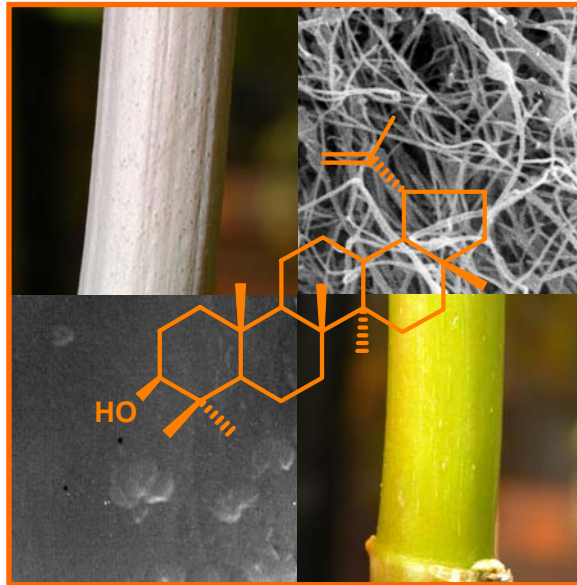


Biosynthese kutikulärer Triterpenoide:  
Klonierung und Charakterisierung von Epoxysqualenzyklassen  
aus *Ricinus communis* und *Lycopersicon esculentum*



Dissertation zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von  
**Ortwin Guhling**  
aus Münnerstadt

Würzburg 2006



Biosynthese kutikulärer Triterpenoide:  
Klonierung und Charakterisierung von Epoxysqualenzyklasen  
aus *Ricinus communis* und *Lycopersicon esculentum*

Dissertation zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von  
**Ortwin Guhling**  
aus Münnerstadt

Würzburg 2006

Eingereicht am: 22. November 2006

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. M. J. Müller

Gutachter: Prof. Dr. M. Riederer

Gutachter: Prof. Dr. R. Jetter

Tag des Promotionskolloquiums: .....

Doktorurkunde ausgehändigt am: .....

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einführung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Biosynthese pentazyklischer Triterpene in Pflanzen.....	1
1.2	Die pflanzliche Kutikula .....	7
1.3	Triterpene als kutikuläre Wachskomponenten .....	10
1.4	Aufgabenstellung .....	14
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>16</b>
2.1	<b>Pflanzenmaterial .....</b>	<b>16</b>
2.1.1	<i>Ricinus communis</i> .....	16
2.1.2	<i>Lycopersicon esculentum</i> .....	20
2.2	<b>Präparation kutikulärer Wachse von <i>Ricinus communis</i> .....</b>	<b>21</b>
2.2.1	Extraktion kutikulärer Wachse.....	21
2.2.2	Gewinnung epikutikulärer Wachse.....	21
2.3	<b>Qualitative und quantitative Analysetechniken .....</b>	<b>22</b>
2.3.1	Derivatisierung .....	22
2.3.1.1	Silylierung.....	22
2.3.1.2	Acetylierung.....	23
2.3.2	Gaschromatographie und Massenspektrometrie .....	23
2.3.3	Dünnschichtchromatographie (TLC) .....	24
2.4	<b>Molekulargenetische Methoden .....</b>	<b>25</b>
2.4.1	RNA-Isolierung und cDNA-Synthese .....	25
2.4.2	DNA-Isolierung .....	26
2.4.3	cDNA-Amplifizierung über Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	27
2.4.4	Gelelektrophoretische Untersuchung und Aufreinigung von PCR-Produkten .....	27
2.4.5	Klonierung von PCR-Produkten in <i>Escherichia coli</i> .....	28
2.4.6	Sequenzierung von PCR-Fragmenten.....	31
2.4.7	RACE-Technik.....	32
2.4.7.1	3'RACE.....	32
2.4.7.2	5'RACE.....	32
2.4.8	Northern-Blot-Analysen.....	34
2.4.8.1	Präparation der RNA.....	34
2.4.8.2	Präparation der Sonden .....	34
2.4.8.3	Hybridisierung .....	35
2.4.9	Semiquantitative RT-PCR .....	36
2.4.10	Sequenzanalytische Verfahren .....	36
2.5	<b>Charakterisierung klonierter cDNAs – heterologe Expression in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....</b>	<b>37</b>
2.5.1	Amplifizierung der 2,3-Oxidosqualenzylase-cDNAs mittels PCR .....	37
2.5.2	Ligation der cDNAs in den Hefe-Expressionsvektor pYES2.....	38
2.5.3	Die Hefemutante GIL 77 und die Transformation von GIL 77 mit dem Expressionsvektor pYES2.....	40
2.5.4	Geninduktion und Extraktion transformierter Hefezellen .....	41
2.5.5	Analyse der Hefe-Extrakte .....	42
2.5.6	<i>In vitro</i> -Enzymtest.....	42
2.6	<b>Zielgerichtete Mutagenese (Site-directed mutagenesis) von <i>RcLUS1</i> .....</b>	<b>43</b>
2.7	<b>Rasterelektronenmikroskopie .....</b>	<b>44</b>

<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>45</b>
<b>3.1</b>	<b>Charakterisierung zweier Stammkutikulaphänotypen von <i>Ricinus communis</i></b> .....	<b>45</b>
3.1.1	Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung nativer Oberflächen beider Sprossachsenphänotypen.....	45
3.1.2	Chemische Charakterisierung der kutikulären Wachse beider Stammkutikula-Phänotypen .....	47
3.1.2.1	Zusammensetzung des kutikulären Gesamtwachses.....	47
3.1.2.2	Epi- und intrakutikuläre Wachszusammensetzungen .....	54
<b>3.2</b>	<b>Kutikula-Ontogenese: Kutikuläre Wachszusammensetzung während der frühen Sprossachsenentwicklung</b> .....	<b>60</b>
3.2.1	Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen von Hypokotyloberflächen während der frühen Entwicklungsphase .....	60
3.2.2	Chemische Charakterisierung der Wachszusammensetzung im Laufe der Hypokotylientwicklung.....	62
<b>3.3</b>	<b>Klonierung von Epoxysqualenzuklasen aus <i>Ricinus communis</i> und <i>Lycopersicon esculentum</i></b> .....	<b>68</b>
3.3.1	Primerdesign zur spezifischen homologiebasierten Klonierung von Gensequenzen pflanzlicher Triterpen- und Cycloartenolsynthasen .....	68
3.3.2	Klonierung der <i>Ricinus communis</i> Lupeolsynthase RcLUS1.....	72
3.3.3	Klonierung eines Genfragmentes einer weiteren potenziellen Triterpensynthase von <i>Ricinus communis</i> .....	76
3.3.4	Klonierung der <i>Ricinus communis</i> Cycloartenolsynthase RcCAS1 .....	78
3.3.5	Klonierung genomischer Sequenzen von <i>RcLUS1</i> und <i>RcCAS1</i> .....	80
3.3.5.1	Genomische Sequenz der Lupeolsynthase RcLUS1.....	80
3.3.5.2	Genomische Sequenz der Cycloartenolsynthase RcCAS1 .....	81
3.3.6	Klonierung zweier Triterpensynthase-cDNAs aus <i>Lycopersicon esculentum</i> .....	81
3.3.6.1	<i>Lycopersicon esculentum</i> $\beta$ -Amyrinsynthase LeTTS1.....	81
3.3.6.2	<i>Lycopersicon esculentum</i> Triterpensynthase LeTTS2.....	84
<b>3.4</b>	<b>Charakterisierung der klonierten 2,3-Oxidosqualenzuklasen mittels heterologer Expression in der Hefemutante GIL 77</b> .....	<b>86</b>
3.4.1	Charakterisierung der <i>Ricinus communis</i> Lupeolsynthase RcLUS1 .....	86
3.4.2	Charakterisierung der <i>Ricinus communis</i> Cycloartenolsynthase RcCAS1.....	90
3.4.3	Charakterisierung der <i>Lycopersicon esculentum</i> $\beta$ -Amyrinsynthase LeTTS1.....	95
<b>3.5</b>	<b>Expressionsmuster der Oxidosqualenzuklasen RcLUS1 und RcCAS1</b> .....	<b>97</b>
3.5.1	Expression in verschiedenen Pflanzengeweben .....	97
3.5.2	Expression während der frühen Sprossachsenentwicklung .....	98
<b>3.6</b>	<b>Site-directed mutagenesis-Versuche an <i>RcLUS1</i></b> .....	<b>100</b>
3.6.1	Die Wahl der zu mutierenden Aminosäurereste .....	100
3.6.2	Charakterisierung der <i>RcLUS1</i> -Mutante F257W .....	102
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>103</b>
<b>4.1</b>	<b>Ausbildung des Glaucous-Phänotyps von <i>Ricinus communis</i></b> .....	<b>103</b>
4.1.1	Chemische und mikromorphologische Charakteristika der beiden Sprossachsen-Phänotypen: Waskristalle als Verursacher des Glaucous-Phänotyps .....	103
4.1.2	Die Schichtung der Kutikula bei <i>Ricinus communis</i> .....	105
4.1.3	Dynamik der kutikulären Wachszusammensetzung während früher Stadien der Hypokotyl-Entwicklung.....	110
4.1.4	Die Biosynthese von kutikulärem Lupeol bei <i>Ricinus communis</i> im ökologischen Kontext – das „Greasy pole Syndrom“ .....	116

---

<b>4.2</b>	<b>Die Bedeutung pflanzlicher Triterpensynthesen für die Biosynthese kutikulärer pentazyklischer Triterpene</b> .....	<b>120</b>
4.2.1	Biosynthese kutikulärer Triterpene bei <i>Ricinus communis</i> - die Kutikularelevanz der Lupeolsynthese RcLUS1 .....	121
4.2.2.1	Das Expressionsverhalten der klonierten Epoxysqualenzkyklen in verschiedenen Pflanzenorganen.....	121
4.2.2.2	Vergleich der <i>RcLUS1</i> -Expression mit der kutikulären Triterpen-Akkumulation im Laufe der frühen Hypokotylentwicklung .....	122
4.2.2.3	Die Ausbildung der Kutikula-Phänotypen als Folge der differentiellen Regulation der Biosynthese von kutikulärem Lupeol durch RcLUS1 .....	125
4.2.2.4	RcTTS2 – eine weitere Triterpensynthese aus <i>Ricinus communis</i> .....	129
4.2.2	Die Biosynthese kutikulärer Triterpene in <i>Lycopersicon esculentum</i> .....	130
<b>4.3</b>	<b>Die klonierten und charakterisierten Triterpensynthesen als Mitglieder der Epoxysqualenzkyklen-Genfamilie</b> .....	<b>135</b>
4.3.1	Klonierung pflanzlicher Epoxysqualenzkyklen durch die Einbeziehung von Sequenz-Unterschieden in den Gen-Unterfamilien.....	135
4.3.2	Die klonierten und charakterisierten 2,3-Oxidosqualenzkyklen im Kontext pflanzlicher Epoxysqualenzkyklen .....	136
4.3.2.1	Phylogenetische Untersuchungen .....	136
4.3.2.2	RcLUS1 im Vergleich zu anderen Lupeolsynthesen – Gerichtete Mutagenese-Versuche	141
4.3.2.3	Genomische Sequenzen von <i>RcLUS1</i> und <i>RcCAS1</i> .....	144
<b>5</b>	<b>Ausblick</b> .....	<b>145</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>148</b>
<b>7</b>	<b>Summary</b> .....	<b>151</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>154</b>
<b>Anhang</b>		
A	Verwendete Medien und Puffer .....	165
B	Klonierte und charakterisierte pflanzliche 2,3-Oxidosqualenzkyklen.....	168
C	Primerdesign zur homologiebasierten Klonierung pflanzlicher Epoxysqualenzkyklen .....	169
D	Verwendete Primer .....	174
E	Klonierte Sequenzdaten .....	178
F	Abbildungsverzeichnis .....	185
G	Tabellenverzeichnis .....	189
H	Verwendete Abkürzungen .....	191
	Danksagung .....	192
	Publikationsliste.....	193
	Lebenslauf.....	194
	Erklärung .....	195

---



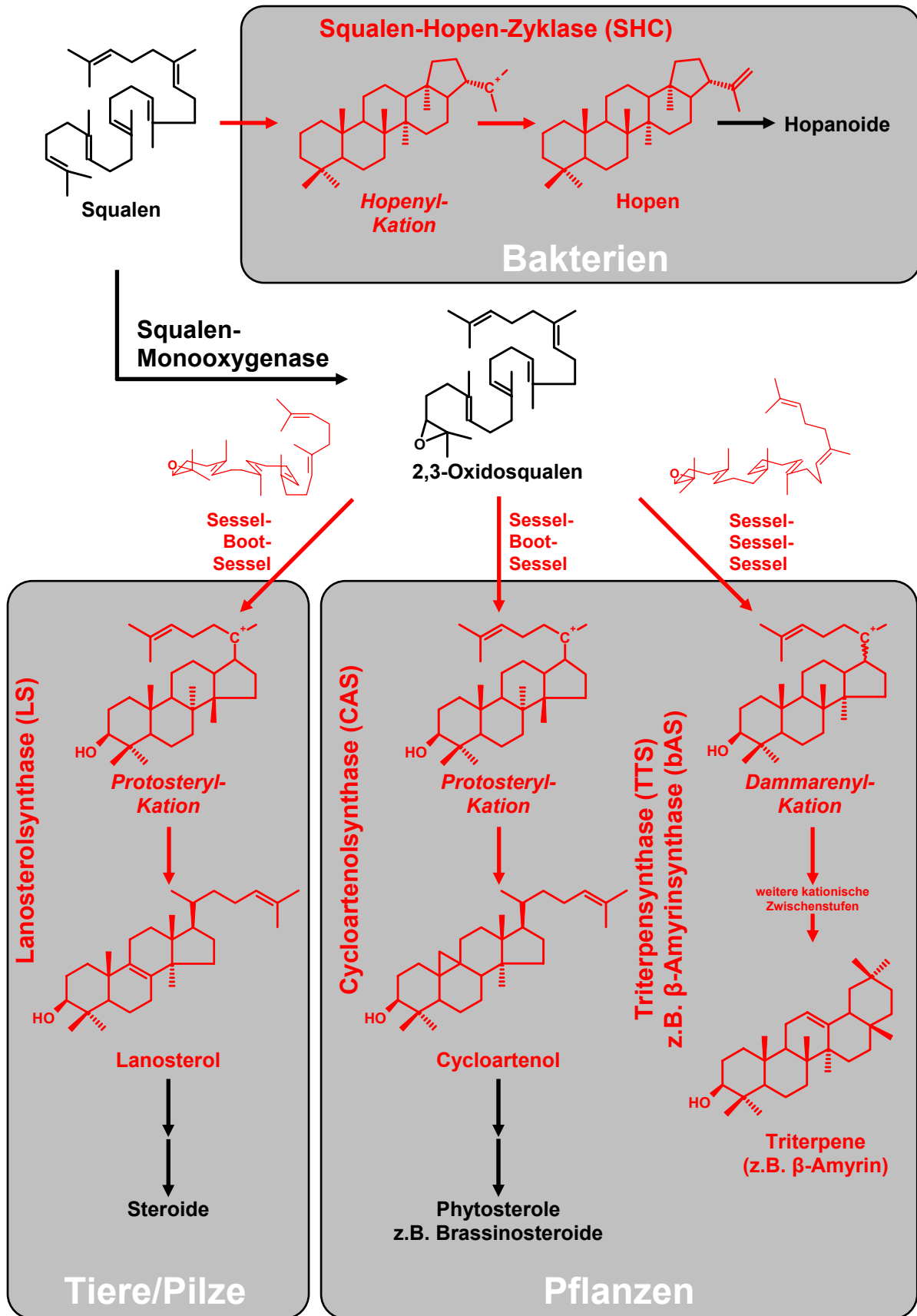


# 1 Einführung

## 1.1 Biosynthese pentazyklischer Triterpene in Pflanzen

Pentazyklische Triterpene gehören der großen Stoffgruppe der Terpenoide an, eine der umfangreichsten Klassen sekundärer Pflanzenstoffe. Als Terpenoide bezeichnet man Verbindungen, die sich formal in Isopren-Bausteine zerlegen lassen und sich biosynthetisch vom Isopentenylpyrophosphat (IPP) ableiten, einer C<sub>5</sub>-Einheit, die bei höheren Pflanzen ausgehend von Acetyl-CoA über Mevalonsäure als Intermediat gebildet wird. Der erst vor wenigen Jahren beschriebene alternative plastidäre Desoxy-D-D-xylulose-5-phosphat-Weg zur Biosynthese von IPP (Lichtenthaler *et al.* 1997) spielt bei der Triterpen-Bildung höherer Pflanzen vermutlich keine Rolle.

Triterpene entstehen durch die Schwanz/Schwanz-Dimerisierung von zwei C<sub>15</sub>-Grundeinheiten auf der Stufe von Farnesyldiphosphat unter Mitwirkung der Squalen-Synthase. Dabei entsteht Squalen, ein ungesättigter C<sub>30</sub>-Kohlenwasserstoff, der in prokaryotischen Organismen direkt über sogenannte Squalen-Hopen-Zyklasen (SHC) zu Hopen zyklisiert wird (Abb. 1-1) (Wendt *et al.* 2000). In eukaryotischen Organismen wird das Squalen durch die Squalen-Monooxygenase mit Hilfe von molekularem Sauerstoff zunächst in das entsprechende 2,3-Epoxid überführt. Erst das 2,3-Oxidosqualen ist der Ausgangspunkt für die nachfolgenden Zyklisierungsreaktionen, die in die Ausbildung der enormen strukturellen Vielfalt von Triterpenen münden und von so genannten 2,3-Oxidosqualenzyklasen oder Epoxysqualenzyklasen (OSC) katalysiert werden (Xu *et al.* 2004). Oxidosqualenzyklasen kontrollieren an einer zentralen Verzweigungsstelle im Biosyntheseweg von Sterolen und „echten“ pentazyklischen Triterpenen den biosynthetischen Fluss des Substrats in den Primär- bzw. Sekundärmetabolismus der Pflanze (Henry *et al.* 1992). Die Zyklisierung von 2,3-Oxidosqualen vollzieht sich in einer einzigen enzymkatalysierten, extrem exothermen Reaktion und stellt einen der komplexesten Reaktionsmechanismen dar (Abe *et al.* 1993). Der Mechanismus beinhaltet a) die Protonierung und damit die Öffnung des Epoxidringes, b) eine Reihe von Zyklisierungsschritten über intramolekulare Kation-Olefin-Reaktionen, c) die Umstrukturierung der intermediär gebildeten instabilen Carbokationen durch Hydrid- und Methylgruppenwanderungen entlang einer thermodynamisch und kinetisch günstigen Kaskade und d) die Deprotonierung, die schließlich zur Bildung des Endproduktes führt (Poralla 1999). In Pflanzen zyklisiert die Cycloartenolsynthase (CAS) die Sessel-Boot-Sessel-Konformation des 2,3-Oxidosqualens über das Protosteryl-Kation zum tetrazyklischen Cycloartenol (Brown 1998). Diese Reaktion entspricht der Zyklisierung von 2,3-Oxidosqualen zu Lanosterol durch Lanosterolsynthasen (LS) in tierischen Organismen und Pilzen (Abb. 1-1).



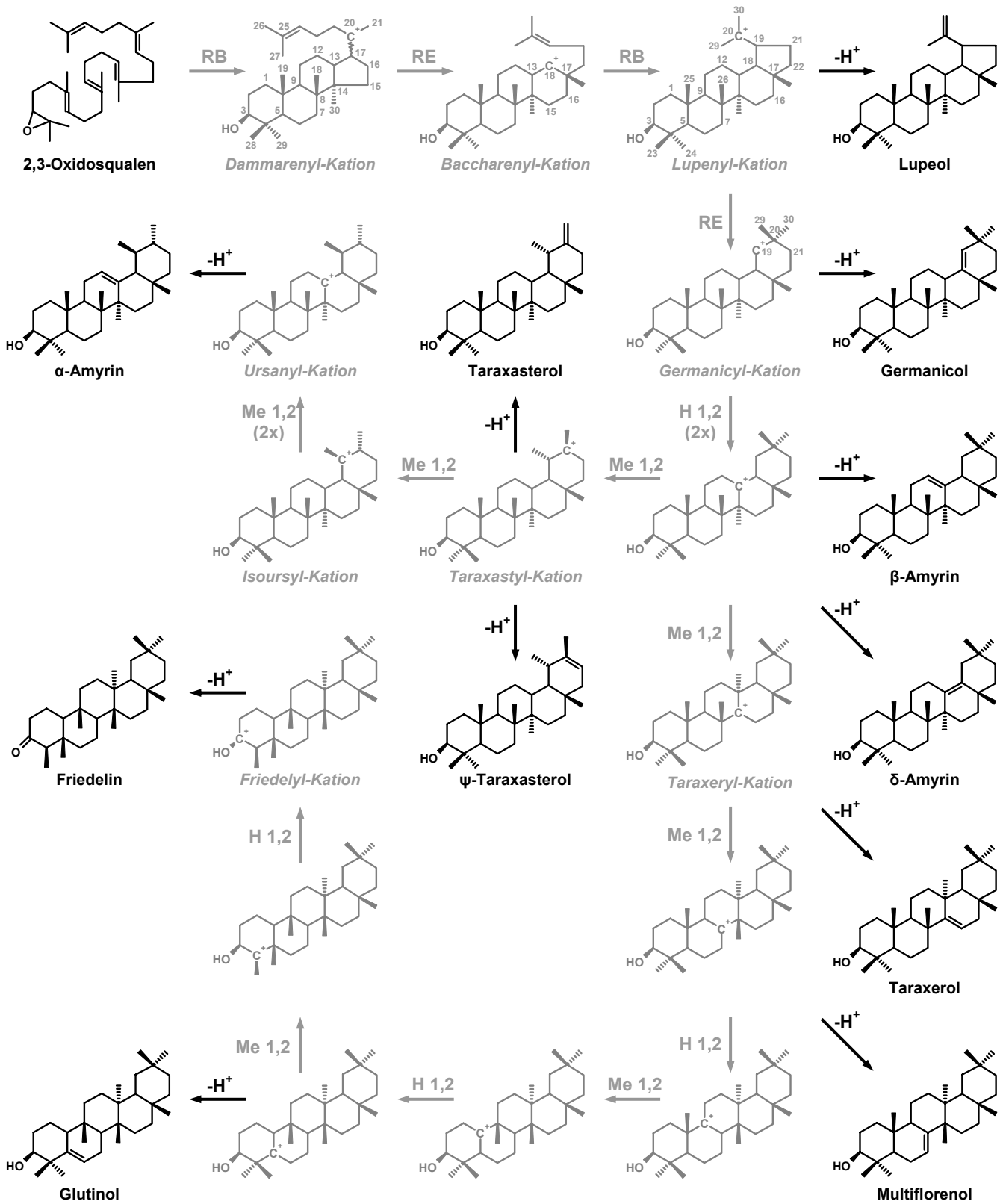
**Abbildung 1-1:** Biosynthesewege von Steroiden und Triterpenen. Bei prokaryotischen Organismen erfolgt die Biosynthese über die Zyklisierung von Squalen durch Squalen-Hopen-Zyklasen (SHC), während bei Eukaryoten die Zyklisierung von 2,3-Oxidosqualen von sogenannten Oxidosqualenzyklasen (OSC) katalysiert wird.

Cycloartenol ist der Ausgangspunkt der Phytosterol-Biosynthese, die zur Bildung von wichtigen Membranbestandteilen wie Stigmasterol oder  $\beta$ -Sitosterol, aber auch zur Synthese wichtiger Pflanzenhormone wie Brassinosteroiden führt (Benveniste 2004). In allerjüngster Vergangenheit wurden Lanosterolsynthasen auch aus pflanzlichen Organismen wie *Arabidopsis thaliana* und *Lotus japonicus* charakterisiert (Kolesnikova *et al.* 2006; Suzuki *et al.* 2006; Sawai *et al.* 2006). Vor dem Hintergrund dieser Arbeiten ist davon auszugehen, dass sich in Pflanzenorganismen neben dem „klassischen“ Biosyntheseweg von Sterolen über Cycloartenol ein weiterer Weg über Lanosterol als Zwischenprodukt evolvierte.

Im Gegensatz dazu zyklisieren Triterpensynthasen (TTS) die Sessel-Sessel-Sessel-Konformation des 2,3-Oxidosqualens über das Dammarenyl-Kation zu verschiedenen Triterpen-Alkoholen (Abb. 1-1). Die bemerkenswerte strukturelle Diversität pflanzlicher pentazyklischer Triterpene wird also durch die strikte enzymatische Kontrolle des Zyklisierungsprozesses und des terminierenden Deprotonierungsschrittes generiert. Abbildung 1-2 gibt eine Übersicht über die Bildung kationischer Zwischenstufen und der jeweiligen aus Deprotonierungsschritten resultierenden Endprodukte. Durch eine D-Ring-Erweiterung des Dammarenyl-Kations über C16-Migration und der  $18\beta$ -E-Ring-Zyklisierung des Baccharenyl-Kations entsteht das Lupenyl-Kation, das ohne weitere Umlagerungen zum Lupeol deprotoniert wird. Kommt es jedoch zu einer E-Ring-Expansion über C21-Migration am Lupenyl-Kation, entsteht das Germanicyl-Kation, das wiederum entweder durch Protonenverlust an C18 zu Germanicol oder über eine Kaskade von 1,2 Hydrid- und 1,2-Methylgruppenwanderungen zur Bildung weiterer Kationen führt, die ihrerseits zu entsprechenden Endprodukten deprotoniert werden.

In den letzten Jahren wurden eine Reihe pflanzlicher Oxidosqualenzyklassen kloniert und auf ihre Produktspezifität hin funktionell charakterisiert, darunter Cycloartenolsynthasen,  $\beta$ -Amyrinsynthasen (bAS), Lupeolsynthasen (LUS), eine Isomultiflorenolsynthase (IMS) und mehrere multifunktionale Triterpensynthasen (MFS) (Phillips *et al.* 2006; Übersicht siehe Anhang B). Vor dem Hintergrund dieser Informationen und weiterer Sequenzierungen aus tierischen und mykotischen Systemen war es möglich, mit Hilfe von Inhibitor-Untersuchungen und gerichteten Mutageneseansätzen, für die Enzymfunktionen essentielle Sequenzmotive zu definieren, die allen OSCs zueigen sind (Haralampidis *et al.* 2002). An erster Stelle ist hier das hochkonservierte Aminosäuremotiv  $DCTAE$  zu nennen, das für die Substratbindung verantwortlich ist (Abb. 1-3). Das elektrophile Aspartat in diesem Substratbindungsmotiv spielt eine wichtige Rolle bei der Protonierung der Epoxidgruppe des Substrates und ist damit für die Initiation der Zyklisierungsreaktion von entscheidender Bedeutung. Zusätzlich finden sich in allen OSCs vier bis acht repetitive, an aromatischen Resten reiche Aminosäuresequenzmotive, die wegen ihres konservierten Sequenzmotives  $Q---G-W$  „QW-Motive“ genannt werden (Abb. 1-3) (Poralla *et al.* 1994). Sie tragen zur

Stabilisierung der Enzymfaltung während der hoch exergonischen Zyklisierungsreaktion bei (Wendt *et al.* 1997).



**Abbildung 1-2:** Mechanismus der Zyklisierung von 2,3-Oxidosqualen zu pentazyklischen Triterpenen über die Bildung instabiler kationischer Zwischenstufen (grau), vermittelt durch 1,2-Hydrid- und Methylgruppenwanderungen und einen terminalen Deprotonierungsschritt. RB = Ringbildung, RE = Ringerweiterung.



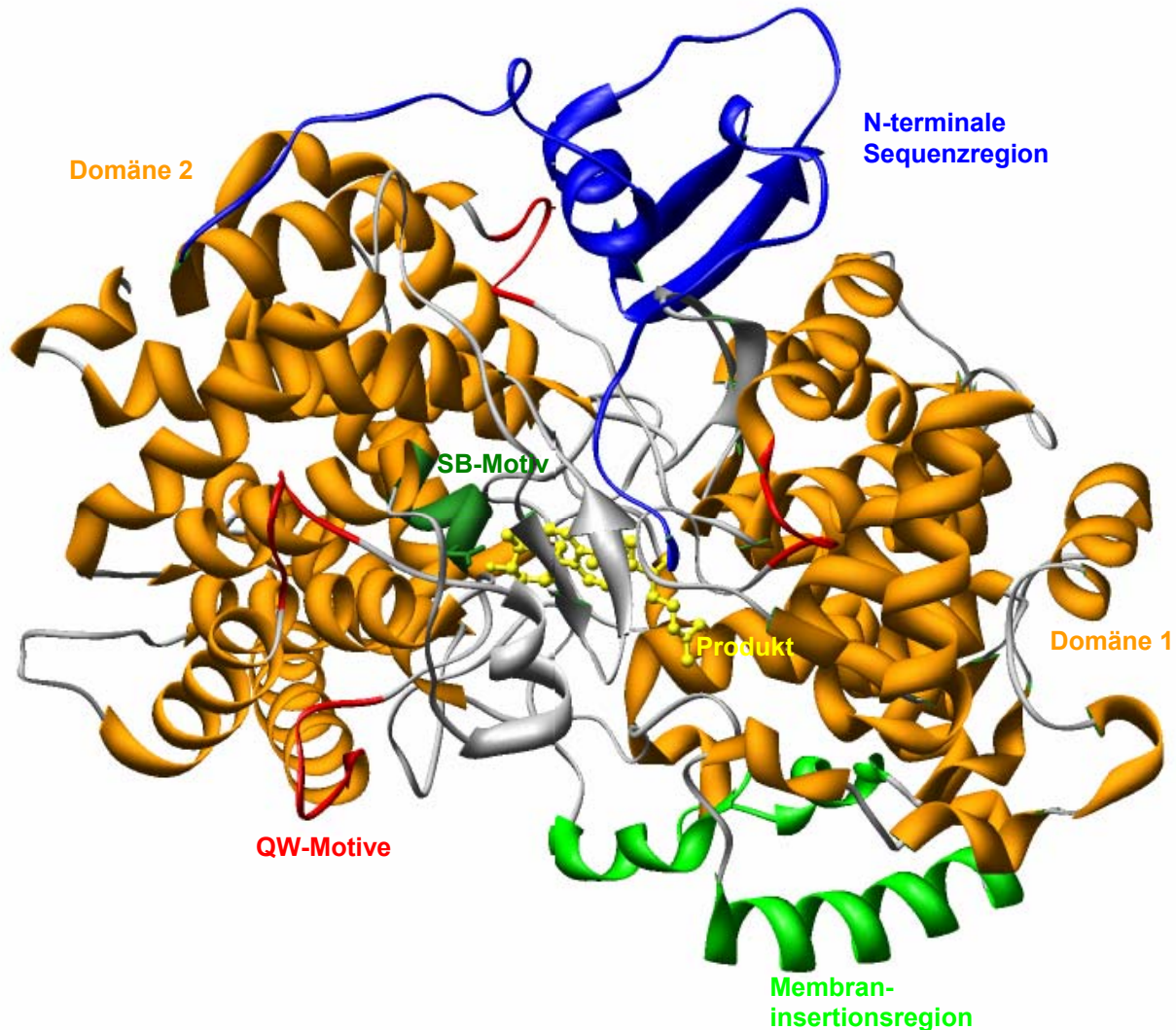
**Abbildung 1-3:** Schematische Darstellung der Sekundärstruktur einer 2,3-Oxidosqualenzylase. Die konservierten QW-Motive (rot) und das Substratbindungsmotiv SB (grün) sind farblich hervorgehoben.

In Untersuchungen zur subzellulären Lokalisierung von OSCs konnte zudem gezeigt werden, dass die Aktivität der Zyklasten mit Mikrosomen/Lipidpartikeln assoziiert ist, ein Hinweis auf die membrangebundene Natur der Zyklasten (Milla *et al.* 2002b; Milla *et al.* 2002a).

Die vor kurzem veröffentlichte dreidimensionale Struktur der menschlichen Lanosterolsynthase (Thoma *et al.* 2004) stellt zweifellos einen Meilenstein in der Erforschung der enzymatisch regulierten Umwandlung von Olefinen in komplexe und biologisch bedeutsame polyzyklische Produkte dar. Die Kenntnis der Proteinstruktur dieser Zyklaste erlaubt einerseits die Überprüfung und Bestätigung des bisherigen Forschungsstandes bezüglich Struktur-Funktions-Beziehungen in der Enzymfamilie und ermöglicht darüber hinaus ein tieferes Verständnis für den Aufbau und die Funktionsweise von Oxidosqualenzyklasten im Allgemeinen und soll deshalb kurz vorgestellt werden. Die menschliche OSC kristallisiert als Monomer und besteht aus zwei ( $\alpha/\alpha$ )-Barrel-Domänen, die über Schleifen und drei kleinere  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen miteinander verbunden sind (Abb. 1-4). Das aktive Zentrum des Moleküls ist zwischen Domäne 1 und 2 lokalisiert. Die N-terminale Region des Enzyms füllt den Raum zwischen beiden Domänen und trägt zur Stabilisierung der relativen Lage beider Domänen zueinander bei. Bei der menschlichen OSC handelt es sich um ein monotopes Membranprotein, d.h., es insertiert in die Membran, durchspannt jedoch nicht die gesamte Bilayerstruktur. Die membraninsertierende Oberfläche besteht aus einem unpolaren Plateau und einem Kanal, der in die Höhlung des aktiven Zentrums führt und dem Substrat über diese Kontaktregion den Eintritt aus dem Membraninneren in das hydrophobe aktive Zentrum der Zyklaste ermöglicht.

Neben den oben genannten Gemeinsamkeiten von Epoxysqualenzyklasten unterscheiden sich Triterpensynthasen klar von Lanosterol- und Cycloartenolsynthasen in ihrer Aminosäuresequenz und bilden eine eigene Untergruppe innerhalb der OSC-Superfamilie (Haralampidis *et al.* 2002). Während viele Triterpensynthasen eine hohe Spezifität in der Synthese ihres Produkts aufweisen und im Wesentlichen nur ein einziges Triterpen zyklisieren, zeigen andere Enzyme multifunktionale Eigenschaften und produzieren eine ganze Reihe verschiedener Zyklisierungsprodukte. Untersuchungen zur Produktspezifität von Chimären aus der Lupeolsynthase von *Arabidopsis thaliana* (AtLUP1) und der  $\beta$ -Amyrinsynthase von *Panax ginseng* (PNY), gewonnen durch heterologe Expression in Hefe-Mutanten zeigten, dass der Austausch bereits kurzer Aminosäurebereiche ausreicht, um das

Produktmuster der entsprechenden Enzym-Chimären in Richtung Lupeol bzw.  $\beta$ -Amyrin zu verschieben (Kushiro *et al.* 1999; Kushiro *et al.* 2000a). Mehr noch: Durch gerichtete Mutagenisierungen (site-directed mutagenesis) wurde gezeigt, dass der Austausch bereits einer einzelnen Aminosäure ausreicht, um die Produktspezifität pflanzlicher Triterpensynthasen zu verändern (Kushiro *et al.* 2000b).



**Abbildung 1-4:** Bandmodell der dreidimensionalen Struktur der menschlichen Lanosterolsynthase. Das Modell wurde mit Hilfe des Programms UCSF Chimera (Version1) erstellt. PDB ID: 1W6K.

Triterpene sind häufig auftretende Sekundärmetabolite und das von Pflanzen produzierte Spektrum ist jeweils artspezifisch. Sie zeigen potenziell nützliche pharmakologische Eigenschaften (Mahato und Sen 1997) wie z. B. entzündungshemmende (Fernandez *et al.* 2001; Akihisa *et al.* 1996) oder krebshemmende (Haridas *et al.* 2001) Wirkungen und haben wirtschaftliche Bedeutung als kosmetische Stoffe, Detergentien und Süßstoffe (Hostettmann und Marston 1995). Triterpene finden sich in den organischen Rückständen antiker Gefäße und dienen so Archäologen als Marker für die Untersuchung von Nahrungsgewohnheiten in vorgeschichtlicher Zeit (Evershed *et al.* 1997). Trotz ihres ubiquitären Vorkommens im Pflanzenreich ist über die Funktion der Triterpene in der Pflanze selbst nur relativ wenig

bekannt. Einige Arten akkumulieren größere Mengen von Triterpen-Glycosiden, sogenannte Triterpen-Saponine (Osbourn 2003). Saponine sind mit ihrer antimikrobiellen Wirkung Bestandteil des pflanzlichen Abwehrsystems gegen Pathogenbefall (Osbourn 1996; Nagata *et al.* 1985), wie am Beispiel des Avenacins in Hafer gezeigt werden konnte (Papadopoulou *et al.* 1999). Daneben werden für Saponine Funktionen als Abwehrstoffe gegen Insektenbefall (Agerbirk *et al.* 2003; Svoboda *et al.* 1995), als allelopathische Stoffe (Waller *et al.* 1993) und als Regulatoren von Gravitropismus (Rahman *et al.* 2001), Zellulosesynthese (Ohana *et al.* 1998) und Wurzelwachstum (Tsurumi und Wada 1995) diskutiert.

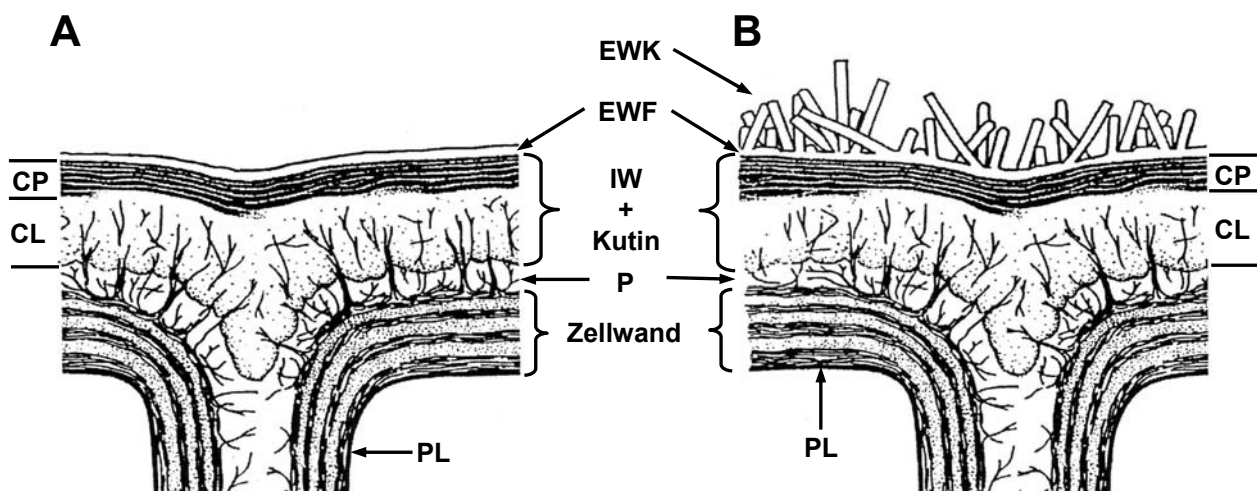
Welche physiologischen und ökologischen Funktionen übernehmen jedoch Triterpen-Aglycone *in planta*? In der Literatur wurde über eine Funktion pentazyklischer Triterpene als Strukturkomponenten von Biomembranen in manchen Pflanzengeweben spekuliert (Baisted 1971; Nes und Heftmann 1981). Daneben akkumulieren bestimmte Pflanzenarten größere Mengen pentazyklischer Triterpene im primären Abschlussgewebe ihrer oberirdischen Organe wie Blätter, Früchte, Blüten und Sprossachsen. Als Bestandteile der pflanzlichen Kutikula übernehmen Triterpene hier wichtige physiologische und ökologische Aufgaben.

## 1.2 Die pflanzliche Kutikula

Die Kutikula bildet die großflächige Grenzschicht zwischen den oberirdischen Pflanzenorganen mit primärem Abschlussgewebe und der Atmosphäre. Dabei handelt es sich um eine lückenlose, 1-15 µm dicke, extrazelluläre Membran, die den Außenwänden der äußersten Zellschicht, der Epidermis, aufgelagert ist (Riederer 1991). Der Hauptbestandteil der Kutikula ist Kutin, ein Lipidbiopolymer aus langkettigen Hydroxy-16:0- und -18:1-Fettsäuren, die über Esterbrücken miteinander verbunden sind und so ein dreidimensionales Netzwerk bilden, das der Kutikula mechanische Stabilität verleiht (Holloway 1982). In diese hydrophobe Polymermatrix ein- und ihrer Außenseite aufgelagert sind lösliche Lipide, die in ihrer Gesamtheit als kutikuläre Wachse bezeichnet werden (Post-Beittenmiller 1996). Sie bestehen aus einem Gemisch aliphatischer, meist unverzweigter Verbindungen wie *n*-Alkanen, Karbonsäuren, primären und sekundären Alkoholen, Aldehyden und Ketonen mit Kettenlängen zwischen 20 und 36 Kohlenstoffatomen (Baker 1982; Walton 1990; Kolattukudy *et al.* 1976; Kunst und Samuels 2003), sowie Alkyl-Estern mit Kettenlängen zwischen C<sub>40</sub> und C<sub>60</sub> (Riederer und Markstädter 1996). Daneben kommen in kutikulären Pflanzenwachsen aber auch nicht selten zyklische Verbindungen wie Phenole oder Triterpene vor (Baker 1982; Wollenweber und Dietz 1981a; Wollenweber und Dietz 1981b).

Die pflanzliche Kutikula ist keine einfache, homogene Struktur, sondern aus verschiedenen Schichten mit unterschiedlichen physikalischen und chemischen Eigen-

schaften aufgebaut (Jeffree 1986) (Abb. 1-5). Sie besteht aus einer tiefer gelegenen Zone, der sogenannten Kutikularschicht (*cuticular layer*) und einer darauf aufgelagerten Schicht, die als eigentliche Kutikula (*cuticle proper*) bezeichnet wird (Jeffree 2006). Die eigentliche Kutikula setzt sich aus intrakutikulären Wachsen und Kutin zusammen, während in die Kutikularschicht zusätzlich Zellwandkomponenten wie Pektin, Zellulose und andere Kohlenhydrate eingelagert sind. Zwischen der Kutikularmembran (*cuticle proper + cuticular layer*) und den Periklinalwänden der Epidermiszellen liegt eine pektinreiche Schicht, die der Mittellamelle äquivalent ist. Zur Atmosphäre hin ist der eigentlichen Kutikula ein dünner, nur aus wenigen Moleküllagen bestehender, amorpher Film aus epikutikulärem Wachs aufgelagert. Zusätzlich können an der Oberfläche der Kutikula epikutikuläre Wachskristalle charakteristischer Formen, die aus dem Film herausragen, ausgebildet sein (Abb. 1-5B). Auf der Grundlage von intensiven rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen pflanzlicher Oberflächen in den letzten Jahrzehnten wurden zahlreiche Formen solcher Wachskristalle beschrieben und klassifiziert (z. B. Barthlott *et al.* 1998; Jeffree 2006). Dabei wird im Wesentlichen zwischen Körnchen, Plättchen, Stäbchen, Fäden und Röhrenchen unterschieden, wobei die einzelnen Formen oft art- oder sogar organspezifisch auftreten. Durch *in vitro*-Rekristallisierungsversuche konnte für ausgewählte Pflanzenarten gezeigt werden, dass jeweils charakteristische Komponenten bzw. Komponentenklassen für die Bildung der Kristalle und ihrer charakteristischen Formen verantwortlich sind (Jetter und Riederer 1994; Jetter und Riederer 1995; Meusel *et al.* 1999).



**Abbildung 1-5:** Schematischer Aufbau der Kutikula. **A:** Kutikula ohne epikutikuläre Wachskristalle. **B:** Kutikula mit epikutikulären Wachskristallen. CL = *cuticular layer* (Kutikularschicht); CP = *cuticle proper* (eigentliche Kutikula); EWF = epikutikulärer Wachsfilme; EWK = epikutikuläre Wachskristalle; IW = Intrakutikuläre Wachse; P = Pektinschicht/Mittellamelle; PL = Plasmalemma. (verändert nach Jeffree, 1986).



In den letzten Jahren wurden Methoden zur präparativen Fraktionierung epi- und intrakutikulärer Wachskomponenten entwickelt (Ensikat *et al.* 2000; Jetter *et al.* 2000b; Jetter und Schäffer 2001). Zur selektiven Gewinnung epikutikulärer Wachsbestandteile werden dabei oberflächennahe Substanzen mechanisch mit Hilfe eines Adhäsivs von den Pflanzenoberflächen abgehoben und so von intrakutikulären Wachskomponenten präparativ isoliert. Entsprechende Untersuchungen an *Prunus laurocerasus* (Jetter *et al.* 2000b), *Nepenthes alata* (Riedel *et al.* 2003) und *Macaranga tanarius* (Guhling *et al.* 2005) zeigten, dass sich die quantitativen wie auch die qualitativen Zusammensetzungen epi- und intrakutikulärer Wachsmischungen innerhalb einer Art eklatant voneinander unterscheiden können, so dass es zu einer auffälligen Differenzierung innerhalb der Kutikula bezüglich ihrer Wachskomponenten, gewissermaßen also zu einer chemischen Schichtung kommen kann.

Die Ausbildung einer Kutikula wird allgemein als evolutive Anpassung an das in terrestrischen Lebensräumen herrschende Gefälle des Wasserpotenzials zwischen dem Inneren des Pflanzengewebes und der Umgebung interpretiert. Sie stellt eine effektive Schutzvorrichtung gegen das Austrocknen dar (Burghardt und Riederer 2006). Durch das extraktive Entfernen der gesamten kutikulären Wachse aus Kutikularmembranen konnte deren Durchlässigkeit um mehrere Größenordnungen erhöht werden (Riederer 1991). Die Gesamtheit der kutikulären Wachse bildet also die wesentliche Barriere für den Transport von Wasser und anderen Stoffen durch die Kutikula (Riederer und Schreiber 1995). Die primäre physiologische Funktion sowohl der epi-, als auch der intrakutikulären Wachse besteht demnach in der Gewährleistung des Transpirationsschutzes der Pflanze. Im Gegensatz dazu können auf Grund der chemischen Eigenschaften kutikulärer Wachse zahlreiche lipophile Substanzen aus der Umgebung in Form gasförmiger, fester oder gelöster Stoffe absorbiert und in die Pflanze transportiert werden (Riederer und Schönherr 1986; Schönherr und Riederer 1989; Schreiber und Schönherr 1992).

Dagegen bestimmen insbesondere die epikutikulären Wachse bzw. Wachskristalle als äußerste Grenzschicht des Gewebes mit der Umwelt die Eigenschaften der unmittelbaren Pflanzenoberfläche. Epikutikuläre Wachskristalle reduzieren die Strahlungsintensität insbesondere ultravioletter Strahlung durch Teilreflexion (Clark und Lister 1975) und schützen das darunter liegende Gewebe auf diese Weise vor Strahlungsschäden (Caldwell *et al.* 1983). Wachskristalle können daneben die Verdunstung durch Bildung bewegungsfreier Luftschichten über Stomata verringern und somit zum Transpirationsschutz der Pflanze beitragen (Jeffree *et al.* 1971). Die lipophilen Eigenschaften des Wachses und die Entstehung mikroskopischer Rauigkeit durch Kristallbildung verringern die Benetzbarkeit von Pflanzenoberflächen durch Wasser (Holloway 1969; Holloway 1970), so dass die Bildung eines geschlossenen Wasserfilms verhindert wird. Diese reduzierte Benetzbarkeit bewirkt, dass Schmutzpartikel und Verbreitungseinheiten phytopathogener Mikroorganismen von der

---

Pflanzenoberfläche im Zuge eines Selbstreinigungsmechanismus durch Wasser entfernt werden (Lotus-Effekt) (Barthlott und Neinhuis 1997) und dass die Pflanze vor Pathogenen, die Feuchtigkeit zur Auskeimung benötigen, geschützt ist (Schwab *et al.* 1995).

Gerade die Wechselwirkungen mit anderen Organismen sind in vielfältiger Weise durch epikutikuläre Wachse bestimmt (Müller und Riederer 2005). So beeinflussen sie z. B. die Infektion der Pflanze durch phytopathogene Pilze in Phasen der Orientierung (Wilkinson und Roberts 1996) sowie der Adhäsion des Pilzes auf der Oberfläche (Deising *et al.* 1992; Nicholson *et al.* 1993; Mercure *et al.* 1994) und liefern chemische Signale im Zuge der Wirtserkennung durch den Pilz (Carver *et al.* 1990; Podila *et al.* 1993; Carver und Gurr 2006). Wachskristallbereifte Oberflächen spielen auf Grund ihrer biomechanischen Eigenschaften eine wichtige Rolle bei Pflanzen-Insekten-Interaktionen (Müller 2006). Generell können Insekten auf wachsbereiften pflanzlichen Oberflächen nur schlecht haften und laufen, die Oberflächen sind also rutschig und bilden eine Barriere für Insekten. Jedoch konnte bisher nur für drei Pflanzensysteme nachgewiesen werden, dass die epikutikulären Wachskristalle auf Grund dieser Eigenschaft eine definierte ökologische Funktion erfüllen und dahingehend evolutionär optimiert sind: a) Epikutikuläre Wachskristalle (z.B. bei *Hypernia vitifolia*) dienen mit ihrer Barriereeigenschaft für Schadinsekten dem Schutz wichtiger hochgelegener Organe wie Blüten oder Fruchständen, ein Phänomen, das als „greasy pole syndrome“ bezeichnet wurde (Harley 1991; Juniper 1995; Eigenbrode 1996). b) Seit langem ist bekannt, dass bei fleischfressenden Pflanzen der Gattung *Nepenthes* epikutikuläre Wachskristalle in der Gleitzone der Kannen das Ausrutschen von Beuteinsekten bewirken (Knoll 1914) und damit ein zentrales Element für den Beutefang darstellen. c) Vor einigen Jahren konnte ein weiteres Beispiel für eine wichtige ökologische Funktion epikutikulärer Wachskristalle beschrieben werden, und zwar innerhalb der Ameisenpflanzen-Gattung *Macaranga* (Federle *et al.* 1997). Wachskristallbereifte Oberflächen fungieren hier als mechanische Barriere für aggressive, generalistische Ameisen, während sich spezifische Partnerameisen der Pflanzen frei auf der Kristallschicht bewegen, so dass Kristalle hier eine wesentliche ökologische Filterfunktion übernehmen.

### 1.3 Triterpene als kutikuläre Wachskomponenten

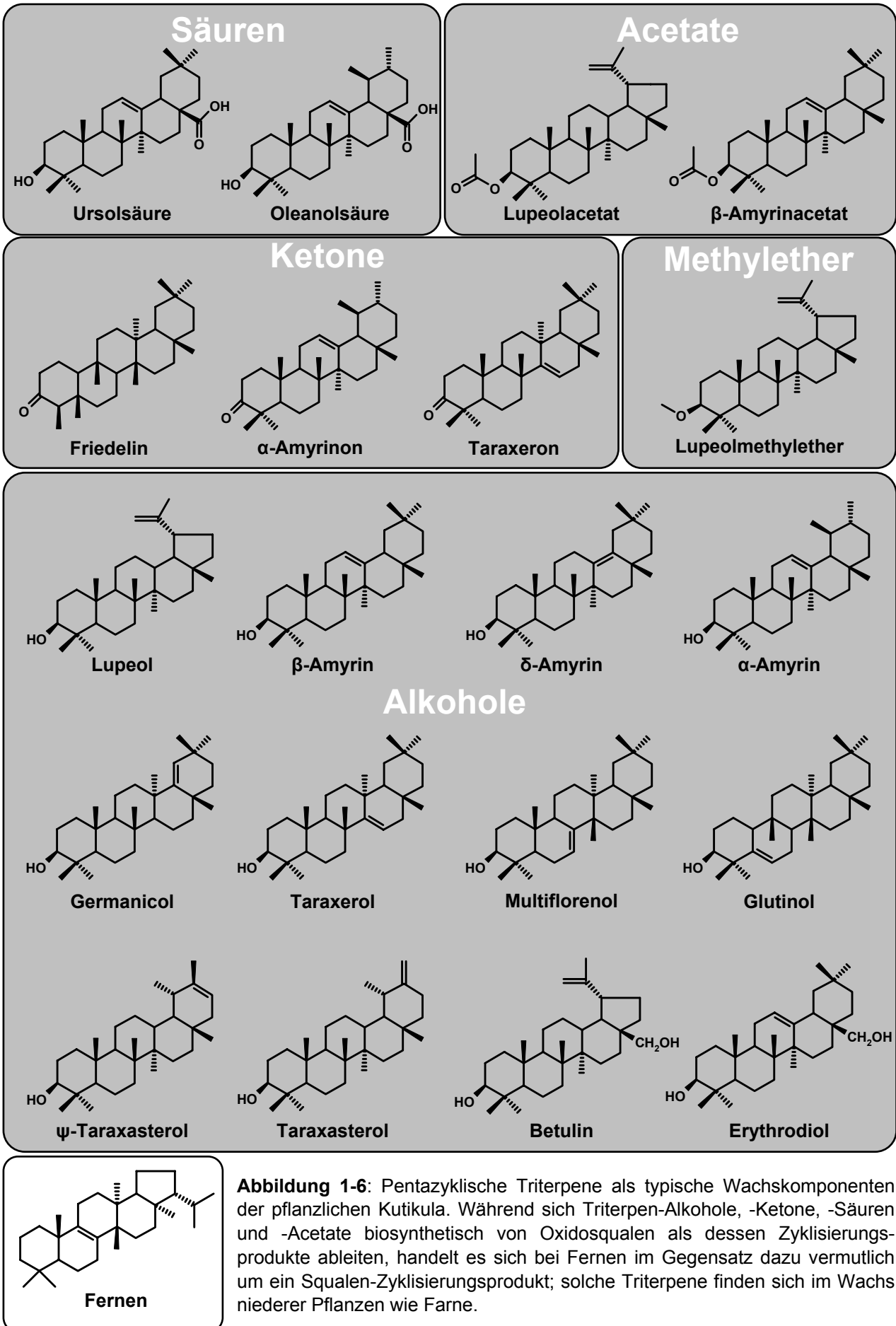
Zahlreiche Pflanzenarten akkumulieren pentazyklische Triterpen-Verbindungen in charakteristischen und artspezifischen Mischungen als Wachsbestandteile in ihrer Kutikula. Aus der großen Menge triterpenoider Kohlenstoffstrukturen mit mehr als 200 bekannten C-Grundgerüsten (Xu *et al.* 2004) findet sich im Kutikulawachs höherer Pflanzen jedoch nur eine relativ geringe Anzahl verschiedener Vertreter dieser Verbindungsklasse. Es handelt sich dabei meist um pentazyklische Triterpene vom Lupan-, Oleanan- oder Ursantyp,

---

gekennzeichnet durch das Vorhandensein von fünf kondensierten Kohlenstoffringen. Relativ weit verbreitete Verbindungen stellen die Triterpenole Lupeol,  $\beta$ -Amyrin,  $\alpha$ -Amyrin oder Germanicol dar (Walton 1990). Immer wieder erweitern Untersuchungen der Wachszusammensetzung verschiedener Pflanzenarten jedoch die Palette der kutikularen relevanten Triterpenoide, wie z. B. bei *Lycopersicon esculentum* mit  $\delta$ -Amyrin als eine der Wachshauptkomponenten der Fruchtkutikula (Vogg *et al.* 2004). Daneben lassen sich aber auch Verbindungen vom Taraxeran-Typ (bei *Macaranga* (Markstädter *et al.* 2000)) oder vom Glutinan-Typ (bei *Euphorbia* (Hemmers *et al.* 1989a)) nachweisen.

Neben diesen Triterpenolen, die allesamt durch die Hydroxyl-Funktion in 3 $\beta$ -Position gekennzeichnet sind, finden sich Vertreter entsprechender Ketone im kutikulären Wachsgemisch, z. B. Friedelin bei *Citrus paradisi* (Nordby und McDonald 1994) oder Germanicon bei *Xerosicyos danguyi* (Wollenweber *et al.* 1999). Daneben konnten außerdem C28-Oxidationsprodukte wie Betulin (Wollenweber *et al.* 1999) oder Erythrodiol (Griffiths *et al.* 2000) im pflanzlichen Oberflächenwachs identifiziert werden, sowie die entsprechenden Hydroxysäuren Oleanol- und Ursolsäuren, z.B. bei Oliven-Früchten (Bianchi *et al.* 1992) oder bei *Prunus laurocerasus* (Jetter *et al.* 2000). Schließlich wurden verschiedene Derivate pentazyklischer Triterpene als Kutikulabestandteile beschrieben, darunter Acetate (z. B.  $\beta$ -Amyrinacetat bei *Tilia tomentosa* (Gülz *et al.* 1988)), mit langkettigen Fettsäuren von C<sub>16</sub> bis C<sub>30</sub> veresterte Triterpene (z. B.  $\beta$ -Amyrin-Ester bei *Euphorbia lathyris* (Hemmers *et al.* 1989b)) oder Triterpenmethylether (z. B. Lupeolmethylether bei Palmengewächsen wie *Butia capitata* (Garcia *et al.* 1995) oder bei Arten der Gattung *Cortaderia* aus der Familie der Gramineae (Martin-Smith *et al.* 1967)). Eine Auswahl von Strukturbeispielen verschiedener Triterpen-Wachskomponenten bietet Abbildung 1-6.

Bei manchen Pflanzenarten, wie der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana*, treten Triterpene nur in Spuren oder geringen Mengen in Erscheinung, während sie bei anderen Arten die kutikulären Wachsmischungen als Hauptkomponenten dominieren (Jetter *et al.* 2006). Viele Arten der Ameisenpflanzen-Gattung *Macaranga* aus der Familie der Euphorbiaceae beispielsweise weisen hohe Konzentrationen der Triterpene Taraxeron und Epi-Taraxerol im kutikulären Wachs ihrer Sprossachsen auf (Markstädter *et al.* 2000). Auch bei anderen Arten der Wolfsmilchgewächse lassen sich große Mengen Triterpene im kutikulären Wachs nachweisen, wie bei Arten der Gattung *Euphorbia* (Hemmers *et al.* 1988) oder bei der Nutzpflanze *Manihot esculenta* (Markstädter *et al.* 2000). Darüber hinaus finden sich hohe Triterpenanteile bei Vertretern aus vielen anderen Pflanzenfamilien, wie den Crassulaceae (z. B. in den Gattungen *Kalanchoe* (R. Jetter, unveröffentlichte Daten), *Echeveria* und *Dudleya* (Manheim und Mulroy 1978)), den Bignoniaceae (im Blattwachs von *Newbouldie laevis* und *Markhamia acuminata* dominieren die Triterpene Ursol- und Oleanolsäure mit bis zu 60% des Gesamtwachses (Gormann *et al.* 2004)), oder den Loran-



**Abbildung 1-6:** Pentazyklische Triterpene als typische Wachskomponenten der pflanzlichen Kutikula. Während sich Triterpen-Alkohole, -Ketone, -Säuren und -Acetate biosynthetisch von Oxidosqualen als dessen Zyklisierungsprodukte ableiten, handelt es sich bei Fernen im Gegensatz dazu vermutlich um ein Squalen-Zyklisierungsprodukt; solche Triterpene finden sich im Wachs niederer Pflanzen wie Farne.

thaceae (bei *Viscum album* und *V. crutiatum* besteht der größte Anteil des kutikulären Wachses aus Triterpensäuren (Haas *et al.* 2003)). Diese wenigen Beispiele verdeutlichen bereits, dass das Vorkommen pentazyklischer Triterpene im kutikulären Wachs höherer Pflanzen taxonomisch weit verbreitet ist (Übersicht in Bianchi 1995; Jetter *et al.* 2006)), und ein, wenn auch nicht dem Regelfall entsprechendes, so doch nicht seltenes Phänomen darstellt.

Nicht nur bei Angiospermen, auch bei Farngewächsen treten pentazyklische Triterpene als Hauptbestandteile des Kutikulawachses in Erscheinung. *Adiantum pedatum* weist hohe Mengen an Adiantan-22-on auf, während bei *Belvisia platyrhynchos* und *Polypodium aureum* Fern-8-en die Hauptkomponente stellt (R. Jetter, unveröffentlichte Daten). Im Blattwachs von *Lophosoria quadripinnata* wurden u. a. die Triterpenoide Fern-9(11)-en sowie Dryocrassol identifiziert (Tanaka *et al.* 1992). Interessanterweise zeigen diese Terpenoide keine funktionelle Gruppe am C3-Atom. Vermutlich handelt es sich bei diesen Substanzen um Zyklisierungsprodukte von Squalen; der Biosyntheseweg dieser Verbindungen würde demnach nicht über eine Oxidosqualenzyklase vermittelte Zyklisierung des Squalen-Epoxids verlaufen, sondern dem in Bakterien verbreiteten Syntheseweg der Hopanoide entsprechen.

Hohe Triterpenanteile im kutikulären Wachs korrelieren oftmals mit dem Vorhandensein epikutikulärer Wachskristalle. Dies ist z. B. bei kristallbereiften Individuen von *Dudleya farinosa* und *D. brittonii* der Fall, wohingegen bei *Dudleya*-Individuen ohne Wachskristalle langkettige aliphatische Komponenten dominieren (Manheim und Mulroy 1978). Eine ähnliche Korrelation lässt sich auch bei der Felsen-Fetthenne *Sedum rupestre* beobachten (Stevens *et al.* 1994). Die Ausbildung von Wachskristallen auf Blattwedeln des Farns *Polypodium aureum* lässt sich durch die hohen Fernen-Konzentrationen im Wachs erklären (Barthlott und Wollenweber 1981). Für *Macaranga tanarius* konnte gezeigt werden, dass die fadenförmigen Wachskristalle auf Sprossachsen und Blattstielen aus  $\beta$ -Amyrin bestehen (Guhling 2002). Mit Blick auf diese Beobachtungen erscheint es deshalb plausibel, dass hohe relative und absolute Mengen von Triterpenen im kutikulären Wachs generell zur Ausbildung von Kristallstrukturen auf der Oberfläche führen. Als Wachskristallbildner übernehmen Triterpene damit wichtige Funktionen bei der Gestaltung und Beeinflussung von Oberflächen- bzw. Grenzflächeneigenschaften von Pflanzen (siehe 1.2).

Ein interessanter Effekt im Zusammenhang mit der ökologischen Bedeutung von kutikulären Triterpenen bei Herbivoren konnte an der afrikanischen Blattkäferart *Platyphora kollari* beobachtet werden. Diese Tiere nehmen  $\beta$ -Amyrin auf, das als kutikuläre Wachskomponente in Blättern ihrer Futterpflanze *Ipomoea batatas* vorkommt. Fütterungsexperimente zeigten, dass die Triterpenkomponente von den Käfern für die Biosynthese von Triterpensaponinen verwendet wird, die in Abwehrdrüsen eingelagert zur Verteidigung gegen Fraßfeinde dienen (Laurent *et al.* 2003).

---

## 1.4 Aufgabenstellung

In der jüngsten Vergangenheit konnte ein tieferes Verständnis für die enzymatisch gesteuerte Biosynthese pflanzlicher Triterpene durch die Klonierung und Charakterisierung entsprechender pflanzlicher Triterpensynthasen entwickelt werden. Die Biosynthese kutikulärer pentazyklischer Triterpene unter Berücksichtigung des/der in diesen Prozess involvierten Gens/Gene war bislang jedoch nicht Gegenstand eingehender wissenschaftlicher Forschungsarbeit gewesen. Für einen Nachweis einer solchen Kutikularelevanz müssen Triterpensynthese-Gene aus geeigneten Modellpflanzen kloniert und charakterisiert, und die produktspezifischen Eigenschaften und Expressionsmuster dieser Enzyme mit den Ergebnissen eingehender analytischer Untersuchungen zur kutikulären Wachsbildung an diesen Pflanzen in Beziehung gesetzt werden. Um dies zu verwirklichen, wurde in der vorliegenden Arbeit die Rizinuspflanze aus der Familie der Euphorbiaceae verwendet. *Ricinus communis* schien ein viel versprechendes Modellsystem für die Untersuchung der Biosynthese kutikulärer Wachse zu sein, da in Vorversuchen gezeigt wurde, dass die Wachsmischung der Sprossachsen-Kutikula von Triterpen-Verbindungen dominiert wird. Außerdem treten Individuen dieser Art sowohl mit als auch ohne wachsbereiften Stammoberflächen in Erscheinung, also in der Ausprägung zweier unterschiedlicher Stammkutikula-Phänotypen. Dies ermöglichte eine vergleichende Untersuchung der Kutikulaphänotypen sowohl auf analytischer, als auch auf molekularbiologischer Ebene. Ziele der Arbeiten an *Ricinus communis* waren daher

- (a) die mikromorphologische und chemische Charakterisierung beider Stammkutikula-Phänotypen;
  - (b) die Untersuchung der Akkumulation kutikulärer Triterpene im Laufe der Stammentwicklung beider Phänotypen sowie der Beteiligung von Triterpen-Verbindung(en) an der Ausbildung epikutikulärer Wachskristalle;
  - (c) die sequenzhomologie-basierte Klonierung der Gensequenzen von 2,3-Oxid-squalenzyklasen bzw. Triterpensynthasen mit Hilfe eines geeigneten Primerdesigns;
  - (d) die Charakterisierung der Produktspezifität dieser Enzyme mittels heterologer Expression in Hefezellen;
  - (e) die Untersuchung der Expressionsmuster der klonierten *Ricinus*-Gene in verschiedenen Organen und im Laufe der Ontogenese des Hypokotyls der Pflanze, um so korrelative Evidenz für die Kutikula-Spezifität der Zyklenen zu erhalten.
-

Darüber hinaus sollte das entwickelte Primerdesign zur Klonierung und das etablierte Hefe-System zur Charakterisierung von weiteren kutikularelevanten Triterpensynthesen aus anderen Pflanzensystemen verwendet werden. Hierfür wurde mit *Lycopersicon esculentum* zunächst eine Art ausgewählt, die aufgrund ihres Kutikula-Triterpenspektrums die Klonierung von Triterpensynthesen mit bislang nicht charakterisierter Produktspezifität verspricht: *L. esculentum* akkumuliert im kutikulären Wachs der Früchte neben  $\beta$ - und  $\alpha$ -Amyrin vor allem  $\delta$ -Amyrin. Für ein tieferes Verständnis der Beteiligung einzelner Aminosäurereste am Zyklisierungsmechanismus und damit an der Produktspezifität von Triterpensynthesen sollte eine Triterpensynthase schließlich exemplarisch gerichtet mutagenisiert werden (Site-directed mutagenesis).

---

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Pflanzenmaterial

#### 2.1.1 *Ricinus communis* L.

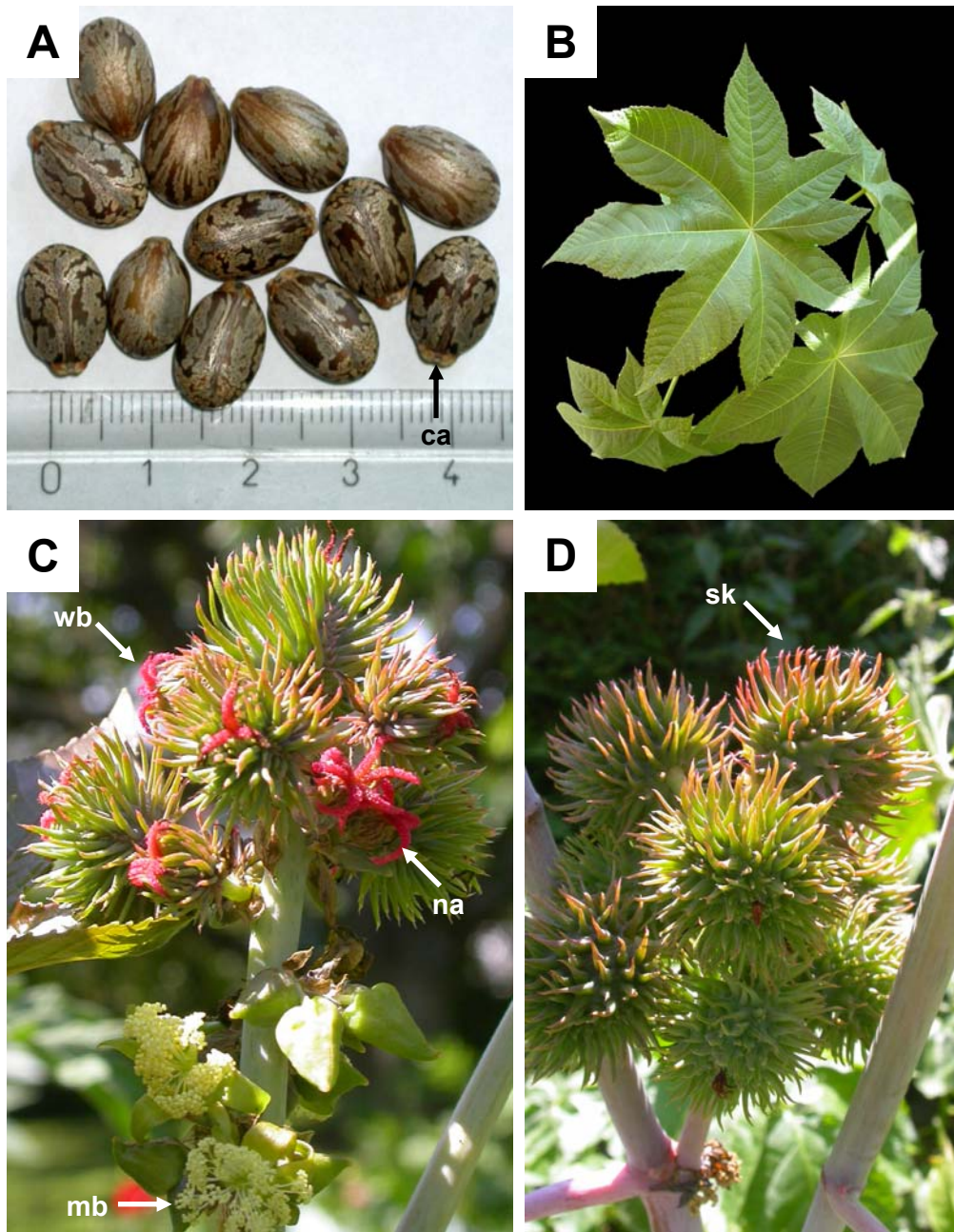
Die monotypische Gattung *Ricinus* gehört zur Familie der Euphorbiaceae (Wolfsmilchgewächse), einer schwerpunktmäßig tropischen Familie, die mit ihren ca. 7500 Arten in 300 Gattungen eine beträchtliche Diversität aufweist: von breitblättrigen Bäumen des tropischen Regenwaldes über Vertreter gemäßigter Klimazonen bis hin zu Stammsukkulenten arider Klimate.

Die auch als Wunder-, Hunds-, Kreuz- und Läusebaum oder Christuspalme bezeichnete Rizinuspflanze *Ricinus communis* (lat. *ricinus* = Zecke, griech. *rikinos* = Wunderbaum) war vermutlich ursprünglich in Asien und Afrika beheimatet. Ihre Samen fanden sich in ägyptischen Gräbern aus der Zeit um 4000 v. Chr. - sie zählt damit zu den ältesten bekannten Arzneipflanzen (Simpson und Ogorzaly 2001). Heute ist die Pflanze weltweit verbreitet und wird, obwohl bevorzugt in den Tropen und Subtropen, auch in gemäßigten Klimaten zur Gewinnung des Rizinusöls angebaut. *Ricinus communis* wird in unseren Breiten, einjährig kultiviert, zwei bis drei Meter hoch, in den tropischen Heimatgebieten entwickelt sich die Pflanze dagegen zu einem bis zu 13 m hohen Baum. Die Pflanzen tragen große, gezähnte, lang gestielte und handförmig gelappte Blätter und entwickeln sich sympodial, d. h., jede Achse endet in einer terminalen ährigen Infloreszenz, die von einer unterhalb austreibenden Seitenachse übergipfelt wird. Der Blütenstand der einhäusigen, aber zweigeschlechtlichen und vorzugsweise windbestäubten Rizinuspflanze bildet im unteren Teil büschelig gehäufte und bäumchenartig verzweigte männliche Blüten aus, darüber endständige weibliche Blüten, die dreifächrige Fruchtknoten mit drei zweispaltigen roten Narbenästen aufweisen (Abb. 2-1). Die Frucht besteht aus einer walnussgroßen, mit weichen Stacheln besetzten Kapsel mit je drei bohngroßen Samen. Die Samen sind von einer bräunlich marmorierten Schale umgeben und tragen an der Mikropyle einen warzigen Anhang, die sog. Caruncula (Abb. 2-1).

Rizinussamen enthalten das hochtoxische Polypeptid Ricin (Toxalbumin), eines der giftigsten Eiweißkörper überhaupt. Das ausgepresste Rizinusöl ist dagegen praktisch ungiftig, da das Ricin bei der Herstellung in den eiweißreichen Pressrückständen verbleibt. Rizinusöl dient unter anderem als antiresorptiv und sekretagog wirkendes Abführmittel (durch die Hydroxyfettsäure Ricinolsäure). Zudem werden daraus hochwertige technische Öle hergestellt, die für Weichmacher, Polyamide, Lösungsmittel, Lacke, Farben, Schmiermittel, Hydraulikflüssigkeiten und Kosmetika verwendet werden.

