbiologische und biochemische Charakterisierung der beiden *DXS*-Isogene der Tomate vorgenommen werden. Umfassende Untersuchungen zu Transkript- und Proteinabundanz, sowie die Immunlokalisierung und die Analyse der putativen Promotorregionen sollten Einblicke in die Rekrutierung beider Gene für deren spezifische Funktionen in verschiedenen Geweben aufzeigen. Besondere Aufmerksamkeit sollte der Analyse der glandulären Trichome gegeben werden. Anhand dieser Untersuchungen sollte eine genauere Aufklärung der Nutzung der beiden *DXS*-Isoenzyme im Stoffwechsel der Tomate vorgenommen werden.

Die Bestimmung der Herkunft der Grundstrukturen der Isoprenoidbiosynthese zur Duftstoffproduktion in Trichomen sollte *in planta* anhand transgener RNAi-Linien erfolgen. Da die Reduktion der *DXS1*-Transkriptmengen vermutlich in den Primärstoffwechsel eingreift und möglicherweise zu letalen Phänotypen führt, wie durch die *cla1* Mutante beschrieben, wurde als Ziel dieses Ansatzes das *DXS2*-Gen gewählt. Die Pflanzen mit reduzierten *DXS2*-Transkriptmengen sollten zunächst generiert und durch weitere Untersuchungen, wie zum Beispiel der Beeinflussung der Duftstoffproduktion, charakterisiert werden. Diese Experimente sollten aufzeigen, ob eine Reduktion der *DXS2*-Transkriptmengen möglicherweise durch ansteigende *SIDXS1*-Transkriptmengen kompensiert wird. Des Weiteren sollten anhand der *DXS2*-RNAi-Pflanzen Wechselwirkungen zwischen den Biosynthesewegen der Isoprenoidvorstufen untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Pflanzen

Samen der in dieser Arbeit genutzten Tomatenkultursorte Moneymaker wurden von N.L. Chrestensen (Erfurt) bezogen. Die Samen der Tomatenmutante *jai1* wurden freundlicherweise von Li *et al.* (2004) zur Verfügung gestellt.

2.1.2 Mikroorganismen

Die für die Anfertigung dieser Arbeit genutzten Bakterienstämme sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

Tabelle 2.1: Bakterienstämme, die zur Anfertigung dieser Arbeit verwendet wurden; **1:** Grant *et al.* (1990), **2:** McBride & Summerfelt (1990), **3:** Holsters *et al.* (1980), **4:** Koncz & Schell (1986)

Mikroorganismus	Genotyp	Bemerkungen
A) Allgemeine Klonierungsarbeiten		
<i>E. coli</i> DH5α	F ⁻ , <i>deoR</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>hsdR17</i> , (rk-mk ⁺), <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , Φ80lacZΔM15, <i>thi-1</i> , Δ(<i>lacZYA-argFV169</i>)	K12 Abkömmling ¹ BD Bioscience Clontech, Heidelberg
<i>E. coli</i> XL1 Blue	<i>endA1</i> <i>gyrA96</i> (nal ^R) <i>thi-1</i> <i>ecA1</i> <i>relA1</i> <i>lac</i> <i>glnV44</i> F[⁺ ::Tn10 <i>proAB</i> ⁺ <i>lacI</i> ^q Δ(<i>lacZ</i>)M15] <i>hsdR17</i> (rk ⁻ mk ⁺)	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
<i>E. coli</i> One shoot ccdB Survival cells	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80lacZΔM15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>araΔ139</i> Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (Str ^r) <i>endA1</i> <i>nupG</i> <i>fluA::IS2</i>	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
B) Heterologe Expression		
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT</i> <i>gal</i> <i>dcm</i> <i>lon</i> <i>hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) λ(DE3 [<i>lacI</i> <i>lacUV5-T7 gene 1</i> <i>ind1</i> <i>sam7</i> <i>nin5</i>])	B834 Abkömmling, Stratagene, Amsterdam, Niederlande
C) Pflanzentransformation		
<i>A. tumefaciens</i> GV2260	pGV2260 (pTiB6S3_T-DNA) in C58C1; Rif ^r , Carb ^r	2
<i>A. tumefaciens</i> GV3101	C58C1 Rif ^r	3
<i>A. tumefaciens</i> GV3101 pMP90RK	C58C1 pMK90RK, Rif ^r , Gmr, Kmr	4

2.1.3 Verwendete Primerpaare

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von MWG Biotech (Ebersberg) bezogen. Nachfolgend sind die Namen und Sequenz dargestellt.

Tabelle 2.2: Genutzte Primerpaare und deren Verwendungszweck

Bezeichnung	Sequenz von 5' nach 3'
Klonierung des Gesamtlängenkonstruktes	
LeDXS1f	AGTGACAGTAGCACCAACACAC
LeDXS1r	CAAAGACTAACACCATTGGCCAAGA
LhDXS2f	ATGGCAGTTTCTTCAGGCACTGTATTTAG
LhDXS2r	TTCACCAACACTTTCTGCAATATGATC
Semiquantitative RT-PCR	
sLeDXS1 f	GGTCCTATGCATGAGCTTGCTG
sLeDXS1r	CACATCTCGAAGGCCGACCT
sLeDXS2 f	GACCTCAAGCACATGAAGTTGCAGC
sLeDXS2 r	CGAGTATATGACAACGTAGGCGAC
LE-ElongFac1_f	AACCCTCCTTGAGGCTCTTG
LE-ElongFac1_r	TCCTTACCTGAACGCCTGTC
Heterologe Expression in E. coli	
DXS1f	GAAAATGGCTTTGTGTGCTTATGCATTTCTGG
DXS1r	TTATGTCATAACCTCTAGAGCCTCTCTGGTTG
DXS2f	AGTTTGCAAGTATGATTTTTCAG
DXS2 r	TTAGTTTACTACCATAGCTTCTTTTG
DXS2 RNAi Konstrukt	
Gawa2 f	AACTAAATTTCCAAAAGGCTATAAG
Gawa2r	GTAGATTAAACAGTATGATTACTACG
Amplifikation des <i>NPTII</i> -Gens in transformierten Pflanzen	
pHg8-ccdB f	TGGGTGGAGAGGCTATTC
pHg8-ccdB r	TCTTCGTCCAGATCATCC
Promotorfusionen	
Prom1f	CACCACTTTGGGTGTGCATAAGTAG
Prom1r	GATTAGTCAATTCAACTGTTTTTTTC
Prom2f	CACCGGAGGGTCATCCTAACTATTTC
Prom2r	ATGAAAAATTTTACTCAGAGAGAAAAT
RealTime RT-PCR	
RT_DXS1_f	AACCTTTGCTGCTGGATTGG
RT_DXS1_r	TCAACGTCATGCACTACCTGG
RT_DXS2_f	AGCAGGCTTAGCTACAGAAGG
RT_DXS2_r	CCGTCTGCACCTACCAAACC
RT_EF_f	GCTGCTGTAACAAGATGGATGC
RT_EF_r	AGGGTTGTAACCAACCTTCTTGAA
RT_AOC_f	TTCTACTTCGGCGATTACGGTC
RT_AOC_r	GGTTAAGTACGCTCCCTGAACG

2.1.4 Vektoren

Die zur Anfertigung dieser Arbeit genutzten Vektoren sind im Folgenden dargestellt. Zusätzlich zu Größe und Verwendungszweck sind auch die praktische Arbeit erleichternde Informationen zusammengefasst.

Tabelle 2.3: Vektoren, die zur Anfertigung dieser Arbeit verwendet wurden; **1**: Bhat *et al.* (2006), **2**: Wesley *et al.* (2001).

Vektor	kb	Besonderheit	Verwendet für	Resistenz	Quelle
pGEM-T Easy	3,0	Lac-Operator	TA-Klonierungen	Carbenicillin	Promega GmbH, Mannheim
pJET	3,1	Klonierungsvektor	blunt-end-Klonierungen	Carbenicillin	Fermentas GmbH, St.Leon-Roth
pCR- Blunt II-TOPO	3,5	Lac-Promotor/Operator, <i>ccdB</i> -Gen	blunt-end-Klonierungen	Kanamycin	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
pENTR	2,6	Gateway Entry Vector	Gateway Klonierung	Kanamycin	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
pDONR	4,8	Gateway Entry Vector	Gateway Klonierung	Kanamycin	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
pET28a(+)	5,4	T7 Promotor, Lac Operator, His tag	Proteinexpression	Kanamycin	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
pQE60	3,4	T5 Promotor, Lac Operator, His-tag	Proteinexpression	Carbenicillin	Qiagen GmbH, Hilden
pEXSG-YFP	7,7	YFP, Gateway-Destination Vektor, binärer Vektor	Promotorfusionen	Carbenicillin	1
pHellsgate8	17,5	Gateway- Destination Vektor, RNAi Kasette, binärer Vektor	RNAi	Kanamycin	2

2.2 Methoden

2.2.1 Pflanzenanzucht

Die Anzucht der Tomatenpflanzen (Sorte Moneymaker, Castlemart und homozygoter *jai1*-Tomatenmutanten) erfolgte auf Einheitserde bei 24°C am Tag und 21°C in der Nacht. Die Luftfeuchtigkeit wurde konstant bei 65% gehalten. Die Photoperiode entsprach Langtagbedingungen (16/8 h).

Nicotiana benthamiana Pflanzen wurden auf Erde bei 22°C während des Tages und 18°C in der Nacht unter Langtagbedingungen bei konstanter Luftfeuchte von 53% angezogen.

2.2.2 Anzucht und Transformation von Mikroorganismen

E. coli

Für die Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen wurde LB Medium mit 1/100 Volumen Vorkultur angeimpft. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6 wurden die Zellen in einer gekühlten Zentrifuge mindestens 5 min bei 3000 x g abzentrifugiert. Das so erhaltene Pellet wurde in 1/5 Volumen in Puffer 1 (30 mM KAc; 100 mM RbCl; 10 mM CaCl₂; 50 mM MnCl₂; 15% (v/v) Glycerin; pH 5,8) resuspendiert. Nach Abkühlen auf Eis wurden die Zellen erneut sedimentiert und anschließend in 1/25 Volumen eiskaltem Puffer 2 (10 mM MOPS; 75 mM CaCl₂; 10 mM RbCl; 15% (v/v) Glycerin; pH 6,5) resuspendiert und auf Eis für mindestens 30 Minuten inkubiert. Bis zur Verwendung wurden 50 µl Aliquots der Zellsuspension bei -80°C aufbewahrt.

Für die Transformation wurde ein Aliquot auf Eis aufgetaut, mit 2-10 µl Ligationsansatz (Abschnitt 2.2.3) oder Plasmid versetzt und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock für 75 Sekunden bei 42°C. Vor der Zugabe von 450 µl SOC- oder LB-Medium wurde der Ansatz nochmals für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Inkubation für mindestens 35 Minuten bei 37°C erfolgte das Ausplattieren von 70 - 150 µl des Transformationsansatzes auf LB-Agarplatten, die das Selektionsantibiotikum enthielten. Die Konzentrationen der verwendeten Antibiotika wurden wie folgt gewählt: Carbenicillin 50 µg/ml, Chloramphenicol 50 µg/ml, Kanamycin 50 µg/ml, Spectinomycin 100 µg/ml und Gentamycin 25 µg/ml. Die Blau-Weiss-Selektion wurde unter Verwendung geeigneter Plasmide durch Zugabe von 0,5 mM IPTG und 80 µg/ml X-Gal und entsprechendem Antibiotikum durchgeführt. Die Inkubation der Platten erfolgte über Nacht bei 37°C.

A. tumefaciens

Zur Herstellung elektrokompeter *A. tumefaciens* Zellen wurden LB-Medium mit 1/100 Volumen Vorkultur inokuliert und bei 28°C und ständiger Belüftung bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6 inkubiert. Nach Abkühlen der Zellkultur auf Eis, erfolgte die Sedimentation in einer gekühlten Zentrifuge bei 3000 x g

für mindestens 10 Minuten. Das so erhaltene Pellet wurde zweimal mit doppelt destilliertem Wasser gewaschen bevor ein letzter Waschschrift mit 10% (v/v) Glycerin erfolgte. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 1/200 Volumen 10% (v/v) Glycerin gelöst und in Aliquots von 100 μ l bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Zur Transformation der *A. tumefaciens* Zellen wurde ein Aliquot der kompetenten Zellen aufgetaut und mit dem zu transformierenden Plasmid versetzt. Die Suspension wurde kurzzeitig auf Eis gelagert bevor die Elektroporation in einer vorgekühlten Küvette (Spaltbreite: 2 mm, Eurogentec GmbH, Köln) an dem MicropulserTM (BioRad Laboratories GmbH, München) nach Herstellerangaben erfolgte. Nach kurzer Abkühlung wurde der Ansatz mit 1 ml LB Medium versetzt und für 2 h bei 28°C geschüttelt. Danach erfolgte das Ausplattieren auf Selektionsplatten, die wiederum für 2 d bei 28°C inkubiert wurden.

2.2.3 Molekularbiologische Arbeiten mit Nukleinsäuren

Isolierung von Nukleinsäuren aus Pflanzen

Pflanzliches Material wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und durch Mörsern oder den Gebrauch einer Kugelmühle zerkleinert. Die Isolierung der genomischen DNA für Southern Blot-Analysen erfolgte mittels DNeasy Kit für pflanzliches Gewebe (Qiagen GmbH, Hilden) mit allen optionalen Schritten nach Herstellerangaben. Nach Elution wurde die erhaltene genomische DNA durch Zugabe von 3 M Natriumacetat (1/10 Volumen) und 96% EtOH (2,5 Volumen) gefällt. Die Konzentrationbestimmung erfolgt photometrisch.

Die Untersuchung der transgenen Pflanzen auf Präsenz des Resistenzgens benötigte ebenfalls genomische DNA. Dazu wurde ein schnelleres Protokoll nach Klimyuk *et al.* (1993) gewählt. Eine Blattprobe von etwa 1 cm^2 wurde mit 40 μ l 0,25 N NaOH versetzt und mechanisch zerkleinert gefolgt von Erhitzung bei 95°C für 30 Sekunden. Nach Zugabe von Puffer 1 (0,5 M Tris (pH 8,0), 0,25% Igepal CA 630 (Sigma-Aldrich, Steinheim)) wurde gründlich gemischt. Danach wurden die Proben mit 0,25 N HCl versetzt und gemischt, bevor eine finale Erhitzung von 2 Minuten bei 95°C erfolgte. Nach Zentrifugation wurden 2 μ l des Überstandes zur PCR eingesetzt.

Zur Isolierung von RNA wurde eine Säulchen-basierte Membrantechnologie nach Herstellerangaben verwendet (RNeasy Plant Kit, Qiagen GmbH, Hilden). Gepulvertes Material aller verwendeten pflanzlichen Proben wurde immer mit RLT-Puffer homogenisiert und mit dem obligatorischen DNaseA-Verdau behandelt. Die Lagerung der isolierten RNA erfolgte bei -80°C .

Plasmidpräparation aus Bakterien

Die Isolierung von Plasmiden aus Bakterienkulturen erfolgte mittels des GeneJet™ Plasmid Miniprep Kits (Fermentas GmbH, St. Leon-Roth) nach Angaben des Herstellers. Die isolierten Plasmide wurden anschließend einem Restriktionsverdau unterzogen, um die erfolgreiche Klonierung zu bestätigen. Zur Bestätigung der Amplifikation der exakten Sequenz wurde vor weiterführenden Klonierungen eine Sequenzierung durch MWG Biotech (Ebersberg) vorgenommen.

PCR

Die PCR (Polymerasekettenreaktion) wird für die Vervielfältigung eines DNA-Abschnittes genutzt. Zur Amplifikation werden zwei für den zu vervielfältigen Bereich spezifische Oligonukleotide (Primer) verwendet. Durch Anlagerung der Primer bei der Primer-spezifischen Temperatur ('annealing') entsteht ein partieller Doppelstrang, der durch die Polymerase verlängert wird ('elongation'). Durch zyklische Abfolge von DNA-Denaturierung, 'annealing' und 'elongation' für 25-35 Zyklen wird ein DNA-Fragment spezifisch vervielfältigt. Die Amplifikation der DNA-Fragmente erfolgte im Eppendorf MasterCycler® Gradient Thermocycler (Eppendorf AG, Hamburg) mit GoTaq®-DNA-Polymerase (Promega GmbH, Mannheim) und für die Klonierung von PCR-Fragmenten mit Platinum® PCR SuperMix oder AccuPrime® SuperMix II (beides von Invitrogen GmbH, Karlsruhe). Ein generelles Schema einer PCR ist nachfolgend dargestellt.

RT-PCR

Reverse Transkription erfolgte mit $1\ \mu\text{g}$ gesamt RNA (Abschnitt 2.2.3.1) unter Verwendung des Omniscript RT-Kits (Qiagen GmbH, Hilden) nach Herstelleran-

Tabelle 2.4: Schema eines PCR-Programms

Prozess	Temperatur	Zeit
Denaturierung	95°C	1-2 min
Denaturierung	95°C	30 sek
'annealing'	Primer T_m -5°C	30 sek
'elongation'	72°C	1 min/kb
25-35x Wiederholung der Schritte 2-4		
'final elongation'	72°C	10 min
Abkühlung	4°C	

gaben. Von der so erhaltenen cDNA (RNA-Äquivalent) wurden 5 ng zur PCR eingesetzt.

Real-Time RT-PCR

Die Verwendung der Real-Time RT-PCR ermöglicht die Quantifizierung von Transkriptmengen. In dieser Arbeit wurde der an doppelsträngige DNA bindende Fluoreszenzfarbstoff SYBR® Green I (Applied Biosystems GmbH, Darmstadt) verwendet. Die Detektion der Fluoreszenzintensität erfolgt nach jedem PCR Zyklus, so dass die Korrelation der Fluoreszenzstärke Rückschlüsse auf die eingesetzte DNA-Menge erlaubt. Als Wert der Quantifizierung wird der Ct-Wert genutzt, der den PCR-Zyklus angibt, bei dem ein definiertes Fluoreszenzniveau ('threshold') über dem Hintergrundsignal (Basislinie) detektiert wird. Die Sequenzen der verwendeten spezifischen Primer (RT DXS1f/r, RT DXS2f/r, RT EFl/r, RT AOCf/r) sind in Abschnitt 2.1.3 aufgeführt. Zur Wahrung der Spezifität wurden Schmelztemperaturen von 59 - 60°C gewählt und mögliche Primerdimere vermieden, da der Fluoreszenzfarbstoff an doppelsträngige DNA bindet. Der Reaktionsansatz ist in der folgenden Tabelle dargestellt. Für jede biologische Probe wurden drei technische Replikate angefertigt. Die Durchführung der Real-Time RT-PCR erfolgten in einem Mx3000P® oder Mx3005P™ QPCR-System (Stratagene, Amsterdam, Niederlande).

Das Programm der Real-Time RT-PCR in Tabelle 2.6 dargestellt. Die initialisierende Denaturierung von 10 Minuten dient der Aktivierung der Polymerase. Anschließend erfolgte die Analyse der Schmelzkurven durch Erhitzen von 60°C

Tabelle 2.5: Reaktionsansatz der Real-Time RT-PCR

Komponente	Konzentration
SYBR [®] Green PCR Master Mix	1x
Primer 'forward'	100 nM
Primer 'reverse'	100 nM
cDNA	5 ng RNA-Äquivalent
destilliertes Wasser	ad 10 μ l

(Primer bindet an Zielsequenz) auf 95°C. Dabei zerfällt der durch die PCR gebildete Doppelstrang und resultiert in der Abnahme der Fluoreszenz durch Freisetzung des Farbstoffes. Ein amplifiziertes DNA-Fragment zeigt ein spezifisches Temperaturmaximum.

Tabelle 2.6: Programm der Real Time RT-PCR

Real-Time PCR Programm		
Prozess	Temperatur	Zeit
Denaturierung	95°C	1-2 Minuten
Denaturierung	95°C	30 Sekunden
'annealing'	60°C	30 Sekunden
'elongation'	72°C	30 Sekunden
40x Wiederholung der Schritte 2-4		
Schmelzkurvenanalyse		

Nach der Durchführung der PCR wurden die Daten mit der MxProTM-Software (Stratagene Amsterdam, Niederlande) ausgewertet. Dabei wurden die gemessenen Fluoreszenzwerte auf den im SYBR[®]-Green Mix enthaltenen Referenzfarbstoff ROX normiert. Das Setzen der Basislinie erfolgte maschinell und adaptiv an jeder Reaktion. Die erhaltenen Ct-Werte mussten dabei über der Basislinie liegen, um weiter prozessiert zu werden. Zur Bestimmung der relativen Transkriptmenge wurde die PCR-Effizienz mit der LinRegPCR-Software für jede Probe exakt bestimmt. Alle Daten wurden dann der Berechnung nach Pfaffl (2001) unterzogen (siehe Formel). Als Referenzgen wurde das konstitutiv exprimierte Gen des Elongationsfaktors genutzt.

$$\text{relative Transkriptmenge} = \frac{(E^{\Delta CP})_{ZG}}{(E^{\Delta CP})_{RG}}$$

E - mit der Software LinRegPCR ermittelte PCR-Effizienz

ΔCP - Kontrolle minus Probe

ZG - Zielgen

RG - Referenzgen

Als Referenzprobe für die Transkriptmengenanalyse in den verschiedenen 96-well Platten diente die Probe des jungen Blattes. Durch die deutliche Abweichung der Transkriptmengen des Elongationsfaktors der analysierten Pollen um mehr als 1,5 Zyklen konnte für die Analysen der Pollen nicht die Blattprobe als Referenz genutzt werden. Die Werte der keimenden Pollen wurden auf die Werte der ungekeimten Pollen bezogen.

Genome Walking & Klonierung der Promotorfusionskonstrukte

Zur Identifizierung der potentiellen Promotorsequenzen wurde ein 'Genome Walking' mit dem GenomeWalker[®] Kit (BD Bioscience Clontech, Heidelberg) nach den Herstellerangaben durchgeführt. Diese Technik ermöglicht die Isolierung unbekannter genomischer Sequenzen ausgehend von einer bekannten Nukleotidsequenz. Zur Amplifikation wurde der Platinum[®] PCR SuperMix (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) verwendet. Die erhaltenen Fragmente wurden elektrophoretisch aufgetrennt und die größten Fragmente mittels GelExtraction Kit (Qiagen GmbH, Hilden) aus der Agarosegelmatrix eluiert und in pGEM[®] T-Easy (Promega GmbH, Mannheim) kloniert. Die Sequenzierung erfolgte durch MWG Biotech (Ebersberg). Fragmente von 1 kb Länge vor dem ATG-Startkodon wurden für die weiteren Analysen verwendet.

Gateway[™]-Klonierungen

Die Klonierung der Promotorfragmente, sowie der RNAi-Konstrukte wurde mittels Gateway[®] Technologie (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) vorgenommen. Die Technik beruht auf dem sequenzspezifischen Rekombinationssystem des Phagen λ und ermöglicht durch die Nutzung eines Zwischenvektors (pDONR, pENTR[™]) eine

schnelle und unkomplizierte Umklonierung von Sequenzen ohne Restriktionsenzyme. Als Zielvektor diente für die RNAi-Konstrukte pHellsgate8 (Wesley *et al.*, 2001), während für die Promotorstudien pEXSG (Bhat *et al.*, 2006) verwendet wurde.

Auffüllen 3' überhängender Enden

Die Nutzung von Polymerasen mit 'proofreading' Funktion (wie zum Beispiel der *Pfu*-Polymerase) erzeugt weniger Fehler bei der Amplifikation von DNA-Fragmenten. Im Gegensatz dazu amplifizieren andere DNA-Polymerase (ohne 'proofreading', *Taq* Polymerase) schneller, und erzeugen am 3' Ende ein Adenosin Überhang, was die TA-Klonierung des Vektors pGEM[®] T-Easy benötigt. Das Anfügen von 3'-Adenosinen an durch die *Pfu*-Polymerase erzeugte Fragmente erfolgte durch Inkubation dieser mit 0,2 mM dATP, 1x Reaktionspuffer und 5 U GoTaq[®]-DNA-Polymerase (Promega GmbH, Mannheim, Deutschland) für 30 min bei 70 °C. Diese Produkte konnten anschließend zur Ligation in den Vektor pGEM[®] T-Easy eingesetzt werden.

Konventionelle Klonierungen

Für konventionelle, gerichtete Klonierungen in einen Zielvektor wurden jeweils neue Primerpaare generiert. Die Nukleotide, die der spezifischen Sequenzerkennung dienen wurden um die von den gewählten Restriktionsenzymen erkannten Sequenzen erweitert. Die amplifizierten Fragmente wurden in Klonierungsvektoren (siehe Abschnitt 2.1.4) kloniert und die korrekte Amplifikation durch Sequenzierung (MWG Biotech, Ebersberg) kontrolliert. Im nächsten Schritt wurden der Zielvektor, sowie der Klonierungsvektor (mit Fragment) mit den ausgewählten Restriktionsenzymen geschnitten. Nach elektrophoretischer Auftrennung im Agarsegel erfolgte die Elution der richtigen Fragmentgrößen aus der Matrix (GelExtraction Kit, Qiagen GmbH, Hilden). Die Fragmente wurden dann zur Ligation eingesetzt.

Ligationen

Ligationen der PCR-Produkte in pGEM[®] T-Easy wurde mit der T4 DNA-Ligase (Promega GmbH, Mannheim) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Umklonierung von PCR Fragmenten von Vektor zu Vektor wurden mit der T4 DNA-Ligase und dem entsprechenden Puffer vorgenommen. Eine weitere Variation der Klonierung erfolgte durch Vereinigen beider Ansätze nach Restriktion. Die DNA wurde mit Hilfe des SureClean Kits (Bioline GmbH, Luckenwalde, Deutschland) nach Angaben des Herstellers ausgefällt und getrocknet. Das Pellet wurde im Ligationansatz (Puffer, T4 DNA Ligase) aufgenommen und für mindestens eine Stunde inkubiert. Anschließend erfolgte die Transformation in kompetente *E. coli*-Zellen.

Southern Blot

Diese Methode wurde zu Bestimmung der Kopienzahl der T-DNA der erzeugten transgenen Pflanzen verwendet. Als Sonde diente ein Digoxigenin (DIG)-markiertes *NPTII* Gen, welches mit Hilfe des PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche GmbH, Freiburg i.Br.) erzeugt wurde. Die Isolierung genomischer DNA wurde, wie in Kapitel 2.2.3 beschrieben, isoliert und 10 μ g mit Restriktionsenzymen verdaut. Dafür wurde ein in der SONDENSEQUENZ schneidendes (*Pst*I) und ein nicht-schneidendes (*Eco*RV) verwendet. Die Auftrennung der Proben und des Dig-markierten Markers (DNA molecular weight Marker II, Roche GmbH) erfolgte in einem 0,75%igem Agarosegel über Nacht bei 20 V. Die Übertragen auf die Membran (Nytran[™] SuperCharge Nylon Membranes, Whatman GmbH, Dassel) erfolgte mit Hilfe des TurboBlotter-Systems (Whatman GmbH, Dassel) nach den Herstellerangaben für alkalischen DNA-Transfer. Danach erfolgte die Fixierung der DNA auf der Membran durch UV-Bestrahlung. Nach Inkubation mit der Sonde und mehreren Waschschritten wurde die Entwicklung des Blots unter Verwendung einer lichtemittierenden Reaktion auf Röntgenfilm entwickelt.

2.2.4 Arbeiten mit Proteinen

Extraktion pflanzlicher Proteine

Gesamtproteinextrakte aus pflanzlichem Gewebe für Western Blot-Analysen wurde durch phenolische Extraktion nach Meyer *et al.* (1988) gewonnen. Es wurde ein Gramm gemörsertes Pflanzenmaterial eingesetzt und mit gleichen Volumina Tris-gesättigtem Phenol (pH 8,0) und Phenol-gesättigtem TrisHCl (pH 8,0) versetzt und unter Rühren inkubiert. Nach Zentrifugation wurde die phenolische Phase entnommen und mit 4 Volumen 0,1 M Ammoniumacetat (in Methanol) zugegeben. Die Proteinfällung erfolgte über Nacht bei -20°C. Das sedimentierte Pellet wurde mehrfach mit 0,1 M Ammoniumacetat (in Methanol) gewaschen und anschließend getrocknet. Das Lösen des Pellets erfolgte durch Zugabe von Probenpuffer (68 mM TrisHCl, pH 6,8, 2% (w/v) SDS, 0,7 M 2-Mercaptoethanol, 10% (v/v) Glycerin) und kurzzeitigem Aufkochen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte nach der von Esen (1978) beschriebenen Methode.

Für den Nachweis der Aktivität durch transiente Expression in *N. benthamiana* wurden die infiltrierten Blattbereiche vier Tage nach Infiltration geerntet und in Puffer (20 mM Tris (pH7,5), 250 mM NaCl, 10 mM DTT, 5% (v/v) Glycerin) im Glashomogenizer aufgeschlossen. Nach der Abtrennung fester Bestandteile durch Zentrifugation wurden die Extrakte entsalzt (Sephadex PD10 Säulen, GE Healthcare, München). Die Aufkonzentrierung der Proben erfolgte in Zentrifugenröhrchen (Amicon MWCO 10000).

Konzentrationsbestimmung

Konzentrationsbestimmungen der Proteinextrakte aus Tomatengeweben und aus *N. benthamiana* Blattextrakten der transienten Überexpression wurde durch Nutzung der Methode von Bradford (1976) vorgenommen. Dazu wurde 1 ml Bradford-Reagenz (0,065% (w/v) Coomassie G-250 in 5% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Phosphorsäure) mit 2-20 μ l des Proteinextrakts versetzt und 5 min inkubiert. Die Extinktion wurde durch Messung bei 595 nm gegen den Blindwert gemessen. Die Berechnung der Proteinkonzentration erfolgte durch Vergleich mit einer BSA-Eichgerade. Die Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Reagenz

wird durch die Anwesenheit von SDS im Puffer verfälscht. Somit wurde eine andere Methode der Proteinkonzentrationsbestimmung der pflanzlichen Proteinextrakte gewählt. Diese Methode wurde nach Esen (1978) durchgeführt. Dafür werden für jede Probe Dreifachbestimmungen durchgeführt. Je 5 μl der Probe werden auf Filterpapier aufgebracht, getrocknet und mit Coomassie-Lösung (0,05% (w/v) Coomassie Blau, 10% (v/v) Essigsäure, 25% (v/v) Isopropanol) angefärbt. Als Standard wurden 5 μl einer 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ BSA- Lösung mitgeführt. Nach dem Entfernen der Hintergrundfärbung durch Waschen mit kochendem Wasser erfolgte die Elution in je ml 0,5% (w/v) SDS (in Wasser) für 30 min bei 55°C. Die photometrische Detektion des eluierten Coomassieblaus erfolgte bei 578 nm. Die Mitführung des Standards erlaubt die Berechnung der Proteinkonzentration der Proben.

SDS-PAGE

Mittels SDS-PAGE werden Proteine in denaturierter Form anhand ihres Molekulargewichtes aufgetrennt. Trenngele mit einem Gehalt von 10% Acrylamid wurden verwendet. Die Proteinproben wurden vor dem Beladen mit Proteinprobenpuffer (0,125 M Tris (pH 6,8), 5 mM EDTA, 15% (v/v) Glycerin, 2% (w/v) SDS, 0,1% (w/v) Bromphenolblau, 0,1% (v/v) 2-Mercaptoethanol) versetzt. Die Elektrophorese wurde bei 20 -25 mA Stromstärke für 60-90 min vorgenommen. Anschließend wurden die Gele entweder mit Coomassieblau angefärbt oder für Western Blot-Analysen weiter verwendet.

2.2.5 Heterologe Expression in *E. coli* und Aufreinigung der rekombinanten Proteine

Zur Überexpression der *SIDXS*-Sequenzen (ohne Transitpeptid) wurde diese in den pET 28a+-Vektor (zusätzlich mit 6x-Histidin verknüpft) kloniert. Zur Expression wurden die Vektoren in kompetente Zellen des *E. coli*-Stammes BL21- CodonPlus (DE3)-RIL (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) transformiert. Die Inokulation der Hauptkultur erfolgte mit 1/10 Volumen über Nacht gewachsener Vorkultur. Nach dem Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase ($OD_{600}=0,6$) wurde

die Expression der rekombinanten Proteine mit 1 mM IPTG induziert. Die weitere Inkubation erfolgte bei 20°C über Nacht unter ständigem Schütteln. Danach wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet (15 min, 5000 x g, 4°C) und Puffer 1 (30 mM NaH₂PO₄ (pH 7,5), 100 mM NaCl, 2,5 mM 2-Mercaptoethanol) resuspendiert und mittels Ultraschall (30 sek, 60% Leistung, 3x mit dem Gerät UW 2070 (Bandelin, Berlin)) aufgeschlossen. Durch erneute Zentrifugation (10 min, 20 000 x g, 4°C) wurde die lösliche Proteinfraction erhalten. Die affinitätschromatographische Aufreinigung erfolgte unter Verwendung der TALON-Matrix (BD Bioscience Clontech, Heidelberg). Dabei werden die mit 6x Histidin fusionierten, rekombinanten Proteine an die Matrix gebunden. Die Elution erfolgte durch hoch-Imidazol Puffer 4 (30 mM NaH₂PO₄ pH 7,5, 100 mM NaCl, 2,5 mM 2-Mercaptoethanol, 250 mM Imidazol, 1 mM TPP, 2,5 mM MgCl₂) nach dem Waschen mit zwei niedrig-Imidazol-Puffern (Puffer 2: 30 mM NaH₂PO₄ pH 7,5, 100 mM NaCl, 2,5 mM 2-Mercaptoethanol, 20 mM Imidazol; Puffer 3: 30 mM NaH₂PO₄ pH 7,5, 100 mM NaCl, 2,5 mM 2-Mercaptoethanol, 40 mM Imidazol, 1 mM TPP, 2,5 mM MgCl₂).