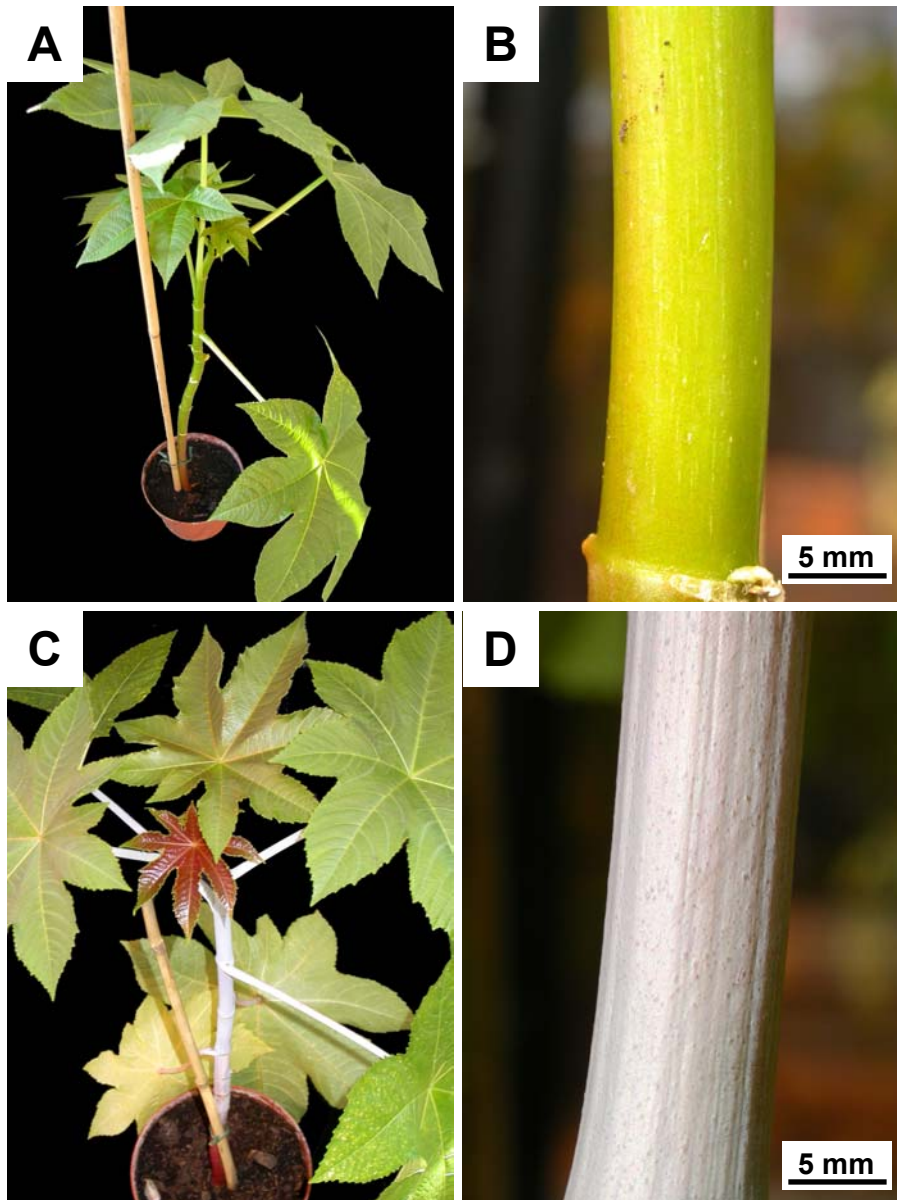
---





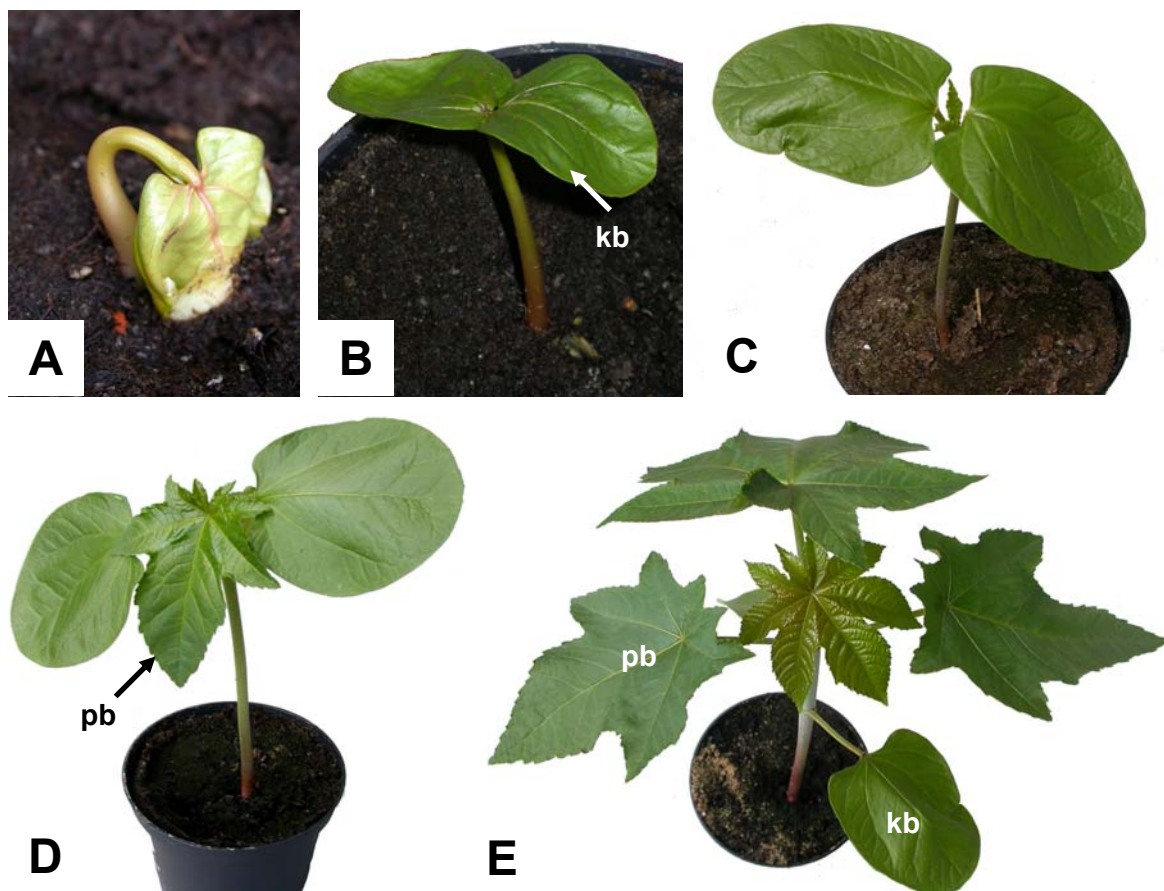
**Abbildung 2-1:** *Ricinus communis*. **A:** Samen. **B:** Blattstruktur. **C:** Blütenstand. **D:** Fruchtstand. ca = Caruncula; mb = männliche Blüte; na = Narbenast; sk = Samenkapsel; wb = weibliche Blüte.

Blatt- und Sprossoberflächen von Rizinuspflanzen weisen eine jeweils einheitlich grünliche oder rötliche Färbung auf. Daneben kann man jedoch Individuen beobachten, die zwar ähnliche Blattoberflächen aufweisen, sich jedoch im Aussehen ihrer Sprossachsen und Blattstiele unterscheiden. Neben dem normalen Spross-Phänotyp mit glänzend-grünen oder roten Sprossen (Glossy-Phänotyp), treten Individuen mit weißlich matten Sprossen auf (Glaucous-Phänotyp), hervorgerufen durch die Auflagerung eines kutikulären Wachsbelages auf der Sprossoberfläche (Abb. 2-2).



**Abbildung 2-2:** Sprossachsen-Phänotypen von *R. communis*. **A** und **B**: Glossy-Phänotyp. **C** und **D**: Glaucous-Phänotyp mit wachsbereiften Stammoberflächen.

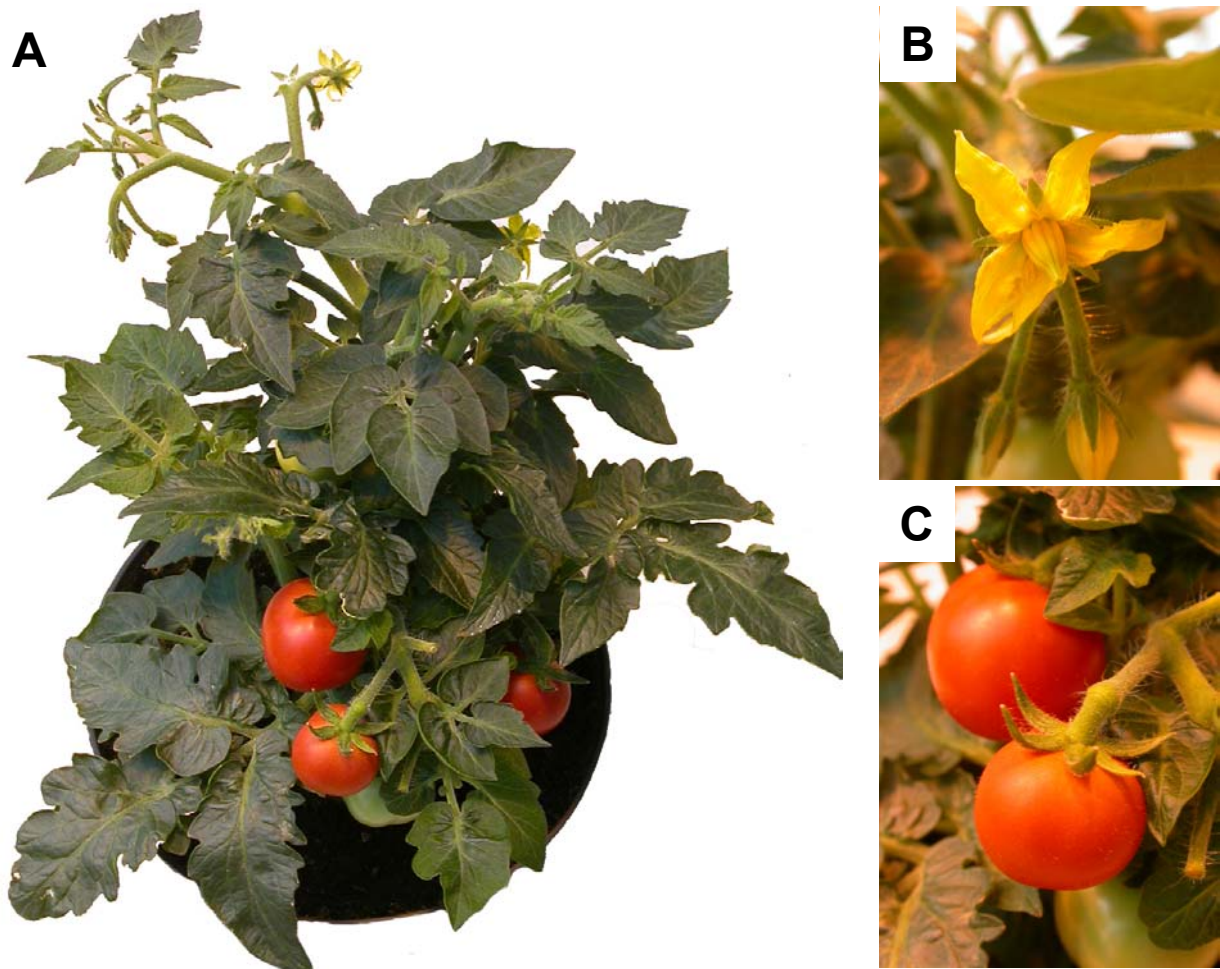
Der jeweilige Stamm-Phänotyp blieb während der Individual-Entwicklung stabil, war spätestens sechs Tage nach dem ersten Erscheinen des Keimlings an der Oberfläche erkennbar und entwickelte sich unabhängig von den Anzuchtbedingungen. Die Versuchspflanzen wurden im Gewächshaus des Lehrstuhls für Botanik II der Universität Würzburg aus homogenem Samenmaterial unter gleichen Bedingungen gezogen und segregierten in einem Verhältnis von 3:1 (Glossy : Glauous) bezüglich ihres Stamm-Phänotyps. Um Pflanzen in verschiedenen Altersstadien (Abb. 1-3) beider Phänotypen zur Verfügung zu haben, wurden über mehrere Wochen hinweg wöchentlich sechs bis zwölf Samen von *Ricinus communis* einzeln in Töpfen 1 cm unter die Oberfläche ausgesät, nachdem sie zuvor mehrere Stunden in Wasser gequellt wurden. Der Tag, an dem der Keimling erstmals an der Erdoberfläche erkennbar war, wurde für das Pflanzenalter als Tag 1 definiert. In den Gewächshäusern des Botany Department der University of British Columbia, Vancouver, Kanada, wurde unter den gleichen Anzuchtbedingungen wie in Würzburg ebenfalls Rizinuspflanzen angezogen, wobei hier die Kultivare Sanguineus (Glossy-Phänotyp) und Baker (Glauous-Phänotyp) ausgesät wurden.



**Abbildung 2-3:** Verschiedene Altersstadien (Tage nach Keimung) von *Ricinus communis*. **A:** 2 Tage. **B:** 4 Tage. **C:** 9 Tage. **D:** 17 Tage. **E:** 42 Tage. kb = Keimblatt; pb = Primärblatt.

### 2.1.2 *Lycopersicon esculentum* MILL. Cv. Micro-Tom

Tomatenpflanzen des Kultivars Micro-Tom (Abb. 2-4) wurden in einer Wachstumskammer (14/10 h Tag/Nacht Rhythmus mit 22/18°C Temperaturunterschied und konstanten 75% rel. Luftfeuchte) des Instituts für Botanik II an der Universität Würzburg bzw. in den Gewächshäusern des Botany Department der University of British Columbia, Vancouver, Kanada gezogen.



**Abbildung 2-4:** *Lycopersicon esculentum* cv. Micro-Tom. **A:** Gesamt-Habitus. **B:** Blüte. **C:** Frucht.

## 2.2 Präparation kutikulärer Wachse von *Ricinus communis*

Um dem geschichteten Aufbau der Kutikula bei der qualitativen und quantitativen Analyse ihrer Wachskomponenten Rechnung zu tragen, müssen epi- und intrakutikuläre Wachse getrennt untersucht werden (siehe 1.2). Für solch eine getrennte Analyse bietet sich folgendes Versuchs-Design an: Die epikutikulären Wachse werden zunächst von der Oberfläche mechanisch abgehoben, wobei mehrere Abhebeschritte garantieren, dass sämtliche epikutikulären Wachse gewonnen werden. Anschließend werden die intrakutikulären Wachskomponenten der abgehobenen Oberflächen extraktiv gewonnen. Die Analysen aus diesen Proben können mit Untersuchungen verglichen werden, bei denen mit Hilfe einer Gesamtextraktion alle kutikulären Wachse präpariert werden.

### 2.2.1 Extraktion kutikulärer Wachse

Für die Extraktion der Hypokotyloberflächen von *Ricinus communis* wurden mit Hilfe einer Rasierklinge mehrere Zentimeter lange Stücke aus dem oberen Teil direkt unter den Keimblättern herausgeschnitten und auf eine Präpariernadel gesteckt. Auf diese Weise konnte das gesamte Hypokotylstück in einem mit Chloroform gefüllten 16 ml-Gläschen für 60 s extrahiert werden. Dabei wurden die Schnittkanten mit blasenfreiem Gummi arabicum (1 mg/ml-Lösung; Roth, Karlsruhe, Deutschland) verschlossen, das aufgrund seines Wassergehaltes ein Eindringen des Chloroforms in das Hypokotylinnere verhinderte. Die Oberflächen der extrahierten Hypokotylstücke wurden anschließend bestimmt, indem die Länge  $h$  und der Durchmesser der Fragmente mit einer digitalen Schieblehre vermessen wurden. Indem die Fragmente näherungsweise als zylindrische Körper angesehen wurden, konnte die beprobte Fläche ermittelt werden:

$$\text{Fläche} = 2 \cdot \pi \cdot r \cdot h$$

Nach Zugabe von  $n$ -Tetracosan als internem Standard (ISTD) wurde die Lösung in einem Reactitherm-Heizgerät (Pierce, Rockford, USA) mit aufgesetzter Reactivap-Ausblasevorrichtung bei 60°C mittels eines leichten Stickstoffstroms auf ein Volumen unter 1 ml eingeeengt und in ein Reaktionsgefäß mit konischer Bohrung (Reactivap, Altmann Analysetechnik, Deutschland) überführt. In diesem Gefäß wurde die Probe vollständig unter einem leichten Stickstoffstrom bei 60°C getrocknet.

### 2.2.2 Gewinnung epikutikulärer Wachse

Für die selektive Gewinnung epikutikulärer Wachskomponenten müssen diese von Oberflächen mit einem Adhäsiv wie einer wässrigen Lösung von Gummi arabicum mechanisch abgehoben werden. Gummi arabicum ist ein an der Luft erhärtendes

---

gummiartiges, pflanzliches Exsudat, das aus der Rinde verschiedener *Acacia*-Arten gewonnen wird und als Strukturpolysaccharid überwiegend aus Galactose- und Glucuronsäure-Resten, daneben auch aus Arabinose und Rhamnose aufgebaut ist (Bickel-Sandkötter 2001). Ein entscheidender Vorteil bei der Verwendung von Gummi arabicum für das Abheben epikutikulärer Wachse liegt in der Tatsache, dass es auch bei nicht planen Oberflächen wie Sprossachsen verwendet werden kann. Der Abhebevorgang kann an derselben Stelle grundsätzlich mehrfach durchgeführt werden, so dass mit jeder Wiederholung ein weiterer Teil der epikutikulären Wachsschicht gewonnen wird, bis idealerweise alle epikutikulären Wachse abgehoben sind. Zur Herstellung der Gummi arabicum-Lösung wurde 0,8 g Gummi arabicum, das zuvor mit heißem Chloroform extrahiert wurde, in 1 ml deionisiertem Wasser gelöst. Die Lösung wurde jeweils direkt nach der Herstellung für die Versuche eingesetzt. Für die Abhebeversuche wurden wie für die Totalextraktion mehrere Zentimeter lange Rizinus-Hypokotylstücke herausgeschnitten und auf Stecknadeln, die in Styropor fixiert waren, aufgesteckt. Die Hypokotylstücke wurden mit einem Pinsel mit Gummi arabicum-Lösung bestrichen. Nach 60 min Lufttrocknung wurde die erhärtete Gummi arabicum-Haut mit einer Federstahlpinzette abgeblättert. Dieser Abhebevorgang wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Die in der Kutikula verbliebenen Wachse wurden anschließend durch eine Extraktion wie oben beschrieben gewonnen (Nachextraktion). Die getrockneten Gummi arabicum-Fragmente aus den einzelnen Präparationsschritten wurden in ein 16 ml-Gläschen überführt, das ein Zweiphasengemisch aus jeweils 6 ml deionisiertem Wasser und 4 ml Chloroform enthielt. In die Chloroform-Phase wurde zuvor eine definierte Menge ISTD zugegeben. Nach kräftigem Ausschütteln, Entnahme der organischen Phase, ihrer Überführung in ein 15 ml-Gläschen und einer zweimaligen Wiederholung des Vorgangs wurden die vereinigten Chloroform-Phasen mit einer Spatelspitze Natriumsulfat getrocknet. Im Anschluss an die Filtration durch einen Faltenfilter wurde die Lösung in einem Reactitherm-Heizgerät bei 60°C unter einem leichten Stickstoffstrom auf ein Volumen unter 1 ml eingeeengt und in ein Reactival überführt. In diesem Gefäß wurde die Probe vollständig mit Stickstoff getrocknet.

## **2.3 Qualitative und quantitative Analysetechniken**

### **2.3.1 Derivatisierung**

#### **2.3.1.1 Silylierung**

Die Extrakte wurden vor der gaschromatographischen und massenspektrometrischen Analyse chemisch modifiziert. Zwischen polaren, organischen Verbindungen, die aktive Wasserstoffatome in Hydroxyl- bzw. Carboxylfunktionen enthalten, und der stationären

---

Phase der Kapillarsäule können starke Wechselwirkungen auftreten. Deshalb ist eine Derivatisierung nötig, um die gaschromatographische Auftrennung zu verbessern. In der vorliegenden Arbeit wurden sämtliche Proben einheitlich für die Gaschromatographie vorbereitet, indem relativ leichtflüchtige und thermisch stabile Silylderivate hergestellt wurden. Die entstehenden Derivate haben zudem den Vorteil, dass ihre Massenspektren in der Regel strukturanalytisch wesentlich ergiebiger sind als die Ausgangsverbindungen. Bei der Silylierung werden alle Verbindungen, die OH-Funktionen enthalten, wie z.B. Alkohole und Säuren, in ihre Trimethylsilyl-Derivate überführt. Typisch für alle Trimethylsilyl-Verbindungen sind die leichte Abspaltung einer Methylgruppe ( $M^+ - 15$ ), der Verlust von  $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$  ( $M^+ - 72$ ) und das Auftreten der Bruchstücke  $m/z$  75 und 73 (Seibl 1970).

Für die Silylierungsreaktion wurden die in den Reactivials vollständig getrockneten Wachsextrakt-Proben (siehe 2.2.1 und 2.2.2) mit je 10  $\mu\text{l}$  *N,N*-bis(trimethylsilyl)-trifluoacetamid (BSTFA; Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) und getrocknetem Pyridin (>99,5%, Wassergehalt <0,01%, Merck, Darmstadt, Deutschland) versetzt und für 30 min bei 70°C im Heizblock zur Reaktion gebracht. Nach dem Abkühlen wurden die Proben mit Chloroform auf ein definiertes Volumen aufgefüllt.

### 2.3.1.2 Acetylierung

Für die Interpretation massenspektrometrischer Daten kann es sehr hilfreich sein, Massenspektren von verschiedenen Derivaten derselben Substanz miteinander zu vergleichen. Aus diesem Grund wurde ein Zyklisierungsprodukt von RcCAS1 acetyliert. Bei dieser chemischen Modifizierung werden im Idealfall alle Hydroxylgruppen in Essigsäureester überführt.

Für die Reaktion wurde die Dünnschichtbande, die die zu derivatisierende Substanz enthielt, von der Platte entnommen und mit Chloroform extrahiert. Der Extrakt wurde unter einem leichten Stickstoffstrom im Heizblock bei 60°C getrocknet und die Probe anschließend mit jeweils 10  $\mu\text{l}$  Essigsäureanhydrid (Alltech, Deerfield, USA) und 10  $\mu\text{l}$  getrocknetem Pyridin versetzt. Der Ansatz wurde für 5 min bei 70°C im Heizblock zur Reaktion gebracht und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Probe silyliert (siehe 2.3.2) und massenspektrometrisch analysiert (siehe 2.3.4).

## 2.3.2 Gaschromatographie und Massenspektrometrie

Die Trennung der einzelnen Komponenten der Wachsgemische von *Ricinus communis* bzw. der Hefe-Gesamtextrakte erfolgte mit druck- und temperaturprogrammierten (Tab. 2-1) Gaschromatographen (Hewlett Packard 5890 II, Avondale, Pennsylvania, USA) mit on-column-Injektoren. Die einzelnen Verbindungen wurden mit Hilfe eines Flammenionisations-

---

detektors (FID) quantifiziert bzw. mittels eines Mass Selective Detectors (MSD; Hewlett Packard 5971,  $m/z$  50-650, Ionisationsenergie 70 eV) identifiziert. Als Trägergas diente Wasserstoff (FID) bzw. Helium (MSD), das Injektionsvolumen betrug 1  $\mu\text{l}$ . Bei einer Vielzahl von Proben kam bei der Injektion ein automatischer Probengeber zum Einsatz. Der FID wurde mit Wasserstoff und Luft als Brennergase betrieben. Die Trennung erfolgte auf einer DB-1 fused-silica-Kapillarsäule (Länge: 30 m; Durchmesser: 320  $\mu\text{m}$ ; J&W Scientific, Folsom, California, USA) mit einer vorgeschalteten 3 m langen Vorsäule.

**Tabelle 2-1:** Werte der Temperatur- und Druckprogrammierung der für die quantitative und qualitative Analyse verwendeten Gaschromatographen.

Analyse- methode	Temperatur- programmierung			Druck- programmierung		
	Temp. [°C]	Zeit [min]	Rate [°C/min]	Druck [kPa]	Zeit [min]	Rate [°C/min]
GC-FID	50	2	40	50	5	3
	200	2	3	150	30	
	320	30				
GC-MS	40	2	40	10	1	5,5
	200	2	3	50	35	
	320	30				

Die massenspektrometrische Identifikation der Verbindungen erfolgte anhand von Vergleichen der gewonnenen Spektren mit authentischen Standards. Hierfür standen mehrere Datenbanken mit massenspektrometrischen Daten zur Verfügung (Nist02, Wachseei). Die quantitative Auswertung der FID-Chromatogramme wurde anhand der Peakflächen der Einzelkomponenten vorgenommen. Für diese Quantifizierung war eine interne Standardisierung der Proben notwendig. Hierzu wurde den einzelnen Wachsextrakt-Proben eine genau definierte Masse an internem Standard ( $m_{\text{ISTD}}$ ) zugegeben. Als ISTD diente eine *n*-Tetracosan-Lösung, die in einer Stammlösungs-Konzentration von 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  zur Verfügung stand. Aus dem Verhältnis der Peakflächen in einem Chromatogramm konnte so die Masse anderer Verbindungen ( $m_{\text{Probe}}$ ) berechnet werden:

$$m_{\text{Probe}} = \frac{A_{\text{Probe}} \cdot m_{\text{ISTD}}}{A_{\text{ISTD}}}$$

Für die Quantifizierung der einzelnen Wachsbestandteile wurden die Peakflächen mit der Analyse-Software HP GC Chemstation A.06.01 integriert.

### 2.3.3 Dünnschichtchromatographie (TLC)

Die TLC (thin layer chromatography) stellt ein relativ simples chromatographisches Verfahren dar, bei dem Komponenten nach ihrer Polarität aufgetrennt werden, und eignet



sich sehr gut, um relativ große Substanzmengen aufzureinigen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Dünnschichtchromatographie vor allem zur quantitativen Präparation der Zyklisierungsprodukte der charakterisierten Oxidosqualenzuklasen verwendet. Hierfür wurden Hefe-Gesamtextrakte auf eine TLC-Platte (20x20 cm, SilicaGel 60, Schichtdicke 0,5 mm; Merck, Darmstadt, Deutschland) aufgetragen. Zusätzlich wurden am Rand der Platte 5 µl eines Standard-Gemisches, bestehend aus Ergosterol, Lupeol und C<sub>27</sub>-Keton (10 mg/ml pro Einzelkomponente), aufgetragen. Die Dünnschichtplatte wurde mittels Sandwichtechnik entwickelt (mobile Phase: Benzol/Aceton 19:1; ca. 50 min, Laufstrecke ca. 10 cm), nach der Trocknung mit Primulin-Lösung (Spatelspitze Primulin in 2 ml Wasser gelöst + 200 ml Aceton) besprüht und unter UV-Licht bei 366 nm betrachtet. Die detektierten Banden wurden mit einem Bleistift markiert, anschließend ausgekratzt, zweimal mit 5 ml Chloroform extrahiert und durch einen Faltenfilter filtriert.

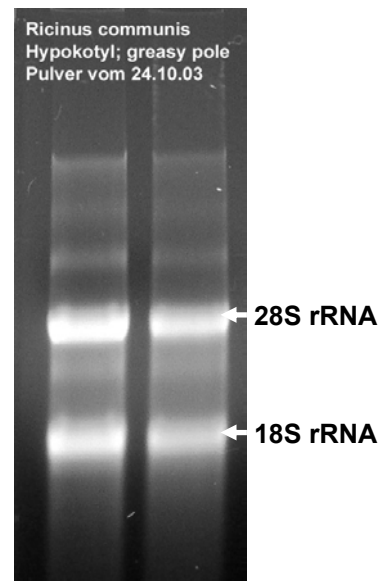
## 2.4 Molekulargenetische Methoden

### 2.4.1 RNA-Isolierung und cDNA-Synthese

Für die Isolierung von Gesamt-RNA wurde die Epidermis 25 Tage alter Hypokotyle von *Ricinus communis*-Pflanzen des Glaucous-Phänotyps mit einer Rasierklinge mit möglichst wenig tiefer liegendem Gewebematerial entnommen. Das Pflanzenmaterial wurde sofort unter flüssigem Stickstoff in einem Mörser zu Pulver homogenisiert. 100 mg dieses gemörserten Pflanzenmaterials wurden zur Isolierung von Gesamt-RNA eingesetzt. Für die Isolierung wurde der RNeasy Plant MiniKit (Qiagen) verwendet. Bei diesem Kit werden die selektiven Bindungseigenschaften einer Silicagel-Membran mit der Mikrozentrifugationstechnik kombiniert. Das biologische Ausgangsmaterial wurde zunächst in einem stark denaturierenden Puffer lysiert und homogenisiert, durch den RNasen sofort effizient inaktiviert wurden, um die Isolierung einer intakten RNA zu gewährleisten. Durch Zugabe von Ethanol wurden optimale Bindungsbedingungen hergestellt, bevor die Probe dann auf die Säule aufgetragen wurde. Die Gesamt-RNA band an die Membran, während übrige Substanzen ausgewaschen und somit abgetrennt wurden. Schließlich wurde die Gesamt-RNA in 30 - 50 µl RNase-freiem Wasser eluiert. Die mit dieser Methode gewonnene RNA wurde bei -80°C aufbewahrt. Aliquots der Proben wurden für die spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung verwendet. Zusätzlich wurde die Intaktheit der RNA gelelektrophoretisch kontrolliert. Hierfür wurden 4 µl (ca. 500 ng) der Proben in einem Agarosegel (1%; siehe 2.4.4) aufgetrennt. Bei nicht denaturierter RNA traten stets die 28S- und 18S-rRNA als klare, distinkte Banden in Erscheinung (Abb. 2-5).

Für die Isolierung von RNA aus *Lycopersicon esculentum* wurden die äußeren Zelllagen noch nicht komplett gereifter Früchte mit einer Rasierklinge entnommen. Die Gesamt-RNA wurde dann wie oben beschrieben aufbereitet.

Für die cDNA-Synthese wurden 3-5 µg Gesamt-RNA, 1 µl eines Oligo dT<sub>18</sub> Primers (Fermentas) und DEPC-Wasser in einem Gesamtansatzvolumen von 12 µl für 10 min bei 70°C inkubiert. Nach einer Minute auf Eis wurde zum Ansatz 1 µl Reverse Transkriptase (RevertAid H Minus M-MuIV RT, Fermentas), 1 µl RNase Inhibitor, 1 µl dNTP-Mix (10 mM) und 4 µl 5x Firststrand buffer zugegeben. Nach einer 60 minütigen Inkubation bei 42°C wurde die Reaktion bei 70°C für 15 min terminiert. Auf Eis wurde RNase A (200 µg/ml) hinzugegeben und der Ansatz für 30 min bei 37°C inkubiert. Die cDNA wurde bei -20°C aufbewahrt.



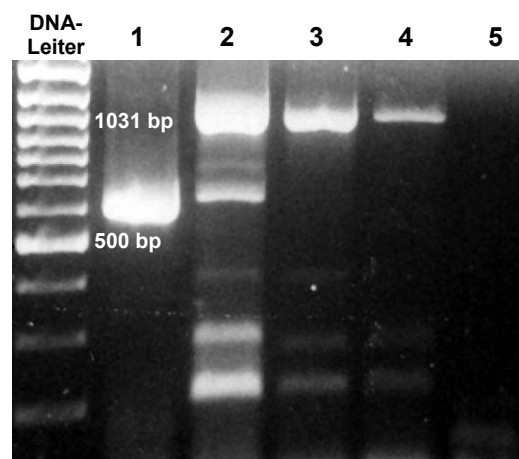
**Abbildung 2-5:** Isolierung von Gesamt-RNA aus *Ricinus communis*-Zellmaterial.

#### 2.4.2 DNA-Isolierung

Für die Isolierung genomischer DNA aus *Ricinus communis* wurde der DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) verwendet. Dazu wurde *Ricinus*-Blattmaterial unter flüssigem Stickstoff zermörsert und jeweils 100 mg des homogenisierten Zellmaterials für die Isolierung verwendet. Alternativ kam eine Methode nach (Chen und Ronald 1999) zum Einsatz. Hierbei wurde das zermörserte Blattmaterial in 700 µl 65°C warmem DNA-Extraktionspuffer (siehe Anhang A) aufgenommen. Nach Zugabe von 7 µl RNase A und einer 5 minütigen Inkubationszeit wurde zum Ansatz 500 µl einer Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung (24:1) zugegeben und gevortext. Der Ansatz wurde 10 min bei full speed und Raumtemperatur zentrifugiert, die obere wässrige Phase durch eine einstündige Inkubationszeit auf Eis mit 0,7 Volumenprozent Isopropanol gefällt und erneut 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig verworfen und das Pellet mit 70% EtOH gewaschen, anschließend 5 min zentrifugiert und unter dem Abzug luftgetrocknet bzw. 20 min in der Speed-Vac getrocknet. Schließlich wurde das Pellet in 30 µl H<sub>2</sub>O bidest. aufgenommen und bei -20°C aufbewahrt.

### 2.4.3 cDNA-Amplifizierung über Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (polymerase chain reaction; PCR) war das zentrale Hilfsmittel und die wichtigste Methode, um cDNA-Fragmente bzw. Gensequenzen von Oxidosqualenzuklasen von *Ricinus communis* und *Lycopersicon esculentum* zu amplifizieren. In der vorliegenden Arbeit wurden alle PCR-Versuche mit einem Thermocycler (Mastercycler Gradient, Eppendorf) durchgeführt. Die Gesamtansatzvolumina der PCR-Ansätze betragen 20 bzw. 50 µl und enthielten in der Regel 1-3 µl cDNA bzw. 5 µl DNA als Template, jeweils 2 µM des Sense- bzw. Antisense-Primers, 0,2 mM dNTP-Mix und 5 U *Taq*-Polymerase in einem Puffer aus 20 mM Tris-HCL (pH 8,0), 100 mM KCL, 1 mM DTT, 0,1 mM EDTA, 0,5 % Tween 20 und 0,5 % Nonidet P40. Der Erfolg der PCR-Ansätze war vor allem von der Wahl der verwendeten Primersequenzen (Übersicht siehe Anhang D) sowie den Temperaturprogrammen abhängig, die für die jeweiligen Ansätze optimiert wurden. Dabei konnten die wichtigen Annealing-Temperatur-Bedingungen mit Hilfe einer Programmierung von Gradientenprogrammen im Rahmen eines einzigen PCR-Laufes variiert werden (Abb. 2-6). Als Positivkontrolle wurde zumeist eine Reaktion mit der Primerkombination CAB-S und CAB-AS und der entsprechenden cDNA angesetzt. Bei CAB-S und CAB-AS handelt es sich um für das hochkonservierte Chlorophyll A/B-Bindungs-Protein spezifische Oligonukleotide, so dass bei dieser Primerkombination in allen photosynthetisch aktiven Pflanzengewebe ein starkes Signal erwartet werden kann.



**Abbildung 2-6:** Beispiel eines PCR-Ansatzes mit *R. communis* cDNA als Template unter der Verwendung eines Annealing-Temperaturgradienten. Temperaturprogramm: 2 min 94°C, (45 s 94°C, 60 s 50°C, 90 s 72°C) x 30, 10 min 72°C.

1: Positivkontrolle mit der Primerkombination CAB-S vs. CAB-AS, Annealingtemp.: 52°C, 2: Primerkombination PNB5II vs. PNB4II; Annealingtemp.: 48°C, 3: wie 2; Annealingtemp.: 53°C, 4: wie 2; Annealingtemp.: 56°C, 5: wie 2; Annealingtemp.: 60°C.

### 2.4.4 Gelelektrophoretische Untersuchung und Aufreinigung von PCR-Produkten

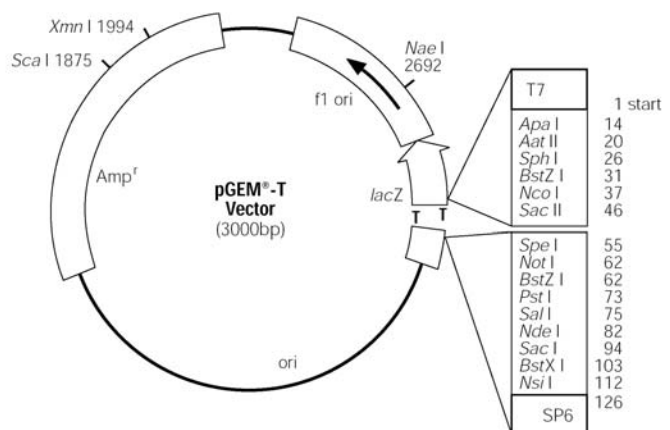
Für die Größen-Auftrennung der PCR-Fragmente kam die Technik der Gelelektrophorese zum Einsatz. Die Auftrennung der Moleküle erfolgte dabei in einem Agarosegel (1%) mit 0,5x TBE-Puffer (siehe Anhang A) als Laufpuffer. Für die Herstellung eines Gels wurde 450 mg Agarose in 450 ml TBE-Puffer durch einminütiges Erhitzen in der Mikrowelle gelöst und die Lösung in einer Gelform bei Raumtemperatur ausgehärtet. Zur Sichtbarmachung der DNA-

Moleküle wurde in das noch nicht auspolymerisierte Gel eine Ethidiumbromid-Lösung in einer Konzentration von 0,1 µg/ml gegeben. Die DNA-Proben wurden in einen Ladepuffer (Fermentas) aufgenommen und in die Ladetaschen des Gels aufgetragen. Zur Größenabschätzung wurde zusätzlich eine DNA-Leiter (1 kb bzw. 100 bp DNA ladder, Fermentas) mit definierten Größenfragmenten in eine Geltasche gegeben. Die Elektrophorese erfolgte in einer Gelelektrophoresekammer bei einer Spannung von ca. 90 mV für ca. 50 min. Nach Beendigung des Gellaufs wurde das Gel auf einen UV-Transilluminator gegeben und mit Hilfe einer Digitalkamera dokumentiert.

Für die weitere Verarbeitung von DNA-Fragmenten wurden entsprechende Banden mit Hilfe des Gel Purification Kit (Qiagen) aus dem Gel extrahiert, in 40 µl H<sub>2</sub>O bidest. eluiert und die Konzentration der Proben spektrophotometrisch bestimmt.

#### 2.4.5 Klonierung von PCR-Produkten in *Escherichia coli*

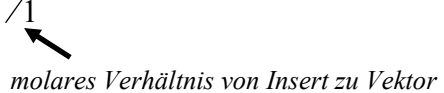
Um eine ausreichende Kopienzahl der über PCR amplifizierten cDNA-Moleküle für die Sequenzierung zu erhalten, mussten die Fragmente in *Escherichia coli* über einen Plasmidvektor kloniert werden. Für die Transformation von *E. coli* wurde der Transformationsvektor pGEM-T (Promega) verwendet. pGEM-T (Abb. 2-7) verfügt über Thymidinüberhänge an den Enden der Multi-cloning-site und ermöglicht so die direkte Ligation von PCR-Produkten, die mit DNA Taq-Polymerase amplifiziert wurden, da dieses Enzym 3'-Adenosin-Überhänge an die Fragmentenden addiert. Die Multi-cloning-site liegt innerhalb der kodierenden Region des β-Galactosidase-Enzyms. Durch die insertionale Inaktivierung dieses Peptids können rekombinante Klone durch ein Farb-Screening (Blue-white-screening) auf Indikatorplatten sofort erkannt werden. Darüber hinaus weist pGEM-T ein Ampicillin-resistenzgen zur Selektion transformierter *E. coli*-Zellen auf.



**Abbildung 2-7:** Schematische Darstellung des Plasmidvektors pGEM-T zur Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen (aus: pGEM-T and pGEM-T Easy Vector Systems, Technical Manual No. 042, Promega).

Für die Ligation musste zunächst die Menge an Insert-DNA, die in der Ligationsreaktion eingesetzt wurde, nach folgender Formel berechnet werden:

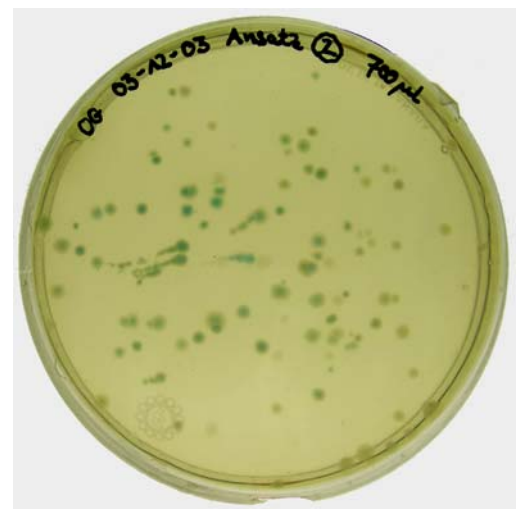
$$\frac{50 \text{ ng Vektor} \cdot x \text{ bp Insert}}{3000 \text{ bp Vektor}} \cdot \frac{3}{1}$$


 molares Verhältnis von Insert zu Vektor

Die Ligrationsreaktion wurde wie folgt pipettiert und über Nacht bei 4°C inkubiert:

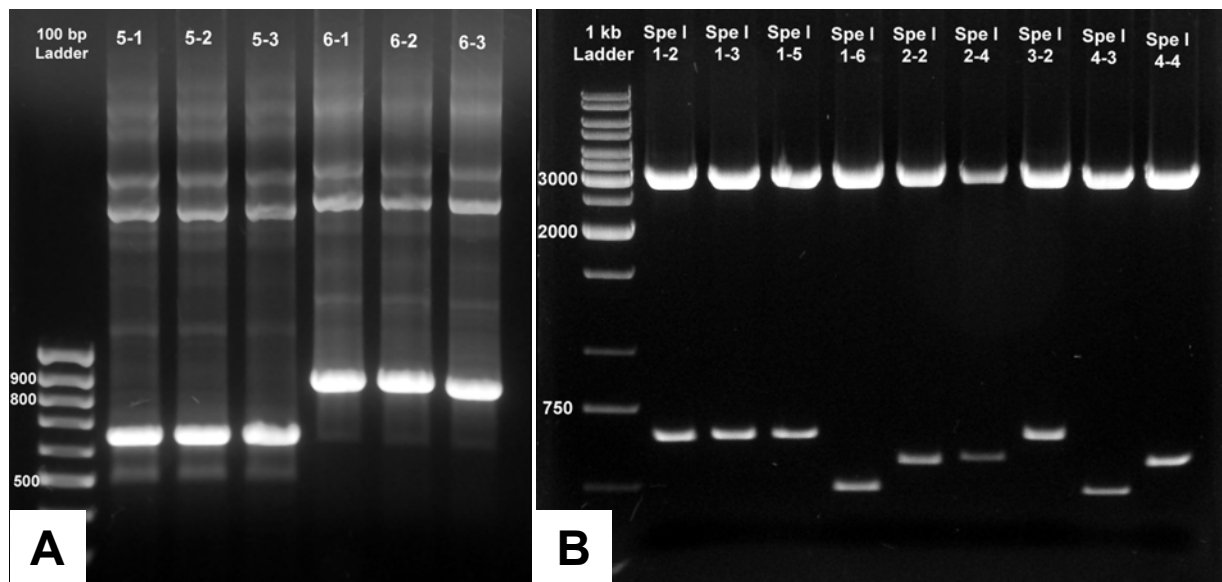
pGEM-T Vector (50 ng)	1 µl
PCR-Produkt (Insert-DNA)	x µl
T4 DNA Ligase (3 Units)	1 µl
Ligationspuffer (2x)	5 µl
H <sub>2</sub> O bidest.	x µl
gesamt	10 µl

Für die Transformation wurden 50 µl kompetenter *E. coli* Zellen (JM 109; Genotyp: *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi*, *hsdR17* (*r<sub>K</sub>-*, *m<sub>K</sub>+*), *relA1*, *supE44*,  $\Delta$ (*lac-proAB*), [*F'*, *traD36*, *proAB*, *lacI<sup>q</sup>ZΔM15*]; Promega) langsam auf Eis aus -80°C aufgetaut und vorsichtig zum Ligationsansatz zugegeben. Nach vorsichtigem Mischen wurde der Ansatz 20 min auf Eis inkubiert. Die eigentliche Transformation der Zellen mit dem Vektor wurde durch eine kurze Temperaturerhöhung (47 s bei 42°C im Wasserbad) bewerkstelligt. Nach dem Hitzeschock wurde zum Ansatz 950 µl LB-Medium (siehe Anhang A) zugegeben und die Zellen 90 min bei 37°C und 150 rpm geschüttelt. Unter der Sterilbank wurden 300 µl bzw. 650 µl des Ansatzes auf LB-Amp-Indikatorplatten (IPTG/X-Gal; siehe Anhang A) ausgestrichen und die Agarplatten über Nacht bei 37°C inkubiert (Abb. 2-8). Weiße Kolonien transformierter Zellen wurden mit einer Impföse unter der Sterilbank entnommen und in 5 ml LB-Amp-Medium überführt. Der Ansatz wurde in einem 16 ml Falcon-Tube über Nacht bei 37°C und 270 rpm inkubiert. 700 µl der ÜN-Kultur wurden für die Präparation von Glycerol-Dauerkulturen verwendet (1:1). Für die Plasmidisolierung wurden 4 ml der ÜN-Kultur schrittweise in 2 ml Eppendorf-Tubes überführt und die Zellen durch zweiminütige Zentrifugation bei 10000 rpm geerntet. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des Plasmid Isolation Kit (Qiagen). Die isolierte DNA wurde schließlich in 30 µl Elutionspuffer eluiert und die Konzentration der Probe spektrophotometrisch bestimmt.



**Abbildung 2-8:** Agarplatte mit Kolonien transformierter *E. coli*-Zellen nach 14 h Inkubation bei 37°C.

Um das Vorhandensein des korrekten PCR-Produkts in der Multi-cloning-site des Vektors zu testen, wurde eine PCR mit den Proben der isolierten Plasmide als Templates (1  $\mu$ l) und der Primerkombination SP6 vs. T7 (jeweils 2  $\mu$ M) durchgeführt, die in einer Amplifizierung eines Produktes mit entsprechender Länge der klonierten DNA resultieren sollte (Abb. 2-9A). Als zusätzliche Kontrolle wurde Plasmid-DNA mit Restriktionsenzymen verdaut, um die Präsenz der korrekten PCR-Produkte zu kontrollieren (Abb. 2-9B).

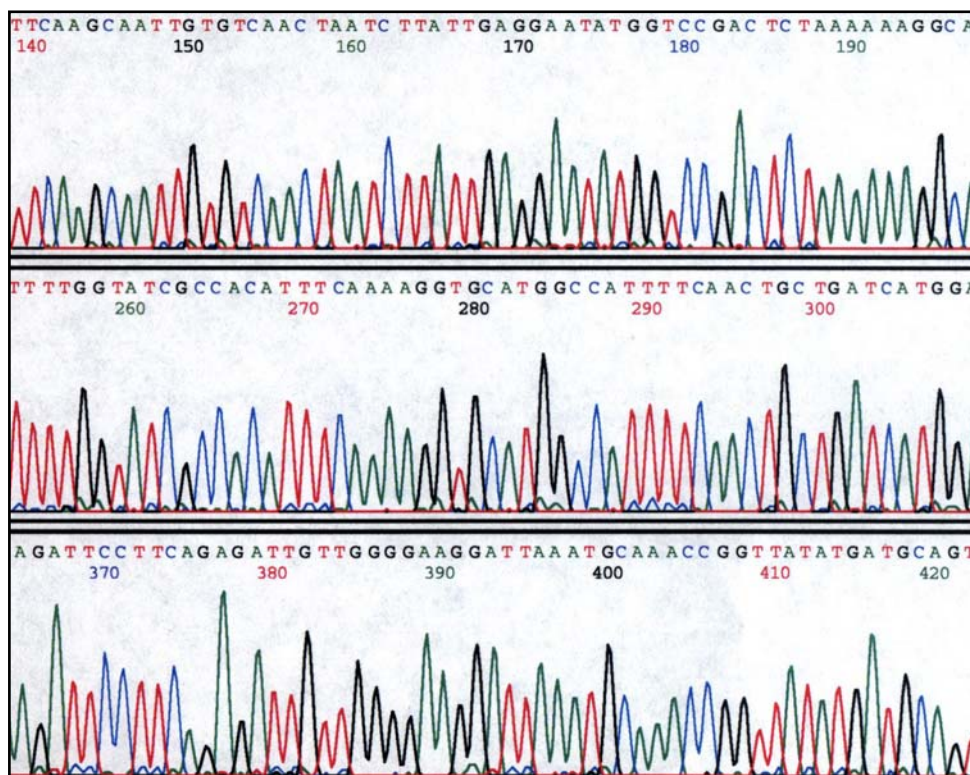


**Abbildung 2-9:** Kontrollversuche nach der Klonierung von PCR-Fragmenten in den Expressionsvektor pGEM-T **A:** Test-PCR nach Plasmidisolierung. In diesem Beispiel wurden zwei Klonierungen getestet (5 und 6, jeweils drei Parallelen; Insert der Klonierung 5: 660 bp, Insert der Klonierung 6: 900 bp). **B:** Restriktionsverdau von Plasmid-DNA mit *SpeI*.

### 2.4.6 Sequenzierung von PCR-Fragmenten

Die Sequenzierung der klonierten cDNAs erfolgte im Sequenzierungslabor am Lehrstuhl für Botanik I, Universität Würzburg, beziehungsweise an der NAPS-Unit der University of British Columbia, Vancouver, Kanada (zu Einsatz kam hier Biosystems PRISM 377 automated sequencer slab gel technology). Für die Sequenzierungsreaktion wurde die aufgereinigte Plasmid-DNA verwendet. Bei der Sequenzierung von Insert-DNA in pGEM-T kamen stets die die Multi-cloning-site flankierenden Primer T7 und SP6 zum Einsatz, bei Insert-DNA aus pYES2 die Primer T7 bzw. PY2A (siehe Anhang D).

Die Ergebnisse der Sequenzierungen wurden digital zur Verfügung gestellt. Daneben konnten Chromatogramme der Sequenzierungsreaktionen eingesehen werden, um die Ergebnisse manuell zu überprüfen (Abb. 2-10).



**Abbildung 2-10:** Ausschnitt aus einem Sequenzierungs-Chromatogramm einer Sequenzierungsreaktion der NAPS-Unit.

### 2.4.7 RACE-Technik

Die RACE-Technik (rapid amplification of cDNA ends) ist eine Methode zur Amplifizierung von Nukleinsäuresequenzen auf PCR-Basis zwischen dem bekannten inneren Bereich einer mRNA und deren 3'- bzw. 5'-Ende. Bei der 3'RACE macht man sich den poly(A)-Schwanz am 3'-Ende der mRNA als Zielsequenz eines Antisense-Primers zunutze. Bei der 5'RACE muss dagegen zunächst eine Adaptersequenz an das unbekannte 5'-Ende der Sequenz synthetisiert werden, bevor die Amplifizierung über PCR erfolgen kann.

#### 2.4.7.1 3'RACE

Für die cDNA-Erststrangsynthese wurden 1-5 µg Gesamt-RNA, 2 µM des AP-Primers (siehe Anhang D) und DEPC-Wasser in einem Gesamtansatzvolumen von 11 µl 10 min bei 70°C, dann 5 min auf Eis inkubiert. Zum Ansatz wurden daraufhin 1 µl Reverse Transkriptase (RevertAid H Minus M-MuIV RT, Fermentas), 1 µl RNase Inhibitor, 1 µl dNTP-Mix (10 mM), 2 µl DTT (0,1 M) und 4 µl 5x Firststrand buffer zugegeben. Nach 50 min Inkubation bei 42°C wurde die Reaktion mit einer fünfminütigen Inkubation bei 70°C beendet und der Ansatz auf Eis gegeben. Nach Zugabe von 5 µl RNase A (200 µg/ml) und Mischen wurde der Ansatz 20 min bei 37°C inkubiert, um das RNA-Template zu zerstören. Der Ansatz wurde bei 4°C aufbewahrt.

Für die cDNA-Amplifikation wurden 2 µl des Erststrangsynthese-Ansatzes bzw. 2 µl einer 1:10 Verdünnung als Template in einem PCR-Ansatz verwendet (Gesamtansatzvolumen: 50 µl). Als Sense-Primer diente hierbei ein genspezifischer Primer, sowie der Adapterprimer AUAP Antisense-Primer (siehe Anhang D). Die Zyklisierungsbedingungen waren: 2 min 94°C, (30 s 94°C, 60 s 55°C, 120 s 72°C) x 30; 10 min 70°C. Der PCR-Ansatz wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt, die cDNA-Bande mit der zu erwartenden Länge aus dem Gel isoliert, kloniert und sequenziert. Gegebenenfalls wurde eine Nested-PCR mit 1:10 verdünntem cDNA-Material aus der vorangegangenen PCR als Template durchgeführt, um die Menge an zu sequenzierender cDNA zu erhöhen. Als Sense-Primer diente dabei jeweils ein genspezifischer Primer, der für eine weiter in 3'-Richtung gelegene Region spezifisch war.

#### 2.4.7.2 5'RACE

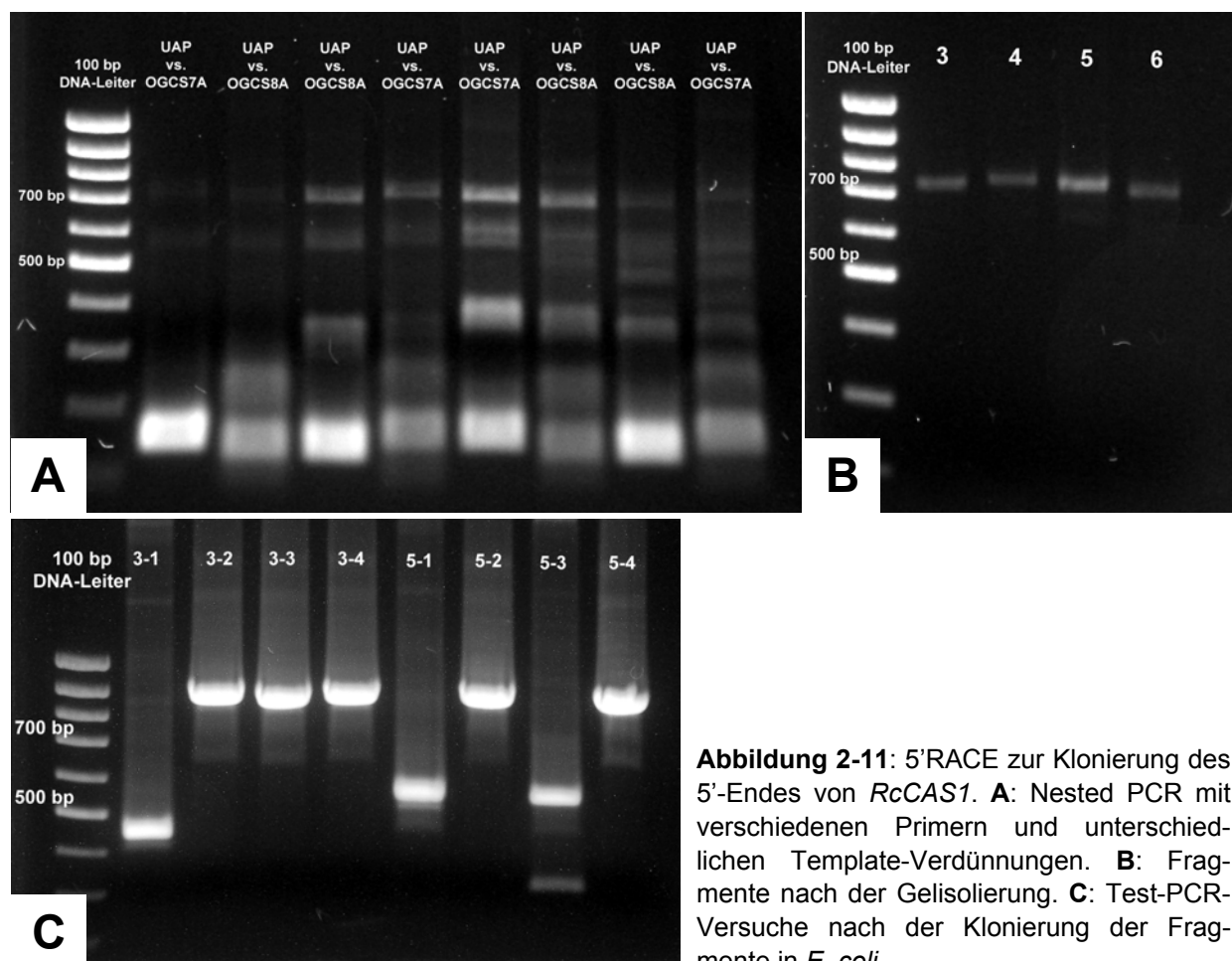
Für alle 5'RACE-Versuche wurde ein Kit der Firma Invitrogen verwendet (5'RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0, Katalog# 18374-058, Version C). Für die cDNA-Erststrangsynthese wurden 1-5 µg Gesamt-RNA, 0,5 µM eines genspezifischen Antisense-Primers und DEPC-Wasser in einem Gesamtansatzvolumen von 15,5 µl 10 min bei 70°C, dann 1 min auf Eis inkubiert. Zum Ansatz wurden daraufhin 2,5 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 1 µl dNTP-Mix (10 mM), 2,5 µl DTT (0,1 M) und 2,5 µl 10x Firststrand buffer zugegeben. Nach einer einminütigen Inkubationszeit bei 42°C wurde 1 µl SuperScript™ II

---



Reverse Transcriptase zugegeben und der Ansatz weitere 50 min bei 42°C inkubiert. Nach Termination der Reaktion (15 min bei 70°C) wurde dem Ansatz 1 µl RNase Mix zugeführt und 30 min bei 37°C inkubiert. Die cDNA wurde anschließend mit Hilfe von S.N.A.P. Säulchen aufgereinigt und in 50 µl sterilem Wasser eluiert. Um einen Oligo dC-Schwanz an das 5'-Ende der cDNA zu synthetisieren (TdT tailing), wurden zunächst 10 bzw. 15 µl der aufgereinigten cDNA, 2,5 µl dCTP (2 mM), 5 µl 5x Tailing buffer und DEPC-Wasser in einem Gesamtvolumen von 24 µl für 3 min bei 94°C inkubiert. Nach 1 min auf Eis wurde 1 µl Terminal Deoxynucleotidyl Transferase zum Ansatz zugegeben und bei 37°C für 10 min inkubiert. Die Reaktion wurde schließlich mit einer zehnminütigen Inkubation bei 65°C beendet.

Für die Amplifikation der dC tailed cDNA wurden 5 bzw. 10 µl des Erststrangsynthese-Ansatzes als Template in einem PCR-Ansatz verwendet (Gesamtansatzvolumen: 50 µl). Als Sense-Primer diente hierbei der Primer AAP, ein genspezifischer Primer als Antisense-Primer. Die Zyklisierungsbedingungen waren: 2 min 94°C, (30 s 94°C, 60 s 55°C, 120 s 72°C) x 30; 10 min 70°C. 5 µl der 5'RACE-Produkte wurden gelelektrophoretisch analysiert. Eine anschließende Nested-PCR mit 1:10 bzw. 1:100 verdünntem cDNA-Material aus der vorangegangenen PCR als Template diente zur spezifischen Amplifizierung des zu charakterisierenden 5'-Endes (Abb. 2-11A). Als Sense-Primer diente dabei der Adapterpri-



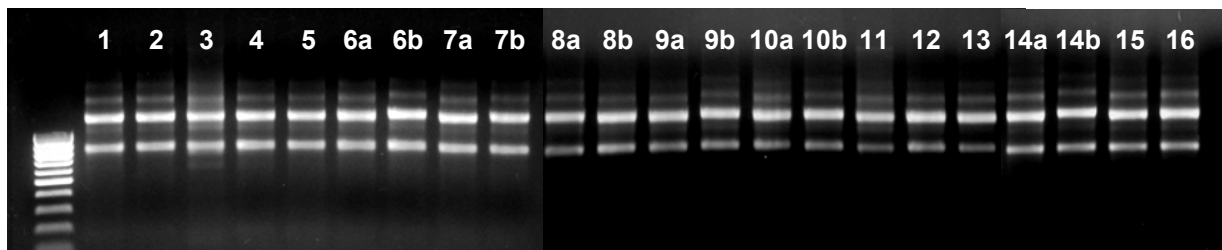
**Abbildung 2-11:** 5'RACE zur Klonierung des 5'-Endes von *RcCAS1*. **A:** Nested PCR mit verschiedenen Primern und unterschiedlichen Template-Verdünnungen. **B:** Fragmente nach der Gelisolierung. **C:** Test-PCR-Versuche nach der Klonierung der Fragmente in *E. coli*.

mer UAP, als Antisense-Primer jeweils ein für eine weiter in 5'-Richtung gelegene Region spezifischer Primer. Die Bande mit der zu erwartenden Fragmentlänge wurde gelisoliert (Abb. 2-11B) und das Fragment kloniert und sequenziert (Abb. 2-11C).

## 2.4.8 Northern-Blot Analysen

### 2.4.8.1 Präparation der RNA

Für die Analyse des Expressionsverhaltens von *RcLUS1* und *RcCAS1* mit Hilfe von Northern-Blot Analysen wurde zunächst Gesamt-RNA von Blättern, Stämmen und Wurzeln 50 Tage alter Pflanzen, sowie von Hypokotylen verschieden alter Pflanzen (6, 12, 18, 25 und 50 Tage) jeweils beider Phänotypen mit Hilfe des RNeasy Kits (Qiagen) isoliert (siehe 2.4.1). Die Konzentration der einzelnen Proben wurde spektrophotometrisch bestimmt. Für eine optische Kontrolle wurde von jeder Probe 500 ng RNA gelelektrophoretisch aufgetrennt und dokumentiert (Abb. 2-12).



**Abbildung 2-12:** Gelelektrophorese von RNA-Proben (jeweils 500 ng), die aus verschiedenen Geweben und von verschieden alten Pflanzen isoliert wurde.

Jeweils 10 µg Gesamt-RNA jeder Probe wurden in einer Speed-Vac getrocknet und in 15 µl RNA-Ladepuffer (siehe Anhang A) aufgenommen. Um die RNA zu denaturieren, wurden die Proben für 15 min in einem Wasserbad auf 65°C erhitzt und danach auf Eis gegeben. Anschließend wurden die Proben in einem 1% (w/v) MOPS-Agarose-Formaldehyd-Gel (siehe Anhang A) elektrophoretisch im Abzug aufgetrennt (120 V für 90 min; 1x MOPS-Puffer als Laufpuffer) und das Gel nach Beendigung des Laufs unter dem UV-Transilluminator dokumentiert. Die aufgetrennte RNA wurde mit Hilfe eines Kapillarblots über Nacht aus dem Gel auf eine Nylonmembran (Hybond XL Membran, Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA) übertragen und 2h im Ofen bei 80°C auf der Membran fixiert.

### 2.4.8.2 Präparation der Sonden

Für die Herstellung spezifischer Sonden für *RcLUS1* und *RcCAS1* wurden zunächst Fragmente der Gensequenzen über PCR-Ansätze (50 µl Gesamtvolumen, cDNA aus Hypokotyl-RNA als Template, Taq-DNA-Polymerase) amplifiziert. Für *RcLUS1* wurden dabei der Senseprimer 5' ACAAGTCTAGCTCTTCAGGC 3' (OGLS1S) und der Antisenseprimer 5'

GCTTGGATTGCTGATGAAG 3' (OGLS17A) verwendet, wodurch ein 454 bp langes Fragment amplifiziert wurde. Bei der Synthetisierung der *RcCAS1*-Sonde dienten die Primer 5' GACACAGCATTCGCAGTTCA 3' (OGCS1S) sowie 5' CTCAACGTACGGGTAGTCAATA 3' (TYCS4A) zur Amplifizierung eines 433 bp langen Fragmentes. Beide PCR Produkte wurden kloniert und sequenziert, um die jeweilige Spezifität der Sequenzen zu überprüfen. In einer weiteren PCR mit der jeweiligen Plasmid-DNA als Template (20 µl Gesamtvolumen, Taq-DNA-Polymerase) wurden die klonierten Sequenzen erneut amplifiziert. Die DNA wurde mit Hilfe des PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt, in 30 µl H<sub>2</sub>O bidest. eluiert und die Konzentration der Proben wurde spektrophotometrisch bestimmt. Jeweils 50 ng DNA wurde für die Radioaktivmarkierung (Random Primers DNA Labeling System, GIBCO Life Technologies, Katalog# 18187-013) zu folgendem Ansatz gegeben:

dATP (0,5 mM in 1 mM Tris-HCl (pH 7,5))	2 µl
dGTP (0,5 mM in 1 mM Tris-HCl (pH 7,5))	2 µl
dTTP (0,5 mM in 1 mM Tris-HCl (pH 7,5))	2 µl
Random Primers Buffer Mixture	15 µl
[α <sup>32</sup> P]dCTP, 3000 Ci/mmol	5 µl (ca. 50 µCi)
H <sub>2</sub> O bidest	x µl
Klenow Fragment (3 U/µl in 50 mM KOH-Puffer)	1 µl
<u>Gesamtvolumen</u>	<u>50 µl</u>

Die Markierungsreaktion erfolgte für 2 h bei Raumtemperatur. Um die Ansätze von überschüssiger Radioaktivität durch nicht inkorporierte [α<sup>32</sup>P]dCTPs zu befreien, wurden die Proben mit Hilfe von Bio-Spin 6 Säulchen (Bio-Rad, Hercules, CA) aufgereinigt.

#### 2.4.8.3 Hybridisierung

Für die Hybridisierung wurde der jeweilige Blot blasenfrei in Hybridisierungsröhren mit der Oberseite nach innen eingerollt und im Hybridisierungssofen 2 h bei 65°C in 20 ml temperiertem Church-Puffer (siehe Anhang A) vorhybridisiert. Danach wurden 20 µl der radioaktiv markierten Sonde, die unmittelbar vorher 5 min auf 95°C erhitzt wurde, zugegeben und über Nacht hybridisiert. Die Blots wurden am nächsten Tag unter hoch-stringenten Bedingungen bei 65°C gewaschen (2 x 5 min 2x SSC, 15 min 1x SSC, 15 min 0,2x SSC; alle in 0,1% (w/v) SDS). Nach den Waschsritten wurden die Membranen in Plastikfolie eingewickelt, über Nacht auf eine Imager-Platte aufgelegt und schließlich mit Hilfe eines Phosphor-Imagers gescannt. Um den gleichen Blot für mehrere Hybridisierungen nutzen zu können, wurde die Membran gestrippt. Hierfür wurde die feuchte Membran in eine Plastikwanne gegeben und mit einer kochenden 0,1 % (w/v) SDS-Lösung übergossen. Nach 20 min wurde der Blot kurz mit 2x SSC gespült.

### 2.4.9 Semiquantitative RT-PCR

Für die RT-PCR-Versuche wurden jeweils 0,5 µg Gesamt-RNA der verschiedenen Proben (siehe 2.4.8) in eine cDNA-Synthese eingesetzt (siehe 2.4.1; 25 µl Gesamtansatzvolumen; Verwendung von SuperScript II™ Reverse Transcriptase (Invitrogen)). Genspezifische Primerkombinationen für *RcLUS1* und *RcCAS1* (siehe 2.4.8) wurden verwendet, um Fragmente der beiden Gene mittels PCR zu amplifizieren. Zusätzlich wurde eine Positivkontrolle in Form des Actin-Gens von *Ricinus communis*, *RcACT* (nach (Eastmond 2004), mit der Primerkombination 5' CGTTCTCTCCTTGTATGCCAGTGGTC 3' (RCACTS) und 5' GAGCTGCTCTTGGCAGTCTCA AGTTC 3' (RCACTA) amplifiziert. Für die PCR wurden jeweils 25 ng cDNA als Template eingesetzt. Die Zyklisierungsbedingungen wurden für die Untersuchung optimiert: 2 min 94°C, (30 s 94°C, 45 s 55°C, 60 s 72°C) x 23, 10 min 72°C. Die PCR-Produkte wurden anschließend mittels Elektrophorese in einem 1% (w/v) Agarose-Tris-Borat-EDTA-Gel aufgetrennt.

### 2.4.10 Sequenzanalytische Verfahren

Vergleiche klonierter Sequenzen mit Sequenzen aus Datenbanken wurden mittels BLAST-Search in der NCBI-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) angestellt. Die Übersetzung von Nukleotid- in Aminosäuresequenzen und ähnliche sequenzanalytische Verfahren erfolgten mit Hilfe des Programms DNASTar EditSeq™ (Version 5.00). Sequenz-Alignments und phylogenetische Analysen, basierend auf Neighbour-joining-Methoden, wurden mit dem Programm ClustalX (Version 1.81) durchgeführt (Thompson *et al.* 1997). Für die Analysen wurden neben den neu klonierten Sequenzen von *Ricinus communis* und *Lycopersicon esculentum* Nukleotid- und Aminosäuresequenzen bereits klonierter und charakterisierter Oxidosqualensynthasen aus der GenBank-Datenbank verwendet (Übersicht siehe Anhang B). Die phylogenetischen Stammbäume wurden mit dem Programm TreeView (Version 1.6.6) erstellt. Die Analyse von Primersequenzen bezüglich ihrer physikalischen und chemischen Eigenschaften erfolgte mit dem Programm OligoAnalyzer (Version 1.0.2).

## 2.5 Charakterisierung klonierter cDNAs – heterologe Expression in *Saccharomyces cerevisiae*

### 2.5.1 Amplifizierung der 2,3-Oxidosqualenzylase-cDNAs mittels PCR

Für die Amplifizierung der cDNAs der Gensequenzen aus Rizinus und Tomate wurden jeweils spezifische Sense- und Antisense-Primer konstruiert, die das Start- bzw. Stop-Codon der ORFs flankierten. Zusätzlich wurden upstream des Start-Codons und downstream des Stop-Codons Restriktionsschnittstellen angefügt, um die cDNA-Fragmente später in den Hefe-Expressionsvektor ligieren zu können. Um eine optimale Expression der cDNAs in Hefe zu garantieren, musste am 5'-Ende der cDNAs zusätzlich eine Translations-Initiations-Sequenz, ein sog. Kozak-Fragment, in der Form „ANNATG“ (Start-Codon unterstrichen) kreiert werden. Die Sequenzen der verwendeten Primer zur Amplifizierung der OSC-Gensequenzen aus Rizinus und Tomate waren (Restriktionsschnittstellen unterstrichen, Start- bzw. Stop-Codon fettgedruckt):

*Ricinus communis* Lupeolsynthase (RcLUS1):

sense (RCTS1C1S): 5' TTGGAGCTCAGG**ATG**TGGCGAATTAAAATAG 3'

Restriktionsschnittstelle: *SacI*

antisense (RCTS1C1A): 5' ATTGCGGCCGC**TC**AATAATTATTGGTGAATC 3'

Restriktionsschnittstelle: *NotI*

*Ricinus communis* Cycloartenolsynthase (RcCAS1):

sense (RCCS1C2S): 5' TTGGAATTCAAAA**ATG**TGGAAGCTAAGGATTGC 3'

Restriktionsschnittstelle: *EcoRI*

antisense (RCCS1C1A): 5' ATTGCGGCCGC**TTA**TGAAGCCTTGAGAACCCG 3'

Restriktionsschnittstelle: *NotI*

*Lycopersicon esculentum*  $\beta$ -Amyrinsynthase (LeTTS1):

sense (LETS1C4S): 5' TTGGAGCTCAGG**ATG**TGGAAATTGAAAATTGCTG 3'

Restriktionsschnittstelle: *SacI*

antisense (LETS1C5A): 5' CCCGAATTC**TTA**GTTGTTTTCTAATGGTAATAATAC 3'

Restriktionsschnittstelle: *EcoRI*

*Lycopersicon esculentum* Triterpensynthase (LeTTS2):

Sense (LETS1C5S): 5' TTGGAGCTCAAG**ATG**TGGAAGTTGAAGATTGCAA 3'

Restriktionsschnittstelle: *SacI*

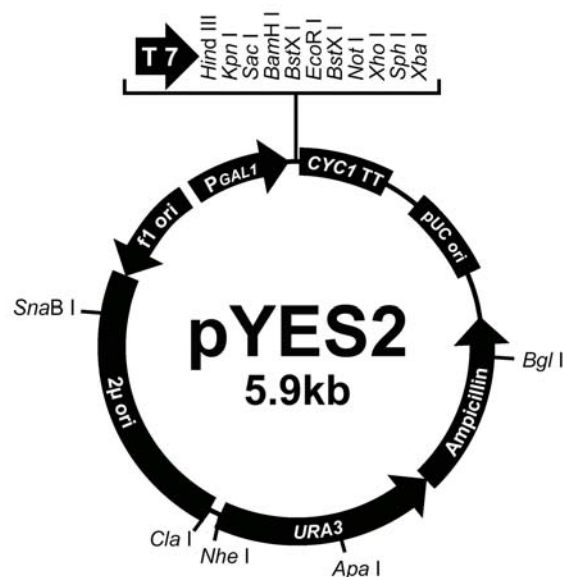
Antisense (LETS1C6A): 5' CCCGAATTC**CTA**TATGTAGTTGTGTTTAATGGT 3'

Restriktionsschnittstelle: *EcoRI*

Die PCR wurde mit Rizinus Hypocotyl cDNA bzw. Tomaten-Frucht cDNA (siehe 2.4.1) und Phusion™ High Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes) in einem Gesamtvolumen von 50 µl gemäß den Herstellerangaben durchgeführt (1 µM pro Primer, 1 µl cDNA). Die Zyklisierungsbedingungen waren: 10 s 98°C, (10 s 98°C, 30 s 55°C, 75 s 72°C) x 28, 10 min 72. Drei solcher PCR-Ansätze wurden vereinigt, aufgereinigt (PCR-Purification Kit, Qiagen) und in 40 µl Elutionspuffer eluiert. Dieser Ansatz wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt und das erwartete Längenfragment aus dem Gel isoliert, aufgereinigt (Gel Isolation Kit, Qiagen) und in 40 µl H<sub>2</sub>O bidest. eluiert.

## 2.5.2 Ligation der cDNAs in den Hefe-Expressionsvektor pYES2

Um die cDNAs der klonierten Gene in Hefezellen heterolog exprimieren zu können, mussten die entsprechenden Sequenzen vorher in einen geeigneten Expressionsvektor ligiert werden. Für die Transformation von Hefe wurde der Expressionsvektor pYES2 (Invitrogen) verwendet. pYES2 verfügt über einen GAL1 Promotor für eine Galactose-induzierbare Protein-Expression in *S. cerevisiae*, eine Multi-cloning-site mit variablen Restriktionsschnittstellen, ein Ampicillin-Resistenz-Gen für die Selektion in *E. coli* und das *URA3*-Gen für die Selektion transformierter Hefezellen mit einem *ura3* Genotyp (Abb. 2-13).

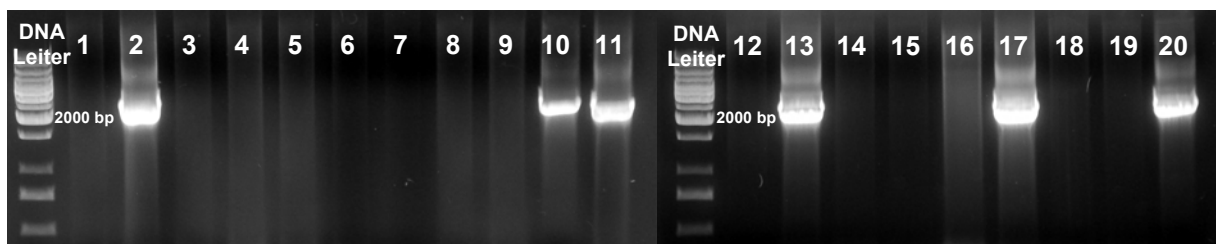


**Abbildung 2-13:** Schematische Darstellung des Hefe-Expressionsvektors pYES2 (aus pYES2, Catalog no. V825-20, Version I, Manual, Invitrogen).

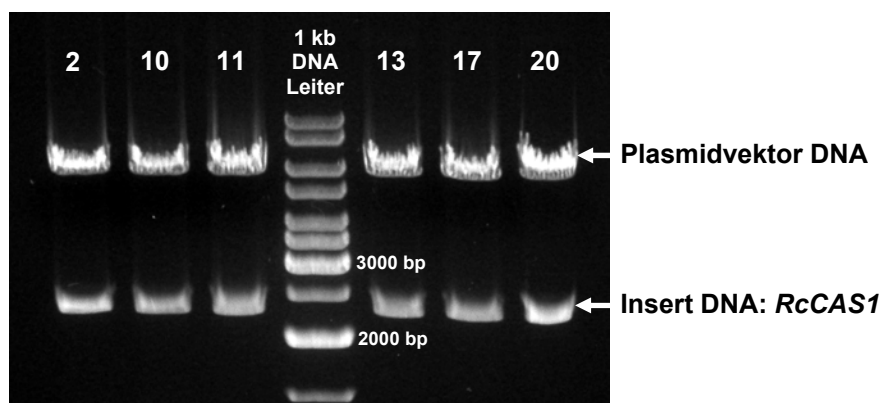
Die aufgereinigten PCR-Produkte sowie 2 µg des Expressionsvektors wurden zunächst mit geeigneten Restriktionsenzymen verdaut (1 h bei 37°C; Konzentrationen der Enzyme und Pufferbedingungen nach Angaben des Herstellers; Gesamtvolumen: 50 µl). Die Reaktion wurde mit einer 20 minütigen Inkubationszeit bei 65°C bzw. 80°C terminiert. Anschließend wurden die Ansätze gelelektrophoretisch aufgetrennt, mit Hilfe des Gel Purifikation Kit (Qiagen) aufgereinigt und die Konzentrationen spektrophotometrisch bestimmt (Konzentration betrug stets ca. 50 ng/µl).

Für die Ligation wurden die verdauten cDNA-Fragmente und der Vektor in einem molaren Verhältnis von 1:3 mit 1 µl Ligase (Gesamtvolumen 10 µl) für 3 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden kompetente *E. coli* Zellen (JM109, Promega) mit

Hilfe der Hitzeschock-Methode (siehe 2.4.5) mit den Konstrukten transformiert, auf LB-Amp-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Von allen Kolonien wurden mit Hilfe einer Pipettenspitze Zellmaterial entnommen und direkt als Template für eine Test-PCR (Gesamtansatzvolumen: 10 µl) mit der Primerkombination T7 und PYES2A eingesetzt (Abb. 2-14). Von geeigneten Kolonien, also von Zellen, die mit dem Expressionsvektor mit der entsprechenden cDNA erfolgreich transformiert worden waren, wurden ÜN-Kulturen ange-setzt und Plasmidisolierungen (Plasmid Isolation Kit, Qiagen) vorgenommen. Als zusätzliche Kontrolle wurde ein Restriktionsverdau der isolierten Plasmide vorgenommen (jeweils 1 µg Plasmid; Abb. 2-15). Die Inserts ausgesuchter Plasmide wurden sequenziert und die entsprechenden Plasmid-Konstrukte wurden als Glycerol-Stocks bei -80°C eingefroren.



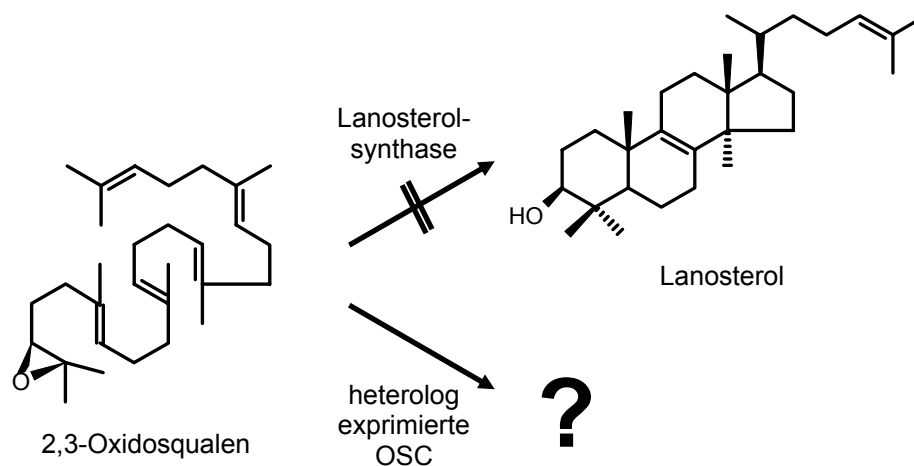
**Abbildung 2-14:** Test-PCR mit *E. coli*-Zellmaterial als Template nach der Transformation mit dem Expressionsvektor pYES2 + Insert und der Primerkombination T7 und PYES2A. In diesem Beispiel wurden 20 Kolonien getestet, die mit dem Konstrukt pYES2-RcCAS1 transformiert worden waren. Kolonie 2, 10, 11, 13, 17 und 20 zeigen das zu erwartende PCR-Fragment mit einer Länge von 2,3 kb.



**Abbildung 2-15:** Restriktionsverdau der isolierten Plasmid-DNA als Positiv-Kontrolle. In diesem Beispiel wurden die Plasmide pYES2-RcCAS1 mit *SacI* und *EcoRI* verdaut.

### 2.5.3 Die Hefemutante GIL 77 und die Transformation von GIL 77 mit dem Expressionsvektor pYES2

Für die heterologe Expression der klonierten Oxidosqualenzyklase-Gene wurde der Hefestamm GIL 77 verwendet, der freundlicherweise von Herrn Prof. Y. Ebizuka, Tokyo, zur Verfügung gestellt wurde. GIL 77 (*gal2 hem3-5 erg7 ura3-167*) zeigt keine Lanosterol-Synthase-Aktivität, so dass in den Zellen dieser Hefemutante das Substrat 2,3-Oxidosqualen akkumuliert wird. Dieser Umstand favorisiert die Bildung neuer Oxidosqualen-Zyklisierungsprodukte durch die heterologe Expression von Oxidosqualenzyklasten (Haralampidis *et al.* 2002) (Abb. 2-16).



**Abbildung 2-16:** Prinzip der funktionellen Charakterisierung klonierter Oxidosqualenzyklasten: die Zyklisierung von 2,3-Oxidosqualen im transformierten Hefestamm GIL 77.

Da die Lanosterolsynthase-Mutation in GIL 77 eine Hemmung der Steroid-Biosynthese zur Folge hat, mussten die Hefezellen in Nährmedien mit exogen zugegebenem Ergosterol gehalten werden. Für die Transformation von GIL 77 mit den entsprechenden pYES2-Konstrukten wurde die Lithiumacetat/PEG-Methode nach Gietz und Woods 2002 angewendet. Hierfür wurde zunächst eine ÜN-Kultur (Hefe-Kolonie in 5 ml YPD; 200 rpm; 30°C) angesetzt. Die ÜN-Kultur wurde in 45 ml YPD (siehe Anhang A) überführt und bei 30°C und 200 rpm in einem autoklavierten Kulturbeker für 4-6 h geschüttelt. Die Kultur wurde anschließend in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und die Zellen durch Zentrifugation bei 4000 rpm und Raumtemperatur geerntet. Nach zweimaligem Waschen der Zellen in 25 bzw. 1 ml H<sub>2</sub>O bidest. und der Überführung der Zellen in ein 1,5 ml Eppendorf tube wurden die Zellen in 300-1000 µl H<sub>2</sub>O bidest. resuspendiert, in 100 µl-Ansätze aliquotiert, bei 14000 rpm für 30 s zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zu den Hefezellen wurde folgender Mastermix pro Transformation zupipetiert:



PEG (Polyethylenglycol) 50% (w/v)	240 $\mu$ l
Lithium Acetat 1 M	36 $\mu$ l
SS Carrier-DNA (10 mg/ml)	10 $\mu$ l
Plasmid-DNA (ca. 500 ng/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O bidest.	73 $\mu$ l
gesamt	360 $\mu$ l

Als Negativ-Kontrolle wurde statt der Plasmid-DNA H<sub>2</sub>O bidest. dazugegeben. Die Hefezellen wurden durch vorsichtiges Vortexen resuspendiert und die Ansätze in einem 42°C-Wasserbad für 40 min inkubiert. Die Ansätze wurden anschließend bei 14000 rpm für 30 s zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abpipetiert und die Zellen in 1 ml H<sub>2</sub>O bidest. vorsichtig mit der Pipette resuspendiert. 300  $\mu$ l und 500  $\mu$ l Aliquots der Ansätze wurden auf SC-Minimal-Platten (siehe Anhang A) übertragen; die Platten wurden bei 30°C für 3-4 Tage inkubiert.

#### 2.5.4 Geninduktion und Extraktion transformierter Hefezellen

Für die Geninduktion transformierter GIL 77 Zellen wurde jeweils eine Zellkolonie mit einer Impföse in 20 ml SC-Minimal Medium (siehe Anhang A) überführt und bei 250 rpm und 30°C inkubiert. Nach 48 h wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 4000 rpm und Raumtemperatur geerntet und in 20 ml SC-U Medium (Induktionsmedium; siehe Anhang A) vorsichtig resuspendiert. Nach einer zwölfstündigen Inkubationszeit bei 250 rpm und 30°C wurden die Zellen erneut durch Zentrifugation geerntet, in 20 ml Resting Medium (siehe Anhang A) resuspendiert und erneut bei 250 rpm und 30°C für 24 h inkubiert.

Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 4000 rpm und Raumtemperatur geerntet, mit 10 ml H<sub>2</sub>O bidest. gewaschen, anschließend in 5 ml 50% EtOH resuspendiert und in ein 24 ml Glasvial überführt. Nach Zugabe von 1 g KOH und vorsichtigem Vortexen wurde der Ansatz für 5 min bei 70°C im Heizblock inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz in einen Extraktions-Zylinder überführt und 5 ml Hexan zugegeben. Nach Ausschütteln wurde die untere Extraktionsphase in ein neues Glasvial überführt. Nach erneuter Extraktion der wässrigen Phase, Vereinigung der beiden Extraktionsphasen und Trocknung mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> wurde der Extrakt unter leichtem Stickstoffstrom und bei 50°C im Heizblock getrocknet und schließlich in 300 ml Hexan aufgenommen.

### 2.5.5 Analyse der Hefe-Extrakte

Ein Aliquot (ca. 2 µl) des jeweiligen Hefe-Gesamtextraktes wurde zunächst mit einem Glasröhrchen auf einen TLC Streifen aufgetragen. Zusätzlich wurden am Rand des Streifens 1 µl eines Standard-Gemisches, bestehend aus Ergosterol, Lupeol und C<sub>27</sub>-Keton (10 mg/ml pro Einzelkomponente) gegeben. Der Extrakt und die Standardlösung wurden dünnschichtchromatographisch für 5 min aufgetrennt (mobile Phase: Benzol/Aceton 19:1); nach der Trocknung des TLC-Streifens wurde dieser mit Primulin-Lösung besprüht und unter UV-Licht bei 366 nm betrachtet.

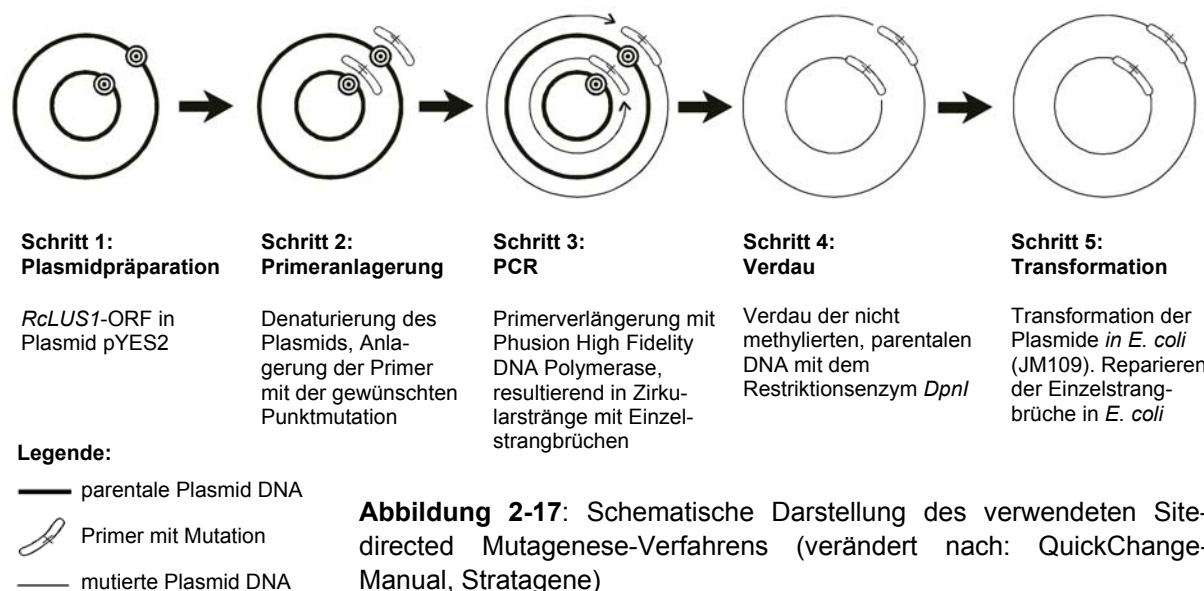
Für eine quantitative Untersuchung wurden die Extrakte mittels Dünnschichtchromatographie präpariert (siehe 2.3.3). Aliquots von den Extrakten der einzelnen Dünnschicht-Fractionen wurden jeweils in ein Reactival überführt, mit Stickstoff im Heizblock ausgeblasen und silyliert. Anschließend wurden die Fractionen auf ihre Zusammensetzung hin mittels GC-FID und GC-MS untersucht. Daneben wurden Hefegesamtextrakte direkt silyliert und mittels FID und MS gaschromatographisch analysiert.

### 2.5.6 *In vitro*-Enzymtest

Im Falle von RcCAS1 wurde neben der oben beschriebenen Methode der Charakterisierung in intakten Hefezellen eine zusätzliche Methode zur Analyse der Produktspezifität des Enzyms angewendet. Hierbei handelte es sich um einen Enzymtest in Anlehnung an Morita *et al.* 1997, bei dem mit einem zellfreien Hefeextrakt gearbeitet wird. Nach der zwölfstündigen Galaktose-Induktion (siehe 2.5.4) wurden die Zellen mit einer 0,1 M Kaliumphosphatpuffer (p.H. 7,4; 0,45 M Succrose, 1 mM EDTA und 1 mM Dithiothreitol) gewaschen und in 500 µl desselben Puffers resuspendiert. Durch zehnmaliges Vortexen für jeweils 30 s mit Glaskügelchen (Sigma) wurden die Zellen homogenisiert. Die Ansätze wurden bei 18000 rpm für 20 min zentrifugiert, der Überstand diente anschließend als Enzymfraktion. 250 µl der zellfreien Enzymfraktion wurde mit 1 mg 2,3-Oxidosqualen (präpariert über Dünnschichtchromatographie aus GIL 77-Gesamtextrakt; siehe 2.5.5) in 750 µl Kaliumphosphatpuffer (pH 7,4; 0,1% (w/v) TritonX-100) für 5 h bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben zweimal mit 2 ml Chloroform extrahiert und die Extrakte gaschromatographisch analysiert.

## 2.6 Zielgerichtete Mutagenese (Site-directed mutagenesis) von *RcLUS1*

Für die gerichtete Mutagenese, also den Austausch bestimmter Aminosäure-Reste, der Lupeolsynthase *RcLUS1* aus *Ricinus communis* wurde im Wesentlichen ein Verfahren angewendet, wie es für den QuickChange Site-directed mutagenesis Kit der Firma Stratagene beschrieben wird (Abb. 2-17).



**Abbildung 2-17:** Schematische Darstellung des verwendeten Site-directed Mutagenese-Verfahrens (verändert nach: QuickChange-Manual, Stratagene)

Die Sequenzen der Oligonukleotid-Primer mit den entsprechenden Punktmutationen wurden nach den Vorschlägen der Stratagene-Website (<http://www.stratagene.com/>) ermittelt. Für die Mutanten wurden folgende Primer verwendet (mutierte Nukleotide unterstrichen):

### *RcLUS1* T416H

RCLST416HS: 5' ATGCAGAGTTTCGGAAGTCAACATTGGGACACAAGTCTAGCTCTTC3'

RCLST416HA: 5' GAAGAGCTAGACTTGTGTCCCAATGTTGACTTCCGAAACTCTGCAT3'

### *RcLUS1* F257W

RCLSF257WS: 5' CTTACACCCAGCAAAAATGTGGTGTTACTGTCGGATCACTT3'

RCLSF257WA: 5' AAGTGATCCGACAGTAACACCCCATTTTTGCTGGGTGTAAG3'

50 ng des pYES2-*RcLUS1*-Konstruktes als Template, jeweils 2  $\mu$ M der Sense- und Antisenseprimer, 0.2 mM dNTPs, 10  $\mu$ l 5X Phusion HF Reaction buffer (Finnzymes) sowie 2 U of Phusion<sup>TM</sup> High Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes) wurden in einer PCR-Reaktion eingesetzt (Gesamtansatzvolumen: 50  $\mu$ l). Die Zyklisierungsbedingungen waren: 30 s 98°C, (30 s 98°C, 60 s 55°C, 4 min 72°C) x 17, 10 min 72°C. Den Ansätzen wurden anschließend 10 U des Restriktionsenzym *DpnI* (Fermentas) zugegeben und für eine Stunde bei 37°C

inkubiert. Jeweils 5 µl der Ansätze wurden für eine Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen (JM109 High Efficiency Competent Cells, Promega) eingesetzt. Eine anschließende Sequenzierung der pYES2-RcLUS1 Mutanten-Konstrukte stellte sicher, dass nur die jeweils erwünschte Mutation vorlag. Anschließend wurden die Konstrukte in Hefe transformiert und charakterisiert (siehe 2.5.3 - 2.5.5). Für die Herstellung der Doppelmutante RcLUS T416H F257W wurden in der PCR-Reaktion 50 ng des pYES2-RcLUS1 T416H-Konstruktes als Template sowie die Primer RCLSF257WS und RCLSF257WSA eingesetzt.

## 2.7 Rasterelektronenmikroskopie

Kleine Sprossachsen- sowie Blattspreitenfragmente von *Ricinus communis* wurden mit Hilfe einer Rasierklinge aus frischem Pflanzenmaterial entnommen. Beim Ausschneiden der Sprossachsen-Proben wurde besonders darauf geachtet, möglichst wenig Zellmaterial aus dem Gewebe mit auszuschneiden, um Trocknungsartefakte so gering wie möglich zu halten. Alle Proben wurden mit doppelseitigen Klebplättchen auf Probenhalter aus Aluminium fixiert. Nach Lufttrocknung für mehrere Stunden wurden die Probenhalter 300 s unter verringertem Druck in Argonatmosphäre mit Gold bei 25 mA bedampft (Balzers Union Sputtering Device). Die Proben wurden direkt im Anschluss am REM untersucht (Zeiss DSM 962; Beschleunigungsspannung: 15 kV). Von den Proben wurden Sw-Negativ-Fotos mit einer eingebauten Spiegelreflexkamera angefertigt, die Negative wurden mit einem Dia-Scanner digitalisiert.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Charakterisierung zweier Stammkutikula-Phänotypen von *Ricinus communis*

Die primäre Sprossachsenoberfläche von Rizinuspflanzen tritt in zwei verschiedenen Ausprägungen in der Natur in Erscheinung, die bereits nach wenigen Tagen nach der Keimung der Pflanzen mit bloßem Auge voneinander unterschieden werden können. Einerseits weisen Rizinus-Sprossachsen eine grünlich bis rötlich glänzende Oberfläche auf (Glossy-Phänotyp). Individuen des anderen Typs sind dagegen durch das Vorhandensein einer weißlich matten Sprossoberfläche gekennzeichnet (Glaucous-Phänotyp). Seit langem ist bekannt, dass die graublaue Bereifung von Pflanzenoberflächen - auffällig zum Beispiel bei Pflaumenfrüchten oder bei „glauken“ Kohlsorten - durch das Vorhandensein von Oberflächenüberzügen aus epikutikulären Wachskristallen zustande kommt.

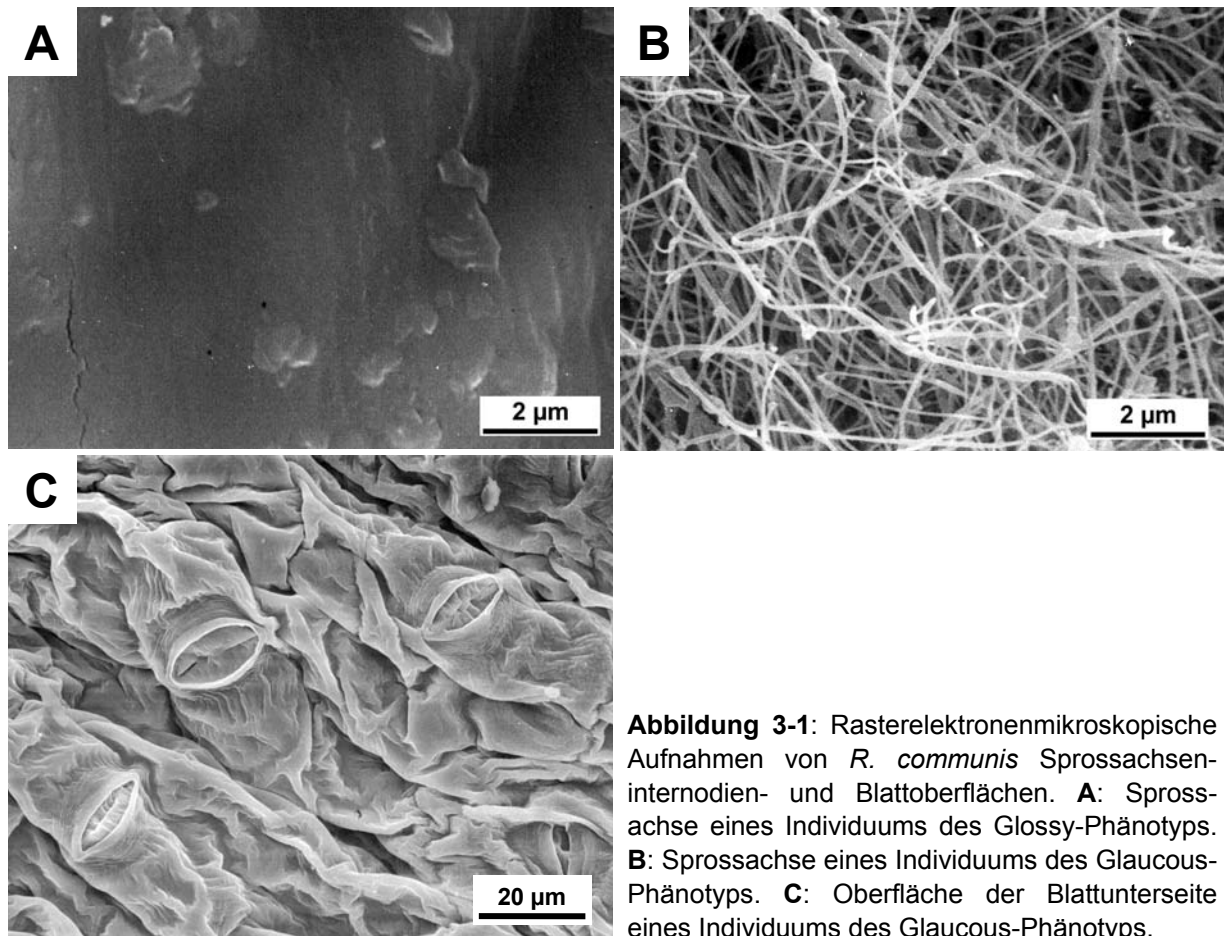
Bei der Aufzucht von *Ricinus communis* unter kontrollierten Anzuchtbedingungen im Gewächshaus des Botanischen Institutes der Universität Würzburg segregierte der Sprossachsen-Phänotyp in einem Verhältnis von 3:1 (Glossy:Glaucous). Die Ausbildung des jeweiligen Sprossachsen-Phänotyps blieb dabei über die Individualentwicklung der Pflanzen hindurch stabil. Es kann also davon ausgegangen werden, dass es sich bei der Ausprägung der Spross-Phänotypen um ein genetisch gesteuertes Merkmal handelt, das unabhängig von individuellen Wachstumsbedingungen ausgebildet wird. In den Gewächshäusern der University of British Columbia, Vancouver, zeigten Individuen des Kultivars Sanguineus stets den Glossy-Phänotyp, Individuen des Kultivars Baker den Glaucous-Phänotyp.

#### 3.1.1 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung nativer Oberflächen beider Sprossachsenphänotypen

Um potenzielle Unterschiede in der Oberflächengestaltung ihrer Sprossachsen und Blattoberflächen und damit die räumliche Struktur ihrer epikutikulären Wachse zu charakterisieren, wurden die nativen Oberflächen mehrere Monate alter Individuen beider Sprossachsen-Phänotypen von *Ricinus communis* rasterelektronenmikroskopisch erfasst. Diese Untersuchungen ergaben, dass die Sprossachsen von Individuen des Glossy-Phänotyps von einem glatten, epikutikulären Wachsfilm bedeckt waren, aus dem wenige kleine Plättchen hervortraten (Abb. 3-1A). Im Gegensatz dazu waren Sprossachsenoberflächen des Glaucous-Phänotyps mit epikutikulären Wachskristallen besetzt, die eine fädige Struktur mit Längen von jeweils 10 – 20 µm und einen Durchmesser von wenigen nm aufwiesen. Die Anordnung dieser Aggregate ließen in der Aufsicht ein dichtes, dreidimensionales Netzwerk auf der Oberfläche erkennen (Abb. 3-1B). Solch ein

---

epikutikulärer Wachskristallbesatz fand sich über die Länge der gesamten Sprossachsenoberfläche mit primärem Abschlussgewebe vom Hypokotyl bis hin zu den jüngsten Internodien, sowie auf den Oberflächen der Petiolen. Die Blattoberflächen beider Phänotypen waren dagegen einheitlich mit einem glatten epikutulären Wachsfilm bedeckt (Abb. 3-1C), die drastischen Unterschiede in der mikroskopischen Struktur der Oberfläche beider Phänotypen also auf Sprossachsen und Blattstiele beschränkt.



**Abbildung 3-1:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von *R. communis* Sprossachseninternodien- und Blattoberflächen. **A:** Sprossachse eines Individuums des Glossy-Phänotyps. **B:** Sprossachse eines Individuums des Glaucous-Phänotyps. **C:** Oberfläche der Blattunterseite eines Individuums des Glaucous-Phänotyps.

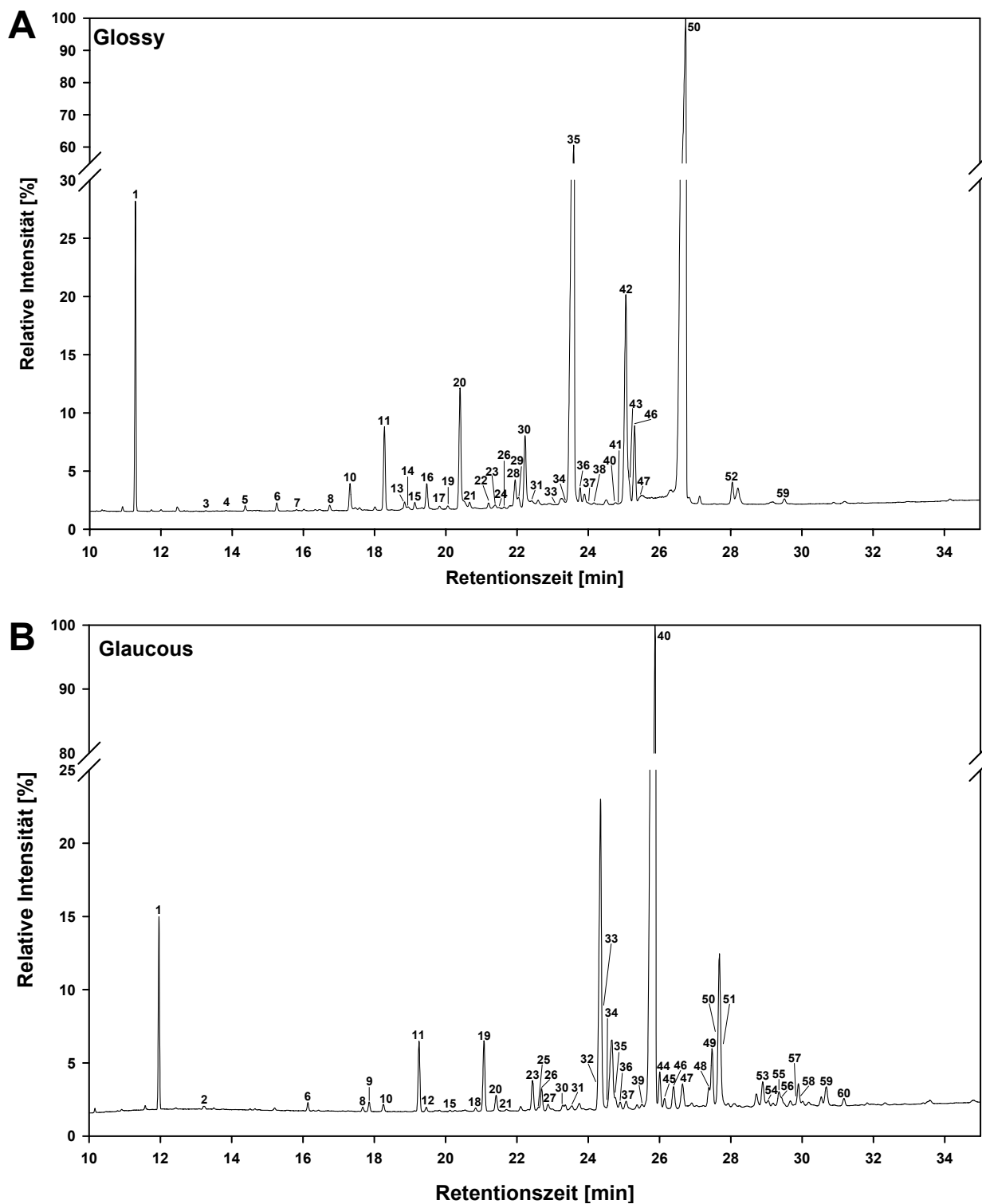
### 3.1.2 Chemische Charakterisierung der kutikulären Wachse beider Stammkutikula-Phänotypen

Für die Gewinnung des kutikulären Gesamtwachses und dessen qualitative und quantitative Analyse wurden jeweils vier Hypoktylabschnitte von 67 Tage alten Rizinuspflanzen beider Phänotypen extrahiert. Um darüber hinaus die epi- und intrakutikulären Wachsbestandteile getrennt zu untersuchen, wurden die oberflächennahen Wachskomponenten von vier Hypokotylen mit Hilfe der Gummi arabicum-Methode jeweils dreimal mechanisch abgehoben und anschließend einer Nachextraktion unterzogen.

#### 3.1.2.1 Zusammensetzung des kutikulären Gesamtwachses

Um potenzielle chemische Unterschiede und damit die mögliche Ursache für die oben beschriebenen mikromorphologischen Unterschiede zwischen beiden Sprossachsenphänotypen von *Ricinus communis* zu verifizieren, wurden die kutikulären Wachse von Hypokotyloberflächen 67 Tage alter Pflanzen beider Phänotypen extrahiert (n=4) und die Extrakte anschließend gaschromatographisch sowie massenspektroskopisch analysiert. In den Chromatogrammen der Wachsextrakte konnten bei beiden Phänotypen rund 50 bis 60 verschiedene Verbindungen identifiziert werden (Abb. 3-2). Unter diesen Substanzen befanden sich einerseits die für kutikuläre Wachse typischen homologen Reihen langkettiger, aliphatischer Verbindungen wie Aldehyde, *n*-Alkane, Fettsäuren und primäre Alkohole. Daneben waren zyklische Verbindungen in Form von Triterpenen (Tab. 3-1) vertreten.

Anhand der silylierten Massenspektren wurden im kutikulären Wachs des Glossy-Phänotyps neben den weit verbreiteten VLC-aliphatischen Verbindungen auch Substanzvertreter der 1,3-Alkandiole identifiziert, einer in kutikulären Wachsgemischen eher selten auftretenden Verbindungsklasse. Dabei zeigten die Fragmente  $m/z$  73, 103 und 147 in den Massenspektren dieser Verbindungen die Anwesenheit von zwei OTMS-Gruppen und damit die Diol-Struktur der Moleküle an. Die Anordnung der funktionellen Gruppen ergab sich aus Anwesenheit des  $\alpha$ -Fragmentes 219  $[\text{TMS-O-CH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-TMS}]^+$ . Die jeweilige Kettenlänge der Substanzen ergab sich aus dem Fragment  $M^+-15$  sowie aus dem Vorhandensein weiterer  $\alpha$ -Fragmente (Abb. 3-3). Die Tatsache, dass die jeweiligen Alkandiole mit  $C_n$ -Kettenlängen bei der gaschromatographischen Auftrennung direkt vor den jeweiligen primären Alkoholen mit Kettenlängen von  $C_{n+2}$  eluierten, bestätigte die massenspektrometrischen Befunde. Insgesamt machten die 1,3-Alkandiole allerdings weniger als 0,5% der gesamten Wachsmenge der Glossy-Individuen aus und waren im Wachs der Glaucous-Individuen nur in Spuren nachweisbar; sie werden deshalb in den nachfolgenden Betrachtungen nicht weiter berücksichtigt.

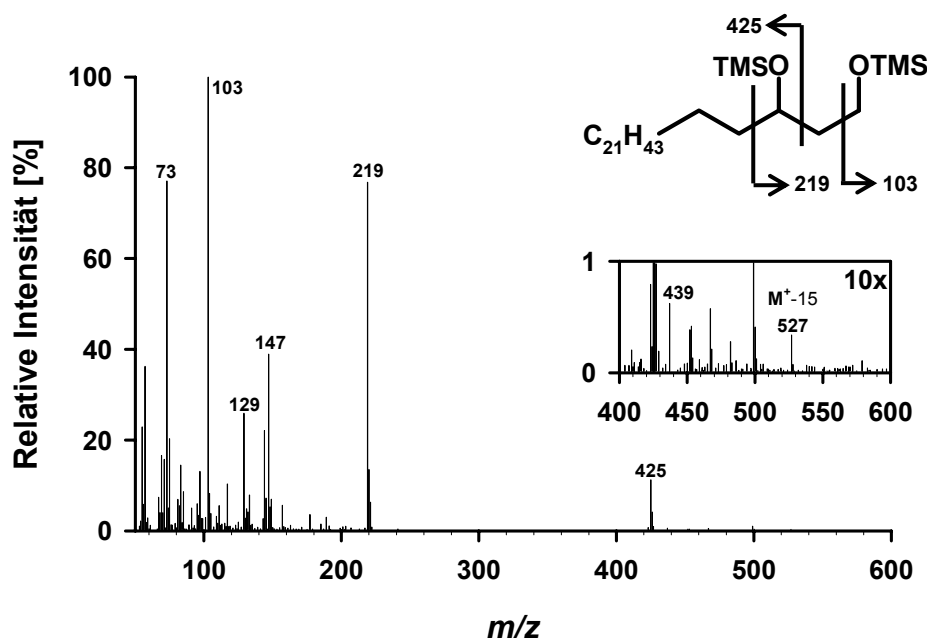


**Abbildung 3-2:** Gaschromatogramm des kutikulären Gesamtwachses von 67 Tage alten *Ricinus communis*-Hypokotylen. Identifizierte Verbindungen wurden gemäß ihrer Retentionsfolge nummeriert (Bezeichnungen der Verbindungen siehe Tabelle 3-1). **A:** Glossy-Phänotyp. **B:** Glaucous-Phänotyp.



**Tabelle 3-1:** Identifizierte Kutikulawachs-Komponenten von *Ricinus communis*-Hypokotylen des Glossy-, sowie des Glaucous-Phänotyps. Die Nummerierung ergibt sich aus der Retentionsfolge in den GC-Läufen (vgl. Abb. 3-2).

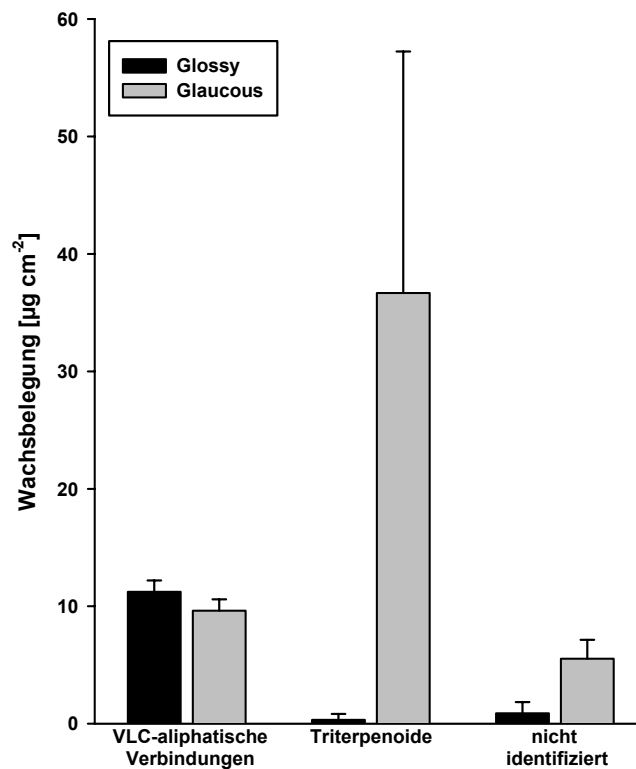
Glossy-Phänotyp		Glaucous-Phänotyp	
Nummer	Verbindung	Nummer	Verbindung
1	<i>n</i> -Tetracosan (ISTD)	1	<i>n</i> -Tetracosan (ISTD)
3	Docosanol	2	<i>n</i> -Pentacosan
4	<i>n</i> -Hexacosan	6	<i>n</i> -Heptacosan
5	Docosansäure	8	<i>n</i> -Octacosan
6	<i>n</i> -Heptacosan	9	Hexacosanal
7	Tricosansäure	10	Tetracosansäure
8	<i>n</i> -Octacosan	11	<i>n</i> -Nonacosan
10	Tetracosansäure	12	Heptacosanal
11	<i>n</i> -Nonacosan	15	Hexacosanol
13	Pentacosansäure	18	<i>n</i> -Triacontan
14	Tetracosan-1,3-diol	19	Octacosanal
15	Hexacosanol	20	Hexacosansäure
16	$\gamma$ -Tocopherol	21	Heptacosanol
17	<i>n</i> -Triacontan	23	<i>n</i> -Hentriacontan
19	Octacosanal	25	nicht identif. Triterpen
20	Hexacosansäure	26	Nonacosanal
21	Heptacosanol	27	Octacosanal (Enol)
22	Cholesterin	30	Octacosanol
23	<i>n</i> -Hentriacontan	31	Octacosanal (Enol)
24	$\alpha$ -Tocopherol	32	Lupenon
26	Nonacosanal	33	Triacontanal
28	Heptacosansäure	34	Taraxerol
29	Hexacosan-1,3-diol	35	Octacosansäure
30	Octacosanol	36	Nonacosanol
31	Octacosanal (Enol)	37	$\beta$ -Amyrin
33	Triacontanal	39	$\alpha$ -Amyrin
34	Taraxerol	40	Lupeol
35	Octacosansäure	44	Triacontanal (Enol)
36	Nonacosanol	45	nicht identif. Triterpen
37	$\beta$ -Amyrin	46	Triacontanol
38	$\beta$ -Sitosterol	47	Triacontanal (Enol)
40	Lupeol	48	Dotriacontanal
41	Hentriacontanal	49	nicht identif. Triterpen
42	Nonacosansäure	50	Triacontansäure
43	Octacosan-1,3-diol	51	nicht identif. Triterpen
46	Triacontanol	53	nicht identif. Triterpen
47	Triacontanal (Enol)	54	Dotriacontanal (Enol)
50	Triacontansäure	55	nicht identif. Triterpen
52	Hentriacontansäure	56	Dotriacontanol
59	Dotriacontansäure	57	Dotriacontanal (Enol)
		58	nicht identif. Triterpen
		59	Dotriacontansäure
		60	nicht identif. Triterpen



**Abbildung 3-3:** Massenspektrum des silylierten Derivats von Hexacosan-1,3-diol.

Die Hypokotyl-Kutikula des Glossy-Phänotypes enthielt  $12,5 \pm 1,9 \mu\text{g cm}^{-2}$  Wachs-komponenten, wohingegen Hypokotyle des Glaucous-Phänotypes mit durchschnittlich  $51,9 \pm 21,1 \mu\text{g cm}^{-2}$  kutikulärem Wachs bedeckt waren. Im kutikulären Wachs des Glossy-Phänotyps wurden mit  $11,2 \pm 1,0 \mu\text{g cm}^{-2}$  ähnlich große und statistisch nicht signifikant unterschiedliche Mengen (Mann Whitney *U*-Test:  $U = 2$ ,  $P = 0,11$ ) an VLC-aliphatischen Verbindungen identifiziert wie im Wachs des Glaucous-Phänotypes mit  $9,6 \pm 1,0 \mu\text{g cm}^{-2}$  (Abb. 3-4). Dagegen war die Menge an zyklischen Triterpen-Verbindungen in beiden Phänotypen deutlich unterschiedlich: Während bei Glossy-Individuen mit  $0,3 \pm 0,5 \mu\text{g cm}^{-2}$  bzw.  $2,3 \pm 3,3\%$  des Gesamtwachses nur sehr geringe absolute und relative Mengen vorhanden waren, dominierte die Stoffklasse der Triterpene mit  $66,5 \pm 15,0\%$  das kutikuläre Wachs des Glaucous-Phänotypes und war mit  $36,7 \pm 20,6 \mu\text{g cm}^{-2}$  in signifikant höheren absoluten Mengen vertreten (Mann Whitney *U*-test:  $U = 0$ ,  $P = 0,029$ ).

Auch wenn die Gesamtmenge an langkettigen Aliphaten pro Fläche in beiden Phänotypen nicht signifikant unterschiedlich war, zeigte die eingehende gaschromatographische Analyse, dass die quantitative Zusammensetzung der einzelnen aliphatischen Substanzklassen stark differierte (Tab. 3-2). Die häufigste aliphatische Substanzklasse im kutikulären Wachs der Glossy-Hypokotyle war die Klasse der Fettsäuren mit  $79,3 \pm 13,6\%$  des Gesamtwachses ( $9,7 \pm 1,0 \mu\text{g cm}^{-2}$ ), gefolgt von primären Alkoholen mit  $5,8 \pm 1,8\%$  ( $0,7 \pm 0,2 \mu\text{g cm}^{-2}$ ), Aldehyden mit  $3,7 \pm 5,7\%$  ( $0,5 \pm 0,9 \mu\text{g cm}^{-2}$ ) und *n*-Alkanen mit  $1,7 \pm 0,6\%$  ( $0,2 \pm 0,1 \mu\text{g cm}^{-2}$ ). Die Gruppe der VLC-aliphatischen Verbindungen im kutikulären Wachs von Glaucous-Hypokotylen wurde von Aldehyden mit  $12,1 \pm 5,8\%$  ( $5,5 \pm 1,0 \mu\text{g cm}^{-2}$ ) dominiert, gefolgt von Fettsäuren mit  $5,7 \pm 4,5\%$  ( $2,2 \pm 1,5 \mu\text{g cm}^{-2}$ ), *n*-Alkanen mit  $2,6 \pm 1,0\%$  ( $1,2 \pm 0,1 \mu\text{g cm}^{-2}$ ) und primären Alkoholen mit  $1,6 \pm 1,2\%$  ( $0,7 \pm 0,2 \mu\text{g cm}^{-2}$ ).

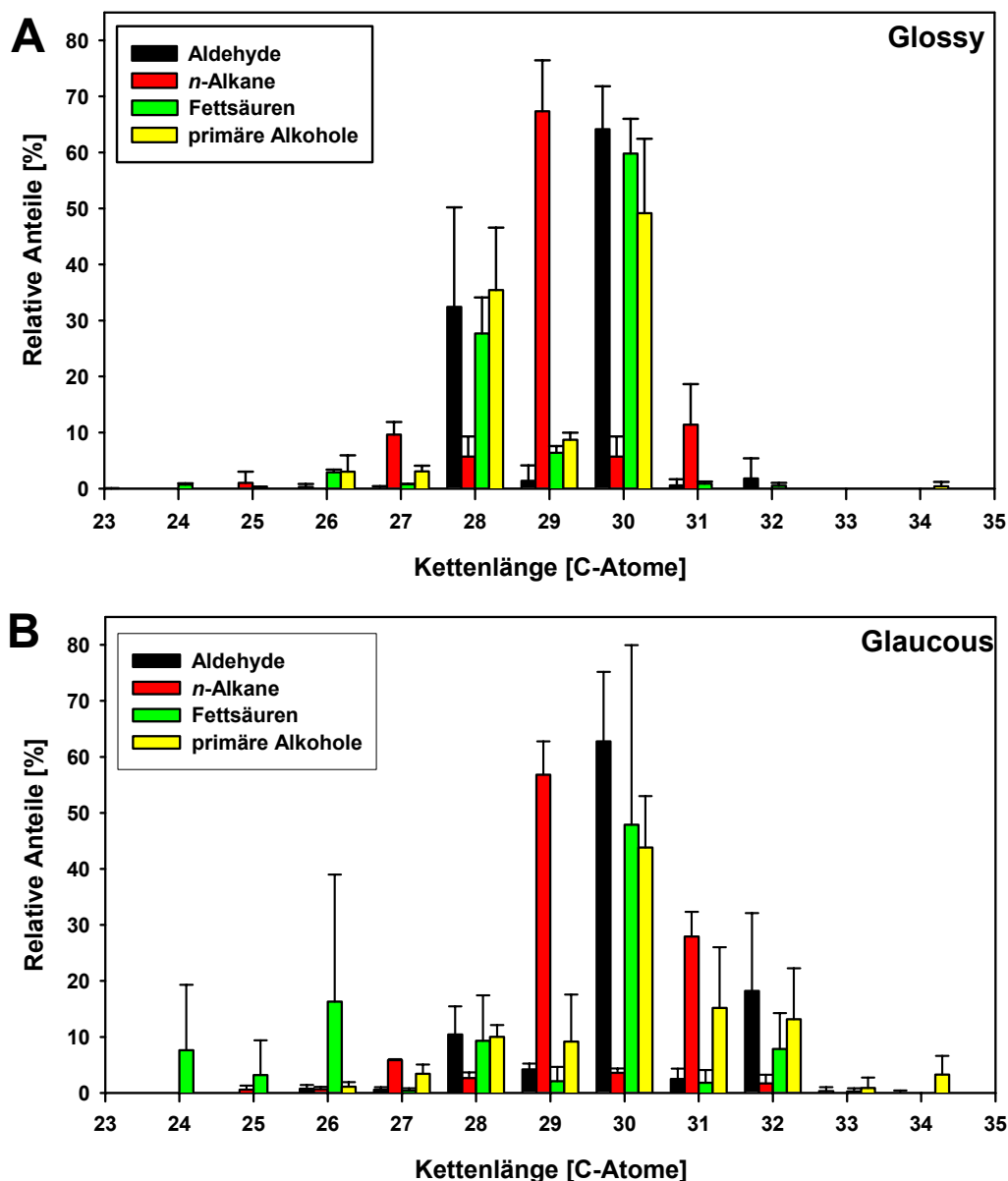


**Abbildung 3-4:** Wachsbelegung und chemische Zusammensetzung kutikulärer Wachse von 67 Tage alten Hypokotylen beider Phänotypen von *R. communis*. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen.

Die jeweilige Kettenlängenverteilung in den entsprechenden langkettigen aliphatischen Substanzklassen war in beiden Phänotypen sehr ähnlich ausgeprägt (Abb. 3-5). Bei den Fettsäuren waren Kettenlängen zwischen 24 und 32 Kohlenstoffatomen mit einem Maximum bei C<sub>30</sub> nachweisbar, wobei geradzahlige Kohlenstoffverbindungen vorherrschten. Die homologen Reihen von Aldehyden und primären Alkoholen wurden ebenfalls von geradzahligen Verbindungen dominiert, zeigten Maxima bei C<sub>30</sub> und waren durch Substanzen mit Längen zwischen 26 bis 32 Kohlenstoffatomen gekennzeichnet. Die Kettenlängenverteilung der *n*-Alkane reichte von C<sub>25</sub> bis C<sub>31</sub>, zeigte ein Maximum bei C<sub>29</sub> und war durch die für Alkane, aufgrund des postulierten Biosyntheseweges über eine Decarbonylierung der entsprechenden Aldehyde, typische Dominanz ungerader Kohlenstoffverbindungen charakterisiert. Im Wachs der Individuen vom Glossy-Phänotyp waren die Alkandiole mit den Verbindungen Tetracosan-1,3-diol, Hexacosan-1,3-diol sowie Octacosan-1,3-diol vertreten.

**Tabelle 3-2:** Absolute und relative Zusammensetzung des kutikulären Wachses von Hypokotyl-Oberflächen 67 Tage alter *R. communis* Pflanzen beider Sprossachsen-Phänotypen. Angegeben sind Mittelwerte ( $n = 4$ ) und Standardabweichung in  $\mu\text{g cm}^{-2}$  bzw. Prozent des Gesamtwachses.

Verbindungs- Kettenlänge	Glossy-Phänotyp		Glaucous-Phänotyp	
	absolut [ $\mu\text{g/cm}^2$ ]	relativ [%]	absolut [ $\mu\text{g/cm}^2$ ]	relativ [%]
<b>Aldehyde</b>				
26	<0,1	<0,1	<0,1	0,1 ± 0,1
28	0,1 ± 0,1	0,7 ± 0,8	0,6 ± 0,3	1,3 ± 0,9
30	0,4 ± 0,6	2,5 ± 3,8	3,5 ± 1,1	8,0 ± 5,2
32	<0,1	0,2 ± 0,5	0,9 ± 0,6	1,8 ± 0,9
<b>n-Alkane</b>				
27	<0,1	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,1
29	0,2 ± 0,1	1,2 ± 0,5	0,7 ± 0,1	1,5 ± 0,8
31	<0,1	0,2 ± 0,0	0,3 ± 0,1	0,7 ± 0,2
<b>Fettsäuren</b>				
24	0,1 ± 0,0	0,5 ± 0,2	<0,1	0,1 ± 0,1
25	<0,1	0,2 ± 0,1	<0,1	<0,1
26	0,3 ± 0,1	2,3 ± 0,6	0,1 ± 0,1	0,3 ± 0,3
27	0,1 ± 0,0	0,6 ± 0,1	<0,1	<0,1
28	2,7 ± 0,5	21,3 ± 2,1	0,3 ± 0,3	0,8 ± 0,9
29	0,6 ± 0,2	5,2 ± 1,7	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,2
30	5,8 ± 1,1	48,0 ± 12,0	1,4 ± 1,0	3,5 ± 2,7
31	0,1 ± 0,0	0,7 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,2
32	0,1 ± 0,0	0,3 ± 0,3	0,2 ± 0,2	0,5 ± 0,4
<b>primäre Alkohole</b>				
26	<0,1	0,2 ± 0,3	<0,1	<0,1
28	0,3 ± 0,1	2,2 ± 1,1	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,2
30	0,3 ± 0,1	2,7 ± 0,5	0,3 ± 0,1	0,7 ± 0,5
32	<0,1	<0,1	0,1 ± 0,1	0,3 ± 0,2
<b>Triterpene</b>				
α-Amyrin	<0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,1
β-Amyrin	<0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,1
Lupeol	0,2 ± 0,3	1,0 ± 1,9	31,3 ± 19,4	56,1 ± 14,5
Taraxerol	0,1 ± 0,2	0,6 ± 1,2	0,8 ± 0,6	1,5 ± 1,0
Lupenon	--	--	0,7 ± 0,6	1,2 ± 1,2
nicht identifiziert	0,9 ± 1,0	6,7 ± 6,5	5,5 ± 1,6	18,7 ± 7,9
<b>gesamt</b>	<b>12,5 ± 1,9</b>		<b>51,9 ± 21,1</b>	



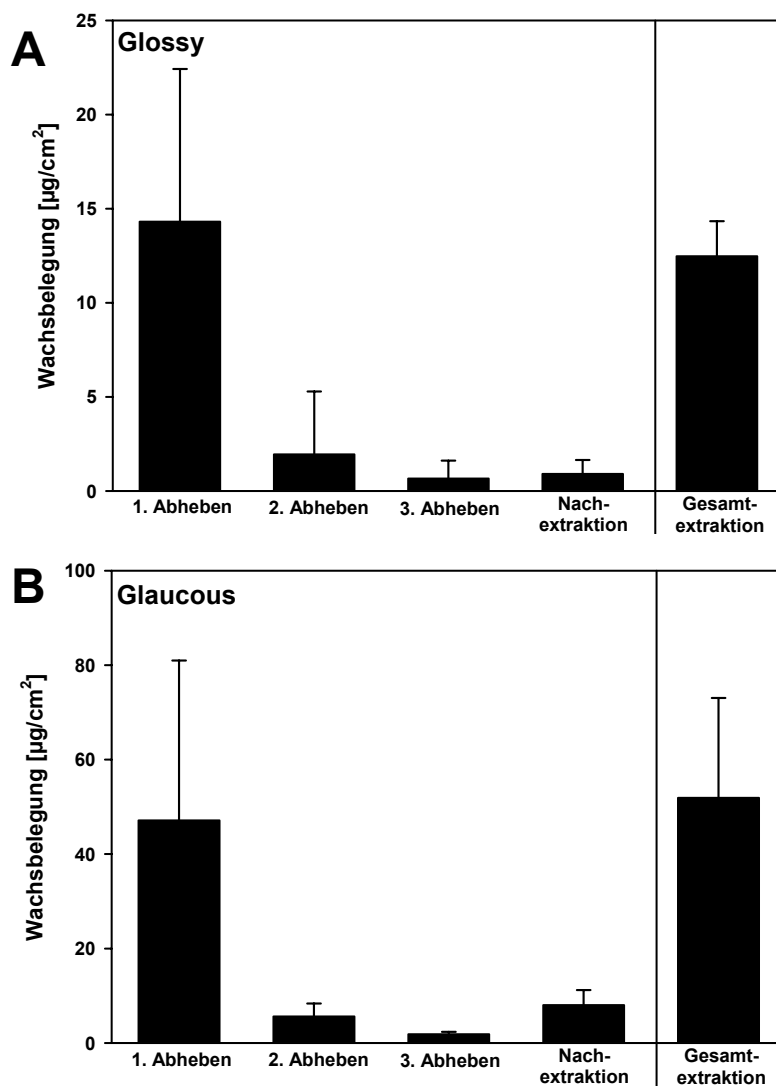
**Abbildung 3-5:** Relative Homologenzusammensetzung [% der jeweiligen Verbindungsklasse] aliphatischer Substanzklassen in kutikulären Wachsen 67 Tage alter Hypokotyle von *Ricinus communis*. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen. **A:** Glossy-Phänotyp. **B:** Glaucous-Phänotyp.

Die Stoffklasse der Triterpene war im kutikulären Wachs des Glossy-Phänotypes durch die pentazyklischen Triterpenole Lupeol,  $\alpha$ -Amyrin,  $\beta$ -Amyrin und Taraxerol vertreten, alle in sehr kleinen absoluten und relativen Mengen (Tab. 3-2). Die Gruppe der Triterpene im kutikulären Wachs von Glaucous-Hypokotylen wurde vom Triterpenol Lupeol dominiert ( $31,3 \pm 19,4 \mu\text{g cm}^{-2}$ ), gleichzeitig die Hauptkomponente des kutikulären Gesamtwachses mit  $56,1 \pm 14,5\%$ . Taraxerol,  $\alpha$ -Amyrin und  $\beta$ -Amyrin sowie das Triterpen-Keton Lupenon waren nur in geringen Mengen nachweisbar. Die Triterpenzusammensetzung beider Phänotypen differierte also im Wesentlichen in der absoluten und relativen Menge des Lupeols.

### 3.1.2.2 Epi- und intrakutikuläre Wachszusammensetzungen

In der jüngeren Vergangenheit wurden Methoden entwickelt, mit der epi- und intrakutikuläre Wachse von planen Oberflächen selektiv beprobt und chemisch analysiert werden können (Jetter *et al.* 2000; Jetter und Schäffer 2001; Riedel *et al.* 2003; Ensikat *et al.* 2000). Das Verfahren, in dem mit Hilfe eines Klebstoffs oberflächennahe Stoffe mechanisch abgehoben werden, musste zunächst auch für konvexe pflanzliche Oberflächen wie Sprossachsen angepasst und optimiert werden (Guhling 2002). Für die Untersuchung der Hypokotyl-Oberflächen von *R. communis* erwies sich Gummi arabicum, ein in wässriger Lösung applizierbares und an der Luft aushärtendes Polysaccharid, als geeignet. Durch die mehrfache Wiederholung des Abhebevorgangs an derselben Oberfläche muss dabei sichergestellt werden, dass das epikutikuläre Wachs quantitativ abgetragen wird. Erst dadurch lassen sich anschließend die verbleibenden intrakutikulären Wachskomponenten extraktiv gewinnen. Die Hypokotyle von *R. communis* erwiesen sich als mechanisch ausreichend stabil, um diese Abfolge von Beprobungen ohne mechanische Verletzungen, und damit ohne Kontamination, aus dem Gewebeinneren durchzuführen. Die Analysen der entsprechenden Abhebe- und Extraktionsproben konnten zu Kontrollzwecken mit Gesamtwachs-Extraktionen verglichen werden, bei denen mit Hilfe einer Gesamtextraktion alle kutikulären Wachse gewonnen wurden. Alle Analysen wurden für vier unabhängige Parallelen durchgeführt, im Folgenden werden Mittelwerte und Standardabweichungen angegeben.

67 Tage alte Hypokotyle von beiden Spross-Phänotypen wurden mit Hilfe dieses Verfahrens auf ihre epi- bzw. intrakutikuläre Wachszusammensetzung hin untersucht. Bei beiden Phänotypen wurde der Abhebevorgang dreimal wiederholt. Dabei wurde eine starke Abnahme der Wachsausbeuten mit jedem Abhebeschritt beobachtet (Abb. 3-6), so dass davon ausgegangen werden kann, dass nach dem letzten Abhebeschritt nahezu der gesamte epikutikuläre Wachsanteil selektiv abgehoben und präparativ gewonnen wurde. Die nachfolgende Extraktion der verbliebenen intrakutikulären Wachsanteile erbrachte jeweils höhere Wachsausbeuten als der letzte Abhebeschritt. In beiden Phänotypen wurden bei der selektiven Beprobung der epikutikulären Wachse weitaus höhere Ausbeuten erzielt als bei der Nachextraktion (Tab. 3-3):  $16,9 \mu\text{g cm}^{-2}$  gegenüber  $0,9 \mu\text{g cm}^{-2}$  bei Hypokotylen des Glossy- und  $54,6 \mu\text{g cm}^{-2}$  gegenüber  $8,0 \mu\text{g cm}^{-2}$  bei Hypokotylen des Glaucous-Phänotyps. In beiden Phänotypen war der Großteil des Wachses demnach epikutikulär lokalisiert. Die Quantitative Analyse des Gesamtwachses, gewonnen durch Extraktion der Sprossoberfläche ohne vorherige Gummi arabicum-Behandlung (3.1.2.1), stimmte mit der Summe der Ausbeuten aus Abhebe- und Nachextraktionsversuchen weitgehend überein (Abb. 3-6).



**Abbildung 3-6:** Vergleich der kutikulären Wachsausbeuten bei 67 Tage alten *Ricinus communis*-Hypokotylen bei drei aufeinanderfolgenden Abhebeschritten und Nachextraktion einerseits und Gesamtextraktion andererseits. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen. **A:** Glossy-Phänotyp. **B:** Glaucous-Phänotyp.

Während bei den Individuen des Glaucous-Phänotyps Triterpene sowohl in der epi- ( $30,0 \mu\text{g cm}^{-2}$ ), als auch in der intrakutikulären Wachsfraktion ( $8,6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) gegenüber VLC-Aliphaten ( $5,6 \mu\text{g cm}^{-2}$  epi- bzw.  $1,2 \mu\text{g cm}^{-2}$  intrakutikulär) deutlich dominierten, zeichnete sich bei den Glossy-Individuen ein anderes Bild ab: Im epikutikulären Wachsgemisch wiesen VLC-Aliphaten mit  $15,0 \mu\text{g cm}^{-2}$  weit größere Mengen in der Wachsbelegung auf als Triterpene mit  $0,3 \mu\text{g cm}^{-2}$ ; im intrakutikulären Wachs dagegen waren Triterpenverbindungen mit  $0,3 \mu\text{g cm}^{-2}$  in größerer Menge vertreten als VLC-Aliphaten mit  $0,2 \mu\text{g cm}^{-2}$ .

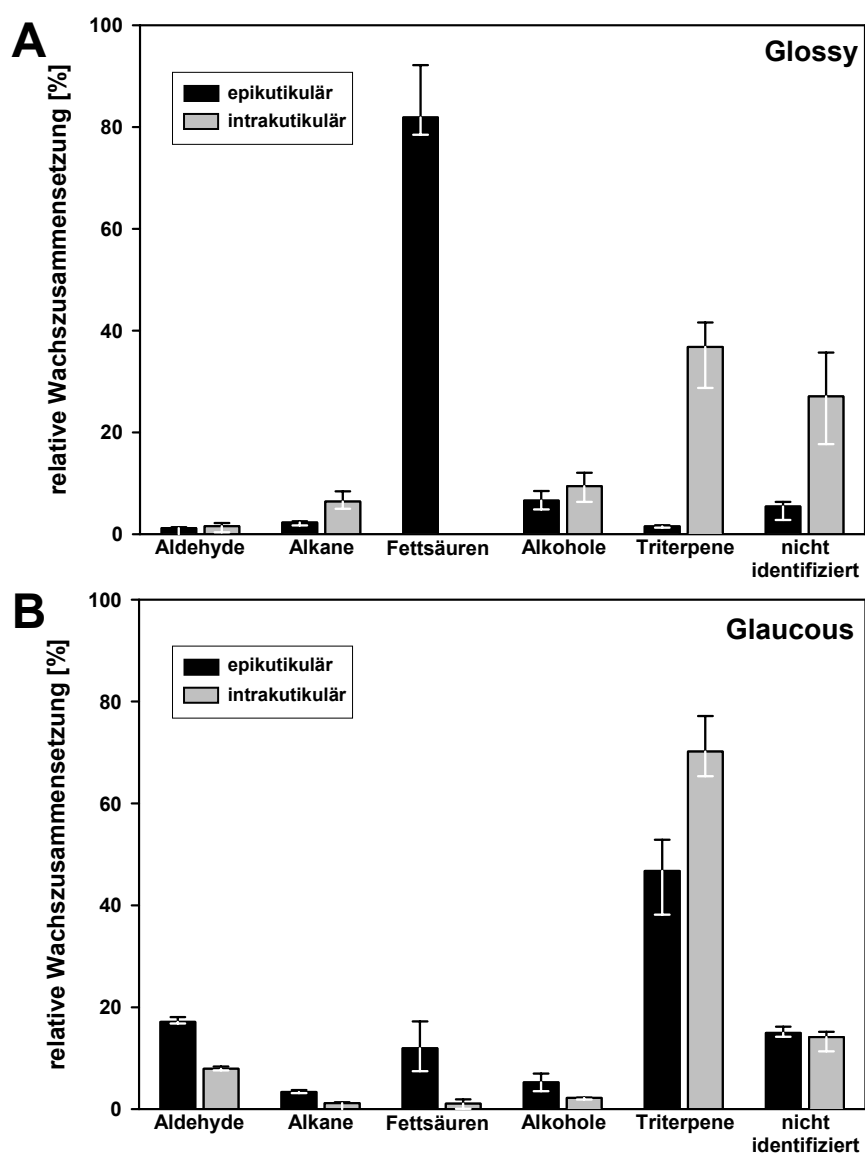
**Tabelle 3-3:** Absolute Ausbeuten der durch Abhebemethode (drei Wiederholungen) und Nachextraktion 67 Tage alter Hypokotyle beider Phänotypen von *Ricinus communis* gewonnenen Wachsschichten. Angaben in  $\mu\text{g cm}^{-2}$  mit Mittelwerten (n=4) und Standardabweichung.

Verbindungs- klasse	Verbindung/ Kettenlänge	Glossy-Phänotyp		Glaucous-Phänotyp	
		abgehoben (epikutikulär)	nachextrahiert (intrakutikulär)	abgehoben (epikutikulär)	nachextrahiert (intrakutikulär)
Aldehyde	26	<0,1	--	0,1 ± 0,1	--
	28	0,2 ± 0,4	<0,1	1,1 ± 0,9	<0,1
	30	1,7 ± 3,2	<0,1	5,7 ± 2,9	0,4 ± 0,3
	32	0,1 ± 0,3	--	1,0 ± 0,4	<0,1
<i>n</i> -Alkane	27	<0,1	<0,1	0,1 ± 0,1	<0,1
	29	0,2 ± 0,1	<0,1	1,0 ± 0,7	<0,1
	31	<0,1	--	0,5 ± 0,5	<0,1
Fettsäuren	24	0,1 ± 0,0	<0,1	0,1 ± 0,1	<0,1
	25	<0,1	--	<0,1	--
	26	0,3 ± 0,1	<0,1	0,3 ± 0,2	<0,1
	27	0,1 ± 0,0	--	<0,1	--
	28	2,4 ± 0,2	--	0,5 ± 0,4	<0,1
	29	0,7 ± 0,0	<0,1	0,2 ± 0,2	<0,1
	30	7,3 ± 3,8	0,1 ± 0,1	2,2 ± 2,0	<0,1
	31	0,1 ± 0,1	--	0,1 ± 0,1	--
	32	0,2 ± 0,4	<0,1	0,7 ± 0,5	<0,1
primäre Alkohole	26	<0,1	--	<0,1	--
	28	0,3 ± 0,2	<0,1	0,3 ± 0,1	<0,1
	30	0,6 ± 0,8	<0,1	1,2 ± 0,5	0,1 ± 0,0
	32	0,1 ± 0,2	--	0,4 ± 0,3	<0,1
Triterpene	$\alpha$ -Amyrin	--	<0,1	0,1 ± 0,1	<0,1
	$\beta$ -Amyrin	<0,1	<0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1
	Lupeol	0,2 ± 0,2	0,1 ± 0,2	23,1 ± 18,5	4,6 ± 2,8
	Taraxerol	<0,1	0,1 ± 0,0	0,7 ± 0,9	0,2 ± 0,1
	Lupenon	--	<0,1	1,0 ± 1,4	0,2 ± 0,1
nicht identifiziert		1,7 ± 2,3	0,3 ± 0,3	7,5 ± 4,1	1,2 ± 0,3
<b>gesamt</b>		<b>16,9 ± 12,4</b>	<b>0,9 ± 0,7</b>	<b>54,6 ± 36,4</b>	<b>8,0 ± 3,2</b>

Die qualitative Analyse zeigte deutliche Unterschiede in der Zusammensetzung von epi- und intrakutikulären Wachsanteilen bei Hypokotylen des Glossy-Phänotyps und offenbarte damit auffällige Gradienten in der Konzentration verschiedener Komponenten zwischen den Kutikula-Kompartimenten (Tab. 3-4; Abb. 3-7). Das epikutikuläre Wachs war von aliphatischen Komponenten stark dominiert (Alkane 2,6%, Aldehyde 6,6%, Säuren 75,0%, primäre Alkohole 6,5%, Dirole 0,4%), Triterpene traten nur mit 1,6% Wachsanteil in



Erscheinung. Im intrakutikulären Wachs war der Triterpenanteil mit 40,0% demgegenüber stark erhöht (darunter Taraxerol mit 16,0%,  $\beta$ -Amyrin mit 4,7% und nicht identifizierte Triterpene mit 8,6%). Es ist von besonderem Interesse, dass Lupeol mit 6,0% nur in geringen Mengen detektiert wurde, obwohl dieses Triterpenol im Sprosswachs des Glaucous-Phänotyps besonders prominent war. Mit 23% war der Anteil an VLC-Aliphaten im Vergleich zur epikutikulären Wachsfraktion sehr gering.



**Abbildung 3-7:** Vergleich der jeweiligen relativen Anteile einzelner Substanzklassen an den epi- bzw. intrakutikulären Wachsschichten 67 Tage alter *R. communis*-Hypokotyle. Angegeben sind Median mit 1. und 3. Quartile. **A:** Glossy-Phänotyp. **B:** Glaucous-Phänotyp.