2.2.6 Transiente Expression in *Nicotiana benthamiana*

Promotorfusionen

Die Promotorfusionen wurden mittels GatewayTM-basierter Technologie (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) in den Vektor pEXSG, der die Sequenz des gelb-fluoreszierenden Proteins (YFP) trägt, kloniert. Als Kontrolle wurde der CaMV 35S Promotor verwendet. Diese Konstrukte wurden in kompetente *Agrobacterium tumefaciens* GV3103 pmp 90RK Zellen transformiert. Für die transiente Expression wurden 5 ml YEB-Medium Kulturen bei 28°C angezogen. Am darauf folgenden Tag wurden 20 µM Acetosyringon, 10 mM Glucose und 10 mM MES-Medium (pH 5,6) zugegeben. Nach einem weiteren Tag Wachstum bei 28°C wurde die optische Dichte bestimmt und mit Infiltrationsmedium (5% Saccharose, 0,18% Glucose, 0,43% MS-Medium (Duchefa, Harlem, Niederlande) pH 5,6, 0,2 mM Acetosyringon) auf 1 eingestellt. Die Infiltration erfolgte in die Blattunterseite von nicht-blühenden *N. benthamiana* Pflanzen. Drei bis fünf Tage nach der Infiltration wurden die infiltrierten Blattbereiche unter dem Konfokalmikroskop (LSM 510 Meta, Carl Zeiss

AG, Oberkochen) auf Fluoreszenz des YFP untersucht.

2.2.7 Herstellung spezifischer Peptid-Antikörper

Zur spezifischen Detektion der beiden DXS-Proteine wurden Isoenzym-spezifische Antikörper benötigt. Die Nutzung von Peptidantikörpern schien dabei eine geeignete Wahl zu sein. Die ausgewählten Peptide sollten nicht nur hydrophil sein und eine hohe potenzielle Antigenizität zeigen, sie mussten auch in einem Bereich gewählt werden, in dem beide SIDXS-Proteine möglichst unterschiedliche Aminosäuresequenzen aufweisen. Für SIDXS2 wurden zwei Peptide am N- (SLQIDFSGEK) und C-Terminus (LTLLGRPKEAMVVN) der reifen Proteins gewählt und zur Immunisierung von Kaninchen verwendet. Ratten wurden als Wirte für die Produktion des DXS1-Antikörpers ausgewählt, um eine Co-Lokalisierung zur ermöglichen. Das ausgewählte Peptid der SIDXS1-Sequenz befand sich am N-Terminus (QASLSESGEYYTQ). Die ersten Tests der Seren zeigten viele unspezifische Bindungen an andere pflanzliche Proteine und somit wurden beide Seren nochmals gegen die entsprechenden Peptide affinitätsgereinigt. Die Antikörper wurden durch die Firma Eurogentec GmbH (Köln) erzeugt und aufgereinigt.

2.2.8 Dot Blot-Analysen

Für die Dot Blot-Analysen wurden die rekombinanten, aufgereinigten Proteine der heterologen Expression verwendet. Die Verdünnungsstufen wurden in vergleichbaren Volumina auf die Nitrocellulose-Membran aufgetropft und getrocknet. Die Antikörperverdünnungen betragen immer 1:1000. Das Protokoll der Antikörperbehandlung und der Entwicklung wurde analog der Western Blot-Analyse durchgeführt.

2.2.9 Western Blot-Analysen

Elektrophoretisch aufgetrennte Proteine wurden auf Nitrocellulosemembranen mit Hilfe des XCell II Blot-Moduls (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) nach Herstellerangaben (60 min, 30 V) übertragen. Die Membran wurde danach in TBS (100 mM

Tris/HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl) gewaschen und anschließen mit Blockierlösung (5% (w/v) BSA in TBST (20 mM Tris pH7,5, 150 mM NaCl, 0,05% (v/v) Tween 20)) inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Die verwendeten Primärantikörper wurden 1:1000 in Blockierlösung verdünnt verwendet. Die Bindung der Antikörper wurde über Nacht bei bei 4°C durchgeführt. Unspezifisch gebundene Antikörper wurden durch Waschen mit TBST entfernt. Der gegen den Wirt des Primärantikörpers gerichtete Sekundärantikörper wurde ebenfalls in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt und war zur enzymatisch colorimetrischen Detektion mit der alkalischen Phosphatase gekoppelt. Eine Farbreaktion mit NBT (p-Nitroblautetrazoliumchlorid) / BCIP (5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat) ermöglichte die Entwicklung der Blots.

Die im späteren Verlauf der Arbeit durchgeführten Western Blot-Analysen zeigten eine Abnahme der Antikörpersensitivität. Dadurch wurden die Antikörperlösungen geringer verdünnt (DXS1-Antikörper: 1:250, DXS2-Antikörper 1:750). Zusätzlich wurde ein sensitiveres Detektionssystem ausgewählt. Es wurden Sekundärantikörper verwendet, die an die Meerrettichperoxidase (horse raddish peroxidase, HRP) gekoppelt waren. Die verwendeten Verdünnungen betragen 1: 8500 (DXS1) und 1:5000 (DXS2). Die Detektion der lichtemittierende Reaktion der Peroxidase (ECL-Kit, Millipore GmbH, Schwalbach) wurde durch Nutzung von Röntgenfilmen dokumentiert.

2.2.10 Immunlokalisierung

Blattmaterial von Tomaten wurde zunächst in Fixierlösung (4% (v/v) Paraformaldehyd, 0,1% (v/v) Triton X-100, 4 mM KCl, 2 mM KH₂PO₄, 12 mM Na₂HPO₄, 180 mM NaCl) inkubiert. Die anschließende Einbettung in PEG (Polyethylenglycol) erfolgte nach Hause *et al.* (1996). Die Anfertigung von 3 µm Schnitten erfolgte am Rotationsmikrotom (HM 325, Microm International GmbH, Walldorf, Deutschland). Anschließend wurden die Schnitte auf Poly-L-Lysin beschichtet Objektträger übertragen und nach Auswaschen des PEGs mit Blockingreagenz (5% (w/v) BSA, 4 mM KCl, 2 mM KH₂PO₄, 12 mM Na₂HPO₄, 180 mM NaCl) inkubiert. Immunmarkierung mit dem SIDXS2-Antikörper erfolgte in einer Verdünnung von 1:250 in Blockingreagenz inklusive 1% acetyliertem BSA. Als Kontrolle wurde der Antikörper vor der Nutzung für die Immunmarkierung mit einem

1000fachen Überschuss an Peptiden abgesättigt. Der verwendete Sekundärantikörper war an die alkalische Phosphatase gekoppelt und ermöglichte somit den Nachweis über die NBT/BCIP-Reaktion, wie bereits in Abschnitt Western Blot beschrieben.

2.2.11 Nachweis der Enzymaktivität

Derivatisierung von DXP mit anschließender chromatographischer Auftrennung

Dieser Nachweis beruht auf der von Han *et al.* (2003) beschriebenen Methode. Die heterolog exprimierten, rekombinanten Proteine wurden in den Reaktionsansatz (50 mM Tris-HCl (pH7.5), 2,5 mM DTT, 0,5 mM TPP; 2,5 mM MgCl₂, 10 mM Pyruvat, 20mM *D,L*-Glyceraldehyd) eingesetzt und bei 30°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Denaturierung des Proteins für 10 min bei 80°C. Nach Zentrifugation (10 000x g, 3 min) wurde der Überstand zur Derivatisierung mit Anthranilsäure und Cyanborohydrid eingesetzt und für 60 min bei 80 °C inkubiert. Die Derivatisierungsreaktion wurde verdünnt auf einer NovaPAK Phenyl-Säule (Waters GmbH Eschborn) (Laufmittel: 1-3% Acetonitril, 0,125% 1-Butylamine, 0,5% THF, 0,25% Phosphorsäure) in einer HPLC (System der Firma Waters GmbH, Eschborn) aufgetrennt. Die Detektion erfolgte nach einer Anregung von 320 nm bei 425 nm.

Nachweis der Bildung radioaktiv-markierten DXPs

Der Einsatz von radioaktiv-markierten Substraten ist eine weitere Möglichkeit die Aktivität von Proteinen durch Produktbildung nachzuweisen. In dem Reaktionsansatz wurden 0,25 µCi 2-¹⁴C-markiertes Pyruvat, sowie die anderen Komponenten (30 mM Pyruvat, 20 mM GAP, 50 mM Tris-HCl (pH7,5), 0,1 mM DTT, 0,5 mM TPP, 2,5 mM MgCl₂, 2 mM β-Mercaptoethanol) eingesetzt. Dazu wurden Proteinextrakte nach heterologer Expression in *E. coli*, sowie nach transientser Expression in *N. benthamiana*, sowohl als Rohextrakt, als auch aufgereinigt eingesetzt. Nach dem Abstoppen der Reaktionen für 3 min bei 80 °C und Zentrifugation wurde

der Überstand zur Auftrennung auf Dünnschichtchromatographie Platten (Kieselgel 60 F254 Platten, Merck KGaA, Darmstadt) aufgetragen. Als Laufmittel diente das Gemisch von n-Propanol: Ethylacetat:Wasser (6:1:3). Nach einer Laufzeit von 5-8 h wurden die Platten getrocknet und einem Niedrig-Energie-Film exponiert.

Komplementation der *E. coli* DXM3 Mutante

Die *dxs*-defiziente *E. coli* Mutante DXM3 (Kim *et al.*, 2005b) wurde freundlicherweise von Prof. Soo-Un Kim (Seoul National University, Seoul, Korea) zur Verfügung gestellt. Dieser Stamm ist nicht in der Lage ohne Zugabe von Deoxyxylulose oder Methylerythritol zu wachsen. Eine Komplementation mit *SIDXS*-Konstrukten sollte diese Einschränkung aufheben. Dafür wurden die in den Expressionsvektor pET28a+ klonierten Konstrukte verwendet.

Komplementation des *E. coli* Stammes EcAB4-2

Zur Bestimmung der Funktionalität der klonierten Sequenzen wurde der *dxs*-defiziente Stamm EcAB4-2 komplementiert. Dieser Stamm enthält ein artifizielles Mevalonat-Operon und kann somit essentielle Isoprenoide durch Metabolisierung von Mevalonat synthetisieren (Sauret-Güeto *et al.*, 2006). Die Transformation zur Komplementation wurden mit den pET28a+-Konstrukten (jeweils ohne His-Tag und mit N- oder C-terminalen His-Tag) sowie Klonierungsvektor-Konstrukte eingesetzt. Zusätzlich wurden beide *SIDXS*-Sequenzen in den Expressionsvektor pQE60 (Qiagen, Hilden) kloniert (ohne His-Tag) und zur Transformation eingesetzt. Diese Arbeiten wurden am IBMB (Institut de Biologia Molecular de Barcelona) in der Arbeitsgruppe von Dr. M. Rodríguez-Concepción in Barcelona (Spanien) durchgeführt.

2.2.12 Stabile Transformation von Tomatenpflanzen

Zur spezifischen Reduktion der *SIDXS2*-Transkriptmengen wurden zwei Regionen mit möglichst geringer Sequenzähnlichkeit zur *SIDXS1*-Sequenz ausgewählt. Es

wurde eine 191 bp große Region, die hauptsächlich das Transitpeptid mit einschloss, sowie ein 263 bp langes Fragment des 3'UTR mit der PlatinumTM PCR SuperMix High Fidelity (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) amplifiziert und in den GatewayTM-Zwischenvektor pDONR kloniert. Während die Klonierung für das Transitpeptid-Konstrukt nicht gelang, wurde das Konstrukt des 3'UTR in den Zielvektor pHellsgate 8 (Wesley *et al.*, 2001), einen RNAi-Vektor, kloniert. Als Transformationskontrolle wurde ein „leerer Vektor“ generiert. Dafür wurden die *ccdB* Gene des pHellsgate Vektors mit *Xba*I und *Xho*I ausgeschnitten. Durch Auffüllen der entstanden Überhänge konnte der Vektor religiert werden. Somit trug der Kontrollvektor keine RNAi-Kassette mehr, aber immer noch das Resistenzgen *NPTII*. Die Transformation beider Plasmide erfolgte in den *Agrobacterium tumefaciens*-Stamm GV3101.

Zur Erzeugung transgener Pflanzen wurden Samen zunächst oberflächensterilisiert (15 min 70% Ethanol, 15 min 6% Natriumhypochlorid, Wasser) und in Töpfen mit Medium 1 (Murashige-Skoog-Medium (Duchefa, Harlem, Niederlande), 30 g/l Saccharose, 6 g/l Agar zur Pflanzenkultivierung (Duchefa) pH 5,8) 14 Tage im Dunkeln angezogen. Vor Inkubation in der Bakteriensuspension wurden die Keimblätter über die Mittelrippe verletzt und auf Platten mit Konditionierungsmedium (MS-Medium, 1 mg/l NAA, 0,1 mg/l BAP, 30 g/l Saccharose, 6 g/l Agar) überführt. Die Anzucht der *A. tumefaciens*-Zellen (mit dem RNAi-/ Kontrollvektor) erfolgte in Medium 2 (10 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Bactopepton, 5 g/l NaCl, 10 mg/ml Kanamycin, 20 μ M Acetosyringon) bei 28°C. Die Einstellung der OD₆₀₀ auf 1 erfolgte mit steriler Magnesiumsulfatlösung (10 mM). Die konditionierten Kotyledonenstückchen wurden für 10 min unter gelegentlichem Schwenken in der Bakteriensuspension inkubiert. Die Selektion der Blattstücke und der wachsenden Kalli erfolgte auf Medium 3 (Murashige-Skoog-Medium, 1 mg/l *trans*-Zeatin, 50 mg/l Kanamycin, 250 mg/l Ticarcillin, 30 g/l Saccharose, 6 g/l Agar). Genügend große, aus den Kalli gewachsene Sprosse wurden in Medium 4 (Murashige-Skoog-Medium, 0,1 mg/l IAA, 20 mg/l Kanamycin, 500 mg/l Ticarcillin, 30 g/l Saccharose, 6 g/l Agar) zur Bewurzelung überführt.

2.2.13 Isolierung von Blatttrichomen

Protokoll nach Gershenzon *et al.* (1992)

Zur Isolierung von Blatttrichomen wurden 60 g vorzugsweise junges Blattmaterial zerkleinert und eine Stunde in Puffer 1 (5 mM Aurintricarboxylsäure (ATA), 1 mM Thioharnstoff) inkubiert. Das durchtränkte Blattmaterial wurde danach in eine Bead-Beater-Kammer mit 35 g Amberlite XAD-4, 140 g Glassperlen (Durchmesser 0,5 mm) und Puffer 2 (25 mM HEPES (pH7,3), 200 mM Sorbitol, 10 mM Saccharose, 5 mM ATA, 1 mM Thioharnstoff, 0.6% (w/v) Methylcellulose, 1% (w/v) Polyvinylpyrrolidon) überführt. Die Zerkleinerung erfolgte dreimal mit jeweils 90 V und einer einminütigen Pause zwischen den Pulsen. Das homogenisierte Material wurde durch Gaze mit einer Porengröße von 350 μm filtriert. Weiteres Blattmaterial wurde durch die Filtrierung durch eine Gaze mit 105 μm Porengröße entfernt. Die isolierten Trichome wurden auf 40 μm -Gaze gesammelt. Die gesamte Methode wurde bei 4°C durchgeführt.

Protokoll nach Amme *et al.* (2005)

In einem 50 ml Reaktionsröhrchen wurden 3 g Blattmaterial gesammelt und bei -80°C eingefroren. Zur Extraktion von Trichomen wurden 9 g Glassperlen (Durchmesser 1,25 - 1,55 mm, Carl Roth GmbH & CoKG, Karlsruhe) zugegeben. Durch vorsichtiges Schütteln (30 sek) wurde das Blattmaterial zerkleinert. Der Inhalt des Röhrchens wurde durch ein vorgekühltes Sieb (trennt große Blattstücke ab) in ein -80°C kaltes Auffanggefäß gegeben. Durch Aufklopfen des Röhrchens wurden an der Gefäßwand haftendes Material abgelöst und ebenfalls in das gekühlte Gefäß überführt. Diese Methode wurde mit 30-60 g Blattmaterial durchgeführt. Zur Bestimmung der Verunreinigung durch Blattmaterial wurde der Chlorophyllgehalt bestimmt.

2.2.14 Trichomzählung

Die vergleichende Bestimmung der Anzahl der glandulären Trichome wurde jeweils auf der adaxialen Oberfläche eines 2 cm langen endständigen Fiederblattes vorgenommen. Ausgezählt wurde eine Fläche von 90 mm² in der Blattmitte. Der

Anteil der Fläche der Mittelvene an der Gesamtfläche wurde in die Berechnung mit einbezogen.

2.2.15 ESEM

Als bildgebendes Verfahren zur Begutachtung der Blattoberflächenstrukturen wurde 'environmental scanning electron microscopy' (ESEM) genutzt. Dies wurde freundlicherweise von F. Syrowatka am Interdisziplinären Zentrum für Materialwissenschaften (IZM) in Halle (Saale) unter Verwendung der Philips ESEM XL30 FEG durchgeführt.

2.2.16 Mykorrhizierung

Stecklinge der Tomatenpflanzen wurden mit *Glomus intraradices* inokuliert. Die Düngung der Pflanzen erfolgte zweimal wöchentlich mit 20 ml 0,5x LongAshton Dünger (Hewitt, 1966). Sechs Wochen nach Inokulation erfolgte die Probennahme. Das Wurzelmaterial wurde geerntet und bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung eingefroren. Zur Analyse wurden 200 mg homogenisiertes Material dreimal mit 400 µl 80% (v/v) wässriges Methanol versetzt. Die Untersuchung der Cyclohexenonderivate erfolgte mit 200 µl des Extraktes. Diese wurden vollständig eingengt ('speed vac', Concentrator 5301, Eppendorf AG, Hamburg) und in 40 µl 80% (v/v) wässrigem Methanol gelöst. Die Analyse der Mycorradicinderivate wurde mit 300 µl des Extraktes durchgeführt. Nach alkalischer Hydrolyse der Esterbindungen (Zugabe von 10 µl 10 M KOH) (Fester *et al.*, 2002) wurden die Proben 1 h inkubiert und anschließend 15 min bei 20 000 xg zentrifugiert. Die anschließende chromatographische Auftrennung von 20 µl der Extrakte erfolgte an einer 'Reversed-Phase'-Chromatographie-System (Waters GmbH, Eschborn) unter Verwendung einer 5 µm Nucleosil C₁₈-Säule (250 x 4 mm, Machery-Nagel, Düren). Als Laufmittel wurden 1,5% (v/v) Phosphorsäure und 100% Acetonitril verwendet. Die Auftrennung und Identifizierung der Cyclohexenon und Myorradicinderivate erfolgte nach Fester *et al.* (2002) und Schliemann *et al.* (2008).

2.2.17 Pollenanalyse

Zur Bestimmung der Pollenkeimungsfähigkeit wurden in Keimungsmedium (10% (w/v) Saccharose, 100 mg/l H_3BO_3 , 300 mg/l $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 200 mg/l MgSO_4 , 100 mg/l KCl) die Pollen aus den Antheren präpariert (Li et al., 2004). Nach zwei-stündiger Inkubation wurde die Keimungsrate mikroskopisch untersucht. Die Länge der Pollenschläuche wurde mit der Software LSM Image Examiner (Carl Zeiss AG, Oberkochen) ermittelt. Die Bestimmung der Lebensfähigkeit der Pollen wurde durch Färbung mit Fluoresceindiacetat vorgenommen (Heslop-Harrison & Heslop-Harrison, 1970). Die Lösung (0,01% (w/v) Fluoresceindiacetat, 10% (w/v) Saccharose in MS-Medium (Duchefa, Harlem, Niederlande)) wurde mit extrahierten Pollen inkubiert. Der Farbstoff diffundiert durch die Membran in die Zelle und wird dort durch unspezifische Esterasen gespalten. Das entstehende Fluorescein ist nicht membrangängig und akkumuliert somit in lebenden Zellen. Die Emission von Licht der Wellenlänge 520 nm durch das Fluorescein wird durch Anregung mit Licht der Wellenlänge 490 nm erreicht.

2.2.18 Analyse flüchtiger Metabolite

Die Duftstoffanalysen der transgenen Pflanzen wurden in Kooperation mit S. Garms und Dr. S. Bartram am Max-Planck-Institut für chemische Ökologie in Jena durchgeführt.

SPME

Zur Gewinnung der Trichominhaltsstoffe wurden 5 mm lange Polydimethylsiloxan (PDMS) Schläuche (1.5 mm innerer Durchmesser x 2.3 mm äußerer Durchmesser, Reichelt Chemietechnik, Heidelberg) verwendet. Vor Gebrauch wurden diese Schläuche zur besseren Handhabung auf Glasstäbe (1.5 mm äußerer Durchmesser) gesteckt und zur Aufbereitung für 15 min bei 250°C unter Heliumbegasung vorbehandelt. Zur Probennahme wurden die vorbereiteten Schläuche dreimal über die adaxiale Blattseite gleich großer und gleich alter Blätter geführt. Die gesamte Probennahme erfolgte innerhalb von 10 min. Vor der Messung wurden die PDMS Schläuche in jeweils einem Glasgefäß gelagert. Vor der Analyse der Duftstoffe

erfolgte die thermische Resorption durch den 'CONCEPT autosampler' (PAS Technologies, Magdala, Germany). Die Bestimmung der Isotopenverhältnisse und der relativen Konzentrationen der Duftstoffe wurde durch ein GC-C-IRMS System, bestehend aus einem HP 6890 (Agilent Technologies, Santa Clara CA, USA) mit optischem Injektor (Optic 3, ATAS Benelux B.V., Zoetermeer, Niederlande), einem Verbrennungsofen und einem IsoPrime Massenspektrometer (Micromass, Manchester, UK), durchgeführt. Die Auftrennung der Duftstoffe erfolgte unter dem Trägergas Helium mit einer Flussrate von 1 ml/min über eine ZB-5ms Sili-ciumoxidsäule (30 m x 0.25 mm i.d. x 0.25 μ m film, Phenomenex, Torrance, CA, USA). Der Säulenofen wurde für jede Probe beheizt genutzt: 2 min 45°C gefolgt von einem Anstieg auf 260°C mit 10°C/min und 30°C/min auf 280°C. Diese Temperatur wurde für 2 min beibehalten. Die von der Säule eluierten Komponenten wurden bei 850°C (unter Kupferoxid) verbrannt. Das entstandene Wasser wurde absorbiert, während das entstandene CO₂ im Massenspektrometer analysiert wurde. Zur Identifikation der von der Säule eluierten Substanz wurden 10% der Probe vor der Verbrennung in einem 'time-of-flight' Massenspektrometer (GCT, Micro-mass, Manchester, UK) analysiert. Basierend auf der Fläche des m/z 44 Signals der IRMS ('isotopic ratio mass spectrometry') erfolgte die Berechnung der relativen Duftstoffkonzentrationen. Dabei wurden die Werte auf die Anzahl der C-Atome pro Molekül (β -Phellandren C₁₀H₁₆, (*E*)- β -Caryophyllen und α -Humulen C₁₅H₂₄) normalisiert und spiegelten die relativ-produzierte CO₂-Menge wider. Zur Analyse der stabilen Isotopen-Verhältnisse wurde das System mit einem Gemisch von Referenzsubstanzen mit bekannten $\delta^{13}\text{C}$ Werten (Standardabweichung ≤ 0.2 ‰) eingestellt und auf die VPDB Skala mit Hilfe des IAEA Referenzmaterials NMS 22 mit einem $\delta^{13}\text{C}$ value of -29.78‰ (Werner & Brand, 2001) kalibriert. Isotopenverhältnisse werden als die Werte angegeben, die gegen den Standard (VPDB (Vienna Pee Dee Belemnite) berechnet wurden angegeben. Der $\Delta\delta^{13}\text{C}$ -Wert gibt Unterschiede der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte an.

$$\delta^{13}\text{C}_{VPDB} = \frac{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{Probe} - (^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{PDB}}{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{PDB}} \times 1000 \text{ ‰}$$

Headspace-Analysen

Die 'Headspace'-Technik wurde für die Raupenfraß-Experimente verwendet. Dafür wurden 5 Wochen alte Stecklinge inklusive Topf eingehüllt und mit 4-6 *Spodoptera littoralis*-Raupen versehen. Duftstoffe wurden für 48 h auf einem Aktivkohlefilter (1.5 mg Aktivkohle, CLSA-Filter, Gränicher and Quartero, Daumazan sur Arize, Frankreich) absorbiert, über welchen ein zirkulierender Luftstrom geführt wurde. Die Elution der Duftstoffe von den Filtern erfolgte mit 2 x 20 μ l Dichlormethan, welchem 100 μ g/ml Bromdecan als interner Standard zugesetzt wurde. Die GC/MS Analysen erfolgten in einem TRACE GC 2000 Gerät, welches mit dem TRACE MS (ThermoQuest/Finnigan, Bremen) und einer ZB-5 Kapillarsäule (0.25 mm i.d. x 15 m with 0.25 μ m film, Phenomenex, Torrance, CA, USA) ausgerüstet war.

2.2.19 Modellierung der 3-D-Strukturen

Die 3D-Modelle von SIDXS1 und SIDXS2 wurden von PD Dr. W. Brandt (IPB, Halle, Abt: Natur- und Wirkstoffchemie) mittels Homologie-Modellierung unter Verwendung der Software MOE (molecular operating environment, Chem. Comp. Group Inc., Montreal, Canada) erstellt. Als Template diente hierfür die Röntgenstruktur von 2O1X Xiang *et al.* (2007) mit einer Sequenzidentität von 44%. Die Stereochemische Qualität wurde mit PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993) überprüft. Alle Kriterien für eine ausreichende Qualität wurden erfüllt. Eine Analyse für korrekte Faltung wurde mit PROSA II durchgeführt (Sippl, 1990). Für alle Bereiche der Sequenzen wurde negative Energiewerte berechnet, die ein starker Hinweis auf eine prinzipiell richtige native Faltung der Protein Modelle sind. Die Abbildungen wurden mit der Software PyMol erstellt.

2.2.20 Statistische Auswertung

Die in der Arbeit dargestellten Werte resultieren aus mindestens drei Wiederholungen des Gesamtversuchs. Auf der Basis der Datenerstellung wurden die Ermittlung des Medians als Balken und der Standardfehler als Fehlerbalken dargestellt. Die statistische Auswertung der Experimente wurde mit One-Way ANOVA

durchgeführt. Anschließend erfolgte der Test auf signifikante Unterschiede mit dem Tukey-HSD post-hoc Test. In den Diagrammen wurden Werte der selben Signifikanzgruppe mit gleichen Buchstaben beschriftet.

3 Ergebnisse

3.1 Molekulare Charakterisierung von zwei DXS-Isoenzymen aus Tomate

Ausgangsmaterial der molekularbiologischen Arbeiten waren die in der EMBL-Datenbank eingetragenen Sequenzen der beiden bekannten Klassen von *DXS*-Genen aus einer Kulturtomate (*Solanum lycopersicum*, AF143812) und einer Wildsorte (*Solanum habrochaites*, AY687353). Anhand derer konnten die beiden Tomaten-*DXS*-Gene aus dem Kultivar MoneyMaker amplifiziert werden. Dies war die Grundlage für die Arbeiten zur Klonierung und molekularen Charakterisierung beider DXS aus der Kulturtomatensorte MoneyMaker.

3.1.1 Klonierung von Tomaten *DXS*-Sequenzen der Klasse 1 und Klasse 2

Nach der Amplifikation der Sequenzen mit spezifischen Primerpaaren (Abschnitt 2.1.3) wurden die resultierenden, etwa 2 kb großen PCR-Produkte in den Vektor pGEM[®] T-Easy kloniert und sequenziert.

Die *SIDXS1*-Sequenz aus dem Kultivar MoneyMaker wies keinerlei Nukleotid austausche zu der bereits bekannten, verfügbaren *SIDXS* auf. Der Vergleich der verfügbaren *DXS2*-Sequenzen aus *S. habrochaites* und der neu bestimmten aus *S. lycopersicum* zeigte einige Unterschiede was sich in einer Sequenzidentität von 98% auf der Nukleotidebene und 99% in der Aminosäuresequenz ausdrückt. Der Sequenzvergleich der beiden Isoenzyme der Kultursorte MoneyMaker (*SIDXS1* und *SIDXS2*) untereinander zeigte eine vergleichsweise geringe Sequenzidentität von 66% und 69% auf Nukleotid- und Aminosäureniveau.

In einem Ähnlichkeitsdiagramm aus anderen pflanzlichen DXS-Sequenzen konnten die beiden SIDXS-Sequenzen den zwei bekannten Klassen zugeordnet werden. SIDXS1 gruppiert mit anderen DXS1 Sequenzen, denen eine Funktion im Primärstoffwechsel zugeschrieben wird. Die SIDXS2-Sequenz zeigt Ähnlichkeit zu DXS2-Sequenzen, denen eine Rolle im Sekundärstoffwechsel zugeordnet wird (siehe Abbildung 4.1 in der Diskussion).

Zur Analyse der genomischen Struktur der kodierenden Bereiche beider *SIDXS*-Gene wurden die bereits beschriebenen spezifischen Primerpaare genutzt (Abschnitt 2.1.3). Nach erfolgreicher Amplifikation wurde für die *SIDXS1*-Sequenz ein 3,8 kb großes Fragment erhalten, während das *SIDXS2*-Fragment eine Größe von 4,6 kb aufwies. Diese Fragmente wurden ebenfalls in den Vektor pGEM® T-Easy kloniert und sequenziert. Die Sequenzen wurden bei EMBL eingereicht und sind unter FN424051 (*SIDXS1*) und FN424052 (*SIDXS2*) zugänglich. Durch den Vergleich mit der jeweiligen cDNA wurde die Exon-Intron-Struktur ermittelt. Der Vergleich der genomischen Sequenzen dokumentierte eine hohe Ähnlichkeit beider Gene mit jeweils 10 Exons und 9 Introns (Abbildung 3.1). Unterschiede zeigten sich in den Introngrößen, wobei die Introns 1,3,4 und 9 des *SIDXS2*-Gens größer sind als die des *SIDXS1*-Gens. Lediglich das Intron 6 des *SIDXS2*-Gens ist deutlich kleiner im Vergleich zum entsprechenden Intron der *SIDXS1*-Sequenz. Der Vergleich der einzelnen Exons und Introns zeigte in den Exonen höhere Sequenzidentitäten. Die vergleichsweise geringen Ähnlichkeiten der beiden ersten Exons sind einerseits auf die veränderte Größe zurückzuführen. Andererseits umfassen diese Exons das Transitpeptid und geringere Sequenzidentitäten sind somit nicht überraschend.

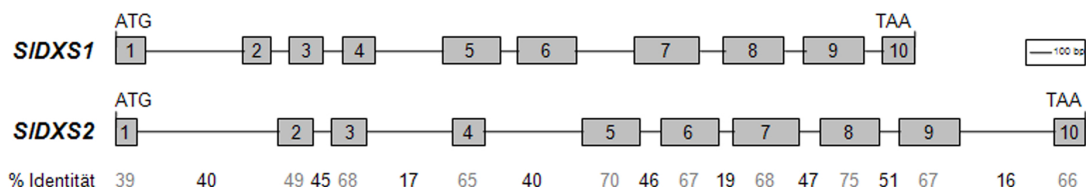


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der genomischen Struktur des kodierenden Bereiches beider *SIDXS*-Gene. Darunter sind die Identitäten der Nukleotidsequenz des jeweiligen Exons/Introns in Prozent dargestellt.

3.1.2 Promotoranalysen der beiden *SIDXS*-Gene

Die Regionen stromaufwärts beider Gene wurden mittels 'Genome Walking' ermittelt (Abschnitt 2.2.3). Die dabei erhaltenen Fragmente waren für *SIDXS1* 1,8 kb und für *SIDXS2* 2,9 kb groß.

Für die weiteren Analysen wurde ein jeweils etwa 1 kb großes Fragment stromaufwärts des Translationsstarts gewählt. Einerseits dienten die Sequenzen als Grundlage für computergestützte Analysen von putativen *cis*-regulierenden Motiven, andererseits wurden diese Fragmente für Fusionen mit Reportergenen genutzt. Als Reportergen, dessen Expression durch das Promotorfragment kontrolliert wurde, fand das Gen des gelb-fluoreszierenden Proteins (YFP, 'yellow fluorescent protein') Verwendung. Das Kontrollkonstrukt enthielt den konstitutiv exprimierten CaMV35S ('Cauliflower mosaic virus 35S') Promotor. Die transiente Expression erfolgte in Tabak (*Nicotiana benthamiana*). Für das verwendete Kontrollkonstrukt wurde eine deutliche Fluoreszenz in den Zellen der unteren Epidermis nachgewiesen. Dagegen wurde für die Promotorkonstrukte beider Tomaten *DXS*-Gene keine Fluoreszenz detektiert. Dies könnte bedeuten, dass der ausgewählte Bereich von 1 kb vor dem Translationsstart nicht die *cis*-regulierende Elemente enthält. Es könnte aber auch an einer geringen Promotoraktivität liegen. Durch die Kenntnis der *DXS2* als wundresponsives Gen (Sanchez-Hernandez *et al.*, 2006; Arimura *et al.*, 2008; Tretner *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2009) wurden nach der Transformation mit dem *DXS2*-Promotorkonstrukt zusätzlich verwundet. Dies führte zu einer geringen Fluoreszenz der Leitgewebe (nicht dargestellt). Somit konnte gezeigt werden, dass nach Verwundung der *SIDXS2*-Promotor in den Leitgeweben genutzt wird und eine Fragmentlänge von 1 kb vor dem Translationsstart für die Dokumentation der Promotor-Aktivität nach Induktion genügt.