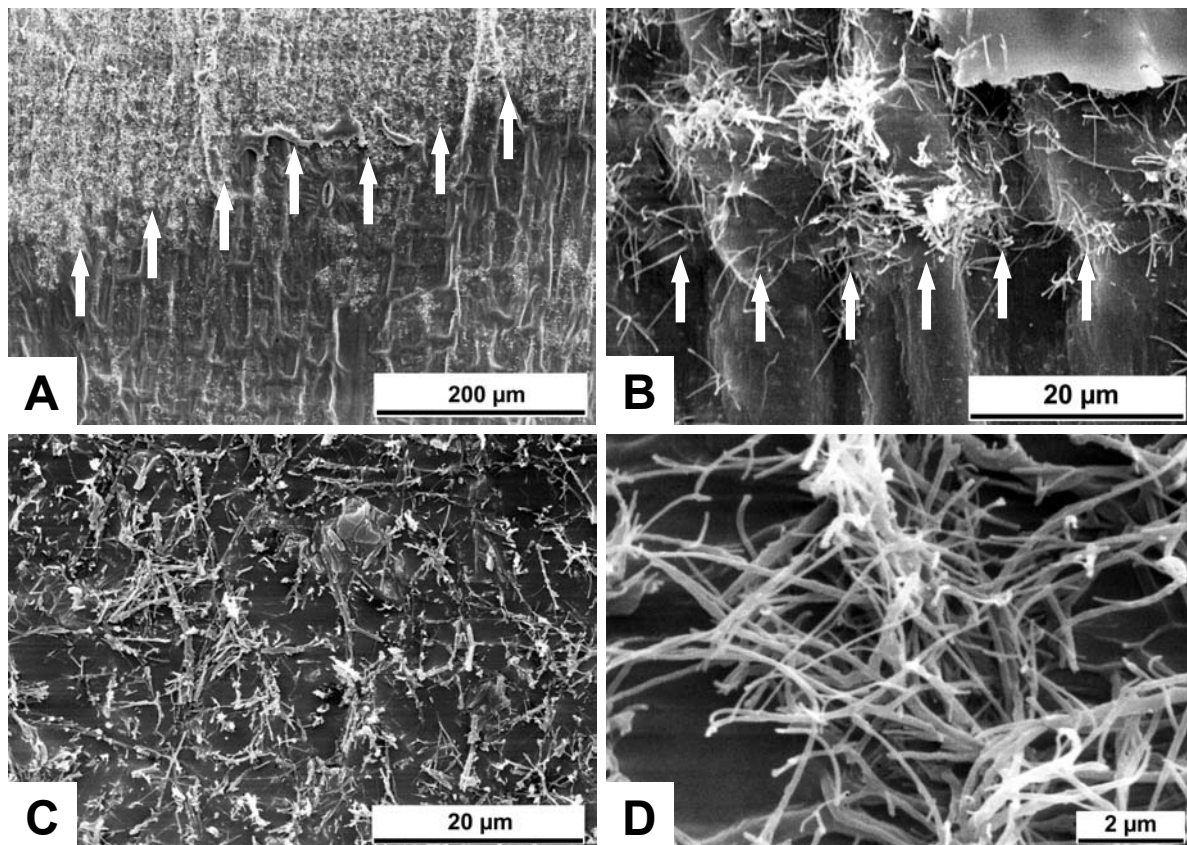
An Hypokotylen von Pflanzen des Glaucous-Phänotyps konnte keine besonders ausgeprägte chemische Schichtung bezüglich der kutikulären Wachse festgestellt werden. Hier dominierten Triterpene sowohl im epi- (49,2%) wie auch im intrakutikulären Wachs (68,0%) gegenüber aliphatischen Verbindungen. Die Hauptkomponente stellte dabei Lupeol

dar, das mit 39,1% im epikutikulären und 54,5% im intrakutikulären Wachs vertreten war. Der hohe Anteil von Lupeol in den mechanisch abgehobenen Oberflächenpräparationen zeigte, dass dieses Triterpen als Kristallbildner der fadenförmigen Wachskristalle auf *Ricinus*-Hypokotylen der Glaucoous-Individuen angesehen werden muss. Daneben wurden 24,0% weiterer Triterpene (darunter Lupenon mit 1,2%, Taraxerol mit 0,9% und  $\beta$ - und  $\alpha$ -Amyrin mit je 0,2%) und 36,2% aliphatischer Komponenten im epikutikulären Wachs nachgewiesen.

**Tabelle 3-4:** Relative Zusammensetzung der Wachsschichten, die durch die Abhebemethode (drei Wiederholungen) und die Nachextraktion 67 Tage alter Hypokotyle beider Phänotypen von *Ricinus communis* gewonnen wurden. Angegeben in Prozent der jeweiligen Wachsschicht mit Mittelwerten (n=4) und Standardabweichung.

Verbindungs- klasse	Verbindung/ Kettenlänge	Glossy-Phänotyp		Glaucoous-Phänotyp	
		abgehoben (epikutikulär)	nachextrahiert (intrakutikulär)	abgehoben (epikutikulär)	nachextrahiert (intrakutikulär)
Aldehyde	26	<0,1	--	0,1 ± 0,1	<0,1
	28	0,7 ± 0,9	0,8 ± 0,1	1,8 ± 0,6	0,6 ± 0,3
	30	5,2 ± 8,7	0,8 ± 1,7	11,1 ± 1,5	5,3 ± 1,8
	32	0,4 ± 0,8	--	2,2 ± 0,8	0,6 ± 0,3
<i>n</i> -Alkane	27	0,2 ± 0,1	0,8 ± 0,4	0,2 ± 0,0	0,5 ± 0,8
	29	1,6 ± 0,9	2,7 ± 1,8	1,7 ± 0,2	0,9 ± 0,9
	31	0,2 ± 0,1	0,5 ± 0,2	0,9 ± 0,3	0,5 ± 0,7
Fettsäuren	24	0,4 ± 0,1	0,1 ± 0,2	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,1
	25	0,1 ± 0,1	--	<0,1	<0,1
	26	2,1 ± 0,6	0,2 ± 0,3	0,5 ± 0,3	0,1 ± 0,1
	27	0,6 ± 0,3	<0,1	0,1 ± 0,0	<0,1
	28	18,3 ± 8,3	--	1,5 ± 1,0	0,1 ± 0,3
	29	5,2 ± 2,4	1,1 ± 2,2	0,6 ± 0,4	0,1 ± 0,2
	30	46,5 ± 6,8	3,4 ± 6,8	6,8 ± 6,1	0,5 ± 0,6
	31	0,6 ± 0,3	--	0,2 ± 0,2	--
	32	0,6 ± 1,0	0,1 ± 0,3	1,3 ± 0,5	0,2 ± 0,3
primäre Alkohole	26	0,2 ± 0,1	0,4 ± 0,3	0,1 ± 0,0	<0,1
	28	2,0 ± 0,9	3,6 ± 2,5	0,6 ± 0,2	0,2 ± 0,1
	30	2,9 ± 1,7	4,9 ± 2,5	2,4 ± 0,8	1,4 ± 0,8
	32	0,2 ± 0,5	--	0,8 ± 0,6	0,2 ± 0,2
Triterpene	$\alpha$ -Amyrin	--	0,5 ± 1,0	0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,1
	$\beta$ -Amyrin	<0,1	4,7 ± 2,4	0,2 ± 0,2	1,3 ± 1,8
	Lupeol	0,7 ± 0,7	6,1 ± 7,6	39,1 ± 8,3	54,5 ± 15,3
	Taraxerol	<0,1	16,0 ± 9,9	0,9 ± 0,7	2,2 ± 0,8
	Lupenon	--	0,2 ± 0,5	1,2 ± 1,1	2,2 ± 0,7
nicht identifiziert		7,1 ± 5,0	27,9 ± 11,5	14,5 ± 1,6	15,9 ± 4,7

Die Effizienz der Abhebetechnik wurde mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie überprüft und dokumentiert. Bereiche, auf denen die epikutikulären Wachse durch einmaliges Abheben beprobt worden waren, zeigten, dass große Bereiche der Kristalle abgetragen waren und teilweise angedrückt wurden. Nach dem dritten Abhebeschritt waren auf den beprobten Flächen nur noch vereinzelt fädige Wachskristalle rasterelektronenmikroskopisch nachweisbar, so dass auf Übergangszonen zwischen behandelten und unbehandelten Flächen eine scharfe Kante zu erkennen war (Abb. 3-8A und B). Der Innenseite von Gummi arabicum-Präparaten hafteten die mechanisch abgerissenen fädigen epikutikulären Wachskristalle an, die in Struktur und Dimension denen auf den nativen Oberflächen entsprachen (Abb. 3-8C und D). Diese mikromorphologischen Ergebnisse bestätigen damit die oben geschilderten chemischen Befunde. Die Behandlung der *R. communis*-Sprossachsen mit Gummi arabicum ermöglichte es, die epikutikulären Kristalle der Glaucous-Versuchspflanzen zu einem großen Teil abzutragen und damit die epikutikuläre und die intrakutikuläre Wachsschicht getrennt zu beproben. Die mechanische Wachsgewinnung ist hochgradig selektiv für die Kristalle und erlaubt damit eine spezifische Analyse der Kristallzusammensetzung.

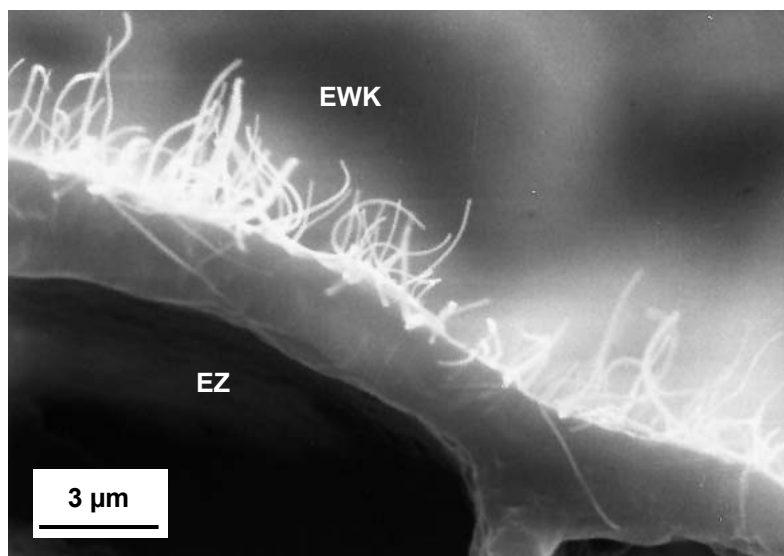


**Abbildung 3-8:** Rasterelektronenmikroskopische Bilder zur Abhebemethode für die selektive Beprobung epikutikulärer Wachse. **A** und **B**: Oberfläche eines Übergangsbereichs von nativer (oben) zu mehrfach abgehobener Fläche (unten) bei einem Hypokotyl vom Glaucous-Phänotyp; die Pfeile markieren die Abhebekante. **C** und **D**: Aufsicht auf die Innenseite eines getrockneten Gummi arabicum-Präparates mit daran anhaftenden Wachskristallen nach dem Abhebevorgang.

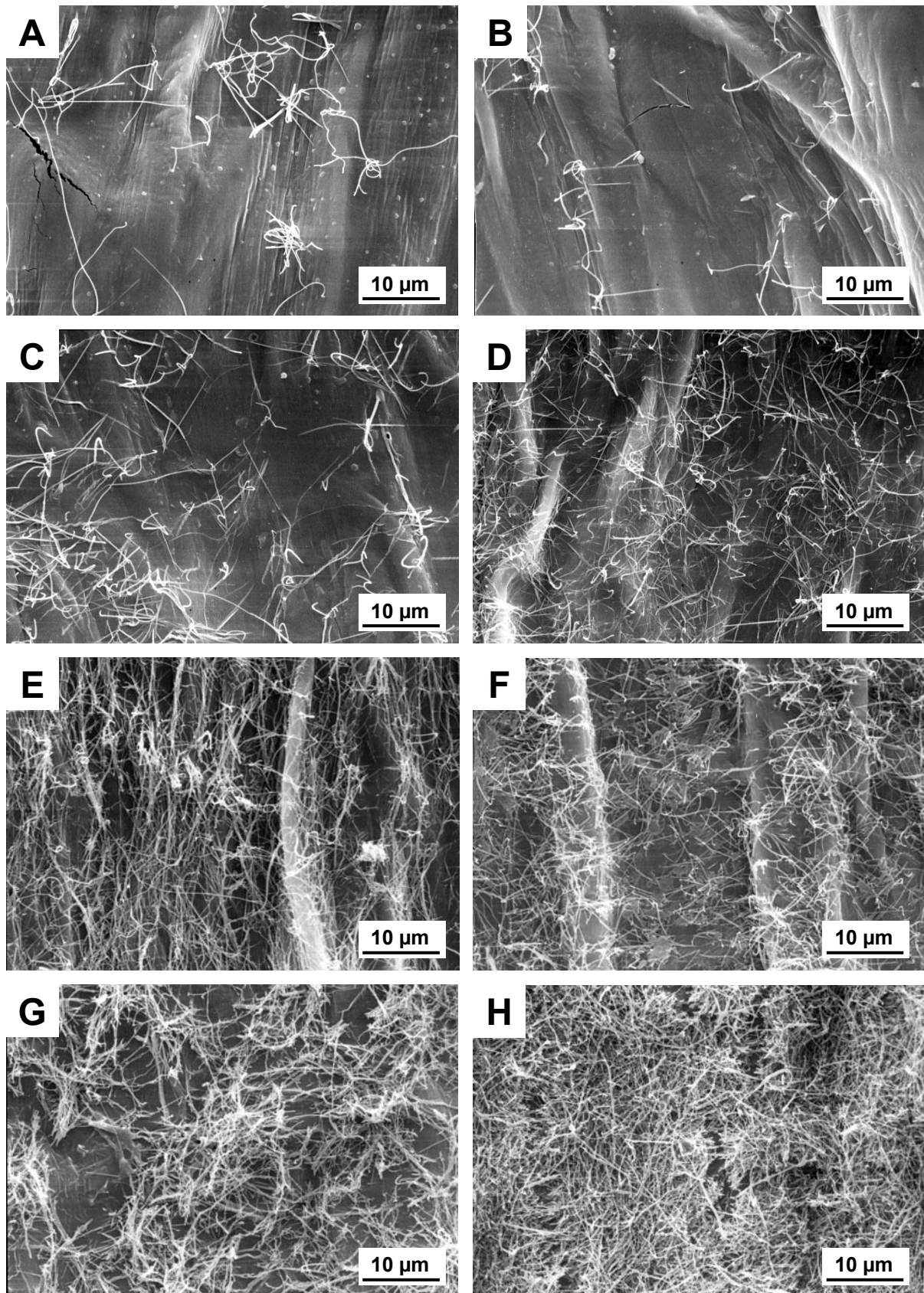
### 3.2 Kutikula-Ontogenese: Kutikuläre Wachszusammensetzung während der frühen Sprossachsenentwicklung

#### 3.2.1 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung von Hypokotyloberflächen während der frühen Entwicklungsphase

Um die Bildung der epikutikulären Wachskristalle während der frühen Entwicklung der Individuen mit Glaucous-Phänotyp von *Ricinus communis* zu dokumentieren, wurden Hypokotyl-Oberflächen unterschiedlich alter Pflanzen rasterelektronenmikroskopisch untersucht (Abb. 3-9). Diese Arbeiten wurden von Frau Barbara Hobl im Rahmen ihrer Diplomarbeit (Hobl 2005) erhoben, die in enger Zusammenarbeit mit meinen Untersuchungen am Lehrstuhl für Botanik II, Universität Würzburg, erstellt wurde. Bereits drei Tage nach dem Durchbrechen der Keimlinge aus dem Bodensubstrat waren erste vereinzelte Wachskristalle auf den Hypokotyloberflächen erkennbar, die mit ihrer Länge von 10-30  $\mu\text{m}$  und ihrer fadenförmigen Struktur denen auf Sprossoberflächen mehrerer Monate alter Pflanzen entsprachen. Ab Tag 6 stieg die Dichte der Wachskristalle auf den Hypokotyloberflächen kontinuierlich an, so dass an Tag 25 die gesamte Oberfläche mit fadenförmigen Wachskristallen überzogen war. Bei 67 Tage alten Pflanzen schließlich formten die epikutikulären Kristalle ein dreidimensionales Netzwerk auf den Hypokotyloberflächen entsprechend den Oberflächen alter Rizinus-Pflanzen (s. Abb 3-1B). Im Gegensatz zu Individuen des Glaucous-Phänotyps waren während der frühen Entwicklung auf den Hypokotylen von Glossy-Individuen keine fadenförmigen Wachskristalle auszumachen. Ein Querschnitt durch die Hypokotyl-Epidermis eines 18 Tage alten Individuums ließ erkennen, dass das Netzwerk aus epikutikulären Wachskristallen in dieser Entwicklungsphase bereits eine Dicke von bis zu 5  $\mu\text{m}$  erreicht hatte (Abb. 3-10).



**Abbildung 3-10:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines Querschnitts durch die Hypokotyl-Epidermis einer 18 Tage alten *Ricinus communis*-Pflanze. EZ = Epidermiszelle. EWK = Epikutikuläre Wachskristalle.



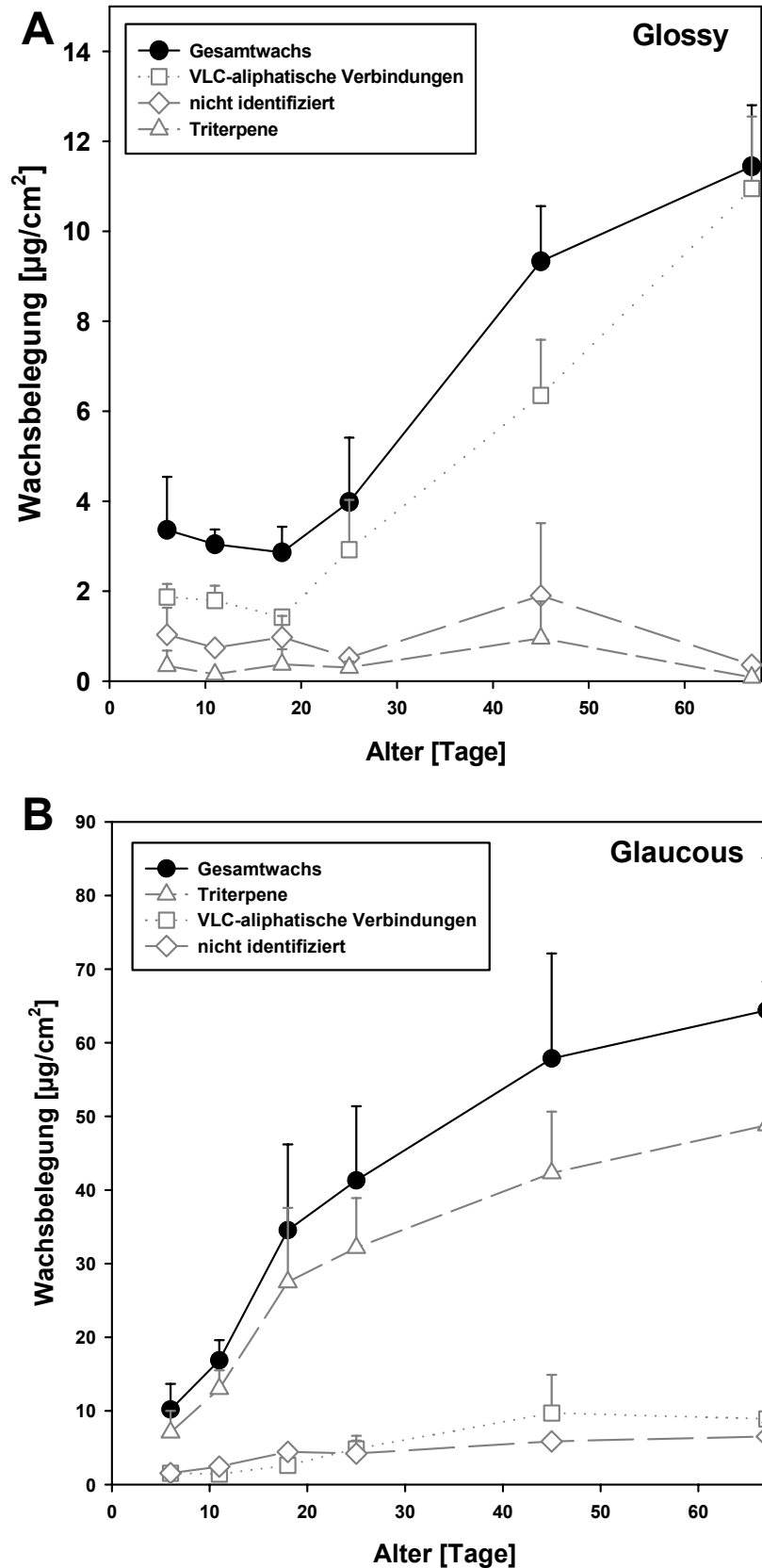
**Abbildung 3-9:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen unterschiedlich alter Hypokotyl-oberflächen von Individuen des Glaucous-Phänotyps von *Ricinus communis*: 3 Tage (A), 5 Tage (B), 6 Tage (C), 11 Tage (D), 18 Tage (E), 25 Tage (F), 45 Tage (G) und 67 Tage (H) nach Erscheinen an der Oberfläche.

### 3.2.2 Chemische Charakterisierung der Wachszusammensetzung im Laufe der Hypokotylentwicklung

Um die zeitabhängige Akkumulation von einzelnen Substanzklassen und von Einzelkomponenten in der Kutikula und damit die Dynamik der chemischen Zusammensetzung des kutikulären Wachses im Laufe der frühen Stamentwicklung zu eruieren, wurden Hypokotyl-Oberflächen von *Ricinus communis*-Pflanzen beider Phänotypen in verschiedenen Entwicklungsstadien extrahiert und analytisch untersucht. Auch hier wurden die praktischen Arbeiten von Frau Barbara Hobl im Rahmen ihrer Diplomarbeit durchgeführt. Die beiden Sprossachsen-Phänotypen konnten in der Regel am sechsten Tag nach der Keimung durch die weißliche Oberfläche auf den Hypokotylen der Individuen des Glaucous-Phänotyps - verursacht durch die Kristallbildung - mit bloßem Auge voneinander unterschieden werden. Dies ermöglichte eine getrennte Wachsbeprobung beider Phänotypen 6, 11, 18, 25, 45 und 67 Tage nach der Keimung (n=2 bzw. n=4 für verschiedene Beprobungszeitpunkte). Für diese Untersuchung wurden nur Hypokotyl-Fragmente verwendet, die sich unmittelbar unterhalb des ersten Nodiums befanden, um die Vergleichbarkeit der Daten im Laufe der Entwicklung zu gewährleisten.

In der Entwicklung der Hypokotyl-Kutikula von Individuen des Glossy-Phänotyps ließen sich zwei Phasen bezüglich der Gesamtwachsbelegung beobachten. In einem ersten Zeitabschnitt von Tag 6 bis Tag 18 nahm die absolute Menge des Wachses von 3,4 auf 2,9  $\mu\text{g cm}^{-2}$  stetig ab, zeigte also eine Nettoabnahme der Wachsbelegung pro Flächeneinheit. In einem zweiten Zeitintervall, beginnend mit Tag 25, reicherten sich dagegen die absoluten Wachsmengen stetig an bis auf 11,4  $\mu\text{g cm}^{-2}$  an Tag 67 (Abb. 3-11A). Zu jedem Zeitpunkt wurde die Wachszusammensetzung von langkettigen aliphatischen Komponenten dominiert (von  $60 \pm 14\%$  des Gesamtwachses an Tag 6 bis zu  $96 \pm 1\%$  an Tag 67), während Triterpen-Verbindungen nur mit sehr geringen absoluten Mengen und relativen Anteilen vertreten waren.

Im ersten Zeitintervall wurden die Wachsmischungen von primären Alkoholen, Alkan-1,3-diolen und einer weiteren aliphatischen Stoffklasse, den 3-Hydroxyaldehyden, dominiert. Diese für kutikuläre Wachse ungewöhnliche Substanzklasse wies in den Massenspektren der einzelnen Verbindungen die Alkoholfragmente  $m/z$  73 und 103 auf. Das Vorhandensein nur einer Hydroxyl-Funktion ergab sich aus dem Fehlen des für Diole typischen Fragments  $m/z$  147. Ein prominentes  $\alpha$ -Fragment  $m/z$  145 in allen homologen Verbindungen verwies auf die zusätzliche Carbonyl-Funktion und die 1,3-Stellung der funktionellen Gruppen. Die Kettenlänge der jeweiligen Substanz ergab sich aus den Fragmenten  $[M]^+$ ,  $[M-\text{CH}_3]^+$  sowie  $[M-\text{HOTMSi}]^+$ . Innerhalb der Hydroxyaldehyde waren Kettenlängen von  $\text{C}_{22}$  bis  $\text{C}_{28}$  nachweisbar, ebenso wie bei den 1,3-Alkandiolen.



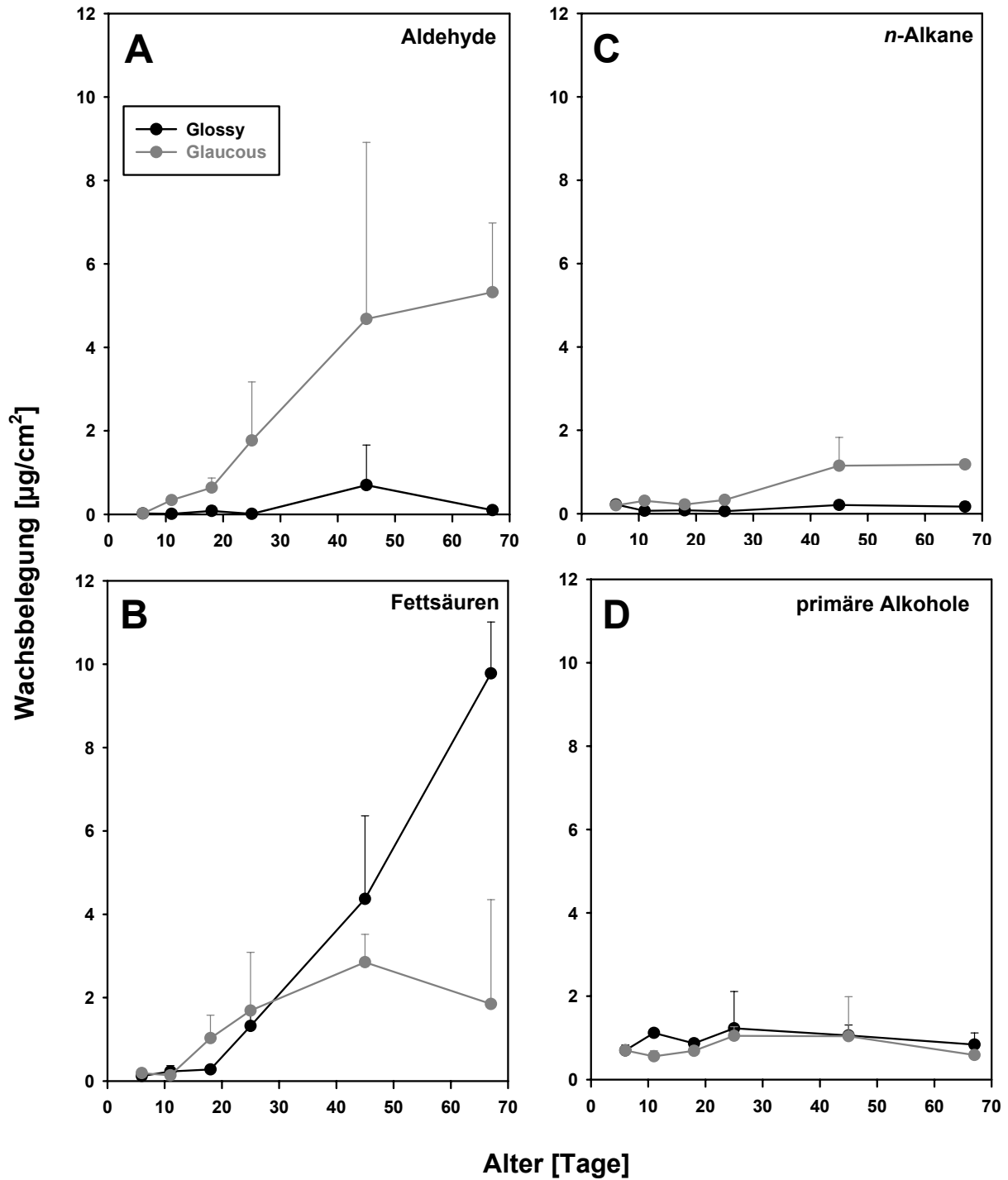
**Abbildung 3-11:** Kutikuläre Gesamtwachsbelegung und Wachsbelegung mit VLC-aliphatischen Verbindungen sowie Triterpenen im Laufe der Hypokotylentwicklung von *Ricinus communis*. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen. **A:** Glossy-Phänotyp. **B:** Glaucous-Phänotyp.

Während Alkandiole und Hydroxyaldehyde lediglich an den ersten beiden Beprobungszeitpunkten in nennenswerten Mengen zu detektieren waren, erreichten die absoluten Mengen an primären Alkoholen im Laufe der Hypokotylentwicklung ein Maximum an Tag 11 mit  $1,2 \mu\text{g cm}^{-2}$  (Abb. 3-12A) und blieben im weiteren Verlauf der Entwicklung relativ konstant. Fettsäuren blieben im ersten Zeitintervall auf niedrigem Niveau bei ca.  $0,2 \mu\text{g cm}^{-2}$ . Mit Tag 25 konnte ein starker Anstieg dieser Verbindungsklasse bis zu Tag 67 auf  $9,8 \mu\text{g cm}^{-2}$  ( $86 \pm 1\%$  des Gesamtwachses) beobachtet werden (Abb. 3-12B). Aldehyde und *n*-Alkane trugen nur geringe Anteile zur absoluten Gesamtwachsmenge während der ersten 67 Tage bei (Abb. 3-12C und D).

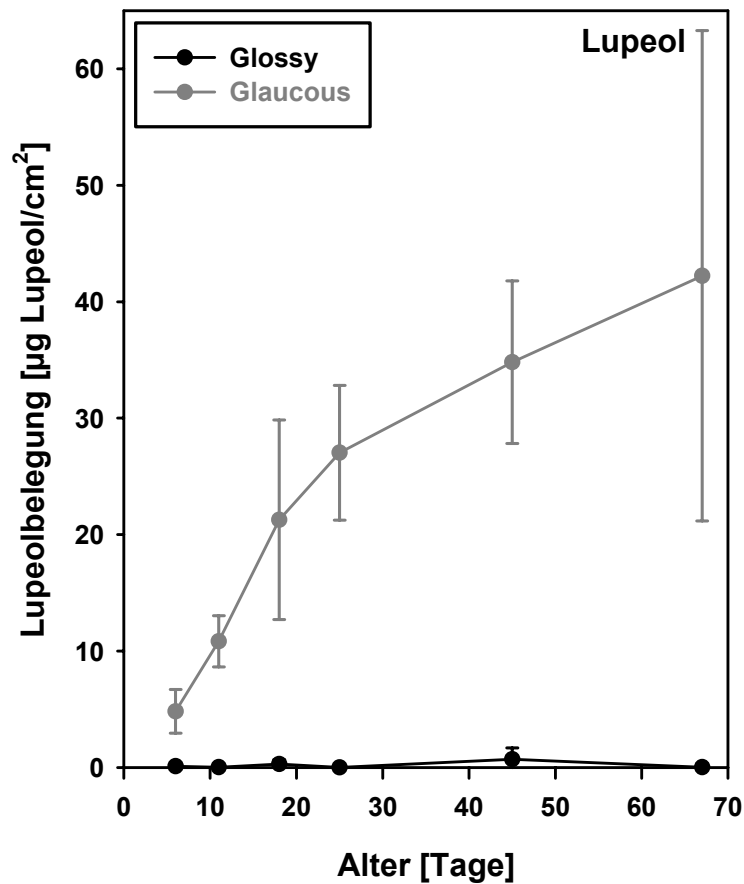
Ein völlig anderes Bild der kutikulären Wachszusammensetzung in der Hypokotylentwicklung zeichnete sich dagegen bei Individuen des Glaucois-Phänotypes ab. Hier setzte die Zunahme der Wachsbelegung von  $10 \mu\text{g cm}^{-2}$  an Tag 6 auf  $64 \mu\text{g cm}^{-2}$  an Tag 67 auch und gerade in einer frühen Phase der Hypokotylentwicklung ein (Abb. 3-11B). Im Gegensatz zu Glossy-Individuen wurde die Zusammensetzung des kutikulären Wachses der Glaucois-Hypokotyle von Beginn an nicht von den klassischen langkettigen aliphatischen Substanzklassen sondern von Triterpen-Verbindungen dominiert. Der Anteil an VLC-Komponenten am Gesamtwachs betrug im untersuchten Zeitraum nie mehr als 16%, wobei ein Minimum des prozentualen Wachsanteils mit 9% bzw. 8% an den Tagen 11 und 18 zu beobachten war. Im Gegensatz dazu war der Anteil von Triterpen-Verbindungen zwischen 68% und 79% im Beprobungszeitraum durchgängig hoch. Langkettige aliphatische Wachskomponenten waren bis einschließlich Tag 18 mit  $2,6 \mu\text{g cm}^{-2}$  nur in verhältnismäßig geringen Mengen vertreten, im Zeitintervall zwischen Tag 25 und 67 stieg die Menge an aliphatischen Komponenten jedoch auf ca.  $9 \mu\text{g cm}^{-2}$  an. Diese zunehmende Akkumulation wurde vor allem durch den Anstieg an Aldehyden, aber auch an *n*-Alkanen und Fettsäuren verursacht (Abb. 3-9), während primäre Alkohole konstante absolute Wachsbelegungen aufwiesen (ca.  $0,6 \mu\text{g cm}^{-2}$ ). Weder Alkan-1,3-diole, noch Hydroxyaldehyde konnten im Laufe der Hypokotylentwicklung in nennenswerten Mengen aus dem kutikulären Wachs der Glaucois-Hypokotyle extrahiert werden.

Die Verbindungsklasse der kutikulären Triterpene war über den gesamten untersuchten Zeitraum der Hypokotylentwicklung durch die Dominanz des Triterpenols Lupeol charakterisiert (Abb. 3-10). Diese Verbindung verzeichnete einen starken Anstieg von  $4,8 \pm 1,9 \mu\text{g cm}^{-2}$  ( $47 \pm 6\%$  des Gesamtwachses) an Tag 6 über  $27,0 \pm 5,8 \mu\text{g cm}^{-2}$  an Tag 25 ( $66 \pm 6\%$ ) bis hin zu  $42,2 \pm 21,1 \mu\text{g cm}^{-2}$  ( $64 \pm 12\%$ ) an Tag 67. Der dramatische Anstieg der Wachsbelegung auf Hypokotylen von Individuen des Glaucois-Phänotyps ließ sich demnach im Wesentlichen auf die Akkumulation des Triterpenols Lupeol zurückführen. Andere Triterpene wie  $\alpha$ -Amyrin,  $\beta$ -Amyrin, Taraxerol und Lupenon trugen nur unwesentlich zur Gesamtwachsbelegung der Kutikula während der Hypokotylentwicklung bei.



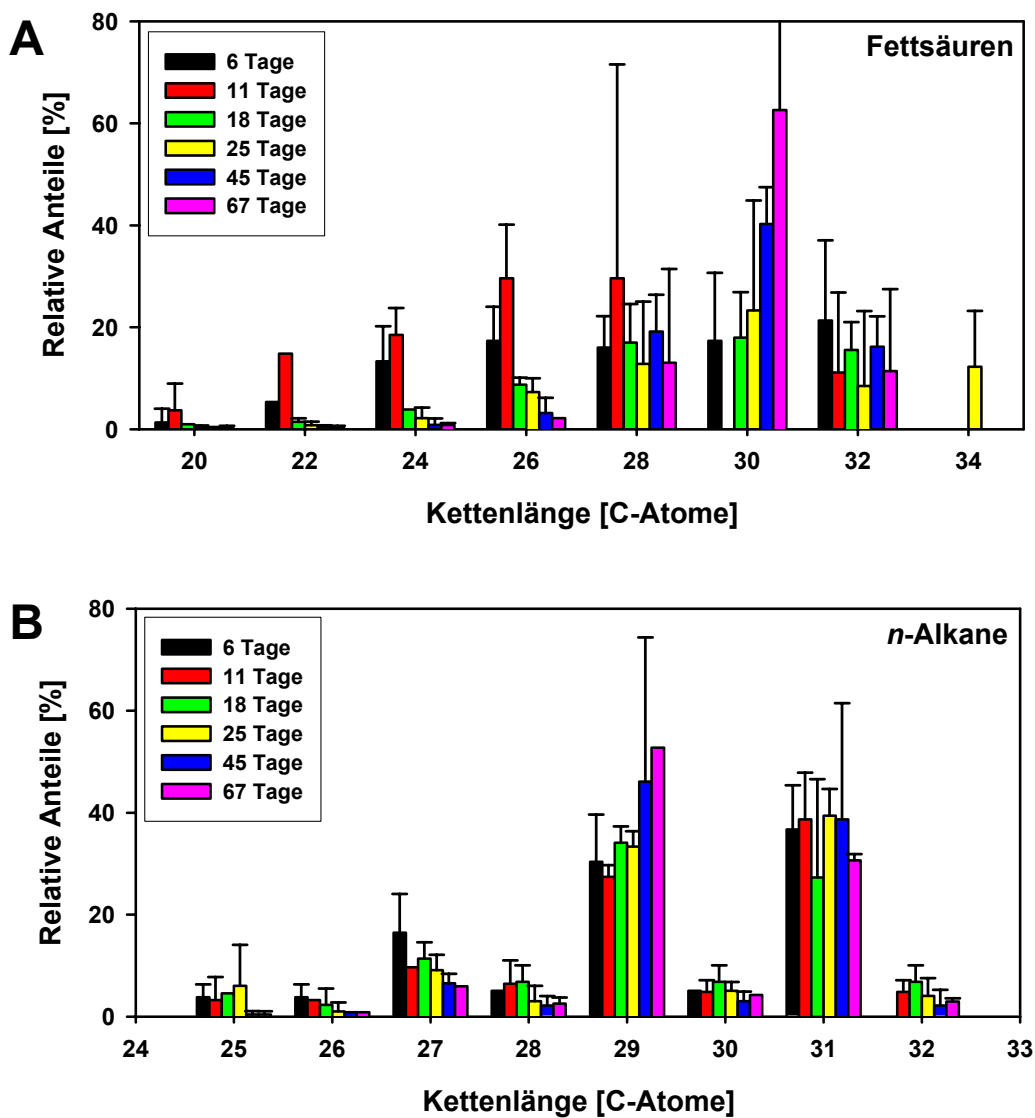


**Abbildung 3-12:** Kutikuläre Wachsbelegung VLC-aliphatischer Substanzklassen im Laufe der Hypokotylentwicklung beider Sprossachsen-Phänotypen von *Ricinus communis*. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen. **A:** Aldehyde. **B:** Fettsäuren. **C:** *n*-Alkane. **D:** primäre Alkohole.



**Abbildung 3-13:** Akkumulation des Triterpenols Lupeol als Wachskomponente in der Kutikula im Laufe der Hypokotylentwicklung beider Sprossachsenphänotypen von *Ricinus communis*. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen.

In beiden Phänotypen ließ sich ein ähnliches Bild der Kettenlängenverteilung innerhalb der einzelnen aliphatischen Substanzklassen im Laufe der Hypokotylentwicklung beobachten. In den einzelnen homologen Reihen waren Verbindungen mit Kettenlängen zwischen  $C_{22}$  und  $C_{34}$  vertreten. Fettsäuren, Aldehyde und primäre Alkohole wiesen dabei eine Dominanz geradkettiger Verbindungen auf, während die Klasse der *n*-Alkane von Verbindungen mit ungeraden Kettenlängen dominiert wurde. Im Laufe der Hypokotylentwicklung zeigte sich bei den einzelnen aliphatischen Substanzklassen eine Tendenz zur Akkumulation hin zu Substanzen mit längeren Kettenlängen ab. So war das Homologenmuster der Fettsäuren an Tag 6 und 18 durch ein Maximum bei  $C_{28}$  gekennzeichnet, während sich zu späteren Zeitpunkten ein Maximum bei  $C_{30}$  abzeichnete (Abb. 3-14A). Ein ähnliches Bild ergab sich bei Aldehyden und primären Alkoholen (Daten nicht gezeigt). Auch *n*-Alkane zeigten eine Verschiebung von kürzeren zu längeren Verbindungen, was zu einer graduellen Ausbildung eines Maximums bei  $C_{29}$  an Tag 67 führte (Abb. 3-14B).



**Abbildung 3-14:** Relative Homologenzusammensetzung [% der jeweiligen Verbindungsklasse] aliphatischer Substanzklassen im kutikulären Wachs von Glaucous-Individuen der Ricinuspflanze im Laufe der Hypokotylentwicklung. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen. **A:** Fettsäuren. **B:** *n*-Alkane.

### 3.3 Klonierung von Epoxysqualenzyklen aus *Ricinus communis* und *Lycopersicon esculentum*

#### 3.3.1 Primerdesign zur homologiebasierten Klonierung von Gensequenzen pflanzlicher Triterpen- und Cycloartenolsynthasen

Für die sequenzhomologiebasierte Klonierung von 2,3-Oxidosqualenzyklen aus *Ricinus communis* bzw. *Lycopersicon esculentum* war es zunächst erforderlich, ein geeignetes Primerdesign zu entwickeln, das die PCR-vermittelte Amplifizierung entsprechender Gensequenzen aus dem cDNA-Pool der Pflanzen ermöglichte. Für das Auffinden geeigneter Target-Sequenzen für Oligonukleotidprimer wurden Alignments bereits klonierter und charakterisierter 2,3-Oxidosqualenzyklen dikotyler Pflanzen sowohl auf Aminosäure-, als auch auf Nukleotidsequenzebene durchgeführt (Übersicht der Datenbank-Sequenzen siehe Anhang B). Bei der Auswahl der Sequenzbereiche für das Primerdesign sollten neben den in der gesamten Genfamilie hoch konservierten QW-Motiven und dem Substratbindungsmotiv DCTAE besonders potenzielle Sequenzunterschiede zwischen Cycloartenol- und Triterpensynthasen berücksichtigt werden, um die Spezifität der jeweiligen Primer für die entsprechenden Synthasen zu erhöhen und eine Diskriminierung „unerwünschter“ PCR-Amplifizierungen zu gewährleisten.

Insgesamt wurden 29 unterschiedlich degenerierte Sequenzen für Oligonukleotidprimer auf der Grundlage der über die Alignments ermittelten Konsensus-Sequenzen kreiert (22 Sense- und 7 Antisenseprimer). Als Targetsequenzen dienten dabei sechs verschiedene Sequenzabschnitte (Abb. 3-15; Einzelheiten siehe Anhang D):

**(a) AS 1-7\*:**

Hierbei handelte es sich um den N-terminalen Bereich der Aminosäuresequenzen, auf Nukleotidebene beginnend mit dem Start-Codon. Die Sense-Primer OGN3S, OGN4S, OGN5S, OGN6S waren für die gesamte Genfamilie spezifisch.

**(b) AS 157-165:**

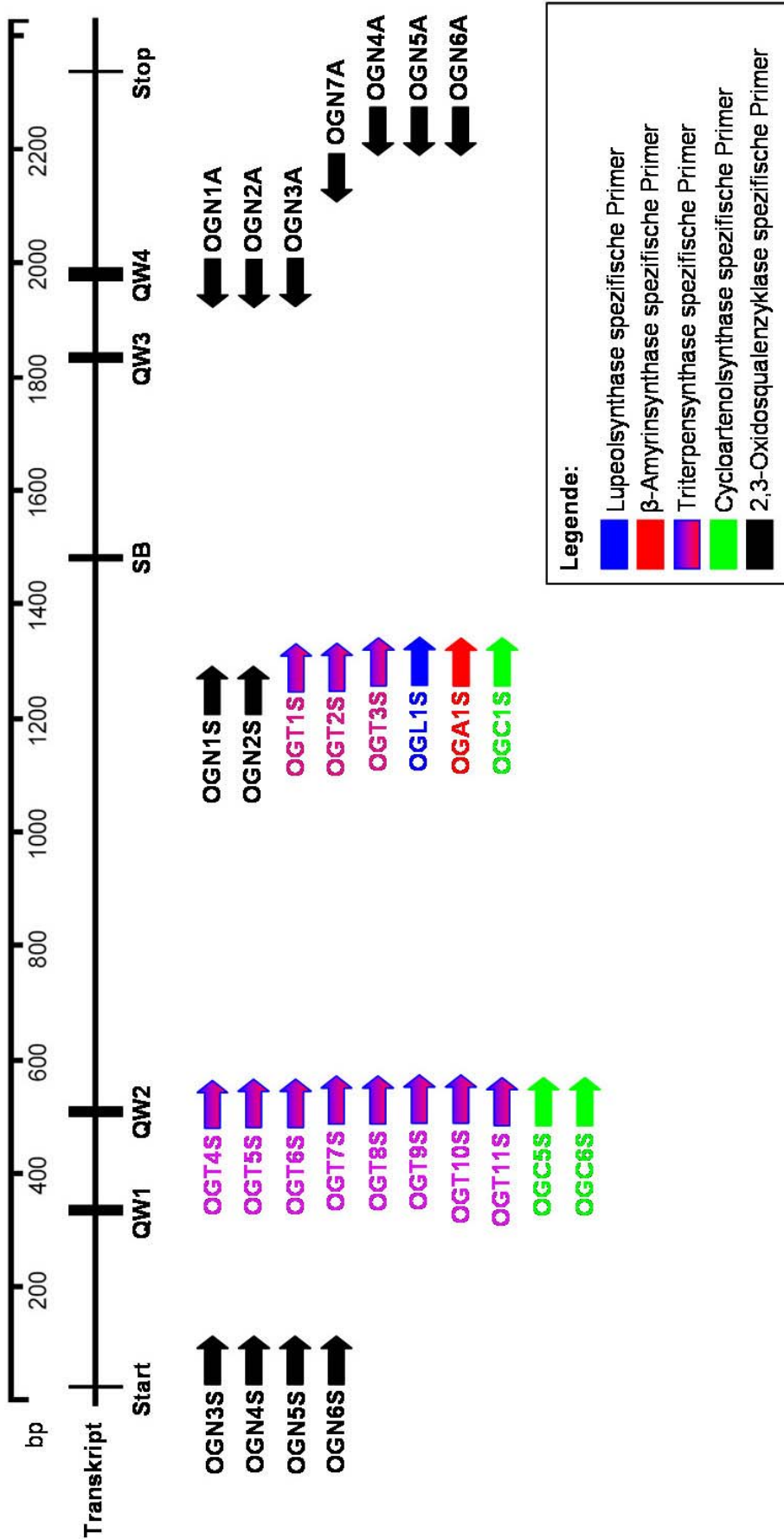
Dieser Bereich umfasste das QW2-Motiv. Während die Sense-Primer OGT4S, OGT5S, OGT6S, OGT7S, OGT8S, OGT9S, OGT10S und OGT11S Triterpensynthese-spezifisch angelegt waren, berücksichtigten die Sense-Primer OGC5S und OGC6S Besonderheiten in den Sequenzen von Cycloartenolsynthasen.

**(c) AS 399-417:**

Dieser Sequenzbereich nimmt eine zentrale Stellung innerhalb des gesamten Primerdesigns ein. Auf ihn wird im Folgenden gesondert eingegangen.

---

\*Als Referenz diente jeweils die Aminosäuresequenz der Cycloartenolsynthase AtCAS1 aus *Arabidopsis thaliana* (Corey et al. 1993)



**Abbildung 3-15:** Übersicht über die Position und Spezifität degenerierter Primer zur Klonierung pflanzlicher 2,3-Oxidosqualenzyklen. Die Lage der hochkonservierten Sequenzbereiche sowie des Start- und Stop-Codons innerhalb eines Transkripts einer typischen pflanzlichen Oxidosqualenzyklase sind schematisch dargestellt. Skala in bp. QW = QW-Motiv. SB = Substratbindungsmotiv.

**(d)** AS 648-659:

Der Bereich umfasst das hochkonservierte QW4-Motiv, die drei degenerierten Antisense-Primer OGN1A, OGN2A und OGN3A sind dementsprechend für die gesamte Genfamilie spezifisch.

**(e)** AS 716-722:

Dieser Sequenzabschnitt führte zur Ermittlung der degenerierten Sequenz des Antisense-Primers OGN7A, spezifisch für die gesamte Genfamilie der Oxidosqualenzyklen.

**(f)** AS 744-750:

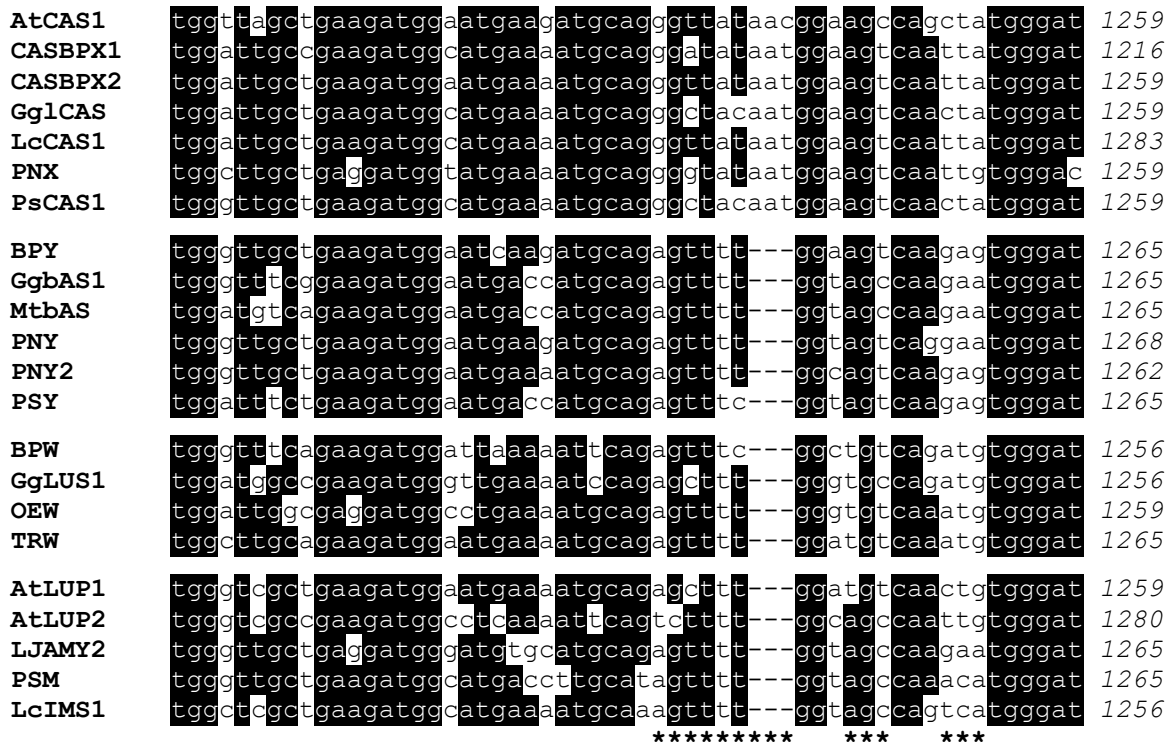
Die Antisense-Primer OGN4A, OGN5A und OGN6A sind für die gesamte Genfamilie spezifisch.

Ein Sequenzabschnitt erwies sich besonders geeignet als Template für Primersequenzen zur Klonierung pflanzlicher Oxidosqualenzyklen, da hier die ansonsten sehr ähnlichen Sequenzen von Triterpensynthesen und Cycloartenolsynthesen auf drei aufeinander folgenden Positionen voneinander abwichen. Im Einzelnen handelte es sich dabei um die bei Cycloartenolsynthesen konservierten Aminosäurereste Glycin (bei Triterpensynthesen Serin), Tyrosin (bei Triterpensynthesen Phenylalanin) sowie Asparagin, das bei Triterpensynthesen durch eine Indel-Position ersetzt war (Abb. 3-16). Daneben fanden sich in unmittelbarer Nachbarschaft die nur in Lupeolsynthesen konservierte Aminosäure Cystein (bei allen anderen Epoxysqualenzyklen Serin), sowie die für  $\beta$ -Amyrinsynthesen spezifische Glutaminsäure.

<b>AtCAS1</b>	WLAEDG <b>M</b> K <b>M</b> Q <b>G</b> Y <b>N</b> GSQ <b>L</b> W <b>D</b>	417	} <b>Cycloartenol-</b> <b>synthesen</b>
<b>CASBPX1</b>	WLAEDG <b>M</b> K <b>M</b> Q <b>G</b> Y <b>N</b> GSQ <b>L</b> W <b>D</b>	427	
<b>CASBPX2</b>	WLAEDG <b>M</b> K <b>M</b> Q <b>G</b> Y <b>N</b> GSQ <b>L</b> W <b>D</b>	417	
<b>Gg1CAS</b>	WLAEDG <b>M</b> K <b>M</b> Q <b>G</b> Y <b>N</b> GSQ <b>L</b> W <b>D</b>	417	
<b>LcCAS1</b>	WLAEDG <b>M</b> K <b>M</b> Q <b>G</b> Y <b>N</b> GSQ <b>L</b> W <b>D</b>	425	
<b>PNX</b>	WLAEDG <b>M</b> K <b>M</b> Q <b>G</b> Y <b>N</b> GSQ <b>L</b> W <b>D</b>	417	
<b>PsCAS1</b>	WVAEDG <b>M</b> K <b>M</b> Q <b>G</b> Y <b>N</b> GSQ <b>L</b> W <b>D</b>	417	
<b>BPY</b>	WVAEDG <b>L</b> K <b>M</b> Q <b>S</b> F-G <b>S</b> Q <b>E</b> W <b>D</b>	419	} <b><math>\beta</math>-Amyrin-</b> <b>synthesen</b>
<b>GgbAS1</b>	WVSE <b>D</b> G <b>M</b> T <b>M</b> Q <b>S</b> F-G <b>S</b> Q <b>E</b> W <b>D</b>	419	
<b>MtbAS</b>	WMSE <b>D</b> G <b>M</b> T <b>M</b> Q <b>S</b> F-G <b>S</b> Q <b>E</b> W <b>D</b>	419	
<b>PNY</b>	WVAEDG <b>M</b> K <b>M</b> Q <b>S</b> F-G <b>S</b> Q <b>E</b> W <b>D</b>	420	
<b>PNY2</b>	WVAEDG <b>M</b> K <b>M</b> Q <b>S</b> F-G <b>S</b> Q <b>E</b> W <b>D</b>	418	
<b>PSY</b>	WVSE <b>D</b> G <b>M</b> T <b>M</b> Q <b>S</b> F-G <b>S</b> Q <b>E</b> W <b>D</b>	419	
<b>BPW</b>	WVAEDG <b>L</b> K <b>L</b> Q <b>S</b> F-G <b>C</b> Q <b>M</b> W <b>D</b>	416	} <b>Lupeol-</b> <b>synthesen</b>
<b>GgLUS1</b>	WLAEDG <b>L</b> K <b>L</b> Q <b>S</b> F-G <b>C</b> Q <b>M</b> W <b>D</b>	416	
<b>OEW</b>	WVAEDG <b>L</b> K <b>M</b> Q <b>S</b> F-G <b>C</b> Q <b>M</b> W <b>D</b>	417	
<b>TRW</b>	WVAEDG <b>M</b> K <b>M</b> Q <b>S</b> F-G <b>C</b> Q <b>M</b> W <b>D</b>	417	
<b>AtLUP1</b>	WVAEDG <b>M</b> K <b>M</b> Q <b>S</b> F-G <b>C</b> Q <b>L</b> W <b>D</b>	417	} <b>multifunktionale</b> <b>Triterpensynthesen</b>
<b>AtLUP2</b>	WIGEDG <b>L</b> K <b>L</b> Q <b>S</b> F-G <b>S</b> Q <b>L</b> W <b>D</b>	422	
<b>LJAMY2</b>	WLAEDG <b>M</b> C <b>M</b> Q <b>S</b> F-G <b>S</b> Q <b>E</b> W <b>D</b>	419	
<b>PSM</b>	WVSE <b>D</b> G <b>M</b> T <b>L</b> H <b>S</b> F-G <b>S</b> Q <b>T</b> W <b>D</b>	419	
<b>LcIMS1</b>	WVAEDG <b>M</b> K <b>M</b> Q <b>S</b> F-G <b>S</b> Q <b>S</b> W <b>D</b>	416	

**Abbildung 3-16:** Aminosäuresequenz-Alignment des Indel-Bereichs. Im Alignment sind die Positionsnummern der jeweils letzten Aminosäure angegeben. Charakteristische Aminosäurereste sind gelb hervorgehoben.

Da dieses Phänomen folgerichtig im Nukleotidsequenz-Alignment dieses Bereiches seinen Niederschlag fand, war es möglich, spezifische Sense-Primer sowohl für Cycloartenolsynthesen (OGC1S), wie auch für Triterpensynthesen (OGT1S, OGT2S, OGT3S) - hier war zusätzlich eine Unterscheidung zwischen Lupeol- (OGL1S) und  $\beta$ -Amyrinsynthese-Sequenzen (OGA1S) möglich - zu kreieren (Abb. 3-17). Zusätzlich diente der unmittelbar in 5'-Richtung gelegene Bereich als Target für zwei Oxidosqualenzyklase-spezifische Sense-Primer OGN1S und OGN2S).



**Primerdesign:**



**Abbildung 3-17:** Nukleotidsequenz-Alignment des Indel-Bereichs und das daraus resultierende Primerdesign zur Klonierung von Lupeol-,  $\beta$ -Amyrin- bzw. Cycloartenolsynthesen. Im Alignment sind die Positionsnummern des jeweils letzten Nukleotids angegeben. Die Sternchen markieren für die jeweiligen Synthesen charakteristische Nukleotide.

### 3.3.2 Klonierung der *Ricinus communis* Lupeolsynthase RcLUS1

Für die Klonierung der *Ricinus communis*-Lupeolsynthase musste zunächst geeignetes Pflanzenmaterial für eine RNA-Extraktion ausgewählt werden, bei der eine entsprechend hohe Expressionsaktivität und damit eine große Transkript-Menge der Triterpensynthase zu erwarten war. Auf der Grundlage der wachsanalytischen und rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden hierfür Hypokotyle 20 Tage alter Rizinuspflanzen verwendet. Auf der Grundlage isolierter Gesamt-RNA aus Hypokotyloberflächengewebe und mittels reverser Transkriptase wurde ein cDNA-Pool synthetisiert, der schließlich als Template für PCR-Experimente diente.

In diesen PCR-Versuchen wurden verschiedene Kombinationen unterschiedlich degenerierter, Triterpensynthase-spezifischer Primer getestet. Die Kombination des Sense-Primers OGT3S (s. Abb. 3-17) und des für das QW4-Motiv spezifischen Antisense-Primers OGN1A (s. Abb. C-3) resultierte in der Amplifikation des PCR-Fragmentes *RcLUS1a* mit der erwarteten Länge von etwa 750 bp. Dieses Fragment wurde gelelektrophoretisch aufgereinigt und in *E. coli* kloniert. Durch die Sequenzierung sechs verschiedener Klone dieses Ansatzes konnte schließlich die Konsensussequenz von *RcLUS1a* ermittelt werden (Abb. 3-18). Das Fragment wies das für die Genfamilie typische Substratbindungsmotiv sowie die Sequenz eines QW-Motifs auf.

```

1   acaagtctag ctcttcaggc cctgatagct agcgacctct ctcatgaaat aggacctaca 60
61   ctaaaacaag gacacgtctt cacgaagaat tctcaggcaa ctgagaacct ttcgggcgac 120
121  ttcagaaaaa tgtttcgtca tatctccaaa ggagcttgga cattctctga taaagatcaa 180
181  ggatggcaag tttctgattg tacagcagaa agcttgaagt gctgcctact tttctcaatg 240
241  atgcctcccg aaattggttg tgagaaaatg gaacctgaaa aggtctatga ttcagtcaat 300
301  gtcatacttt ctcttcagag ccaaaatggt ggtttcacag cttgggagcc agcaagagca 360
361  ggatcatgga tggagtggct caacctgta gagttcatgg aggatcttgt cgttgagcac 420
421  gagtatgtgg agtgcacttc atcagcaatc caagcactag ttctttttaa aaaattatat 480
481  ccccgacaca ggaacaaaga gattgaaaat tgtatcataa atgctgcgca gttcattgaa 540
541  aatatacaag aacctgatgg ttcattggtat ggaaattggg ggatatgctt ctcttatggt 600
601  acctggtttg cactgaaagg attagctgct gctggaagga catatgaaaa ttgttctgct 660
661  attcgtaaag gtgttgattt tctactaaaa tcacaaagag atg 703

```

**Abbildung 3-18:** Konsensussequenz des klonierten Genfragments *RcLUS1a*. Die Sequenzbereiche, die dem DCTAE-Substratbindungsmotiv (grün) sowie dem QW3-Motiv (rot) entsprechen, sind farblich hervorgehoben.

Ein Sequenzvergleich der Nukleotidsequenz mittels BLAST-Search in der NCBI-Datenbank ergab eine große Übereinstimmung mit pflanzlichen Triterpensynthasen, vor allem mit  $\beta$ -Amyrinsynthasen, während zu Cycloartenolsynthasen nur relativ geringe Sequenz-Ähnlichkeiten festzustellen waren (Tab. 3-5).

Mit Hilfe einer Kombination aus einem spezifischen Antisense-Primer (OGLS4A), der 60 bp vor dem 5'-Ende des klonierten Fragments lag, und dem degenerierten, für das QW2-Motiv spezifischen Sense-Primer OGT4S (s. Abb. C-2), wurde ein weiteres PCR-Produkt, *RcLUS1b*, mit einer Länge von 825 Basenpaaren synthetisiert. Dieses Produkt wurde ebenfalls kloniert und



sequenziert. Das 3'-Ende von *RcLUS1b* zeigte im Überlappungsbereich eine identische Sequenz mit *RcLUS1a*. Auf diese Weise konnte die klonierte Sequenz in 5'-Richtung um 750 Nukleotide verlängert werden.

**Tabelle 3-5:** Ergebnisse des Datenbankvergleichs des klonierten Genfragmentes *RcLUS1a* von *R. communis* auf Nukleotid-Ebene. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe des Programms Blast Search (blastn) des National Center for Biotechnology Information (NCBI) ermittelt.

Akzessions- Nummer	Pflanzenart	Gen- Produkt	Score* (bits)	E Value*
AB055512	<i>Betula platyphylla</i>	bAS	151	3*e <sup>-33</sup>
AB037203	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	bAS	147	5*e <sup>-32</sup>
AB034803	<i>Pisum sativum</i>	MFS	131	3*e <sup>-27</sup>
AB009030	<i>Panax ginseng</i>	bAS	113	7*e <sup>-22</sup>
AJ430607	<i>Medicago truncatula</i>	bAS	105	2*e <sup>-19</sup>
AB014057	<i>Panax ginseng</i>	bAS	101	3*e <sup>-18</sup>
AB034802	<i>Pisum sativum</i>	bAS	99,6	1*e <sup>-17</sup>
AF478455	<i>Lotus japonicus</i>	MFS	93,7	6*e <sup>-16</sup>
U49919	<i>Arabidopsis thaliana</i>	MFS	69,9	9*e <sup>-09</sup>
AB055511	<i>Betula platyphylla</i>	LUS	58	4*e <sup>-05</sup>
AB055510	<i>Betula platyphylla</i>	CAS	48,1	0.034

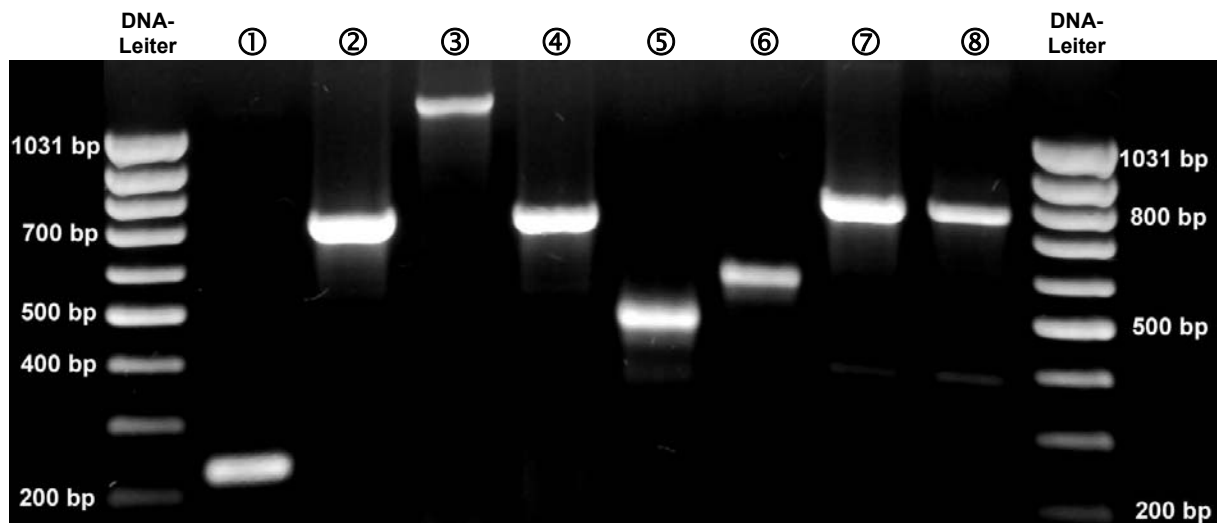
\* In dieser Aufstellung steht 'Score' für einen Gütefaktor des Einzelergebnisses (höherer Wert steht für bessere Übereinstimmung). Der 'E value' gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der eine Übereinstimmung der gefundenen Art rein zufällig auftreten würde (niedrigerer Wert steht für höhere Signifikanz).

In einem nächsten Schritt wurde die Nukleotidsequenz des 3'-Endes des Gens bis zum Poly-A-Schwanz mit Hilfe der RACE-Technik ermittelt. Für die 3'-RACE (nach 3'RACE-Kit, Invitrogen) wurden der spezifische Sense-Primer OGLS4S, synthetisiert auf der Grundlage des bereits klonierten Sequenzbereiches, und der Ankerprimer AUAP verwendet. Dieser Ansatz führte zur Amplifizierung des 560 bp langen Fragmentes *RcLUS1c*, das neben dem Stop-Codon noch etwa 80 bp des nicht kodierenden Bereiches am 3'-Ende des Gens beinhaltet. Durch die Verwendung eines 5'RACE-Systems (Invitrogen) konnte schließlich der noch fehlende Bereich des Transkriptes am 5'-Ende ermittelt werden. Bei der 5'-RACE kamen der Ankerprimer UAP sowie die spezifischen Antisense-Primer OGLS13A und OGLS14A zum Einsatz. Dieser Ansatz führte zur Amplifikation des Fragmentes *RcLUS1d* mit einer Länge von 670 bp. Die Sequenzierung von *RcLUS1d* zeigte die erwartete Überlappungsregion mit *RcLUS1b*, ein potentielles Start-Codon und 27 Basenpaare des nicht kodierenden Bereiches am 5'-Ende.

PCR-Versuche mit verschiedenen Kombinationen spezifischer Primer (Tab. 3-6) für die klonierte Gesamtsequenz dienten als Kontrolle für die gewonnenen Ergebnisse. Dabei wurden stets die zu erwartenden Fragmentlängen synthetisiert (Abb. 3-19). Die zusammengesetzte Nukleotidsequenz der klonierten Fragmente ergab eine Konsensussequenz von 2426 Nukleotiden (s. Abb. E-1) und zeigte bei Alignments mit bekannten Oxidosqualenzyklen den für Triterpensynthesen typischen Indel-Bereich (vgl. Abb. 3-17).

**Tabelle 3-6:** Kombinationen spezifischer Primer, die für PCR-Ansätze zur Kontrolle der klonierten Gensequenz verwendet wurden. Die Positionen der Primer ergeben sich aus der Entfernung der jeweiligen Primeranfänge vom Startcodon.

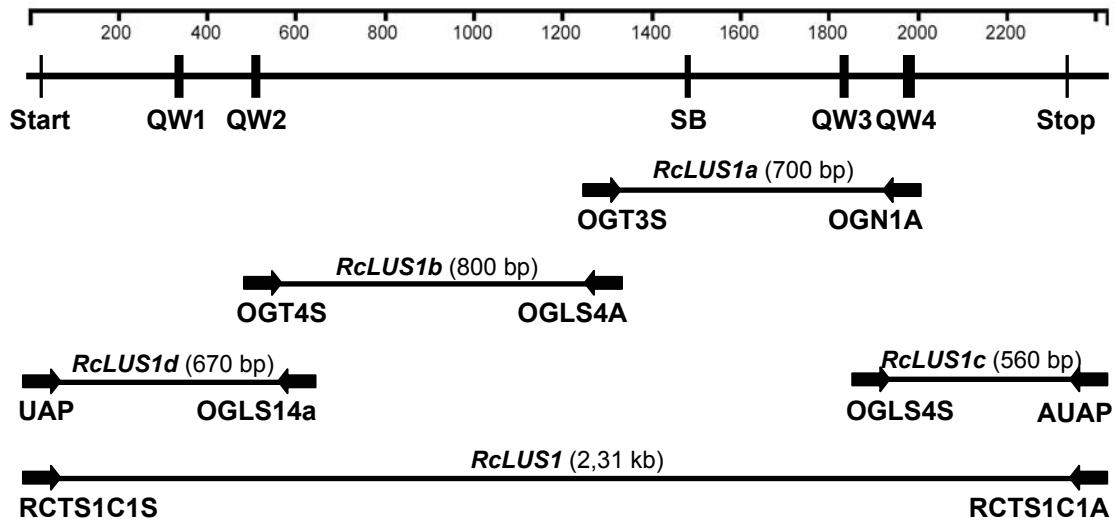
Sense-Primer		Antisense-Primer		erwartete Fragmentlänge
Name	Position	Name	Position	
OGLS1S	1254	OGLS7A	1483	229 bp
OGLS1S	1254	OGLS1A	1964	710 bp
OGLS2S	1256	AUAP	2420	1145 bp
OGLS2S	1256	OGLS1A	1964	708 bp
OGLS3S	1943	AUAP	2420	477 bp
OGLS4S	1839	AUAP	2420	581 bp
OGLS9S	501	OGLS3A	1274	773 bp
OGLS9S	501	OGLS4A	1301	800 bp



**Abbildung 3-19:** PCR-Fragmente unterschiedlicher Sequenzbereiche der *RcLUS1*-cDNAs, die mit Hilfe verschiedener Kombinationen spezifischer PCR-Primer mit Hypokotyl-cDNA als Template synthetisiert wurden.

Primerkombination: ① OGLS1S-OGLS7A; ② OGLS1S-OGLS1A; ③ OGLS2S-AUAP; ④ OGLS2S - OGLS1A; ⑤ OGLS3S-AUAP; ⑥ OGLS4S-AUAP; ⑦ OGLS9S-OGLS3A; ⑧ OGLS9S-OGLS4A. DNA-Leiter: Fermentas GeneRuler 100 bp.

Um den *RcLUS1*-Full-Length-Klon amplifizieren zu können, wurden Oligonukleotidprimer synthetisiert, die neben der spezifischen Sequenz Restriktionsschnittstellen unmittelbar vor dem ATG-Start-Codon (RCTS1C1S) bzw. hinter dem Stop-Codon (RCTS1C1A) aufwiesen. Ein PCR-Ansatz mit *Ricinus communis*-Hypokotyl-cDNA als Template führte zur Amplifikation von *RcLUS1* mit der erwarteten Länge von 2,31 kb. Abbildung 3-20 gibt eine Übersicht über die Klonierungsstrategie von *RcLUS1*. Die Klonierung und Sequenzierung von *RcLUS1* zeigte, dass es sich dabei erwartungsgemäß um ein offenes Leseraster handelte, das für ein 770 Aminosäurelanges Protein kodierte. Die übersetzte Aminosäuresequenz (Abb. 3-21) beinhaltet neben dem Substratbindungsmotiv vier QW-Motive und wies höhere Ähnlichkeiten zu anderen pflanzlichen Triterpensynthasen als zu Cycloartenolsynthasen auf (Tab. 3-7).



**Abbildung 3-20:** Schematische Darstellung der Strategie zur homologiebasierten Klonierung von *RcLUS1*. Im oberen Bereich sind die Positionen des Start- bzw. Stop-Codons sowie der in der Genfamilie der Oxidosqualenzyklen konservierten Sequenzmotive QW und DCTAE angegeben. Die Pfeile geben die relative Position sowie die Richtung der verwendeten Primer wieder. Die Linien repräsentieren die jeweiligen, über PCR-Ansätze amplifizierten cDNA-Fragmente.

```

MWRIKIAEGGNNPYIYSTNNFQGRQIWVFDPNAGTPEEQAEVEEARQNF 50
KNRFQVKPNSDLLWQLQFLREKNFKQKIPKVKVEDGEEITSEIAAAALRR 100
SVHLFSALQASDGHWCAENGGLFFLPPLVFAVYITGHLNTVFSPEHRKE 150
ILRYIYCHQNEDGGWGIHIEGHSTMFCTVLNYICMRILGEARDGGIENAC 200
ERGRKWILDHGGATGISSWGKTWLSILGVYEWDTNPMPPEFWAFPSSFP 250
LHPAKMFCYCRITYMPMSYLYGKRFGVGPITPLILQIREEIYNPEYKIKW 300
NSVRHLCAKEDNYFPHPTIQKLLWDALYTFSEPLFSRWPFNKLRKALKI 350
TMDHIHYEDHNSRYITIGCVEKPLCMLACWIEDPHGEAFKKHLARIADYI 400
WVGEDGIKMQSFGSQTWDTSLALQALIASDLSHEIGPTLKQGHVFTKNSQ 450
ATENPSGDFRKMFRHISKGAWTFSDKDQGWQVSDDCTAESLKCCLLFMMMP 500
PEIVGEKMEPEKVYDSVNVILSLQSQNGGFTAWEPARAGSWMEWLNPFVEF 550
MEDLVVEHEHYVECTSSAIQALVLFKKLYPRHRNKEIENCIINAAQFIENI 600
QEPDGSWYGNWIGICFSYGTWFALKGLAAAGRTYENCSAIRKGVDFLLKSQ 650
RDDGGWAESYLSCPCKKVYVPFEGNRSNLVQTAWAMMGLIYGGQAKRDPMP 700
LHRAAKLLINSQTDLGDFPQQELTGAFMRNCLHLYALFRNTFPIWALAEY 750
RRHVLFPAGFGFGFTNNL* 770

```

**Abbildung 3-21:** Aminosäuresequenz der *Ricinus communis* Lupeolsynthase *RcLUS1*. Das Substratbindungsmotiv DCTAE (grün) sowie die QW-Motive (rot) sind farblich hervorgehoben.

**Tabelle 3-7:** Ergebnisse des Datenbankvergleichs der *Ricinus communis* Lupeolsynthase R<sub>c</sub>LUS1 auf Aminosäuresequenz-Ebene. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe des Programms Blast Search (blastp) des National Center for Biotechnology Information (NCBI) ermittelt.

Akzessionsnummer	Pflanzenart	Gen-Produkt	Score (bits)	E Value
BAB83088	<i>Betula platyphylla</i>	bAS	1259	0
BAA33461	<i>Panax ginseng</i>	bAS	1237	0
BAA33722	<i>Panax ginseng</i>	bAS	1227	0
BAA89815	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	bAS	1205	0
AAO33578	<i>Medicago truncatula</i>	bAS	1197	0
BAA97558	<i>Pisum sativum</i>	bAS	1187	0
AAO33580	<i>Lotus japonicus</i>	MFS	1180	0
BAA97559	<i>Pisum sativum</i>	MFS	1154	0
BAB68529	<i>Luffa cylindrica</i>	IMS	1082	0
AAD05032	<i>Arabidopsis thaliana</i>	MFS	1053	0
AAB94341	<i>Arabidopsis thaliana</i>	OSC	1052	0
BAA86930	<i>Olea europaea</i>	LUS	1030	0
BAB83087	<i>Betula platyphylla</i>	LUS	1012	0
BAA86932	<i>Taraxacum officinalis</i>	LUS	1004	0
JC5590	<i>Pisum sativum</i>	CAS	942	0

### 3.3.3 Klonierung eines Genfragmentes einer weiteren potenziellen Triterpensynthase von *Ricinus communis*

Die Sequenzierung verschiedener PCR-Produkt-Klone, die mit der Kombination des Sense-Primers OGT3S und des Antisense-Primers OGN1A unter Verwendung der Hypokotyl-cDNA als Template im oben beschriebenen PCR-Ansatz gewonnen worden waren, zeigte, dass diese Primerkombination nicht nur zur Amplifikation von *RcLUS1a*, sondern auch zur Synthese eines Fragmentes mit ähnlicher, aber dennoch eindeutig davon abweichender Sequenz von gleicher Nukleotidlänge führte (Abb. 3-22). Auch diese zweite mit unspezifischen Primern klonierte Nukleotidsequenz *RcTTS2a* zeigte bei einem Sequenzvergleich mittels BLAST-Search in der NCBI-Datenbank große Homologien zu anderen pflanzlichen Triterpensynthasen (Tab. 3-8). Versuche, den Full-length-Klon dieser zweiten potenziellen Triterpensynthase RcTTS2 analog zur Klonierung von *RcLUS1* zu gewinnen, scheiterten: Weder bei PCR-Ansätzen zur Verlängerung von *RcTTS2a* in 5'-Richtung, noch bei 3'RACE-Versuchen konnten entsprechende Fragmente in ausreichenden Mengen für eine Klonierung amplifiziert werden. Der Grund hierfür lag vermutlich im mangelnden Transkript-Level von *RcTTS2* im verwendeten cDNA-Pool von *Ricinus communis* Hypokotyl-Gewebe.

```

1   gctaatttca ctttcaagc tttatatctc agcaatctgg gcgacgaaat catgccagca 60
61  ctggccaaag catatgattt catcaagcaa actcggatga aggacaatcc tgcaggcgac 120
121 tttagaacaa tgtttcgcca tatttcaaaa ggggatggc ctttctctga tcaagatcat 180
181 ggctggcaag tttctgattg cacagcagaa ggcttgaagt gtcttctata tgccacgcag 240
241 ttgcctacag aaaagatcgg cgagaaagca gagcctgaac gtttgtatga tgctgtcaat 300
301 gtcatacttt ccctacaggg taaaaacggg ggtttatcag cctgggagcc ggtgagaggt 360
361 tcaatgtggt tagaaaaact gaatcccatg gagtttttgg agaacatcgt gattgaacat 420
421 caatacgtgg aatgcacatc atctggaata gaaacattag caatgtttaa aaagatgtac 480
481 cggggccaca gaagcaaaga aatagacaac ttcattaaga atggtgccgg atatatgaa 540
541 gaaattcagg aagaggacgg ttcttgggtac ggaaactggg ggatttgctt catttacggg 600
601 acatggtttg cgcttgttgg actttcagct gctggaagaa gttacagtga atgtccggct 660
661 gtgcggaagg gggttgattt tctacttaag aatcagtgcg atg 703

```

**Abbildung 3-22:** Sequenz des klonierten Genfragments *RcTTS2a*. Die Sequenzbereiche, die dem DCTAE-Substratbindungsmotiv (grün) sowie dem QW3-Motiv (rot) entsprechen, sind farblich hervorgehoben.

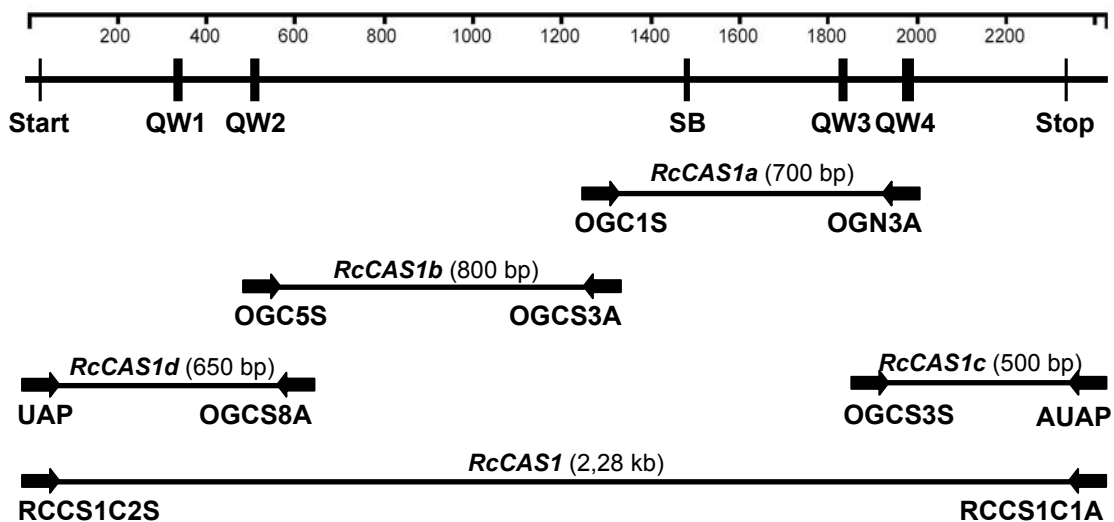
**Tabelle 3-8:** Ergebnisse des Datenbankvergleichs des klonierten Genfragmentes *RcTTS2a* von *R. communis* auf Nukleotid-Ebene. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe des Programms Blast Search (blastn) des National Center for Biotechnology Information (NCBI) ermittelt.

Akzessionsnummer	Pflanzenart	Gen-Produkt	Score (bits)	E Value
AB037203	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	bAS	95,6	$2 \cdot e^{-16}$
AB055512	<i>Betula platyphylla</i>	bAS	95,6	$2 \cdot e^{-16}$
AF478455	<i>Lotus japonicus</i>	MFS	87,7	$4 \cdot e^{-14}$
AB034803	<i>Pisum sativum</i>	MFS	81,8	$2 \cdot e^{-12}$
AJ430607	<i>Medicago truncatula</i>	bAS	71,9	$2 \cdot e^{-09}$
AB034802	<i>Pisum sativum</i>	bAS	71,9	$2 \cdot e^{-09}$
AB009030	<i>Panax ginseng</i>	bAS	63,9	$6 \cdot e^{-07}$
AB014057	<i>Panax ginseng</i>	bAS	60	$9 \cdot e^{-06}$
U49919	<i>Arabidopsis thaliana</i>	MFS	58,0	$4 \cdot e^{-05}$
AB025345	<i>Taraxacum officinale</i>	LUS	48,1	0,034
AB058643	<i>Luffa cylindrica</i>	IMF	48,1	0,034

### 3.3.4 Klonierung der *Ricinus communis* Cycloartenolsynthase RcCAS1

Für die Klonierung der *Ricinus communis* Cycloartenolsynthase RcCAS1 wurde die gleiche Klonierungsstrategie verfolgt wie bei der Klonierung von *RcLUS1* (Abb. 3-23). In einem ersten PCR-Ansatz wurde der degenerierte, für Cycloartenolsynthasen spezifische Oligonukleotidprimer OGC1S (vgl. Abb. 3-17) mit dem Antisenseprimer OGN3A kombiniert. Als Template diente dabei erneut cDNA, die aus Gesamt-RNA 20 Tage alter *Ricinus*-Hypokotylen synthetisiert worden war. Das über diesen Ansatz amplifizierte cDNA-Fragment *RcCAS1a* hatte eine Länge von 700 bp, wurde aufgereinigt, kloniert und sequenziert. *RcCAS1a* zeigte in einem Datenbankvergleich hohe Sequenzähnlichkeiten mit anderen Cycloartenolsynthasen. Für die Verlängerung des bekannten Sequenzbereiches in 5'-Richtung wurde der degenerierte Sense-Primer OGC5S mit dem spezifischen Antisenseprimer OGCS3A in einem nächsten PCR-Ansatz eingesetzt. Auf diese Weise konnte das cDNA-Fragment *RcCAS1b* mit einer Länge von 800 bp gewonnen werden. Um das gesamte offene Leseraster der Cycloartenolsynthase abdecken zu können, wurden mit Hilfe der RACE-Technik die cDNA-Fragmente *RcCAS1c* und *RcCAS1d* synthetisiert (Abb. 3-23).

Die zusammengesetzte Nukleotid-Sequenz der klonierten Fragmente ergab eine Konsensussequenz von 2529 Nukleotiden (s. Abb. E-2). Für die Amplifizierung des RcCAS1-Full-Length-Klons mit einer Länge von 2,28 kb dienten Oligonukleotidprimer, die Restriktionsschnittstellen unmittelbar vor dem ATG-Start-Codon (RCCS1C2S) bzw. hinter dem Stop-Codon (RCCS1C1A) aufwiesen. Die Sequenzierung von *RcCAS1* zeigte, dass es sich dabei um ein offenes Leseraster handelte, das für ein Protein mit 760 Aminosäuren kodierte (Abb. 3-24). Der Sequenzvergleich zeigte die großen Ähnlichkeiten von RcCAS1 zu anderen pflanzlichen Triterpensynthasen (Tab. 3-9).



**Abbildung 3-23:** Schematische Darstellung der Strategie zur homologiebasierten Klonierung von *RcCAS1* (analog zu Abbildung 3-20).

**M**WKLRIAEGSGNPWLRTTNDHIGRQVWEFDSSKIGSPEELSQIENARQNF 50  
 TKNRFIHKHSSDLLMRIQFSKENPICEVLPQVKVKESEQVTEEKVKITLR 100  
 RALNYYSSI**QADDGHW**PGDYGGPMFLMPGLIIALSITGALNAILSEEHR 150  
 EMCRYLYNH**QNRDGGW**GLHIEGPSTMFGSVLCYVSLRLLGEGPNEGEGAV 200  
 ERGRNWILKHGGATAITSWGKMWLSVLGAYEWSGNNPLPPEMWLLPYILP 250  
 VHPGRMWCHCRMVYLPMSYLYGKRFVGPITPTVLSLRKELYTVPYHEIDW 300  
 NQARNQCAKEDLYYPHMLQDVLWATLHKFVEPIILMHWP GKRLREKAIQT 350  
 AIEHIHYEDENTRYICIGPVNKVLNMLCCWVEDPNSEAFKLHLPRLYDYL 400  
 WLAEDGMKMQGYNGSQLWDTAFVQAIIVSTNLIEEYGPTLKKAHSFIKKM 450  
 QVLENCPGDLNFWYRHISKGAWPFSTADHGWPI**SDCTAE**GIKALMLLSKI 500  
 PSEIVGEGLNANRLYDAVNVVLSLQNGDGGFPTYELSRYSWLEFINPAE 550  
 TFGDIVIDYPYVECTSAAIQALTSFRKSYPEHQREEIECCIKKAAKFMEK 600  
**IQISDGSW**YGSWGVCFETYGTWFGIKGLVAAGKSFNCSSIRKACDFLLSK 650  
**QCPSGGW**GESYLSQCQKKVYSNLEGDRSHVVNTAWAMLSLIDAGQAERDPT 700  
 PLHRAARYLINAQMENGDFPQQEIMGVFNRCMITYAAYRDI FPIWALGE 750  
 YRCRVLKAS\* 760

**Abbildung 3-24:** Aminosäuresequenz der *Ricinus communis* Cycloartenolsynthase RcCAS1. Das Substratbindungsmotiv DCTAE (grün) sowie die QW-Motive (rot) sind farblich hervorgehoben.

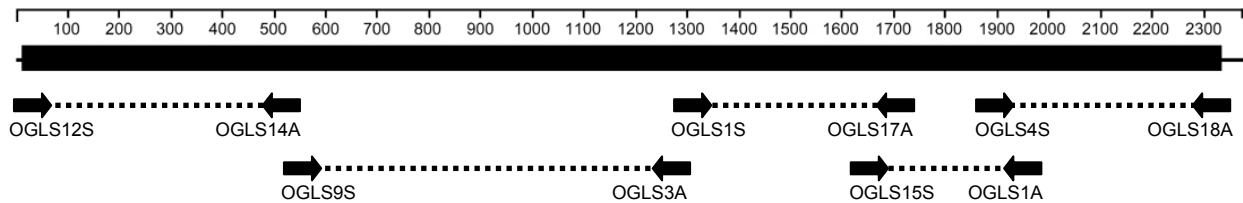
**Tabelle 3-9:** Ergebnisse des Datenbankvergleichs der *Ricinus communis* Cycloartenolsynthase RcCAS1 auf Aminosäuresequenz-Ebene. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe des Programms Blast Search (blastp) des National Center for Biotechnology Information (NCBI) ermittelt.

Akzessionsnummer	Pflanzenart	Gen-Produkt	Score (bits)	E Value
BAA76902	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	CAS	1380	0
BAB83086	<i>Betula platyphylla</i>	CAS	1360	0
JC5590	<i>Pisum sativum</i>	CAS	1353	0
BAA33460	<i>Panax ginseng</i>	CAS	1339	0
A49398	<i>Arabidopsis thaliana</i>	CAS	1330	0
BAB83085	<i>Betula platyphylla</i>	CAS	1285	0
BAB83253	<i>Costus speciosus</i>	CAS	1276	0
BAA85266	<i>Luffa cylindrica</i>	CAS	1270	0
AAT38891	<i>Avena strigosa</i>	CAS	1248	0
AAF03375	<i>Oryza sativa</i>	CAS	1233	0
AAG44096	<i>Abies magnifica</i>	CAS	1218	0
BAB83254	<i>Costus speciosus</i>	MFS	1140	0
BAA86931	<i>Olea europaea</i>	CAS	1072	0
BAA86930	<i>Olea europaea</i>	LUS	1045	0

### 3.3.5 Klonierung genomischer Sequenzen von *RcLUS1* und *RcCAS1*

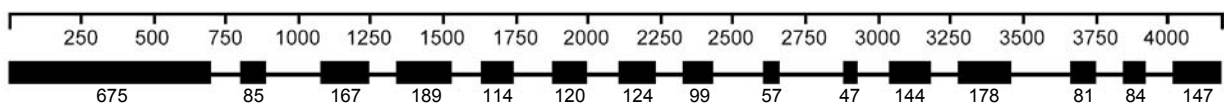
#### 3.3.5.1 Genomische Sequenz der Lupeolsynthase *RcLUS1*

Um die genomische Sequenz der klonierten Lupeolsynthase von *Ricinus communis* zu erhalten, wurden PCR-Versuche mit isolierter DNA aus Rizinus-Blattmaterial als Template durchgeführt. Dabei deckten fünf verschiedene Ansätze mit Kombinationen spezifischer Oligonukleotidprimer den gesamten Sequenzbereich ab (Abb. 3-25). Die amplifizierten PCR-Fragmente wurden anschließend kloniert und sequenziert.



**Abbildung 3-25:** Strategie zur Klonierung der genomischen Sequenz von *RcLUS1*. Der obere Balken repräsentiert das *RcLUS1*-Transkript, wobei der dicke Balken den codierenden Bereich widerspiegelt. Die Pfeile geben die relative Position sowie die Richtung der verwendeten spezifischen Primer wieder. Die gestrichelten Linien repräsentieren die jeweiligen, über PCR-Ansätze amplifizierten Fragmente.

Insgesamt wies die genomische Sequenz der *Ricinus communis* Lupeolsynthase eine Länge von 4189 Basenpaaren auf (s. Abb. E-5). Durch den Abgleich der genomischen Sequenz mit den vorhandenen Sequenzdaten des *RcLUS1*-Transkripts konnte schließlich das Exon-Intron-Muster gemäß der GTX XAG-Regel (Hanley und Schuler 1988) konstruiert werden. Diese Analyse ergab, dass 14 Introns die 15 Exonbereiche voneinander trennen (Abb. 3-26). Die Länge der Exon-Bereiche variierte dabei zwischen 47 bp (Exon 10) und 675 bp (Exon 1), die Intron-Bereiche hatten Längen zwischen 93 bp (Intron 14) und 325 bp (Intron 9).

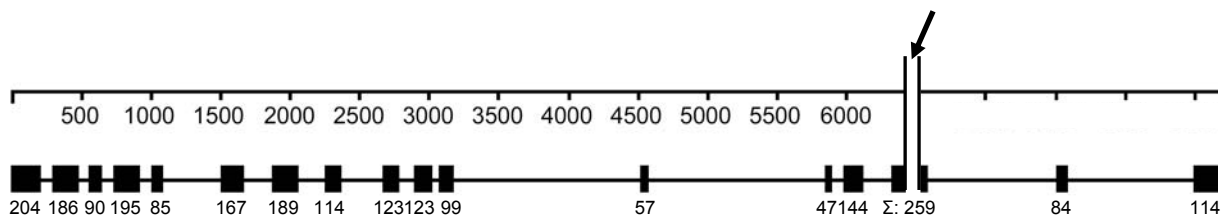


**Abbildung 3-26:** Exon-Intron-Muster der genomischen Sequenz von *RcLUS1*. Die dicken Balken geben die Länge und Position der einzelnen Exon-Bereiche an, die Linien repräsentieren Intron-Bereiche. Die Zahlen unter den Balken geben die Längen der Exon-Bereiche in bp an.



### 3.3.5.2 Genomische Sequenz der Cycloartenolsynthase RcCAS1

Um die genomische Sequenz der *Ricinus communis* Cycloartenolsynthase RcCAS1 in Erfahrung zu bringen, wurden auch hier Kombinationen spezifischer Oligonukleotidprimer in PCR-Ansätzen mit genomischer DNA als Template eingesetzt. Trotz verschiedener Ansätze mit mehreren Primerkombinationen im Bereich um Basenpaar 6500 führten die entsprechenden PCR-Ansätze hier zu keiner Fragment-Amplifikation, so dass keine vollständige genomische RcCAS1-Sequenz rekonstruiert werden konnte. Die Sequenzanalyse der amplifizierten Fragmente ergab jedoch, dass die genomische Sequenz eine Länge von mindestens 8,67 kb aufweist (s. Abb. E-6) und die Anzahl der Exon-Bereiche bei 18 liegen dürfte. Die Länge der Exons variiert zwischen 46 Basenpaaren (Exon 13) und 204 Basenpaaren (Exon 1). Anders als bei *RcLUS1* schwankt die Länge der einzelnen Intron-Bereiche ganz erheblich zwischen 58 Basenpaaren (Intron 10) und 1341 Basenpaaren (Intron 11).



**Abbildung 3-27:** Exon-Intron-Muster der genomischen Sequenz von *RcCAS1*. Die dicken Balken geben die Länge und Position der einzelnen Exon-Bereiche an, die Linien repräsentieren Intron-Bereiche. Die Zahlen unter den Balken geben die Längen der Exon-Bereiche in bp an. Der Pfeil markiert den Bereich, der in mehreren PCR-Ansätzen zu keiner Fragment-Amplifikation führte.

## 3.3.6 Klonierung zweier Triterpensynthase-cDNAs aus *Lycopersicon esculentum*

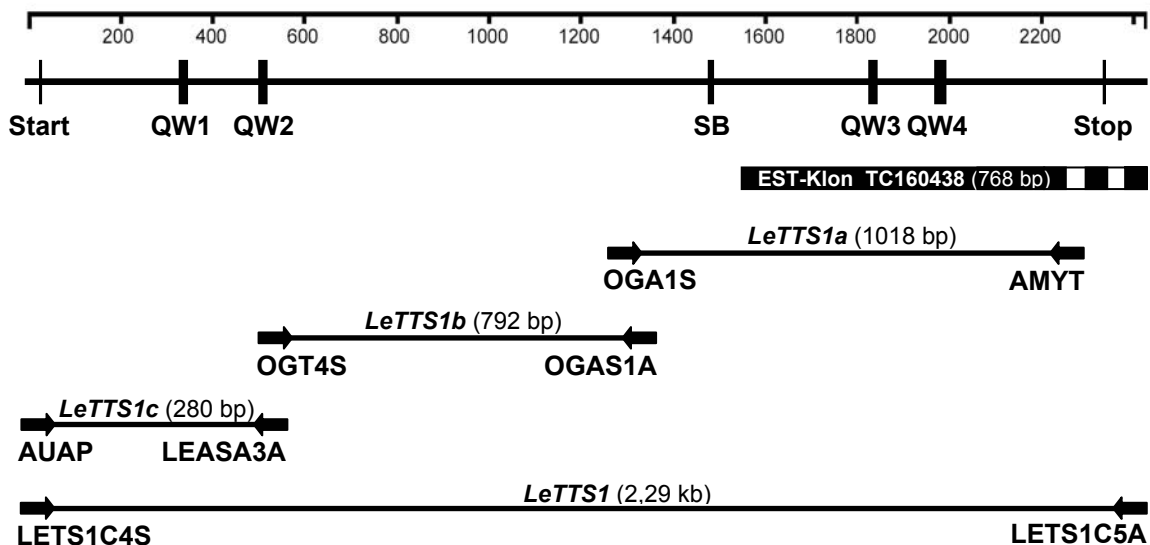
### 3.3.6.1 *Lycopersicon esculentum* $\beta$ -Amyrinsynthase LeTTS1

Für die Klonierung einer Triterpensynthase aus *Lycopersicon esculentum* wurde zunächst nach Sequenzen in Datenbanken gesucht, die aufgrund ihrer Ähnlichkeiten zu anderen Triterpensynthase-Sequenzen als Fragmente potentieller Triterpensynthasen angesprochen werden und damit als Grundlage für Klonierungsarbeiten dienen konnten. In der TIGR-Datenbank des Institute for Genomic Research (The TIGR Tomato Gene Index (LeGI)) fand sich dabei der EST-Klon TC160438, annotiert als Fragment einer  $\beta$ -Amyrinsynthase. Dieser EST-Klon wurde am Clamson University Genomics Institute bestellt und von der Arbeitsgruppe Vogg, Universität Würzburg, über seine vollständige Länge von 768 Basenpaaren sequenziert.

Für die PCR-basierte Klonierung der vollständigen *L. esculentum* Triterpensynthase diente cDNA als Template, die aus Gesamt-RNA - isoliert aus Tomatenfrüchten - synthetisiert worden war. Mit Hilfe des für die TC160438-Sequenz spezifischen Rückwärtsprimers AMYT und dem degenerierten, für  $\beta$ -Amyrinsynthasen spezifischen Antisense-Primer OGA1S (s. Abb. 3-17)

wurde das PCR-Produkt *LeTTS1a* mit einer Länge von 1 kb synthetisiert (Abb. 3-28) und anschließend sequenziert, so dass der bekannte Sequenzbereich des Transkripts um ca. 300 bp in 5'-Richtung verlängert werden konnte. Eine zusätzliche Erweiterung erbrachte die Sequenzierung des PCR-Produktes *LeTTS1b*, das mit Hilfe eines weiteren PCR-Ansatzes amplifiziert wurde, bei dem der spezifische Rückwärtsprimer OGAS1A mit dem degenerierten Antisense-Primer OGT4S kombiniert worden war. Eine 5'-RACE erbrachte die Amplifikation des Fragmentes *LeTTS1c* und damit die noch fehlende Sequenzinformation am 5'-Ende des Triterpensynthese-Transkripts.

Die zusammengesetzte Nukleotid-Sequenz der klonierten Fragmente ergab eine Konsensussequenz von 2535 Nukleotiden (s. Abb. E-3). Für die Amplifizierung des Full-Length-Klons *LeTTS1* mit einer Länge von 2,29 kb dienten die Oligonukleotidprimer LETS1C4S bzw. LETS1C5A. Der Full-Length-Klon wurde anschließend kloniert und sequenziert. Die Übersetzung der Nukleotidsequenz ergab eine durchgehende Aminosäuresequenz von 762 Aminosäuren (Abb. 3-29). Ein Sequenzvergleich offenbarte die großen Ähnlichkeiten von *LeTTS1* zu anderen pflanzlichen Triterpen-, vornehmlich  $\beta$ -Amyrinsynthasen (Tab. 3-10).



**Abbildung 3-28:** Schematische Darstellung der Strategie zur Klonierung von *LeTTS1*. Im oberen Bereich sind die Positionen des Start- bzw. Stop-Codons sowie der in der Genfamilie der Oxidosqualenzyklen konservierten Sequenzmotive QW und DCTAE angegeben. Die Lage der Sequenz des EST-Klons wird durch den dicken Balken repräsentiert. Die Pfeile geben die relative Position sowie die Richtung der verwendeten Primer wieder. Die Linien repräsentieren die jeweiligen, über PCR-Ansätze amplifizierten cDNA-Fragmente.

**M**WKLKIAEGQNGPYLYSTNNYVGRQTWEFDPNNGGTIEERAKIEEARQQFW 50  
 NNRYKVKPSSDLLWRIQFLGKKNFKQKI PAVKVEEGEEI SHEVATIALHR 100  
 AVNFFSAL**QATDGHW**PAENAGPLFFLPPLVMCMYITGHLNTVFPAEHRKE 150  
 ILRYIYCH**QNEGGW**GLHIEGHSTMFCTALS YICMRILGEGPDGGVNNAC 200  
 ARARKWILDHGSVTAIPSWGKTWLSILGVFEWIGTNPMPPEFWILPSFLP 250  
 VHPAKMWCYCRMVYMPMSYLYGKRFVGPITPLILQLREELYDRPYDEINW 300  
 KKVRHVCAKEDLYYPHPLVQDLMWDSLYICTEPLLTRWPFNKLRNKALEV 350  
 TMKHIHYEDENSRYITIGCVKVLCLACWVEDPNGDYFKKHLARIPDYL 400  
 WVAEDGMKMQSFGSQEWDTGFAIQALLASEMNDEIADTLRKGHDFIKQSQ 450  
 VTNNPSGDFKGMYRHISKGSWTFSDQDHGWQVS**DCTAE**AALKCCLLLSTMP 500  
 RELVGQAMEPGRLYDSVNVVLSLQSKNGGLAAWEPAGASEYLELLNPTF 550  
 FADIVIEHEYVECTASSIQALVLFKKLYPGHRTKEINIFIDNAVKYLEDV 600  
**QMPDGSW**YGNWVCFTYGSWFALGGLVAAGKSYNNSAAVRKGVFLLRT**Q** 650  
**RSDGGW**GESYRSCPDKVYRELETNDSNLVQTAWALMGLIHSGQADRDPKP 700  
 LHRAAKLLINSQMEDGDFPQEQEITGVFMKNCMLHYAAYRNIYPLWGLAEY 750  
 RKNVLLPLENN\* 762

**Abbildung 3-29:** Aminosäuresequenz der *Lycopersicon esculentum*  $\beta$ -Amyrinsynthase LeTTS1. Das Substratbindungsmotiv DCTAE (grün) sowie die QW-Motive (rot) sind farblich hervorgehoben.

**Tabelle 3-10:** Ergebnisse des Datenbankvergleichs der *Lycopersicon esculentum*  $\beta$ -Amyrinsynthase LeTTS1 auf Aminosäuresequenz-Ebene. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe des Programms Blast Search (blastp) des National Center for Biotechnology Information (NCBI) ermittelt.

Akzessionsnummer	Pflanzenart	Gen-Produkt	Score (bits)	E Value
BAB83088	<i>Betula platyphylla</i>	bAS	1373	0
BAA33722	<i>Panax ginseng</i>	bAS	1373	0
BAA33461	<i>Panax ginseng</i>	bAS	1371	0
BAA89815	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	bAS	1310	0
AAO33578	<i>Medicago truncatula</i>	bAS	1309	0
BAA97558	<i>Pisum sativum</i>	bAS	1305	0
AAO33580	<i>Lotus japonicus</i>	MFS	1233	0
BAA97559	<i>Pisum sativum</i>	MFS	1154	0
AAD05032	<i>Arabidopsis thaliana</i>	MFS	1128	0
BAB68529	<i>Luffa cylindrica</i>	IMS	1115	0
BAA86930	<i>Olea europaea</i>	LUS	1070	0
BAB83087	<i>Betula platyphylla</i>	LUS	1042	0
BAA86932	<i>Taraxacum officinalis</i>	LUS	1027	0
BAD08587	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	LUS	1024	0
BAB83253	<i>Costus speciosus</i>	CAS	974	0

3.3.6.2 *Lycopersicon esculentum* Triterpensynthase LeTTS2

Die Sequenzierung mehrerer Klone des PCR-Fragmentes *LeTTS1b* zeigte, dass neben dem eindeutig zu *LeTTS1* zuzuordnenden Fragment ein weiteres Fragment *LeTTS2b* amplifiziert worden war, das zwar eine ähnliche, aber dennoch eindeutig abweichende Sequenz aufwies; diese Unterschiede waren nicht allein auf Sequenzierungs- oder Synthese-Artefakte zurückzuführen. Das PCR-Produkt wurde als Fragment einer zweiten *Lycopersicon* Triterpensynthase LeTTS2 interpretiert. Mit Hilfe der Kombination des unspezifischen Antisense-Primers OGN2A und des für *LeTTS2* spezifischen Sense-Primers LEASB1S wurde eine PCR-Fragment-Amplifikation des in 3'-Richtung anschließenden Bereiches bewerkstelligt. Eine anschließende Sequenzierung ermöglichte die eindeutige Zuordnung zu *LeTTS2* aufgrund des vorhandenen Überlappungsbereiches mit *LeTTS2b*. Um das gesamte offene Leseraster von *LeTTS2* abdecken zu können, wurden mit Hilfe der RACE-Technik die entsprechenden cDNA-Fragmente synthetisiert. Neben den Ankerprimern kamen bei der 3'-RACE dabei wiederum der spezifische Sense-Primer LEASB1S zum Einsatz, bei der 5'RACE die Antisenseprimer OGAS6A und OGAS7A.

Die zusammengesetzte Nukleotid-Sequenz der klonierten Fragmente ergab eine Konsensussequenz für das LeTTS2-Transkript von 2641 Nukleotiden (s. Abb. E-4), die für ein Protein mit einer Länge von 764 Aminosäuren kodierte (Abb. 3-30). Auch hier zeigte der Sequenzvergleich in der NCBI-Datenbank, dass LeTTS2 große Ähnlichkeiten zu anderen pflanzlichen  $\beta$ -Amyrinsynthasen aufwies (Tab. 3-11).

```

MWKLIKIAKGLDDRYLYSTNNYIGRQIWEFDPNAGTIEEQAKIEEARQHYW 50
NNRYKKGKPNSDLLWRMQFLREENFKQRIRAVKVEEGEEISHEIATVALHR 100
AVHFFSALQATDGHWPAESAGPLFFLPPLVMCMYITGHLNTVYPAEHRKE 150
ILRYIYCHQNEDEGGWGLHIEGHSTMFCTAMS YICMRILGEGPEGGVNNAC 200
ARARKWILDHGSVIAI PSWGKTWLSILGAFEWIGTNPMPPEFWILPSFLP 250
VHPAKMWCYCRTVYMPMSYLYGKRFVGPITPLILKLREELYDQTYDEINW 300
KKVRHVCAKEDLYYPHPFVQDLMWDSLYICTEPLLTRWPFNKLRNKALEV 350
TMKHIHYEDENSRYITMGCVEKVL SMLACWVEDPNGDHFKKHLARIPDFL 400
WVAEDGKMQGCGSQSWDASLAIQALLASEMYDEISDTLKNHGDFIKQSQ 450
VKDNPSGDFKVMYRHISKGSWAFADQDLGWQVSDCTAELKCCLLFSTMP 500
PEIVGEAMDPVRLYDSVNVI LSLQSKNGGLSAWEPAGAPEYLELLNPTEF 550
FEDIVIEHEHVECTSSAIQALVRFKKLYPGHRTTEVDNF INGVKYIEDV 600
QEPDGSWYGNWGVCFIYASWFALGGLAAVGLSYSNCAAVRKSVEFLLRTQ 650
RSDGGWGESYRSCPDKVYRELETEHSNLVQTAWALMGLIHSGQVERDPRP 700
LHRAAKLLINFQMEDGDFPQQEITGVFLRNCMMHYALYRNI FPLWGLAEY 750
RRNVLVPLKHNYI * 764

```

**Abbildung 3-30:** Aminosäuresequenz der *Lycopersicon esculentum* Triterpensynthase LeTTS2. Das Substratbindungsmotiv DCTAE (grün) sowie die QW-Motive (rot) sind farblich hervorgehoben.

**Tabelle 3-11:** Ergebnisse des Datenbankvergleichs der *Lycopersicon esculentum* LeTTS2 auf Aminosäuresequenz-Ebene. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe des Programms Blast Search (blastp) des National Center for Biotechnology Information (NCBI) ermittelt.

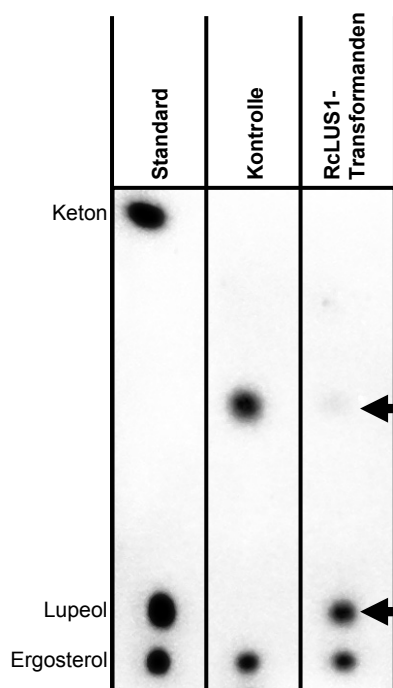
Akzessionsnummer	Pflanzenart	Gen-Produkt	Score (bits)	E Value
BAB83088	<i>Betula platyphylla</i>	bAS	1300	0
BAA33722	<i>Panax ginseng</i>	bAS	1300	0
BAA33461	<i>Panax ginseng</i>	bAS	1298	0
BAA89815	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	bAS	1258	0
AAO33578	<i>Medicago truncatula</i>	bAS	1244	0
BAA97558	<i>Pisum sativum</i>	bAS	1241	0
AAO33580	<i>Lotus japonicus</i>	MFS	1183	0
BAA97559	<i>Pisum sativum</i>	MFS	1178	0
BAB68529	<i>Luffa cylindrica</i>	IMS	1082	0
AAD05032	<i>Arabidopsis thaliana</i>	MFS	1080	0
BAA86930	<i>Olea europaea</i>	LUS	1016	0
BAB83087	<i>Betula platyphylla</i>	LUS	1013	0
BAA86932	<i>Taraxacum officinalis</i>	LUS	1000	0
BAD08587	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	LUS	976	0
BAB83253	<i>Costus speciosus</i>	CAS	937	0

### 3.4 Charakterisierung der klonierten 2,3-Oxidosqualenzuklassen mittels heterologer Expression in der Hefemutante GIL 77

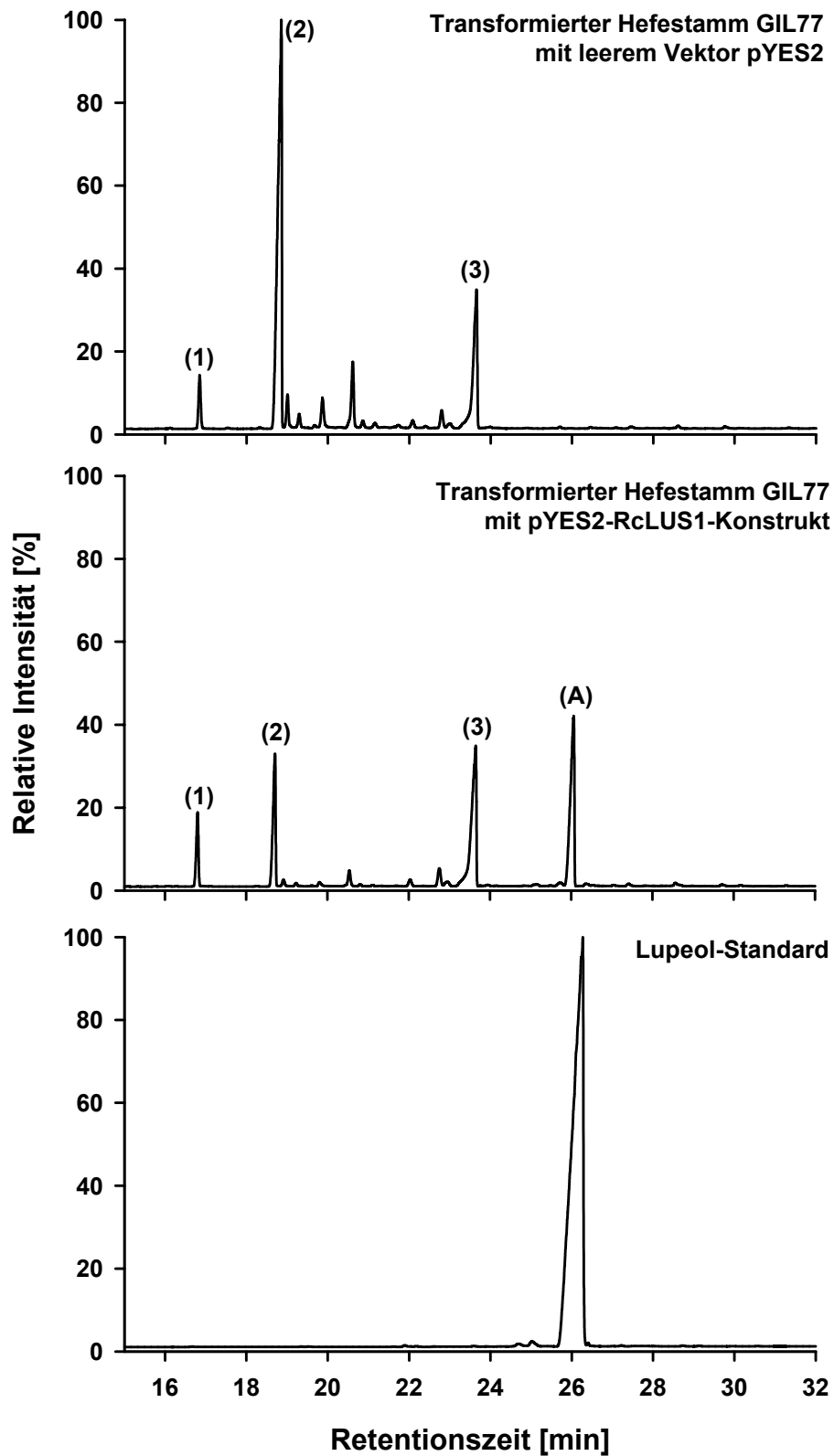
#### 3.4.1 Charakterisierung der *Ricinus communis* Lupeolsynthase RcLUS1

Für die funktionelle Charakterisierung der Triterpensynthase RcLUS1 wurde im Wesentlichen eine Methode angewendet, die im Labor von Y. Ebizuka, Tokyo, Ende der 90er Jahre etabliert wurde (Kushiro *et al.* 1998). Diese Methode basiert auf einer heterologen Expression der zu charakterisierenden Oxidosqualenzuklasse in GIL 77, einer Lanosterolsynthase-defizienten Hefestamm-Mutante (siehe 2.5.3).

Zunächst wurde die *RcLUS1*-Full-length-cDNA in den Hefe-Expressionsvektor pYES2 kloniert und anschließend in die Hefestamm-Mutante transformiert. Nach der Galactose-induzierten Expression von *RcLUS1* in GIL 77 wurden die Zellen geerntet und Hexanzell-extrakte hergestellt (siehe 2.5.4). Als Negativkontrolle wurden Hefezellen extrahiert, die zuvor mit dem leeren Hefe-Expressionsvektor pYES2 transformiert worden waren. Für eine erste qualitative Analyse wurden Aliquots der Extrakte auf einen Dünnschichtstreifen aufgetragen und mit einer Benzol/Aceton-Mischung als mobile Phase chromatographisch aufgetrennt. Hierbei zeigte sich, dass im Extrakt der pYES2-RcLUS1-Transformanden eine Substanz prominent angereichert vorlag, die im Kontroll-Extrakt nicht nachweisbar war. Diese Substanz zeigte denselben  $R_f$ -Wert wie ein authentischer Lupeol-Standard, der ebenfalls auf den Dünnschichtstreifen aufgetragen worden war (Abb. 3-31). Daneben fand sich in der Negativkontrolle eine Substanz, die in den Extrakten der RcLUS1-Transformanden in weit geringerer Menge vorhanden war.

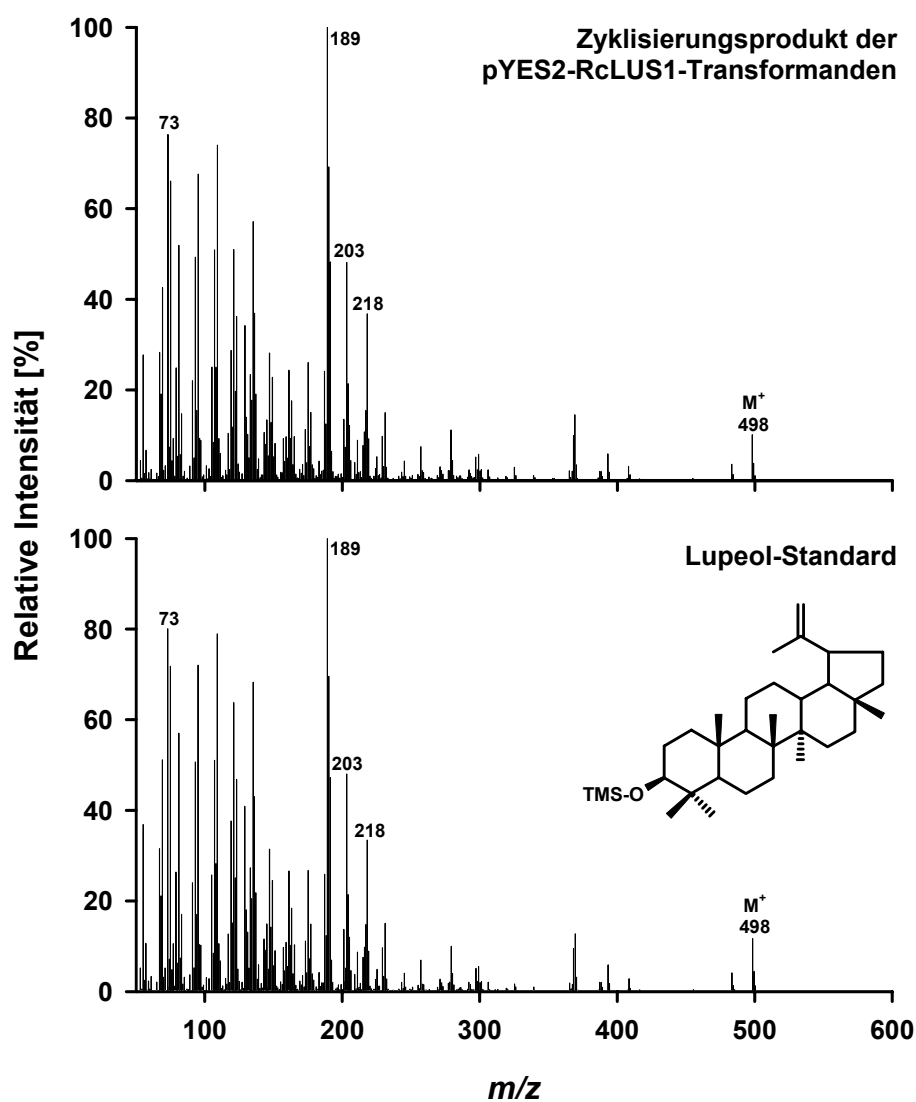


**Abbildung 3-31:** Dünnschichtchromatographie der Hefe-Gesamtextrakte. Neben einem Standard, bestehend aus Ergosterol, Lupeol und einem  $C_{27}$ -Keton, wurden jeweils 2  $\mu$ l der Extrakte der Kontrolle (mit leerem Expressionsvektor pYES2 transformierter Hefestamm GIL 77) sowie der pYES2-RcLUS1-Transformanden aufgetragen. Der obere Pfeil markiert die in der Kontrolle prominent vorhandene Substanz 2,3-Oxidosqualen (wie die anschließende massenspektroskopische Analyse zeigte). Der untere Pfeil markiert das Zyklisierungsprodukt der pYES2-RcLUS1-Transformanden.



**Abbildung 3-32:** Gaschromatographische Analyse TMS-derivatisierter Extrakte der mit RcLUS1 transformierten Hefezellen. (1) Squalen, (2) 2,3-Oxidosqualen, (3) Ergosterol und (A) Zyklisierungsprodukt der pYES2-RcLUS1-Transformanden.

Für eine eingehende analytische Untersuchung wurden die Extrakte anschließend silyliert, gaschromatographisch aufgetrennt und massenspektrometrisch analysiert. Sowohl im Extrakt der Negativkontrolle, wie auch im Extrakt der Hefezellen, in denen *RcLUS1* heterolog exprimiert worden war, ließen sich durch Vergleiche mit authentischen Standards bzw. durch Vergleiche mit Massenspektren in Datenbanken (Nist02, Wachseei) Ergosterol, Squalen sowie 2,3-Oxidosqualen identifizieren (Abb. 3-32). 2,3-Oxidosqualen war in den pYES2-RcLUS1-Transformanden in weit geringeren Mengen vertreten als in der Negativkontrolle, entsprechend den Ergebnissen der Dünnschichtchromatographie (vgl. Abb. 3-31). Die mit RcLUS1 transformierten Hefezellen akkumulierten eine Substanz, die in der Retentionszeit und in ihrem silylierten Massenspektrum (Basispeak  $m/z$  189 und Molpeak  $m/z$  498) exakt denen von authentischem Lupeol entsprach (Abb. 3-33).

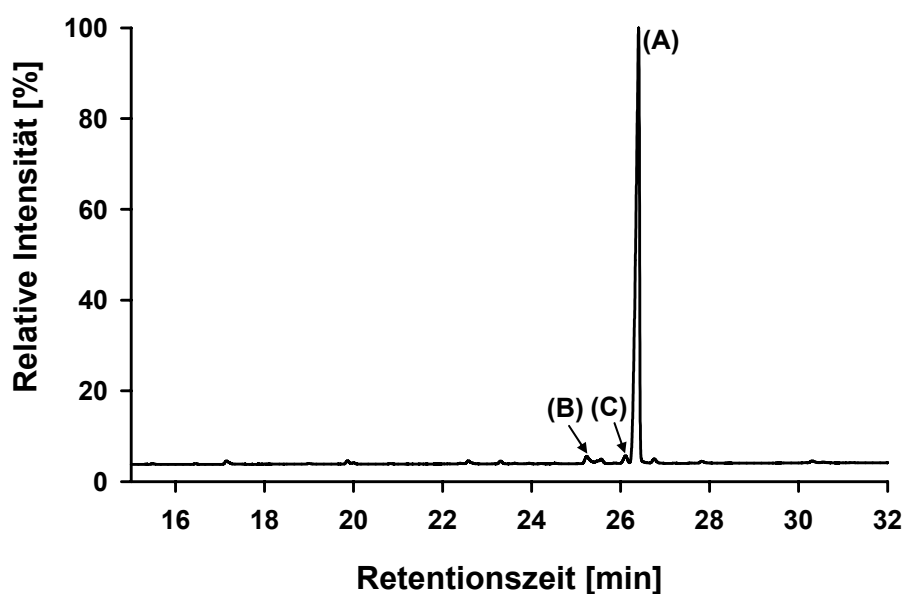


**Abbildung 3-33:** Massenspektrum des silylierten Zyklisierungsproduktes des mit dem pYES2-RcLUS1-Konstrukt transformierten Hefestammes GIL 77 im Vergleich zu silyliertem authentischen Lupeol-Standard.



Um zu untersuchen, ob - und wenn welche - Substanzen neben Lupeol als Haupt-Zyklisierungsprodukt als Folge der heterologen Expression von *RcLUS1* in GIL 77 zusätzlich entstanden, wurde der Hefe-Gesamtextrakt eines Transformationsansatzes auf eine Dünnschichtplatte aufgetragen und chromatographisch getrennt. Die Bande, die den Zyklisierungsprodukten zuzuordnen war, wurde ausgekratzt, extrahiert und gaschromatographisch sowie massenspektrometrisch untersucht (Abb. 3-34). Die Analyse zeigte, dass in der Dünnschichtfraktion neben Lupeol noch die Triterpenole  $\beta$ -Amyrin und  $\alpha$ -Amyrin nachweisbar waren, allerdings in sehr geringen Mengen (jeweils 0,9% beziehungsweise 0,1% der Gesamtmenge an Zyklisierungsprodukten).

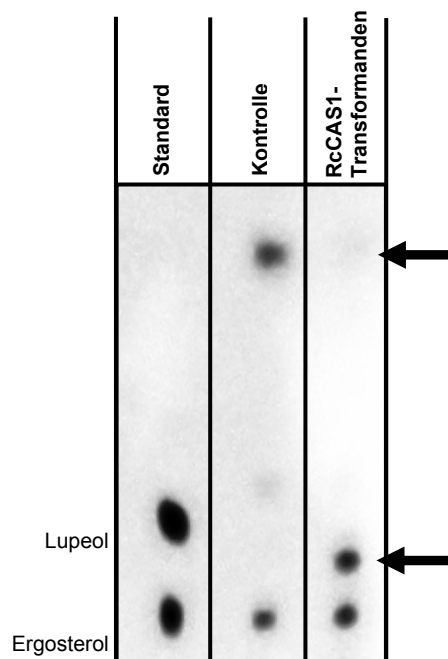
Da das wesentliche Zyklisierungsprodukt von *RcLUS1* eindeutig als Lupeol identifiziert wurde, konnte durch die heterologe Expression gezeigt werden, dass die klonierte cDNA der *Ricinus communis*-Triterpensynthase *RcLUS1* für eine Lupeolsynthase kodierte. Zur Bestätigung der Ergebnisse wurde GIL 77 mit drei unabhängig durchgeführten Klonierungen von *RcLUS1* transformiert. Die heterologe Expression in den Hefezellen führte dabei stets zur Anreicherung von Lupeol in den transformierten Zellen.



**Abbildung 3-34:** Gaschromatogramm der über Dünnschichtchromatographie quantitativ gewonnenen Zyklisierungsprodukte Lupeol (A),  $\beta$ -Amyrin (B) und  $\alpha$ -Amyrin (C).

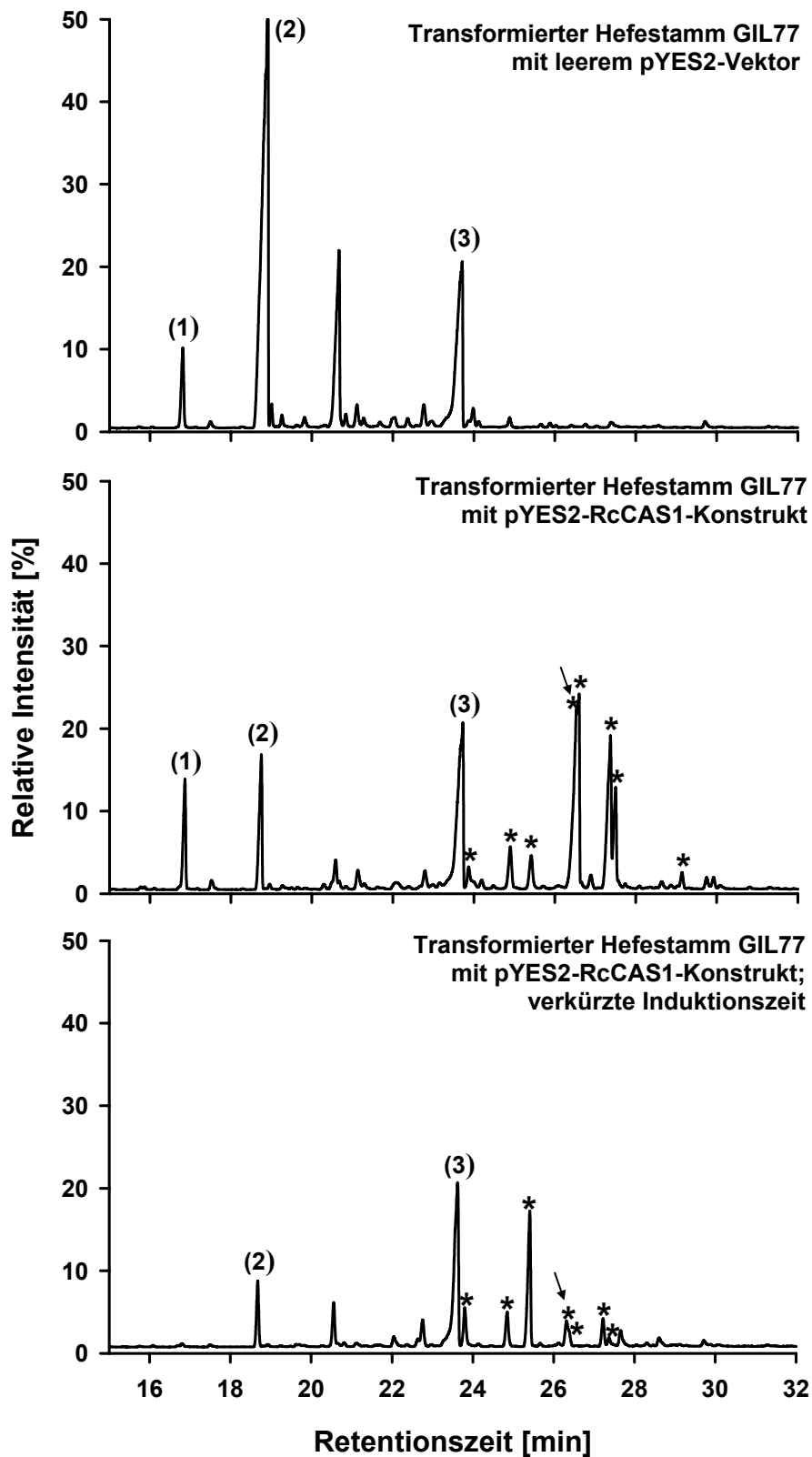
### 3.4.2 Charakterisierung der *Ricinus communis* Cycloartenolsynthese RcCAS1

Die klonierte RcCAS1-cDNA wurde für die Charakterisierung entsprechend der bereits beschriebenen Methode in GIL 77 heterolog exprimiert und die transformierten Hefezellen anschließend mit Hexan extrahiert. Eine Dünnschichtchromatographie der Gesamtextrakte zeigte, dass in den transformierten Zellen im Gegensatz zur Negativkontrolle eine Substanzfraktion angereichert wurde, die in ihrem R<sub>F</sub>-Wert nicht dem von Lupeol entsprach (Abb. 3-35).



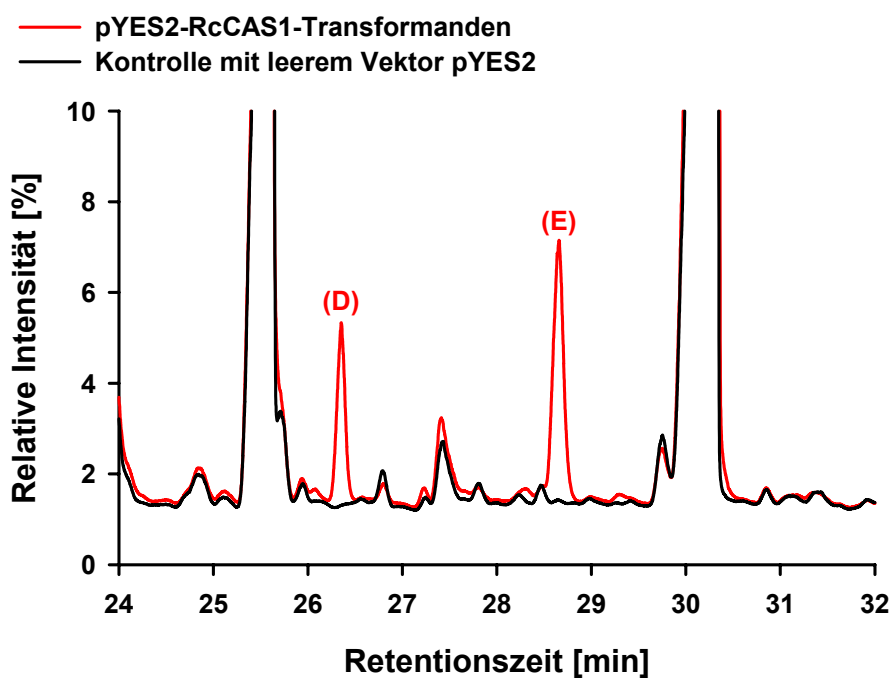
**Abbildung 3-35:** Dünnschichtchromatographie der Hefe-Gesamtextrakte. Neben einem Standard wurden jeweils 2 µl der Extrakte der Kontrolle (mit leerem Expressionsvektor pYES2 transformierter Hefestamm GIL 77) sowie der mit dem pYES2-RcCAS1-Konstrukt transformierte GIL77-Stamm aufgetragen. Der obere Pfeil markiert das in der Kontrolle prominent vorhandene 2,3-Oxidosqualen, der untere Pfeil das Zyklisierungsprodukt der RcCAS1-Transformanden.

Eine gaschromatographische und massenspektroskopische Analyse der Gesamtextrakte zeigte, dass im Vergleich zur Negativkontrolle acht prominente Substanzen in den RcCAS1-Transformanden angereichert vorlagen (Abb. 3-36), ein Befund, der sich in vier unabhängigen GIL 77-Transformierungen mit RcCAS1-pYES2-Konstrukten reproduzieren ließ. Unter diesen Verbindungen fand sich eine Substanz, die in ihrem Retentionsverhalten und ihrem Massenspektrum dem eines silylierten Cycloartenol-Standards (Labor R. Jetter) entsprach, wengleich diese Substanz nur 24% der gesamten Produktmenge ausmachte. Die anderen Verbindungen konnten aufgrund ihrer Massenspektren nicht identifiziert werden. Das silylierte Massenspektrum des Hauptproduktes, im Retentionsverhalten sehr ähnlich zu dem von Cycloartenol, zeigte einen Molpeak von  $m/z$  498 und die charakteristischen Massenfragmente  $m/z$  408 (Basispeak) und  $m/z$  393. Die Molmasse von  $m/z$  468 des Acetyl-Derivates dieser Substanz wies auf das Vorhandensein einer Hydroxylgruppe in der underivatisierten Verbindung hin. Eine andere quantitative Zusammensetzung der akkumulierten Substanzen ließ sich ausmachen, wenn die Galactose-Induktionsphase bei den Transformanden auf die Hälfte (6 Stunden) reduziert wurde, jedoch konnte auch hier Cycloartenol in den Extrakten identifiziert werden (Abb. 3-36).



**Abbildung 3-36:** Gaschromatogramm TMS-derivatisierter Extrakte der transformierten Hefezellen. (1) Squalen, (2) 2,3-Oxidosqualen, (3) Ergosterol. Sternchen weisen Produkte der pYES2-RcCAS1-Transformanden aus. Die Pfeile kennzeichnen Cycloartenol.

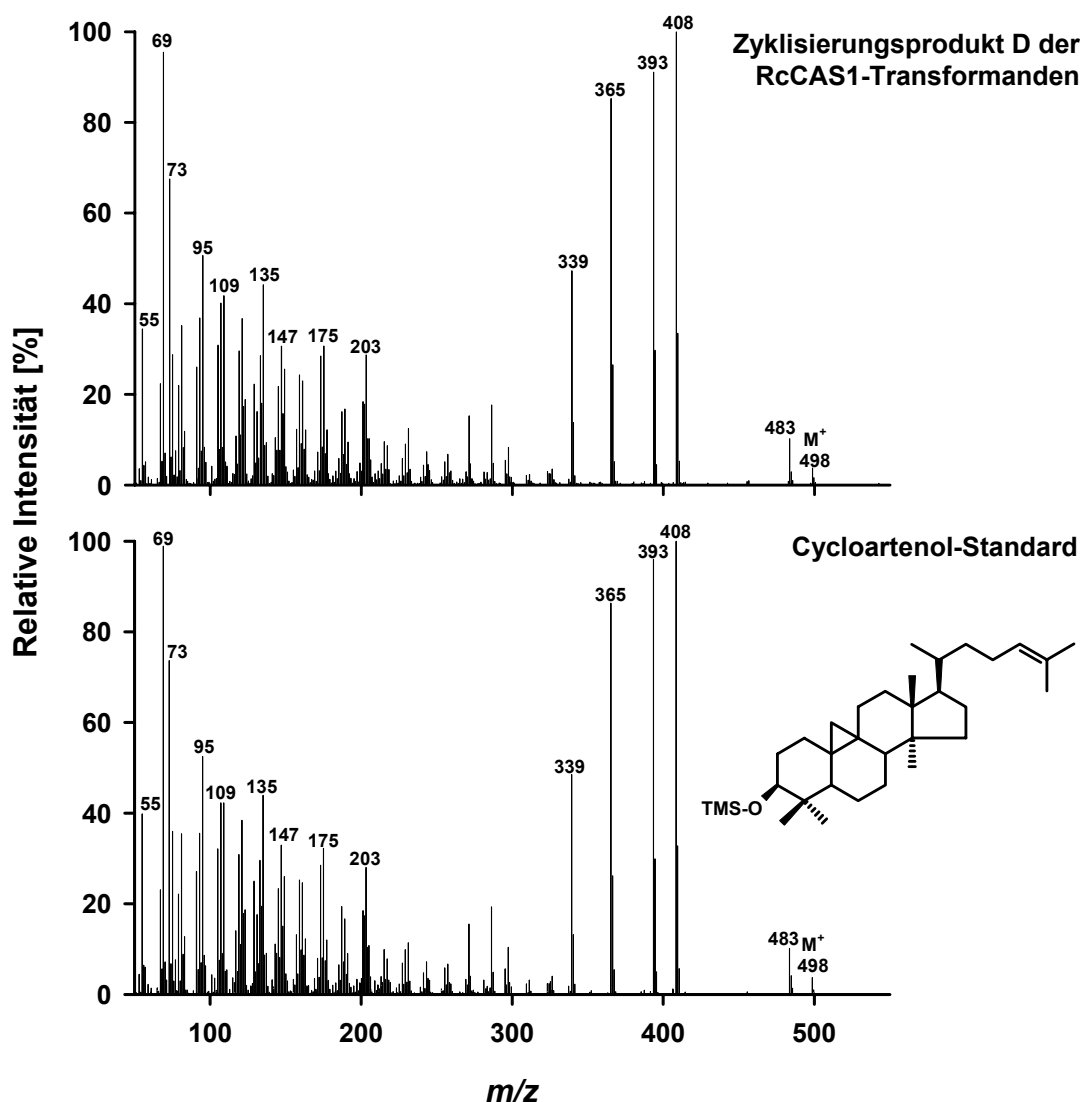
Wiederholt wurde in der einschlägigen Literatur darauf hingewiesen, dass Cycloartenol nicht in ausreichenden Mengen in mit Cycloartenolsynthase-cDNA transformierten Hefezellen akkumuliert wird (Haralampidis *et al.* 2001; Kawano *et al.* 2002). Dieser Effekt wird durch die metabolische Verarbeitung des Zyklisierungsproduktes in den Hefezellen erklärt (Venkatramesh und Nes 1995). Um das Produktspektrum von RcCAS1 vor diesem Hintergrund genauer untersuchen zu können, wurde ein *in vitro*-Enzymtest mit zellfreiem Hefezellenextrakt durchgeführt. Hierfür wurden mit *RcCAS1*-cDNA transformierte GIL 77-Zellen nach der Galaktose-Induktion homogenisiert. Der Zellextrakt diente dann für den Test, bei dem der zellfreie Extrakt mit dem Substrat 2,3-Oxidosqualen inkubiert und anschließend extrahiert wurde (s. 2.5.6). Die gaschromatographische Analyse zeigte, dass im Extrakt der transformierten Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle zwei Zyklisierungsprodukte (D und E) von RcCAS1 akkumuliert vorlagen (Abb. 3-37).



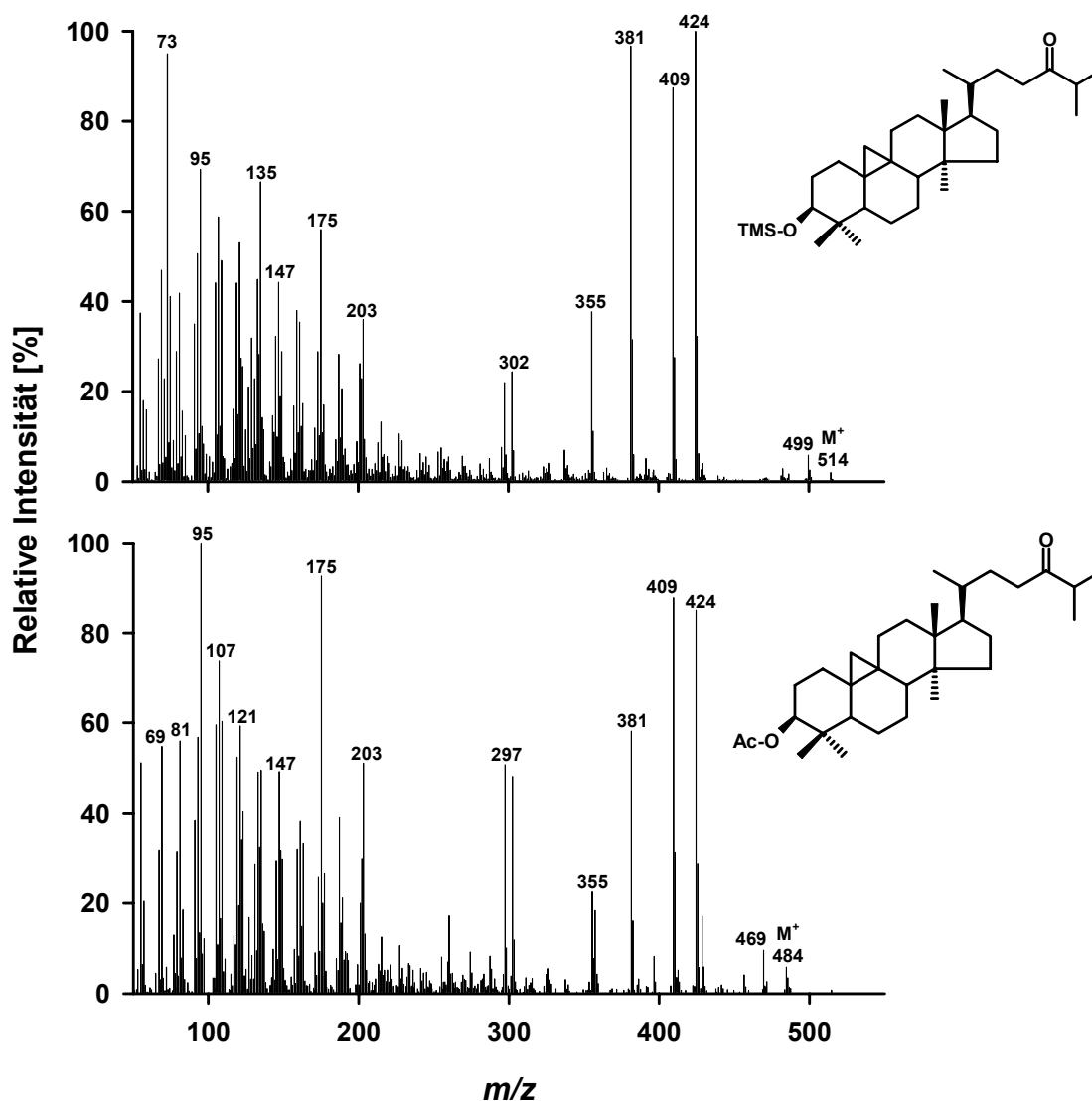
**Abbildung 3-37:** Gaschromatogramm der TMS-derivatisierten Chloroform-Extrakte aus dem Enzym-Test mit zellfreiem Extrakt. Im Vergleich zur Negativkontrolle waren die Substanzen D und E in dem von mit RcCAS1 transformierten Zellen stammenden Extrakt prominent.

Durch den Vergleich des Retentionsverhaltens und des silylierten Massenspektrums (Abb. 3-38) mit dem bereits oben erwähnten Standard konnte die Substanz D eindeutig als Cycloartenol identifiziert werden. Das silylierte Massenspektrum der zweiten Substanz E wies eine Molmasse der Verbindung von  $m/z$  514 aus; weitere charakteristische Fragmente waren  $m/z$  381,  $m/z$  409 sowie  $m/z$  424 (Basispeak). Durch eine dünnschichtchromatographische Auftrennung des Gesamtextraktes der RcCAS1-Transformanden wurde die

Fraktion, in der die Substanz E nachgewiesen werden konnte, einer Acetylierung unterzogen. Das entsprechende Spektrum der Substanz E nach der Derivatisierung zeigte folgerichtig einen Molpeak  $M^+$  von  $m/z$  484 (Abb. 3-39). Eine Recherche in der Massenspektren-Datenbank Nist02 ergab, dass dieses Spektrum dem des acetylierten Derivates von Lagerenol (Talapatra *et al.* 1983) gleich. Diese Verbindung unterscheidet sich von Cycloartenol lediglich durch das Vorhandensein einer Carbonylgruppe am C-Atom 24 anstelle der  $C_{24}$ - $C_{25}$ -Doppelbindung. Das Fehlen eines authentischen Standards machte eine eindeutige Identifizierung des Zyklisierungsproduktes E jedoch nicht möglich.



**Abbildung 3-38:** Massenspektrum des silylierten Zyklisierungsproduktes D des mit dem pYES2-RcCAS1-Konstrukt transformierten Hefestammes GIL 77 im Vergleich zu silyliertem Cycloartenol-Standard.



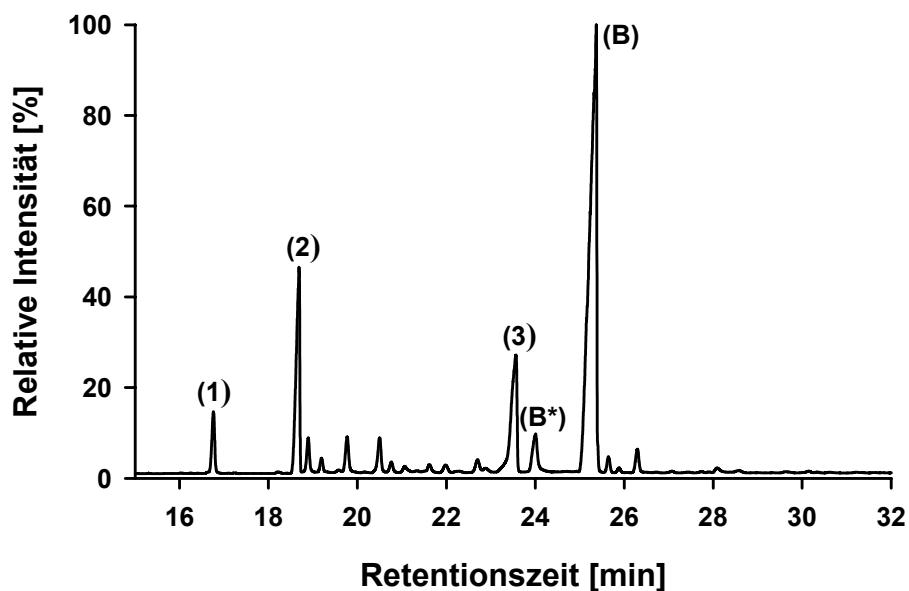
**Abbildung 3-39:** Massenspektrum des silylierten sowie acetylierten Zyklisierungsproduktes E des mit dem pYES2-RcCAS1-Konstrukt transformierten Hefestammes GIL 77. Die Spektren weisen die jeweiligen Verbindungen als Lagerenol-Derivate aus.