Für die *in silico* Analysen der *SIDXS*-Promotorfragmente wurden zwei verschiedene Datenbanken verwendet, PLACE (Higo *et al.*, 1999) und PlantCARE (Rombaux *et al.*, 1999). Beide Programme erkennen durch Sequenzübereinstimmung mit bereits identifizierten *cis*-regulatorischen Elementen Motivsequenzen der eingegebenen Nukleotidfolge. Es wurden viele mögliche Motive identifiziert: 68 Motive in der *SIDXS1*-Sequenz und 49 Motive in der *SIDXS2*-Sequenz. Eine detaillierte Aufschlüsselung dieser Daten befindet sich im Anhang (Tabellen A.1 bis A.4). Die erhaltenen Motive wurden nach ihrer putativen Funktion zusammengefasst, wie

in Tabelle 3.1 dargestellt. Die Werte repräsentieren erstens die Quantität (Summe aller einer Funktion zugeordneten Elemente) und zweitens die Diversität (Anzahl der verschiedenen Elemente der zugeordneten Funktion). Die Gruppierung der Motive wurde anhand ihrer putativen Funktion in Gewebespezifität, zelluläre Einflüsse und Umweltreize vorgenommen. Beide Promotoren enthalten putati-

Tabelle 3.1: Darstellung der aus den *in silico*-Analysen resultierenden putativen *cis*-regulatorischen Elemente (Summe der Anzahl aller Elemente(Quantität)/Anzahl der verschiedenen Elemente (Diversität)). Zum Vergleich ist ebenfalls die Analyse des *MtDXS2-1*-Promotors aufgeführt (Floß *et al.*, 2008).

	<i>SIDXS1</i>	<i>SIDXS2</i>	<i>MtDXS2-1</i>
Wurzel-spezifisch	16/3	24/4	20/2
Samen-/Embryo-/Endosperm-spezifisch	25/11	19/7	20/2
Licht-reguliert	33/11	45/5	6/2
Blüte-/Pollenspezifisch	20/3	12/3	10/4
Plastid-spezifisch	2/1	9/4	-
Trichom-spezifisch	-	3/1	-
Keimblätter-spezifisch	1/1	-	-
Abscisinsäure-induziert	18/8	2/1	12/3
Auxin/Salicylsäure-induziert	7/4	5/2	6/3
Gibberellinsäure-induziert	4/2	4/2	1/1
Cytokinin-responsiv	7/1	7/2	11/1
Ethylen-responsiv	-	1/1	1/1
Pathogen-, Stress-reguliert	13/5	11/4	7/5
andere	44/18	40/13	54/22

ve *cis*-regulatorische Elemente, die eine gewebespezifische Expression vermitteln könnten. Obwohl beide Promotoren Elemente aufwiesen, die speziell für Expression in Wurzeln und Samen bekannt sind, unterschied sich die Anzahl beträchtlich. Die Anzahl der samenspezifischen *cis*-regulatorischen Elemente war in der *SIDXS1*-Promotorsequenz verglichen mit der *SIDXS2*-Promotorsequenz erhöht. Letzterer dagegen wies eine höhere Anzahl putativer Motive, die spezifisch für Wurzelexpression sind, auf. *Cis*-regulatorische Elemente, die potenziell lichtreguliert sind, wurden in beiden Promotoren gefunden. Eine deutlich höhere Diversität der Elemente ist im *SIDXS1*-Promotor zu finden. Trotz geringerer Diversität weist der *SIDXS2*-Promotor eine deutlich höhere Anzahl an putativ Licht-regulierten Elementen auf. Im Gegensatz dazu wurde eine höhere Anzahl Pollen-spezifischer

Motive im *SIDX1*-Promotor identifiziert. Ein Element, welches verantwortlich für die Trichomentwicklung der Baumwolle ist, wurde ausschließlich im *SIDX2*-Promotor detektiert. Die Betrachtung *cis*-regulatorischer Elemente, die vermutlich Phytohormon- und Pathogenese-reguliert sind, zeigte, dass der *SIDX1*-Promotor eine höhere Anzahl dieser Elemente enthält. Die Diversität dieser Elemente ist beim *SIDX1*-Promotor zumeist höher (Abscisinsäure; Auxin/Salicylsäure, Pathogen). Die *SIDX2*-Promotorsequenz beinhaltet mehr putative Cytokinin- und Ethylen-regulierte Elemente. Nur bei Elementen, die vermutlich durch Gibberellinsäure reguliert werden, stimmen Quantität und Diversität überein. Dies lässt vermuten, dass Phytohormone einen unterschiedlichen Einfluss auf die Expression beider Isogene haben könnten.

Die beiden Tomaten-Promotoren wurden mit dem *Medicago truncatula* *DXS2-1*-Promotor, dessen Zellspezifität in mykorrhizierten Wurzelzellen gezeigt wurde (Floß *et al.*, 2008), verglichen. Einige der Motive, sowie deren Diversität, zeigten, je nach Funktionszuordnung Ähnlichkeiten zum *SIDX1*- oder *SIDX2*-Promotor. Für die putativ regulatorischen Elemente der samenspezifischen Expression, sowie der Abscisinsäure- Responsivität wurden vergleichbare Quantitäten und Diversitäten, wie im *SIDX1*-Promotor gefunden. Die *MtDXS2-1*-Promotorsequenz wies eine hohe Anzahl an putativ Cytokinin-responsiven Elementen auf, während beispielsweise relativ wenig Licht-regulierte Elemente identifiziert wurden.

Die Kategorie “andere“ umfasst Elemente, deren Funktion bisher nicht genau bekannt ist. Motive, die als Erkennungssequenzen von Transkriptionsfaktoren mit multiplen Funktionen genutzt werden, wurden ebenfalls dieser Kategorie zugeordnet. Ferner wurden in beiden Promotoren putative für die Transkriptionsinitiation bekannte TATA-Boxen identifiziert (*SIDX1* zwei, *SIDX2* eine).

Dennoch handelt es sich bei diesen Analysen um *in silico* Daten, deren tatsächliche Funktion durch zum Beispiel Promotordeletionsstudien aufgeklärt werden sollte. Zusätzlich zu den genannten *cis*-regulatorischen Elementen weisen beide *SIDX*-Promotorfragmente einen hohen AT-Gehalt auf, welcher in DNA-Bereichen vorkommt, die leicht zugänglich für die Initiation der Transkription sind.

3.1.3 Nachweis der Funktionalität der rekombinanten Proteine

Ausschließlich der Nachweis der spezifischen DXS-Aktivität bestätigt die Klonierung der korrekten Gene. Dafür wurde aufgereinigtes rekombinantes Protein bei der DXS benötigt. Die *SIDXS*-Gene wurden ohne Transitpeptid mit N- und C-terminalem His-Tag, sowie ohne Tag in den Expressionsvektor pET28a+ kloniert und in die Expressionszellen *E.coli* (BL21) DE3 transformiert (Abschnitt 2.2.5).

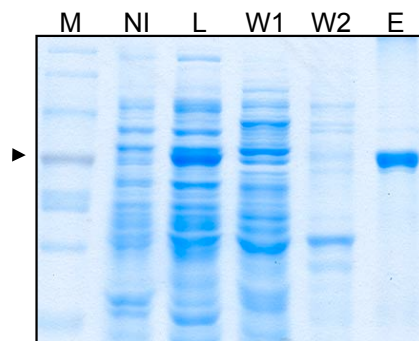


Abbildung 3.2: Überexpression und Aufreinigung des reifen, rekombinanten SIDXS2-Proteins mit C-terminalem His-Tag, **M**: Größenstandard, **NI**: nicht induziert, **L**: lösliche Proteinfraction nach 4 h Induktion mit IPTG, **W1/W2**: bei niedrig Imidazolkonzentration eluierte Proteine nach Bindung der löslichen Proteinfraction an die TALON-Matrix, **E**: Elution durch hohe Imidazolkonzentration, Pfeil weist auf die berechnete Größe des reifen DXS-Proteins von etwa 70 kDa hin.

Die Proteine konnten exprimiert werden und lagen nach dem Zellaufschluss in der löslichen Fraktion vor, wie exemplarisch für SIDXS2 in Abbildung 3.2 dargestellt. Zum Nachweis der katalytischen DXS-Aktivität wurden verschiedene Ansätze getestet. Diese Ansätze reichten von Derivatisierung der enzymatischen Reaktionen mit anschließender chromatographischer Auftrennung, über den Einsatz radioaktiv-markierter Substrate bis hin zur Komplementation von *E.coli*-Mutanten.

Derivatisierung mit anschließender chromatographischer Auftrennung

Diese Methode beruht auf einer Veröffentlichung von Han *et al.* (2003). In dieser Publikation wurde eine Derivatisierung des Reaktionsansatzes mit Anthranilsäure

und Natriumcyanborhydrid bei 80°C beschrieben. Anschließend erfolgte die chromatographische Auftrennung mittels HPLC.

Nach erfolgreicher Aufreinigung der His-Tag-Proteine mittels TALON Matrix wurde die Enzymaktivität, wie in Abschnitt 2.2.11 beschrieben, getestet. Nach Denaturierung des Enzyms bei 80°C erfolgte die Derivatisierung und Auftrennung mittels HPLC. In Abbildung 3.3 A sind exemplarisch die derivatisierten und chro-

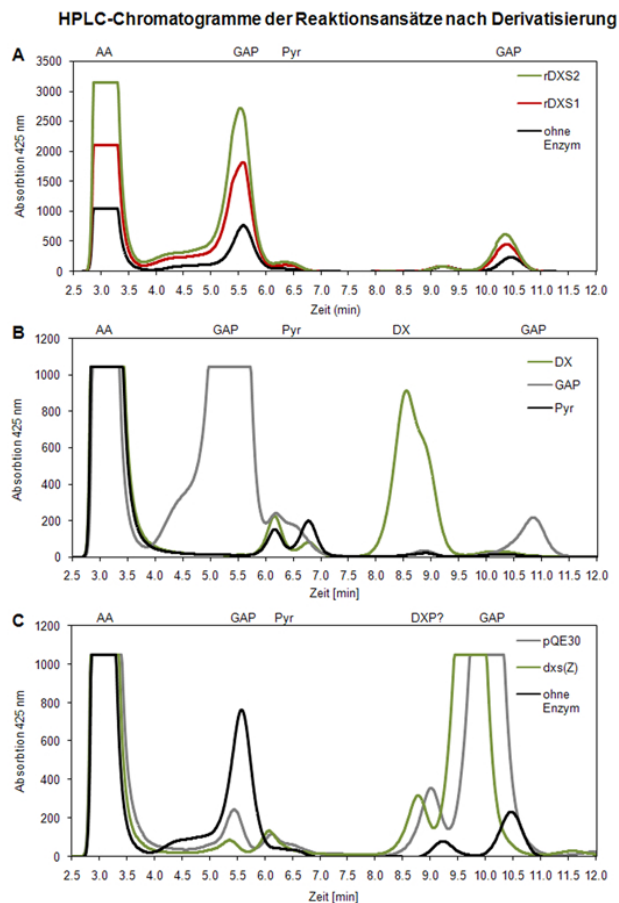


Abbildung 3.3: HPLC-Chromatogramme zur Bestimmung der DXS-Enzymaktivität nach Derivatisierung der Reaktionsansätze, **A**: Reaktionsansätze mit aufgereinigtem, rekombinantem DXS1/2-Enzym, sowie ohne Enzym, **B**: Einzelläufe der zu detektierenden Substanzen, **C**: dxs von *S. leopoliensis* (dxs(Z)) mit den erforderlichen Kontrollen, **AA**: Anthranilsäure, **GAP**: Glycerinaldehyd-3-phosphat, **Pyr**: Pyruvat, **DX**: 1-Deoxy-D-xylulose, **DXP**: 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat.

matographisch aufgetrennten Chromatogramme der Reaktionsansätze mit den rekombinanten SIDXS-Proteinen (SIDXS1 mit N-terminalem His-Tag und SIDXS2

mit C-terminalem His-Tag) dargestellt. Für die überexprimierten, aufgereinigten Tomaten-DXS-Proteine konnten keine Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle, bei welcher im Reaktionsansatz kein Enzym vorhanden war, festgestellt werden. Lediglich die Signale der Derivatisierungsreagenz (AA, Anthranilsäure) und der Substrate (GAP und Pyr) konnten detektiert werden. Zur Überprüfung der Funktionalität dieser Methode sollte eine überexprimierte *dxs* eines Cyanobakteriums, die bereits als funktionell beschrieben wurde, dienen (Plasmid von W. Zimmer erhalten, (Miller *et al.*, 1999)). Die *Synechococcus leopoliensis dxs* wurde in das pQE30-Plasmid kloniert, weshalb Zellen mit diesem Vektor als Kontrolle diente. Im Vergleich zur pQE30-Kontrolle konnten auch für dieses Konstrukt keine Unterschiede zwischen den Kontroll- und den Reaktionsansätzen mit rekombinantem *dxs* detektiert werden (Abbildung 3.3 C).

Somit konnte mit dieser Methode kein Nachweis der enzymatischen DXS-Aktivität geführt werden. Im Zuge der Etablierung dieser Methode traten häufig innerhalb eines Laufs Peakverschiebungen auf, was die Auswertung der Signale erschwerte. Diese Verschiebungen konnten durch Variieren des Acetonitrilgehaltes bei der HPLC-Auftrennung nicht kompensiert werden. Als kritisch wurde ebenfalls die Derivatisierung angesehen. Einerseits konnte die Vollständigkeit der Reaktion nicht überprüft werden, andererseits erfolgte die Derivatisierung bei sehr hohen Temperaturen, so dass beispielsweise ein thermischer Zerfall des Produktes nicht ausgeschlossen werden konnte.

Nachweis der Bildung radioaktiv-markierten DXPs

Der weitere Nachweis der enzymatischen DXS-Aktivität wurde durch den Einsatz ^{14}C -markierter Substrate vorgenommen. Dem Reaktionsansatz wurde radioaktiv ($2\text{-}^{14}\text{C}$)-markiertes Pyruvat hinzugefügt. Dieses würde durch funktionsfähige DXS-Proteine im Reaktionsansatz in ^{14}C -markiertes DXP umgewandelt werden. Die ^{14}C -markierten Substanzen sollten dünnenschichtchromatographisch aufgetrennt und anschließend auf einem Niedrig-Energie-Film detektiert werden. Für diese Experimente wurden die in den pET28a+-Vektor klonierten Konstrukte verwendet. Zunächst wurden die Konstrukte nach der etablierten Methode exprimiert und anschließend affinitätsgereinigt, wie in Abbildung 3.4 dargestellt, oder auch als Rohextrakt eingesetzt. Als Kontrollen wurden auf jeder Dünnschichtplatte

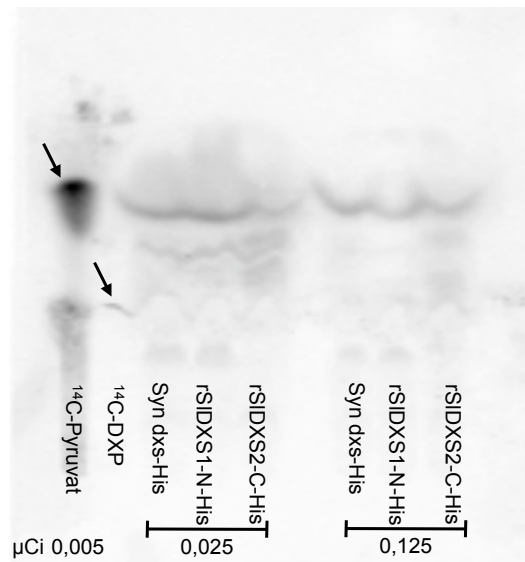


Abbildung 3.4: Reaktionsansätze unter Verwendung von radioaktiv-markiertem ^{14}C -Pyruvat und anschließender dünn-schichtchromatographischer Auftrennung, Pfeile weisen auf die Banden der Referenzsubstanzen hin.

^{14}C -markiertes Pyruvat und ^{14}C -markiertes DXP (freundlicherweise von Prof. M. Zenk zur Verfügung gestellt) aufgetragen. Für die in *E. coli* überexprimierten, rekombinanten Proteine konnte jedoch in keinem Ansatz eine Bande in der Höhe des ^{14}C -DXP detektiert werden. Durch Verwendung des ^{14}C -markierten Pyruvats konnte somit keine Funktionalität der rekombinanten DXS-Proteine nachgewiesen werden.

Komplementation von *E. coli* DXM3

Ein neuer Versuch zum Nachweis der enzymatischen Aktivität beider Tomaten DXS-Proteine wurde mittels Komplementation vorgenommen. Der *dxs*-defiziente *E. coli* Stamm DXM3 wurde freundlicherweise von Prof. Soo-Un Kim aus Seoul bereitgestellt. Dieser Stamm ist ohne Zugabe von Deoxyxylulose nicht lebensfähig. Die Transformation eines Plasmides, welches die cDNA einer funktionellen DXS trägt, sollte zur Komplementation, das heißt zum Überleben der *E. coli*-Zellen auf Deoxyxylulose-freiem Medium führen. Diese Komplementation sollte anhand einer höheren Kolonienanzahl sichtbar werden.

Es zeigte sich jedoch eine hohe Rückmutationsrate von 0,33 pro 10^6 Zellen. Bei einer Transformation ist somit eine von drei Millionen Zellen spontan wieder ohne

Tabelle 3.2: Mutationsrate des *dxs*-defizienten *E. coli* Stammes DXM3. Eine erfolgreiche Komplementation sollte eine deutlich höhere Anzahl an Kolonien als die Transformationskontrolle (ohne Plasmid) aufweisen.

Plasmid	Mutationsrate je 10 ⁶ Zellen
kein	0,33
<i>SIDXS1</i>	0,5
<i>SIDXS1</i> -N-His	0,2
<i>SIDXS2</i>	0,2
<i>SIDXS2</i>-N-His	1,2
<i>SIDXS2</i> -C-His	0,2

Deoxyxylulose überlebensfähig ist. Somit wuchsen auf den Kontrolltransformati-
onsplatten ebenfalls einige Kolonien. Um die Komplementation mit der *SIDXS*
als erfolgreich zu werten, musste die Anzahl der Kolonien signifikant über der
Rückmutationsrate der Kontrolltransformation liegen und damit einen deutlich
höheren Zahlenwert als die Rückmutationsrate aufweisen. Dies wurde nur mit
dem *SIDXS2*-Konstrukt mit N-terminalen His-Tag erreicht (Tabelle 3.2). Somit
konnte nur für *SIDXS2* eine Funktionsfähigkeit nachgewiesen werden, nicht aber
für *SIDXS1*. Aufgrund dieser Ergebnisse müsste der N-terminale His-Tag eine Ak-
tivitätssteigerung zur Folge haben, da für *SIDXS2* ohne einen fusionierten Tag
keine Funktionalität nachzuweisen war. Durch die relativ hohe, spontane Rück-
mutationsrate wurden diese Ergebnisse kritisch bewertet.

Komplementation des *E. coli* Stammes EcAB4-2

In einem weiteren Ansatz erfolgte die Komplementation eines anderen *dxs*-defi-
zienten *E. coli*-Stammes. Durch die Zerstörung des *dxs*-Gens fehlen die wich-
tigen Isoprenoidvorstufen IPP und DMAPP. Der Stamm EcAB4-2 enthält ein
synthetisches Mevalonatoperon, welches den Zellen ermöglicht, die Isoprenoid-
vorstufen IPP und DMAPP aus Mevalonat synthetisieren (Sauret-Güeto *et al.*,
2006). Fehlt Mevalonat in dem Medium, sind auch diese Zellen nicht überlebens-
fähig.

Die Transformation einer für ein funktionelles *DXS*-Gen kodierenden Sequenz in
diese Zellen ermöglicht ein Wachstum auch ohne Mevalonat. Zusätzlich zu den be-

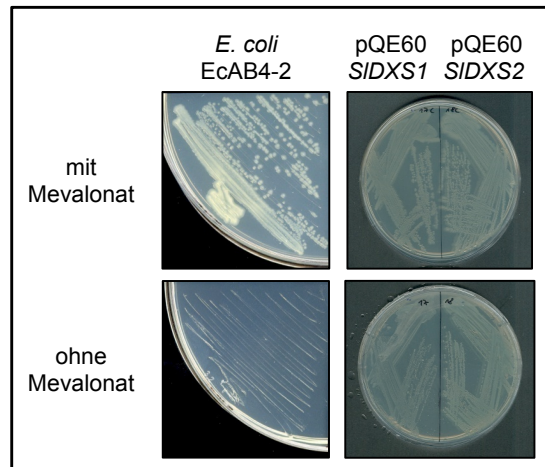


Abbildung 3.5: Komplementation des *E. coli* -Stammes EcAB4-2 mit den *SIDXS*-Sequenzen ohne putatives Transitpeptid. Ohne Zugabe von Mevalonat können nicht komplementierte Zellen nicht überleben.

reits vorhandenen diversen Klonierungs- und Überexpressionskonstrukten wurden beide Tomaten-*DXS* ohne Transitpeptid und ohne His-Tag in den Vektor pQE60 kloniert. Ein Kolonienwachstum auf Medium ohne Mevalonat konnte für diese pQE60-Konstrukte dokumentiert werden (Abbildung 3.5). Zur Bestätigung der erfolgreichen Komplementation wurden einige der gewachsenen Kolonien einer Plasmidpräparation mit anschließender Kontrollrestriktion unterzogen. Somit konnte der Nachweis der Funktionalität beider Tomaten-*DXS* durch erfolgreiche Komplementation des *E. coli*-Stammes EcAB4-2 geführt werden.

3.1.4 Modellierung der 3-D-Strukturen der beiden Isoenzyme

Eine mögliche Bestimmung biochemischer Parameter war durch das Fehlen eines geeigneten Detektionssystems nicht möglich. Aus diesem Grund sollten mögliche Unterschiede zwischen der Sekundär- und Tertiärstruktur beider Tomaten-*DXS*-Proteine anhand eines Modells erfolgen.

Als Basis wurde die zur Verfügung stehende Kristallstruktur einer bakteriellen *dxs* aus *Deinococcus radiodurans* (Xiang *et al.*, 2007) verwendet. Dieser Teil der Arbeit wurde in Zusammenarbeit mit PD Dr. Wolfgang Brandt (IPB, Abt. Natur- und

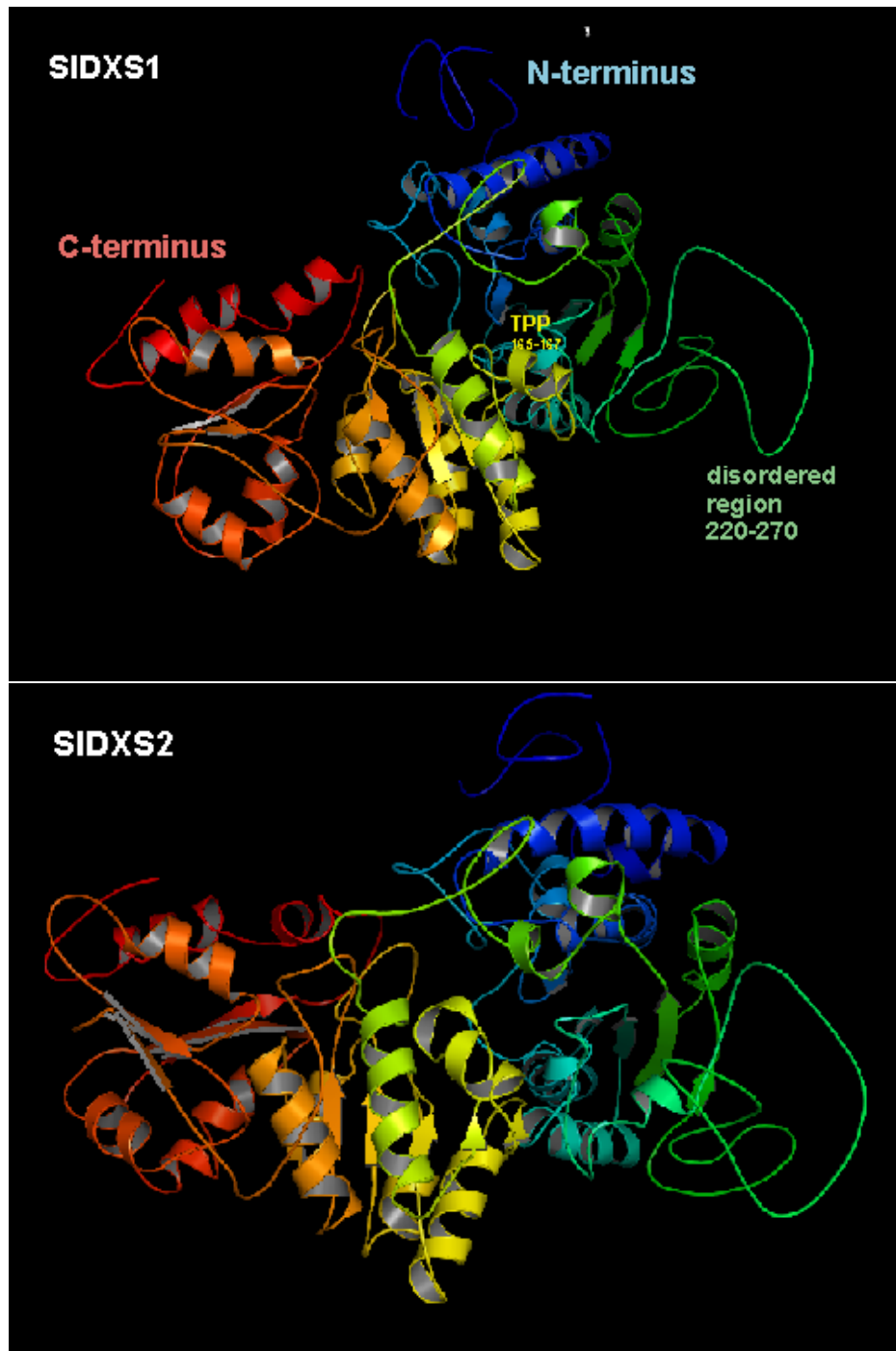


Abbildung 3.6: Strukturmodelle der beiden reifen SIDXS-Proteine auf der Basis einer bakteriellen dxs aus *D. radiodurans* (Xiang *et al.*, 2007).

Tabelle 3.3: Vergleich der Aminosäuren, die für katalytische Aktivität verantwortlich sind. Die Zahlen geben Positionen in der Primärstruktur wieder. Positionsunterschiede zwischen pflanzlichen und bakteriellen Enzymen sind durch die für eukaryotische Systeme notwendigen Transitpeptide zu erklären. Mit Sternchen gekennzeichnete Austausche von Aminosäuren wurden auch in der *A. thaliana CLA1*-Sequenz gefunden.

Funktion	<i>D. radiodurans</i> dxs	SIDX1	SIDX2	
putatives aktives Zentrum	His51	His63	His65	GAP
	Ser54	Ser66	Ser68	TPP
	His82	His94	His96	TPP
	Tyr395	Tyr420	Tyr422	GAP
	Asp430	Asp455	Asp457	GAP
	Arg480	Arg506	Arg508	
GAP-Bindung	His51	His63	His65	
	Lys101	Arg113	Arg115	*
	Phe109	Phe121	Phe123	
	Ile187	Leu200	Leu202	*
	Ser325	Thr350	Thr352	*
	Met349	Met374	Met376	
	Gly352	Gly377	Gly379	
	Tyr395	Tyr420	Tyr422	
	Arg423	Arg448	Arg450	
	Asp430	Asp455	Asp457	
	His434	His459	His461	
TPP-Bindung	Ser54	Ser66	Ser68	
	His82	His94	His96	
	Gly123	Gly135	Gly137	
	Ala125	Ser137	Ser139	*
	Asp154	Asp166	Asp168	
	Asn183	Asn195	Asn197	
	Met185	Val198	Val200	*
	Lys289	Lys312	Lys314	
	Ile371	Ile396	Ile398	
	Glu373	Glu398	Glu400	
	Phe398	Phe423	Phe425	
	Arg401	Arg426	Arg428	

Wirkstoffchemie) vorgenommen. Das Strukturmodell zeigt eine überwiegend gleiche 3-D-Struktur der beiden Isoenzyme (Abbildung 3.6). Marginale Unterschiede sind nur am N- und C-Terminus zu finden, die ebenfalls in der Primärstruktur geringe Ähnlichkeiten aufweisen. Lediglich die Region zwischen den Resten 221 und 267 sticht heraus. Diese Region konnte in der bakteriellen dxs nicht dargestellt werden, was möglicherweise auf die Flexibilität dieser Region zurückzuführen ist.

Ein Vergleich der für die Enzymaktivität relevanten Aminosäuren ist in Tabelle 3.3 dargestellt. Die für die katalytische Aktivität entscheidenden Aminosäuren sind jeweils durch die Kombination des Dreibuchstabencodes mit der Position der Aminosäure in der Primärstruktur gekennzeichnet. Die Verschiebungen der Positionen sind auf die in pflanzlichen DXS vorkommenden Signalpeptide zurückzuführen. Im putativen aktiven Zentrum waren keine Substitutionen der relevanten Aminosäuren zu finden. Jedoch wurden einige Austausche in den GAP- und TPP-Bindungsstellen festgestellt. Das Lys101 der *D. radiodurans*-Sequenz wurde in beiden Tomaten-Sequenzen durch Arginin ersetzt. Dabei wurde eine basische Aminosäure durch eine andere basische Aminosäure ersetzt. Alle weiteren Austausche ersetzen neutrale Aminosäuren durch ebenfalls neutrale Aminosäuren. Somit wird vermutet, dass die Unterschiede der Aminosäuren des aktiven Zentrums keinen gravierenden Einfluss auf die Funktionsfähigkeit beider Proteine haben. Des Weiteren sind die dokumentierten Aminosäureaustausche, die sich von der *D. radiodurans*-Sequenz unterscheiden auch in der Modellpflanze *A. thaliana* nachweisbar und scheinen sich in der Evolution der Landpflanzen entwickelt zu haben.

Relevante Unterschiede der beiden Tomaten-DXS Isoenzyme war anhand des Modells nicht nachweisbar, auch die Oberflächenladungen unterschieden sich nicht.

3.2 Bestimmung der Transkriptmengen und Proteinabundanzen

Die molekularbiologischen und histochemischen Analysen beider DXS der Tomate werden im folgenden Teil beschrieben. Die Bestimmung der Abundanzen von Transkriptmengen erfolgte in den verschiedenen Geweben und Organen der Tomatenpflanze und sollte Rückschlüsse auf die gewebespezifische Expression beider Isogene ermöglichen. Des Weiteren wurden Isoenzym-spezifische Antikörper generiert, um die Proteinabundanz zu untersuchen.

3.2.1 Analysen der *SIDXS*-Transkriptmengen

Zur Unterscheidung beider Tomaten-*DXS*-Sequenzen wurden spezifische Primerpaare (Abschnitt 2.1.3) abgeleitet. Die Spezifität der Primerpaare wurde durch Klonierung des PCR-Produktes in den Vektor pGEM[®] T-Easy und anschließender Sequenzierung überprüft. Die Verwendung des *SIDXS1*-Primerpaars in einer PCR resultierte in einem 800 bp großen Fragment, während die Nutzung des *SIDXS2*-spezifischen Primerpaars ein 300 bp großes Fragment amplifiziert.

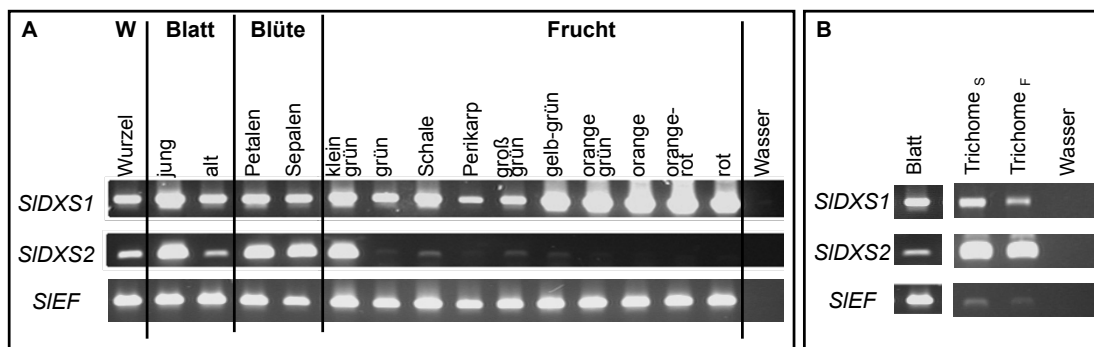


Abbildung 3.7: RT-PCR mit spezifischen Primerpaaren für *SIDXS1* und *SIDXS2* mit cDNA verschiedener Organe und Gewebe der Tomate, **A**: Proben verschiedener Organe, sowie der Fruchtstadien, **B**: RT-PCR an isolierten Trichomen, die auf verschiedene Weise präpariert wurden (S: Scherkräfte, F: Filtration, siehe Abschnitt 2.2.13) *SIEF*: Elongationsfaktor.

Diese Primerpaare wurden zur Analyse der *SIDXS*-Transkriptmengen in verschiedenen Organen und Geweben der Tomatenpflanze eingesetzt (Abbildung 3.7).

Dabei wurden Wurzeln, zwei verschiedene Blattstadien, die Blütenteile (Petalen und Sepalen), sowie das Perikarp verschiedener Tomatenfruchtstadien verwendet. Es zeigte sich, dass die *SIDXS1*-Transkriptmengen in allen Proben abundant waren und während der Fruchtreife anstiegen. Im Gegensatz dazu wurde während der Fruchtreife kein *SIDXS2*-Transkript nachgewiesen. In Wurzeln, in beiden Blattstadien, in den Sepalen und Petalen sowie in der kleinen grünen Frucht wurden jedoch erhebliche *SIDXS2*-Transkriptmengen nachgewiesen (Abbildung 3.7 A).

Ferner wurden Blatttrichome durch zwei verschiedene Methoden (Abschnitt 2.2.13) isoliert und ebenfalls der Untersuchung der *DXS*-Transkriptabundanzen unterzogen. Nach erfolgter RNA-Extraktion und RT-PCR konnten in beiden Proben stark erhöhte *SIDXS2*-Transkriptmengen nachgewiesen werden. Die Signale der *SIDXS1* zeigen im Gegensatz dazu nur schwache Signale (Abbildung 3.7). Die abgebildete sehr geringe Expression des Elongationsfaktors wurde in einer unabhängigen PCR ermittelt und konnte in weiteren Experimenten nicht bestätigt werden.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden die Transkriptmengen mittels semi-quantitativer Real-Time RT-PCR genauer untersucht. Dafür wurden dieselben Gewebe und Organe der Tomate, wie auch in der RT-PCR, analysiert (Abb. 3.8).