Die Carbonylgruppe des potenziellen Lagerenols an C<sub>24</sub> könnte durch eine Hydratation der C<sub>24</sub>-C<sub>25</sub>-Doppelbindung des Cycloartenol erklärt werden. Es bleibt allerdings ungeklärt, ob Verbindung E tatsächlich ein primäres Zyklisierungsprodukt der RcCAS1 darstellt, oder ob diese Substanz als „Artefakt“ durch die Inkubationsbedingungen während des Essays entsteht. Der *in vitro*-Enzymtest wurde in drei unabhängigen Ansätzen wiederholt, in denen jeweils Cycloartenol nachgewiesen werden konnte. Dagegen war in einer der Wiederholungen Verbindung E in weit geringeren Mengen vertreten als Cycloartenol, im dritten Ansatz sogar nur in Spuren nachzuweisen.

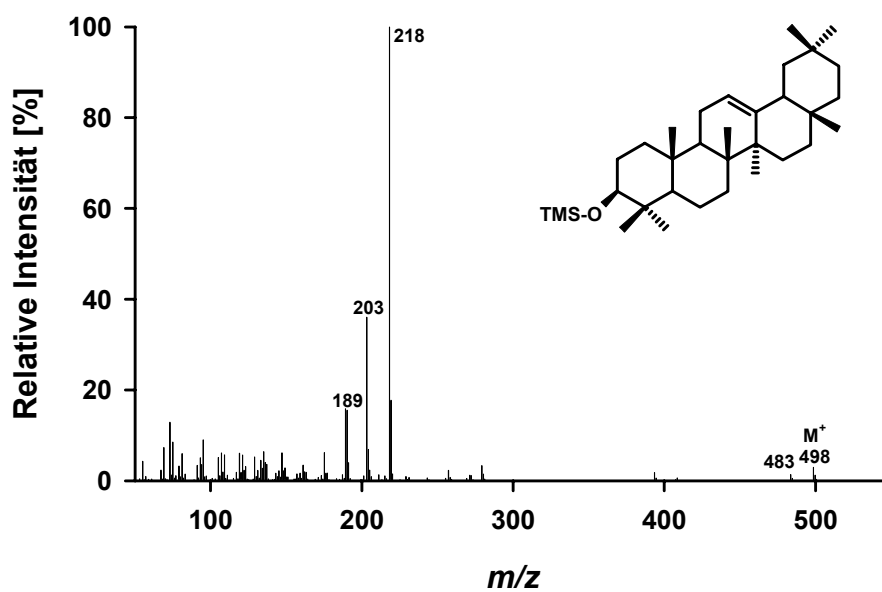
### 3.4.3 Charakterisierung der *Lycopersicon esculentum* $\beta$ -Amyrinsynthase LeTTS1

Für die Charakterisierung der von der *LeTTS1*-cDNA codierten Triterpensynthase aus *Lycopersicon esculentum* wurde das gleiche Verfahren wie bei R<sub>c</sub>LUS1 angewendet. Die Transformation von GIL 77-Hefezellen mit dem den *LeTTS1*-Full-length-Klon tragenden Expressionsvektor pYES2 und die anschließende Galaktose-Induktion der Zellen führte zu einer heterologen Expression von *LeTTS1*. Die gaschromatographische und massenspektroskopische Analyse der Gesamtextrakte der transformierten Zellen zeigte, dass es sich beim Zyklisierungsprodukt von *LeTTS1* um das Triterpenol  $\beta$ -Amyrin handelte (Abb. 3-40 und 3-41). Ähnlich wie R<sub>c</sub>LUS1 wies *LeTTS1* eine Monofunktionalität auf, da neben  $\beta$ -Amyrin kein weiteres Zyklisierungsprodukt in nennenswerten Mengen zu detektieren war.

Wie eine nachträgliche Sequenzierung des für die Charakterisierung eingesetzten Klons zeigte, entsprachen drei Aminosäuren am 5'-Ende des Full-length-Klons nicht dem *LeTTS1*-Wildtyp. Dies ist vermutlich auf eine „fehlerhafte“ Sequenz des für die Klonierung verwendeten Primers LETS1C4S zurückzuführen. Zwar kann davon ausgegangen werden, dass diese Abweichung keinen Einfluss auf die Produktspezifität von *LeTTS1* hatte; bei einer Wiederholung des Versuches muss jedoch ein völlig korrekter Full-Length-Klon von *LeTTS1* zur Transformation von GIL 77 eingesetzt werden, um eventuelle Sequenz-Artefakte ausschließen zu können.



**Abbildung 3-40:** Gaschromatographische Analyse TMS-derivatisierter Extrakte der mit *LeTTS1* transformierten Hefezellen. (1) Squalen, (2) 2,3-Oxidosqualen, (3) Ergosterol und (B) Zyklisierungsprodukt der pYES2-*LeTTS1*-Transformanden. (B\*) kennzeichnet das underivatisierte Zyklisierungsprodukt B.



**Abbildung 3-41:** Massenspektrum des silylierten Zyklisierungsproduktes B des mit dem pYES2-LeTTS1-Konstrukt transformierten Hefestammes GIL77. Das Spektrum weist das LeTTS1-Zyklisierungsprodukt B als das Triterpenol  $\beta$ -Amyrin aus.

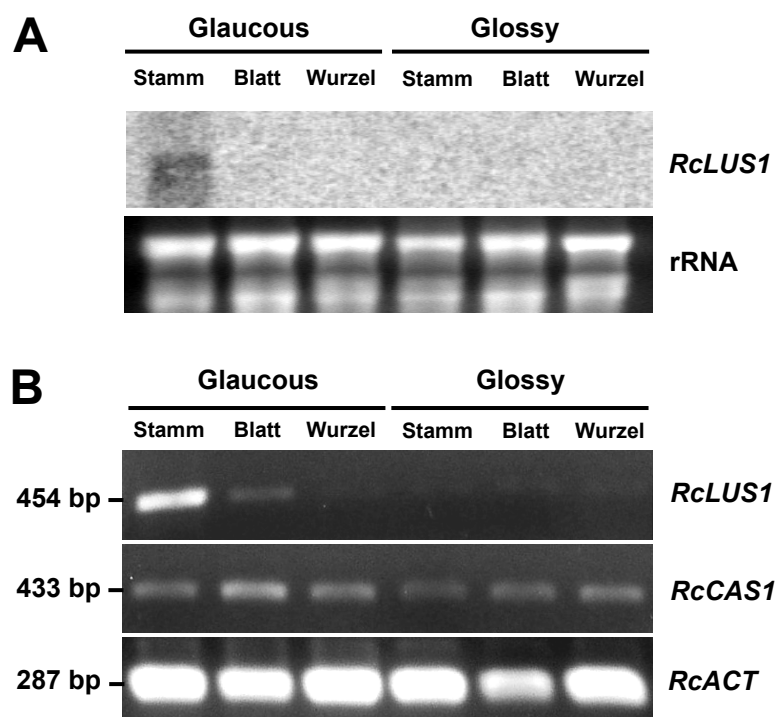


### 3.5 Expressionsmuster der Epoxysqualenzuklassen RcLUS1 und RcCAS1

#### 3.5.1 Expression in verschiedenen Pflanzengeweben

Um die Expression der klonierten Lupeol- und Cycloartenolsynthase von *R. communis* in verschiedenen Organen der Pflanze zu untersuchen, wurden entsprechende Northern-Blot-Analysen durchgeführt. Eine für *RcLUS1* spezifische radioaktiv markierte Sonde wurde hierfür mit jeweils 10 µg Gesamt-RNA hybridisiert. Die RNA-Proben wurden zuvor aus Stamm-, Wurzel- und Blattmaterial 50 Tage alter *Ricinus communis* Pflanzen beider Phänotypen isoliert, gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran geblottet. Als Kontrolle diente die Ethidiumbromidfärbung der rRNA-Banden der einzelnen Proben. Die Untersuchung zeigte, dass *RcLUS1* nur in Sprossachsen des Glaucous-Phänotyps exprimiert war, wohingegen in allen anderen Proben kein Signal der Lupeolsynthase-spezifischen Sonde detektierbar war (Abb. 3-42A). Um die geblotteten RNA-Proben für eine weitere Analyse nutzen zu können, wurde die Membran gestrippt und die Proben danach mit einer für RcCAS1 spezifischen, radioaktiv markierten Sonde hybridisiert. Auch nach einer mehrtägigen Entwicklung des Blots auf einer Imager-Platte war kein Signal messbar. Ebenso war auch nach einer weiteren Hybridisierung des Blots mit einer für das Actin-Gen (*RcACT*) spezifischen Sonde als Positiv-Kontrolle keinerlei Signal zu detektieren.

Um zusätzliche Informationen zum Expressionsverhalten der *R. communis* Lupeol- und Cycloartenolsynthase zu erhalten, wurden neben den Northern-Blot-Analysen semiquantitative RT-PCR-Untersuchungen durchgeführt. Hierfür wurden jeweils 0,5 µg Gesamt-RNA der Stamm-, Wurzel- und Blattproben beider Phänotypen für cDNA-Synthesen eingesetzt. In anschließenden PCR-Versuchen wurden mit Hilfe genspezifischer Primer RcLUS1- und RcCAS1-Transkripte entsprechend ihrem Expressionsmuster in den verschiedenen Pflanzengewebe amplifiziert. Die Ergebnisse für RcLUS1 bestätigten im Wesentlichen die Ergebnisse aus den Northern-Blot-Analysen (Abb. 3-42B): Während in den Proben des Glossy-Phänotyps keine Fragmente von *RcLUS1* amplifiziert wurden, zeigte die starke Amplifikation des Transkriptfragmentes in der Sprossachsenmaterial-Probe des Glaucous-Phänotyps die starke Expression der Lupeolsynthase in diesem Gewebe an. Darüber hinaus wurde in der Blattmaterial-Probe des Glaucous-Phänotyps eine schwache Amplifikation des *RcLUS1*-Fragmentes beobachtet. Im Gegensatz zu diesem differenzierten Expressionsverhalten zeigte die Amplifikation der *RcCAS1*-Transkript-Fragmente, dass die klonierte *R. communis* Cycloartenolsynthase in allen Geweben der Pflanze exprimiert war. Als konstitutive Kontrolle in den RT-PCR-Versuchen fungierte die Amplifikation eines Transkript-Fragmentes des in allen Proben erwartungsgemäß stark exprimierten Actin-Gens (*RcACT*).



**Abbildung 3-42:** Expression der *R. communis* Lupeolsynthase und Cycloartenolsynthase in verschiedenen Organen. **A:** Northern-Blot-Analyse mit einer *RcLUS1*-spezifischen Sonde; 10 µg RNA pro Linie. Die untere Teilabbildung zeigt die Ethidiumbromid-Färbung des Gels vor dem Blotten auf die Nylonmembran als Kontrolle. **B:** RT-PCR-Analyse der Expression von *RcLUS1* und *RcCAS1*. Als konstitutive Kontrolle diente *RcACT*.

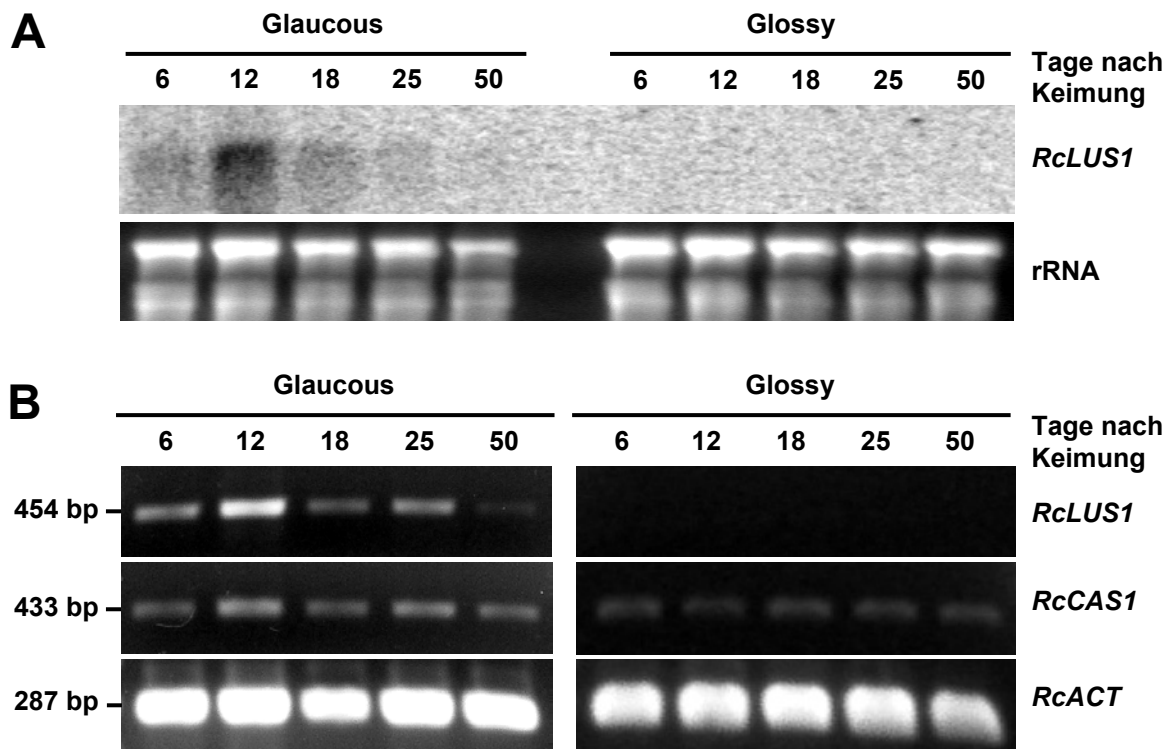
### 3.5.2 Expression während der frühen Sprossachsenentwicklung

Das Expressionsverhalten der klonierten und charakterisierten Lupeolsynthase *RcLUS1* während der frühen Hypokotylentwicklung wurde ebenfalls mit Hilfe von Northern-Blot-Analysen untersucht, analog zur oben beschriebenen Vorgehensweise. Die RNA-Proben wurden dabei aus Hypokotylen von 6, 12, 18, 25 und 50 Tage alten Rizinuspflanzen beider Phänotypen gewonnen. Die Northern-Blot-Analyse zeigte, dass *RcLUS1* im Glaucous-Phänotyp zwischen Tag 6 und Tag 25 exprimiert war, wobei sich ein Maximum des Expressionslevels am Tag 12 abzeichnete (Abb. 3-43A). Im Gegensatz dazu war während dieses Zeitraums keinerlei *RcLUS1*-Expressionsaktivität im Glossy-Phänotyp detektierbar.

Auch hier wurden ergänzend semiquantitative RT-PCR-Versuche durchgeführt, die im Wesentlichen die Ergebnisse der Northern-Blot-Analysen bestätigten (Abb. 3-43B): Beim Glaucous-Phänotyp ließ sich eine Expression von *RcLUS1* von Tag 6 bis Tag 50 nachweisen, wobei sich ein Peak an Tag 12 im Expressionsmuster, an Tag 50 nur eine

schwache Amplifikation des *RcLUS1*-Fragments erkennen ließ. In den aus Glossy-Individuen gewonnenen Proben ließ sich keinerlei Expressionsaktivität von RcLUS1 erkennen.

Im Gegensatz zur Lupeolsynthese war *RcCAS1* während der gesamten untersuchten Zeitspanne exprimiert, sowohl im Glaucous-, wie auch im Glossy-Phänotyp. Wie in den vorangegangenen Expressions-Versuchen diente auch hier die Amplifizierung des *RcACT*-Fragmentes jeweils als Positivkontrolle.



**Abbildung 3-43:** Expression der *R. communis* Lupeolsynthese und Cycloartenolsynthese während der frühen Hypokotylentwicklung. **A:** Northern-Blot-Analyse mit einer RcLUS1-spezifischen Sonde; 10 µg RNA pro Linie. Die untere Teilabbildung zeigt die Ethidiumbromid-Färbung des Gels vor dem Blotting auf die Nylonmembran als Kontrolle. **B:** RT-PCR-Analyse der Expression von *RcLUS1* und *RcCAS1*. Als konstitutive Kontrolle diente *RcACT*.

### 3.6 Site-directed mutagenesis-Versuche an *RcLUS1*

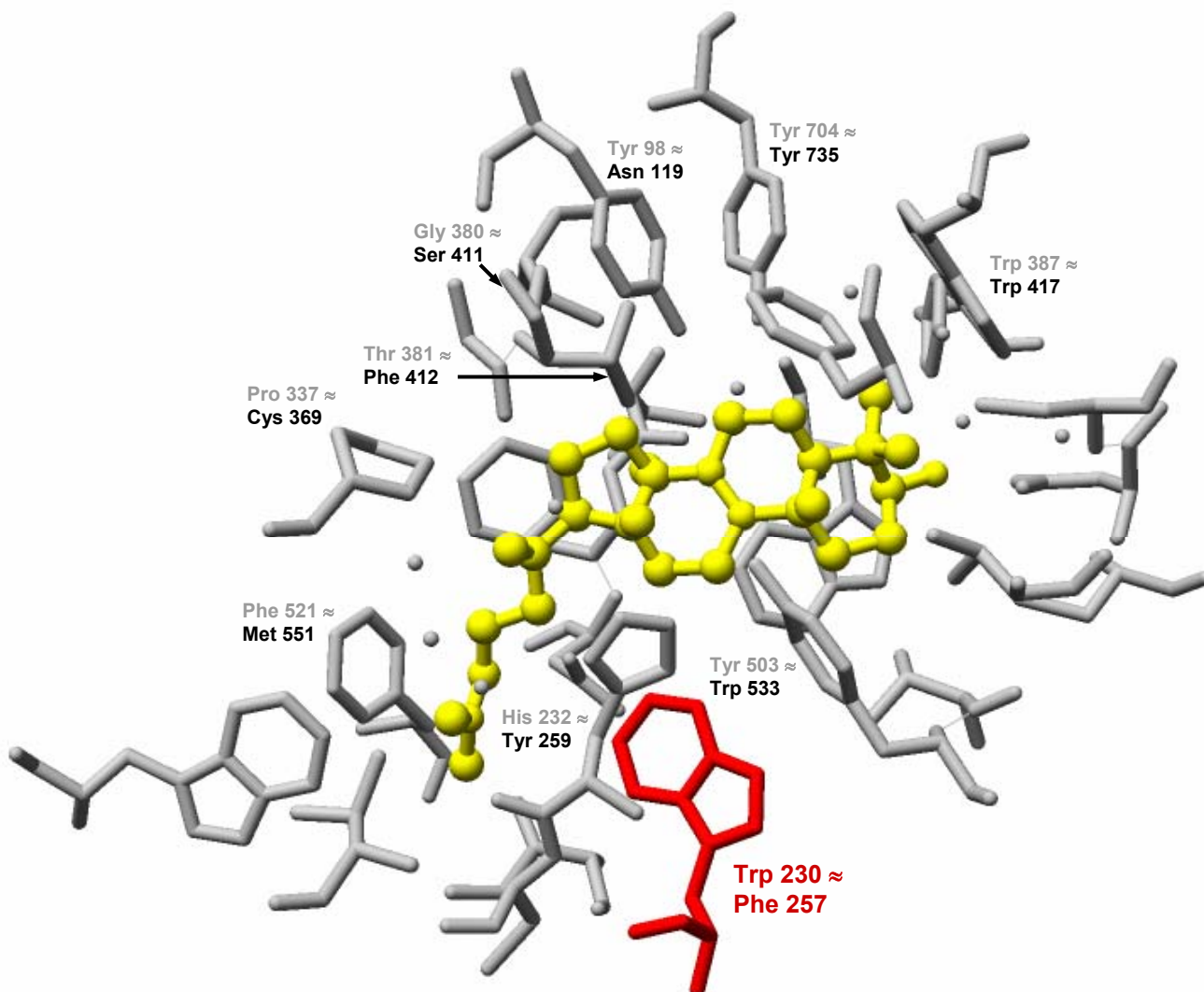
#### 3.6.1 Die Wahl der zu mutierenden Aminosäurereste

Die Bedeutung für den produktspezifischen Zyklisierungsmechanismus einzelner Aminosäurereste der Lupeolsynthase aus *Ricinus communis* wurde untersucht, indem durch gerichtete Mutagenisierungsversuche (site-directed mutagenesis) einzelne Aminosäuren mutagenisiert wurden. Ebizuka und seine Mitarbeiter konnten mit dieser Methode zeigen, dass der Austausch jeweils einzelner Aminosäuren bei der Lupeolsynthase aus *Olea europaea* (OEW) und der  $\beta$ -Amyrinsynthase aus *Panax ginseng* (PNY) eine Veränderung der Produktspezifität zur Folge hatte. Bei ihren Untersuchungen spielte das bei Amyrinsynthasen konservierte Tryptophan im Motiv  $^{258}\text{MWCYCR}^{263}$  (PNY) sowie das in Lupeolsynthasen konservierte Leucin im entsprechenden Motiv  $^{255}\text{MLCYCR}^{260}$  (OEW) eine entscheidende Rolle: Der jeweilige gegenseitige Austausch von Tryptophan und Leucin in OEW und PNY zog eine entsprechende Veränderung der Produktspezifität der mutagenisierten Triterpensynthasen nach sich (Kushiro *et al.* 2000b). Wie sich in Sequenzalignments herausstellte, zeigte *RcLUS1* ebenfalls das entsprechende Motiv, allerdings mit einem Phenylalanin anstatt des für Lupeolsynthasen charakteristischen Leucins:  $^{256}\text{MFCYCR}^{261}$  (Abb. 3-44).

<b>OEW</b>	PIHPGKMLCYCR	260	} Lupeol-synthasen
<b>TRW</b>	PIHPGKMLCYCR	262	
<b>BPW</b>	PIHPGKMLCYCR	259	
<b>GgLUS1</b>	PFHPGKMLCYCR	259	
<b>MtbAS</b>	PMHPAKMWCYCR	261	} $\beta$ -Amyrin-synthasen
<b>PSY</b>	PMHPAKMWCYCR	261	
<b>GgbAS1</b>	PMHPAKMWCYCR	261	
<b>PNY2</b>	PMHPAKMWCYCR	261	
<b>BPY</b>	PMHPAKMWCYCR	261	
<b>PNY</b>	PMHPAKMWCYCR	263	
<b>RcLUS1</b>	PLHPAKMFCYCR	261	

**Abbildung 3-44:** Aminosäuresequenz-Alignment von Lupeol- und  $\beta$ -Amyrinsynthasen im Bereich der jeweils konservierten Aminosäuren Leucin und Tryptophan. Eine Sonderstellung von *RcLUS1* innerhalb der Gruppe der Lupeolsynthasen ergibt sich durch die Aminosäure Phe<sup>257</sup>, die nicht das LUS-typische Leu aufweist.

Über die dreidimensionale Struktur der menschlichen Lanosterolsynthase und ein Alignment der Aminosäuresequenz mit der von *RcLUS1* ließ sich ermitteln, dass <sup>257</sup>Phe von *RcLUS1* sehr nahe am bzw. im aktiven Zentrum des Enzyms positioniert sein dürfte und damit die unmittelbare Beteiligung an der Zyklisierungsreaktion wahrscheinlich ist (Abb. 3-45). Um zu testen, ob <sup>257</sup>Phe tatsächlich für die Bildung von Lupeol mit verantwortlich ist, wurde die *RcLUS1*-Mutante F257W kreiert (siehe 2.6).

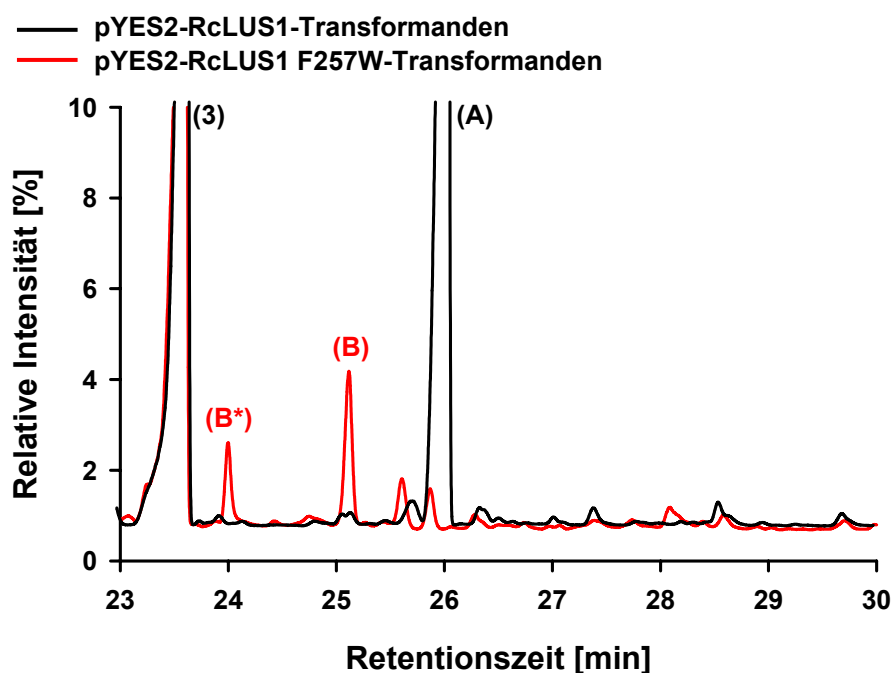


**Abbildung 3-45:** Dreidimensionale Darstellung der Aminosäurereste der menschlichen Lanosterolsynthese, die sich in einem Abstand von 5 Ångström vom Substrat befinden. Die Positionen der einzelnen Aminosäuren in der AS-Kette (grau) sowie die über Sequenzalignments ermittelten entsprechenden Aminosäuren von *RcLUS1* und deren Positionen (schwarz) sind angegeben. Der Rest des Trp230, das dem zu mutierenden Phe257 aus *RcLUS1* entspricht, ist rot, das Produkt Lanosterol gelb eingefärbt. Die Darstellung wurde mit Hilfe des Programms UCSF Chimera (Version 1) erstellt (PDB ID: 1W6K).

Neben diesem Ansatz wurde noch eine weitere Mutagenisierung an *RcLUS1* durchgeführt, bei der der Thymidinrest der Aminosäure 416 durch ein Histidin ersetzt wurde. Die Bildung dieser *RcLUS1*-Mutante T416H war durch Sequenzvergleiche von *RcLUS1* mit einer gerade im Labor klonierten und charakterisierten *Kalanchoe*-Triterpensynthase motiviert gewesen. Der Vergleich mit der menschlichen Lanosterolsynthese machte jedoch eine Beteiligung dieser Aminosäure aufgrund seiner relativ weiten Entfernung vom katalytischen Zentrum des Enzyms unwahrscheinlich. Da die Charakterisierung der Mutante keine Veränderungen in der Produktspezifität der Mutante erkennen ließ, wird dieser Ansatz im Folgenden nicht weiter berücksichtigt.

### 3.6.2 Charakterisierung der *RcLUS1*-Mutante F257W

Die Charakterisierung der *RcLUS1*-Mutante F257W erfolgte analog zur oben beschriebenen Methode über die heterologe Expression des Gens in der Hefemutante GIL 77. Die Extraktion der Transformanden und die anschließende gaschromatographische Analyse offenbarte ein verändertes Produktspektrum der Mutante F257W gegenüber dem Wildtyp (Abb. 3-46): Als Hauptzyklisierungsprodukt wurde hier  $\beta$ -Amyrin identifiziert, während andere Verbindungen, darunter auch Lupeol, nur in geringen Mengen detektiert wurden. Das relative Mengenverhältnis von  $\beta$ -Amyrin : Lupeol : nicht identifizierte Produkte betrug 64 : 13 : 23. Auch wenn die Triterpenproduktion insgesamt bei *RcLUS1* F257W gegenüber dem Wildtyp stark reduziert war (etwa 15% im Vergleich zur Produktionsmenge des nativen Enzyms), konnte durch diesen Ansatz gezeigt werden, dass die Veränderung einer einzigen Aminosäure das Produktspektrum der Zyklastase beeinflusst, so dass es möglich war, aus einer Lupeolsynthese eine multifunktionale Triterpensynthase mit überwiegender  $\beta$ -Amyrin-Produktion zu kreieren.



**Abbildung 3-46:** Gaschromatogramm TMS-derivatisierter Gesamtextrakte mit *RcLUS1*-Wildtyp und *RcLUS1*-Mutante F257W transformierter Hefezellen. (3) Ergosterol, (A) Lupeol, (B)  $\beta$ -Amyrin und (B\*) underivatisiertes  $\beta$ -Amyrin.

## 4 Diskussion

### 4.1 Ausbildung des Glaucous-Phänotyps von *Ricinus communis*

#### 4.1.1 Chemische und mikromorphologische Charakteristika der beiden Sprossachsen-Phänotypen: Wachskristalle als Verursacher des Glaucous-Phänotyps

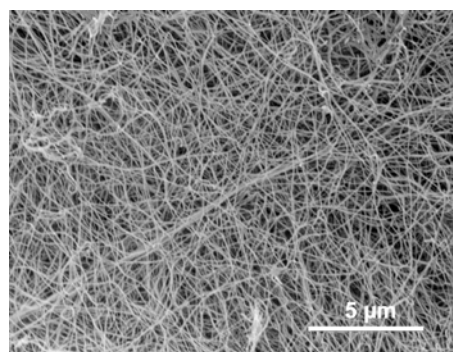
Die chemische Analyse der kutikulären Wachszusammensetzung 67 Tage alter Hypokotyle von *Ricinus communis* ergab, dass der gravierendste Unterschied zwischen beiden Sprossachsenkutikula-Phänotypen vor allem in der Akkumulation von zyklischen Triterpenverbindungen bei Individuen des Glaucous-Phänotyps begründet liegt. Bei der Hauptkomponente des kutikulären Wachses von Individuen des Glaucous-Phänotyps handelt es sich um das Triterpenol Lupeol, das mehr als 50% der Wachsmenge stellt. Im Gegensatz dazu sind im Wachsgemisch der Individuen des Glossy-Phänotyps nur sehr geringe absolute und relative Mengen an Lupeol bzw. Triterpenen insgesamt zu detektieren. So beträgt die Wachsbelegung auf Hypokotylen vom Glossy-Phänotyp nur  $12,5 \mu\text{g cm}^{-2}$  gegenüber  $51,9 \mu\text{g cm}^{-2}$  auf Hypokotylen von Individuen des Glaucous-Phänotyps. Aus den rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen ging hervor, dass Sprossachsen und Blattstiele des Glaucous-Phänotyps von einem dichten Netzwerk aus fadenförmigen epikutikulären Wachskristallen, das die makroskopisch glauke Erscheinungsform dieser Pflanzenorgane verursacht, bedeckt sind. Die Sprossoberflächen des Glossy-Phänotyps sind dagegen lediglich von einem Wachsfilm überzogen, ihre Sprossachsen erscheinen deshalb glänzend grün. Die Detektion der auffälligen Triterpen-Akkumulation, die auf das Wachs von Individuen des Glaucous-Phänotyps beschränkt bleibt, liefert einen ersten Hinweis darauf, dass die fadenförmigen epikutikulären Wachskristalle auf den Sprossen und den Blattstielen dieser Erscheinungsform von *Ricinus communis*-Sprossachsen hauptsächlich aus Lupeol bestehen.

Meist geht das Auftreten von Wachskristallen auf Pflanzenoberflächen mit dem Vorhandensein großer Mengen einer Substanzklasse bzw. einer einzelnen Verbindung im kutikulären Wachs einher (Jetter und Riederer 1994). Die Kristalle entstehen, sobald die Konzentration einer Substanz im Wachsgemisch einen bestimmten Schwellenwert überschreitet (Gülz *et al.* 1992). Dabei wird die Bildung von epikutikulären Wachskristallen als ein spontaner Prozess interpretiert, der entscheidend durch die molekularen Eigenschaften der im Wachsgemisch vorherrschenden Komponenten beeinflusst wird (Wen *et al.* 2006). Mehrere Daten aus der Literatur zeigen eine auffällige Korrelation zwischen hohen Triterpen-Anteilen im kutikulären Wachs und glauken Pflanzenoberflächen. Obwohl diese Untersuchungen eine morphologische Vielfalt an Triterpen-Kristallstrukturen offen-

---

baren, zeigen doch mehrere Beispiele, dass Triterpene generell eine Tendenz zur Bildung fadenförmiger Wachskristalle aufweisen, die in Form und Dimension denen auf Rizinus-Sprossoberflächen gleichen:

- (1) Die glauke Erscheinungsform von *Dudleya brittonii* (Crassulaceen), die durch fadenförmige epikutikuläre Wachskristalle verursacht wird, zeigt hohe Konzentrationen von  $\beta$ -Amyrinacetat im Wachsgemisch (Manheim und Mulroy 1978).
- (2) Die fadenförmigen Wachskristalle auf den Wedeln von Farnen der epiphytischen Gattung *Belvisia* werden durch das Triterpenoid Fernen gebildet (R. Jetter, unveröffentlichte Daten).
- (3) Die Sprossachsen der Ameisenpflanzen aus der Gattung *Macaranga* sind mit fadenförmigen Wachskristallen bedeckt. Bei allen bereiften *Macaranga*-Arten machen Triterpene mehr als 50% des Gesamtwachses aus (Markstädter *et al.* 2000).



**Abbildung 4-1:** Fadenförmige Wachskristalle auf Sprossachsenoberflächen von *Macaranga tanarius*. Die Kristalle bestehen aus dem Triterpen  $\beta$ -Amyrin (Guhling 2002).

Wichtige Kontrollversuche bei der Erforschung der Beteiligung einzelner Verbindungen an der Bildung von Wachskristallen stellen *in vitro*-Rekristallisationen von Lösungen entsprechender Reinsubstanzen dar. Bei solchen Untersuchungen konnte die spontane Ausbildung von Kristallen dokumentiert werden, die denen auf nativen Pflanzenoberflächen in Form, Größe und Anordnung zueinander sehr ähnlich sind (Meusel *et al.* 1999). Im Falle von Triterpenen ( $\beta$ -Amyrin, Taraxeron und Epitaraxerol) wurde bei *in vitro*-Rekristallisationen konsequenterweise die Bildung fadenförmiger Kristalle beobachtet (R. Jetter, unveröffentlichte Daten). Dieser Befund untermauert die These, dass sich hohe Triterpenanteile im kutikulären Wachs in der Ausbildung epikutulärer fadenförmiger Wachskristalle an der Kutikulaoberfläche äußern, wie sie als Folge der Lupeolanreicherung auf den Rizinus-Sprossoberflächen des Glaucous-Phänotyps entstehen.

Im Gegensatz zum deutlichen Unterschied im Triterpenprofil in beiden Sprossachsen-Erscheinungsformen zeigen die Rizinus-Phänotypen in der qualitativen Zusammensetzung ihres aliphatischen Wachsprofils durchaus Übereinstimmungen. VLC-Aliphaten sind jeweils in Form homologer Reihen von *n*-Alkanen, Aldehyden, primären Alkoholen, Fettsäuren und 1,3-Alkandiolen mit jeweils ähnlichen Kettenlängenverteilungen vertreten und ähneln damit dem aliphatischen Wachsprofil, das für *Ricinus communis*-Blattoberflächen beschrieben wurde (Vermeer *et al.* 2003). Lediglich 3-Hydroxyaldehyde lassen sich im Wachs 67 Tage alter Hypokotyle nicht nachweisen, im Gegensatz zu ihrem Vorkommen in der Blatt-Kutikula.



In der quantitativen Zusammensetzung ihrer aliphatischen Wachsbestandteile sind jedoch deutliche Unterschiede zwischen den Phänotypen erkennbar: Während bei Individuen des Glossy-Phänotyps Fettsäuren dominieren, stellen Aldehyde und *n*-Alkane die aliphatischen Hauptklassen bei Individuen des Glaucois-Phänotyps. Der niedrigere Anteil an freien VLC-Fettsäuren bei glauken Pflanzen könnte durch die Tatsache erklärt werden, dass ein großer Teil der VLC-Fettsäuren als Triterpenol-Ester gebunden wird. Solche Verbindungen konnten in entsprechenden Extraktionen zwar bei den massenspektrometrischen Untersuchungen detektiert, aufgrund ihres hohen Molekulargewichtes jedoch nicht quantitativ ausgewertet werden. Die Substanzklasse der primären Alkohole schließlich war in beiden Phänotypen in gleichen absoluten Mengen vertreten.

Die Unterschiede zwischen beiden Phänotypen bezüglich der VLC-aliphatischen Verbindungen demonstrieren, dass die Phänotypen nicht alleine durch eine drastisch unterschiedliche Triterpen-Biosynthese gekennzeichnet sind, sondern auch in ihrem aliphatischen Wachsprofil differieren. Der zweitgenannte Effekt ist möglicherweise auf eine differenzielle Regulation der verschiedenen aliphatischen Biosynthesewege zurückzuführen. Eine alternative Erklärung wäre, dass die quantitativen Unterschiede in den VLC-Aliphaten lediglich auf einer jeweils unterschiedlichen passiven Selbstorganisation der entsprechenden Substanzen in der Kutikula basieren. Welche der beiden Möglichkeiten zutrifft, kann auf der Grundlage der Daten nicht entschieden werden.

Die Rizinus-Phänotypen differieren in ihrer Wachszusammensetzung, wie in der vergleichenden chemischen Analyse gezeigt, sehr eklatant. Mit ihrer unterschiedlichen chemischen Zusammensetzung besonders in der Lupeolakkumulation stellen die Hypokotyle der beiden Phänotypen von *Ricinus communis* ein ideales Modellsystem zur Untersuchung der Biosyntheseregulation kutikulärer Triterpene auf molekularer Ebene dar.

#### **4.1.2 Die Schichtung der Kutikula bei *Ricinus communis***

Die Abhebeversuche an 67 Tage alten Rizinus-Hypokotylen zeigten, dass der größte Mengenanteil an kutikulärem Wachs bei beiden Sprossachsen-Phänotypen von *Ricinus communis* epikutikulär exponiert wird: ca. 95% des Gesamtwachses bei Individuen des Glossy-Phänotyps bzw. ca. 85% beim Glaucois-Phänotyp lassen sich als Ergebnis der mechanischen Abhebeversuche als epikutikuläres Wachs ansprechen. In der qualitativen Zusammensetzung ergeben sich beim Glaucois-Phänotyp kaum gravierende Unterschiede. Triterpene und im Besonderen Lupeol dominieren sowohl das intra- wie auch das epikutikuläre Wachsgemisch, wobei der relative Anteil an Lupeol im epikutikulären Wachs mit ca. 40% geringer ist als im intrakutikulären Wachs mit 55%. Dabei könnte es sich

---

allerdings um einen Artefakt-Effekt handeln: Bei den Abhebeversuchen wurden die Hypokotyle teilweise auch im untersten Bereich beprobt. Gerade hier war die Wachskristallschicht allerdings nicht mehr vollständig intakt, teils durch mechanischen Abrieb. Geht man davon aus, dass die Kristalle mehr Lupeol als die anderen Wachskompartimente (epikutikulärer Wachsfilm und intrakutikuläre Wachse) aufweisen, dürfte der Anteil an Lupeol am epikutikulären Wachsgemisch in oberen Sprossachsenbereichen, an denen der epikutikuläre Wachskristall-Überzug unbeschädigt bleibt, deutlich höher liegen.

Hohe relative Anteile von Triterpenen im intrakutikulären Wachs des Glaucous-Phänotyps führen dazu, dass in diesem bereits weitgehend mit zyklischen Verbindungen gesättigten Kompartiment VLC-aliphatische Verbindungen nur noch begrenzt eingelagert werden. Die größeren Quantitäten an Aliphaten akkumulieren demzufolge im epikutikulären Wachskompartiment.

Die epikutikuläre Akkumulation von Lupeol beim Glaucous-Phänotyp legt den Schluss nahe, dass die fadenförmigen epikutikulären Wachskristalle auf Sprossachsen und Blattstielen hauptsächlich aus Lupeol bestehen, und erhärtet somit die Schlussfolgerung, die bereits aus der chemischen Analyse des Gesamtwachses gezogen wurde. Neben Lupeol sind jedoch auch eine ganze Reihe anderer Verbindungen, darunter die VLC-Aliphaten, im epikutikulären Wachskompartiment vertreten. Nicht die gesamte Masse der epikutikulären Wachskomponenten ist den Kristallen zuzuordnen, da ein Teil der Substanzen im epikutikulären Wachsfilm lokalisiert ist, bzw. diesen Film bildet. Ein Teil der Stoffe, die zusätzlich zu Lupeol in der epikutikulären Wachsfraction der Individuen des Glaucous-Phänotyps angereichert sind, ist wohl im amorphen Film unmittelbar an der Außenseite der Kutinmatrix lokalisiert. Der andere Teil dieser Komponenten könnte neben dem dominierenden Bestandteil Lupeol ebenfalls in den epikutikulären Kristallen zu finden sein, da diese das wesentliche Volumen der epikutikulären Wachse ausmachen. Die vorliegende Analyse für die mechanisch präparierten Wachse stellt in jedem Fall eine direkte Evidenz für die Kristallzusammensetzung dar.

Eine ausgeprägte chemische Schichtung weist die Kutikula der Sprossachsen des Glossy-Phänotyps auf. Während die Zusammensetzung des epikutikulären Wachses hier durch die Dominanz von VLC-aliphatischen Verbindungen, allen voran von Fettsäuren mit 75%, bestimmt wird, können in der intrakutikulären Wachsmischung keine langkettigen Fettsäuren detektiert werden. Vielmehr wird das in die Kutinmatrix eingelagerte Wachs von hohen relativen Triterpen-Anteilen (40% des intrakutikulären Wachses) geprägt, daneben sind homologe Reihen von Aldehyden, *n*-Alkanen und primären Alkoholen vertreten.

---

In den vergangenen Jahren wurde durch die Entwicklung entsprechender Methoden, die allesamt auf einer Kombination von extraktiven Verfahren mit Techniken zur selektiven mechanischen Beprobung der epikutikulären Wachsbestandteile beruhen, für einige Pflanzenarten die quantitative Verteilung der kutikulären Wachse auf das epi- bzw. intrakutikuläre Kompartiment untersucht (Tab. 4-1). Dabei zeigte sich eine große Bandbreite an Verteilungen der Wachskomponenten auf die jeweiligen Kutikula-Kompartimente: Während bei Lorbeerkirsche und Tomate der überwiegende Teil der Wachse intrakutikulär eingelagert ist, wird bei Erbse und der Kannenpflanze *Nepenthes* der größte Teil der Wachse epikutikulär an der unmittelbaren Oberfläche exponiert. Auch die Zusammensetzung der jeweiligen Wachsgemische ist teilweise sehr unterschiedlich. So liegt beispielsweise das C<sub>30</sub>-Aldehyd Triacontanal im epikutikulären Wachs von *Nepenthes alata* in weit größeren relativen Mengen vor als im intrakutikulären Wachs, was letztlich zur Identifizierung dieser Komponente als Hauptkristallbildner in den Kannen führte.

**Tabelle 4-1:** Bisherige Untersuchungen zur chemischen Schichtung der pflanzlichen Kutikula unter besonderer Berücksichtigung kutikulärer Triterpene.

Pflanzenart	untersuchte Oberfläche	Epikutulärer Wachsanteil [% Gesamtwachs]	Triterpenanteil [% Gesamtwachs]	Triterpene nur intrakutikulär angereichert	Referenz
<i>Pisum sativum</i>	Blattoberseite	75	--		Gniwotta <i>et al.</i> 2005
<i>Taxus baccata</i>	Nadelunterseite	55	--		Wen <i>et al.</i> 2006
<i>Prunus laurocerasus</i>	Blattoberseite	45	20	X	Jetter <i>et al.</i> 2000
<i>Nepenthes alata</i>	Kanneninnenseite	65	1	X	Riedel <i>et al.</i> 2003
<i>Lycopersicon esculentum</i>	Frucht	30	20	X	Vogg <i>et al.</i> 2004
<i>Macaranga tanarius</i>	Blattoberseite	85	15	X	Guhling <i>et al.</i> 2005
<i>Macaranga tanarius</i>	Blattstiel	85	85		Guhling 2002
<i>Ricinus communis</i> Glossy-Phänotyp	Sprossachse	95	2	X	
<i>Ricinus communis</i> Glaucous-Phänotyp	Sprossachse	85	70		

Bei *Ricinus communis* korreliert das epikutuläre Vorkommen von Lupeol auf Sprossachsen des Glaucous-Phänotyps mit großen Mengenanteilen dieser Substanzen im Gesamt- wie auch im intrakutikulären Wachs. Ist Lupeol dagegen nur mit geringeren Mengen im Gesamtwachs vertreten, wie dies beim Glossy-Phänotyp der Fall ist, wird diese

Verbindung nicht epikutikulär exponiert, sondern fast ausschließlich als intrakutikuläre Wachskomponente in die Kutin-Matrix eingelagert. Hier bestimmen große Mengen an unpolaren Fettsäuren die epikutikuläre Wachsmischung.

Das Phänomen, dass Triterpene im intrakutikulären Kompartiment angereichert werden und nur dann in größeren Mengen epikutikulär in Erscheinung treten, wenn sie die dominierende Substanzklasse im Gesamtwachs stellen, lässt sich auch bei anderen Pflanzenarten beobachten. Eine ausgeprägte intrakutikuläre Anreicherung von Triterpenen wurde für Blattoberflächen von *Prunus laurocerasus* und *Macaranga tanarius* sowie für Früchte von *Lycopersicon esculentum* ermittelt (Tab. 4-1). In allen drei Fällen überschreitet der Mengenanteil der Triterpene am Gesamtwachs dabei nicht 20%. Im Falle von *Macaranga tanarius*-Blattstielen dagegen ist das Triterpenol  $\beta$ -Amyrin in großen Mengen im Gesamtwachs vertreten und findet sich dementsprechend in hohen relativen Anteilen im intra-, aber auch im epikutikulären Wachs.

Es stellt sich die Frage, ob die unterschiedliche Zusammensetzung epi- und intrakutikulärer Wachse, also die Differenzierung innerhalb der Kutikula bezüglich der Zusammensetzung ihrer Wachskomponenten, aktiv von der Pflanze gesteuert wird oder rein passiv zustande kommt. Grundsätzlich wäre denkbar, dass die unterschiedliche chemische Zusammensetzung der Kutikula-Kompartimente, durch eine Bildung der verschiedenen Schichten vermittelt, über die zeitlich gestaffelte Einlagerung der einzelnen Verbindungen im Laufe der Ontogenese zustande kommt. Im Falle von *Prunus laurocerasus*-Blättern, bei denen epikutikulär ausschließlich VLC-aliphatische Verbindungen exponiert werden, während intrakutikulär Triterpene angereichert vorliegen, würde dieser Erklärungsansatz bedingen, dass im Laufe der Blattentwicklung zuerst die aliphatischen Komponenten zum epikutikulären Wachsfilm akkumulieren und danach erst die Triterpene in der tiefer liegenden intrakutikulären Schicht eingelagert werden. In entsprechenden Untersuchungen wurde jedoch gezeigt, dass die epikutikuläre Wachszusammensetzung im Laufe der Blattentwicklung ständigen Veränderungen unterliegt, während die intrakutikuläre Wachszusammensetzung mit den hohen Triterpenanteilen bereits sehr früh ausgeprägt wird und konstant bleibt (Jetter und Schäffer 2001). Bei *P. laurocerasus*-Blättern ist die chemische Schichtung in der Kutikula demnach nicht eine Folge der zeitlich hintereinander gereihten Ablagerung einzelner Verbindungen/Verbindungsklassen im Laufe der Entwicklung, sondern vielmehr als Folge der Diffusion und der spontanen räumlichen Trennung der Stoffe zu interpretieren.

Möglicherweise zeigen Triterpene auf Grund ihrer besonderen Molekülgeometrie und vor allem ihrer Polarität eine höhere Affinität zu Kutin als die weniger polaren VLC-aliphatischen Verbindungen und bleiben deshalb in der Kutikularmembran gebunden, während die aliphatischen Wachsbestandteile vermehrt epikutikulär angereichert werden. Erst wenn eine bestimmte Menge an Triterpenen in Form eines Schwellenwertes überschritten wird und in

das intrakutikuläre Kompartiment keine weiteren Mengen mehr eingelagert werden können, gelangen diese Substanzen an die Kutikulaoberfläche. Aus den bisher veröffentlichten Daten kann als Anhaltspunkt für eine quantitative Bestimmung dieses Schwellenwertes abgeleitet werden: Zu einer nennenswerten epikutikulären Anreicherung von Triterpenen kommt es nur dann, wenn der Triterpenanteil am Gesamtwachs die Menge der intrakutikulär lokalisierten Wachsmenge überschreitet. Entsprechend finden sich im epikutikulären Wachs von Früchten der transgenen *lecer6*-Transposon-Mutante von *Lycopersicon esculentum* keine Triterpen-Verbindungen, obwohl der Triterpenanteil am Gesamtwachs mit 40% beträchtlich ist (Vogg *et al.* 2004); bei Tomatenfrüchten sind nämlich 70% der Wachskomponenten intrakutikulär verortet (s. Tab. 4-1), so dass die Triterpenmenge in diesem Fall also nicht ausreicht, um das intrakutikuläre Kompartiment zu sättigen und damit den Schwellenwert für eine epikutikuläre Anreicherung zu erreichen.

Zur spontanen Bildung von Triterpen-Wachskristallen an der Oberfläche dürfte es vermutlich erst dann kommen, wenn der Anteil der kristallbildenden Triterpen-Komponente(n) im epikutikulären Wachsgemisch einen weiteren Schwellenwert überschreitet, wie im Falle von Lupeol bei glauken *Ricinus*-Sprossachsen. Dabei bleibt unklar, ob bei diesem zweiten Schwellenwert die absolute Menge der kristallbildenden Substanz oder ihr relativer Anteil am epikutikulären Wachs die entscheidende Größe darstellt, oder ob eine Kombination beider Faktoren Voraussetzung für die spontane Kristallbildung ist. Entsprechende Daten von *R. communis* und *M. tanarius* liegen jeweils zwischen 40% und 64% bzw. 23 und 11  $\mu\text{g cm}^{-2}$ .

Eine weitere Fragestellung bezieht sich auf die Bedeutung einer unterschiedlichen Zusammensetzung epi- und intrakutikulärer Wachse für mögliche physiologische oder ökologische Funktionen einer solchen Schichtung. Kutikuläre Wachse bilden die Hauptbarriere für den Transport von Wasser durch die Kutikula (Riederer und Schreiber 1995). Obwohl sich zahlreiche Untersuchungen in der Vergangenheit zum Ziel gesetzt haben, Zusammenhänge zwischen der Struktur der Kutikula und ihren Eigenschaften bezüglich des Transpirationsschutzes herzustellen, konnten entsprechende allgemeingültige Regelmäßigkeiten nicht hinreichend abgeleitet werden. Eine Korrelation zwischen der quantitativen und qualitativen Wachszusammensetzung oder der Dicke der Kutikula mit ihrer Durchlässigkeit für Wasser konnte beispielsweise bislang nicht experimentell nachgewiesen werden (Riederer und Schreiber 2001). Die selektive Entfernung epikutikulärer Wachse bei Früchten von *Prunus avium* zeigte, dass die epikutikulären Wachse 72% zum Widerstand für die Permeabilität von Wasser durch die Kutikula hindurch beitragen (Knoche *et al.* 2000). Im Gegensatz dazu wurden jedoch an Tomatenfrüchten Daten ermittelt, die darauf hindeuten, dass das intrakutikuläre Kompartiment deutlich mehr zur Transpirationsbarriere-Eigenschaft beiträgt als die epikutikulären Wachse (Vogg *et al.* 2004). Aus der Reduzierung der Anteile

---

von VLC-aliphatischen Wachsverbindungen um 50% im Gesamtwachs bei der Tomaten-Mutante *lecer6* resultierte eine vierfach erhöhte Wasserpermeabilität der Kutikula (Vogg *et al.* 2004).

Der momentane Forschungsstand führt zu der Hypothese, dass die kutikulären Barriere-eigenschaften zum größten Teil den VLC-aliphatischen Wachsbestandteilen zuzusprechen sind, die durch die Ausbildung kristalliner Strukturen - sei es in Form epikutikulärer Wachskristalle oder kristalliner Bereiche im epikutikulären Wachsfilm bzw. im intrakutikulären Kompartiment - eine Permeation von Wassermolekülen verhindern. Vermutlich könnte eine reduzierte Einlagerung zyklischer Wachsbestandteile wie Triterpene im epikutikulären Wachsbestandteil, die gleichzeitig eine Anreicherung von langkettigen aliphatischen Verbindungen nach sich zieht, den Anteil hochgeordneter, kristalliner Bereiche langkettiger Verbindungen in der oberflächennahen Kutikulaschicht erhöhen. Dies würde letztlich zu einer Optimierung des Transpirationsschutzes durch die Kutikula beitragen.

Daneben könnte die chemische Schichtung ökologische Bedeutung im Zusammenhang mit der Erkennung spezifischer Pflanzenoberflächen durch Insekten und phytotrope Pilze (Jetter *et al.* 2000), oder aber in speziellen Fällen als Schutz vor Herbivoren durch die Schaffung rutschiger Oberflächen haben (siehe 4.1.4).

#### **4.1.3 Dynamik der kutikulären Wachszusammensetzung während früher Stadien der Hypokotyl-Entwicklung**

Um ein tieferes Verständnis für die Dynamik der Wachsbiosynthese während der frühen Entwicklungsphase der Sprossachsen zu erhalten, wurde neben den chemischen Analysen zusätzlich das Wachstum und die Ausdehnung der Hypokotyloberflächen der Individuen vermessen, indem Länge und Durchmesser der Hypokotyle während der ersten 70 Tage aufgenommen wurden (n=28). Die entsprechenden Rohdaten wurden von Frau Barbara Hobl im Rahmen ihrer Diplomarbeit, die in enger Kooperation mit der vorliegenden Arbeit entstand, ermittelt (Hobl 2005) und werden im Folgenden zusammengefasst und interpretiert.

Zwischen beiden Kutikula-Phänotypen konnten keine Unterschiede im Wachstum der Hypokotyle festgestellt werden; die Daten wurden deshalb einheitlich ausgewertet. Das Längenwachstum der Hypokotyle ist bereits nach zwölf Tagen weitgehend abgeschlossen, die Sprosslänge nimmt ab diesem Zeitpunkt nur noch sehr geringfügig zu und bleibt danach konstant zwischen ca. 13 und 14 cm (Abb. 4-2A). Das Dickenwachstum der Hypokotyle steigert sich dagegen von Beginn bis zum Ende des Messzeitraums linear mit gleichbleibender Rate von 2 mm auf 9 mm. Durch die Kombination der beiden Größen lässt sich die Zunahme der gesamten Hypokotyloberfläche während der frühen Entwicklungsphase ermitteln. Diese Zunahme wird in zwei Phasen untergliedert, repräsentiert durch lineare Regressionsgeraden, von der jede die Wachstumsrate während der jeweiligen

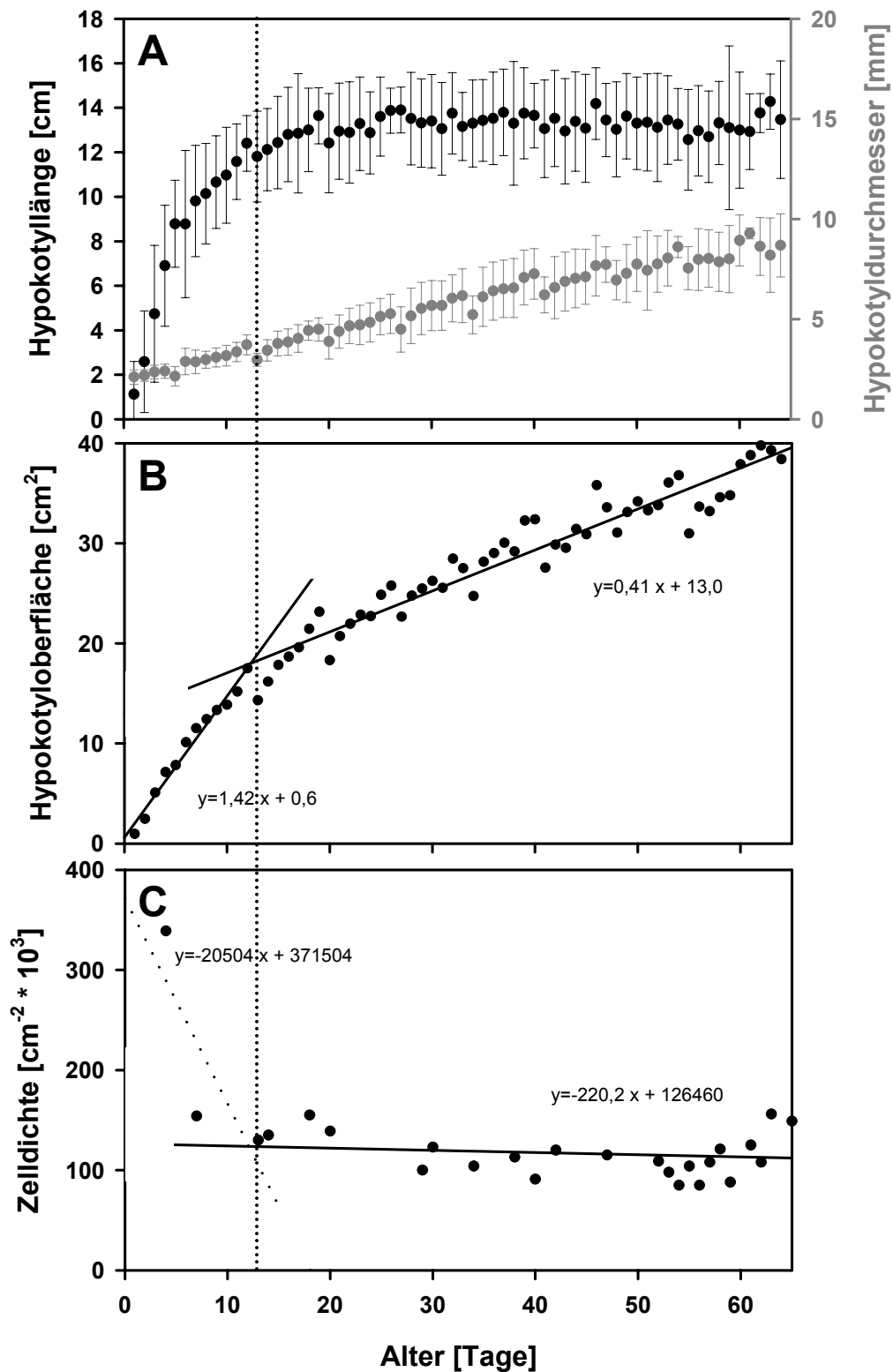
---

Wachstumsphase wiedergeben soll (Abb. 4-2B). Daraus ergibt sich eine Flächenzunahme von ca.  $140 \text{ mm}^2 \text{ d}^{-1}$  bis zum Tag 12, danach eine tägliche Zunahme von ca.  $40 \text{ mm}^2$ .

Zusätzlich zu den Beobachtungen zur Flächenzunahme erfolgte durch Frau Hobl eine mikroskopische Untersuchung der Zelldichte im Laufe der Hypokotylentwicklung mit Hilfe von Nagellackabdrücken. Dadurch sollten Anhaltspunkte gewonnen werden, ob das Wachstum durch Zellstreckung, Zellteilung, oder durch eine Kombination aus beiden Prozessen erfolgte. Die epidermale Zelldichte des Hypokotyls liegt zu Beginn der Entwicklung am Tag 6 bei über  $350\,000 \text{ Zellen cm}^{-2}$ , nimmt jedoch sehr bald ab und pendelt sich nach wenigen Tagen auf einen Wert zwischen  $80\,000$  und  $150\,000 \text{ Zellen cm}^{-2}$  ein. Auch bei der Entwicklung der Zelldichte lässt sich also eine sehr frühe Entwicklungsphase von einer zweiten Phase abgrenzen, graphisch wiederum durch zwei Regressionsgeraden angedeutet (Abb. 4-2C). Diese Beobachtung wird hier dahingehend interpretiert, dass der Vorgang des Hypokotyl-Längenwachstums im Wesentlichen durch ein longitudinales Streckenwachstum der Zellen bewerkstelligt wird. Die Dickenzunahme der Hypokotyle dagegen resultiert aus einer mehr oder minder kontinuierlichen Zellteilung. Leider wurden während des frühesten - und damit für unsere Fragestellung interessantesten - Zeitraums zu wenige Daten zur Zelldichte erhoben, so dass diese Interpretation durch weitere Untersuchungen stichhaltig untermauert werden müsste.

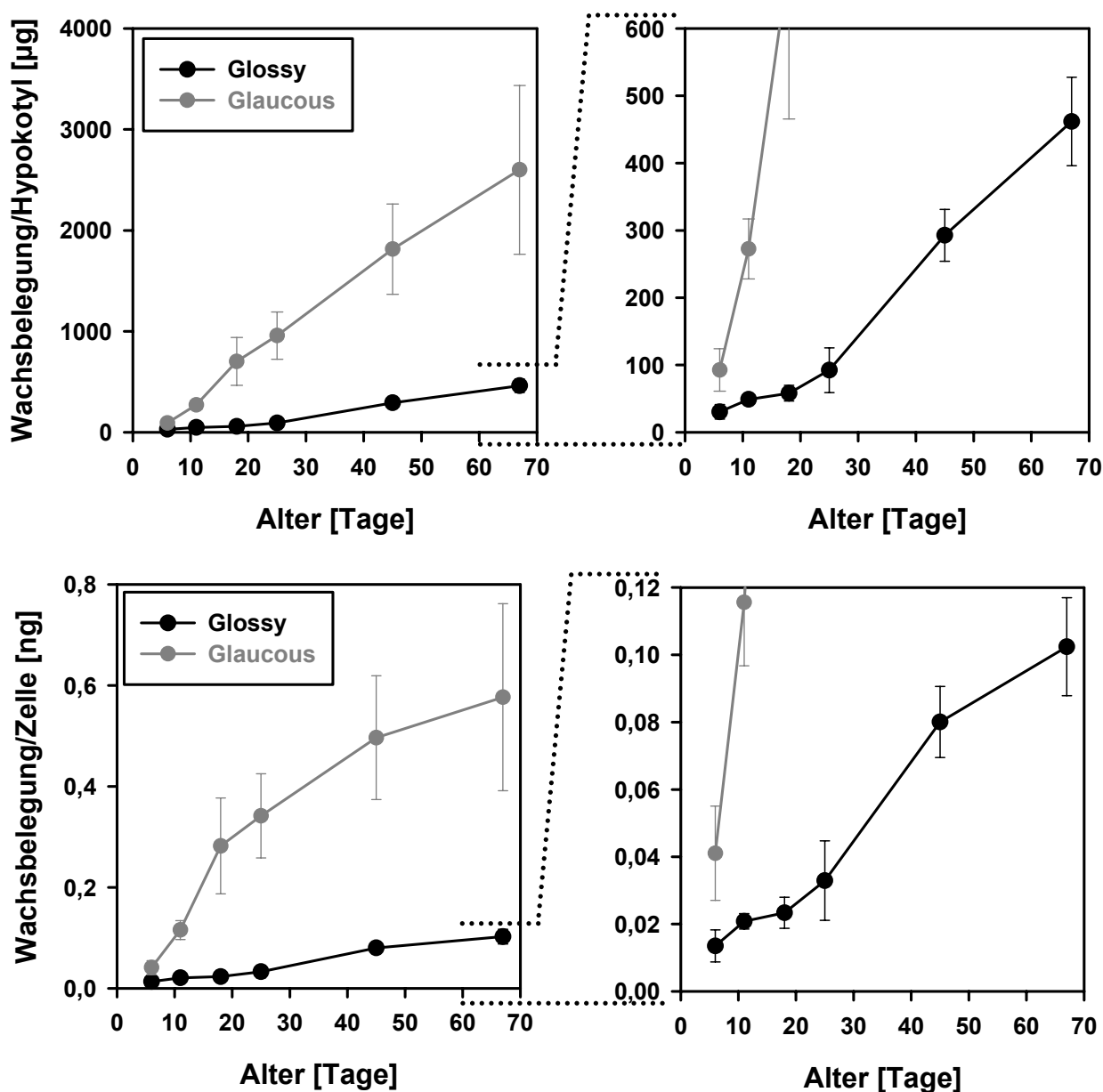
Aus den ermittelten Daten der Hypokotyloberfläche bzw. der Zelldichte lassen sich nun Werte für die Wachsbelegung pro Hypokotyl beziehungsweise Wachsbelegung pro Epidermiszelle im Laufe der frühen Hypokotylentwicklung ableiten (Abb. 4-3). Beim Glossy-Phänotyp setzt eine wesentliche Zunahme der Wachsbelegung erst nach Tag 25 ein; bis zu diesem Zeitpunkt nimmt die Belegung pro Hypokotyl lediglich von  $30$  auf  $90 \mu\text{g}$  zu. Zwischen Tag 25 und Tag 67 verfünffacht sich die Menge an Wachskomponenten schließlich auf  $460 \mu\text{g/Hypokotyl}$ . Ein ähnliches Bild ergibt sich bei der Kalkulation der Wachsbelegung pro Epidermiszelle. Auch hier nimmt die Wachsbelegung zunächst nur mäßig zu (von ca.  $0,01 \text{ ng/Zelle}$  an Tag 6 auf ca.  $0,03 \text{ ng/Zelle}$  an Tag 25), bevor sie bis auf etwa  $0,1 \text{ ng/Zelle}$  an Tag 67 ansteigt. Beim Glaucous-Phänotyp dagegen lässt sich bereits zwischen Tag 6 und 25 ein starker Anstieg der Wachsbelegung beobachten: sie steigt mit einer täglichen Rate von  $45 \mu\text{g pro Hypokotyl}$  von  $90$  auf  $960 \mu\text{g/Hypokotyl}$ . Mit  $40 \mu\text{g pro Hypokotyl und Tag}$  lässt sich zwischen Tag 25 und 67 eine ähnliche Zunahme des Gesamtwachses feststellen, bis die Wachsbelegung auf  $2,6 \text{ mg/Hypokotyl}$  ansteigt. Die Wachsbelegung pro Epidermiszelle verachtfacht sich im frühen Zeitintervall zwischen Tag 6 und 25 von  $0,04 \text{ ng/Zelle}$  auf  $0,34 \text{ ng/Zelle}$ , während sie sich zwischen Tag 25 und Tag 67 nicht einmal verdoppelt. Die Biosyntheserate kutikulärer Wachsverbindungen dürfte demnach beim Glaucous-Phänotyp in der frühen Phase der Hypokotylentwicklung gegenüber der späteren Entwicklungsphase deutlich erhöht sein.

---



**Abbildung 4-2:** Wachstumsbeobachtungen an Hypokotylen von *Ricinus communis* in der frühen Entwicklungsphase. Die gestrichelte Linie markiert das Ende des Hypokotyl-Längenwachstums. **A:** Längen- und Dickenwachstum. **B:** Hypokotyloberfläche. Die Geraden (lineare Regression) repräsentieren die durchschnittliche Entwicklung der Hypokotyloberfläche vor und nach Beendigung des Längenwachstums. **C:** Zelldichte. Auch hier markieren lineare Regressionsgeraden die durchschnittliche Entwicklung der Zelldichte.

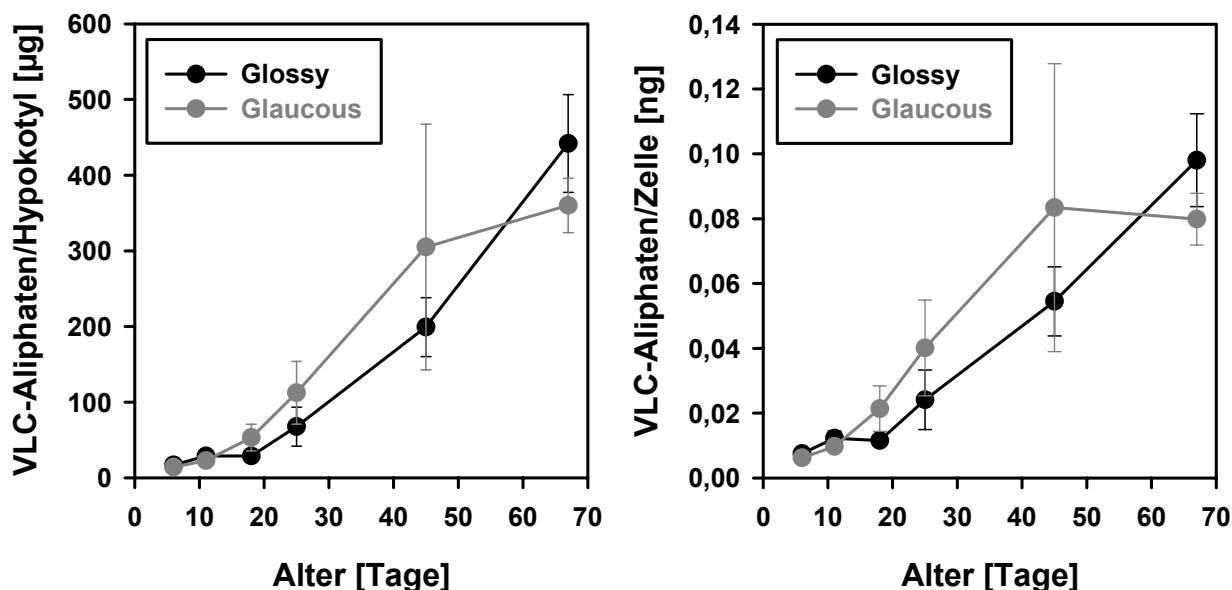




**Abbildung 4-3:** Akkumulation kutikulärer Wachse pro Hypokotyl bzw. pro Epidermiszelle in den ersten 67 Tagen der Hypokotylenentwicklung.

In beiden Rizinus-Stammphänotypen lässt sich ein wesentlicher Anstieg der Akkumulation von VLC-aliphatischen Verbindungen pro Flächeneinheit erst nach Tag 18 beobachten (Abb. 4-4). Dabei scheint die Einlagerung der Aliphaten bei Hypokotylen des Glaucous-Phänotyps etwas früher einzusetzen als beim Glossy-Phänotyp. In dem Zeitintervall, in dem die Oberflächenzunahme wesentlich auf das Längenwachstum der Hypokotyle bzw. auf Zellstreckung zurückzuführen ist, bleibt die Wachsbekleidung pro Epidermiszelle weitgehend konstant. Erst danach wird durch eine erhöhte Biosyntheserate aliphatischer Stoffe die Einlagerung dieser Verbindungen in die Kutikula der Zellen erhöht. In der Akkumulation der aliphatischen Stoffe spiegelt sich der Effekt wieder, der oben bei der Gesamtwachsbelegung beim Glossy-Phänotyp beschrieben wurde, da die chemische

Zusammensetzung des kutikulären Wachses hier von VLC-aliphatischen Verbindungen dominiert wird.

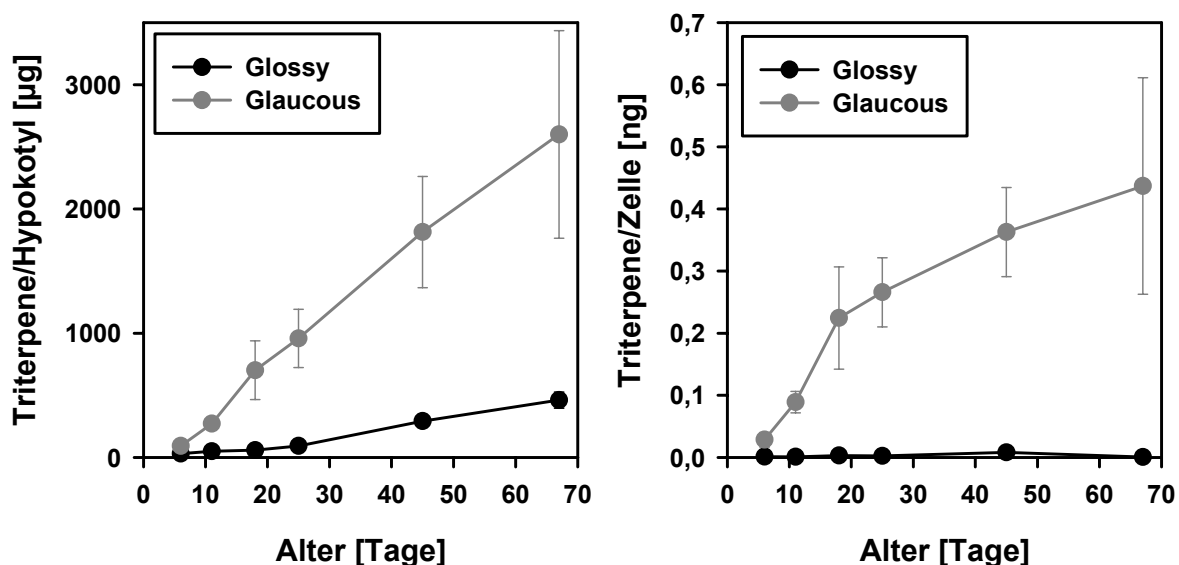


**Abbildung 4-4:** Akkumulation der VLC-aliphatischen Verbindungen im kutikulären Wachs pro Hypokotyl bzw. pro Epidermiszelle in den ersten 67 Tagen der Hypokotylientwicklung.