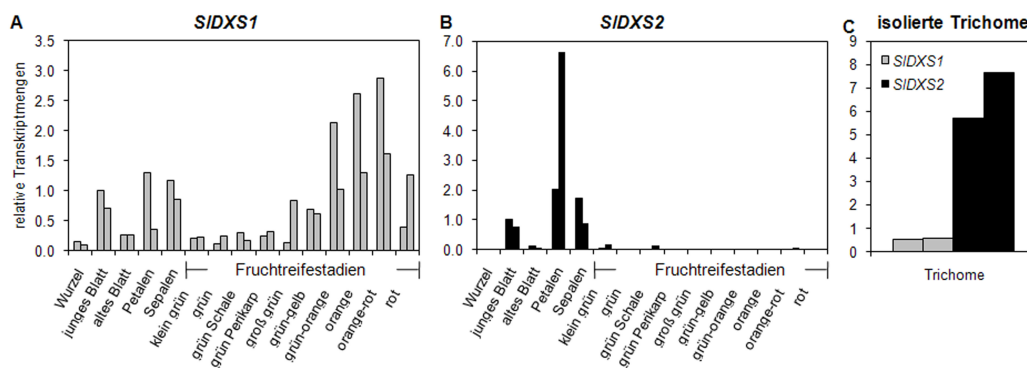


Abbildung 3.8: Semiquantitative Real-Time RT-PCR verschiedener Tomatenproben, einschließlich verschiedener Fruchtreifestadien, **A:** *SIDXS1*-Transkriptmengen, **B:** *SIDXS2*-Transkriptmengen, **C:** *SIDXS*-Transkriptmengen in isolierten Trichomen, Berechnung nach Pfaffl (2001), als Referenz diente das Transkriptniveau des jungen Blattes. Es wurden je zwei biologische Replikate verwendet.

Auch bei diesen Analysen zeigten sich die *SIDXS1*-Transkriptmengen abundant, während *SIDXS2*-Transkripte auch in dieser Analyse während der Fruchtreife nicht nachgewiesen werden konnten (Abbildung 3.8 A und B). Mittels dieser Methode wurde gezeigt, dass die *SIDXS2*-Transkriptmengen in Petalen und Sepalen im Vergleich zum jungen Blattes erhöht sind. Die Analysen der Transkripte der *SIDXS*-Gene in isolierten Trichomen bestätigten die deutlich höhere *SIDXS2*- als *SIDXS1*-Transkriptmengen (Abbildung 3.8 C).

Bei den später erläuterten transgenen *SIDXS2*-RNAi-Pflanzen wurde ein verminderter Fruchtansatz beobachtet. Deshalb wurden detailliertere Untersuchungen der Reproduktionsorgane der Tomatenblüte vorgenommen. Die Staubblätter und das Fruchtblatt wurden aus verschiedenen Blütenstadien (geschlossen und weit geöffnet) isoliert und die Abundanzen der *SIDXS*-Transkripte untersucht. In den Reproduktionsorganen der geschlossenen Blüte wurden keine Unterschiede bei der *SIDXS*-Transkriptmengen festgestellt (nicht dargestellt), während in den Proben der geöffneten Blüte erhöhte *SIDXS2*-Transkriptmengen nachgewiesen wurden (Abbildung 3.9 A).

In den Staubblättern wurden deutlich höhere *SIDXS2*-Transkriptmengen detektiert als im Fruchtblatt. Für weitere Analysen wurden Pollen aus den Staubblättern weit geöffneten Blüten präpariert und einerseits sofort, andererseits nach Inkubation in Keimungsmedium auf *SIDXS*-Transkriptabundanzen untersucht. Dabei

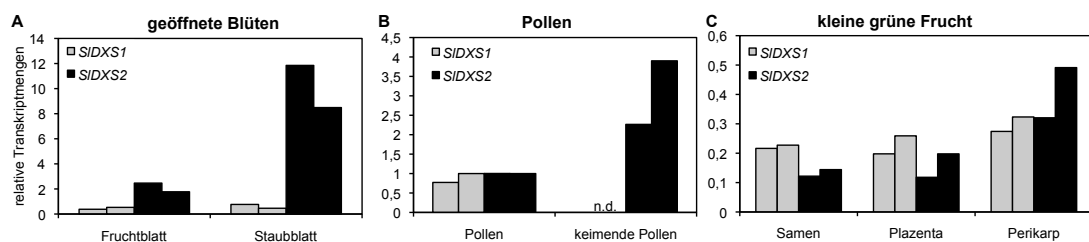


Abbildung 3.9: Semiquantitative Real-Time RT-PCR verschiedener Proben aus Fortpflanzungsorganen, **A**: Frucht- und Staubblatt geöffneter Blüten, **B**: Pollen aus geöffneten Blüten vor und nach Keimung in Medium, **C**: Verschiedene Organe junger grüner Früchte. Die Berechnung wurde nach Pfaffl (2001) durchgeführt, als Referenzprobe für A & C dienen die *SIDXS*-Transkriptmengen des jungen Blattes, für B wurden die *SIDXS*-Transkriptmengen des ungekeimten Pollen als Referenz verwendet, **n.d.**: nicht detektierbar. Es wurden je zwei biologische Replikate verwendet.

wurden deutlich höhere *SIDXS2*-Transkriptmengen in den keimenden Pollen nachgewiesen (Abbildung 3.9 B). Im Gegensatz dazu konnte kein *SIDXS1*-Transkript in keimenden Pollen detektiert werden. Dies lässt vermuten, dass die Biosynthese von Isoprenoiden und Isoprenoid-Derivaten, die während der Pollenkeimung benötigt werden über den DXS2-MEP-Weg gewährleistet wird.

Ferner wurden ebenfalls verschiedene Gewebe kleiner grüner Früchte untersucht. Die *SIDXS*-Transkriptabundanz wurde für Samen, Plazenta und Perikarp der jungen Früchte analysiert. Sie wiesen neben deutlich geringeren Transkriptmengen im Vergleich zu den anderen Proben der Tomatenpflanze keine eindeutigen Unterschiede der *SIDXS*-Transkriptmengen auf (Abbildung 3.9 C).

Analyse der *SIDXS*-Transkripte in der *jai1*-Tomatenmutante

Die Tomatenmutante *jai1* ist aufgrund eines Jasmonat-insensitiven Phänotyps isoliert worden (Li *et al.*, 2004). Die Charakterisierung dieser Pflanzen ergab außerdem, dass diese Pflanzen einen Defekt der Bildung glandulärer Trichome aufweisen. Die Rolle der *DXS*-Isogene wurde bisher noch nicht untersucht. Da die Mutante aus der Sorte Castlemart erzeugt wurde, wurde diese als Kontrolle genutzt. In der Analyse der Blattproben mittels semiquantitativer Real-Time RT-PCR zeigte sich, dass die Transkriptmengen beider *SIDXS*-Gene im Vergleich zur Kontrolle reduziert waren, dieser Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant. Darüber hinaus wurden keine signifikanten Unterschiede der *SIDXS1*- und *SIDXS2*-Transkriptmengen dokumentiert.

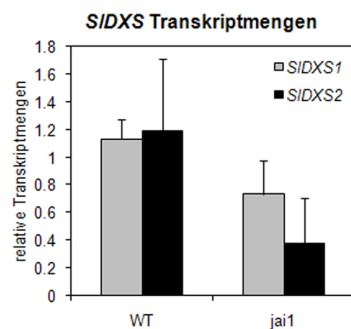


Abbildung 3.10: *SIDXS*-Transkriptmengen in Blättern der Tomatenmutante *jai1*, sowie des Wildtyps (WT, Castlemart), Grau: *SIDXS1*, Schwarz: *SIDXS2*, n=3.

3.2.2 Untersuchung der SIDXS-Proteinabundanz

Die Untersuchung der SIDXS-Proteinmengen sollte weitere Erkenntnisse der Gewebespezifität beider Isoenzyme geben. Dazu sollten Isoenzym-spezifische Antikörper verwendet werden. Um eine Unterscheidung der zu 69% identischen Tomaten-DXS-Proteine zu gewährleisten, wurden Peptide zur Generierung der Antikörper genutzt. Die Auswahl ist in Abschnitt 2.2.7 beschrieben und im Anhang (Abbildung A.1) graphisch dargestellt. Die Spezifität der durch diese Methodik erhal-

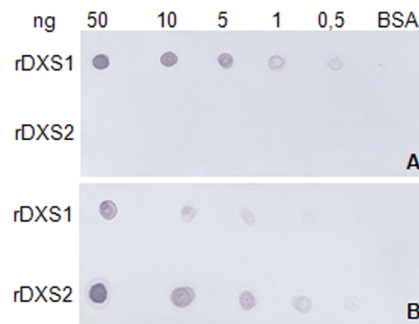


Abbildung 3.11: Dot Blot-Analysen zur Testung der Spezifität der Antikörper gegen die rekombinanten, aufgereinigten Proteine, **A**: DXS1-Antikörper, **B**: DXS2-Antikörper, an den Sekundärantikörper war die alkalische Phosphatase gekoppelt.

tenen Antikörper wurde zunächst an aufgereinigten, rekombinanten Proteinen im Dot Blot getestet (Abbildung 3.11). Der SIDXS1-Antikörper zeigte ausschließlich eine Reaktion mit dem rekombinanten SIDXS1-Protein, während der SIDXS2-Antikörper das rekombinante SIDXS2-Protein mit einer höheren Spezifität als das rekombinante SIDXS1-Protein erkennt. Die Antikörperspezifität wurde zusätzlich an pflanzlichen Proteinextrakten getestet (Abbildung 3.12). Dazu wurden drei Proben gewählt, die nach Ergebnissen der Transkriptmengenanalysen eine Überprüfung der Spezifität ermöglichen. In den Blattextrakten sollten beide SIDXS-Proteine detektiert werden. Dagegen sollte in den Extrakten der roten Frucht nur das SIDXS1-Protein und in den Trichomextrakten ausschließlich SIDXS2-Protein nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der Western Blot-Analysen sind in Abbildung 3.12 dargestellt. Der DXS1-Antikörper wies hierbei starke Kreuzreaktivität zu anderen pflanzlichen Proteinen auf und zeigte nur eine schwache Bande in der erwarteten Größe von ca. 70 kDa. Das SIDXS1-Protein wurde in der Blattprobe und in der rote Frucht-Proben nachgewiesen, aber nicht in den Proteinextrakten

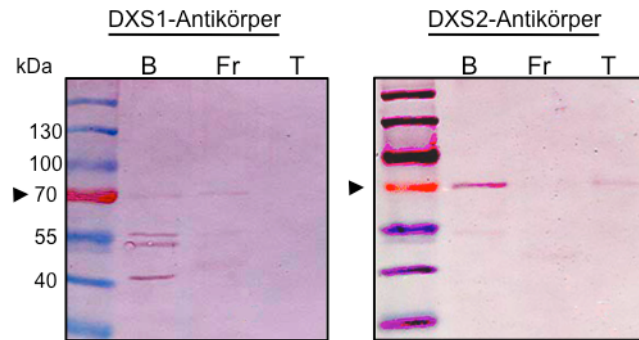


Abbildung 3.12: Western Blot-Analysen pflanzlicher Proteinextrakte mit alkalischer Phosphatase-gekoppeltem Sekundärantikörper, B: Blatt, Fr: rote Frucht, T: Trichome, links: DXS1-Antikörper, rechts: DXS2-Antikörper.

der isolierten Trichome. Der DXS2-Antikörper detektierte nur eine Bande, diese in der erwarteten Größe von ca. 70 kDa. Das SIDXS2-Protein wurde nicht in der roten Frucht, aber im Blatt und in der Trichomprobe detektiert. Die deutlich schwächere SIDXS2-Proteinbande in der Trichomprobe weist auf einen geringeren Anteil des SIDXS2-Proteins zum Gesamtprotein hin (Abbildung 3.12). Diese Testung der Isoenzym-spezifischen Antikörper weist somit auf eine ähnliche Abundanz der *DXS*-Transkripte und der *DXS*-Proteine in den untersuchten Organen hin.

Die Analysen der SIDXS-Proteinabundanzen weiterer Gewebe und Organe der Tomatenpflanze, die bereits in den Transkriptmengenanalysen betrachtet wurden, erfolgten zu einem späteren Zeitpunkt. Dabei wurde eine Abnahme der Sensitivität der Antikörper beobachtet, weshalb ein anderes, sensitiveres Detektionssystem (Nutzung der Meerrettichperoxidase anstelle der alkalischer Phosphatase) Verwendung fand. Die Ergebnisse dieser Analysen sind in Tabelle 3.4 zusammenfassend dargestellt. Der SIDXS1-Antikörper zeigte deutliche Signale ausschließlich in der Blattprobe und in den verschiedenen Fruchtstadien (Tabelle 3.4). Das SIDXS2-Protein wurde nur im Blatt und den Petalen mit deutlichem Signal detektiert, während sich in allen anderen untersuchten Geweben nur sehr schwache Banden zeigten.

Die Analysen der Proteinabundanzen beider SIDXS-Proteine in den Stadien der Frucht reife wiesen ein Bandenmuster auf. Dieses, zu Beginn der Arbeiten nicht auftretende Muster, wird auf den Verlust der Sensitivität und der Zunahme der

Tabelle 3.4: Auswertung der Analyse der SIDXS-Proteinabundanzen mit Hilfe des Western Blots unter Verwendung der Meerrettichperoxidase, ++: starkes Signal, +: deutliches Signal, o: schwaches Signal, - : kein Signal, n.b.: nicht bestimmt.

Probe	SIDXS1	SIDXS2
Wurzel	o	-
junges Blatt	++	++
altes Blatt	+	+
Petalen	n.b.	++
Antheren & Pistill	n.b.	o
Sepalen	o	o
kleine grüne Frucht	+	o
grüne Frucht	+	o
grüne Frucht Schale	-	o

Kreuzreaktivität mit fruchtspezifischen Verbindungen, wie zum Beispiel Polysacchariden (persönliche Mitteilung PD Dr. B. Hause) zurückgeführt. Damit war eine eindeutige Zuordnung der Abundanzen der DXS-Proteine in diesen Proben nicht möglich.

Immunlokalisierung des SIDXS2-Proteins

Die Generierung der Peptid-Antikörper ermöglichte außer der Bestimmung der SIDXS-Proteinabundanzen in Pflanzenextrakten auch die Immunlokalisierung. Für diese Analysen wurde zunächst Tomatenblattmaterial in PEG eingebettet und 3-5 μm dicke Schnitte angefertigt. Danach erfolgte die Behandlung mit den verschiedenen Antikörpern. Nach Verwendung des DXS1-Antikörpers wurde eine Immunmarkierung außerhalb der Plastiden erhalten. Bei der DXS handelt es sich um ein plastidäres Enzym (Rodriguez-Concepcion, 2006), wodurch das Immunsignal kritisch bewertet wird. Außerdem wurde bereits in den Western Blot-Analysen eine Erkennung anderer Proteine dokumentiert. Die Lokalisierung des DXS1-Proteins wurde aus diesen Gründen nicht weitergeführt.

Der SIDXS2-Antikörper zeigte jedoch gute Funktionalität in der Immunlokalisierung. Als Kontrolle diente der mit den zur Generierung verwendeten spezifischen Peptiden abgesättigte SIDXS2-Antikörper. Abbildung 3.13 zeigt die Lokalisierung

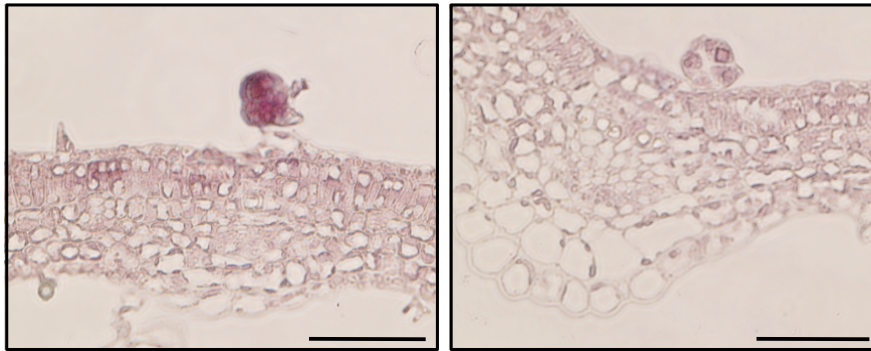


Abbildung 3.13: Lokalisierung des SIDXS2-Proteins in Semidünnschnitten eines Tomatenblattes mittels spezifischem Peptid-Antikörper. Das immunpositive Signal (violette Färbung) ist eindeutig den Köpfchenzellen des glandulären Trichoms zuzuordnen, links: SIDXS2-Antikörper, rechts: mit Peptiden abgesättigter SIDXS2-Antikörper als Kontrolle, Balken: 50 μm .

des SIDXS2-Proteins. Beide Bilder zeigen einen 3 μm Querschnitt eines Tomatenblattes mit einem Köpfchen eines glandulären Trichoms. Im rechten Bild ist die Teilung des Köpfchen in vier Zellen zu erkennen. Der Stiel, auf dem das Köpfchen sitzt, ist in beiden Abbildungen nicht erkennbar. In der Lokalisierung (links) ist im Vergleich zur Kontrolle (rechts) eine deutliche Färbung des Trichomköpfchens erkennbar, was auf die Anreicherung des SIDXS2-Proteins hinweist. Die Färbung des Blattes kann dagegen nicht eindeutig belegt werden, da auch eine Farbreaktion in der Kontrolle sichtbar war.

3.3 Generierung stabil transformierter *SIDXS2*-RNAi-Pflanzen

Eine funktionelle Analyse der SIDXS-Isoenzyme sollte durch die Generierung stabil transformierter transgener Pflanzen erfolgen. Ein Funktionsausfall des *DXS1*-homologen Gens (*CLA1*) in *A. thaliana* führt zu einem Albinophänotyp und somit zu multiplen, schwerwiegenden Defekten (Mandel *et al.*, 1996; Estévez *et al.*, 2000). Deshalb wurde als Ziel dieser Arbeit lediglich die spezifische Reduktion der *SIDXS2*-Transkriptmengen mittels RNAi-Ansatz gewählt. Für dieses Vorhaben wurden Teilsequenzen des *SIDXS2*-Gens gewählt, welche eine möglichst geringe Übereinstimmung zur *SIDXS1*-Sequenz aufwiesen. Zwei Regionen erschienen als

besonders geeignet. Eine der ausgewählten Regionen umfasst das gesamte Transitpeptid und Bereiche der flankierenden Sequenz (Nt: 52-243), während die zweite Sequenz in dem 3' UTR gewählt wurde (Nt: 2191-2453). Die Klonierung erfolgte mittels Gateway-System in den RNAi-Vektor pHellsgate8 (Karte siehe Abbildung A.3). Während bei der Klonierung des ersten Fragmentes (Transitpeptid) auftretende Probleme die Fertigstellung des Konstruktes verhinderten, konnte die Klonierung des zweiten Fragmentes (3' UTR) erfolgreich beendet werden. Mit diesem Konstrukt und zusätzlich unter Nutzung eines Kontrollplasmids ohne RNAi-Kassette (EV = 'empty vector'), wurde die Transformation der Tomatenpflanzen, wie in Kapitel 2.2.12 beschrieben, mit Hilfe des Agrobakterien-vermittelten Gentransfer über Kalluskulturen vorgenommen.

3.3.1 Reduktion der *SIDXS2*-Transkriptmengen

Nach der erfolgreichen Bewurzelung der aus den Kalli wachsenden Pflanzensprosse erfolgte die Überprüfung der Präsenz des Resistenzgens (*NPTII*-Gen) (Tabelle 3.5). Pflanzen, bei denen durch eine PCR kein Resistenzgen nachgewiesen werden konnte, wurden nicht weitergeführt.

Tabelle 3.5: Anzahl der Pflanzen in diversen Untersuchungsstadien nach der Agrobakterien-vermittelten Transformation.

	bewurzelte Pflanzen	Präsenz des Resistenzgens	<i>SIDXS2</i> -Transkriptmengen		ausgewählte Pflanzen	verzögerter Fruchtansatz
			erste RT-PCR	zweite RT-PCR		
Σ	400	164	52	32	5	4
RNAi	296	129	41	22	4	4
EV	104	35	11	10	1	0

Nach Überprüfung des Vorhandenseins des Resistenzgens wurde in den insgesamt 164 transgenen Pflanzen das *SIDXS2*-Transkriptniveau untersucht. Dabei wurde in den *SIDXS2*-RNAi-Linien eine Transkriptreduktion erwartet, während die transgenen EV-Pflanzen keine Veränderung der *SIDXS2*-Transkriptmengen aufweisen sollten. Nach Absicherung des *SIDXS2*-Transkriptmengenstatus in einer zweiten RT-PCR, wurden vier *SIDXS2*-RNAi-Pflanzen und eine EV-Pflanze weitergeführt. Die *SIDXS2*-Transkriptniveaus wurden in diesen ausgewählten Pflanzen zusätzlich mittels Real-Time RT-PCR untersucht (Abbildung 3.14).

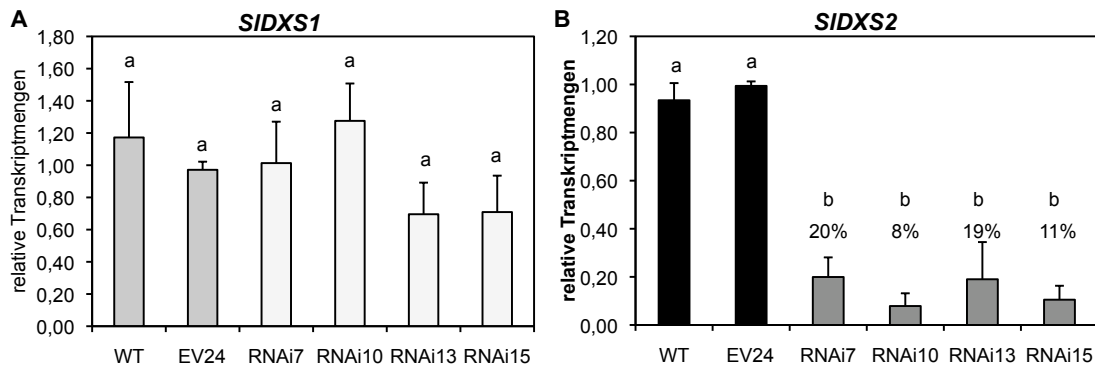


Abbildung 3.14: Relative Transkriptmengen der *SIDXS*-Gene in vier transgenen *SIDXS2*-RNAi-Linien und einer Kontrolllinie (EV24), A: *SIDXS1*-Transkriptmengen, B: *SIDXS2*-Transkriptmengen, $n \geq 3$, $P < 0,001$.

Wie in Abbildung 3.14 dargestellt zeigte keine der ausgewählten Pflanzen eine signifikante Veränderungen des *SIDXS1*-Transkriptgehalts, jedoch wurde eine signifikante Reduktion der *SIDXS2*-Transkriptmengen dokumentiert. Eine Reduktion des *SIDXS2*-Proteingehalts konnte im Vergleich zu den Kontrollen mittels Western Blot unter Verwendung des spezifischen *SIDXS2*-Antikörper ebenfalls nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Sowohl auf Transkriptebene, als auch auf Proteinebene wies die Kontrolllinie EV24 keine Unterschiede zum Wildtyp auf.

3.3.2 Bestimmung der Kopienzahl der RNAi-Pflanzen

Durch die Agrobakterien-vermittelte Transformation ist eine mehrfache Integration der T-DNA in das pflanzliche Genom möglich. Die Kenntnis über die Anzahl der Integrationsereignisse ist für die Erzeugung homozygoter Pflanzen von Bedeutung. Deshalb wurden Southern Blot-Analysen durchgeführt. Dabei diente das Resistenzgen *NPTII* als Sonde. Vor der elektrophoretischen Auftrennung wurde die extrahierte genomische DNA mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut. *EcoRV* schneidet nicht innerhalb des durch die Sonde detektierten *NPTII*-Gens. Somit wurde pro Integration eine Bande erwartet. Zur Unterstützung dieser Daten wurde ein weiteres Enzym (*PstI*) genutzt, welches einmal im *NPTII*-Gen schneidet und demnach für jede Kopie zwei Banden aufweisen sollte. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.15 dargestellt.

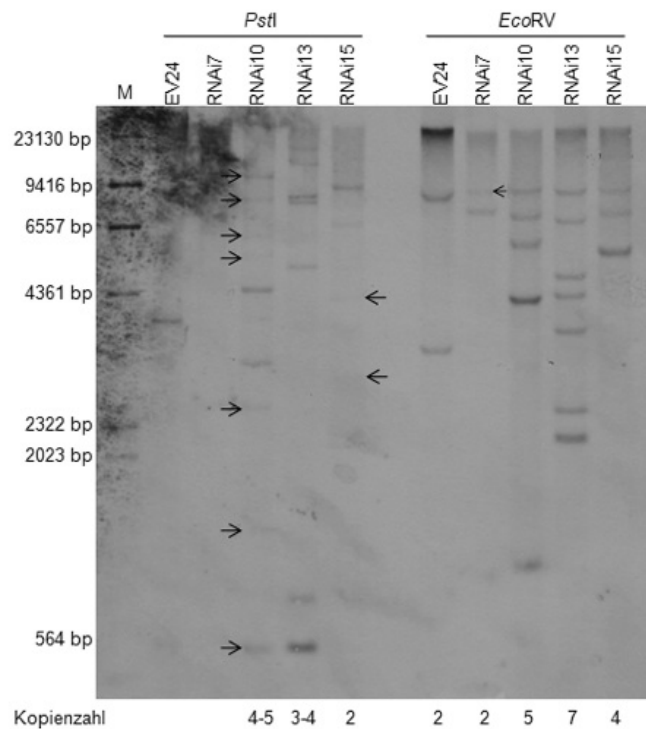


Abbildung 3.15: Southern Blot der transgenen Linien, *PstI* schneidet einmal in dem als Sonde verwendeten *NPTII* Gen, während *EcoRV* keine Schnittstelle im *NPTII*-Gen besitzt. Die aus der Anzahl der Banden abgeschätzte Kopienzahl ist unten dargestellt, Pfeile zeigen auf sehr schwache Signale.

Anhand dieser Analysen konnten für RNAi7 zwei Kopien und für RNAi10 fünf Kopien bestimmt werden, während für RNAi13 und RNAi15 keine genaue Bestimmung möglich war. Eine Mindestkopienzahl von drei für RNAi13 und zwei für RNAi15 konnte ermittelt werden. Für die Transformations-Kontrolllinie EV24 wurden ebenfalls zwei Kopien bestimmt.

In den folgenden zwei Abschnitten werden die Effekte der *SIDXS2*-Transkriptmengenreduktion in den *SIDXS2*-RNAi- und Kontrolllinien dargestellt. Dazu wurden zwei unabhängige Versuche durchgeführt, einerseits die Mykorrhizierung und andererseits die mechanische Verwundung der Blätter der transgenen Pflanzen. Der Umfang der Experimente wurde aufgrund der Potenzierung durch biologische Replikate auf zwei transgene Linien, RNAi10 und RNAi13, beschränkt.

3.3.3 Auswirkung der *SIDXS2*-Transkriptmengenreduktion auf die Mykorrhizierung

Der Einfluss der *DXS2*-Reduktion auf die arbuskuläre Mykorrhiza (AM) wurde bereits in der Arbeitsgruppe an *M. truncatula* untersucht (Floß *et al.*, 2008). Der Einfluss zeigte sich besonders deutlich bei der Analyse von Derivaten der Cyclohexenone und des Mycorradicins. Um die Funktionalität der spezifischen *SIDXS2*-Reduktion in den transgenen Tomatenpflanzen nachzuweisen, wurden je fünf Stecklinge der Linie 10 und 13, sowie der Kontrolle EV24 mit dem AM-Pilz (*Glomus intrradices*) inokuliert. Sechs Wochen nach Inokulation wurden die Pflanzen geerntet und auf ihren Gehalt von Cyclohexenon- und Mycorradicin-Derivaten untersucht.

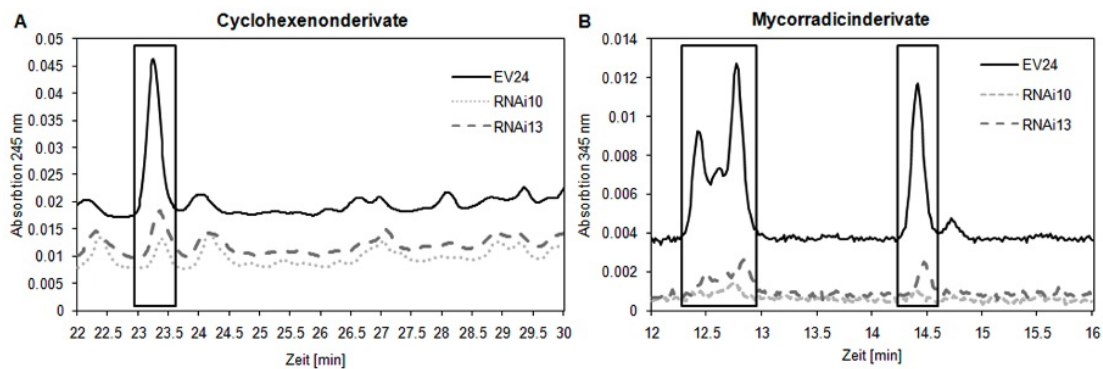


Abbildung 3.16: HPLC-Chromatogramme der Cyclohexenonderivate und Mycorradicinderivate nach Mykorrhizierung, Boxen weisen auf die Peaks mit den jeweils spezifischen Absorptionsmuster hin, die aufgrund der charakteristischen UV-Spektren identifiziert wurden.

Die Abbildung 3.16 zeigt die HPLC-Chromatogramme der extrahierten Cyclohexenon- und Mycorradicinderivate. Die gekennzeichneten Flächen weisen auf die Signale hin, die das jeweils spezifische UV-Absorptionsspektrum aufweisen. Aus den Diagrammen ist ersichtlich, dass sowohl die Mycorradicin-, als auch die Cyclohexenonderivate der RNAi-Linien im Vergleich zur Kontrolle, deutlich reduziert sind. Somit konnte durch Absenkung der Mykorrhiza-spezifischen Verbindungen die Funktionsfähigkeit des *SIDXS2*-RNAi-Konstruktes bewiesen werden.

3.3.4 Verwundung der transgenen Pflanzen

Aus der Literatur ist bekannt, dass *DXS2* durch Verwundung induzierbar ist (Sanchez-Hernandez *et al.*, 2006; Arimura *et al.*, 2008; Tretner *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2009). Daraufhin wurden die beiden ausgewählten *SIDXS2*-RNAi-Linien verwundet. Als Kontrolle dienten hierbei die nicht-verwundeten Pflanzen (0 h). Eine Stunde nach Verwundung erfolgte die Probennahme. Anhand der semiquantitativen Real-Time RT-PCR wurden die relativen Transkriptmengen der *SIDXS*-Gene bestimmt. Weiterhin wurden zur Dokumentation der Verwundung Primerpaare der *SLAOC* (Allenoxidcyclase), die als wundresponsives Gen bekannt ist (Ziegler *et al.*, 2000), verwendet. Der signifikante Anstieg der *SLAOC*-Transkriptmengen nach einer Stunde bestätigt die erfolgreiche Verwundung (Abbildung 3.17B).

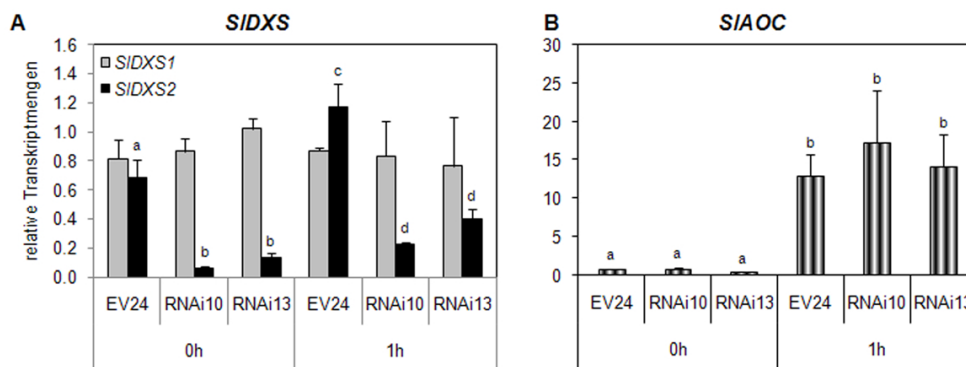


Abbildung 3.17: Transkriptmengenanalysen der mechanisch verwundeten Kontroll- und RNAi-Pflanzen mittels Real Time RT-PCR, **A**: *SIDXS*-Transkriptmengen, **B**: *SLAOC*-Transkriptmengen, Berechnung nach Pfaffl (2001), n=3.

Die Analyse der *SIDXS1*-Transkriptmengen zeigte keine signifikanten Änderungen (Abbildung 3.17 A). Die *SIDXS2*-Transkriptmengen zeigten zum Kontrollzeitpunkt (0 h) die *SIDXS2*-Suppression in den RNAi-Linien. Nach der Verwundung stiegen die *SIDXS2*-Transkriptmengen in allen Proben an. Ein Anstieg wurde auch in den RNAi-Linien dokumentiert, dabei wurde aber nie das Basislevel der Kontrollpflanzen erreicht (Abbildung 3.17). Somit konnte gezeigt werden, dass auch in den *SIDXS2*-RNAi-Linien eine Wundresponsivität des *SIDXS2*-Gens erfolgt.

3.3.5 Weitere phänotypische Auffälligkeiten der *SIDXS2*-RNAi-Pflanzen

Die transgenen *SIDXS2*-RNAi-Linien wiesen keine makroskopisch erkennbaren veränderten Phänotypen auf. Allerdings zeigte sich ein Trend zu einem verzögerten Fruchtansatz. Dies führte zu den Untersuchungen der reproduktiven Organe der Tomate, wie in Abschnitt 3.2.1 beschrieben. Bei diesen Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass keimende Pollen vergleichsweise hohe *SIDXS2*-Transkriptmengen aufwiesen. Weiterführende Analysen der Pollen der RNAi-Linien ergaben eine leicht eingeschränkte allerdings nur für die Linien RNAi7, RNAi10 und RNAi15 gering signifikante Reduktion der Pollenvitalität (nicht dargestellt). Bei anschließenden Pollenkeimungstests wurde jedoch ein deutlicher Effekt beobachtet. Die verzögerte Keimungsfähigkeit der Pollen wurde anhand der Pollenschlauchlänge dokumentiert (Abbildung 3.18). Die Unterschiede zwischen der Transformationskontrolle und den RNAi-Linien waren statistisch hoch-signifikant.

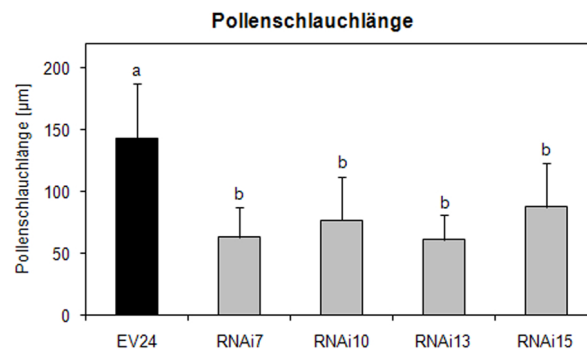


Abbildung 3.18: Gemessene Pollenschlauchlänge nach zweistündiger Inkubation in Keimungsmedium, $n \geq 3$, $P < 0,01$.

Des Weiteren wiesen erste mikroskopische Vergleiche zwischen Kontroll- und RNAi-Linien der Blätter auf eine veränderte Dichte der Trichome hin. Zur detaillierteren Untersuchungen wurden Blätter des gleichen Stadiums untersucht und die Anzahl der glandulären Trichome auf der adaxialen Blattseite bestimmt (Abschnitt 2.2.14). Dabei stellte sich heraus, dass im Wildtyp, wie auch in der Transformationskontrolle, im Durchschnitt pro Quadratmillimeter ein glanduläres Trichom vorhanden ist, während für die RNAi-Linien 1,5 Trichome pro Quadratmillimeter bestimmt wurden. Um diesen Unterschied statistisch abzusichern, wurden diese Analysen mehrfach ($n \geq 10$) durchgeführt. Dabei erwies sich die Erhöhung

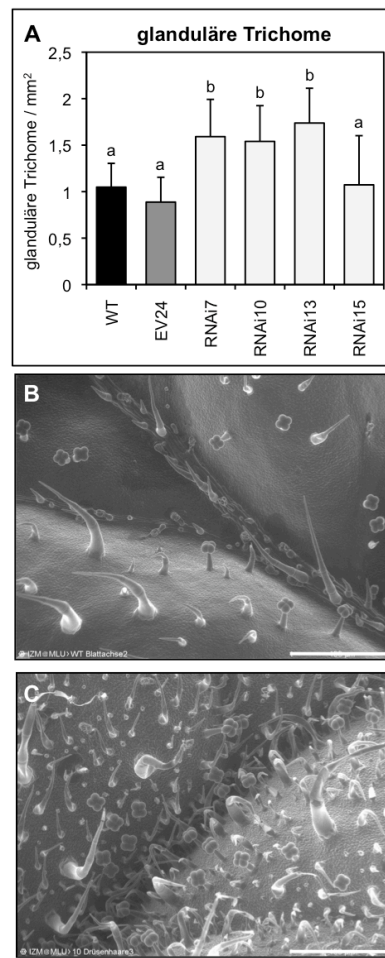


Abbildung 3.19: Veränderung der Anzahl der glandulären Trichome der transgenen *SIDXS2*-RNAi-Pflanzen, **A**: Anzahl glandulärer Trichome $P \leq 0,05$, $n \geq 10$, **B**: ESEM-Bild eines Wildtypblattes, **C**: ESEM-Bild eines Blattes der transgenen Linie RNAi10, Balken: 400 μm .

in der Trichomanzahl bei den RNAi-Linien 7, 10 und 13 als signifikant (Abbildung 3.19 A). Übersichtsbilder wurden durch die ESEM ('environmental scanning electron microscopy') am IZM (Interdisziplinäres Zentrum für Materialwissenschaften) in Halle (Saale) in Zusammenarbeit mit Frank Syrowatka gewonnen. Exemplarisch sind diese Bilder in Abbildung 3.19 B und C dargestellt und zeigen eine Erhöhung der Anzahl der glandulären Trichome auf der adaxialen Seite eines Blattes der Linie RNAi10 gegenüber einem Wildtypblatt.

3.3.6 Untersuchung der Terpene der Trichome, sowie ihres biogenetischen Ursprungs

Zur Bestimmung des Einflusses von *SIDXS2* auf die Duftstoffproduktion wurden die generierten transgenen *SIDXS2*-RNAi-Linien am Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie in Jena in Kooperation mit Dipl. Chem. S. Garms und Dr. S. Bartram untersucht. Mit Hilfe einer modifizierten SPME ('solid phase micro extraction')-Technik wurden Proben der Trichominhaltsstoffe genommen und mittels gekoppelter Thermodesorptions-Gaschromatographie-Massenspektrometrie (TD-GC/MS) analysiert. Dabei wurden drei Proben von jeweils drei Stecklingen der transgenen Linien EV24, RNAi10 und RNAi13 genommen. Die quantitative Auswertung erfolgte für die drei Hauptduftstoffkomponenten: das Monoterpen β -Phellandren und die beiden Sesquiterpene (*E*)- β -Caryophyllen und α -Humulen. Aufgrund der Methodik wird kein interner Standard mitgeführt. Somit werden die Duftstoffkonzentrationen relativ zur Gesamtkonzentration aller gemessenen Duftstoffe dargestellt (Abbildung 3.20). Ein Unterschied zwischen Kontrolle (EV24) und RNAi-Pflanzen wurde dokumentiert und zeigte einen starken Rückgang des Monoterpens (β -Phellandren). Der Anstieg der relativen Sesquiterpenkonzentration ist nicht ohne Einschränkungen zu werten. Basierend auf der Methode und der

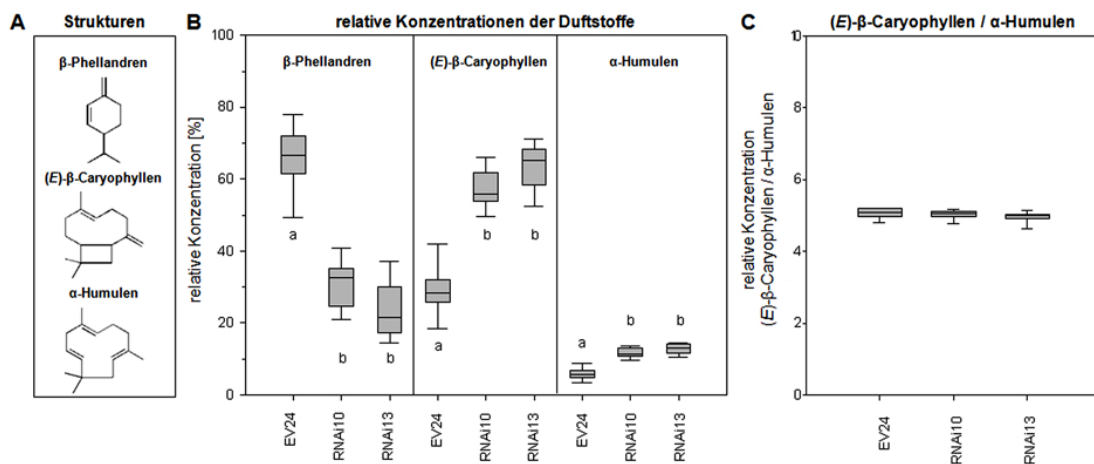


Abbildung 3.20: Terpene der Trichome verschiedener Linien transgener Tomatenpflanzen (EV-Kontrolllinie, *SIDXS2*-RNAi-Linien), **A**: chemische Strukturen der detektierten Duftstoffe, **B**: relative Konzentrationen der drei Hauptduftstoffkomponenten, **C**: Verhältnis der Duftstoffkonzentrationen (*E*)- β -Caryophyllen zu α -Humulen.

daraus folgenden Berechnung werden relative Duftstoffkonzentrationen als Anteil aller gemessenen Duftstoffe dargestellt. Somit führt eine Reduktion der relativen β -Phellandren Konzentration automatisch zu einem Anstieg der relativen Sesquiterpenkonzentrationen. Dies wurde dadurch bestätigt, dass sich das Verhältnis der beiden Sesquiterpenen in der Kontrolllinie und den RNAi-Pflanzen, wie in Abbildung 3.20 C dargestellt, konstant zeigt.

Weitere Informationen über den Einfluss der Reduktion der *SIDXS2*-Transkriptmengen auf den Terpenstoffwechsel sollte die Untersuchungen des natürlichen $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenverhältnisses liefern. Diese Methode kann Aufschluss darüber geben, aus welchem Biosyntheseweg die Vorstufen der untersuchten Terpene, die C_5 -Einheiten DMAPP und IPP herrühren (Jux *et al.*, 2001). Vorteil dieser Methode ist, dass Einflüsse ohne äußere Zugabe von markierten Substanzen oder Inhibitoren also an einem „ungestörtem System“ untersucht werden können. Die klassische Auffassung ist, dass in Pflanzen die Vorstufen der Monoterpene über den MEP-Weg, die Sesquiterpene über den MVA-Weg gebildet werden. Das führt auf Grund der unterschiedlichen Reaktionsmechanismen in der Biosynthese von IPP zu verschiedenen Kohlenstoff-Isotopenverhältnissen (Bartram *et al.*, 2006; Jux *et al.*, 2001). Die Ursache der Isotopendiskriminierung liegt in der Freisetzung von

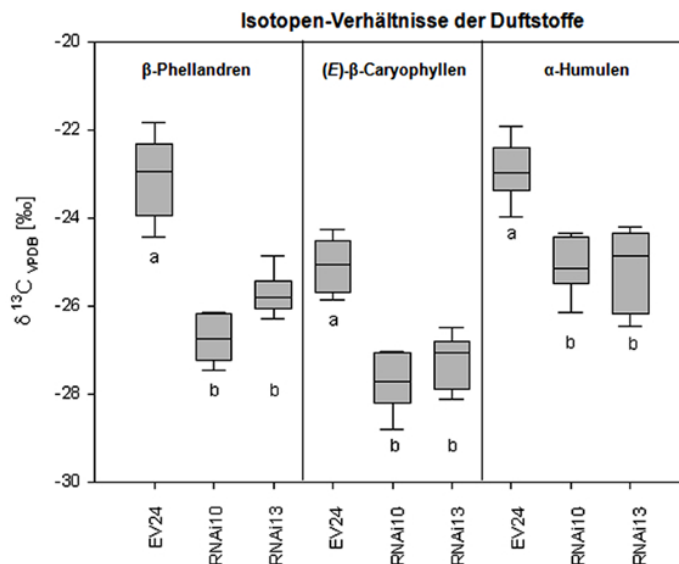


Abbildung 3.21: Analyse des $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenverhältnisse der Hauptduftstoffkomponenten. Für alle Duftstoffe wurde in beiden RNAi-Linien eine signifikante Abweichung des $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenverhältnisses dokumentiert. $n=9$.

Kohlendioxid, die zu einer Abreicherung an ^{13}C um etwa 4 ‰ führt. Da der Schritt der CO_2 -Freisetzung im MVA-Weg dreimal, im MEP-Weg lediglich einmal durchlaufen wird, weisen die aus den beiden Stoffwechselwegen resultierenden Terpene ein differierendes Kohlenstoff-Isotopenverhältnis auf. Somit erfahren Sesquiterpene eine stärkere Abreicherung des ^{13}C -Isotopes als Monoterpene. Die Messungen der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenverhältnisse ergab für alle gemessenen Hauptduftstoffkomponenten eine Abreicherung des ^{13}C in den RNAi-Pflanzen gegenüber der Kontrolle (EV24) (Abbildung 3.21). Allerdings ist das β -Phellandren mit einem $\Delta\delta^{13}\text{C}$ -Werte von durchschnittlich -3.4 ‰ stärker angereichert als die beiden Sesquiterpene mit einem $\Delta\delta^{13}\text{C}$ -Werte von durchschnittlich -2.1 ‰. Im Gegensatz zu den relativen Konzentrationen der Terpene zeigt sich bei der Betrachtung der Isotopenverhältnisse ebenfalls ein starker Einfluss der *SIDXS2*-Reduktion auf die Sesquiterpene. So liegen die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte für (*E*)- β -Caryophyllen in allen Fällen niedriger als die Werte des Monoterpens, erfahren allerdings bei Einschränkung des MEP-Weges in den RNAi-Linien nochmals eine Abreicherung. Dies lässt eine Beteiligung von Vorstufen aus dem MEP-Weg an der Sesquiterpenbiosynthese der Kontrollpflanzen vermuten. Die Absenkung des ^{13}C -Gehaltes des Monoterpens in den *SIDXS2*-RNAi-Pflanzen hingegen weist auf den Einbau von Vorstufen aus dem MVA-Weg hin, der nach der klassischen Ansicht nur zur Sesquiterpen-Biosynthese beiträgt (Abbildung 3.21).

3.3.7 Beeinflussung des Fraßverhaltens von *Spodoptera littoralis* Raupen

Die Analysen der emittierten Duftstoffe wurden durch Raupenfraß-Experimente erweitert. Raupenfraß erhöht die Duftstoffemission und kann dazu dienen, mögliche geringe Beeinflussungen der Duftstoffbildung zu erkennen. Dabei wurden je sechs Stecklinge der Linien EV24, RNAi10 und RNAi13 eingehüllt und mit 4-6 Raupen der Schmetterlingsart *Spodoptera littoralis* bestückt. Die emittierten

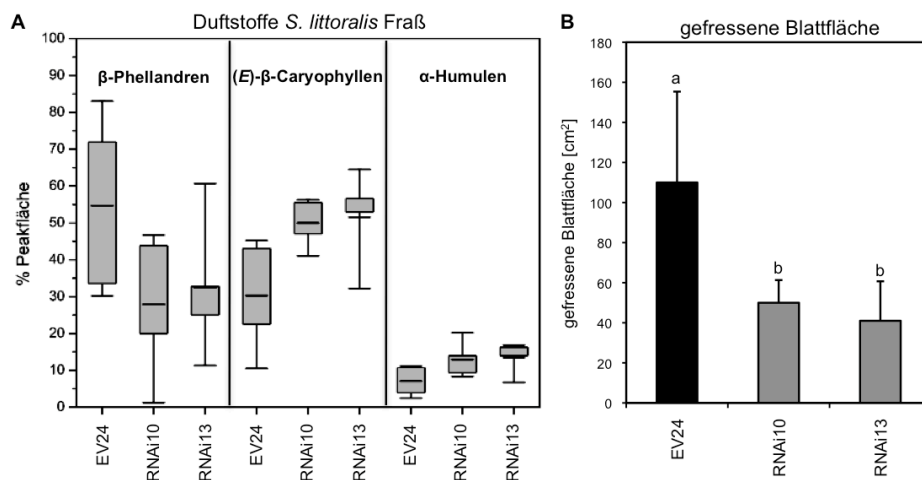


Abbildung 3.22: Duftstoff- und Raupenfraßanalysen der transgenen *SIDXS2*-RNAi-Linien, **A**: Duftstoffe nach 48 h *S. littoralis* Fraß, **B**: gefressene Blattfläche nach 48 h Fraß (n=6, $P \leq 0.001$).

Duftstoffe wurden hierbei auf einem Aktivkohlefilter gesammelt. Nach Elution der Duftstoffe zeigte deren Analyse keine deutlichen Veränderungen zwischen Kontrolle und *SIDXS2*-RNAi-Linien (Abbildung 3.22 A). Dagegen wurden aber geringere Fraßschäden an den *SIDXS2*-RNAi-Linien beobachtet. Nach Abschätzung der gefressenen Fläche zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen Kontroll- und *SIDXS2*-RNAi-Pflanzen (Abbildung 3.22 B).

4 Diskussion

4.1 Isogene im MEP-Biosyntheseweg und in späteren Schritten der Isoprenoidbiosynthese

Die Gene von *DXS1* und *DXS2* aus *Solanum lycopersicum* wurden in der vorliegenden Arbeit kloniert und charakterisiert. Obwohl diese für Isoenzyme kodieren, welche biochemisch die gleiche Reaktion katalysieren, weisen sie eine relativ geringe Ähnlichkeit von 66% auf der Nukleotid-, sowie 69% auf der Aminosäureebene auf. Die genomische Struktur der kodierenden Bereiche beider Gene zeigte eine konservierte Anzahl der Exons (je 10) und Introns (je 9). Eine Verschiebung der Exon-Intron-Grenze wurde lediglich im ersten Exon, welches das Transitpeptid umfasst, festgestellt. Ansonsten wiesen die Exons die gleiche Größe auf. Dagegen waren die Introns des *SIDXS2*-Gens deutlich größer als in *SIDXS1* (Abbildung 3.1). Eine konserviert Anzahl von Exons (sieben) und Introns (sechs) ist auch für die beiden Isogene der Phytoensynthase (PSY), einem Enzym der Carotinoidbiosynthese, beschrieben. Auch in diesen Isogenen weisen die Intronsequenzen größere Sequenzunterschiede als die Exonsequenzen auf (Giorio *et al.*, 2008).

Durch die Modellierung beider Tomaten-DXS an der bekannten Struktur der *Deinococcus radiodurans* *dxs* (Xiang *et al.*, 2007) sollten mögliche Differenzen in der Sekundär- und Tertiärstruktur der beiden Isoformen bestimmt werden. Unterschiede waren lediglich in einer Region zu dokumentieren, bei der eine hohe Flexibilität in der bakteriellen *dxs* beschrieben wurde. Ebenso wenig konnten Unterschiede der Oberflächenladung dokumentiert werden.

Von Walter *et al.* (2002) wurde eine Klassifizierung der DXS-Isoenzyme anhand von Sequenzähnlichkeiten vorgenommen. Aufgrund von Expressionsanalysen wur-

de den Isoenzymen der Klasse 1 eine Rolle im Primärstoffwechsel zugeschrieben, während Klasse 2 Isoenzyme vermutlich eine Funktion im Sekundärstoffwechsel erfüllen. Die Rolle der DXS1 im Primärstoffwechsel wird unter anderem durch Untersuchungen von Lois *et al.* (2000) unterstützt. In dieser Arbeit wurde die *SlDXS1* erstmalig beschrieben und ihre Beteiligung an der Fruchtreifung dokumentiert. Fruchtreife in Beeren (zu denen botanisch auch Tomatenfrüchte gehören) wird nicht nur durch die Akkumulation von Carotinoiden, sondern auch von Aromen isoprenoiden Ursprungs (hauptsächlich flüchtige Substanzen, Geschmack- und Geruchsträger) bestimmt (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000). Computergestützte Analysen der Weinrebe führten zur Identifizierung eines QTLs, der in Zusammenhang mit der Bildung von Aromastoffen in reifen Beeren der untersuchten Rebsorten steht. Dieser QTL wurde als *DXS* identifiziert und zu den Enzymen der Klasse 1 gruppiert (Battilana *et al.*, 2009; Duchêne *et al.*, 2009). Ferner wurden auch für die Monokotyledone Ölpalme (*Elaiis guineensis*) Transkriptmengen eines *DXS*-Gens, welches nach Zuordnung in den Ähnlichkeitsbaum der Klasse 1 angehört, in den Carotinoid-akkumulierenden Früchten nachgewiesen (Khemvong & Suva-chittanont, 2005). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass ausschließlich die Transkriptmengen der *SlDXS1* während der Fruchtreife ansteigen was somit im Einklang mit den bisherigen Untersuchungen steht.

Die Funktion von Isoenzymen der Klasse 2 wird aufgrund spezifischer Transkript-induktionsmuster im Sekundärstoffwechsel vermutet. Diese Hypothese kann unter anderem mit einer Rolle in der Duftstoffproduktion durch glanduläre Trichome belegt werden. In duftstoffproduzierenden Zellen der Minze (*Mentha x piperita*) wurde ein Zusammenhang zwischen den *DXS*-Transkriptmengen und dem Einbau ¹⁴C-markierten CO₂ in Monoterpene nachgewiesen (Lange *et al.*, 1998). Die dort beschriebene DXS kann der Klasse 2 zugeschrieben werden (Abbildung 4.1). In der Literatur ist für *DXS*-Gene aus *Hevea brasiliensis* eine ähnliche Spezialisierung zu finden. Diese Pflanze produziert in spezialisierten sekretorischen Zellen (Laticiferen) Latex als Wundantwort und zur Herbivoren-Abwehr. In diesen Zellen sind die *DXS2*-Transkriptmengen besonders hoch, während im natürlichen Gummi (Latex) selbst nur *DXS1*-Transkripte nachgewiesen werden konnte (Sando *et al.*, 2008). Eine weitere spezialisierte Rolle der *DXS2* wurde während der Mykorrhizierung von *Medicago truncatula* gezeigt. Durch Promotor-Fusionsstudien wurde eine lokale Aktivität des *MtDXS2-1*-Promotors in mykorrhizierten Wurzel-

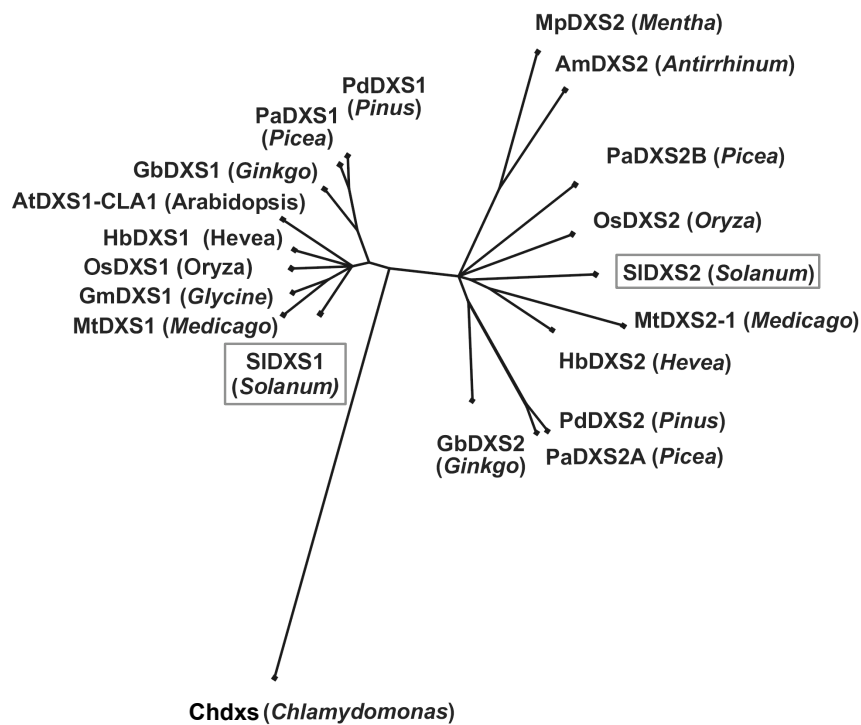


Abbildung 4.1: Ähnlichkeitsdiagramm der reifen DXS-Proteine, **AmDXS2**: *Antirrhinum majus* AY770407, **AtDXS1**: CLA1 *Arabidopsis thaliana* U27099, **ChDXS**: *Chlamydomonas reinhardtii* AJ007559, **GbDXS1**: *Ginkgo biloba* AY505128, **GbDXS2**: *Ginkgo biloba* AY494185, **GmDXS1**: *Glycine max* FJ830452, **HbDXS1**: *Hevea brasiliensis* AB294698 (+AY502939), **HbDXS2**: *Hevea brasiliensis* AB294699 (+DQ473433), **MpDXS2**: *Mentha x piperita* AF019383, **MtDXS1**: *Medicago truncatula* AJ430047, **MtDXS2-1**: *Medicago truncatula* AJ430048, **OsDXS1**: *Oryza sativa* AP005173 (+AP005877), **OsDXS2**: *Oryza sativa* AK100909, **PaDXS1**: *Picea abies* EF688331, **PaDXS2A**: *Picea abies* EF688332, **PdDXS1**: *Pinus densiflora* EU439293, **PdDXS2**: *Pinus densiflora* EU438118, **SIDXS1**: *Solanum lycopersicum* AF143812, **SIDXS2**: *Solanum lycopersicum* FN424052. Die dxs-Sequenz von *Chlamydomonas reinhardtii* diente als 'Outgroup'. Das Ähnlichkeitsdiagramm wurde aus einem Clustal-Alignment mit Hilfe der Programme 'Distance' und 'Splits' des HUSAR-Programmpakets mit den 'Default'-Einstellungen erstellt.

zellen beobachtet, was auf eine zellspezifische Expression des *DXS2*-Gens hinweist (Floß *et al.*, 2008).

In der vorliegenden Arbeit wurden Trichome von Tomatenblättern isoliert, um weitere Untersuchungen zur Rolle der DXS2 im Sekundärstoffwechsel vorzunehmen. In den isolierten Trichomen wurden erhöhte *SIDXS2*-Transkriptmengen nachgewiesen (Abbildung 3.8). Ebenso wurde eine spezifische Akkumulation des SIDXS2-Proteins in den Köpfchen glandulärer Trichome detektiert (Abbildung 3.13), was mit der Einteilung der SIDXS2 als Isoenzym des Sekundärstoffwechsels in Einklang steht. Die Produktion flüchtiger Substanzen ist nicht ausschließlich auf glanduläre Trichome beschränkt, auch Petalen setzen Duftstoffe frei. Die circadiane Emission von Mono- und Sesquiterpenen aus Petalen des Löwenmäulchens (*Antirrhinum majus*) konnte auf eine Änderung von *DXS*-Transkriptmengen zurückgeführt werden (Dudareva *et al.*, 2005). Die nähere Betrachtung der analysierten DXS ordnete diese der Klasse 2 zu (Abbildung 4.1). Wie aus Abbildung 3.8 hervorgeht, wurden in der Tomatenkultursorte Moneymaker eine Akkumulation beider *SIDXS*-Transkripte in Petalen nachgewiesen. Die Petalen besitzen keine Trichome, dennoch konnte auch das Vorhandensein von SIDXS2-Proteinmengen dokumentiert werden. Dies könnte einerseits auf die Emission von Duftstoffen durch die Petalenepidermis zurückzuführen sein, aber auch auf die Gelbfärbung der Petalen durch Xanthophylle. Gegen diese Hypothese spricht jedoch, dass die in dieser Arbeit generierten transgenen *SIDXS2*-RNAi-Pflanzen keine sichtbaren Verblassungen der Petalen aufweisen. In Sepalen wurden vergleichbare Mengen des *SIDXS1*- und des *SIDXS2*-Transkriptes detektiert. Da diese erhebliche Mengen glandulärer Trichome besitzen, könnte dies die ähnlichen Transkriptmengen beider Isogene, wie auch in jungen Blättern, erklären.

Ein Zusammenhang zwischen Transkriptmengen von Genen des MEP-Weges und Metabolitakkumulation wurde bisher kaum untersucht. In *A. thaliana* (Laule *et al.*, 2003; Wille *et al.*, 2004) und Basilikum (*Ocimum basilicum*) (Ijima *et al.*, 2004) konnte keine direkte Verbindung zwischen den Expressionsmustern der Vorläuferbiosynthesegene des Terpenoidstoffwechsels und der Metabolitakkumulation festgestellt werden. Für Monoterpensynthesen, welche die Bildung flüchtiger Monoterpene aus dem C₅-Grundkörper (IPP/DMAPP) katalysieren, gilt dies anscheinend nicht. Die Metabolitakkumulation sowie die Transkriptabundanzen der spe-

zifischen Monoterpensynthesen (Linaloolsynthese und Geraniolsynthese) korrelieren in verschiedenen Basilikumarten (Ijima *et al.*, 2004). In Pfefferminze (*Mentha x piperita*) konnte für die Limonensynthese, eine Monoterpensynthese, ein direkter Zusammenhang zwischen Transkriptmengen, Proteinabundanz und -aktivitäten hergestellt werden, die einen Rückschluss auf posttranskriptionelle Regulation ermöglichen (McConkey *et al.*, 2000). Studien, die an isolierten glandulären Trichomen der Pfefferminze vorgenommen wurden, zeigten eine Korrelation zwischen Monoterpenproduktion und *DXS*-Transkriptmengen (Lange *et al.*, 1998), während dies in Tomatenfrüchten zwischen Expression, Enzymaktivität und Metaboliten nicht nachweisbar war (Fraser *et al.*, 2007). Die in dieser Arbeit ermittelten Daten der *DXS*-Transkriptmengen und Proteinabundanz wiesen keine eindeutigen Verknüpfungen beider Parameter auf, obwohl eine Charakterisierung der *SIDXS*-Proteinabundanz nur eingeschränkt erfolgen konnte. Während die Transkriptmengen und Proteinabundanz in Blättern, Trichomen und Petalen für *SIDXS2* mit jeweils deutlichen Signalen korrelierten, galt dies nicht für Sepalen und Staubblätter (hohe Transkriptmengen, nur schwache Signale des Proteins). Dies könnte auf posttranslationale regulatorische Mechanismen, wie auch von Besser *et al.* (2009) vorgeschlagen, zurückzuführen sein. Auch Analysen der Modellpflanze *A. thaliana*, welche nur ein einziges als funktionell charakterisiertes *DXS*-Gen (*CLA1*) besitzt, lassen eine zusätzliche Feedback-Regulation der *DXS* (Guevara-Garcia *et al.*, 2005) oder eine Regulation durch Proteasom-vermittelten Abbau (Flores-Pérez *et al.*, 2008) vermuten.

Eine Koexistenz von duplizierten *DXS*-Genen wurde für verschiedene Pflanzenspezies beschrieben. Evolutionär ältere Pflanzen, wie zum Beispiel Gymnospermen, weisen ebenfalls eine Duplikation des *DXS*-Gens mit teilweise anderer Einteilung auf. Für die japanischen Rotkiefer (*Pinus densiflora*) wurde eine deutlich höhere Abundanz der Transkriptmengen der *DXS2* beschrieben, deren Expression ebenso, wie in Angiospermen durch Methyljasmonat induziert ist und deshalb ebenfalls dem sekundären Metabolismus zugeordnet werden kann (Kim *et al.*, 2009). In der Fichte (*Picea abies*) wurden sogar drei verschiedene *DXS*-Gene identifiziert. Eines davon kann aufgrund von Sequenzhomologien der Klasse 1 dem Primärstoffwechsel zugeordnet werden. Die putative Rolle der durch diese Gene kodierten *DXS2* im Sekundärstoffwechsel wird auch durch die beiden *PaDXS2*-Gene unterstrichen, da bei verschiedenen Umwelteinflüssen unterschiedliche Expressionsmuster doku-

mentiert wurden (Phillips *et al.*, 2007). Auch für diverse Angiospermen wurde die Existenz von drei *DXS*-ähnlichen Genen dokumentiert. So wurden in *A. thaliana* drei Sequenzen identifiziert, während der funktionelle Nachweis aber bisher nur für eines der Gene aus der *DXS1*-Klasse geführt werden konnte (*CLA1*) (Estévez *et al.*, 2001; Rodríguez-Concepción & Boronat, 2002).

Aus Reis (*Oryza sativa*) sind ebenfalls drei putative *DXS*-Sequenzen bekannt. Dabei können zwei aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeiten jeweils einer der beiden bekannten Klassen zugeordnet werden. Das dritte Gen konnte keiner dieser Klassen zugeordnet werden und dessen Identität als *DXS* bleibt zweifelhaft (Kim *et al.*, 2005a). Alle drei Gene werden differenziell exprimiert. In etiolierten Reisblättern wurden Transkriptmengenverhältnisse von 9:181:1 (*DXS1:DXS2:DXS3*) bestimmt. Im Gegensatz dazu ist aus der Sojabohne (*Glycine max*) bisher ein *DXS*-Gen bekannt (Zhang *et al.*, 2009), welches als *DXS1* klassifiziert wurde. Das Auftreten von *DXS*-Isoenen ist somit im Pflanzenreich weit verbreitet. Dabei ist *A. thaliana* die bisher einzig bekannte Spezies, die kein *DXS2*-Gen besitzt.

Genduplikationen im MEP-Stoffwechselweg sind nicht ausschließlich auf die *DXS* beschränkt, wurden jedoch bisher nur in Einzelfällen berichtet. Für Ginkgo (*Ginkgo biloba*) wurden zwei Isoformen der CMK und der HDR beschrieben. Transkriptmengen beider zur Klasse 2 zugeordneten Gene wurden in Wurzeln detektiert, welche für die Ginkgolid-Produktion (Diterpene) bekannt sind (Kim *et al.*, 2008a,b). Des Weiteren wurde ein *DXS*-Gen der Klasse 2, dessen Transkriptmengen ebenfalls während der Ginkgolid-Produktion nachgewiesen werden konnte aus Ginkgo kloniert (Kim *et al.*, 2005b). Diese Beispiele unterstützen die vermutete Rolle der Klasse 2-Gene im Sekundärmetabolismus.

Die Existenz differenziell regulierter Isoenzyme wird auch für eine Reihe späterer Schritten der Isoprenoidbiosynthese beschrieben. In den Enzymreaktionen treten dabei, ebenso wie bei der *DXS*, oft keine erkennbaren Unterschiede auf. Hier liegen insbesondere für die Enzyme der Carotinoidbiosynthese unter anderem aus Tomate viele Daten vor (Abbildung 4.2). Die Geranylgeranyldiphosphat Synthase (GGPS) liefert das C₂₀-Grundgerüst für die Synthese von unter anderem Diterpenen, Gibberellinen und Carotinoiden (Zhu *et al.*, 1997; Okada *et al.*, 2000) und wird von zwei Genen (Ament *et al.*, 2006) kodiert (*GGPS1* und *GGPS2*): *GGPS1*-

Transkriptakkumulation wurde in Blättern und nach Herbivorie durch Insekten detektiert, während *GGPS2*-Transkripte in Sepalen, sowie in der reifenden Frucht nachgewiesen werden konnten. Die Regulation der *GGPS*-Isogene unterscheidet sich somit von derjenigen der *DXS*-Isogene.