Während der frühen Sprossachsenentwicklung kann eine Veränderung im Homologenmuster der einzelnen Verbindungsklassen beobachtet werden: Fettsäuren mit kürzeren Kettenlängen akkumulieren nur bis zum Tag 6 (Glossy) bzw. Tag 18 (Glaucous), gefolgt von der Ausbildung eines Maximums bei  $C_{30}$  in der darauffolgenden Entwicklungsphase. Bei Aldehyden und primären Alkoholen zeichnet sich ein ähnliches Bild ab. Auch die Substanzklasse der *n*-Alkane zeigt eine Verschiebung von kürzeren hin zu längeren homologen Verbindungen im Laufe der frühen Sprossentwicklung, so dass sich ab Tag 67 ein klares Nonacosan-Maximum ausbildet. Ähnliche Verschiebungen in der Kettenlängenverteilung aliphatischer Wachskomponenten während der Pflanzenentwicklung wurden bei entsprechenden Untersuchungen an *Prunus laurocerasus* beobachtet (Jetter und Schäffer 2001). Die auch bei *Arabidopsis thaliana* beobachtete generelle Tendenz zur Akkumulation längerer Kettenlängenhomologe im kutikulären Wachs im Laufe der Organentwicklung (Jenks *et al.* 1996) konnte also bei *Ricinus communis*-Sprossachsen bestätigt werden.

Im Gegensatz zu den VLC-aliphatischen Verbindungen setzt die Triterpen-Akkumulation pro Flächeneinheit bereits in einer sehr frühen Entwicklungsphase der Individuen des Glaucous-Phänotyps ein. Während Triterpene im Glaucous-Phänotyp im Laufe von 67 Tagen nach der Keimung auf eine absolute Menge von ca. 2600 µg/Hypokotyl im kutikulären Wachs akkumulieren, bleibt die Menge an Triterpenen im kutikulären Wachs des Glossy-Phänotyps mit 450 µg/Hypokotyl weitaus geringer (Abb. 4-5). Beim Glaucous-Phänotyp

Phänotyp nimmt die Triterpen-Wachsbelegung vor dem Tag 25 mit einer Rate von  $1,3 \mu\text{g cm}^{-2} \text{d}^{-1}$  zu, bevor die Zunahmerate im nachfolgenden Zeitraum auf  $0,4 \mu\text{g cm}^{-2} \text{d}^{-1}$  abnimmt. Zwischen Tag 6 und Tag 25 nimmt die Triterpeneinlagerung also um das 4,5-fache zu, während sich im Zeitraum danach nur eine 1,5-fache Zunahme beobachten lässt. Bezogen auf die Belegung pro Epidermiszelle lässt sich zwischen Tag 11 und 18 die höchste tägliche Triterpen-Zunahme mit  $0,019 \text{ ng pro Zelle}$  beobachten (Abb. 4-5). Auf die Akkumulation der Triterpen-Hauptkomponente Lupeol sowie anderer Triterpene wird in 4.2.2.2 gesondert eingegangen.



**Abbildung 4-5:** Triterpen-Akkumulation im kutikulären Wachs pro Hypokotyl bzw. pro Epidermiszelle in den ersten 67 Tagen der Hypokotylenentwicklung.

Während die chemischen Analysen mit sechs Tage alten Pflanzen begonnen wurden, da sich erst in diesem Alter eine sichere Zuordnung über das makroskopische Erscheinungsbild der jeweiligen Versuchspflanzen zu einem bestimmten Sprossachsen-Phänotyp gewährleisten ließ, konnten rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen auch mit jüngeren Pflanzen durchgeführt werden. Es zeigte sich, dass bereits am ersten Tag, an dem Pflanzen vom Glaucous-Phänotyp das Substrat durchbrechen, schon Bereiche mit Wachsaufgaben existieren, aus denen die ersten Anlagen von Kristallen herausragen (Hobl 2005). Nach drei Tagen sind lange fadenförmige Kristalle auf der Hypokotyloberfläche des Glaucous-Phänotyps auszumachen, die bereits teilweise miteinander verschlungen sind. Die Belegung der Hypokotyloberflächen mit den epikutikulären Wachskristallen wird ab Tag 6 immer dichter, an Tag 25 ist bereits ein dreidimensionales Netzwerk aus fädigen Kristallstrukturen erkennbar. Die REM-Aufnahmen bestätigen damit die chemischen Untersuchungen bezüglich einer sehr frühen Akkumulation des kristallbildenden Triterpens Lupeol.

Übereinstimmend mit dem Befund bei Rizinus-Pflanzen finden sich im kutikulären Wachs von Tomatenfrüchten in einem frühen Entwicklungsstadium hohe Triterpenanteile, während im Laufe des Reifungsprozesses der Früchte die prozentualen Triterpenanteile sinken und aliphatische Substanzklassen überwiegen (Bauer *et al.* 2004). Darüber hinaus ließen sich bereits acht Tage nach dem Knospenbruch von *Prunus laurocerasus*-Blättern hohe Triterpenkonzentrationen im intrakutikulären Wachs der Kutikula nachweisen (Jetter und Schäffer 2001). Diese Beobachtungen könnten eine allgemeine Tendenz für eine erhöhte Triterpen-Biosynthese verbunden mit einem raschen Transport dieser Verbindungen zur Kutikula zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Ontogenese widerspiegeln. Obwohl die Biosynthese anderer kutikulärelevanter Stoffklassen wie VLC-Aliphaten ebenfalls früh in der Entwicklung starten muss, scheint dies kontinuierlicher und in niedrigeren Raten über den gesamten Entwicklungszeitraum hin zu geschehen, als es bei der Triterpen-Biosynthese und der Einlagerung zyklischer Verbindungen in die Kutikula der Fall ist.

#### 4.1.4 Die Biosynthese von kutikulärem Lupeol bei *Ricinus communis* im ökologischen Kontext – das „Greasy-pole-Syndrom“

Die auffällige Ausprägung eines wachsbereiften *Ricinus communis*-Sprossachsen-Phänotyps, der durch die verstärkte Biosynthese des Triterpenols Lupeol verursacht wird, wirft zwangsläufig die Frage nach der Funktion einer solchen Wachsbereifung auf. Einen möglichen Anknüpfungspunkt für eine entsprechende Interpretation in einem ökologischen Kontext liefert ein Phänomen, das bei nah verwandten Pflanzen aus der gleichen Unterfamilie (Acalyphoideae) beobachtet werden kann. An der myrmekophytischen Pflanzengattung *Macaranga* nämlich konnte gezeigt werden, dass epikutikuläre Wachskristalle auf vertikalen Pflanzenorganen - ähnlich wie bei der Gattung *Ricinus* handelt es sich um fadenförmige Kristalle, die aus Triterpenen bestehen (Markstädter *et al.* 2000) - durch ihre Rutschigkeit als mechanische Barriere für generalistische Ameisen dienen (Federle *et al.* 1997).

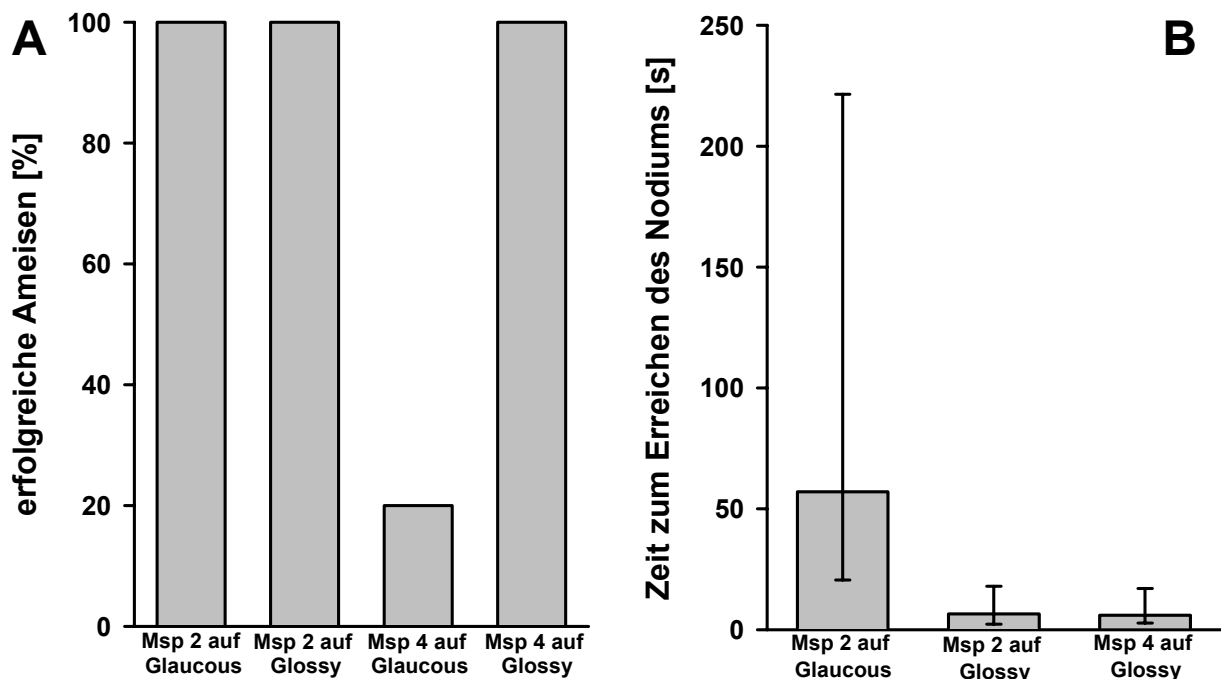
Um zu überprüfen, ob die bereiften Sprossoberflächen der Glaucous-Individuen von *Ricinus communis* einen rutschigen Effekt auf generalistische Ameisen bzw. Partnerameisen der Gattung *Crematogaster* haben, die in der Natur mit *Macaranga*-Arten vergesellschaftet sind, wurden entsprechende Lauftests von Frau Hobl im Rahmen eines Kurzpraktikums am Institut für Zoologie II der Universität Würzburg durchgeführt. Die Ergeb-



**Abbildung 4-6:** *Crematogaster* (*Decacrema*) Msp. 4 auf der wachskristallfreien Fläche einer Rizinuspflanze des Glaucous-Phänotyps.

nisse dieser Versuche sollen im Folgenden dargestellt werden. Als Wachsläufer-Ameisen wurde für die Versuche *Crematogaster (Decacrema)* Msp 2, als Nichtwachsläufer-Ameisen *Crematogaster* Msp 4 verwendet. Auf der Sprossoberfläche von Glaucous- sowie Glossy-Individuen wurden jeweils in der Mitte eines Internodiums die Wachskristalle bzw. der Wachsfilm abgerieben und auf dieser wachsfreien Fläche die Ameisen abgesetzt (Abb. 4-6).

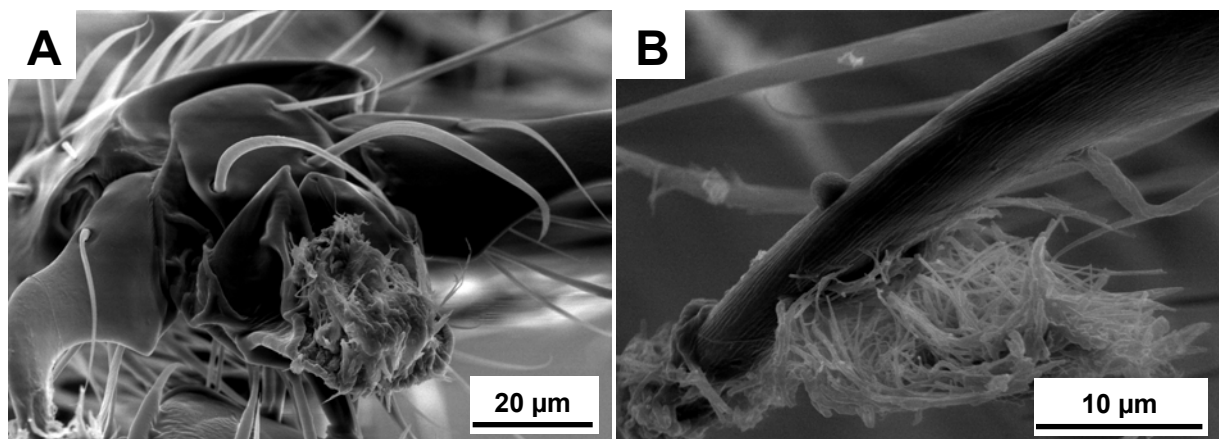
In den nun folgenden Lauffests wurden als „erfolgreiche“ Ameisen diejenigen Individuen gezählt, die in der Lage waren, innerhalb eines Zeitraums von 10 min das nach oben oder nach unten nächstgelegene Nodium (jeweils 3-4 cm) zu erreichen. Als „nicht erfolgreich“ wurden diejenigen Ameisen kategorisiert, die vor dem Erreichen des Nodiums von der Sprossachse abgefallen waren oder den wachskristallfreien Bereich während der Messzeit nicht verlassen hatten. Während sich auf den Oberflächen der Glossy-Individuen alle Ameisen frei bewegen konnten, zeigten sich bei den Versuchen auf Glaucous-Individuen deutliche Unterschiede zwischen den Ameisen der Morphospezies 2 und 4. Die meisten Individuen der Nichtwachsläufer-Ameisen (Msp. 4) fanden bereits nach meist sehr kurzen Strecken keinen Halt mehr an den Sprossachsen und stürzten ab. Dagegen war es den Wachsläufer-Ameisen möglich, scheinbar ohne Probleme über die wachsbereifte Oberfläche zu laufen (Abb. 4-7A). Wachsläufer konnten demnach hoch signifikant besser auf der kristallbereiften Oberfläche von *R. communis* laufen als die Nichtwachsläufer-Ameisen (Fishers exakter Test:  $p < 0,001$ ). Allerdings waren sie auf der wachsbereiften Oberfläche um viele Sekunden langsamer als auf der Oberfläche der Glossy-Pflanzen (Abb. 4-7B).



**Abbildung 4-7:** Ergebnisse der Lauffests mit Wachsläufern sowie Nichtwachsläufern der Gattung *Crematogaster* auf beiden Sprossachsen-Phänotypen von *Ricinus communis*. **A:** erfolgreiche Ameisen beim Erreichen des nächsten Nodiums (jeweils  $n=15$ ). **B:** Zeit bis zum Erreichen des Nodiums (angegeben sind Median mit 1. und 3. Quartile).

Die Untersuchungen zeigen, dass die Ausbildung einer epikutikulären Wachskristallschicht auf den Sprossachsen von glauken Rizinus-Pflanzen tatsächlich eine Rutschigkeit für Insekten bewirkt. Darüber hinaus wird von diesen Sprossoberflächen eine Umgebung kreiert, die der Situation an Sprossachsen von obligat myrmekophytischen *Macaranga*-Arten entspricht, obwohl es sich bei dem kristallbildenden Triterpen um Lupeol und nicht um Taraxeron oder Epitaraxerol handelt.

Einige der Versuchstiere wurden für rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen direkt nach den Lauffests betäubt, fixiert, gefroren und getrocknet. An den Tarsen der Wachsläufer-Arten waren bei den anschließenden mikroskopischen Untersuchungen keine Kristallstrukturen erkennbar. An den Tarsen der Nichtwachsläufer-Ameisen fanden sich dagegen Strukturen, die den epikutikulären Wachskristallen auf glauken Rizinusoberflächen ähnlich sahen. Darüber hinaus waren vor allem an den Haftblasen sehr viele Kristalle nachzuweisen, die hier den Anschein hatten, etwas angelöst zu sein (Abb. 4-8). Auch an den Krallen des hinteren Beinpaars fanden sich Kristalle, die noch das Aussehen der nativen Kristalle auf der Pflanzenoberfläche hatten, also vermutlich nicht abgelöst, sondern abgerissen worden waren. Bei einer rasterelektronenmikroskopischen Betrachtung von „begangenen“ Pflanzenoberflächen von *Ricinus communis* des Glaucous-Typs waren sehr vereinzelt runde oder ovale Abdrücke zu erkennen, die als „Spuren“ der Ameisen interpretiert wurden. Dabei schienen hier die Kristallfäden eher angedrückt als abgerissen zu sein.



**Abbildung 4-8:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Haftstrukturen einer Nichtwachsläufer-Ameise nach dem Lauffest auf einem Individuum des Glaucous-Phänotyps von *Ricinus communis*. **A:** Tarse mit verklebten Wachskristallen auf dem Haftlappen. **B:** Kralle mit anhaftenden Wachskristallen.

Ameisen verwenden zum Laufen auf rutschigen Oberflächen neben den stark sklerotisierten Krallen spezielle Haftorgane, die sich am Ende jedes Tarsus zwischen den beiden Krallen befinden und den Kontakt zum Substrat durch oberflächenaktive Ausscheidungen optimieren, indem diese Substanzen die Kräfte zwischen Insektenfuß und Substrat durch molekulare Adhäsion und die Oberflächenspannung eines dünnen Flüssigkeitsfilms vermitteln (Federle *et al.* 2001). Möglicherweise entscheidet die Zusammensetzung dieser Haftflüssigkeit über die Fähigkeit einer Ameisenart, auf wachsbereiften Oberflächen laufen zu können. Unklar ist allerdings, ob Ameisen aufgrund der hydrophoben Eigenschaft der epikutikulären Wachse bei dem Versuch, mit Hilfe der Haftflüssigkeit an vertikalen Pflanzenoberflächen zu haften, ausrutschen, oder ob die Kristalle abreißen und dabei die Haftorgane der Ameisen verkleben.

Eventuell werden bei *Crematogaster* Msp 4 durch die von der Haftblase abgegebene Haftflüssigkeit Wachskristalle von der Rizinus-Sprossachsenoberfläche abgelöst und verkleben daraufhin das Haftorgan. Das Insekt verliert den Halt und stürzt ab. Die Wachsläufer-Ameisen dagegen bewerkstelligen es scheinbar, ein Anlösen oder Abreißen der Kristalle zu verhindern und können sich so relativ sicher auf den kristallbereiften Oberflächen fortbewegen. Vielleicht liegt die Ursache dafür in einer unterschiedlichen Zusammensetzung der Haftflüssigkeit. Möglicherweise fehlt den Ameisen der Msp 2 eine Komponente in der Haftflüssigkeit, die bei den Ameisen der Msp 4 für das Ablösen der Kristalle verantwortlich ist.

Das allgemeine Phänomen der Rutschigkeit vertikaler Pflanzenoberflächen, verursacht durch die Ausbildung epikutikulärer Wachskristalle, wird als Schutz von hochgelegenen Organen wie Blüten und Fruchständen vor Schadinsekten interpretiert und hat als „Greasy-pole-Syndrom“ Eingang in die Fachliteratur gefunden (Harley 1991). Im Falle von zahlreichen *Macaranga*-Arten erfüllen die Triterpen-Wachskristalle auf den Sprossachsen, die nur von spezifischen Partnerameisen im Gegensatz zu Generalisten begehbar sind, zusätzlich eine ökologische Filterfunktion. Auch bei *Ricinus communis* wird eine mechanische Barriere für generalistische, nicht aber für „angepasste“ Ameisenspezies aufgebaut. Inwieweit damit eine tatsächliche biologische Funktion der Kristalle bezüglich eines Fraßschutzes im Sinne des „Greasy-Pole-Syndroms“ verbunden ist und dem Glaucous-Phänotyp gegenüber dem Glossy-Phänotyp auf diese Weise ein Vorteil erwachsen würde, kann allerdings nur mit entsprechenden Kosten-Nutzen-Versuchen mit potenziellen Herbivoren von *Ricinus communis* nachgewiesen werden.

---

## 4.2 Die Bedeutung pflanzlicher Triterpensynthesen für die Biosynthese kutikulärer pentazyklischer Triterpene

Trotz der relativ großen Zahl klonierter und charakterisierter Triterpensynthesen wurde über die biologische Funktion dieser Enzyme im Pflanzenorganismus bislang recht wenig publiziert. Im Wesentlichen beschränken sich entsprechende Veröffentlichungen auf zwei Untersuchungen, bei denen über die Klonierung und Charakterisierung der Triterpensynthesen hinaus auch deren mögliche Funktion innerhalb der Saponinbiosynthese *in planta* berücksichtigt wurde: Die  $\beta$ -Amyrinsynthase AsbAS1 aus *Avena strigosa* ist in die Biosynthese von Avenacin A-1 (Osborn *et al.* 2003), die  $\beta$ -Amyrinsynthase GgbAS1 aus *Glycyrrhiza glabra* in die Biosynthese von Soyasaponin involviert (Hayashi *et al.* 2004; Hayashi *et al.* 2001b). Darüber hinaus wurde in *Luffa cylindrica*-Zellkulturen eine Korrelation des zeitlichen Expressionsmusters der Isomultiflorenolsynthase mit der entsprechenden Akkumulation von Bryonolsäure festgestellt (Hayashi *et al.* 2001a).

Im Zusammenhang mit klonierten und charakterisierten Triterpensynthesen wurde jedoch bisher nie eine eventuelle Bedeutung dieser Zyklasten für die Biosynthese kutikulärer Wachskomponenten diskutiert. Für den Nachweis einer solchen Bedeutung müssen die molekulargenetischen Untersuchungen mit Analysen zur chemischen Zusammensetzung der kutikulären Wachse kombiniert werden. Von einigen Arten, von denen Triterpensynthesen charakterisiert wurden, liegen detaillierte Untersuchungen zur Chemie kutikulärer Wachse vor, wie beispielsweise von *Arabidopsis thaliana* (Aharoni *et al.* 2004; Suh *et al.* 2005; Rashotte *et al.* 1997) oder *Pisum sativum* (Gniwotta *et al.* 2005). Bei diesen Arten spielen Triterpene als kutikuläre Wachbestandteile keine Rolle, da sie - wenn überhaupt - nur in Spuren in der Kutikula vorhanden sind. Bei *Medicago truncatula* läßt sich  $\beta$ -Amyrin im kutikulären Wachs zwar nachweisen, doch auch hier nur in geringen relativen und absoluten Mengen (Zhang *et al.* 2005). Eine Beteiligung der klonierten Triterpensynthesen aus *Arabidopsis*, Erbse und Alfalfa an der Biosynthese kutikulärer Wachskomponenten wird also kaum anzunehmen sein. Von vielen Pflanzenarten ist die Zusammensetzung der kutikulären Wachse dagegen bisher nicht untersucht worden, so dass in diesen Fällen über eine Bedeutung der charakterisierten OSCs für die Bildung kutikulärer Triterpene bei jetzigem Kenntnisstand keine Aussage getroffen werden kann. Vielversprechende Pflanzenarten, bei denen die bereits klonierten Triterpensynthesen in direktem Zusammenhang mit der Biosynthese kutikulärer Wachse stehen könnten, sind *Olea europaea* (Bianchi *et al.* 1992), da in den Früchten hohe Anteile an Triterpensäuren in der Kutikula nachweisbar sind, sowie *Euphorbia tirucalli*, da sich die Gattung *Euphorbia* allgemein durch hohe Anteile kutikulärer Triterpene auszeichnet (Hemmers *et al.* 1988).

Mit *Ricinus communis* und *Lycopersicon esculentum* wurden in dieser Arbeit erstmals zwei Arten untersucht, bei denen sich die Produktspezifität und Expressionsdaten der

---



charakterisierten Triterpensynthesen mit Ergebnissen aus eingehenden chemischen Wachsanalysen kombinieren lassen.

#### 4.2.1 Biosynthese kutikulärer Triterpene bei *Ricinus communis* – die Kutikularelevanz der Lupeolsynthase RcLUS1

##### 4.2.2.1 Das Expressionsverhalten der klonierten Epoxysqualenzyklasen in verschiedenen Pflanzenorganen

Um die Bedeutung der klonierten Lupeolsynthase RcLUS1 für die Biosynthese kutikulärer Triterpene beurteilen zu können, war es entscheidend, das Expressionsverhalten von *RcLUS1* in verschiedenen Pflanzenorganen beider Sprossachsenphänotypen zu untersuchen. Northern-Blot-Versuche zeigten, dass die Lupeolsynthase nur in den Sprossachsen von Individuen des Glauous-Phänotyps exprimiert war. Im Glossy-Phänotyp blieb der Nachweis einer Expression von *RcLUS1* dagegen gänzlich aus. Das Genprodukt, das über die Charakterisierung via heterologe Expression in Hefe nachweislich für die Biosynthese des Triterpens Lupeol verantwortlich gemacht werden kann, ist also nur in dem Pflanzenorgan hochreguliert, in dem auch große Mengen an Lupeol im kutikulären Wachs eingelagert werden. Die *RcLUS1*-Expression korreliert damit mit der Einlagerung bzw. der Abwesenheit von Lupeol im kutikulären Wachs der beiden Sprossachsen-Phänotypen.

In den ergänzenden RT-PCR-Versuchen konnte neben diesem Befund zusätzlich ein schwaches *RcLUS1*-Signal in Blättern von Individuen des Glauous-Phänotyps nachgewiesen werden. Zwar wurden im Rahmen dieser Arbeit keine chemischen Analysen des kutikulären Blattwachses von *Ricinus communis* durchgeführt; frühere Versuche hatten jedoch gezeigt, dass Lupeol - wenn auch nur in weit geringeren absoluten und relativen Mengen als in Sprossachsen - als kutikuläre Wachskomponente in Rizinus-Blättern eingelagert wird (Vermeer *et al.* 2003). Der Lupeolanteil im Blattwachs des Glauous-Phänotyps ist dabei gegenüber dem Anteil des Triterpens am Blattwachs von Individuen des Glossy-Phänotyps erhöht (P. Nastold und R. Jetter, unveröffentlichte Daten). Das schwache Expressionssignal im Blattgewebe des Glauous-Phänotyps korreliert demnach ebenfalls mit chemischen Analysen zur Zusammensetzung der kutikulären Wachse in diesem Organ.

Aus der Literatur sind einige Expressionsdaten für pflanzliche Triterpensynthesen greifbar, die zeigen, dass die unterschiedlich starke Expression dieser Enzyme in verschiedenen Pflanzengeweben durchaus nicht ungewöhnlich ist. Die Expression der  $\beta$ -Amyrinsynthase *AsbAS1* aus *Avena strigosa* beispielsweise bleibt auf die Wurzeln der Pflanze beschränkt (Haralampidis *et al.* 2001), gleiches gilt für die multifunktionale Triterpensynthase *LjAMY2* aus *Lotus japonicus* (Iturbe-Ormaetxe *et al.* 2003). Eine annotierte Lupeolsynthase aus *Medicago truncatula* wird im Wurzel- und Blattgewebe, nicht aber in Sprossachsen exprimiert (Iturbe-Ormaetxe *et al.* 2003). Die  $\beta$ -Amyrinsynthase *PSY*

aus *Pisum sativum* ist nur in Sprossachsen und Wurzeln stark exprimiert (Iturbe-Ormaetxe *et al.* 2003) und für die  $\beta$ -Amyrinsynthase *GgbAS1* lässt sich bei *Glycyrrhiza*-Keimlingen eine weit stärkere Expression in Wurzeln und Hypokotylen als in den Kotyledonen nachweisen (Hayashi *et al.* 2004).

Im Gegensatz zu *RcLUS1* war die Cycloartenolsynthase *RcCAS1* konstitutiv in allen Organen sowohl des Glaucoous-, wie auch des Glossy-Phänotyps exprimiert. Auch während der frühen Hypokotylentwicklung war eine über den gesamten untersuchten Zeitraum relativ konstante Expression von *RcCAS1* in beiden Phänotypen zu beobachten. Diese Ergebnisse decken sich mit entsprechenden Beobachtungen, die an der Lakritzpflanze gemacht wurden: In den *Glycyrrhiza glabra*-Keimlingen wird die Cycloartenolsynthase während den ersten Tagen nach der Keimung konstant exprimiert (Hayashi *et al.* 2004). Auch über den Jahresverlauf hinweg bleibt die Expression der Cycloartenolsynthase in den Hauptwurzeln der Pflanzen konstitutiv. Schließlich konnte bei *Avena strigosa* die Expression eines Cycloartenolsynthase-homologen Gens in allen Pflanzengewebe nachgewiesen werden (Haralampidis *et al.* 2001). Cycloartenolsynthesen katalysieren den ersten wichtigen Schritt im Biosyntheseweg von Phytosterolen, die als Membranbestandteile ubiquitär in pflanzlichen Geweben vorkommen. Sie sind deshalb als „housekeeping enzymes“ der Pflanzen anzusprechen, im Gegensatz zu Triterpensynthesen, die eine äußerst organspezifische und entwicklungsabhängige Regulation aufweisen können.

2,3-Oxidosqualenzyklen spielen eine entscheidende Rolle bei der Regulation des Isoprenoid-Flusses in den Phytosterol-Biosyntheseweg einerseits und den Triterpen-Biosyntheseweg andererseits und stehen damit am Scheideweg zwischen Primär- und Sekundärstoffwechsel der Pflanze. Durch Inhibitor-Versuche mit Oxidosqualen-Analoga konnte gezeigt werden, dass die spezifische Blockierung der Cycloartenol-Biosynthese zu einer Akkumulation von Triterpenen auf Kosten von Cycloartenol führt (Taton *et al.* 1996; Taton *et al.* 1992). Die Behandlung von Zellsuspensionen von *Tabernaemontana divaricata* mit einem Elicitor bewirkt eine Inhibition der Cycloartenolsynthase, gefolgt von einer Induktion der Aktivität von Triterpensynthesen (van der Heijden *et al.* 1989). Auch hier mündet die Blockierung der CAS also in eine erhöhte Triterpen-Biosynthese.

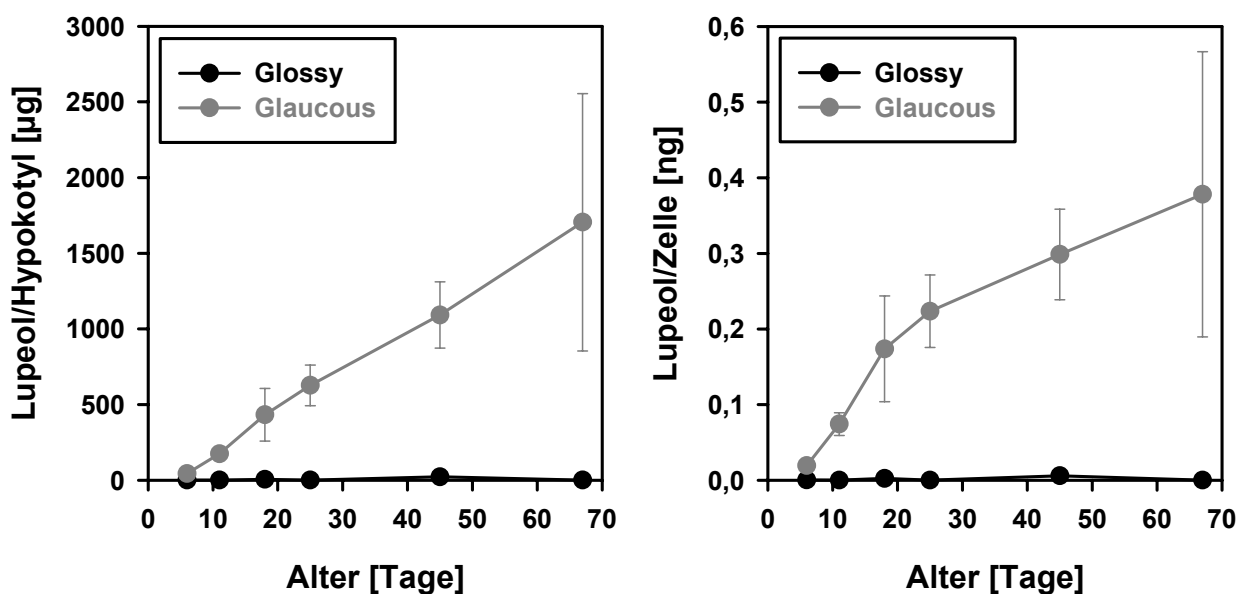
#### 4.2.2.2 Vergleich der *RcLUS1*-Expression mit der kutikulären Triterpen-Akkumulation im Laufe der frühen Hypokotylentwicklung

Wie bereits in 4.2.2.1 ausgeführt, korreliert das Expressionsmuster von *RcLUS1* in verschiedenen Pflanzenorganen mit der Akkumulation großer Mengen Lupeol bzw. der Abwesenheit des Triterpenols im kutikulären Wachs dieser Organe. Ein eingehender Vergleich der *RcLUS1*-Expression im Laufe der frühen Hypokotylentwicklung mit den

---

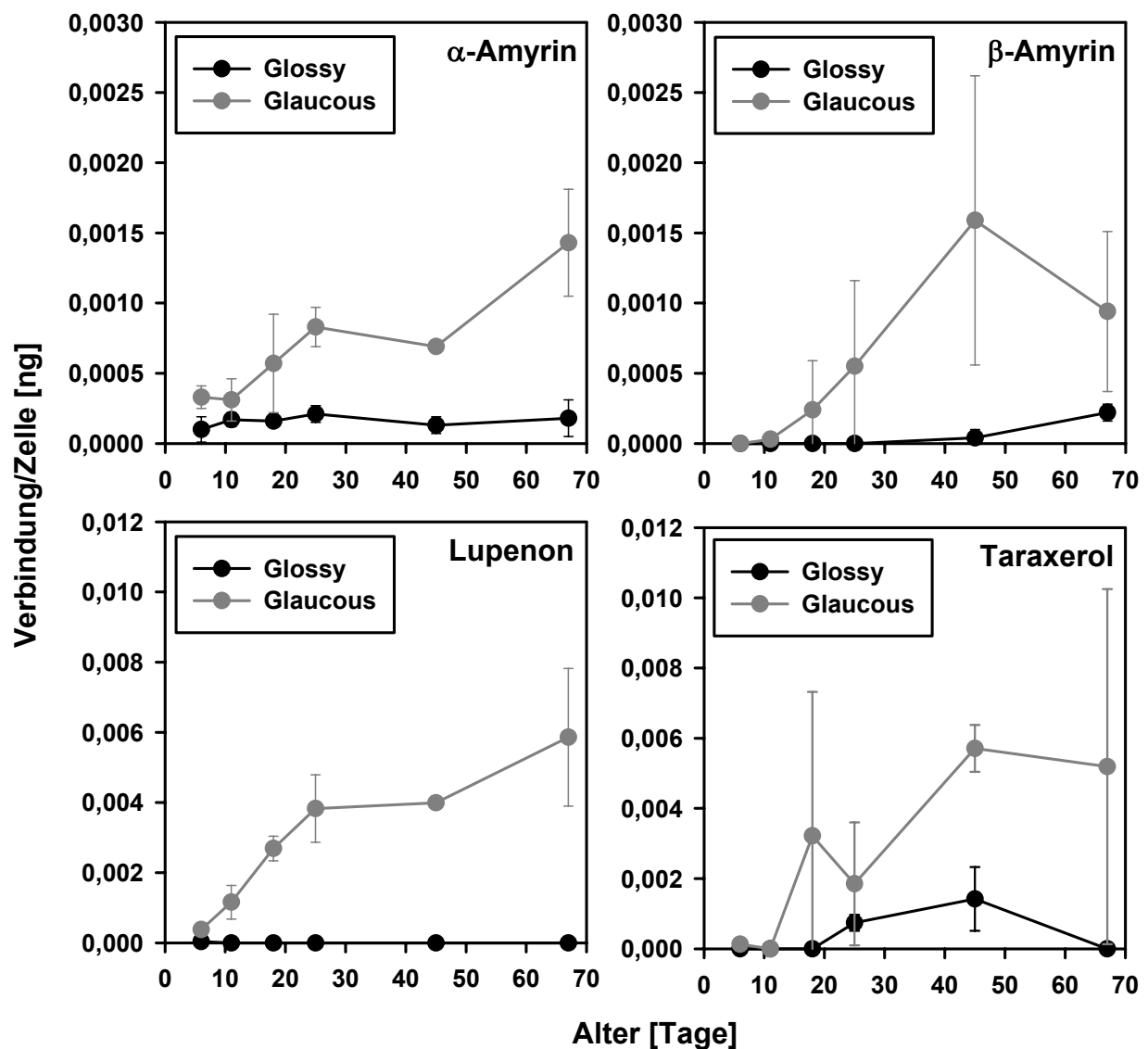
analytischen Daten zur Triterpen- bzw. Lupeolanreicherung in der Kutikula soll die Relevanz von R<sub>c</sub>LUS1 für die Biosynthese kutikulärer Triterpene nun zusätzlich untermauern:

Die Genexpression von R<sub>c</sub>LUS1 während der frühen Hypokotylenentwicklung wurde sowohl mit Northern-Blot-Analysen, als auch RT-PCR-Versuchen untersucht. Während in den Pflanzen vom Glossy-Phänotyp erwartungsgemäß keinerlei R<sub>c</sub>LUS1-Aktivität detektierbar ist, kann eine Expression von R<sub>c</sub>LUS1 in Individuen des Glaucous-Phänotyps in den ersten 50 Tagen der Hypokotyl-Entwicklung nachgewiesen werden, wobei sich ein Expressionsmaximum an Tag 12 abzeichnet. Wie steht dieser Befund nun im Verhältnis zur Lupeol-Akkumulation in der Kutikula? Die kutikuläre Anreicherung von Lupeol setzt bereits in einer sehr frühen Entwicklungsphase der Individuen des Glaucous-Phänotyps ein. Während Lupeol im Glaucous-Phänotyp im Laufe von 67 Tagen nach der Keimung auf eine absolute Menge von ca. 1700 µg/Hypokotyl im gesamten kutikulären Wachs akkumuliert, bleibt die Menge dieses Triterpens im kutikulären Wachs des Glossy-Phänotyps mit 0,8 µg/Hypokotyl sehr gering (Abb. 4-9). Beim Glaucous-Phänotyp nimmt die Lupeol-Wachsbelegung vor dem Tag 25 mit einer Rate von 1,2 µg cm<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> zu, bevor die Zunahmerate im nachfolgenden Zeitraum auf 0,4 µg cm<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> abnimmt. Zwischen Tag 6 und Tag 25 steigt die Lupeoleinlagerung also um das 5,6-fache, während sich im Zeitraum danach nur eine 1,6-fache Zunahme beobachten lässt. Die kalkulierte Lupeolbelegung pro Epidermiszelle verdeutlicht, dass die Biosyntheserate und Einlagerung des Triterpens in die Kutikula zwischen Tag 11 und Tag 18 am intensivsten ist: in dieser Zeitspanne steigt die Lupeol-Belegung von 0,075 auf 0,17 ng/Epidermiszelle; dies entspricht einer täglichen Lupeol-Zunahme von 0,013 ng pro Zelle. Die Biosynthese und Einlagerung von kutikulärem Lupeol korreliert also exakt mit dem Expressionsmuster der Lupeolsynthase R<sub>c</sub>LUS1.



**Abbildung 4-9:** Akkumulation des Triterpenols Lupeol im kutikulären Wachs pro Hypokotyl bzw. pro Epidermiszelle in den ersten 67 Tagen der Hypokotylenentwicklung.

Neben Lupeol als Hauptkomponente wurden im kutikulären Wachs von *Ricinus*-Hypokotylen - wenn auch nur in vergleichsweise sehr geringen Mengen - weitere Triterpen-Verbindungen nachgewiesen, respektive  $\alpha$ - und  $\beta$ -Amyrin, sowie Lupenon und Taraxerol. Alle diese Substanzen finden sich in größeren absoluten Mengen bei Individuen des Glaucous-Phänotyps als bei denen des Glossy-Phänotyps (Abb. 4-10). Betrachtet man die Belegung pro Epidermiszelle in der frühen Phase der Hypokotylentwicklung, zeigt sich, dass die relative Zunahme von Lupenon in der Kutikula der Individuen des Glaucous-Phänotyps in etwa der des Triterpenols Lupeol entspricht. Es ist anzunehmen, dass die erhöhten Lupenon-Werte in direktem Zusammenhang mit der hohen Lupeol-Biosynthese stehen.



**Abbildung 4-10:** Akkumulation verschiedener Triterpen-Verbindungen im kutikulären Wachs pro Epidermiszelle in den ersten 67 Tagen der Hypokotylentwicklung.

Die Charakterisierung von R<sub>c</sub>LUS1 zeigte, dass neben Lupeol als Hauptzyklisierungsprodukt  $\alpha$ - und  $\beta$ -Amyrin in sehr geringen Mengen als Nebenprodukte der vermittelten Zyklisierungsreaktion in Erscheinung traten. Infolge dessen dürfen die erhöhten Mengen dieser beiden Triterpenole in den Individuen des Glauous-Phänotyps gegenüber den Individuen des Glossy-Phänotyps nicht verwundern, zumal die Zunahme der Einlagerung vor allem in der frühen Entwicklungsphase ab Tag 12 einsetzt und damit mit dem Expressionsmuster von *RcLUS1* korreliert. Das Vorhandensein von Taraxerol in der Hypokotyl-Kutikula von *Ricinus communis* kann allerdings nur schwerlich mit der Expression von *RcLUS1* in Verbindung gebracht werden, da dieses Triterpenol bei der Charakterisierung von R<sub>c</sub>LUS1 nicht nachgewiesen wurde. Insofern dürfte eine weitere Triterpensynthese für die Biosynthese von Taraxerol verantwortlich sein (vgl. dazu 4.2.2.4).

Anhand der Korrelation der organspezifischen und entwicklungsabhängigen Lupeol-Akkumulation in der Kutikula mit dem Expressionsmuster der *Ricinus communis* Lupeolsynthese R<sub>c</sub>LUS1 lässt sich zweifelsfrei die unmittelbare Bedeutung von R<sub>c</sub>LUS1 für die Biosynthese des kutikulären Lupeols ableiten. Damit stellt R<sub>c</sub>LUS1 das zentrale Enzym für die Bildung epikutikulärer Wachskristalle auf den Sprossachsenoberflächen des Glauous-Phänotyps von *R. communis* dar und repräsentiert die erste in der Literatur beschriebene kutikularelevante Triterpensynthese (Guhling *et al.* 2006).

#### 4.2.2.3 Die Ausbildung der Kutikula-Phänotypen als Folge der differenziellen Regulation der Biosynthese von kutikulärem Lupeol durch R<sub>c</sub>LUS1

Die R<sub>c</sub>LUS1-Expressionsergebnisse lassen den Schluss zu, dass die enzymatisch vermittelte Zyklisierung von 2,3-Oxidosqualen durch R<sub>c</sub>LUS1 den entscheidenden Schritt bei der Regulation der Biosynthese von kutikulärem Lupeol darstellt. Die unterschiedlich starke Biosynthese von kutikulärem Lupeol wird durch eine differenzierte transkriptionelle Regulation von *RcLUS1* gesteuert, und nicht über eine differenzielle Regulation von im Biosyntheseweg vorgeschalteten Enzymen wie etwa der Squalenepoxidase bewerkstelligt. Daneben scheint der intrazelluläre Transport des Lupeols vom Syntheseort über die Plasmamembran und Zellwand bis hin zur Einlagerung in die Kutikula der Epidermiszellen ebenfalls kein limitierender Faktor für die Kutikulaakkumulation von Lupeol zu sein, wobei völlig unklar ist, durch welche Carrier- bzw. Transportproteine diese Prozesse vermittelt werden (vgl. dazu Kunst *et al.* 2006).

Eine Regulation auf transkriptioneller Ebene lässt sich auch bei den Genen *CER2* und *CER6* von *Arabidopsis thaliana* beobachten. Diese Gene kodieren für Enzyme, die Einfluss auf die Biosynthese und Einlagerung VLC-aliphatischer Verbindungen in die Kutikula haben. (Xia *et al.* 1997; Hooker *et al.* 2002). Erste Anhaltspunkte für potenzielle Transkriptionsfaktoren, die diese durch Umwelteinflüsse induzierbare Expression von Wachsbiosynthese-

---

Genen vermitteln, geben Untersuchungen an *WIN1/SHN1*, einem Transkriptionsfaktor aus der *AP2/EREBP*-Familie. Durch die Überexpression dieses Regulators wird die Wachsbiosynthese dramatisch induziert (Aharoni *et al.* 2004).

Welche Transkriptionsfaktoren kommen jedoch für die Biosynthese pentazyklischer Triterpene in Frage? In den letzten Jahren wurde verstärkt daran gearbeitet, die Expressionsregulation von Triterpensynthesen in Zellkulturen der Modellpflanzen *Medicago truncatula* und *Glycyrrhiza glabra* durch Zugabe von Elicitoren zu beeinflussen. Als potenzielle Transkriptionsfaktoren von Triterpensynthesen sind dabei bisher die Pflanzenhormone Methyljasmonat (MeJA) und Gibberelinsäure ( $GA_3$ ) beschrieben worden: In *M. truncatula*-Zellkulturen führte die Behandlung mit MeJA zu einer koordinierten Induktion von Squalensynthase, Squalenepoxidase und  $\beta$ -Amyrinsynthase, wohingegen die Cycloartenolsynthase nicht induziert wurde, die Sterol-Zusammensetzung in den Zellkulturen dementsprechend unverändert blieb (Suzuki *et al.* 2002; Hayashi *et al.* 2003). Durch die Exposition der Zellen mit 500  $\mu$ M MeJA konnte eine 50fache Steigerung der  $\beta$ -Amyrinsynthase-Expression 24 h nach Zugabe bewirkt werden (Suzuki *et al.* 2005). Auch in *Glycyrrhiza glabra*-Zellkulturen konnte durch Zugabe von 100  $\mu$ M exogenem MeJA die Expression der  $\beta$ -Amyrinsynthase *GgbAS1* - zusammen mit einer Squalensynthase und einer Glucuronosyltransferase, einem Enzym, das in einem späteren Schritt im Biosyntheseweg von Sojasapinin involviert ist - induziert werden, wohingegen die Expression der Cycloartenolsynthase unverändert blieb (Hayashi *et al.* 2003) und die Expression der Lupeolsynthase *GgLUS1* herunterreguliert wurde (Hayashi *et al.* 2004). Eine Zugabe von 10-100  $\mu$ M  $GA_3$  hatte dagegen einen hemmenden Effekt auf die Expression von *GgbAS1* und keinen Effekt auf *GgCAS1* und *GgLUS1* (Hayashi *et al.* 2004). Inwieweit MeJA auch bei *Ricinus communis* tatsächlich eine entscheidende Rolle bei der Expressionsregulation von *RcLUS1* spielt, bleibt allerdings sehr fraglich, zumal die Ausbildung des Glaucous-Phänotyps nicht als Folge von Umwelteinflüssen, sondern unabhängig von Wachstumsbedingungen ausgebildet wird. Zukünftige eingehende Promotor-Untersuchungen des *RcLUS1*-Gens sollten die Kenntnis über eventuelle Transkriptionsfaktoren und deren Einfluss auf die Biosynthese kutikulären Lupeols jedoch entscheidend erweitern können.

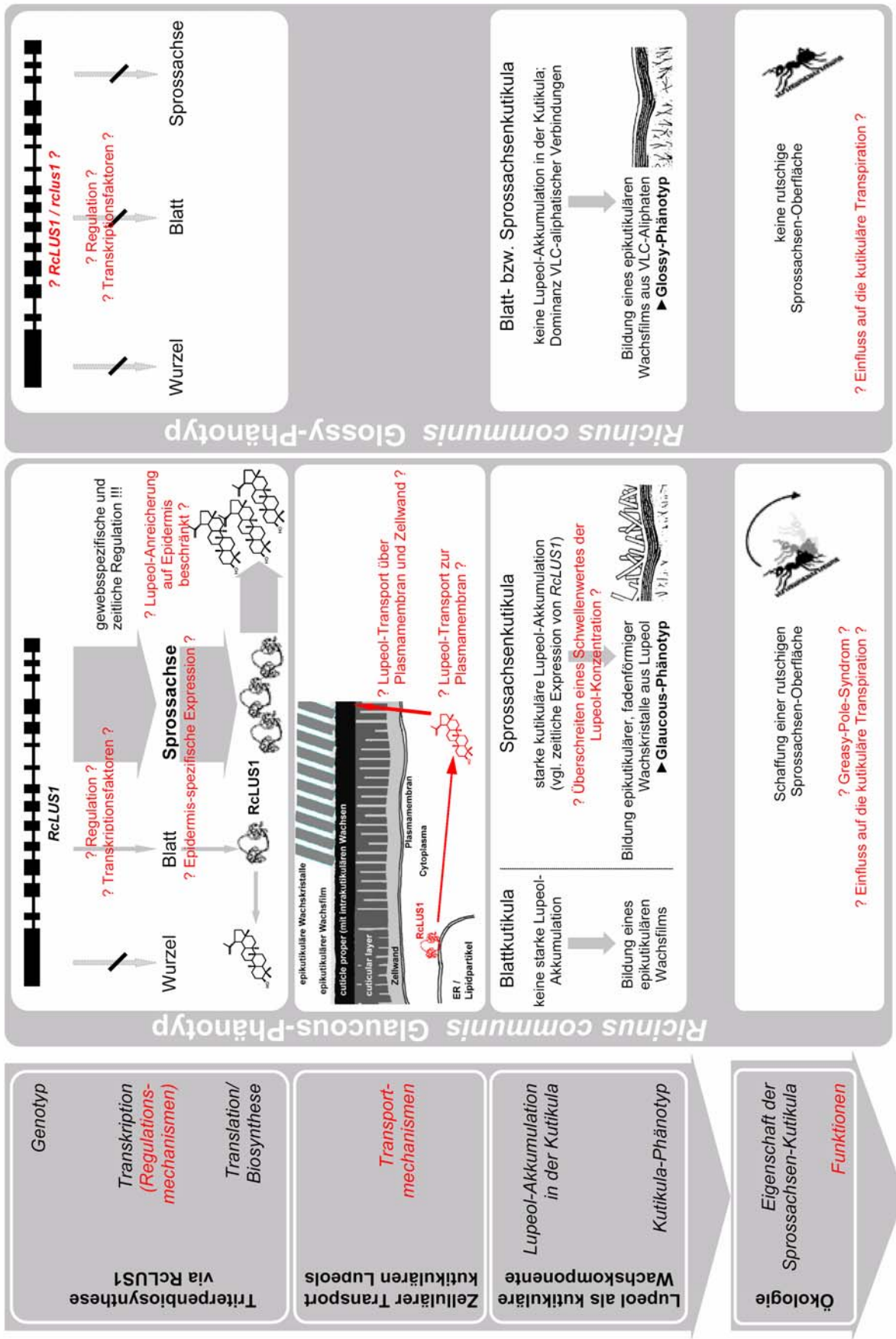
Da für die Expressionsversuche oberflächennahes Hypokotylmaterial verwendet wurde, ist von einer epidermalen *RcLUS1*-Expression auszugehen. Auf der Grundlage der vorliegenden Daten wird es nun mit Hilfe von *in situ*-Hybridisierungs-Techniken möglich sein, eine genaue Lokalisierung von *RcLUS1*-Transkripten im Sprossachsengewebe des Glaucous-Phänotyps vorzunehmen und damit die wichtige Frage zu beantworten, ob die Expression der Lupeolsynthase exklusiv auf die Epidermis beschränkt ist. Das Vorhanden- bzw. Nichtvorhandensein einer Epidermis-spezifischen Expression von *RcLUS1* wird es ermöglichen zu verstehen, ob es sich bei der kutikulären Akkumulation von Lupeol an der

Sprossachsenoberfläche von Individuen des Glaucous-Phänotyps um einen spezifischen Prozess handelt, oder ob dieses Phänomen als ein Nebeneffekt im Zusammenhang einer allgemein erhöhten Lupeol-Biosynthese in der Sprossachse zu interpretieren ist.

Es bleibt die Frage zu klären, ob der Glossy-Phänotyp die ursprüngliche Ausprägungsform der Sprossachsen von *Ricinus communis* darstellt und der Glaucous-Phänotyp erst durch eine epidermale Steigerung der *RcLUS1*-Expression das Merkmal der gesteigerten kutikulären Lupeolakkumulation im Laufe der Evolution erlangt hat, oder ob der Glaucous-Phänotyp die ursprüngliche Erscheinungsform repräsentiert. In letzterem Fall hätten die Individuen des Glossy-Phänotyps die Fähigkeit zur Expression von *RcLUS1* in Sprossachsen durch eine wie auch immer geartete Mutation im *RcLUS1*-Gen selbst oder in einem Gen, das die *RcLUS1*-Expression reguliert, verloren. Eine mögliche Erklärung für das Ausbleiben der *RcLUS1*-Expression in den Sprossachsen der Individuen des Glossy-Phänotyps könnte durch eine Punktmutation in der genomischen Sequenz verursacht sein, die ein Nonsense-Codon innerhalb der kodierenden Sequenz produziert und so zu einem vorzeitigen Translationsabbruch führt. Voraussetzung hierfür wäre allerdings, dass eine solche Mutation homozygot im Glossy-Phänotyp vorliegt (*Ricinus communis* weist einen diploiden Chromosomensatz mit  $n=20$  auf). Eine derartige Mutation konnte für die Ausbildung der Saponin-defizienten Hafermutante *sad1* verantwortlich gemacht werden (Haralampidis *et al.* 2001). Der Grund für einen extrem reduzierten Transkriptionslevel des betroffenen Gens könnte in einem „Nonsense-vermittelten“ Abbau von mRNA zu suchen sein, ein Effekt, der vor allem in Hefe untersucht, aber auch bei pflanzlichen Organismen beschrieben wurde (Petracek *et al.* 2000; van Hoof und Green 1996). Für die Überprüfung dieser Hypothese müsste die genomische Sequenz des *RcLUS1*-Gens in Individuen, die den Glossy-Phänotyp aufweisen, ermittelt und auf entsprechende Punktmutationen hin untersucht werden.

Abbildung 4-11 stellt die Ergebnisse aus den molekulargenetischen Untersuchungen zur Biosynthese des Triterpenols Lupeol via *RcLUS1* den Daten aus den Wachsanalysen (vor allem in Bezug auf die jeweils charakteristische kutikuläre Lupeolakkumulation bei beiden Sprossachsenphänotypen von *Ricinus communis*) gegenüber und versucht, aus der Zusammenschau der Erkenntnisse die sich nun ergebenden Fragestellungen abzuleiten. Die Biosynthese des kutikulären Lupeols konnte aufgrund der Expressionsuntersuchungen unzweifelhaft der Enzymaktivität der Lupeolsynthase *RcLUS1* zugeordnet und damit als Ursache für die Ausbildung des Glaucous-Phänotyps ausgemacht werden. Die differenzielle Genexpression von *RcLUS1* in den verschiedenen Pflanzengeweben wirft nun die Frage nach den Regulationsmechanismen der Expression und die mögliche Beteiligung von Transkriptionsfaktoren auf.

---



**Abbildung 4-11:** Zusammenfassende Darstellung der verschiedenen Prozesse, die zur Ausbildung des Glaucous- bzw. Glossy-Phänotyps von *Ricinus communis* führen, unter Berücksichtigung der möglichen ökologischen Auswirkungen der Sprossachsen-Phänotypen. Die rot markierten Texte bezeichnen in diesem Zusammenhang offen gebliebene Fragen.



Darüber hinaus ist zu klären, ob die Expression von *RcLUS1* im Glaucoous-Phänotyp auf die Epidermis beschränkt bleibt oder im gesamten Sprossachsengewebe erhöht ist. Trifft ersteres zu, dürfte der größte Anteil an in der Pflanze synthetisiertem Lupeol in der Kutikula eingelagert sein und die Synthese von Lupeol ein exklusives „Kutikula“-Phänomen repräsentieren. Zu klären bleibt außerdem, ob der Grund für die ausbleibende Expression von *RcLUS1* im Glossy-Phänotyp in einer Mutation innerhalb des Gens selbst oder in einer drastischen Veränderung der Regulation liegt, z. B. durch das Ausbleiben der benötigten Transkriptionsfaktoren. Ein weiterer großer Themenkomplex, der bislang völlig ungeklärt ist, betrifft den Transport des Lupeols über das Endomembransystem vom Syntheseort über die Plasmamembran und Zellwand zur Kutikula und die potentielle Beteiligung von Transport- und Lipidtransferproteinen. In Bezug auf die Bedeutung der Ausbildung unterschiedlicher Phänotypen im ökologischen Kontext bleibt der Nachweis einer tatsächlichen Funktion der Generierung rutschiger Oberflächen oder der möglichen Beeinflussung kutikulärer Transpirationseigenschaften durch die Bildung epikutikulärer Wachskristalle bzw. die Einlagerung großer Mengen von Lupeol in die Kutikula für die Pflanzen zukünftigen Untersuchungen vorbehalten.

#### 4.2.2.4 RcTTS2 – eine weitere Triterpensynthese aus *Ricinus communis*

Neben *RcLUS1* wurde ein weiteres Fragment einer 2,3-Oxidosqualenzylase (*RcTTS2*) aus *Ricinus communis* kloniert. Eine Klonierung des gesamten kodierenden Bereiches dieses Gens war jedoch nicht möglich. Vorausgesetzt, dieses Enzym ist nicht in Sprossachsen, jedoch differenziell in anderen Organen der Pflanzen exprimiert, sollte die Verwendung von Template-mRNA für die Klonierungsarbeiten aus anderen Pflanzengewebe wie Blättern oder Wurzeln zu einer erfolgreichen Klonierung des Full-length-Klons führen. Entsprechende Versuche konnten aus Zeitmangel im Rahmen dieser Arbeit nicht bewerkstelligt werden.

Aufgrund der Sequenzhomologien zu *RcLUS1* (Abb. 4-12) und anderen TTSs kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei *RcTTS2* um das Fragment einer weiteren Triterpensynthese handelt. Aus der Literatur sind etliche Pflanzenarten bekannt, in denen mehrere Triterpen-Cyclasen nachgewiesen werden konnten, darunter *Arabidopsis thaliana*, *Panax ginseng*, *Pisum sativum*, *Betula platyphylla* und *Glycyrrhiza glabra*. Expressionsversuche zeigten, dass diese Synthesen auf Transkriptionsebene getrennt voneinander reguliert werden (Iturbe-Ormaetxe *et al.* 2003; Hayashi *et al.* 2004). Eine Beteiligung der zweiten Rizinus-Triterpensynthese an der Biosynthese von kutikulären Wachsbestandteilen wäre denkbar, da das kutikuläre Triterpenspektrum, allen voran die Akkumulation von Taraxerol, nicht mit der Expression der Lupeolsynthese *RcLUS1* alleine

---

erklärt werden kann (vgl. 4.2.2.2). Eine Charakterisierung der Triterpensynthese RcTTS2 ist vor diesem Hintergrund von großem Interesse. Ob RcTTS2 nun für die Biosynthese kutikulärer Triterpene verantwortlich ist oder nicht – in jedem Fall würden Daten zur Expression dieses Gens im Pflanzengewebe eine wichtige Ergänzung für das Verständnis der Regulation der Triterpen-Biosynthese in der Rizinus-Pflanze darstellen.

```

RcTTS2  1  -----ANFTFQALYLSNIGDEIMPALAKAYDFIKQTRMKD  35
RcLUS1 401  WVGEDGIKMQSFGSQTWDTSLALQALIASDLSHEIGPTLKQGHVFTKNSQATE  453

RcTTS2  36  NPAGDFRTMFRHISKGGWPFSDQDHGWQVSDCTAEGLKCLLYATQLPTEKI GE  88
RcLUS1 454  NPSGDFRKMFRHISKGAWTFSDKQGWQVSDCTAESLKCCLLFSMMPPEIVGE  506

RcTTS2  89  KAEPERLYDAVNVILSLQGKNGGLSAWEPVRGSMWLEKLNPMEFLENIVTEHQ  141
RcLUS1 507  KMEPEKQVYDSVNVILSLQSQNGGFTAWEPARAGSWMEWLNPEVFMEDIVVEHE  559

RcTTS2 142  YVECTSSGIETLAFKKMYPGRHSKEIDNFTKNGAGYIEETQEEEDGSW/GNWG  194
RcLUS1 560  YVECTSSAIQALVLFKKLYPRHRNKEIENCLINAAQFIENIQEPDGSW/GNWG  612

RcTTS2 195  ICFIYGTWFALVGLSAAGRSYSECPAVRKGVDLFLKNQCD-----  232
RcLUS1 613  ICFSYGTWFALKGLAAAGRITYENCSAIRKGVDFLLKSQRDDGGWAESYLSCP  665

```

**Abbildung 4-12:** Alignment der Aminosäuresequenzen von RcLUS1 und des klonierten Fragmentes RcTTS2a einer weiteren Triterpensynthese aus *Ricinus communis*. Das Substratbindungsmotiv (grün) und das QW3-Motiv (rot) sind farblich hervorgehoben.

#### 4.2.2 Biosynthese kutikulärer Triterpene in *Lycopersicon esculentum*

Mit Hilfe der entwickelten Methode zur Klonierung pflanzlicher OSCs konnten die Sequenzen der 2,3-Oxidosqualenzyklasen LeTTS1 und LeTTS2 aus *Lycopersicon esculentum* ermittelt werden. Während LeTTS1 mit Hilfe heterologer Expression in Hefe als  $\beta$ -Amyrinsynthase charakterisiert werden konnte, stellt die Charakterisierung von LeTTS2 ein dringendes Desiderat für zukünftige Untersuchungen dar. Die Aminosäuresequenzen beider Synthesen zeigen mit 87% Übereinstimmung ein hohes Maß an Ähnlichkeit (Abb. 4-13), LeTTS2 kodiert also mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit für eine weitere Triterpensynthese. Das Vorhandensein des für Triterpensynthesen charakteristischen Indels im Vergleich zu Cycloartenolsynthesen (vgl. 3.3.1) untermauert diese Hypothese. Dennoch muss es sich bei LeTTS2 durchaus nicht um eine weitere monofunktionale  $\beta$ -Amyrinsynthase handeln. Ein Alignment mit der Aminosäuresequenz der menschlichen Lanosterolsynthase zeigt nämlich, dass LeTTS1 und LeTTS2 mindestens in vier Aminosäureresten voneinander abweichen (Abb. 4-13), die aufgrund ihrer Nähe zum aktiven Zentrum eine unmittelbare Bedeutung für den Zyklisierungsprozess und damit für die Produktspezifität der Enzyme haben dürften. Besonders bemerkenswert sind dabei die

Aminosäurereste 411Glycin und 412Cystein von LeTTS2, da diese Reste von den bei allen bisher charakterisierten Triterpensynthesen ansonsten konservierten Aminosäuren Serin und Phenylalanin abweichen (vgl. Abb. 3-16). Eine Charakterisierung der Produktspezifität von LeTTS2 ist damit nicht nur für einen Erkenntnisgewinn zur Biosynthese pentazyklischer Triterpene bei *Lycopersicon esculentum* wichtig, sondern wird darüber hinaus das allgemeine Verständnis der Bedeutung und Funktion einzelner Aminosäurereste pflanzlicher Oxidosqualenzyklasten am Zyklisierungsprozess erweitern.

Neben dem EST-Klon TC160438 (vgl. 3.3.6.1) fanden sich im TIGR Tomato Gene Index weitere Gen-Fragmente, die aufgrund von Sequenzähnlichkeiten als Fragmente von OSCs annotiert wurden (Annotation in Klammer): TC160907 (LUS), TC167994 (LUS), AW618579 (LUS), BE459106 (OSC), TC159227 (CAS), TC165541 (CAS). Keines dieser Fragmente konnte einer der klonierten Triterpensynthesen zugeordnet werden. Es ist also durchaus möglich, dass neben den Synthesen LeTTS1 und LeTTS2 noch weitere Triterpensynthesen in *Lycopersicon esculentum* existieren.

Im Gegensatz zur Kutikula von *Ricinus communis*-Sprossachsen des Glaucous-Phänotyps zeichnet sich *Lycopersicon esculentum* durch das Auftreten gleich mehrerer pentazyklischer Triterpene in größeren Mengen im kutikulären Wachs der Früchte aus (Vogg *et al.* 2004). Hierbei stellen  $\alpha$ -Amyrin,  $\beta$ -Amyrin und  $\delta$ -Amyrin die größten Mengenanteile, daneben lassen sich jedoch auch eine ganze Reihe weiterer Triterpene als kutikuläre Wachsverbindungen nachweisen (Bauer *et al.* 2004). Interessanterweise verändern sich die relativen Mengenverhältnisse der Triterpene im Laufe der Fruchtentwicklung kaum (Tab. 4-2).

**Tabelle 4-2:** Prozentuale Verteilung der Triterpenalkohole in unterschiedlichen Reifestadien von Tomatenfrüchten, bezogen auf deren Summe (aus Bauer 2002).

	grün	grün-orange	rot	vollreif	nachgereift im Dunkel	nachgereift im Licht	Mittelwert	Standardabweichung
<b>Taraxerol</b>	1,9	1,9	2,0	1,9	2,0	2,0	<b>2,0</b>	0,05
<b><math>\delta</math>-Amyrin</b>	41,2	41,2	40,7	40,6	39,6	40,6	<b>40,7</b>	0,59
<b><math>\beta</math>-Amyrin</b>	22,2	20,7	21,5	22,3	23,9	22,6	<b>22,2</b>	1,08
<b><math>\alpha</math>-Amyrin</b>	22,3	22,2	21,7	21,6	21,3	21,4	<b>21,8</b>	0,41
<b>Lupeol</b>	0,7	0,7	0,8	0,8	0,8	0,8	<b>0,8</b>	0,05
<b>Multiflorenol</b>	4,3	4,4	4,5	4,3	4,2	4,1	<b>4,3</b>	0,14
<b><math>\psi</math>-Taraxasterol</b>	2,8	2,9	3,0	3,0	2,9	2,9	<b>2,9</b>	0,08
<b>Taraxasterol</b>	3,4	3,3	3,4	3,3	3,2	3,3	<b>3,3</b>	0,08

LeTTS1	1	MWKLKIAEGQNGPYLYSTNNYVGRQTWEFDPNGGTIEERAKIEEARQQFW	50
LeTTS2	1	MWKLKIAKGLDDRYLYSTNNYI GRQIWEFDPNAGTIEEQAKIEEARQHYW	50
LeTTS1	51	NNRYKVKPS SDLLWRIQFLGKFNFKQKIIPAVKVEEGEEISHEVATI ALHR	100
LeTTS2	51	NNRYKGPNSDLLWRMQFLREBNFKQRIIRAVKVEEGEEISHEIATVALHR	100
LeTTS1	101	AVHFFSALQATDGHWPAENAGPLFFLPPLVMCMYITGHLNTVFP AEHRKE	150
LeTTS2	101	AVHFFSALQATDGHWPAESAGPLFFLPPLVMCMYITGHLNTVYPAEHRKE	150
LeTTS1	151	ILRYIYCHQ NEDGGWGLHIEGHSTMFCTALSYICMRILGEGPDDGGVNNAC	200
LeTTS2	151	ILRYIYCHQ NEDGGWGLHIEGHSTMFCTAMSYICMRILGEGPEGGVNNAC	200
LeTTS1	201	ARARKWILDHGSVTAIPSWGKTWLSILGVFEWIGTNPMPPEFWILPSFLP	250
LeTTS2	201	ARARKWILDHGSVIAIPSWGKTWLSILGAFEWIGTNPMPPEFWILPSFLP	250
LeTTS1	251	VHPAKMWCYCRMVYMPMSYLYGKRFVGPITPLILQLREELYDRPYDEINW	300
LeTTS2	251	VHPAKMWCYCRTVYMPMSYLYGKRFVGPITPLILKLREELYDQTYDEINW	300
LeTTS1	301	KKVRHVC AKEDLYPHPLVQDLMWDSLYICTEPLLTRWPFNKLRNKALEV	350
LeTTS2	301	KKVRHVC AKEDLYPHPEVQDLMWDSLYICTEPLLTRWPFNKLRNKALEV	350
LeTTS1	351	TMKHIHYEDENSRYITITGCVKVLCLMLACWVEDPNGDYFKKHLARIPDYL	400
LeTTS2	351	TMKHIHYEDENSRYITITMGCVEKVL SMLACWVEDPNGDHFKKHLARIPDFL	400
LeTTS1	401	WVAEDGMKMQSEFGSQEWDTGFAIQALLASEMND EIAADTLRKGHDFIKOSQ	450
LeTTS2	401	WVAEDGMKMQGCGSQSWDASLAIQALLASEMYDEISDTLKNGHDFIKOSQ	450
LeTTS1	451	VTNPNP SGDFKGMYRHISKGSWTFSDQDHGWQVSDCTAEAL KCCLLLSTMP	500
LeTTS2	451	VKDNPNP SGDFKVMYRHISKGSWAFADQDLGWQVSDCTAEAL KCCLL FSTMP	500
LeTTS1	501	REIVGQAMEPGRLYDSVNVVLSLQSKNGGLAAWEPAGASEYLELLNPTEF	550
LeTTS2	501	PEIVGGEAMD PVRLYDSVNVVLSLQSKNGGLSAWEPAGAPEYLELLNPTEF	550
LeTTS1	551	FADIVIEHEYVECTASSIQALVLFKKLYPGHRTKEINIFIDNAVKYLEDV	600
LeTTS2	551	FEIVIEHEHVECTSSAIQALVRFKKLYPGHRTTEVDNFINNGVKYLEDV	600
LeTTS1	601	QMPDGSWYGNWGVCFIYASWFALGGLVAACKSYNNSAAVRKGV EFLLRTO	650
LeTTS2	601	QEPDGSWYGNWGVCFIYASWFALGGLAAVGLSYSNCAAVRKSVEFLLRTO	650
LeTTS1	651	RSDGGWGESYRSCPDKVYRELETDNSNLVQTAWALMGLIHSGQADRDPKP	700
LeTTS2	651	RSDGGWGESYRSCPDKVYRELETEHSNLVQTAWALMGLIHSGQOVERDPRP	700
LeTTS1	701	LHRAAKLLINSQMEDGDFPQQEITGVFMKNCLHYAAYRNIYPLWGLAEY	750
LeTTS2	701	LHRAAKLLINFQMEDGDFPQQEITGVFLRNCMLHYALYRNIYPLWGLAEY	750
LeTTS1	751	RKNVLLPLENN--	761
LeTTS2	751	RRNVLVPLKHNYI	763

**Abbildung 4-13:** Aminosäuresequenzalignment der klonierten Triterpensynthesen aus *Lycopersicon esculentum*. Das Substratbindungsmotiv (grün) und das QW3-Motiv (rot) sind farblich hervorgehoben. Gelb hinterlegt sind Aminosäuren, die aufgrund ihrer Nähe zum Substrat für die Produktspezifität der Enzyme von großer Bedeutung sein dürften und sich in beiden Synthesen unterscheiden.

Es stellt sich die Frage, auf welche Weise dieses charakteristische Triterpenspektrum im Wachs der Tomatenfrüchte enzymatisch vermittelt wird. Einerseits könnte die spezifische Triterpenakkumulation durch die Expression mehrerer monofunktionaler Triterpensynthesen bewerkstelligt werden. Andererseits wäre das Vorkommen der kutikulären Triterpene auch durch die Beteiligung einer multifunktionalen Triterpensynthase mit entsprechendem Produktspektrum zu erklären. Aus der Literatur sind mehrere solcher multifunktionaler Triterpensynthesen bekannt. So zyklisiert beispielsweise die Triterpensynthase PSM aus *Pisum sativum* 2,3-Oxidosqualen zu den Triterpenen  $\alpha$ -Amyrin,  $\beta$ -Amyrin,  $\delta$ -Amyrin,  $\psi$ -Taraxasterol, Butyrospermol, Lupeol, Germanicol und Taraxasterol (Morita *et al.* 2000). Die Expression von LjAMY2 aus *Lotus japonicus* in Hefe resultiert in der Akkumulation von  $\beta$ -Amyrin und Lupeol in ungefähr gleichen Mengen als Hauptprodukte, daneben können weitere uncharakterisierte Nebenprodukte detektiert werden (Iturbe-Ormaetxe *et al.* 2003). Die multifunktionale Triterpensynthase CSV aus *Costus speciosus* zeigt bei der Charakterisierung ein Triterpenspektrum, bei dem Lupeol, Germanicol und  $\beta$ -Amyrin die Hauptkomponenten darstellen (Kawano *et al.* 2002). Die *Arabidopsis thaliana* OSC ATLUP1 synthetisiert bei Hefe-Expressionsversuchen neben dem Hauptprodukt Lupeol (Herrera *et al.* 1998) weitere Triterpennebenprodukte, darunter  $\beta$ -Amyrin, Germanicol, Taraxasterol,  $\psi$ -Taraxasterol und 3 $\beta$ ,20-Dihydroxilupan (Herrera *et al.* 1998; Shibuya *et al.* 1999; Segura *et al.* 2000). Eine weitere multifunktionale Triterpensynthase aus *A. thaliana* katalysiert die Zyklisierung zu  $\beta$ -Amyrin,  $\alpha$ -Amyrin und Lupeol in einem Verhältnis von 55:30:15 (Husselstein-Muller *et al.* 2001). Darüber hinaus wurden Taraxasterol, Tirucalla-7,21-dien-3 $\beta$ -ol, Baurenol, Butyrospermol, Multiflorenol und  $\psi$ -Taraxasterol als ATLUP2-Zyklisierungsprodukte identifiziert (Kushiro *et al.* 2000). Bei der Charakterisierung weiterer multifunktionaler *Arabidopsis*-Triterpensynthesen schließlich konnten Tirucalla-7,21-dienol (ATLUP5) sowie Baurenol, Lupeol und  $\alpha$ -Amyrin (ATPEN6) neben anderen nicht zu bestimmenden Produkten identifiziert werden (Ebizuka *et al.* 2003).