Im weiteren Verlauf der Carotinoidbiosynthese katalysiert die Phytoensynthase (PSY) die Bildung des 15-*cis*-Isomers des Phytoens aus zwei Molekülen Geranylgeranyldiphosphat. In Mais (*Zea mays*) wurden drei differenziell regulierte *PSY*-Isogene dokumentiert. Transkriptakkumulation der *PSY1* und *PSY2* wurde im photosynthetisch aktivem Gewebe nachgewiesen. Dabei wurde gezeigt, dass *PSY1* ausschließlich zur Carotinoidbiosynthese im Endosperm, sowie in der Dunkelphase im Blattgewebe exprimiert wird, während *PSY2*-Transkriptakkumulation wurde im Blatt unter Lichtbedingungen nachgewiesen werden konnte. Im Gegensatz zu *PSY1* und *PSY2* wurden *PSY3*-Transkripte nur in Wurzeln detektiert (Li *et al.*, 2008). In der Tomate wurden bisher zwei Gene der PSY identifiziert. Beide zeigen, ebenso wie die *DXS*-Isogene, eine strenge Konservierung der genomischen Struktur. Ähnlich den *DXS*-Isogenen wurde eine Transkriptakkumulation beider Isogene in den Petalen nachgewiesen, während in der Fruchtreife ausschließlich Transkripte nur eines der beiden Isogene (*PSY1*) detektiert wurde (Giorio *et al.*, 2008). Transkriptakkumulation des *PSY1*-Isogens konnten in Blättern jedoch nicht nachgewiesen werden. Somit führt die differenzielle Expression der *PSY*-Isogene nicht dazu, diese Gene, wie die Isogene der *DXS1* und *DXS2*, in spezifisch für Primär- oder Sekundärstoffwechsel einzugruppieren.

Die Carotinhydroxylase (*CrtR-b*) bildet aus β -Carotin Zeaxanthin und katalysiert damit eine Reaktion nachfolgend der GGPS und PSY. Eine Mutation eines der *CrtR-b*-Isogene führt zu weißen Petalen und Staubblättern der Tomatenblüte (Galpaz *et al.*, 2006) während der Carotinoidgehalt der Blätter unbeeinflusst bleibt. Dies weist auf die differentielle Expression beider *CrtR-b*-Isogene hin.

Ferner wurde von Galpaz *et al.* (2006) vermutet, dass Isoformen von GGPS, PSY, CRTRB, sowie der LCY-B, in Chloroplasten- und Chromoplasten-spezifische Isoformen eingeteilt werden können. Chromoplasten-haltige Gewebe sind einerseits die gelben Petalen und andererseits die Früchte. Für die *GGPS* wurden Transkripte der einen Isoform (*GGPS1*) in Früchten nachgewiesen, aber Informationen zu

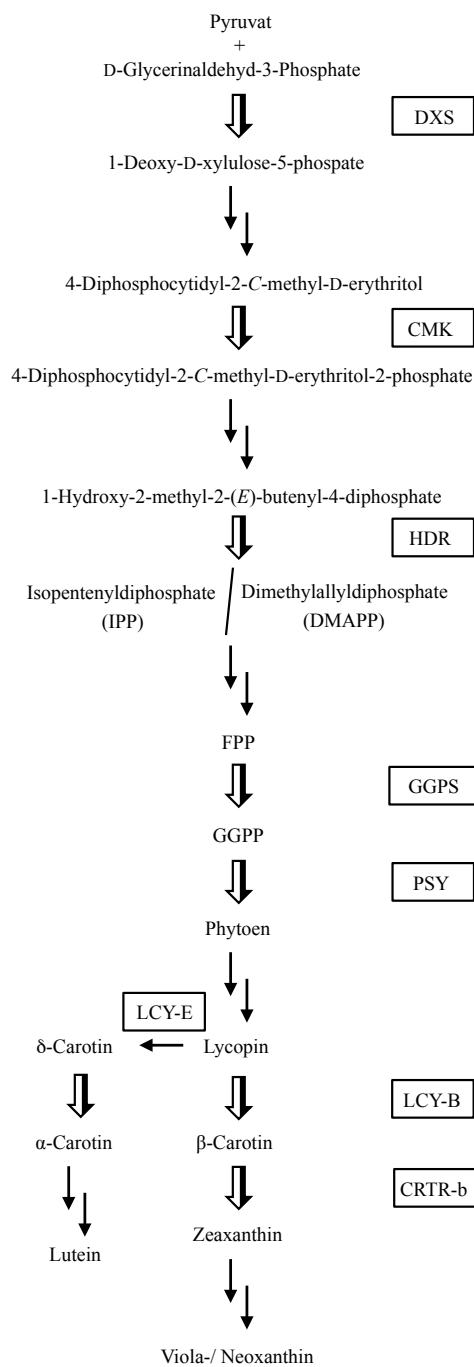


Abbildung 4.2: : Isogene der Isoprenoid- und Carotinoid-Biosynthese, **CMK**: 4-(Cytidin 5-diphospho)-2-*C*-methyl-D-erythritol-Kinase, **CRTISO**: Carotin-*cis-trans*-Isomerase, **CRTR-b**: β -Carotinhydroxylase, **CYC-B**: Lycopin- β -Cyclase, **DXS**: 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat-Synthase, **GGPS**: GGPP-Synthase, **HDR**: 1-Hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl-4-diphosphat-Reduktase, **LCY-B**: Lycopin- β -Cyclase, **PDS**: Phytoendesaturase, **PSY**: Phytoensynthase, **ZDS**: ζ -Carotendesaturase, **FPP**: Farnesylidiphosphat, **GGPP**: Geranylgeranylidiphosphat, Schwarz-Weiße-Pfeile: mindestens zwei Isogene nachgewiesen, schwarzer Pfeil: bisher nur ein Isogen bekannt, verändert nach Galpaz *et al.* (2006).

GGPS-Transkriptmengen in Petalen liegen nicht vor (Ament *et al.*, 2006). Die Chromo- beziehungsweise Chloroplasten-spezifische Expression kann somit für die GGPS-Isoformen nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden. Vorliegenden Daten der PSY-Isogene belegen das Vorhandensein der Transkripte beider Gene in den gelben Petalen (Giorio *et al.*, 2008). Somit kann die Einteilung beider Isoenzyme der PSY in Chromo- beziehungsweise Chloroplasten-spezifische Isoformen, wie durch (Galpaz *et al.*, 2006) postuliert, nicht bestätigt werden.

In diesem Abschnitt wurde gezeigt, dass Genduplikationen in der Isoprenoidvorstufen- und der Carotinoidbiosynthese im ganzen Pflanzenreich beobachtet werden können. Die Einteilung der Isoenzyme nach ihrer vermutlichen Funktion in den Primär- oder Sekundärstoffwechsel scheint zutreffender als eine Differenzierung in Chromo- oder Chloroplasten-spezifische Isoenzyme.

4.2 Hinweise auf die Beteiligung von Isoprenoiden an der Befruchtung

Die Rolle der Isoprenoide während der Befruchtung ist kaum erforscht. Hinweise auf eine mögliche Bedeutung ergaben sich in dieser Arbeit durch die Beobachtungen eines verzögerten Fruchtansatzes und einer retardierten Pollenkeimung in den *SIDXS2*-RNAi-Pflanzen (Abbildung 3.18). Eine nicht auftretende Sterilität ist vermutlich auf den RNAi-Ansatz, der eine Reduktion in der *SIDXS2*-Transkriptmengenreduktion bewirkt, aber keinen totalen Verlust der *SIDXS2*-Funktion zur Folge hat, zurückzuführen. Ein weiterer Grund für die Fruchtansatzverzögerung könnte ein vermindertes Wirken des im Vektor verwendeten 35S Promoters sein. In *A. thaliana* wurde im Tapetum, das Nährgewebe der Pollen während der Reifung in den Antheren, eine verminderte Nutzung des 35S Promoters beschrieben (Skiryecz *et al.*, 2007). Das lässt vermuten, dass der konstitutive Promotor nicht in allen Geweben gleich stark genutzt wird. Bezüglich der *SIDXS2*-RNAi-Pflanzen würde dies in einer verringerten Expression des RNAi-Konstruktes resultieren und somit zu einer schwächeren *SIDXS2*-Transkriptmengenreduktion.

Eine mögliche Erklärung der verzögerten Pollenkeimung könnte die Nutzung von MVA-abgeleitetem IPP, wie bei den Duftstoffen beobachtet, sein. In *A. thaliana* konnte ein Austausch von Isoprenoidvorstufen in der umgekehrten Richtung (MEP zu MVA) zumindest während der Pollenentwicklung ausgeschlossen werden (Suzuki *et al.*, 2009). Eine mögliche Kompensation der verringerten *SIDXS2*-Transkriptmengen durch *SIDXS1*-Transkripte konnte ausgeschlossen werden, da in *in vitro* gekeimten Pollen keine *SIDXS1*-Transkriptakkumulation detektiert wurde (Abbildung 3.9). Deshalb wird vermutet, dass die ausschließliche Expression des *DXS2*-Gens die Vorstufen für essentielle Isoprenoide bereitstellt.

Das Vorhandensein von duftstoffproduzierenden Enzymen in den Reproduktionsorganen wurde durch Roeder *et al.* (2007) beschrieben. Die Autoren lokalisierten eine Monoterpensynthase (1,8-Cineole Synthase) in Griffel und Narbe und der Petalenepidermis einer Tabakart (*Nicotiana suaveolens*). Somit konnte gezeigt werden, dass Reproduktionsorgane Duftstoffe emittieren, aber inwiefern die Vorläuferbiosynthese auch dort abläuft bleibt offen.

Mögliche Isoprenoid-Derivate, deren Rolle während der Befruchtung dokumentiert wurden, sind Gibberelline. Eine Tomatenmutante, die Rückschlüsse auf die Funktion von Isoprenoid-Derivaten während der Befruchtung erlaubt, ist die *pat*-Tomatenmutante. Die parthenokarpe Fruchtbildung in diesen Pflanzen wurde auf erhöhte Gibberellin-Gehalte in den Ovarien zurückgeführt (Fos *et al.*, 2000; Olimpieri *et al.*, 2007). In den *SIDXS2*-RNAi-Pflanzen könnte jedoch ein verminderter Gehalt an Gibberellinen vermutet werden. Wahrscheinlich genügt die *SIDXS2*-Restaktivität in diesen Pflanzen, um eine Fruchtbildung zu gewährleisten. Weitere Hinweise der Beteiligung von Gibberellinen bei der Befruchtung basieren auf Ergebnissen von Nitsch *et al.* (2009) und Vriezen *et al.* (2008), die die Rolle von Ethylen- und Abscisinsäure-Biosynthesegenen untersuchten. De Jong *et al.* (2009) vermuten basierend auf diesen Arbeiten, dass der Beginn der Fruchtentwicklung unter anderem von Gibberellinen abhängig ist. Eine Übertragung von Gibberellinen von den Pollen auf die Ovarien während der Befruchtung wurde bereits Anfang der Sechziger Jahre des letzten Jahrhunderts vermutet (Sastry & Muir, 1963).

Eine Beeinflussung des Pollenschlauchlängenwachstums durch Gibberelline wurde ebenfalls in *A. thaliana* beobachtet (Swain *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2002). Eine

Funktion von mehreren Phytohormonen (Auxin und Gibberelline stimulieren; Abscisinsäure inhibiert) konnte beim Pollenschlauchlängenwachstum in Samtgesicht (*Torenia fournieri*) dokumentiert werden (Wu *et al.*, 2008).

Pollen können ebenso Duftstoffe produzieren, die von dem den Pollen umgebenden „Pollenkitt“, emittiert werden (Dobson, 2000). Die vermutliche Funktionen dieser Duftstoffe ist die Kommunikation mit bestäubenden Insekten oder die Abwehr pollenfressender Insekten.

Einen möglichen Einfluss von Phytohormonen auf die *DXS*-Expression könnte zunächst mit Hilfe der *in silico* Analysen der Promotorfragmente gewonnen werden. Putativ Gibberellin-regulierte Motive wiesen keine Unterschiede in den analysierten Promotorsequenzen auf, während für Abscisinsäure-responsive Elemente eine deutlich höhere Quantität und Diversität für das *SIDXS1*-Promotorfragment dokumentiert werden konnte. Da in keimenden Pollen aber keine *SIDXS1*-Transkripte detektiert wurden (Abbildung 3.9), werden diese Daten relativiert.

4.3 *SIDXS2*-Transkriptreduktion verändert die Produktion flüchtiger Isoprenoide und den Beitrag von MEP- und MVA-Weg

Einige Ansätze zur Aufklärung der Duftstoffproduktion in Pflanzen zeigten bereits, dass *DXS* eine einflussreiche Rolle hat. Durch die Überexpression einer *DXS1*-ähnlichen Sequenz aus *A. thaliana* in Lavendel (*Lavandula latifolia*) wurde eine vermehrte Akkumulation von Monoterpenen, die Hauptbestandteil des Lavendelöls sind, dokumentiert (Munoz-Bertomeu *et al.*, 2006). In Minze (*Mentha x piperita*) wurde ebenfalls ein Zusammenhang zwischen der *DXS*-Expression und der Monoterpenproduktion belegt (Lange *et al.*, 1998). Das Monoterpen β -Phellandren und das Sesquiterpen β -Caryophyllen wurden als Hauptduftstoffkomponenten von Tomaten identifiziert (Zhang *et al.*, 2008). Durch die spezifische Reduktion der *SIDXS2*-Transkriptmengen wurde der Einfluss des MEP-Weges auf die *in vivo*-Produktion flüchtiger Isoprenoide untersucht.

Mit Hilfe einer neu entwickelten Methode wurden Terpene der Trichome analysiert. Es wurden drei Duftstoffe detektiert: ein Monoterpen (β -Phellandren) und zwei Sesquiterpene (E - β -Caryophyllen, α -Humulen). Das β -Phellandren bildete die Hauptduftstoffkomponente der hier analysierten Kulturtomate (Abbildung 3.20). Dies bestätigt die Analysen von Besser *et al.* (2009). Dort wurde für die Kulturtomaten β -Phellandren als Hauptduftstoffkomponente bestimmt, während Monoterpene in den Wildsorten nur in geringen Mengen nachzuweisen waren.

Der Vergleich der relativen Duftstoffmengen der *SIDXS2*-RNAi-Pflanzen zur Kontrolle zeigte eine signifikante Änderung aller gemessenen Komponenten, sowohl der Mono-, als auch der Sesquiterpene (Abbildung 3.20 B). Die Reduktion des Monoterpens ist dabei erwartet, da die Synthese von Monoterpenen über den MEP-Weg bekannt ist. Die Herkunft des IPPs aus MEP- oder MVA-Weg wurde in der vorliegenden Arbeit anhand des natürlichen Isotopenverhältnisses von $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ermittelt (Jux *et al.*, 2001). Dies ist durch die unterschiedliche Abreicherung des ^{13}C -Isotops in den Stoffwechselwegen möglich. Die Isotopenverhältnisse des β -Phellandrens der Kontroll- und der RNAi-Linien zeigten deutliche Unterschiede, die eine Abreicherung des ^{13}C -Isotopes im β -Phellandren der RNAi Linien dokumentieren (Abbildung 3.21). Aufgrund dessen kann geschlossen werden, dass die reduzierten Mengen β -Phellandren in den RNAi-Linien zu einem erhöhten Anteil aus IPP des MVA-Wegs synthetisiert wurden. Somit sind die noch detektierten Mengen nicht ausschließlich auf *SIDXS2*-Restaktivität zurückzuführen. Außerdem wird durch diese Hypothese eine mögliche Kompensation der verringerten *SIDXS2*-Transkriptmengen durch *SIDXS1* weitestgehend ausgeschlossen. Für die detektierten Sesquiterpene wurde ebenfalls eine Abreicherung des ^{13}C -Isotopes in den RNAi-Linien im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen. Somit wird auch zur Biosynthese von β -Caryophyllen und α -Humulen in den RNAi-Linien MVA-abgeleitetes IPP verwendet. Im Umkehrschluss bedeutet dies für die Duftstoffproduktion in der Kontrolllinie, dass sowohl MEP- als auch MVA-abgeleitetes IPP zur Biosynthese von Mono- und Sesquiterpenen genutzt werden. Dies wird durch die ähnlichen Isotopenverhältnisse aller drei Duftstoffe in EV24 unterstützt und wurde bereits durch Inhibitorstudien von Besser *et al.* (2009) vermutet.

Die Herkunft der C_5 -Grundbausteine IPP/DMAPP für die Produktion der ver-

schiedenen Duftstoffklassen bei verschiedenen Pflanzengattungen ist jedoch nicht eindeutig. Die Synthese von Hemi-, Mono- und Diterpenen wurde dem MEP-Stoffwechselweg zugeschrieben (McGarvey & Croteau, 1995). Hinsichtlich der Synthese von Sesquiterpenen ist die Herkunft von IPP nicht eindeutig geklärt, einige sollen aus dem MEP-IPP abgeleitet werden, während andere aus dem MVA-IPP hervorgehen sollen (Nes & Venkatramesh, 1999; Eisenreich *et al.*, 2001; Lange & Ghassemian, 2003). Durch Fütterungsversuche mit deuterierten Vorstufen an Erdbeer-Pflanzen (*Fragaria x ananassa*) wurde nachgewiesen, dass Mono- und Sesquiterpene im Cytosol und somit über den MVA-Weg synthetisiert werden (Hampel *et al.*, 2006). Die Nutzung von isotopen-markierten Vorläuferstufen an Löwenmäulchen-Blüten (*Antirrhinum majus*) zeigte, dass sowohl die Produktion der plastidär-produzierten Monoterpene, als auch der im Cytosol produzierten Sesquiterpenen in den Petalen ausschließlich über den MEP-Weg gewährleistet wird (Dudareva *et al.*, 2005). Ebenso wurde eine Verwendung des IPPs beider Stoffwechselwege zur Produktion von Sesquiterpenen in Kamille und Limabohne berichtet (Piel *et al.*, 1998; Adam *et al.*, 1999). Diese Beispiele zeigen, dass die Nutzung beider Stoffwechselwege zur Produktion flüchtiger Isoprenoide in den verschiedenen Pflanzenspezies variieren und eine eindeutige Aufteilung der Duftstoffe zum zugehörigen Stoffwechselweg nicht generalisiert werden kann. Vermutungen über einen Austausch der Isoprenoidvorstufen wurden ebenfalls berichtet (Adam *et al.*, 1999; Hemmerlin *et al.*, 2003). Durch Microarray-Analysen an *A. thaliana* wurde vermutet, dass zur Isoprenoidbiosynthese ein Austausch von Vorstufen stattfindet (Burlat *et al.*, 2004; Bick & Lange, 2003). Während in Analysen der Terpene der Tomatentrichome einen Austausch von Vorstufen dokumentiert wurde (Abbildung 3.21), wurde dies durch Untersuchungen der Duftstoffe von Hopfen (*Humulus lupulus*) (Wang *et al.*, 2008) und Minze (*Mentha x piperita*) (McCaskill & Croteau, 1995) ausgeschlossen.

Anhand der vorliegenden Daten wurde der direkte Einfluss des MEP-Weges auf die Monoterpen-Produktion von Tomatenpflanzen bestätigt. Ferner konnte gezeigt werden, dass die durch Besser *et al.* (2009) vermutete Nutzung des MEP-Weges in der Biosynthese der Sesquiterpene in der Kulturtomate zumindest teilweise erfolgt. Folglich wird die Produktion der Duftstoffe der Kulturtomate durch beide Stoffwechselwege gewährleistet.

4.4 Reduktion der *SIDXS2* führt zu einer erhöhten Anzahl glandulärer Trichome

In weiterführenden Experimenten sollten durch eine Induktion der Duftstoffproduktion mittels Herbivorie mögliche Unterschiede der Duftstoffemission geprüft werden (Dicke, 2009). Dazu wurden die Duftstoffe der *SIDXS2*-RNAi-Pflanzen, sowie der Kontrollen mittels 'Head-Space'-Technik während der Schädigung durch Schmetterlingsraupen (*Spodoptera littoralis*) gesammelt. Nach der Analyse der Duftstoffe konnten keine Unterschiede der Duftstoffemission festgestellt werden (Abbildung 3.22 A). Dagegen wiesen die *SIDXS2*-RNAi-Pflanzen bei gleichen Bedingungen deutlich weniger Fraßschäden auf (Abbildung 3.22 B). Aufgrund ähnlicher Duftstoffkonzentrationen könnte dieser Effekt auf die erhöhte Anzahl glandulärer Trichome zurückgehen. Diese Hypothese wird durch vielfältige Beobachtungen an verschiedenen Pflanzenarten, die eine erhöhte Trichomzahl als Fraßschutz dokumentieren, unterstützt. In *Arabidopsis lyrata* (Clauss *et al.*, 2006) und im Blauglockenbaum (*Paulownia tomentosa*) (Kobayashi *et al.*, 2008) wurde die Abwehr von Herbivoren auf die Trichomdichte und andere Oberflächenstrukturen, sowie den Glucosinolat-Gehalt der Typ VI Trichome zurückgeführt. An Tomatenpflanzen durchgeführte Studien konnten Bewegungseinschränkungen von Blattläusen (*Myzus persicae*) (Simmons *et al.*, 2003) und von Milben (*Tetranychus urticae*) (Alba *et al.*, 2009; Maluf *et al.*, 2007) direkt auf die Anzahl glandulärer Typ VI Trichome zurückgeführt werden. Ebenfalls wurde durch Untersuchungen an Tomatenpflanzen eine erhöhte Trichomanzahl als Ursache der verringerten Bewegung von *Frankliniella occidentalis* festgestellt (Boughton *et al.*, 2005). Bei allen Beispielen erwiesen sich Pflanzen mit einer höheren Anzahl glandulärer Trichome als resistenter gegenüber Herbivoren.

Die Jasmonat-insensitive Tomatenmutate *jai1* zeigt neben anderen Auffälligkeiten eine verminderte Bildung glandulärer Trichome. In Experimenten mit herbivoren Milben erwiesen sich die *jai1*-Pflanzen als attraktiver für die Milben als die Kontrollpflanzen (Li *et al.*, 2004).

Eine Reduktion der CMK, ebenfalls ein Enzym des MEP-Weges durch VIGS ('virus-induced gene silencing') resultierte ebenfalls in der Erhöhung der Trichomanzahl (Ahn & Pai, 2008). Im Gegensatz zu der in dieser Arbeit beschriebenen

Reduktion des *DXS2*-spezifischen MEP-Weges wurde durch eine Verringerung der *CMK*-Transkriptmengen der gesamte MEP-Weg beeinflusst und führte zusätzlich zu einer deutlichen Beeinträchtigung der Blattmorphologie (u.a. welke Blätter und veränderte Chloroplasten).

Zu den die Trichomanzahl beeinflussenden Faktoren zählen auch Transkriptionsfaktoren. So wurde aus Tabak (*N. benthamiana*) ein MYB-Transkriptionsfaktor identifiziert, der die Bildung glandulärer Trichome reguliert (Schäfer, 2005). Eine Erhöhung des Transkriptniveaus führt zu einer gesteigerten Anzahl glandulärer Trichome. Dies betrachtend wurden die Transkriptmengen des MYB-ähnlichen Transkriptionsfaktors *THM18* (Lin *et al.*, 1996) in den *SIDXS2*-RNAi-Pflanzen analysiert. Ein Anstieg des Transkriptniveaus konnte ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt).

Die Reduktion der *SIDXS2*-Transkriptmengen in den transgenen RNAi-Pflanzen führte ebenfalls, wie in Abschnitt 3.3.6 beschrieben, zu einer verminderten Produktion von β -Phellandren. Eine mögliche Kompensation der Duftstoffreduktion durch erhöhte Anzahl glandulärer Trichome kann anhand der vorliegenden Daten weder unterstützt noch widerlegt werden.

In Stechapfel (*Datura wrightii*), ebenfalls der *Solanaceae*-Gattung zugehörig, wurde vermutet, dass eine Erhöhung der Trichomzahl zwar in einer erhöhte Resistenz gegenüber Herbivoren resultiert, aber gleichzeitig eine verminderte Reproduktionsfähigkeit hervorruft (Hare *et al.*, 2003). Somit sind Pflanzen durch die Erhöhung der Anzahl der glandulären Trichome eher wachstumsdominant als reproduktionsdominant. Die erzeugten *SIDXS2*-RNAi-Pflanzen wiesen ähnliche phänotypische Merkmale auf. Einerseits die Erhöhung der Anzahl glandulärer Trichome und andererseits ein vermindertes Pollenschlauchlängenwachstum. Somit wurde durch die Reduktion der *SIDXS2*-Transkriptmengen ein Einfluss sowohl auf die vegetative, als auch auf die reproduktive Lebensphase der Tomatenpflanze dokumentiert. Diese Daten unterstützen die Hypothese der steigenden Wachstumsdominanz durch erhöhte Trichomzahlen zu Lasten der Reproduktionsfähigkeit.

4.5 Fazit und Ausblick

Durch die Analyse transgener Pflanzen, deren MEP-Biosyntheseweg beeinträchtigt wurde, konnten in der vorliegenden Arbeit einige potenzielle Kompensationsmechanismen für Störungen in der Isoprenoidvorstufen-Biosynthese beschrieben werden. Die generierten, stabil transformierten Pflanzen zeigen eine Beeinträchtigung der Befruchtung, eine erhöhte Anzahl glandulärer Trichome und einen verminderten Gehalt an β -Phellandren, die in den Folgegenerationen überprüft werden sollten.

Zur Erzeugung von homozygoten Linien ist eine möglichst geringe Kopienzahl des RNAi-Konstruktes vorteilhaft. Es zeigte sich, dass die in dieser Arbeit hauptsächlich genutzten transgenen Linien RNAi10 und RNAi13 eine hohe Kopienzahl (≥ 3) aufweisen, somit ist die Generierung homozygoter Pflanzen erschwert. Für weiterführenden Arbeiten kann die Linie RNAi7 genutzt werden, da diese Linie laut Analysen nur zwei Kopien des RNAi-Konstruktes besitzt. Homozygote Linien könnten eine Aufklärung der Funktion der SIDXS in den Petalen ermöglichen. Weiterhin ist die Analyse der auf die intensive Gelbfärbung der Petalen zurückzuführenden Xanthophylle Neoxanthin und Violaxanthin und deren biogenetischer Ursprünge aus dem MEP- oder MVA-Weg denkbar. Mit homozygoten Linien wären ebenfalls weitere Ansätze bezüglich der verringerten Herbivorie der *SIDXS2*-RNAi-Pflanzen möglich. So könnten zum Beispiel andere blattfressende Herbivoren, wie *Frankliniella occidentalis* als polyphages Insekt oder Raupen des Tabakschwärmers (*Manduca sexta*) genutzt werden. Für weitere Experimente zur Untersuchung des Einflusses der erhöhten Anzahl glandulärer Trichome ist eine Verwendung von blattsaugenden Insekten, wie zum Beispiel der gemeinen Spinnmilbe (*Tetranychus urticae*) und der grünen Pfirsichblattlaus (*Myzus persicae*) denkbar.

Die in der Arbeit vorgenommenen Untersuchungen der Proteinabundanzen beider SIDXS-Proteine waren aufgrund der abnehmenden Antikörpersensitivität nicht vollständig. Der SIDXS2-Antikörper zeigte nach Aufreinigung gegen die zur Generierung genutzten Peptide eine hohe Spezifität für das SIDXS2-Protein. Dies galt nicht für den SIDXS1-Antikörper. Dieser detektierte das SIDXS1-Protein lediglich als eins von mehreren Proteinen. Zur Produktion beider Antikörper wurden

Peptide des N-Terminus genutzt. Zusätzlich wurde für die SIDXS2-Antikörper-Produktion ein weiteres Peptid des C-Terminus verwendet. Da der SIDXS2-Antikörper bessere histochemische Reaktionen zeigte, könnte dies auf das Peptid des C-Terminus zurückzuführen sein. Für erneute Co-Lokalisierungsexperimente sind daher gegen Peptide des C-Terminus gerichtete Antikörper geeignet. Eine weitere Möglichkeit Isoenzym-spezifische Antikörper zu erhalten, wäre durch die Generierung von Antikörpern, welche gegen das Gesamtprotein gerichtet sind, möglich. Durch die hohe Ähnlichkeit beider SIDXS-Proteine und die durch das Modell gezeigten geringen Unterschiede in Sekundär- und Tertiärstruktur, ist vermutlich eine affinitätschromatographische Aufreinigung der Antiseren gegen das jeweilige rekombinante Protein nötig, um Isoenzym-Spezifität zu gewährleisten.

Die Untersuchung der Promotor-Fusionen durch transiente Expression in Tabak (*N. benthamiana*) zeigte nur eine sehr schwache Dokumentation der *DXS2*-Promotor-Aktivität in der Mittelvene des Blattes nach Induktion durch Verwundung. Dies könnte einerseits an der Ineffizienz der Infiltration liegen. Andererseits wäre ebenso eine schwache Promotoraktivität möglich oder eine Kombination aus geringer Transformationseffizienz und geringer Promotoraktivität. Eine Verbesserung ist durch stabil transformierte transgene Pflanzen, die die Promotor - Fusionskonstrukte exprimieren, denkbar. Möglicherweise könnte dann eine zellspezifische Expression zum Beispiel in den Köpfchen glandulärer Trichome dokumentiert werden. Des Weiteren wäre die Analyse der die Promotoraktivitäten in den Petalen möglich. Vermutlich könnten weitere Hinweise der differenziellen Regulation beider Isogene liefern könnte. Die erhaltenen Erkenntnisse der spezifischen Transkriptakkumulation der *SIDXS*-Isogene wären für weitere transgene Ansätze verwendbar. Dies wäre für Untersuchungen der Fruchtreife sehr interessant, da in den kleinen grünen Früchten sowohl *SIDXS1*- als auch *SIDXS2*-Transkriptakkumulation nachgewiesen wurden. Im Gegensatz dazu wurden während der Fruchtreife ausschließlich *SIDXS1*-Transkriptmengen detektiert. So wäre eine *SIDXS1*-Transkriptmengenreduktion unter einem induzierbaren Promotor eine Möglichkeit für weitere Untersuchungen. Durch Verwendung des durch Alkohol-induzierbaren *alc* Promotors wurde sogar eine gewebespezifische Induktion durch Applikation von Acetaldehyd berichtet (Schaarschmidt *et al.*, 2004). Mit der Nutzung induzierbarer Promotoren könnten durch zeitlich genaue Applikation ebenfalls Entwicklungsprozesse untersucht werden. Um die Rolle der *SIDXS1*

und *SIDXS2* während der Fruchtreife zu untersuchen, wäre die Nutzung gewebe-spezifische Promotoren eine Möglichkeit. Die Verwendung fruchtspezifischer Pro-motoren, wie zum Beispiel E8 (Butelli *et al.*, 2008) und TomLoxB (Beaudoin & Rothstein, 1997) könnten eine Untersuchung der Rolle der SIDXS-Isoenzyme wäh-rend der Fruchtreife gewährleisten, ohne das Pflanzenwachstum durch *SIDXS1*-Transkriptmengenreduktion zu beeinträchtigen.

Die erhaltenen Daten der Analysen des biogenetischen Ursprungs von Trichom-Terpenen der *SIDXS2*-RNAi-Pflanzen zeigen, dass die *SIDXS*-Isogene sich ge-genseitig vermutlich nicht kompensieren sondern, dass vielmehr ein Austausch zwischen den beiden Vorläuferbiosynthesewege induziert wird. Mit transgenen Pflanzen, die ein *SIDXS1*-Konstrukt unter fruchtspezifischen Promotoren expri-mieren, könnten ein möglicher Austausch zwischen beiden Stoffwechselwegen bei der Fruchtreife näher untersucht werden.

5 Zusammenfassung

Die Biosynthese der Isoprenoidgrundstrukturen (Isopentenylidiphosphat (IPP) und Dimethylallyldiphosphat (DMAPP)) kann in Pflanzen entweder durch den cytosolischen Mevalonat (MVA)-Weg oder über den plastidären Methylerythritol-Phosphat (MEP)-Weg erfolgen. Der erste Schritt des MEP-Stoffwechselweges wird durch die 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat-Synthase (DXS) katalysiert. In vielen Pflanzen scheinen zwei divergente, differenziell regulierte Isoformen der DXS für die Zuteilung der Grundstrukturen in die nachfolgenden Biosynthesewege verantwortlich zu sein. Im Fokus der vorliegenden Arbeit lagen die Analysen dieser *DXS*-Isogene und deren Proteine in der Kulturtomatensorte Moneymaker.

- > Bei der Bestimmung der Transkriptabundanz zeigte sich, dass *SIDXS1*-Transkripte in allen Organen nachweisbar waren. In Blättern, Petalen und Sepalen wurden etwa vergleichbare *SIDXS1*-Transkriptmengen nachgewiesen. Die höchsten *SIDXS1*-Transkriptabundanz wurden in Früchten der späten Reifestadien dokumentiert.
- > Die Transkriptniveaus der *SIDXS2* waren nur in jungen Blättern und Petalen sowie in keimenden Pollen erhöht. Während der Fruchtreife waren keine *SIDXS2*-Transkripte nachweisbar. Ein stark erhöhter Gehalt der *SIDXS2*-Transkriptmengen wurde in isolierten Trichomen dokumentiert.
- > Die Generierung Isoenzym-spezifischer Peptid-Antikörper ermöglichte die Untersuchung der Proteinabundanz beider DXS-Isoformen. Dabei konnten die Daten der Transkriptmengenanalysen weitestgehend bestätigt werden. In der reifen Frucht wurde nur DXS1-Protein detektiert. Ausschließlich DXS2-Protein konnte in Extrakten isolierter Trichome nachgewiesen werden, während in Blattextrakten beide Proteine detektiert werden konnten.

- > Zur funktionellen Charakterisierung und zur Aufklärung der Bedeutung von DXS2 wurden *SIDXS2*-RNAi-Pflanzen erzeugt. Die Transformation der Tomatenpflanzen erfolgte über Agrobakterien-vermittelten Gentransfer über Kalluskulturen. Es wurden 400 bewurzelte Pflanzen zunächst auf die Präsenz des Resistenzgens getestet. Weitere Analysen der *SIDXS2*-Transkriptmengenreduktion ermöglichten eine Verminderung auf fünf transgene Linien (RNAi7, 10, 13, 15; EV24), die weiter untersucht wurden.
- > Die Funktionalität des RNAi-Ansatzes wurde durch Mykorrhizierung mit *Glomus intrradices* nachgewiesen. Die Reduktion der *SIDXS2*-Transkriptniveaus führte zu einer Verringerung der Mykorrhiza-spezifischen Cyclohexenon- und Mykorrhadin-Derivate in den ausgewählten Linien RNAi10 und RNAi13.
- > Ein weiterer Nachweis der Wirksamkeit des RNAi-Ansatzes erfolgte durch Verwundung. Nach erfolgter Verwundung wurden die Transkriptmengenänderung der *SIDXS*-Gene analysiert. *SIDXS1*-Transkriptniveaus blieben unbeeinflusst, während *SIDXS2*-Transkriptmengen, auch in den RNAi-Linien, signifikant anstiegen. Der Anstieg in den RNAi-Linien erfolgte von einem reduzierten Basisniveau und erreichte nicht das Niveau der Kontrolllinie EV24.
- > Die phänotypische Charakterisierung der vier transgenen RNAi-Linien zeigte nur geringe Auffälligkeiten. Aufgrund eines beobachteten Trends zu einem retardiertem Fruchtansatzes wurden Transkriptmengenanalysen in Reproduktionsorganen von Wildtyp Pflanzen durchgeführt. Dabei konnte festgestellt werden, dass bei der Pollenkeimung ausschließlich *SIDXS2*-Transkripte nachweisbar sind, während *SIDXS1*-Transkripte nicht detektiert werden konnten. Die Vermutung eines verzögerten Pollenschlauchlängenwachstums in den transgenen Pflanzen konnte bestätigt werden. Dies könnte auch der Grund des verzögerten Fruchtansatzes sein. Weitere Aspekte des Einflusses von MEP-abgeleiteten Isoprenoiden in den Reproduktionsorganen werden diskutiert.
- > Untersuchungen der Trichominhaltsstoffe der transgenen Pflanzen mittels einer neu entwickelten Methode zeigte einen deutlich reduzierten relativen Gehalt des Monoterpens β -Phellandren in den RNAi-Pflanzen. Analysen

des natürlichen $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Isotopenverhältnisses ermöglichen eine Unterscheidung der Herkunft der IPP-Grundstrukturen für die untersuchten Duftstoffe (MVA- gegenüber MEP-Weg). Diese Untersuchungen ergaben, dass die Duftstoffe der RNAi-Pflanzen einen erhöhten Anteil MVA-abgeleitetes IPP enthalten. Damit deutet sich an, dass eine Reduktion der *SIDXS2*-Transkriptmengen in einem verstärktem Austausch der Vorläuferstufen zwischen den Stoffwechselwegen resultiert. Eine Kompensation in der Form erhöhter *SIDXS1*-Transkriptniveaus wurde dagegen nicht beobachtet.

- > Für die RNAi Linien RNAi7, 10 und 13 wurde eine signifikant erhöhte Anzahl glandulärer Trichome dokumentiert. Experimente die mit Schmetterlingsraupen (*Spodoptera littoralis*) an den transgenen Linien RNAi10 und RNAi13 sowie mit der Kontrolllinie EV24 durchgeführt wurden, zeigten auf den RNAi Linien deutlich geringere Fraßschäden als auf den Kontrollpflanzen (EV24). Dieser Effekt wurde auf die erhöhte Anzahl glandulärer Trichome zurückgeführt.

Durch die umfassende Charakterisierung der *SIDXS1* und *SIDXS2* aus der Tomate konnten neue, Einblicke in die Isoprenoidvorstufenbiosynthese des MEP-Stoffwechselweges gewonnen werden. Dabei wurde insbesondere die Rolle der *SIDXS2* bei der Bildung isoprenoider Trichominhaltsstoffe deutlich.

Literaturverzeichnis

- Adam, K. P., Thiel, R. & Zapp, J. (1999): Incorporation of 1-[1-¹³C]deoxy-D-xylulose in chamomile sesquiterpenes. *Arch. Biochem. Biophys.*, **369** (1): 127–32.
- Ahn, C. S. & Pai, H. S. (2008): Physiological function of *IspE*, a plastid mep pathway gene for isoprenoid biosynthesis, in organelle biogenesis and cell morphogenesis in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Mol. Biol.*, **66** (5): 503–17.
- Alba, J. M., Montserrat, M. & Fernández-Muñoz, R. (2009): Resistance to the two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae*) by acylsucroses of wild tomato (*Solanum pimpinellifolium*) trichomes studied in a recombinant inbred line population. *Exp. Appl. Acarol.*, **47** (1): 35–47.
- Ament, K., Van Schie, C. C., Bouwmeester, H. J., Haring, M. A. & Schuurink, R. C. (2006): Induction of a leaf specific geranylgeranyl pyrophosphate synthase and emission of (*E,E*)-4,8,12-trimethyltrideca-1,3,7,11-tetraene in tomato are dependent on both jasmonic acid and salicylic acid signaling pathways. *Planta*, **224** (5): 1197–208.
- Amme, S., Rutten, T., Melzer, M., Sonsmann, G., Vissers, J. P. C., Schlesier, B. & Mock, H.-P. (2005): A proteome approach defines protective functions of tobacco leaf trichomes. *Proteomics*, **5** (10): 2508–18.
- Arimura, G., Garms, S., Vei, M. M., Bossi, S., Schulze, B., Leitner, M., Mithöfer, A. & Boland, W. (2008): Herbivore-induced terpenoid emission in *Medicago truncatula*: concerted action of jasmonate, ethylene and calcium signaling. *Planta*, **227** (2): 453–464.
- Bartram, S., Jux, A., Gleixner, G. & Boland, W. (2006): Dynamic pathway allocation in early terpenoid biosynthesis of stress-induced lima bean leaves. *Phytochemistry*, **67** (15): 1661–72.
- Battilana, J., Costantini, L., Emanuelli, F., Sevini, F., Segala, C., Moser, S., Velasco, R., Versini, G. & Grando, M. S. (2009): The 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase gene co-localizes with a major qtl affecting monoterpene content in grapevine. *Theor. Appl. Genet.*, **118** (4): 653–69.
- Beaudoin, N. & Rothstein, S. J. (1997): Developmental regulation of two tomato lipoxygenase promoters in transgenic tobacco and tomato. *Plant Mol. Biol.*, **33** (5): 835–46.
- Besser, K., Harper, A., Welsby, N., Schauvinhold, I., Slocombe, S., Li, Y., Dixon, R. A. & Broun, P. (2009): Divergent regulation of terpenoid metabolism in the trichomes of wild and cultivated tomato species. *Plant Physiol.*, **149** (1): 499–514.

- Bhat, R. A., Lahaye, T. & Panstruga, R. (2006): The visible touch: in planta visualization of protein-protein interactions by fluorophore-based methods. *Plant Methods*, **26** (2): 12.
- Bick, J. A. & Lange, B. M. (2003): Metabolic cross talk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis: unidirectional transport of intermediates across the chloroplast envelope membrane. *Arch. Biochem. Biophys.*, **415** (2): 146–54.
- Bifulco, V., M.; Di Marzo (2002): Targeting the endocannabinoid system in cancer therapy: A call for further research. *Nature Med.*, **8** (6): 547–50.
- Bloch, K., Chaykin, S., Phillips, A. H. & de Waard, A. (1959): Mevalonic acid pyrophosphate and isopentenylpyrophosphate. *J. Biol. Chem.*, **234**: 2595–604.
- Boughton, A. J., Hoover, K. & Felton, G. W. (2005): Methyl jasmonate application induces increased densities of glandular trichomes on tomato, *Lycopersicon esculentum*. *J. Chem. Ecol.*, **31** (9): 2211–6.
- Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**: 248–54.
- Burlat, V., Oudin, A., Courtois, M., Rideau, M. & St-Pierre, B. (2004): Co-expression of three mep pathway genes and geraniol 10-hydroxylase in internal phloem parenchyma of *Catharanthus roseus* implicates multicellular translocation of intermediates during the biosynthesis of monoterpene indole alkaloids and isoprenoid-derived primary metabolites. *Plant J.*, **38** (1): 131–41.
- Butelli, E., Titta, L., Giorgio, M., Mock, H. P., Matros, A., Peterek, S., Schijlen, E. G., Hall, R. D., Bovy, A. G., Luo, J. & Martin, C. (2008): Enrichment of tomato fruit with health-promoting anthocyanins by expression of select transcription factors. *Nat. Biotechnol.*, **26** (11): 1301–8.
- Chappell, J. (1995): Biochemistry and molecular biology of the isoprenoid biosynthetic pathway in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.*, **46**: 521–47.
- Clauss, M. J., Dietel, S., Schubert, G. & Mitchell-Olds, T. (2006): Glucosinolate and trichome defenses in a natural *Arabidopsis lyrata* population. *J. Chem. Ecol.*, **32** (11): 2351–73.
- Dayan, F. E., Hernandez, A., Allen, S. N., Moraes, R. M., Vroman, J. A., Avery, M. A. & Duke, S. O. (1995): Comparative phytotoxicity of artemisinin and several sesquiterpene analogues. *Phytochemistry*, **50** (4): 607–14.
- De Jong, M., Mariani, C. & Vriezen, W. H. (2009): The role of auxin and gibberellin in tomato fruit set. *J. Exp. Bot.*, **60** (5): 1523–32.
- De Moraes, C. M., Mescher, M. C. & Tumlinson, J. H. (2001): Caterpillar-induced nocturnal plant volatiles repel conspecific females. *Nature*, **410** (6828): 577–80.

- Dewick, P. M. (2002): The biosynthesis of c5-c25 terpenoid compounds. *Nat. Prod. Rep.*, **19** (2): 181–222.
- Dicke, M. (2009): Behavioural and community ecology of plants that cry for help. *Plant Cell Environ.*, **32** (6): 654–65.
- Disch, A., Schwender, J., Müller, C., Lichtenthaler, H. K. & Rohmer, M. (1998): Distribution of the mevalonate and glyceraldehyde phosphate/pyruvate pathways for isoprenoid biosynthesis in unicellular algae and the cyanobacterium *Synechocystis* pcc 6714. *Biochem. J.*, **333** (2): 381–8.
- Dobson, G., H. E. M.; Bergström (2000): The ecology and evolution of pollen odors. *Plant Syst. Evol.*, **222** (1): 63–87.
- Duchêne, E., Butterlin, G., Claudel, P., Dumas, V., Jaegli, N. & Merdinoglu, D. (2009): A grapevine (*Vitis vinifera* l.) deoxy-D-xylulose synthase gene colocalizes with a major quantitative trait loci for terpenol content. *Theor. Appl. Genet.*, **118** (3): 541–52.
- Dudareva, N., Andersson, S., Orlova, I., Gatto, N., Reichelt, M., Rhodes, D., Boland, W. & Gershenzon, J. (2005): The nonmevalonate pathway supports both monoterpene and sesquiterpene formation in snapdragon flowers. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **102** (3): 933–8.
- Duke, S. O., Canel, C., Rimando, A. M., Tellez, M. R., Duke, M. V. & Paul, R. N. (2000): Current and potential exploitation of plant glandular trichomes productivity. *Adv. Bot. Res.*, **31**: 121–51.
- Eccles, R. (1994): Menthol and related cooling compounds. *J. Pharm. Pharmacol.*, **46** (8): 618–30.
- Echeverrigaray, S., Michelim, L., Longaray Delamare, A. P., Andrade, C. P., Pinto da Costa, S. O. & Zacaria, J. (2008): The effect of monoterpenes on swarming differentiation and haemolysin activity in *Proteus mirabilis*. *Molecules*, **13** (12): 3107–16.
- Eisenreich, W., Rohdich, F. & Bacher, A. (2001): Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids. *Trends Plant Sci.*, **6** (2): 78–84.
- Enfissi, E. M. A., Fraser, P. D., Lois, L. M., Boronat, A., Schuch, W. & Bramley, P. M. (2005): Metabolic engineering of the mevalonate and non-mevalonate isopentenyl diphosphate-forming pathways for the production of health-promoting isoprenoids in tomato. *Plant Biotechnol. J.*, **3** (1): 17–27.
- Enserink, M. (2005): Infectious disease: Source of new hope against malaria is in short supply. *Science*, **307** (5706): 33.
- Esen, A. (1978): A simple method for quantitative, semiquantitative, and qualitative assay of proteins. *Anal Biochem*, **89**: 264–273.

- Estévez, J. M., Cantero, M., Romero, E., Kawaide, H., Jiménez, L., Kuzuyama, T., Seto, H., Kamiya, Y. & León, P. (2000): Analysis of the expression of *cla1*, a gene that encodes the 1-deoxyxylulose 5-phosphate synthase of the 2-*C*-methyl-D-erythritol-4-phosphate pathway in arabidopsis. *Plant Physiol.*, **124** (1): 95–104.
- Estévez, J. M., Cantero, A., A. and Reindl, Reichler, S. & León, P. (2001): 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, a limiting enzyme for plastidic isoprenoid biosynthesis in plants. *J. Biol. Chem.*, **276** (25): 22901–22909.
- Fahn, A. (2000): Structure and function of secretory cells. *Adv. Bot. Res.*, **31** (37-75).
- Fester, T., Hause, B., Schmidt, D., Halfmann, K., Schmidt, J., Wray, V., Hause, G. & Strack, D. (2002): Occurrence and localization of apocarotenoids in arbuscular mycorrhizal roots. *Plant Cell Physiol.*, **43** (3): 256–65.
- Flores-Pérez, U., Sauret-Güeto, S., Gas, E., Jarvis, P. & Rodríguez-Concepción, M. (2008): A mutant impaired in the production of plastome-encoded proteins uncovers a mechanism for the homeostasis of isoprenoid biosynthetic enzymes in arabidopsis plastids. *Plant Cell*, **20** (5): 1303–15.
- Floß, D. S., Hause, B., Lange, P. R., Küster, H., Strack, D. & Walter, M. H. (2008): Knock-down of the *mep* pathway isogene 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase 2 inhibits formation of arbuscular mycorrhiza-induced apocarotenoids, and abolishes normal expression of mycorrhiza-specific plant marker genes. *Plant J.*, **56** (1): 86–100.
- Fos, M., Nuez, F. & García-Martínez, J. L. (2000): The gene *pat-2*, which induces natural parthenocarpy, alters the gibberellin content in unpollinated tomato ovaries. *Plant Physiol.*, **22** (2): 471–80.
- Fraser, P. D., Enfissi, E. M., Halket, J. M., Truesdale, M. R., Yu, D., Gerrish, C. & Bramley, P. M. (2007): Manipulation of phytoene levels in tomato fruit: effects on isoprenoids, plastids, and intermediary metabolism. *Plant Cell*, **19** (10): 3194–211.
- Galpaz, N., Ronen, G., Khalfa, Z., Zamir, D. & Hirschberg, J. (2006): A chromoplast-specific carotenoid biosynthesis pathway is revealed by cloning of the tomato white-flower locus. *Plant Cell*, **18** (8): 1947–60.
- Gershenzon, J., McCaskill, D., Rajaonarivony, J. I., Mihaliak, C., Karp, F. & Croteau, R. (1992): Isolation of secretory cells from plant glandular trichomes and their use in biosynthetic studies of monoterpenes and other gland products. *Anal. Biochem.*, **200** (1): 130–8.
- Gershenzon, J. & Dudareva, N. (2007): The function of terpene natural products in the natural world. *Nat. Chem. Biol.*, **3** (7): 408–14.
- Giorio, G., Stigliani, A. & D'Ambrosio, C. (2008): Phytoene synthase genes in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) – new data on the structures, the deduced amino acid sequences and the expression patterns. *FEBS J.*, **275** (3): 527–535.

- Goldstein, J. L. & Brown, M. S. (1990): Regulation of the mevalonate pathway. *Nature*, **343** (6257): 425–30.
- Gordon, H. T. & Bauernfeind, J. C. (1982): Carotenoids as food colorants. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **18** (1): 59–97.
- Graebe, J. E. (1987): Gibberellin biosynthesis and control. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **38**: 419–65.
- Grant, S. G., Jessee, J., Bloom, F. R. & Hanahan, D. (1990): Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **87** (12): 4645–9.
- Gray, J. C. (1987): Control of isoprenoid biosynthesis in higher plants. *Adv. Bot. Res.*, **14**: 25–91.
- Guevara-Garcia, A., San Roman, C., Arroyo, A., Cortes, M., de la Luz Gutierrez-Nava, M. & Leon, P. (2005): Characterization of the arabidopsis *clb6* mutant illustrates the importance of posttranscriptional regulation of the methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway. *Plant Cell*, **17** (628-43).
- Guzmán, M. (2003): Cannabinoids: Potential anticancer agents. *Nature Rev.*, **3**: 745–55.
- Hallahan, D. L. (2000): Monoterpenoid biosynthesis in glandular trichomes of labiate plants. *Adv. Bot. Res.*, **31**: 77–120.
- Hampel, D., Mosandl, A. & Wüst, M. (2006): Biosynthesis of mono- and sesquiterpenes in strawberry fruits and foliage: ²H labeling studies. *J. Agric. Food Chem.*, **54** (4): 1473–8.
- Han, Y. S., Sabbioni, C., van der Heijden, R. & Verpoorte, R. (2003): High-performance liquid chromatography assay for 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase activity using fluorescence detection. *J. Chromatogr. A.*, **986** (2): 291–6.
- Hare, J. D., Elle, E. & van Dam, N. M. (2003): Costs of glandular trichomes in *Datura wrightii*: a three-year study. *Evolution*, **57** (4): 793–805.
- Hause, B., Demus, U., Teichmann, C., Parthier, B. & Wasternack, C. (1996): Developmental and tissue-specific expression of *JIP-23*, a jasmonate-inducible protein of barley. *Plant Cell Physiol.*, **37** (5): 641–9.
- Hemmerlin, A., Hoeffler, J.-F., Meyer, O., Tritsch, D., Kagan, I. A., Grosdemange-Billiard, C., Rohmer, M. & Bach, T. J. (2003): Cross-talk between the cytosolic mevalonate and the plastidial methylerythritol phosphate pathways in tobacco bright yellow-2 cells. *J. Biol. Chem.*, **278** (29): 26666–26676.
- Heslop-Harrison, J. & Heslop-Harrison, Y. (1970): Evaluation of pollen viability by enzymically induced fluorescence; intracellular hydrolysis of fluorescein diacetate. *Stain Technol.*, **45**: 115–20.
- Hewitt, E. (1966): Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. *Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal, Bucks, UK*.

- Higo, K., Ugawa, Y., Iwamoto, M. & Korenaga, T. (1999): Plant *cis*-acting regulatory dna elements (place) database:1999. *Nucleic Acids Res.*, **27** (1): 297–300.
- Hiller, H., E.; Gerhartz (1984): New aspects in the antiemetic therapy of cytostatic drug-induced vomiting. *Klin. Wochenschr.*, **62** (10): 441–5.
- Holsters, M., Silva, B., Van Vliet, F., Genetello, C., De Block, M., Dhaese, P., Depicker, A., Inzé, D., Engler, G., Villarroel, R. & et al. (1980): The functional organization of the nopaline *A. tumefaciens* plasmid ptic58. *Plasmid*, **3** (2): 212–30.
- Ijima, Y., Davidovich-Rikanati, R., Fridman, E., Gang, D. R., Bar, E., Lewinsohn, E. & Pichersky, E. (2004): The biochemical and molecular basis for the divergent patterns in the biosynthesis of terpenes and phenylpropenes in the peltate glands of three cultivars of basil. *Plant Physiol.*, **136** (3): 3724–36.
- Julliard, J. H. & Douce, R. (1991): Biosynthesis of the thiazole moiety of thiamin (vitamin b1) in higher plant chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **88** (6): 2042–5.
- Jux, A., Gleixner, G. & Boland, W. (2001): Classification of terpenoids according to the methylerythritolphosphate or the mevalonate pathway with natural ¹²c/¹³c isotope ratios: dynamic allocation of resources in induced plants. *Angew. Chem.*, **40** (11): 2091–4.
- Khemvong, S. & Suvachittanont, W. (2005): Molecular cloning and expression of a cDNA encoding 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase from oil palm *Elaeis guineensis* jacq. *Plant Sci.*, **169** (3): 571–8.
- Kim, B. R., Kim, S. U. & Chang, Y. (2005a): Differential expression of three *1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase* genes in rice. *Biotechnol. Lett.*, **27** (14): 997–1001.
- Kim, S.-Y., Kuzuyama, T., Chang, Y.-J. & Kim, S.-U. (2005b): Functional identification of *Ginkgo biloba* 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate synthase (dxs) gene by using *Escherichia coli* disruptants defective in *DXS* gene. *Agric. Chem. Biotechnol.*, **48** (2): 101–4.
- Kim, S. M., Kim, Y. B., Kuzuyama, T. & Kim, S. U. (2008a): Two copies of 4-(cytidine 5'-diphospho)-2-*C*-methyl-D-erythritol kinase (cmk) gene in *Ginkgo biloba*: molecular cloning and functional characterization. *Planta*, **228** (6): 941–50.
- Kim, S. M., Kuzuyama, T., Kobayashi, A., Sando, T., Chang, Y. J. & Kim, S. U. (2008b): 1-hydroxy-2-methyl-2-*E*-butenyl 4-diphosphate reductase (ids) is encoded by multicopy genes in gymnosperms *Ginkgo biloba* and *Pinus taeda*. *Planta*, **227** (2): 287–98.
- Kim, Y. B., Kim, S. M., Kang, M. K., Kuzuyama, T., Lee, J. K., Park, S. C., Shin, S. C. & Kim, S. U. (2009): Regulation of resin acid synthesis in *Pinus densiflora* by differential transcription of genes encoding multiple 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase and 1-hydroxy-2-methyl-2-*E*-butenyl 4-diphosphate reductase genes. *Tree Physiol.*, **29** (5): 737–49.
- Klayman, D. L. (1985): Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from china. *Science*, **228** (4703): 1049–55.

- Klimyuk, V., Carroll, B. J., Thomas, C. M. & Jones, J. D. (1993): Alkali treatment for rapid preparation of plant material for reliable pcr analysis. *Plant J.*, **3** (3): 493–4.
- Kobayashi, S., Asai, T., Fujimoto, Y. & Kohshima, S. (2008): Anti-herbivore structures of *Paulownia tomentosa*: morphology, distribution, chemical constituents and changes during shoot and leaf development. *Ann. Bot. (Lond)*, **101** (7): 1035–47.
- Koncz, C. & Schell, J. (1986): The promoter of t1-dna gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol. Gen. Genet.*, **204**: 383–96.
- Konstantopoulou, M. A., Krokos, F. D. & Mazomenos, B. E. (2002): Chemical stimuli from corn plants affect host selection and oviposition behavior of *Sesamia nonagrioides* (lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.*, **95** (6): 1289–93.
- Kotan, R., Kordali, S. & Cakir, A. (2007): Screening of antibacterial activities of twenty-one oxygenated monoterpenes. *Z. Naturforsch. C.*, **62** (7-8): 507–13.
- Lange, B. M., Wildung, M. R., McCaskill, D. & Croteau, R. (1998): A family of transketolases that directs isoprenoid biosynthesis via a mevalonate-independent pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **95** (5): 2100–2104.
- Lange, B. M. & Ghassemian, M. (2003): Genome organization in *Arabidopsis thaliana*: a survey for genes involved in isoprenoid and chlorophyll metabolism. *Plant Mol. Biol.*, **51** (6): 925–48.
- Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S. & Thornton, J. M. (1993): Procheck: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.*, **26**: 283–91.
- Laue, G., Preston, C. A. & Baldwin, I. T. (2000): Fast track to the trichome: induction of n-acyl nornicotines precedes nicotine induction in *Nicotiana repanda*. *Planta*, **210**: 510–4.
- Laule, O., Fürholz, A., Chang, H., Zhu, T., Wang, X., Heifetz, P., Gruißem, W. & Lange, M. (2003): Crosstalk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **100** (11): 6866–71.
- Lee, J. J., Woodward, A. W. & Chen, Z. J. (2007): Gene expression changes and early events in cotton fibre development. *Ann. Bot.*, **100** (7): 1391–401.
- Li, L., Zhao, Y., McCaig, B. C., Wingerd, B. A., Wang, J., Whalon, M. E., Pichersky, E. & Howe, G. A. (2004): The tomato homolog of coronatine-insensitivel is required for the maternal control of seed maturation, jasmonate-signaled defense responses, and glandular trichome development. *Plant Cell*, **16** (1): 126–143.
- Li, F., Vallabhaneni, R., Yu, J., Rocheford, T. & Wurtzel, E. T. (2008): The maize phytoene synthase gene family: overlapping roles for carotenogenesis in endosperm, photomorphogenesis, and thermal stress tolerance. *Plant Physiol.*, **147** (3): 1334–46.
- Lichtenthaler, H. K., Schwender, J., Seemann, M. & Rohmer, M. (1995): Carotenoid biosynthesis in green alga proceeds via a novel biosynthetic pathway. -. *Photosynthesis*, **4**: 115–118.

- Lichtenthaler, H. K., Rohmer, M. & Schwender, J. (1997): Two independent biochemical pathways for isopentenyl diphosphate biosynthesis in higher plants. *Physiol. Plant.*, **101** (3): 643–652.
- Lin, Q., Hamilton, W. & Merryweather, A. (1996): Cloning and initial characterization of 14 myb-related cdnas from tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. ailsa craig). *Plant Mol. Biol.*, **30** (5): 1009–20.
- Lois, L. M., Campos, N., Putra, S. R., Danielsen, K., Rohmer, M. & Boronat, A. (1998): Cloning and characterization of a gene from *Escherichia coli* encoding a transketolase-like enzyme that catalyzes the synthesis of D-1-deoxyxylulose 5-phosphate, a common precursor for isoprenoid, thiamin, and pyridoxol biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **95** (5): 2105–2110.
- Lois, L. M., Rodríguez-Concepción, M., Gallego, F., Campos, N. & Boronat, A. (2000): Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: regulatory role of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase. *Plant J.*, **22** (6): 503–13.
- Luckwill, L. (1943): The genus *Lycopersicon*. an historical, biological, and taxonomic survey of the wild and cultivated tomatoes. *Aberdeen Univ. Studies*, **120**: 1–44.
- Lynen, U., F.; Henning (1960): Über den biologischen weg zum naturkautschuk. *Angew. Chem.*, **72**: 820–9.
- Mahmoud, S. S. & Croteau, R. B. (2002): Strategies for transgenic manipulation of monoterpene biosynthesis in plants. *Trends Plant Sci.*, **7** (8): 366–73.
- Maluf, W. R., Inoue, I. F., de Paula Duarte Ferreira, R., Gomes, L. A. A., de Castro, E. M. & das Graças Cardoso, M. (2007): Higher glandular trichome density in tomato leaflets and repellence to spider mites. *Pesq agropec. bras.*, **42** (9): 1227–35.
- Mandel, M. A., Feldmann, K. A., Herrera-Estrella, L., Rocha-Sosa, M. & León, P. (1996): *CLA1*, a novel gene required for chloroplast development, is highly conserved in evolution. *Plant J.*, **9** (5): 649–58.
- McBride, K. E. & Summerfelt, K. R. (1990): Improved binary vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Plant Mol. Biol.*, **14** (2): 269–76.
- McCaskill, D. & Croteau, R. (1995): Monoterpene and sesquiterpene biosynthesis in glandular trichomes of peppermint (*Mentha x piperita*) rely exclusively on plastid-derived isopentenyl diphosphate. *Planta*, **197** (1): 49–56.
- McConkey, M. E., Gershenzon, J. & Croteau, R. B. (2000): Developmental regulation of monoterpene biosynthesis in the glandular trichomes of peppermint. *Plant Physiol.*, **122** (1): 215–24.
- McGarvey, M. J. & Croteau, R. (1995): Terpenoid metabolism. *Plant J.*, **7**: 1015–26.

- Meyer, Y., Grosset, J., Chartier, Y. & Cleyet-Marel, J. C. (1988): Preparation by two-dimensional electrophoresis of proteins for antibody production: Antibodies against proteins whose synthesis is reduced by auxin in tobacco mesophyll protoplasts. *Electrophoresis*, **9** (11): 704–12.
- Miller, B., Heuser, T. & Zimmer, W. (1999): A *Synechococcus leopoliensis* saug 1402-1 operon harboring the 1-deoxyxylulose 5-phosphate synthase gene and two additional open reading frames is functionally involved in the dimethylallyl diphosphate synthesis. *FEBS Lett.*, **460** (3): 485–90.
- Munoz-Bertomeu, J., Arrillaga, I., Ros, R. & Segura, J. (2006): Up-regulation of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase enhances production of essential oils in transgenic spike lavender. *Plant Physiol.*, **142** (3): 890–900.
- Nes, W. D. & Venkatramesh, M. (1999): Enzymology of phytosterol transformations. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **34** (2): 81–93.
- Nitsch, L. M. C., Oplaat, C., Feron, R., Ma, Q., Wolters-Arts, M., Hedden, P., Mariani, C. & Vriezen, W. H. (2009): Abscisic acid levels in tomato ovaries are regulated by lenced1 and sicyp707a1. *Planta*, **229** (6): 1335–46.
- Okada, K., Saito, T., Nakagawa, T., Kawamukai, M. & Kamiya, Y. (2000): Five geranylgeranyl diphosphate synthases expressed in different organs are localized into three subcellular compartments in arabidopsis. *Plant Physiol.*, **122** (4): 1045–56.
- Olimpieri, I., Siligato, F., Caccia, R., Mariotti, L., Ceccarelli, N., Soressi, G. & Mazzucato, A. (2007): Tomato fruit set driven by pollination or by the parthenocarpic fruit allele are mediated by transcriptionally regulated gibberellin biosynthesis. *Planta*, **226** (4): 877–88.
- Pfaffl, M. W. (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time rt-pcr. *Nucleic Acids Res.*, **29** (9).
- Phillips, M. A., Walter, M. H., Ralph, S. G., Dabrowska, P., Luck, K., Urós, E. M., Boland, W., Strack, D., Rodríguez-Concepción, M., Bohlmann, J. & Gershenzon, J. (2007): Functional identification and differential expression of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase in induced terpenoid resin formation of norway spruce (*Picea abies*). *Plant Mol. Biol.*, **65** (3): 243–57.
- Pichersky, E. & Gershenzon, J. (2002): The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **5** (3): 237–43.
- Piel, J., Donath, J., Bandemer, K. & Boland, W. (1998): Mevalonate-independent biosynthesis of terpenoid volatiles in plants: induced and constitutive emission of volatiles. *Angew. Chem.*, **37**: 2478–81.
- Prashar, A., Locke, I. C. & Evans, C. S. (2004): Cytotoxicity of lavender oil and its major components to human skin cells. *Cell Prolif.*, **37** (221-9).

- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A. & Dubourdiou, D. (2000): *The chemistry of wine: stabilization and treatments*, volume 2. Wiley J and Sons Ltd.
- Rodríguez-Concepción, M. & Boronat, A. (2002): Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. a metabolic milestone achieved through genomics. *Plant Physiol.*, **130**: 1079–89.
- Rodriguez-Concepcion, M. (2006): Early steps in isoprenoid biosynthesis: Multilevel regulation of the supply of common precursors in plant cells. *Phytochemistry Rev.*, **5**: 1–15.
- Roeder, S., Hartmann, A., Effmert, U. & Piechulla, B. (2007): Regulation of simultaneous synthesis of floral scent terpenoids by the 1,8-cineole synthase of *Nicotiana suaveolens*. *Plant Mol. Biol.*, **65** (1-2): 107–24.
- Rohmer, M., Knani, M., Simonin, P., Sutter, B. & Sahn, H. (1993): Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochem. J.*, **295**: 517–24.
- Rombauts, S., D'hais, P., Van Montagu, M. & Rouz, P. (1999): Plantcare, a plant *cis*-acting regulatory element database. *Nucleic Acids Res.*, **27** (1): 295–6.
- Runyon, J. B., Mescher, M. C. & De Moraes, C. M. (2006): Volatile chemical cues guide host location and host selection by parasitic plants. *Science*, **313** (5795): 1964–7.
- Ruzicka, L. (1953): The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds. *Experientia*, **9** (357-96).
- Sacchettini, J. C. & Poulter, C. D. (1997): Creating isoprenoid diversity. *Science*, **277** (5333): 1788–9.
- Sanchez-Hernandez, C., Lopez, M. G. & Delano-Frier, J. P. (2006): Reduced levels of volatile emissions in jasmonate-deficient *spr2* tomato mutants favour oviposition by insect herbivores. *Plant Cell Environ.*, **29** (4): 546–557.
- Sando, T., Takeno, S., Watanabe, N., Okumoto, H., Kuzuyama, T., Yamashita, A., Hattori, M., Ogasawara, N., Fukusaki, E. & Kobayashi, A. (2008): Cloning and characterization of the 2-*C*-methyl-D-erythritol 4-phosphate (mep) pathway genes of a natural-rubber producing plant, *Hevea brasiliensis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **72** (11): 2903–17.
- Sastry, K. K. S. & Muir, R. M. (1963): Gibberellin: Effect on diffusible auxin in fruit development. *Science*, **140** (3566): 494–4.
- Sauret-Güeto, S., Urós, E., Ibáñez, E., Boronat, A. & Rodríguez-Concepción, M. (2006): A mutant pyruvate dehydrogenase e1 subunit allows survival of *Escherichia coli* strains defective in 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase. *FEBS Lett.*, **580** (736-40).
- Schaarschmidt, S., Qu, N., Strack, D., Sonnewald, U. & Hause, B. (2004): Local induction of the alc gene switch in transgenic tobacco plants by acetaldehyde. *Plant Cell. Physiol.*, **45** (11): 1566–77.

- Schäfer, U. (2005): Isolierung und funktionelle charakterisierung eines an der trichomentwicklung beteiligten myb-transkriptionsfaktors aus *Nicotiana benthamiana*. Ph.D. thesis, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Schiff, P. B., Fant, J. & Horwitz, S. B. (1979): Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature*, **277** (5698): 665–7.
- Schillmiller, A. L., Last, R. L. & Pichersky, E. (2008): Harnessing plant trichome biochemistry for the production of useful compounds. *Plant J.*, **54** (4): 702–11.
- Schliemann, W., Ammer, C. & Strack, D. (2008): Metabolite profiling of mycorrhizal roots of *Medicago truncatula*. *Phytochemistry*, **69** (1): 112–46.
- Schwender, J., Zeidler, J., Gröner, R., Müller, C., Focke, M., Braun, S., Lichtenthaler, F. W. & Lichtenthaler, H. K. (1997): Incorporation of 1-deoxy-D-xylulose into isoprene and phytol by higher plants and algae. *FEBS Lett.*, **414** (1): 129–34.
- Shuttleworth, A. & Johnson, S. D. (2009): A key role for floral scent in a wasp-pollination system in *Eucomis* (hyacinthaceae). *Ann. Bot. (Lond)*, **103** (5): 715–25.
- Simmons, A. T., Gurr, G. M., McGrath, D., Nicol, H. I. & Martin, P. M. (2003): Trichomes of *Lycopersicon* spp. and their effect on *Myzus persicae* (sulzer) (hemiptera: Aphididae). *Austral. J. Entomol.*, **42** (4): 373–378.
- Singh, D. P., Jermakow, A. M. & Swain, S. M. (2002): Gibberellins are required for seed development and pollen tube growth in arabidopsis. *Plant Cell*, **14** (12): 3133–47.
- Sippl, M. J. (1990): Calculation of conformational ensembles from potentials of mean force — an approach to the knowledge based prediction of local structures in globular proteins. *J. Mol. Biol.*, **213** (4): 859–83.
- Sitte, P., Ziegler, H., Ehrendorfer, F. & Bresinsky, A. (1998): *Lehrbuch der Botanik*. Gustav Fischer Verlag, 34th edition.
- Skiryycz, A., Jozefczuk, S., Stobiecki, M., Muth, D., Zanol, M., Witt, I. & Mueller-Roeber, B. (2007): Transcription factor atdof4-2 affects phenylpropanoid metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol.*, **175** (3): 425–38.
- Skorupinska-Tudek, K., Poznanski, J., Wojcik, J., Bienkowski, T., Szostkiewicz, I., Zelman-Femiak, M., Bajda, A., Chojnacki, T., Iaszowska, O., Grunler, J., Meyer, O., Rohmer, M., Danikiewicz, W. & Swiezewska, E. (2008): Contribution of the mevalonate and methylerythritol phosphate pathways to the biosynthesis of dolichols in plants. *J. Biol. Chem.*, **283** (30): 21024–35.
- Smart, E. M., R. G.; Adlaf (1982): Adverse reactions and seeking medical treatment among student cannabis users. *Drug and Alcohol Dependence*, **9** (3): 201–11.

- Sprenger, G. A., Schörken, U., Wiegert, T., Grolle, S., de Graaf, A., Taylor, S. V., Begley, T. P., Bringer-Meyer, S. & Sahm, H. (1997): Identification of a thiamin-dependent synthase in *Escherichia coli* required for the formation of the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate precursor to isoprenoids, thiamin, and pyridoxol. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **94**: 12857–62.
- Suzuki, M., Nakagawa, S., Kamide, Y., Kobayashi, K., Ohyama, K., Hashinokuchi, H., Kiuchi, R., Saito, K., Muranaka, T. & Nagata, N. (2009): Complete blockage of the mevalonate pathway results in male gametophyte lethality. *J. Exp. Bot.*, **60** (7): 2055–64.
- Swain, S. M., Singh, D. P., Helliwell, C. A. & Poole, A. T. (2005): Plants with increased expression of ent-kaurene oxidase are resistant to chemical inhibitors of this gibberellin biosynthesis enzyme. *Plant Cell Physiol.*, **46** (2): 284–91.
- Threlfall, D. R., Griffiths, W. T. & Goodwin, T. W. (1967): Biosynthesis of the prenyl side chains of plastoquinone and related compounds in maize and barley shoots. *Biochem. J.*, **103** (3): 831–51.
- Tretner, C., Huth, U. & Hause, B. (2008): Mechanostimulation of *Medicago truncatula* leads to enhanced levels of jasmonic acid. *J. Exp. Bot.*, **59** (10): 2847–56.
- Turlings, T. C., Loughrin, J. H., McCall, P. J., Röse, U. S., Lewis, W. J. & Tumlinson, J. H. (1995): How caterpillar-damaged plants protect themselves by attracting parasitic wasps. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **92** (10): 4169–74.
- Turner, G., Gershenzon, J., Nielson, E. E., Froehlich, J. E. & Croteau, R. (1999): Limonene synthase, the enzyme responsible for monoterpene biosynthesis in peppermint, is localized to leucoplasts of oil gland secretory cells. *Plant Physiol.*, **120** (3): 879–886.
- Vriezen, W. H., Feron, R., Maretto, F., Keijman, J. & Mariani, C. (2008): Changes in tomato ovary transcriptome demonstrate complex hormonal regulation of fruit set. *New Phytol.*, **177** (1): 60–76.
- Walker, M. D., A. R.; Marks (2000): Trichome initiation in arabidopsis. *Adv. Bot. Res.*, **31**: 219–236.
- Walter, M. H., Hans, J. & Strack, D. (2002): Two distantly related genes encoding 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthases: differential regulation in shoots and apocarotenoid-accumulating mycorrhizal roots. *Plant J.*, **31** (3): 243–254.
- Wang, G., Tan, L., Aziz, ., N., Broun, P., Dai, X., He, J., King, A., Zhao, P. X. & Dixon, R. A. (2008): Terpene biosynthesis in glandular trichomes of hop. *Plant Physiol.*, **148** (3): 1254–66.
- Werker, E. (2000): Trichome diversity and development. *Adv. Bot. Res.*, **31**: 1–35.
- Werner, R. A. & Brand, W. A. (2001): Referencing strategies and techniques in stable isotope ratio analysis. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **15** (7): 501–19.

- Wesley, S. V., Helliwell, C. A., Smith, N. A., Wang, M. B., Rouse, D. T., Liu, Q., Gooding, P. S., Singh, S. P., Abbott, D., Stoutjesdijk, P. A., Robinson, S. P., Gleave, A. P., Green, A. G. & Waterhouse, P. M. (2001): Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant J.*, **27** (6): 581–90.
- Wille, A., Zimmermann, P., Vranová, E., Fürholz, A., Laule, O., Bleuler, S., Hennig, L., Prelic, A., von Rohr, P., Thiele, L., Zitzler, E., Gruissem, W. & Bühlmann, P. (2004): Sparse graphical gaussian modeling of the isoprenoid gene network in *Arabidopsis thaliana*. *Genome Biol.*, **5** (11): R92.
- Wiss, O. & Gloor, U. (1969): Nature and distribution of terpene quinones. *Biochem. J.*, **113** (3): 21P.
- Withers, S. T. & Keasling, J. D. (2007): Biosynthesis and engineering of isoprenoid small molecules. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **73**: 980–90.
- Wu, J., Qin, Y. & Zhao, J. (2008): Pollen tube growth is affected by exogenous hormones and correlated with hormone changes in styles in *Torenia fournieri* l. *J. Plant Growth Reg.*, **55**: 137–48.
- Xiang, S., Usunow, G., Lange, G., Busch, M. & Tong, L. (2007): Crystal structure of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase, a crucial enzyme for isoprenoids biosynthesis. *J. Biol. Chem.*, **282** (4): 2676–2682.
- Zhang, M., Li, K., Zhang, C., Gai, J. & Yu, D. (2009): Identification and characterization of class 1 dxs gene encoding 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, the first committed enzyme of the mep pathway from soybean. *Mol. Biol. Rep.*, **36** (5): 879–87.
- Zhang, P. Y., Chen, K. S., He, P. Q., Liu, S. H. & Jiang, W. F. (2008): Effects of crop development on the emission of volatiles in leaves of *Lycopersicon esculentum* and its inhibitory activity to *Botrytis cinerea* and *Fusarium oxysporum*. *J. Integr. Plant. Biol.*, **50** (1): 84–91.
- Zhu, X., Suzuki, K., Saito, T., Okada, K., Tanaka, K., Nakagawa, T., Matsuda, H. & Kawamukai, M. (1997): Geranylgeranyl pyrophosphate synthase encoded by the newly isolated gene *GGPS6* from *Arabidopsis thaliana* is localized in mitochondria. *Plant Mol. Biol.*, **35** (3): 331–341.
- Ziegler, J., Stenzel, I., Hause, B., Maucher, H., Hamberg, M., Grimm, R., Ganai, M. & Wasternack, C. (2000): Molecular cloning of allene oxide cyclase. the enzyme establishing the stereochemistry of octadecanoids and jasmonates. *J. Biol. Chem.*, **275** (25): 19132–8.

A Anhang

Der Vergleich der Aminosäuresequenzen der SIDXS1 und SIDXS2 ist in Abbildung A.1 dargestellt und gekennzeichnet die Peptide, welche zur Generierung der Isoformspezifischen Antikörper ebenso wie das putative Signalpeptid.

Abbildung A.1: Vergleich der Aminosäuresequenzen beider *SIDXS*-Proteine. Die putative Grenze zwischen Signalpeptid ist eingezeichnet (schwarze Linie), ebenso wie die zur Generierung der Isoenzym-spezifischen Antikörper verwendeten Peptide (grau unterstrichen)

```
pLeDXS1      1 malcayafpgilnrtgvvsdss-katplfsgwihgtdlqflfqhklthevkkrsrvvqaslsesge--yytqrpptpildtvnypihmknlsikelkqla
pLeDXS2      1 mavss----gtvfrinqhpsppmktprfyfnf---tkkkflvkasvngsdeingkiwfkkekqlqidfsgkepfpfldtinypkhmknlskmdleqla

pLeDXS1     98 delrsdtifnvsktgghlgsslgvveltvahyvfnapqdrilwdvghqsypkhiltgrrdkmstlrqtdglagftrkseseydcfgtghssttisaglg
pLeDXS2     94 aeiraeivsvaktgghlssslgvvdltvahhvfdtpedkiiwdvghqayahkiltgrrskmhtmrktsglapfprkdesvhdaifgaghssttisaglg

pLeDXS1    198 mavgrdlkgrnnnviavigdgamtggayeamnagylsdsmivilndnrqvsiptatldgppavpvalssalsrlqsnrplrelrevakgvtkkigppm
pLeDXS2    194 mavardllgnnhvisviggdamtggayeamnagfldsnlivilndnkqvsiptatldgppatpvalssalsklqaslkrqlreaaktitkqigppa

pLeDXS1    298 helaakvdeyargmlsagstlfeelglyyigpvdghnidliailkevrtkttgppvlihvtekgryppyaeraadkyhgvakfdpatgkqfkasakt
pLeDXS2    294 hevaakvdeyargmlsagstlfeelglyyigpvdghnidlitilekvkalpaggpvlihiytekkgylpaeaaddkmhgvacfdpktgkqfkakspt

pLeDXS1    398 qsyttfyaelialaeaeadkdivaihaamgggtgmnlfhrfptrcfdvgiaeqhvtfaaglacegikpfcaiyssfmqraydqvvhdvdlqklpvrfam
pLeDXS2    394 lcytryfaeslikeaendnkivaihaamgggtglnyfqkqfpercfdvgiaeqhvtfaaglategikpfcaiyssflqrgydvvhdvdlqklpvrfam

pLeDXS1    498 draglvgadgpthcgafdvtymacipnmvmapsdeaelhmhvataaaaddrpscfrfprngngigvelpagnkgiplevgkgriliegervailgygsav
pLeDXS2    494 draglvgadgpthcgafdvtymacipnmvmapsdeaelhmhvataaaaddrpscfrfprngngigailpnnkgipievkgriliegervailgygsii

pLeDXS1    598 qncldaavilesrglqvtvadarfckpldhalirslakshevilitveegsigggfshvqfmaldglldgklkwrpivlpdryidhgsppvdqlaeagltp
pLeDXS2    594 qqclgaadilnshdirvtvadarfckpldadlirslakeheilitleveegsigggfshvshflslnsilddgplkirsmlpdrdyidhgsppvdqlaeagls

pLeDXS1    698 shiaatvfnilgqtrealvmt
pLeDXS2    694 rhisvtvltllgrpkeamvvn-
```

Nukleotidsequenzen der *SIDX1* und *SIDX2* sind im Vergleich in Abbildung A.2 dargestellt. Es sind der kodierende Bereich, sowie der zur Generierung der *SIDX2*-RNAi-Pflanzen verwendete Bereich eingezeichnet.

Abbildung A.2: Nukleotidsequenz beider *SIDX*-Gene im Vergleich. Der offene Leserahmen ist gekennzeichnet. Der Bereich der zur spezifischen Suppression der *SIDX2*-Transkriptmengen genutzt wurde, ist unterstrichen.



Die Sequenzen stromaufwärts des ATGs, die mittels 'Genome Walking' identifiziert wurden:

SIDX1-Promotor:

ACTTTGGGTGTGCATAAGTAGACACTTCAACTTGTATA AAATTAACAAA
TAAACACATATGTCCTATATGTCATCC TACATGTCATTTTTTGTCCCTACGT
GGTGTACATACATGTAATTTGCCATATAGGACTCATTTATTTATTTAAAAGT
TGGATAGTTAAAGTGACTGTTTGTTTCATTGTGAAAGTTTGATGTTAAAGT
TAAAATTTGAAGTCAAGTTTAGGTTCAATATATGCATTATGAAAATTTTAA
ATTTTCGTGATCAAATGAGAATTTAATCACAAATTTTAAAAAAATTATTTTA
ATATTTATTTGATCATAAAATTTATCATTCAAATATTTCTGAGTCAAAAAT
ATTTTTTGATACTTTTCGCTTATATAACTTTAATTTATTTTCTAAATATATAA
TTTTAAATTTAAAATCTCTGATCAAACGAAAGCCAAAATTGAAAGGTGAA
AAAGATTGTTTAAAGAAAAAAAAAAAAAGAAGGTGACACAACCCCTCCATTT
TTTCCTTCCCAATAAACAAAAAATAAATAAATATATAAATCCATTATCATCT
TTCTATCTAAATGTGATTTCTGCTGACGTGGCCCAATAGAAAGTAGTGAC
CTTTTTTAAGATTTGAGTTTCATATTCCTAGCTAAATACAATGCTTATATAA
ATATATATATGTACATATTCATACAAGGTACCTTCACATTCCTCCACATTG
GATCAACACCATTTGATCCTTTTTATCAAAGATTCATTTTTTTTTTCACTT
ACCCTCCAATTACATCTTCATAAACACATTTTAGTGACAGTAGCACCAAC
ACACCCCACTAGAATTTTCTTGAAGTAAACCCCTTTTTTCAAGAATCAAG
AAACCACTTATAAAATTTGTGGGTTTTTCATTGAAACAAAGGA AAAAAAA
CAGTTGAATTGACTAATC

SLDXS2-Promotor:

GGAGGGTCATCCTAACTTATTTTCAGCACATAAAAAATTGAATTAGTATATA
ATTCAAATTGATCTATGACTATTAATAAAAAATACATTTAGCGATAAAATTT
TTTTATAGCTAAACAATAAATTTTCGTTGTTAAACCTACTTAGCGACGAATT
AGCGATTGATTTTTGTCTTCAACGAACAAAACAACAACAATCAGTGACG
AGATCGTTGCTAAATGTAGTTTTTTTTTAGTAGTATATATATTATATATATAAC
TTGTCAATTTTTTTTAAAAAAGATATTTTTTTGTTAAAATTTGATAATATT
AAATGTAGTCATGATATAGAAAAGGTTATCAAATTTATTTTTGATATGTTA
TGTATAGTAATAATTTAAAAAGTAATTTTATTAGATACTCTACTATATAAAA
AAAAATAAACAAATTGAAACCTAGTAAGAATTGACAATTTATGTTGTCAT
CTATATTTTAATGCATTTCCATCAAATATTTTTTTGATAGAATTACAATTC
ACATTTTTTATTATCTTAATTTATTTTGACCCGATCAAATTCAAATTAATCT
TTTCCATTAATACTCTACTTAAATATTTTCTATAATTGATATAAGAGTTGT
TTGAATTGAATTTGATCCATATTTTAGCTTTTATCACTCAAACATTATTT
TAGACAAAATAATAACTCATATATTTATTGTTTTTTGAATTTATGTTTGACT
GTTTAAATTCAGGTTAACCTTTTCATTTAACAGTATTTAAATTTACTCTAC
AATTGATATAAAAATTTATCAGAAAAATAAATATTTCACTTTGATTTAAA
GCTTATAGATTCGAAATGACAAAAAATAAAATGGAATTTCTTTGTA
GTGTTAAAAATAAGTAAATTAATTACCATGTTGAGAATATAGACAATTT
ATCATTTTGGGAATTGATATTTTTTCTATTTTTATTTAAGGAAGTTGCT
ACTCTTTCTTGTGTTGTAATAAATTATGTCCCCCTTTTCTCTTCTTGT
GTCTAAAAATAATTGAACAACCTGTTTCATTTTCTCTCTGAGTAAAATTTTT
CATACAAA

Die detaillierte Auflistung der putativen *cis*-regulatorischen Elemente, die durch Analyse eines etwa 1 kb großen Bereiches stromaufwärts des ATGs mittels der Software PLACE und PlantCARE identifiziert wurden, sind in den folgenden Tabellen dargestellt.

Tabelle A.1: *cis*-regulatorische Elemente mit putativer gewebespezifische Nutzung

	sequence	SIDXS1			SIDXS2			MIDXS2-1			Bemerkung
		Anz	(+)	(-)	Anz	(+)	(-)	Anz	(+)	(-)	
tissue- or organell specific	AAAGAT	3	2	1	2	1	1				root, nodulation
	ACACNNG	1	0	1	1	0	1	1	0	1	embryo
	AGAAA	9	3	6	7	2	5	2	2	0	pollen, tomato
	ATAGAA	2	1	1	4	2	2				plastids
	ATATT	12	5	7	16	11	5	15	8	7	root
	ATATTTAWW	3	1	2	2	1	1	2	0	2	seeds, soybean
	CANNTG	10	5	5	2	1	1	6	3	3	seeds, Brassica napus
	CNGTTR	1	1	0	1	0	1	2	2	0	myb, flavonoid biosynthesis in petunia petal epidermis; (water stress in A.th.)
	GTGA	10	7	3	4	1	3	5	2	3	pollen, tobacco
	RTTTTTR	1	0	1	7	5	2	5	0	5	seeds, soybean
	TGACT	4	2	2	3	2	1	3	2	1	endosperm
	TGHAAARK	1	1	0	2	0	2	0	1	1	endosperm
	AACAAC	1	0	1							endosperm
	AACCCA	1	0	1							seeds, soybean
	CNAACAC	1	1	0				1	1	0	embryo, endosperm
	KCACGW	1	0	1							root (root hairs)
	TGACGT	1	1	0							cotyledons
	TGAGTCA	1	1	0							endosperm
	TGTTAAGT	1	1	0							seeds, pea
	ATGGTA				1	0	1				plastid
	CTCTT				3	2	1	5	3	2	root, nodulation
	CWWWWWWWWG				2	1	1	4	2	2	embryo
	SCGAYNRNNNNNNN NNNNNNNNHD				3	3	0				plastid
	TAAATGYA				3	2	1				trichome, cotton
	TATTCT				1	0	1				chloroplast
	TTAATGG				1	0	1				root
	CCWACC							1	0	1	maize MYB flower

Tabelle A.2: putative Licht-regulierte *cis*-regulatorische Elemente, die mit Hilfe der PLACE- und PlantCARE-Software identifiziert wurden.

	sequence	SIDXS1			SIDXS2			MIDXS2			Bemerkung
		Anz	(+)	(-)	Anz	(+)	(-)	Anz	(+)	(-)	
light	CAANNNNATC	1	1	0	2	2	0				circadian expression, tomato
	GATA	6	2	4	15	10	5				GATABOX
	GATAA	3	0	3	7	2	5	4	4	0	IBOXCORE
	GRWAAW	12	5	7	16	3	13				GT1CONSENSUS
	YTCANTYY	2	1	1	5	2	3				INRNTPSADB
	AAMAATCT	1	0	1							phytochrome
	ACGT	4	2	2							etiollation induced expression
	ACGTGGC	1	1	0							BOXIIPCCHS
	ACTTTG	1	1	0							TBOXATGAPB
	GCCAC	1	0	1							SORLIP1AT
	GGGCC	1	0	1							SORLIP2AT
	GATAAGR							2	2	0	IBOXCORENT

Tabelle A.3: putative *cis*-regulatorische Elemente, die möglicherweise bei Abwehr-, Wund- und Phytohormon-Antwort eine Rolle spielen. Diese Motive wurden mit Hilfe der PLACE- und PlantCARE-Software identifiziert.

	SIDXS1			SIDXS2			MDXS2			Bemerkung		
	sequence	Anz	(+)	(-)	Anz	(+)	(-)	Anz	(+)		(-)	
phytohormone- wounding- or resistance-related	CANNTG	10	5	5	2	1	1	6	3	3	ABA responsive	
	CCTTTT	3	3	0	3	2	1	1	1	0	GA response	
	GAAAAA	5	3	2	4	1	3	1	0	1	pathogen and salt induced	
	NGATT	7	4	3	6	4	2	11	5	6	cytokinin	
	TGACG	1	1	0	1	1	0	1	0	1	Auxin/ salicylic acid responsive	
	TGTCA	5	3	2	4	2	2	1	1	0	disease resistance	
	TTGAC	3	1	2	4	3	1	3	1	2	salicylic acid responsive	
	ACGTG	2	2	0								ABA responsive, ABRE
	ACGTGGC	1	1	0								ABA responsive, ABRE
	ACGTGKC	1	1	0								ABA responsive, ABRE
	ACGTGKC	1	1	0								ABA responsive, ABRE
	ACGTSSSC	1	1	0								ABA responsive, ABRE
	CATATG	2	1	1								auxine responsive
	TATCCA	1	0	1				1	0	1		MYB, sugar response
	TGACGTGGC	1	1	0								auxine responsive
	TTTGACY	1	0	1	2	2	0					W-box, elicitor-induced
	TTTTTTCC	1	0	1								GA
	WAACCA	1	1	0				5	2	3		ABA, dehydration
	YAACKG	1	0	1				1	0	1		ABA, dehydration
	YTGTCWC	1	0	1				2	2	0		pathogenesis-related
	AWTTCAAA				4	2	2	1	0	1		Ethylene response
	TAACAAR				1	0	1					GA response
	TATTAG				1	1	0					cytokinin
	TTGACC				1	1	0					elicitor-induced
	CTGACY							2	1	1		WBOXNTCHN48
	TGTCTC							2	2	0		ARFAT (AUX)

Tabelle A.4: putative *cis*-regulatorische Elemente, die in keine der vorangegangenen Gruppen eindeutig zugeordnet werden konnten. Dazu wurden auch unter anderem auch Erkennungssequenzen für Transkriptionsfaktoren mit multiplen Funktionen und Transkriptionsinitiations-Motive gezählt.

	sequence	SIDXS1			SIDXS2			MIDXS2			Bemerkung
		Anz	(+)	(-)	Anz	(+)	(-)	Anz	(+)	(-)	
others	AAAG	20	12	8	10	4	6	14	6	8	Dof
	TAAAG	4	3	1	1	1	0	6	2	4	Dof <i>S. tuberosum</i>
	ACTCAT	1	1	0	1	1	0				Hypoosmolarity
	YACT	13	5	8	20	9	11	9	4	5	PEP Carboxylase C4 Pfl
	CAACA	3	3	0	4	2	2	5	1	4	RAV
	AATAAAYAAA	3	2	1	1	1	0	1	1	0	scaffold attachment region
	TTWTWTTWTT	3	1	2	4	0	4	4	3	1	scaffold attachment region
	TTTATATA	2	0	2	1	0	1				TATA Box
	GANTTNC	1	1	0	2	2	0	2	0	2	myb transcription factor
	TATCCA	1	0	1							amylase
	GGCCCAWWW	1	0	1							bud outgrowth
	TGGGCY	1	0	1							cytochromes
	ACTTTA	3	1	0				2	2	0	Dof Protein, <i>A. rhizogenes</i> rolB gene, tissue-specific, auxin-responsive
	AAACAAA	3	3	0				1	1	0	fermentative Pathway, tomato
	TGACGTGG	1	1	0							HEXAT (-1 S000235)
	ACGTCA	1	0	1							Histones
	CCAATGT	1	0	1							LEAFYATAG
	GGATA	1	1	0				2	2	0	MYBST1
	CCACGTCA	1	0	1							UPRMOTIFIAT
	CAACTC				1	0	1	2	0	2	Cys Protease
	TAAAATAT				2	0	2	2	0	2	Cys Protease, tomato
	WTTTATRITTTW				1	1	0				scaffold attachment region
	CGACG				1	1	0				Amylase Gen
	TAACARA				1	0	1				"amylase box"
	TGCAGG							1	1	0	plant intron
	TACGTA							2	1	1	sugar repression
	AMNAUGGC							1	0	1	translation initiation
	AMNAUGGC							1	0	1	translation initiation
	AACCAA							5	1	4	phytochrome regulation
	CAAAACGC							1	0	1	dark response
	TTATCC							1	0	1	sugar responsive element
	TCATCAC							1	1	0	fermentative pahway
	GAGAC							3	0	3	sulfur response
	TGGACGG							1	1	0	Carbohydrate Metabolite Signal Responsive Element
MACCWAMC							1	0	1	Myb, phenylpropanoid BS, Anthirrum	

Der binäre RNAi-Vektor pHellgate8 (Wesley *et al.*, 2001) wurde zur Reduktion der *SIXS2*-Transkriptmengen verwendet. Als Transformationskontrolle wurde ein „leerer Vektor“ generiert, in dem die RNAi-Kassette mittels *Xba*I / *Xho*I-Verdau ausgeschnitten wurde und das Vektorrückgrad religiert wurde (Abschnitt 2.2.12). Durch den Agrobakterien-vermittelten Gentransfer wurde die T-DNA (Sequenzbereich zwischen 'left' und 'right border') ohne RNAi-Kassette, aber mit Selektionsmarkergen (*NPTII*) in das pflanzliche Genom übertragen.

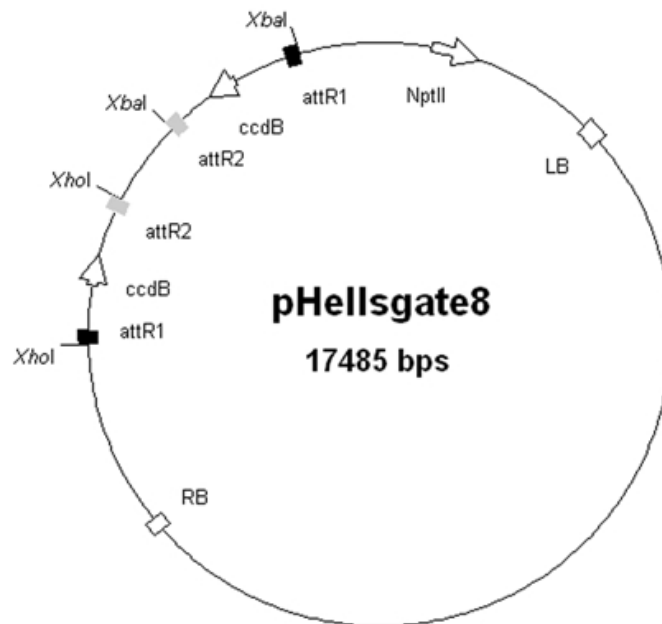


Abbildung A.3: Karte des binären RNAi-Vektors pHellgate8, **LB**: 'left border', **RB**: 'right border', **attR1/2**: 'attachment sites', **ccdB**: Selektionsgen des Gateway[®]-Systems, **NPTII**: Kanamycin-Resistenz vermittelndes Gen (Wesley *et al.*, 2001)

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. D. Strack für das Ermöglichen dieser Arbeit in der Abteilung Sekundärstoffwechsel, sowie für die Unterstützung in den Jahren der Anfertigung dieser Dissertation.

Für die Bereitstellung des Themas, sowie die fachliche Betreuung während der Fertigstellung der Arbeit bedanke ich mich bei PD Dr. M. H. Walter.

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. B. Hause für das ungebremste Interesse und den unermüdlichen Beistand bei der Anfertigung der Arbeit.

Bei Prof. Dr. W. Boland bedanke ich mich für die Möglichkeit die Duftstoffanalysen in seiner Abteilung am MPI in Jena durchführen zu können. Vielen Dank auch an Dipl. Chem. S. Garms und Dr. S. Bartram für die tiefgehenden, geduldigen und erhellenden Erklärungen der Analysemethode sowie der Auswertung.

Herzlicher Dank gilt Dr. M. Rodriguez-Concepción für die Unterstützung beim Aktivitätsnachweis und die Anleitung zur erfolgreichen Durchführung. Dr. Eva Uros-Gracia sei gedankt für die labortechnische Einweisung und Jordi Perez für die netten Einblicke in das Leben in Barcelona.

Bei Dr. G. Hause möchte ich mich für den aufschlussreichen Informationsaustausch und der Kontaktknüpfung mit F. Syrowatka, der die ESEM-Bilder ermöglichte, bedanken.

Des Weiteren gilt PD Dr. W. Brandt mein Dank für die Erstellung der 3-D-Modelle.

Für das gute Klima und die vielfältigen, nicht nur fachlichen Erörterungen, sowie die ermunternden Worte in allen Lebenslagen möchte ich mich ganz herzlich bei Kathleen, Felix, Dirk, Diana, Laudi und Elfe bedanken.

Yvonne und Jan gilt mein besonderer Dank für die erleuchtenden Statistik-Diskussionen sowie die unermüdliche Unterstützung beim Umgang mit L^AT_EX.

Ferner bedanke ich mich bei Frau K. Manke für die technische Unterstützung und die teilweise Übernahme von Routinemethoden. Jenny Wiczorek danke ich dafür, dass sie während der Anfertigung ihrer Bachelorarbeit auch Daten lieferte, die in diese Arbeit einfließen.

Herr M. Barth danke ich für die Frachttaxi-Fahrten nach Jena.

Ich bedanke mich außerdem bei den Gärtnern, besonders Frau P. Jansen, Herr P. Plato, Frau M. Allstädt, die immer ein wachsames Auge über die Pflanzen hatten und mit denen eine gute Zusammenarbeit möglich war.

Bei Frau C. Kaufman bedanke ich mich für die Einweisung in die graphischen Einheiten der Postererstellung.

Dieses Projekt wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie finanziert.

Abschließend möchte ich mich bei meiner gesamten Familie für das Verständnis und den unerschütterlichen Beistand in allen Lebenslagen bedanken.

- VIELEN DANK -

Veröffentlichungen

Publikation

Paetzold H., Garms S., Bartram S., Wieczorek J., Uros-Gracia E. M., Rodriguez-Concepción M., Boland W., Strack D., Hause B., Walter M. H. (2009): The isogene 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase 2 controls isoprenoid profiles, precursor pathway allocation and density of tomato trichomes, *Plant Physiology*, *submitted*.

Tagungsbeiträge - Vorträge

Paetzold, Heike DXS isogenes play complex roles in isoprenoid biosynthesis of tomato, 6th Kurt Mothes Workshop secondary metabolites, 18.-19.09.2008, Jena

Paetzold, Heike, First steps towards the characterisation of DXS, 2nd IPK student conference, 29.05-01.06.2006, Gatersleben

Tagungsbeiträge - Poster

Paetzold H., Strack, D., Walter M. H., DXS and their role in isoprenoid biosynthesis, Botanikertagung, 03.-07.09.2007, Hamburg

Paetzold H., Strack, D., Walter M. H., Isoprenoid biosynthesis in tomato: About isogenes of DXS, 3rd Plant Science Student Conference, 05.-08.06.2007, Halle

Paetzold H., Strack, D., Walter M. H., Roles of DXS isogenes in tomato, Terpnets: 8th International Meeting: Biosynthesis and Function of isoprenoids in plants, microorganisms and parasites, 30.04.-04.05.2007, Strasbourg, Frankreich

Lebenslauf

persönliche Angaben

Name: Heike Paetzold
Geburtsdatum: 21. Mai 1981
Geburtsort: Hansestadt Rostock

Studium & beruflicher Werdegang

seit 03.2005 Promotion am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie,
Abt. Sekundärstoffwechsel, Halle (Saale)
Kooperationen mit:
Dr. M. Rodríguez-Concepción, IBMB-CSIC, Barcelona, Spanien
Dipl. Chem. S. Garms, Dr. S. Bartram, MPI Chemische
Ökologie, Jena
PD Dr. W. Brandt, IPB, Abt: Natur- und Wirkstoffchemie

01.2005 - 02.2005 Praktikum am Robert-Koch-Institut,
Projektgruppe 1: Neuartige Erreger,
Arbeitsgruppe: HIV-Variabilität und molekulare Epidemiologie

10.1999 - 12.2004 Biologiestudium an der Universität Rostock
Hauptfächer: Mikro-, Molekularbiologie, Pflanzenphysiologie
Mehrwöchige Praktika während des Studiums:

02.2003 MPI Molekulare Physiologie, Dortmund

08. - 09.2002 Heriot-Watt-University, Edinburgh, Großbritannien

Schulbildung

07.1999 Abitur 1999

09.1995 - 07.1999 Gymnasium Große Stadtschule, Rostock

09.1991 - 08.1995 Erasmus Gymnasium Rostock

09.1988 - 08.1991 „Albin Köbis“ Grundschule, Rostock

09.1987 - 08.1988 „Max Pagenl“ Grundschule, Rostock

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit, dass ich mich mit der vorliegenden Arbeit erstmals um die Erlangung des Doktorgrades bewerbe. Ferner versichere ich an Eides statt, dass die vorliegende Dissertation selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Halle, den 14.07.2009