Über die Bedeutung der klonierten Triterpensynthesen aus *L. esculentum* für die Biosynthese kutikulärer Triterpene lässt sich zum gegenwärtigen Zeitpunkt leider keine gesicherte Aussage treffen. Zwar handelt es sich bei  $\beta$ -Amyrin um eine der Wachskomponenten. Ob es sich dabei allerdings um das von LeTTS1 vermittelte Produkt handelt, muss aufgrund mangelnder Expressionsergebnisse offen bleiben. Darüber hinaus muss jedoch mindestens eine weitere Triterpensynthase in die Biosynthese der kutikulären Triterpene involviert sein. Da das Triterpenspektrum in der Kutikula über die gesamte Fruchtentwicklung hinweg gleich bleibt, scheint es naheliegend, dass dabei eine Synthase mit einer multifunktionalen Produktspezifität beteiligt ist. Ergebnisse, die im Labor von R. Jetter bei der Untersuchung einer weiteren Modellpflanze für die Biosynthese kutikulärer Triterpene erzielt wurden, sollen an dieser Stelle nicht unerwähnt bleiben. Mit Methoden

analog zur Vorgehensweise bei *Ricinus communis* und *Lycopersicon esculentum* wurde aus *Kalanchoe daigremontiana* eine 2,3-Oxidosqualenzyklase kloniert und mit Hilfe heterologer Expression in Hefe als eine multifunktionale Triterpensynthese charakterisiert (unveröffentlichte Daten). Dieses *Kalanchoe*-Enzym stellt das erste bekannte Enzym dar, das eine Reihe von weniger verbreiteten Triterpenen produziert, darunter auch das Triterpenketon Friedelin. Erstaunlicherweise deckt sich das charakteristische Produktspektrum dieser Triterpensynthese mit dem Vorkommen der gleichen Triterpene und in ungefähr den entsprechenden Verhältnissen im kutikulären Wachs von *Kalanchoe*-Blättern. In diesem Fall scheint eine direkte Relevanz des Enzyms für die Biosynthese kutikulärer Wachse gegeben zu sein. Dabei ist davon auszugehen, dass die Akkumulation verschiedener Triterpene in der Kutikula durch die Expression einer einzigen multifunktionalen Triterpensynthese bewerkstelligt wird, auch wenn entsprechende Expressionsversuche diese Vermutung erst noch untermauern müssen.

*Lycopersicon esculentum* stellt in jedem Fall ein geeignetes Modellsystem für die Erforschung der Biosynthese-Regulation kutikulärer Triterpene dar. Die Charakterisierung weiterer Tomaten-Triterpensynthesen wird es in Zukunft ermöglichen, die differenzielle Genexpression der verschiedenen Enzyme miteinander zu vergleichen und letztendlich daraus die Bedeutung einzelner Enzyme für die Biosynthese kutikulärer Wachskomponenten abzuleiten.

---

### 4.3 Die klonierten und charakterisierten Triterpensynthesen als Mitglieder der Epoxysqualenzyklen-Genfamilie

#### 4.3.1 Klonierung pflanzlicher Epoxysqualenzyklen durch die Einbeziehung von Sequenz-Unterschieden in den Gen-Unterfamilien

Bei den bis dato in der Literatur beschriebenen Methoden zur sequenzhomologiebasierten Klonierung pflanzlicher Epoxysqualenzyklen war eine gezielte Amplifizierung von Triterpensynthesen bei einer gleichzeitigen Diskriminierung von Cycloartenolsynthesen (und umgekehrt) nicht möglich gewesen. Vielmehr wurden mit den bisherigen Primerdesigns unspezifisch Fragmente von Epoxysqualenzyklen amplifiziert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte dagegen ein Primerdesign entwickelt werden, das eine spezifische cDNA-Fragment-Amplifizierung von Cycloartenolsynthesen bzw. Triterpensynthesen und damit eine spezifische Klonierung ermöglicht, indem durch unterschiedliche Funktionalitäten vorauszusetzende Sequenzunterschiede in beiden Gen-Unterfamilien berücksichtigt werden sollten. Tatsächlich war ein Sequenzbereich, der für die jeweilige OSCs-Unterfamilie der Triterpensynthesen bzw. der Cycloartenolsynthesen charakteristisch und hochkonserviert ist, für die erfolgreiche spezifische Klonierung von entscheidender Bedeutung (vgl. Abb. 3-16 und 3-17). Mit Hilfe des entwickelten Primerdesigns konnte die zielgerichtete Klonierung sowohl einer Triterpen-, als auch einer Cycloartenolsynthase aus *Ricinus communis* erfolgreich durchgeführt werden. Darüber hinaus konnten mit Hilfe der Primer Triterpensynthesen aus *Lycopersicon esculentum* sowie eine multifunktionale Triterpensynthase aus *Kalanchoe daigremontiana* kloniert werden (unveröffentlichte Daten).

Die Tatsache, dass das Motiv QGYNG in Cycloartenolsynthesen bzw. das entsprechende Motiv QSEFG in Triterpensynthesen jeweils hochkonserviert ist, lässt vermuten, dass dieser Bereich für die von Epoxysqualenzyklen katalysierte Zyklisierungsreaktion und deren Spezifität eine entscheidende Rolle spielt. Zwei Indizien sprechen zusätzlich für diese Annahme: 1. Anhand der dreidimensionalen Struktur der menschlichen Lanosterolsynthase und entsprechender Sequenzalignments kann davon ausgegangen werden, dass sich die AS Glycin und Tyrosin (CASs) bzw. Serin und Phenylalanin (TTSs) in unmittelbarer Nähe des katalytischen Zentrums der jeweiligen Enzyme befinden (vgl. Abb. 3-45). 2. In Site-directed mutagenesis-Ansätzen wurde gezeigt, dass das <sup>410</sup>Tyr der Cycloartenolsynthase ATCAS1 von *A. thaliana* aus obigem Motiv auf die Produktspezifität des Enzyms entscheidenden Einfluss hat: Die AtCAS1-Mutante Tyr410Thr zyklisiert 2,3-Oxidosqualen nicht zu Cycloartenol, sondern zu Lanosterol, Parkeol und 9 $\beta$ - $\Delta^7$ -Lanosterol (Herrera *et al.* 2000). Analog zu diesem Befund weisen Lanosterolsynthesen tierischer Organismen ein konserviertes Threonin an der korrespondierenden Tyr-Position der CASs auf. Tyr410 dürfte in unmittelbarer Nachbarschaft des B/C-Ring-Übergangs lokalisiert sein und könnte die Deprotonierung der C-8/C-9-Kation-Zwischenstufen im Laufe der Zyklisierungsreaktion

---

vermitteln. Protosteryl- und Dammarenyl-Kation zeigen jeweils eine umgekehrte Stereochemie im Bereich des B/C-Ring-Übergangs; es ist denkbar, dass das SerPhe-Motiv der Triterpensynthesen die Bildung des Dammarenyl-Kations ermöglicht.

### 4.3.2 Die klonierten und charakterisierten 2,3-Oxidosqualenzyklasen im Kontext pflanzlicher Epoxysqualenzyklasen

#### 4.3.2.1 Phylogenetische Untersuchungen

Für einen sequenzanalytischen Vergleich der klonierten Triterpen- bzw. Cycloartenolsynthesen aus *Ricinus communis* und *Lycopersicon esculentum* wurde zunächst ein Alignment der jeweiligen Aminosäuresequenzen mit den Sequenzen bereits charakterisierter pflanzlicher Epoxysqualenzyklasen durchgeführt. Auf der Grundlage dieses Alignments konnten die prozentualen Sequenzübereinstimmungen von RcLUS1, RcCAS1 und LeTTS1 mit Vertretern verschiedener Untergruppen aus der Familie der 2,3-Oxidosqualenzyklasen ermittelt werden (Tab. 4-3).

RcCAS1 zeigt im Vergleich mit anderen pflanzlichen Cycloartenolsynthesen erwartungsgemäß eine hohe Übereinstimmung in ihrer Aminosäuresequenz von 76%-82%, die größte Ähnlichkeit dabei mit den Cycloartenolsynthesen GgICAS1 von *Glycyrrhiza glabra* (82,7%) und BPX2 von *Betula platyphylla* (82,6%). Eine weitaus geringere Sequenzübereinstimmung war dagegen mit Triterpensynthesen zu erkennen; sie erreichte Werte von 50% bis zu 62%.

Die RcLUS1 Lupeolsynthase aus *Ricinus communis* wies eine nur relativ geringe Sequenzübereinstimmung von 59-62% mit den bisher bekannten monofunktionalen Lupeolsynthesen aus *O. europaea* (OEW), *T. officinale* (TRW), *B. platyphylla* (BPW) und *G. glabra* (GgLUS1) auf. 66% Übereinstimmung zeigte RcLUS1 mit der multifunktionalen Triterpensynthase aus *A. thaliana* (ATLUP1), 71-74% mit  $\beta$ -Amyrinsynthesen aus *B. platyphylla* (BPY), *P. ginseng* (PNY und PNY2), *P. sativum* (PSY), *M. truncatula* (MtbAS) und *G. glabra* (GgbAS1), 68-69% mit multifunktionalen Triterpensynthesen von *L. japonicus* (LJAMY2) und *P. sativum* (PSM) und 66% mit der Isomultiflorenolsynthase von *L. cylindrica* (LcIMS1). Mit Cycloartenolsynthesen war nur eine verhältnismäßig geringe Sequenzübereinstimmung festzustellen, die zwischen 54 und 58 % lag.

Die  $\beta$ -Amyrinsynthase LeTTS1 aus *Lycopersicon esculentum* zeigte mit bis zu 83% vor allem hohe Sequenzübereinstimmungen mit anderen  $\beta$ -Amyrinsynthesen, der höchste Wert wurde dabei für PNY aus *P. ginseng* festgestellt. Die Ähnlichkeiten in der Aminosäuresequenz im Vergleich zu multifunktionalen Triterpensynthesen (72-74%), zu Lupeolsynthesen (62-64%) sowie zu Cycloartenolsynthesen (57-60%) waren dagegen geringer.



**Tabelle 4-3:** Übersicht der Sequenzübereinstimmungen der klonierten und charakterisierten Oxidosqualenzyklen RcoLUS1, RcoCAS1 und LeTTS1 mit anderen charakterisierten pflanzlichen OSCs auf Aminosäuresequenzebene (Angaben in Prozent).

	<b>RcoLUS (RcLUS1)</b>	<b>RcoCAS (RcCAS1)</b>	<b>LesbAS (LeTTS1)</b>
<i>EtibAS</i> (EtOSC)	71,3	58,1	80,6
<i>PgibAS</i> (PNY)	73,4	58,6	83,2
<i>PgibAS</i> (PNY2)	73,1	58,6	83,0
<i>BplbAS</i> (BPY)	74,1	57,6	82,7
<i>MtrbAS</i> (MtbAS)	71,1	56,9	78,3
<i>PsabAS</i> (PSY)	71,6	57,0	78,5
<i>GgfbAS</i> (GgbAS1)	71,4	57,6	79,1
<i>LjamFS</i> (LJAMY2)	68,6	56,8	73,7
<i>PsamFS</i> (PSM)	67,7	56,4	71,7
<i>LcyIMS</i> (LcIMS1)	65,5	52,4	66,0
<i>AthMFS</i> (ATLUP1)	66,3	54,4	69,7
<i>AthMFS</i> (ATLUP5)	63,2	53,0	65,8
<i>AthMFS</i> (ATLUP2)	65,8	56,1	70,4
<i>AthMFS</i> (ATPEN6)	57,9	49,9	58,6
<i>OeuLUS</i> (OEW)	61,7	61,9	63,7
<i>TofLUS</i> (TRW)	60,0	59,9	62,5
<i>BplLUS</i> (BPW)	61,2	61,1	62,5
<i>GglLUS</i> (GgLUS1)	59,2	59,9	62,1
<i>PgiCAS</i> (PNX)	57,0	80,2	59,0
<i>BplCAS</i> (BPX2)	57,1	82,6	59,7
<i>PsaCAS</i> (PSX)	57,5	81,7	58,2
<i>GglCAS</i> (GgCAS1)	57,5	82,7	58,8
<i>LcyCAS</i> (LcCAS1)	54,4	75,6	56,6
<i>BplCAS</i> (BPX1)	55,5	77,5	58,5
<i>AthCAS</i> (AtCAS1)	55,5	79,4	59,2
<i>CspMFS</i> (CSV)	55,5	67,7	55,5
<i>CspCAS</i> (CSI)	56,3	75,6	57,6
<i>AstbAS</i> (AsbAS1)	48,0	54,6	48,3

Auf der Grundlage des AS-Sequenzalignments wurde ein ungewurzelter phylogenetischer Stammbaum erstellt, der die Verwandtschaftsbeziehungen der verschiedenen pflanzlichen Epoxysqualenzyklen darstellt (Abb. 4-14). Daneben wurde ein Stammbaum anhand eines Alignments der cDNA-Sequenzen der Enzyme kreiert, wobei in dieser Darstellung die menschliche Lanosterolsynthese als Outgroup diente (Abb. 4-15). Bei beiden Stammbäumen zeigt sich, dass sich drei Unterfamilien der Epoxysqualenzyklen-Genfamilie beschreiben lassen, deren Mitglieder jeweils in separaten Gruppen clustern. Hierbei handelt es sich um die Unterfamilien der Cycloartenolsynthesen, der  $\beta$ -Amyrinsynthesen und der Lupeolsynthesen.

Bei der Gruppe der Cycloartenolsynthesen dürfte es sich um jeweils orthologe Gene handeln. Das Auftreten der katalytisch gesteuerten Zyklisierung von 2,3-Oxidosqualen via Cycloartenolsynthese als „Housekeeping-Enzym“ geht also der Entstehung der pflanzlichen

Artenvielfalt voraus. Erwartungsgemäß findet sich auch die klonierte und charakterisierte Cycloartenolsynthase RcCAS1 aus *R. communis* in dieser Gruppe.

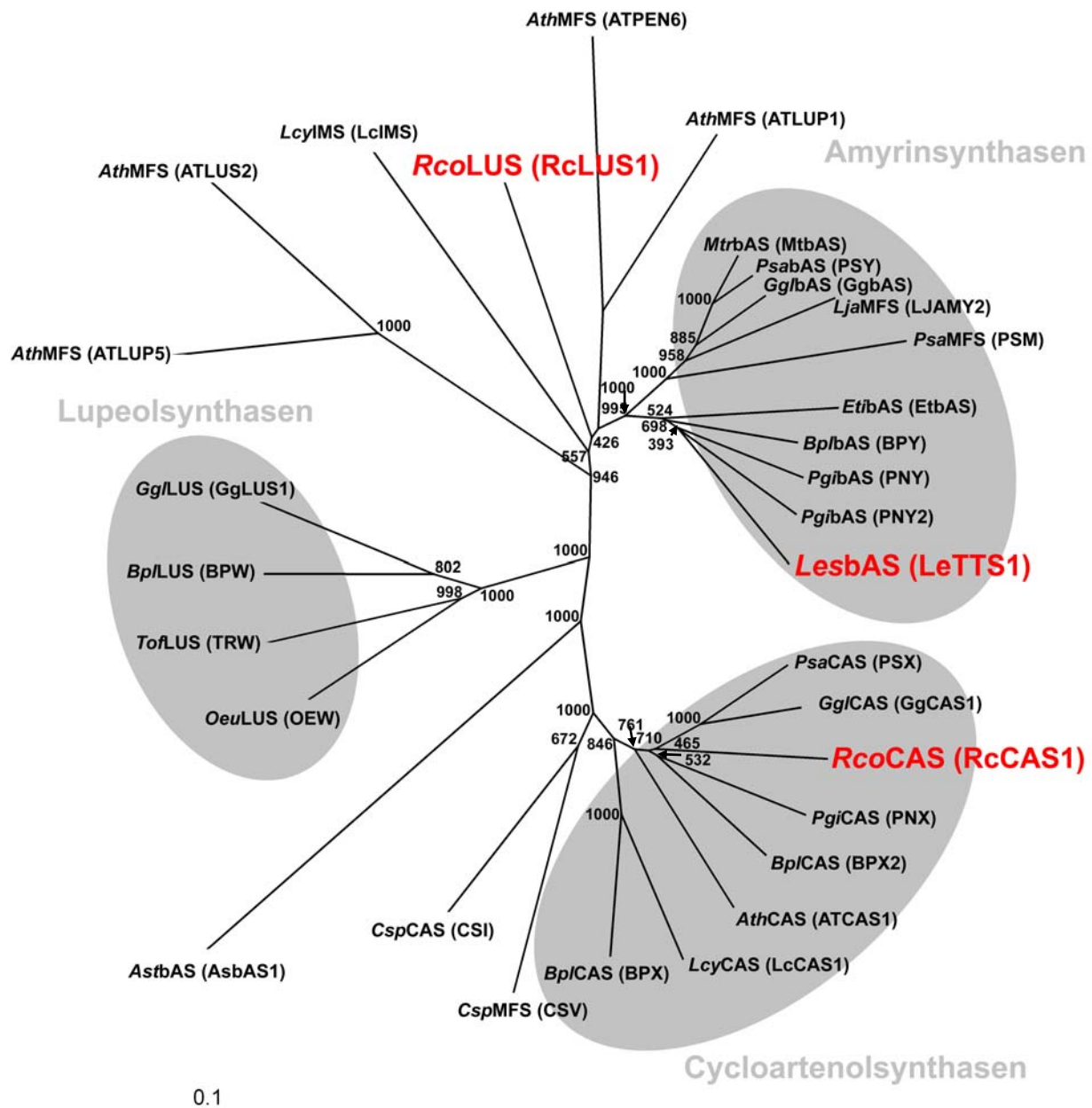
Die monofunktionalen  $\beta$ -Amyrinsynthesen der dikotylen Pflanzen clustern ebenfalls in einer separaten Gruppe, in der sich auch die *Lycopersicon esculentum* LeTTS1 als charakterisierte  $\beta$ -Amyrinsynthase wiederfindet (Abb. 4-14). Einen anderen Ursprung dürfte dagegen AsbAS1 haben, da die Synthase aus Hafer trotz der gleichen Produktspezifität mit 48% bis 50% nur relativ geringe Ähnlichkeiten zu allen übrigen  $\beta$ -Amyrinsynthesen zeigt, weshalb über eine unabhängige Evolution von  $\beta$ -Amyrinsynthesen in mono- und dikotylen Pflanzen spekuliert wurde (Qi *et al.* 2004; Haralampidis *et al.* 2001). Die phylogenetischen Untersuchungen zeigten außerdem, dass sich die orthologen multifunktionalen Triterpensynthesen aus den Hülsenfrüchtlern *P. sativum* (PSM) und *L. japonicus* (LjAMY2) einen gemeinsamen Vorläufer mit den monofunktionalen  $\beta$ -Amyrinsynthesen dikotyler Pflanzen teilen. In den Stammbaum auf cDNA-Basis wurde zusätzlich die Sequenz der zweiten Triterpensynthase LeTTS2 der Tomate mit einbezogen (Abb. 4-15); auch diese Triterpensynthase clustert in die Unterfamilie der Amyrinsynthesen.

Alle vier bisher charakterisierten monofunktionalen Lupeolsynthesen bilden einen eigenen Stamm innerhalb der Epoxysqualenzyklen (Abb. 4-14) und zeigen mit einer Übereinstimmung zwischen 74% und 81% untereinander ein hohes Maß an Ähnlichkeit. Die Anwesenheit von Genen im Lupeolsynthase-Cluster von Pflanzenvertretern sowohl der Asteriden wie auch der Rosiden (Abb. 4-15) unterstützt die Annahme, dass die Enzyme OEW, TRW, BPW und GgLUS1 allesamt Vertreter eines Lupeolsynthase-Typs sind, der sich vor der Auftrennung der Unterklassen evolvierte. Um so erstaunlicher nimmt sich die Tatsache aus, dass die charakterisierte monofunktionale Lupeolsynthase RcLUS1 aus *R. communis* nicht dieser Gruppe zugeordnet werden kann, sondern im Gegenteil keiner der beiden Triterpensynthase-Unterfamilien zuzuordnen ist. Die größte Ähnlichkeit zeigt die *RcLUS1*-Sequenz zur cDNA-Sequenz eines orthologen Gens, einer mutmaßlichen Triterpensynthase (EtOSC) aus der nah verwandten Pflanze *Euphorbia tirucalli* (Abb. 4-15). Leider liegen bis jetzt keine Informationen über die Produktspezifität dieses Enzyms vor, wenngleich ein Vergleich des Produktspektrums beider Enzyme von großem Interesse wäre. Die phylogenetischen Daten lassen den Schluss zu, dass RcLUS1 ein Vertreter einer nicht beschriebenen Klasse von Lupeolsynthesen höherer Pflanzen angehört, die sich getrennt und parallel zu den bislang charakterisierten Lupeolsynthesen in der Familie der Euphorbiaceae evolvierte.

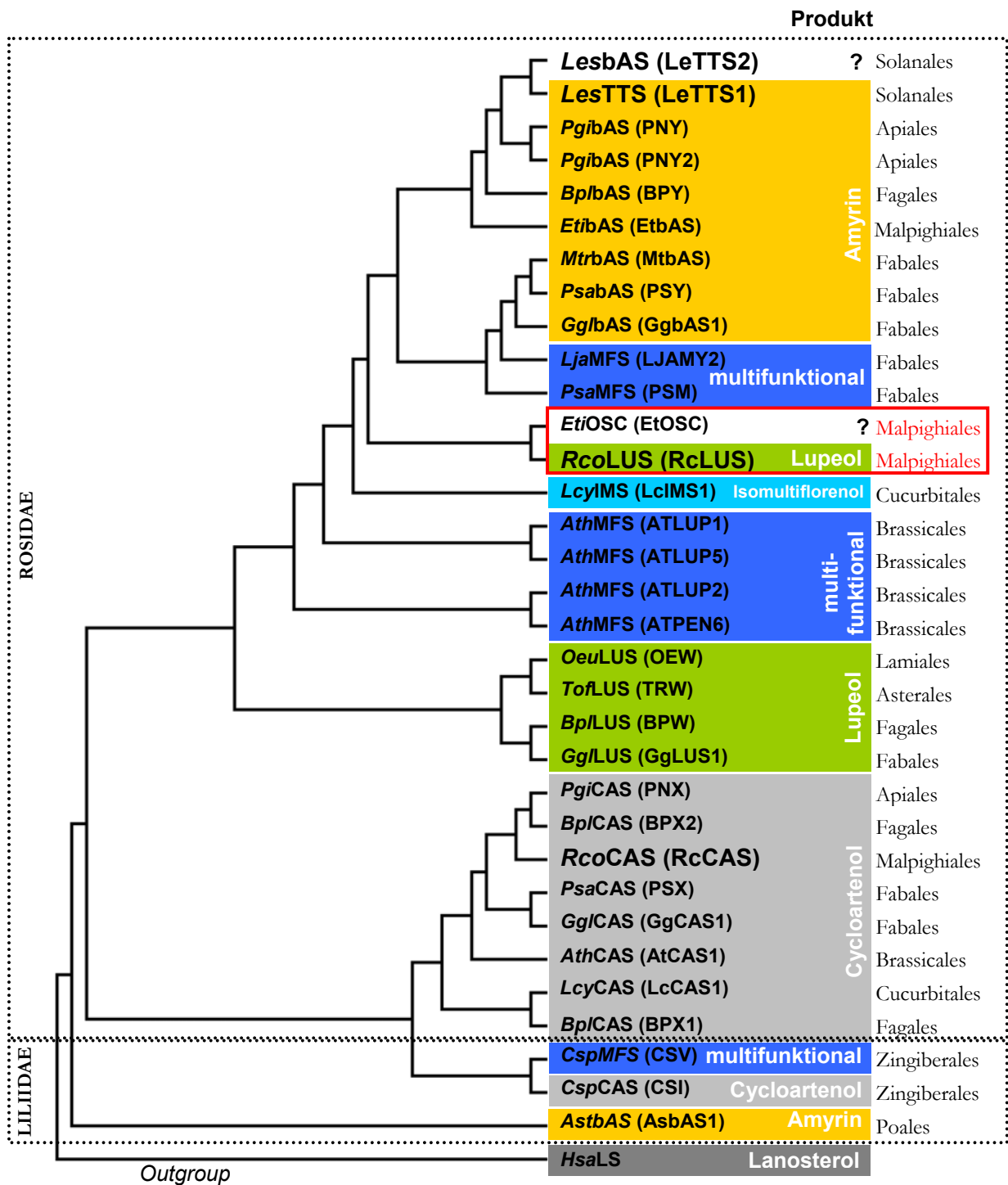
Die multifunktionalen Triterpensynthesen aus *A. thaliana* - von Philips *et al.* als paraloge Enzyme angesprochen - lassen sich keinem der drei beschriebenen Untergruppen der Epoxysqualenzyklen zuordnen, ebenso wie die monofunktionale Isomultiflorenolsynthase aus *L. cylindrica*. Eine Sonderstellung nimmt die multifunktionale Triterpensynthase CSV der

---

monokotylen Pflanze *C. speciosus* ein: Dieses Enzym weist mit 67% bis 71% ein relativ hohes Maß an Sequenzähnlichkeit zu Cycloartenolsynthesen auf. Setzt man hier einen unmittelbaren gemeinsamen Vorläufer voraus, würde CSV einen in der Entwicklung der Pflanzen relativ jungen „Evolutionssprung“ repräsentieren, der eine dramatische Veränderung der katalytischen Funktionsweise des Enzyms bei der Zyklisierung von 2,3-Oxidosqualen über das Dammarenyl-, und nicht wie bei Cycloartenolsynthesen über das Protosteryl-Kation, beinhaltet (Xiong *et al.* 2005).



**Abbildung 4-14:** Darstellung der phylogenetischen Verwandtschaftsbeziehungen pflanzlicher Epoxysqualenzyklasen auf der Grundlage eines Aminosäuresequenzalignments. Die angegebene Skala repräsentiert den Abstand von 0,1 Aminosäuresubstitution pro Site. Die Zahlen geben die Anzahl der Bootstrap-Wiederholungen an (von 1000), in denen die dargestellten Verzweigungen im Baum erzielt wurden.



**Abbildung 4-15:** Phylogenetischer Stammbaum pflanzlicher Epoxyssqualenzyklasen, erstellt auf der Basis eines Sequenzalignments der cDNA-Sequenzen (Clustal-X). Angegeben sind die jeweilige Produktspezifität der Enzyme sowie die Ordnungs-Zugehörigkeit der Arten, aus denen die Zyklenen kloniert wurden. Rot umrandet sind die Rizinus Lupeolsynthese RcLUS1 und die uncharakterisierte Epoxyssqualenzyklase der nah verwandten Pflanze *Euphorbia tirucalli*. Als Outgroup wurde die menschliche Lanosterolsynthese verwendet (GenBank- Akzessionsnummer: D63807).

#### 4.3.2.2 RcLUS1 im Vergleich zu anderen Lupeolsynthesen – Gerichtete Mutagenese-Versuche

Wie die phylogenetischen Untersuchungen verdeutlichen, nimmt RcLUS1 innerhalb der Triterpensynthesen eine Sonderstellung ein, da die Rizinus-Lupeolsynthase nur relativ geringe Ähnlichkeit zu den bisher charakterisierten Lupeolsynthesen anderer Pflanzen aufzeigt. Diese besondere Stellung erweist sich auch in dem Vorhandensein des Aminosäurerestes Phe257, da an der korrespondierenden Position in allen anderen Lupeolsynthesen ein Leucin hochkonserviert ist (vgl. Abb. 3-44), auf den im Folgenden eingegangen werden soll.

Durch die Technik der gerichteten Mutagenisierung und des gezielten Austausches einzelner Aminosäuren können Informationen über die Bedeutung einzelner AS-Reste an der katalytischen Funktionsweise des mutagenisierten Enzyms gewonnen werden. In den vergangenen Jahren wurde mit Hilfe solcher Ansätze vor allem an Cycloartenolsynthesen gezeigt, dass der Austausch bereits weniger Aminosäurereste ausreicht, um die Produktspezifität pflanzlicher Epoxysqualenzyklasen zu verändern (Hart *et al.* 1999; Meyer *et al.* 2002; Segura *et al.* 2002; Wu und Griffin 2002; Lodeiro *et al.* 2004). So konnte die Cycloartenolsynthase ATCAS1 aus *Arabidopsis thaliana* durch den Austausch der Aminosäuren His477 mit Asn und Ile481 mit Val in eine monofunktionale Lanosterolsynthase konvertiert werden (Lodeiro *et al.* 2005).

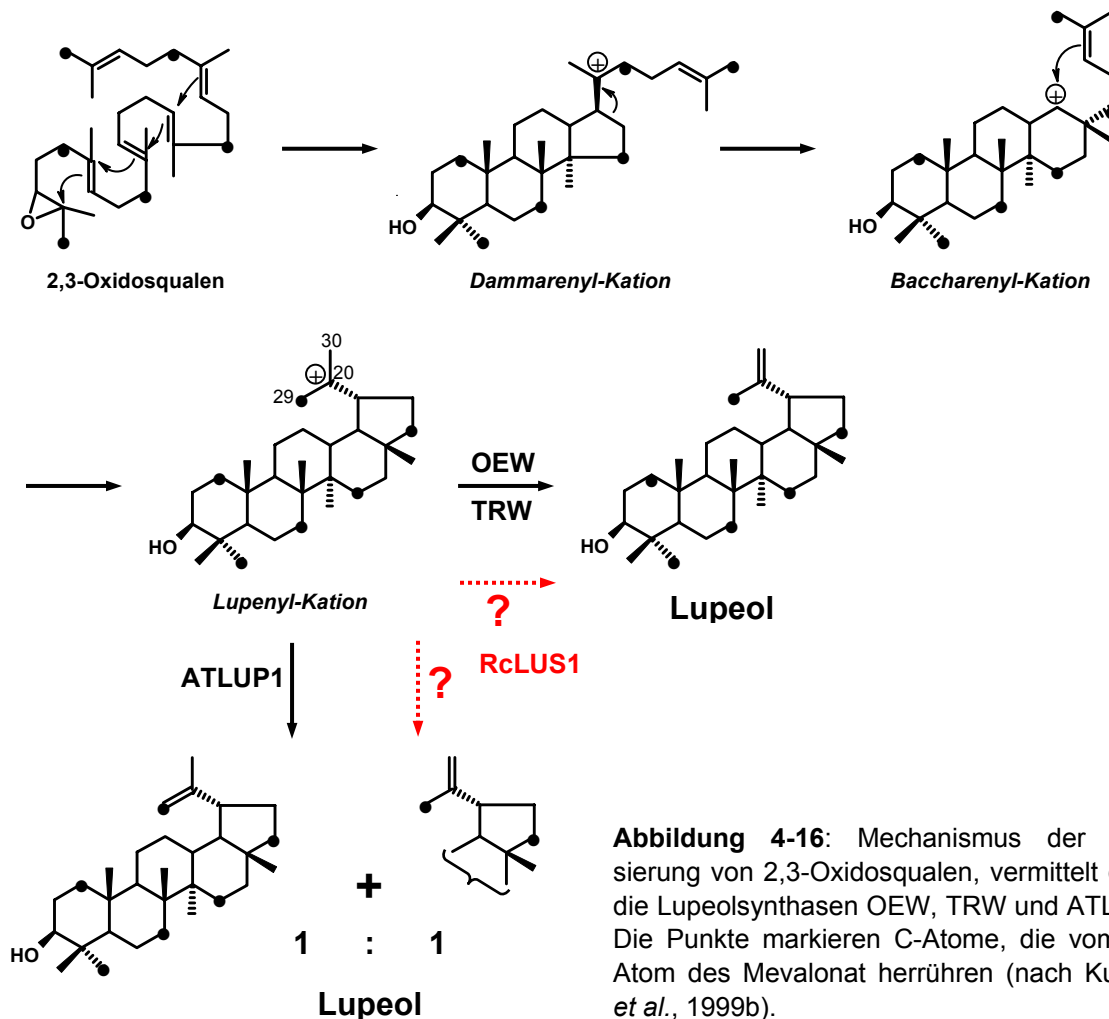
Auch an Triterpensynthesen wurde beobachtet, dass eine geringfügige Änderung in der Aminosäuresequenz der Enzyme ein verändertes Produktspektrum nach sich ziehen kann: In Untersuchungen zur Produktspezifität von Chimären aus der multifunktionalen Triterpensynthase von *Arabidopsis thaliana* (ATLUP1) und der  $\beta$ -Amyrinsynthase von *Panax ginseng* (PNY) mittels heterologer Expression in Hefe-Mutanten wurde gezeigt, dass der Austausch bereits kurzer Aminosäurebereiche ausreicht, um das Produktmuster der entsprechenden Enzym-Chimären in Richtung Lupeol bzw.  $\beta$ -Amyrin zu verschieben (Kushiro *et al.* 1999a). Kushiro *et al.* (2000b) konnten mit Hilfe von gerichteten Evolutionsansätzen darüber hinaus den Nachweis erbringen, dass das Aminosäuremotiv  $^{258}\text{MWCYCR}^{263}$  in der  $\beta$ -Amyrinsynthase von *Panax ginseng* (PNY) bzw. das entsprechende Motiv  $^{255}\text{MLCYCR}^{260}$  in der Lupeolsynthase von *Olea europea* (OEW) für die Produktspezifität der jeweiligen Triterpensynthase essenziell ist. Die Tyrosin-Reste in beiden Motiven sind dabei für die generelle Triterpensynthase-Eigenschaft beider Enzyme unabdingbar, da der Austausch von Tyrosin gegen Histidin (diese Aminosäure findet sich im entsprechenden Sequenzmotiv in allen bisher bekannten Cycloartenolsynthesen) zur Produktion verschiedener tetracyclischer Verbindungen führt, was auf einen verfrühten Abbruch der Zyklisierungsreaktion zurückgeführt werden kann. Demgegenüber kommt dem Tryptophan in PNY bzw. dem Leucin in OEW der besagten Motive besondere Bedeutung für die jeweilige

Triterpen-Produktspezifität zu, da diese Aminosäurereste auch in anderen bekannten  $\beta$ -Amyrin- bzw. Lupeolsynthesen jeweils konserviert sind. Wird Trp259 in PNY durch Leu ersetzt, so zeigt das entsprechend mutierte Enzym eine eklatante Verschiebung seines Produktspektrums von  $\beta$ -Amyrin hin zu Lupeol. Umgekehrt bewirkt der Austausch des Leu256 in OEW mit Trp eine Produkt-Verschiebung von Lupeol zu  $\beta$ -Amyrin. Es wird spekuliert, dass der aromatische Rest des Tryptophans zur Stabilisierung des instabilen Lupenyl-Kations während des Zyklisierungsprozesses entscheidend beiträgt. Auf diese Weise findet der abschließende Deprotonierungsschritt erst am Oleanyl-Kation statt, was schließlich die Bildung von  $\beta$ -Amyrin bewirkt. Im Gegensatz zu OEW führte der Austausch des Leucins mit Tryptophan im entsprechenden ATLUP1-Motiv <sup>254</sup>ILCYSR<sup>259</sup> der MTS aus *A. thaliana* nicht zu einer eklatanten Veränderung der katalytischen Funktion des Enzyms; das aktive Zentrum des nativen ATLUP1 besitzt allerdings bereits die Fähigkeit, sowohl die Zyklisierung von Lupeol, als auch von  $\beta$ -Amyrin zu katalysieren.

Das entsprechende Sequenzmotiv findet sich auch in RclUS1 wieder: <sup>256</sup>MFCYCR<sup>261</sup>. Erwartungsgemäß weist das Motiv das für Triterpensynthesen charakteristische Tyrosin auf. Anstelle von Leu257 zeigt das Rizinus-Motiv jedoch das für Lupeolsynthesen bisher nicht beschriebene und oben bereits erwähnte Phenylalanin. Um zu überprüfen, ob Phe257 auf die Produktspezifität von RclUS1 entscheidenden Einfluss hat, wurde die Mutante F257W hergestellt und funktionell charakterisiert (vgl. 3.6.2). Auch wenn die Produktmenge bei der Mutante im Vergleich zum Wildtyp stark reduziert ist, zeigt dieses Experiment, dass durch die Veränderung einer einzelnen AS eine Lupeolsynthase in eine  $\beta$ -Amyrinsynthase verwandelt werden kann, analog zu Versuchen an OEW. Der Versuch ergibt darüber hinaus, dass der aromatische Phenylalanin-Rest im nativen RclUS1-Enzym an der Terminierung der Zyklisierungsreaktion auf der Lupenyl-Kation-Ebene beteiligt ist. Davon abgeleitet ist es wahrscheinlich, dass weniger der elektrostatische Effekt als vielmehr die Sperrigkeit des Tryptophan in  $\beta$ -Amyrinsynthesen zur Ringerweiterung vom Lupenyl- zum Oleanylkation im Verlauf der Zyklisierungsreaktion beiträgt.

In der Literatur wurden zwei verschiedene Zyklisierungsmechanismen für die Synthese von Lupeol beschrieben, die sich in ihrem Deprotonierungsmechanismus unterscheiden. Durch Fütterungs-Experimente von Hefezellen, die zuvor mit den Lupeolsynthesen OEW bzw. TRW transformiert worden waren, mit [1,2-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]Acetat wurde nachgewiesen, dass diese Synthesen beim finalen Deprotonierungsschritt eine der beiden endständigen Methylgruppen des Lupenyl-Kations diskriminieren und das Proton ausschließlich von der Methylgruppe extrahieren, die sich vom C6-Atom des Mevalonats ableitet (C30-Atom; Abb. 4-16). Im Gegensatz dazu konnte in einem gleichen Versuchsaufbau nachgewiesen werden, dass die multifunktionale Triterpensynthase ATLUP1, deren Hauptzyklisierungsprodukt Lupeol darstellt, keine derartige Regiospezifität bei der Deprotonierung aufweist, so dass die

Protonenabstraktion sowohl an C<sub>29</sub> als auch an C<sub>30</sub> in jeweils gleicher Rate stattfindet (Kushiro *et al.* 1999b; Kushiro *et al.* 1999a). Diese Ergebnisse führen zu dem Schluss, dass sich im Pflanzenreich zwei Arten von Lupeolsynthesen evolvierten, die sich sowohl in ihrer Sequenz als auch im Deprotonierungsmechanismus unterscheiden. Welcher Deprotonierungsmechanismus bei RcLUS1 vorliegt, könnte nur mit Hilfe von entsprechenden Markierungsexperimenten geklärt werden, da die Sequenzähnlichkeiten keine Zuordnung zu einer der beiden Lupeolsynthese-Typen zulässt.



**Abbildung 4-16:** Mechanismus der Zyklisierung von 2,3-Oxidosqualen, vermittelt durch die Lupeolsynthesen OEW, TRW und ATLUP1. Die Punkte markieren C-Atome, die vom C2-Atom des Mevalonat herrühren (nach Kushiro *et al.*, 1999b).

#### 4.3.2.3 Genomische Sequenzen von *RcLUS1* und *RcCAS1*

Auch wenn die Genstrukturen der beiden Epoxysqualenzyklasen *RcLUS1* und *RcCAS1* mit ihrer unterschiedlichen Exonanzahl und der großen Variabilität in der Länge der Intronbereiche zunächst nicht viel gemeinsam zu haben scheinen, so zeigt sich bei genauer Betrachtung, dass beide Gene in der Länge ihrer Exons und der Positionen der Exon-Intron-Grenzen große Übereinstimmungen aufweisen. Die Größe des Exon 1 von *RcLUS1* stellt mit 675 bp die Summe der Exonlängen 1 bis 4 von *RcCAS1* dar, ist also als Fusion der vier Exons am N-terminalen Ende interpretierbar. In allen übrigen Exongrößen stimmen beide Gene miteinander überein (vgl. Abb. 3-26 und 3-27).

Vergleichsdaten zur Genstruktur pflanzlicher Epoxysqualenzyklasen stehen vor allem von *A. thaliana* zur Verfügung. Beim Gen der Cycloartenolsynthase ATCYC liegt die Anzahl der Exons wie bei *RcCAS1* bei 18 (Husselstein-Müller *et al.* 2001). Die Länge der 18 Exons stimmt dabei mit den entsprechenden Exongrößen aus *RcCAS1* nahezu exakt überein. Die *Arabidopsis*-Triterpensynthase-Gene sind durch das Vorhandensein von 13 und 17 Exons gekennzeichnet. Wie bei *RcLUS1* sind die Variationen in der Anzahl der Exons durch die Fusion einzelner Exonbereiche zu erklären; wie bei den Rizinus-Genen variiert die Intronlänge bei den einzelnen *Arabidopsis*-OSCs extrem.

Aus den genomischen Sequenzdaten von Rizinus-Epoxysqualenzyklasen und dem Vergleich mit entsprechenden Daten von *Arabidopsis thaliana* lässt sich ableiten, dass der Splicing-Mechanismus in der gesamten Genfamilie der Epoxysqualenzyklasen konserviert ist und die Exon-Intron-Grenzen jeweils weitgehend identisch sind. In dieser Klasse von Genen tritt also nicht das Phänomen des „Intron sliding“ auf, wie es beispielsweise für die Squalen-Epoxidase-Genfamilie beschrieben wurde (Schäfer *et al.* 1999).

---



## 5 Ausblick

Der Nachweis der Bedeutung von *RcLUS1* für die Biosynthese von kutikulärem Lupeol bei Individuen des Glaucous-Phänotyps von *Ricinus communis* eröffnet Möglichkeiten, das Verständnis für die Regulation und Steuerung der Biosynthese von Triterpenen, die als Wachskomponenten die Eigenschaften der pflanzlichen Kutikula beeinflussen, in der Rizinuspflanze nun weiter zu vertiefen. An erster Stelle ist hier der Mechanismus zur Transkriptionsregulation von *RcLUS1* zu nennen. Ein wichtiger Ansatzpunkt hierfür ist die Untersuchung der Promotorregion von *RcLUS1*, die vermutlich die Sprossachsen-Gewebespezifität von *RcLUS1* vermittelt. Für die Klonierung der *RcLUS1*-Promotorregion können Sequenzdaten herangezogen werden, die im Rahmen des „*Ricinus communis* whole genome shotgun sequencing project“ gewonnen wurden, das am Microbial Sequencing Center (MSC) des National Institute of Allergy and Infections Diseases (NIAID), angesiedelt am Institute for Genomic Research (TIGR), ins Leben gerufen wurde. Eine Sequenz aus dieser seit kurzem online zugänglichen Datenbank stimmt nämlich mit der 5'-codierenden Sequenz von *RcLUS1* überein und enthält zusätzlich etwa 500 bp des stromaufwärts gelegenen nicht codierenden Bereiches des Gens (WGS-Nummer: gnl|ti|1360811269). Neben der Sprossachsen-Gewebespezifität wird die Frage nach der genauen Lokalisierung der Aktivität von *RcLUS1* im Sprossachsen-Gewebe mit Hilfe von *in situ*-Hybridisierungstechniken, sowie die Rolle, die der *RcLUS1*-Promotor dabei spielt, zu beantworten sein. Das Vorhandensein bzw. Fehlen einer Epidermis-Spezifität von *RcLUS1* wird es ermöglichen zu verstehen, ob es sich bei der Ausbildung von Lupeol-Kristallen an der Sprossachsenoberfläche um einen eigenständigen, mit Kosten verbundenen Prozess handelt, oder ob dieses Phänomen als ein Seiteneffekt im Zusammenhang einer allgemein erhöhten Lupeol-Biosynthese in der Sprossachse zu interpretieren ist. In diesem Zusammenhang wird es zusätzlich wichtig sein, die Gesamtmenge an biosynthetisiertem Lupeol im Pflanzengewebe zu bestimmen und mit den quantitativen Daten aus der chemischen Analyse der kutikulären Wachse zu vergleichen. Sollte sich tatsächlich eine auf die Epidermis beschränkte Expression der Lupeolsynthese in Rizinus bestätigen, wäre es wünschenswert, den *RcLUS1*-Promotor auf seine Spezifität hin mit Hilfe von Reportergenen in *Arabidopsis* zu charakterisieren.

Um die Vorgänge der Akkumulation von Triterpenen in der pflanzlichen Kutikula eingehend zu untersuchen, wäre es von Nutzen, das Spektrum der chemischen Wachszusammensetzung in Pflanzen künstlich zu beeinflussen und zu Gunsten einer erhöhten Triterpenbiosynthese zu verändern. Mit dem *CER6*-Gen aus *Arabidopsis thaliana* steht ein Promotor zur Verfügung, der eine Epidermis-spezifische Expression eines unter seiner Kontrolle stehenden Gens ermöglicht (Hooker *et al.* 2002). Da *A. thaliana* keine

---

nennenswerten Mengen an kutikulären Triterpenverbindungen aufweist, existieren hier beste Voraussetzungen, um zu dokumentieren, ob und wie sich die Transformation von Arabidopsispflanzen mit einem Konstrukt aus *CER6*-Promotor und dem *RcLUS1*-ORF auf die kutikuläre Wachszusammensetzung in der Kutikula sowie ihre mikromorphologischen Charakteristika bis hin zu einer möglichen Bildung epikutikulärer Triterpen-Wachskristalle auswirkt.

Im Falle des Glossy-Phänotyps von *Ricinus communis* kommt es nicht zur Expression des Lupeolsynthasegens *RcLUS1*. Eine mögliche Ursache hierfür könnte eine Mutation im *RcLUS1*-Gen selbst sein. Für den Nachweis einer derartigen Mutation sollte die Sequenzierung der genomischen Sequenz von *RcLUS1* aus Individuen des Glossy-Phänotyps (Kultivar Sanguineus) durchgeführt werden.

Wie in 4.3.2.2 ausgeführt, nimmt *RcLUS1* innerhalb der bisher beschriebenen Lupeolsynthasen aufgrund der relativ geringen Sequenzähnlichkeit zu beiden Untergruppen von Triterpensynthasen mit vergleichbarer Produktspezifität eine Sonderstellung ein. Für eine funktionale Zuordnung der Lupeolsynthase aus *Ricinus communis* zu einer der beiden LUS-Untergruppen ist es notwendig, mit Markierungsversuchen analog zu Kushiro *et al.* 1999b nachzuvollziehen, welchem Protonierungsmechanismus *RcLUS1* folgt, um letztlich ein besseres Verständnis für die evolutorischen Zusammenhänge von Lupeolsynthasen in dikotylen Pflanzen zu erlangen.

Neben der Fortsetzung der Untersuchungen an *Ricinus* sollten vor allem die Arbeiten an *Lycopersicon esculentum* forciert werden. Hier gilt es zunächst, die Triterpensynthase *LeTTS2* funktionell zu charakterisieren und die Bedeutung beider Triterpensynthasen für die Synthese der kutikulären Triterpene durch Expressionsanalysen nachzuweisen. *Micro-Tom* wird sich als Pflanzensystem gut eignen, die Biosynthese von Triterpenen durch Gene-silencing der entsprechenden Synthasen über RNAi-Technik einerseits bzw. durch Überexpression mit Hilfe der Transformation mit 35S-Promotor-TTS-Konstrukten andererseits massiv zu beeinflussen, um so die Folgen solcher Manipulationen für die kutikuläre Wachszusammensetzung zu dokumentieren. Vor allem das Zusammenspiel der Triterpenkomponenten als zyklische kutikuläre Wachbestandteile mit VLC-aliphatischen Wachsverbindungen wird dabei gerade im Hinblick auf die Entstehung der Kutikulaschichtung und Bildung epikutikulärer Kristalle von großem Interesse sein.

Neben Rizinus und Tomate bieten sich in Zukunft weitere Pflanzensysteme an, die eine eingehende molekulargenetische Untersuchung der Biosynthese kutikulärer Triterpene lohnenswert erscheinen lassen und den Erkenntnisstand dieses Phänomens auf eine breitere Basis stellen werden. Allen voran ist hier die Ameisenpflanzen-Gattung *Macaranga* aus mehreren Gründen zu nennen: 1. Die chemische Analyse der Akkumulation von

---

Triterpenen in der Kutikula sowie die mikromorphologischen Charakteristika zahlreicher Arten dieser Gattung wurden bereits hinreichend untersucht und dokumentiert (Markstädter *et al.* 2000; Guhling 2002). Ein Vergleich der Expressionsmuster von charakterisierten OSCs mit wachsanalytischen Daten wäre also mit wenig Aufwand zu bewerkstelligen. 2. Das bereits entwickelte Primerdesign und die phylogenetische Verwandtschaft zu *Rizinus* sollte eine Klonierung von Triterpensynthesen aus *Macaranga*-Pflanzen relativ problemlos ermöglichen. 3. Die chemischen Analysen weisen darauf hin, dass in zahlreichen *Macaranga*-Arten die Triterpene Taraxeron und Epitaraxerol angereichert werden. TTSs mit entsprechenden Produktspektren wurden bislang nicht charakterisiert. 4. Im Falle von *Macaranga* konnte den kutikulären Triterpenen als epikutikuläre Wachskristallbildner eine konkrete ökologische Filterfunktion im Zusammenhang mit der Vergesellschaftung der Pflanzen mit ihren Partnerameisen zugewiesen werden. Diese funktionale Zuweisung macht eine weitere Erforschung der Biosynthese kutikulärer Triterpene besonders attraktiv.

---

## 6 Zusammenfassung

Pentazyklische Triterpene finden sich in großer struktureller Vielfalt als Sekundärmetabolite in Form von glycosylierten Verbindungen, aber auch als Aglykone, in zahlreichen Pflanzen. In einigen Arten akkumulieren Triterpene in großen Mengen als kutikuläre Wachbestandteile im primären Abschlussgewebe und beeinflussen auf diese Weise die Grenzflächeneigenschaften der oberirdischen Pflanzenorgane. In der vorliegenden Arbeit wurde die kutikulaspezifische Biosynthese von Triterpenen durch die Kombination molekular-genetischer und analytischer Methoden exemplarisch an *Ricinus communis* eingehend untersucht.

Die Rizinus-Pflanze tritt in zwei Sprossachsenphänotypen in Erscheinung. Der Glossy-Phänotyp weist eine grünlich-glänzende Sprossachsenoberfläche auf und ist frei von epikutikulären Wachskristallen. Die Sprossachsen von Individuen des Glaucous-Phänotyps, charakterisiert durch das weißlich-matte Erscheinungsbild ihrer Oberflächen, sind dagegen von einem dreidimensionalen Netzwerk fadenförmiger epikutikulärer Wachskristalle bedeckt. Eine vergleichende chemische Analyse zeigte, dass 67 Tage alte Hypokotyle der Individuen des Glossy-Phänotyps mit etwa  $12,5 \mu\text{g cm}^{-2}$  kutikulärem Wachs bedeckt sind. Die Zusammensetzung des kutikulären Wachsgemisches wird von VLC-aliphatischen Verbindungen dominiert, Triterpene treten nur in sehr geringen Mengen in Erscheinung. Hypokotyle der Individuen vom Glaucous-Phänotyp weisen mit  $51,9 \mu\text{g cm}^{-2}$  dagegen eine weit höhere Wachsbelegung auf, wobei das Wachsgemisch von Triterpen-Verbindungen, vor allem durch die Hauptkomponente Lupeol mit 56% der Gesamtwachsmenge dominiert wird (ca.  $1500 \mu\text{g}$  Lupeol pro Hypokotyl). Durch eine selektive Beprobung ausschließlich der epikutikulären Wachse konnte direkte Evidenz dafür gewonnen werden, dass die fadenförmigen Wachskristalle hauptsächlich aus dem Triterpenol Lupeol bestehen, da diese Komponente auch im epikutikulären Wachs stark angereichert vorlag. Um die Akkumulation von Lupeol im Laufe der frühen Sprossachsenentwicklung des Glaucous-Phänotyps zu dokumentieren, wurden entsprechende wachsanalytische Beprobungen an Hypokotylen in den ersten zwei Monaten der Keimlingsentwicklung durchgeführt. Es zeigte sich, dass Lupeol bereits in einer frühen Entwicklungsphase mit hohen Raten in die Kutikula eingelagert wird: zwischen Tag 6 und Tag 25 nach der Keimung der Pflanzen nimmt die Lupeolwachsbelegung mit einer Rate von  $1,2 \mu\text{g cm}^{-2} \text{ d}^{-1}$  zu. Bezogen auf die Biosyntheseleistung einzelner Epidermiszellen ergab sich im Zeitraum zwischen Tag 11 und Tag 18 nach der Keimung die höchste tägliche Lupeol-Zunahme mit  $0,013 \text{ ng/Zelle}$ . Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen belegten, dass die Lupeolakkumulation von einer starken Zunahme der fadenförmigen Wachskristalle in der frühen Hypokotylenentwicklung begleitet wird.

---

Vor dem Hintergrund der wachsanalytischen und mikromorphologischen Daten zur Charakterisierung beider Rizinus-Sprossachsenkutikula-Phänotypen war es nun von zentraler Bedeutung, die für die Biosynthese des kutikulären Lupeols verantwortliche Triterpensynthese zu klonieren. Mit Hilfe des entwickelten Primerdesigns zur homologie-basierten Klonierung pflanzlicher 2,3-Oxidosqualenzyklasten wurden zwei Epoxysqualenzyklasten aus *Ricinus communis* kloniert und durch heterologe Expression in der Lanosterolsynthese-defizienten Hefemutante GIL 77 jeweils als Cycloartenolsynthese (RcCAS1) und monofunktionale Lupeolsynthese (RcLUS1) charakterisiert. Um die tatsächliche Relevanz von RcLUS1 für die Biosynthese des kutikulären Lupeols nachzuweisen, wurde das Expressionsmuster des Gens in verschiedenen Pflanzenorganen sowie im Laufe der frühen Hypokotylentwicklung mit Northern-Blot-Analysen sowie semiquantitativen RT-PCR-Ansätzen untersucht. Die auf den Glaucois-Phänotyp beschränkte sprossachsenspezifische Expression und die hohe Expressionsrate von *RcLUS1* in der frühen Entwicklungsphase mit einem Peak an Tag 12 nach der Keimung stimmte exakt mit der zeitlichen Akkumulation von Lupeol in der Sprossachsenkutikula bei Individuen des Glaucois-Phänotyps überein. Damit handelt es sich bei RcLUS1 um die erste charakterisierte Triterpensynthese, die für die Bildung kutikulärer Triterpene verantwortlich gemacht werden kann. Im Gegensatz zur Lupeolsynthese zeigte die Cycloartenolsynthese aus Rizinus ein für „Housekeeping-Enzyme“ typisches konstitutives Expressionsmuster in allen Pflanzenorganen sowie während der gesamten frühen Entwicklungsphase der Hypokotyle.

Mit dem Nachweis der Kutikularelevanz der Lupeolsynthese RcLUS1 konnte zum ersten Mal ein tieferes Verständnis für den Mechanismus der Triterpenbiosynthese bzw. –akkumulation in der pflanzlichen Kutikula gewonnen werden: Die Biosynthese von kutikulären Triterpenen wird über die enzymatisch gesteuerte Zyklisierung von 2,3-Oxidosqualen bewerkstelligt. Offensichtlich spielt eine Transkriptionsregulation auf der Ebene der jeweiligen Triterpensynthese dabei eine zentrale Rolle. Zukünftige eingehende Promotor-Untersuchungen sollten die Kenntnis über die Regulationsmechanismen der Triterpen-Biosynthese entscheidend erweitern können.

Im Falle der Rizinuspflanze bewirkt die Hochregulierung von *RcLUS1* und die damit verbundene Ausbildung epikutikulärer Wachskristalle eine dramatische Veränderung der chemischen und physikalischen Stamm-Oberflächenmerkmale des Glaucois-Phänotyps, wie in ersten Lauffests mit *Crematogaster*-Ameisen gezeigt werden konnte. Inwieweit diese Veränderungen der Kutikula-Eigenschaften im ökologischen Kontext der Pflanze von entscheidender Bedeutung sind, muss in geeigneten Untersuchungen nachgewiesen werden.

Phylogenetische Vergleiche zeigten, dass RcLUS1 erstaunlicherweise nur relativ geringe Sequenzähnlichkeiten zu den bisher charakterisierten Lupeolsynthasen aufweist und somit

als Vertreter einer bisher nicht beschriebenen Klasse pflanzlicher Triterpensynthesen angesprochen werden muss. Durch gerichtete Mutagenisierung wurde die *RcLUS1*-Mutante F257W hergestellt und funktionell charakterisiert. Das Produktspektrum der mutagenisierten Lupeolsynthase verschob sich von Lupeol nach  $\beta$ -Amyrin und bestätigte damit die Bedeutung des dem Phenylalanin in bASs korrespondierenden Tryptophans für die katalytische Funktionalität dieser Enzyme.

Mit der Klonierung der Triterpensynthesen LeTTS1 und LeTTS2 aus *Lycopersicon esculentum* wurde der erste wichtige Schritt für ein tieferes Verständnis der Biosynthese kutikulärer Triterpene in dieser Pflanze getan. LeTTS1 konnte als  $\beta$ -Amyrinsynthase charakterisiert werden, die Charakterisierung der Produktspezifität von LeTTS2 bleibt als dringendes Desiderat nachfolgenden Arbeiten vorbehalten. Im Gegensatz zur Stammkutikula des Glaucous-Phänotyps von *Ricinus communis* werden in die Fruchtkutikula von Tomate nicht nur ein, sondern mit  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\delta$ -Amyrin gleich drei Triterpene in größeren Mengen eingelagert. Der Nachweis einer tatsächlichen Relevanz der klonierten OSCs für die Biosynthese dieser kutikulären Triterpene muss durch Untersuchungen zur Expression dieser Gene erbracht werden. Für zukünftige Arbeiten zur Biosynthese kutikulärer Triterpene dürfte *Lycopersicon esculentum* ein vielversprechendes Modellsystem abgeben. Zum einen liegen durch die Arbeiten von Bauer und Vogg bereits detaillierte Daten zur chemischen Zusammensetzung der Kutikulawachse vor. Zum anderen dürfte die Anwendung molekular-genetischer Methoden wie beispielsweise das Herstellen von Knockout-Mutanten oder die eingehende Untersuchung der Promotorregionen relevanter Gene in diesem Pflanzensystem leichter zu bewerkstelligen sein als bei Arten wie *Ricinus communis*, die weniger im Fokus der molekularphysiologischen Pflanzenforschung stehen.

---

## 7 Summary

Pentacyclic triterpenoids are a large group of secondary metabolites found in different plant species, either as glycoside conjugates or as aglycones. The latter in many cases accumulate to high amounts in the cuticular wax and hence the primary surface of above-ground plant organs, influencing their surface properties. In the present work, the cuticle-specific formation of triterpenoids was investigated in *Ricinus communis* stems, combining analytical and molecular genetic methods.

Two phenotypes of castor bean could be distinguished based on the appearance of the surface of all stem portions including the hypocotyls: The stems of the glossy phenotype exhibit a green, glossy surface, and are devoid of wax crystals but instead covered by an epicuticular wax film. In contrast, the stems of the glaucous phenotype are covered by a layer of thread-like epicuticular wax crystals, forming a dense three dimensional network. Comparative studies by GC-FID analysis revealed that the cuticles of 67-day old hypocotyls of the glossy and the glaucous phenotypes contained 12.5 and 51.9  $\mu\text{g cm}^{-2}$ , respectively. The wax mixture of the glossy phenotype was dominated by VLC aliphatic compounds, whereas triterpenoids represented only small portions of the wax. In the cuticular wax of the glaucous phenotype, VLC aliphatics were found in similar absolute amounts as in the glossy phenotype, whereas the triterpene loads were significantly higher. Here, the wax mixture was dominated by lupeol, making it the single most abundant component (56% of the total wax, approx. 1500  $\mu\text{g}$  lupeol per hypocotyl). Hence, the formation of epicuticular wax crystals on stems and hypocotyls of glaucous individuals is correlated with the accumulation of large amounts of lupeol in the corresponding stem wax. This correlation suggests that the thread-like crystals are formed by this triterpenol. Additionally, selective sampling of the epicuticular wax fraction gave direct evidence that the threads on glaucous hypocotyls are mainly formed by lupeol, due to the fact that this compound was found to be enriched in the outermost cuticle compartment. To monitor the accumulation of cuticular lupeol during ontogenesis, the chemical composition of the wax mixture was studied at different stages of hypocotyl growth. In these investigations, lupeol was found to accumulate rapidly during early development at the surface of glaucous hypocotyls: between day 6 and day 25 the lupeol load increased by a daily rate of 1.2  $\mu\text{g cm}^{-2}$ . During the period of highest lupeol increase from day 11 to day 18, a daily rate of 0.013 ng/cell could be calculated. Within that early time period a sharp increase in the number of epicuticular wax crystals on the surface of glaucous hypocotyls was observed by SEM.

Based on the cuticular wax analyses of both stem phenotypes, it was hypothesized that a triterpene synthase should exist in castor bean responsible for the biosynthesis of cuticular lupeol in the glaucous phenotype. In a homology-based cloning approach two epoxy-

---

squalene cyclases were cloned from *R. communis*, functionally expressed in the yeast strain GIL 77 and characterized as a cycloartenol synthase (RcCAS1) and a lupeol synthase (RcLUS1). To prove the cuticle-relevance of RcLUS1, gel blot analyses and RT-PCR analyses were carried out to determine the expression patterns of this gene in *Ricinus communis*. Both the organ-specific expression of *RcLUS1* (with an expression exclusively in stems of the glaucous phenotype) and the expression pattern during hypocotyl development (with a peak at day 12) exactly matched the accumulation of cuticular lupeol in the plant. In contrast, *RcCAS1* was constitutively expressed in all organs at various times, as it was expected for a synthase involved in primary metabolism of the plant. From the strong correlation of the organ specific and time dependent accumulation of lupeol in the cuticle of glaucous hypocotyls on the one hand, and the expression patterns of the *RcLUS1* gene on the other, it can be concluded that the lupeol synthase RcLUS1 from castor bean is the central enzyme responsible for the biosynthesis of cuticular lupeol. This is the first report on a cuticle-relevant triterpene synthase.

In castor bean, the biosynthesis of cuticular triterpenoids is accomplished by enzymatic cyclisation of the substrate 2,3-oxidosqualene and obviously controlled by a transcription regulation of the corresponding epoxysqualene cyclase. It would be of high interest to investigate the promoter region of the *RcLUS1* gene to get a deeper understanding of the regulation mechanisms leading to the formation of cuticular lupeol. The up-regulation of *RcLUS1* in the glaucous stems causes the formation of the epicuticular crystals on the surface of the plants, *i.e.* the glaucous phenotype of castor bean, and hence leading to dramatic changes in the chemical and physical properties of the stem surface (*e.g.* to hamper insect adhesion on vertical plant structures, as it was shown in tests with *Crematogaster* ants). It remains to be investigated whether these implications are of crucial significance in the ecological context of the plant.

Phylogenetic analyses revealed that RcLUS1 surprisingly exhibits only weak sequence similarities to the two clades of so far known lupeol synthases and was thus interpreted as a first member of a new class of lupeol synthases in higher plants. The exceptional position of RcLUS1 within the clade of dicot triterpene synthases is further underlined by a particular amino acid involved in enzyme catalysis: instead of a Leu residue, highly conserved in lupeol synthases, RcLUS1 contains a Phe at position 257. The RcLUS1 mutant F257W was created by a site-directed mutagenesis approach and the mutated enzyme was functionally characterized in yeast. The mutation resulted in an altered product pattern, switching from lupeol to  $\beta$ -amyrin, thus confirming the importance of the corresponding Trp in bASs for the catalytical function of these enzymes.

---



Besides *Ricinus communis*, *Lycopersicon esculentum* was chosen as a model plant to study the biosynthesis of cuticular triterpenes. The implementation of the homology-based primer design and cloning strategy developed for castor bean led to the successful cloning of two triterpene synthases from *L. esculentum*. One of these enzymes, LeTTS1, was characterized as a monofunctional  $\beta$ -amyrin synthase. The characterization of the second triterpene synthase LeTTS2 has to be carried out in future investigations. In contrast to the glaucous stems of *R. communis*, with  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\delta$ -amyrin, more than one single triterpene compound accumulates to high amounts in the tomato fruit cuticle. The evidence of the cuticle-relevance of the cloned epoxysqualene cyclases LeTTS1 and LeTTS2 has to be proven in accompanying experiments by determination of the expression patterns of these genes. Two circumstances point to the fact that *Lycopersicon esculentum* will be a promising model system for the examination of cuticular triterpene biosynthesis in future: First, there are detailed analytical data available from the literature, describing the chemical composition of the cuticular wax mixture. Second: The use of a broad range of molecular genetic techniques as the fundament for extensive investigations of triterpene biosynthesis can be established much more easily in tomato than in other plants like castor bean.

---

## 8 Literaturverzeichnis

- Abe I, Rohmer M, Prestwich GD (1993) Enzymatic cyclization of squalene and oxidosqualene to sterols and triterpenes. *Chemical Reviews* **93**, 2189-2206.
- Agerbirk N, Olsen CE, Bibby BM, Frandsen HO, Brown LD, Nielsen JK, Renwick JA (2003) A saponin correlated with variable resistance of *Barbarea vulgaris* to the diamondback moth *Plutella xylostella*. *Journal of Chemical Ecology* **29**, 1417-1433.
- Aharoni A, Dixit S, Jetter R, Thoenes E, van Arkel G, Pereira A (2004) The SHINE clade of AP2 domain transcription factors activates wax biosynthesis, alters cuticle properties, and confers drought tolerance when overexpressed in Arabidopsis. *Plant Cell* **16**, 2463-2480.
- Akihisa T, Yasukawa K, Oinuma H, Kasahara Y, Yamanouchi S, Takido M, Kumaki K, Tamura T (1996) Triterpene alcohols from the flowers of compositae and their anti-inflammatory effects. *Phytochemistry* **43**, 1255-1260.
- Baisted DJ (1971) Sterol and triterpene synthesis in the developing and germinating pea seed. *Biochemical Journal* **124**, 375-383.
- Baker EA (1982) Chemistry and morphology of plant epicuticular waxes. In: The plant cuticle, Linnean Society Symposium Series Vol. 10. (Eds DF Cutler, KL Alvin, und CE Price) pp. 139-165. (Academic Press : London)
- Barthlott W, Neinhuis C (1997) Purity of the sacred lotus, or escape from contamination in biological surfaces. *Planta* **202**, 1-8.
- Barthlott W, Neinhuis C, Cutler D, Ditsch F, Meusel I, Theisen I, Wilhelmi H (1998) Classification and terminology of plant epicuticular waxes. *Botanical Journal of the Linnean Society* **126**, 237-260.
- Barthlott W, Wollenweber E (1981) Zur Feinstruktur, Chemie und taxonomischen Signifikanz Epicuticularer Wachse und ähnlicher Sekrete. *Tropische und Subtropische Pflanzenwelt* **32**, 7-67.
- Bauer S (2002) Die Zusammensetzung der Oberflächenwachse von Tomaten, Paprika und Auberginen. Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät.
- Bauer S, Schulte E, Thier H-P (2004) Composition of the surface wax from tomatoes - II. Quantification of the components at the ripe red stage and during ripening. *European Food and Research Technology* **219**, 487-491.
- Benveniste P (2004) Biosynthesis and accumulation of sterols. *Annual Review of Plant Biology* **55**, 429-457.
- Bianchi G (1995) Plant waxes. In: Waxes: Chemistry, molecular biology and functions. (Ed. RJ Hamilton) pp. 175-222. (The Oily Press : West Ferry)
- Bianchi G, Murelli C, Vlahov G (1992) Surface waxes from olive fruits. *Phytochemistry* **31**(10), 3503-3506.
- Bickel-Sandkötter S (2001) Nutzpflanzen und ihre Inhaltsstoffe. (Quelle & Meyer : Wiebelsheim)
- Brown GD (1998) The biosynthesis of steroids and triterpenoids. *Natural Product Reports* **15**, 653-696.
-

- Burghardt M, Riederer M (2006) Cuticular transpiration. In: Biology of the plant cuticle. (Eds M Riederer und C Müller) pp. 292-311. (Blackwell : Oxford)
- Caldwell MM, Robberecht R, Flint SD (1983) Internal filters: prospects for uv-acclimation in higher plants. *Physiologia Plantarum* **58**, 445-450.
- Carver TL, Gurr SJ (2006) Filamentous fungi on plant surfaces. In: Biology of the plant cuticle. (Eds M Riederer und C Müller) pp. 368-397. (Blackwell : Oxford)
- Carver TLW, Thomas BJ, Ingersonmorris SM, Roderick HW (1990) The role of the abaxial leaf surface waxes of *Lolium* Spp. in resistance to *Erysiphe graminis*. *Plant Pathology* **39**(4), 573-583.
- Chen DH, Ronald PC (1999) A rapid DNA minipreparation method suitable for AFLP and other PCR applications. *Plant Molecular Biology Reporter* **17**, 53-57.
- Clark JB, Lister GR (1975) Photosynthetic action spectra of trees 2. The relationship of cuticle structure to the visible and uv spectral properties of needles from four coniferous species. *Plant Physiology* **55**, 407-413.
- Corey EJ, Matsuda SPT, Bartel B (1993) Isolation of an *Arabidopsis thaliana* gene encoding cycloartenol synthase by functional expression in a yeast mutant lacking lanosterol synthase by the use of a chromatographic screen. *PNAS* **90**, 11628-11632.
- Deising H, Nicholson RL, Haug M, Howard RJ, Mendgen K (1992) Adhesion pad formation and the involvement of cutinase and esterases in the attachment of uredospores to the host cuticle. *Plant Cell* **4**(9), 1101-1111.
- Eastmond PJ (2004) Cloning and characterization of the acid lipase from castor beans. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 45540-45545.
- Ebizuka Y, Katsube Y, Tsutsumi T, Kushiro T, Shibuya M (2003) Functional genomics approach to the study of triterpene biosynthesis. *Pure and Applied Chemistry* **75**, 369-374.
- Eigenbrode SD (1996) Plant surface waxes and insect behaviour. In: Plant cuticles: an integrated functional approach. (Ed. G Kerstiens) pp. 201-222. (BIOS Scientific Publishers : Oxford)
- Ensikat HJ, Neinhuis C, Barthlott W (2000) Direct acces to plant epicuticular wax crystals by a new mechanical isolation method. *International Journal of Plant Science* **1**, 148.
- Evershed RP, van Bergen PF, Peakman TM, Leigh-Firbank EC, Horton MC, Edwards D, Biddle M, Kjolbye-Biddle B, Rowley-Conwy PA (1997) Archaeological frankincense. *Nature* **390**, 667-668.
- Federle W, Brainerd EL, McMahon TA, Hölldobler B (2001) Biomechanics of the movable pretarsal adhesive organ in ants and bees. *PNAS* **98**, 6215-6220.
- Federle W, Maschwitz U, Fiala B, Riederer M, Hölldobler B (1997) Slippery ant-plants and skilful climbers: selection and protection of specific ant partners by epicuticular wax blooms in *Macaranga* (Euphorbiaceae). *Oecologia* **112**, 217-224.
- Fernandez MA, las Heras B, Garcia MD, Saenz MT, Villar A (2001) New insights into the mechanism of action of the anti-inflammatory triterpene lupeol. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **53**, 1533-1539.
- Garcia S, Heinzen H, Hubbuch C, Martinez R, de Vries X, Moyna P (1995) Triterpene methyl ethers from palmae epicuticular waxes. *Phytochemistry* **39**, 1381-1382.
-

- Gietz RD, Woods RA (2002) Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods in Enzymology* **350**, 87-96.
- Gniwotta F, Vogg G, Gartmann V, Carver TL, Riederer M, Jetter R (2005) What do microbes encounter at the plant surface? Chemical composition of pea leaf cuticular waxes. *Plant Physiology* **139**, 519-530.
- Gormann R, Schreiber L, Kolodziej H (2004) Cuticular wax profiles of leaves of some traditionally used African Bignoniaceae. *Zeitschrift für Naturforschung [C]* **59**, 631-635.
- Griffiths DW, Robertson GW, Shepherd T, Birch AN, Gordon SC, Woodford JA (2000) A comparison of the composition of epicuticular wax from red raspberry (*Rubus idaeus* L.) and hawthorn (*Crataegus monogyna* Jacq.) flowers. *Phytochemistry* **55**, 111-116.
- Guhling O (2002) Zusammensetzung und Bildung der Oberflächenstrukturen auf verschiedenen Organen von *Macaranga tanarius*. Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Fakultät für Biologie.
- Guhling O, Hobl B, Yeats T, Jetter R (2006) Cloning and characterization of a lupeol synthase involved in the synthesis of epicuticular wax crystals on stem and hypocotyl surfaces of *Ricinus communis*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **448**, 60-72.
- Guhling O, Kinzler C, Dreyer M, Bringmann G, Jetter R (2005) Surface composition of myrmecophilic plants: cuticular wax and glandular trichomes on leaves of *Macaranga tanarius*. *Journal of Chemical Ecology* **31**, 2323-2341.
- Gülz PG, Müller E, Moog B (1988) Epicuticular leaf waxes of *Tilia tomentosa* Moench. and *Tilia x europaea* L., Tiliaceae. *Zeitschrift für Naturforschung [C]* **43**, 173-176.
- Gülz P-G, Müller E, Schmitz K, Marner F-J, Güth S (1992) Chemical composition and surface structures of epicuticular leaf waxes of *Ginkgo biloba*, *Magnolia grandiflora* and *Liriodendron tulipifera*. *Zeitschrift für Naturforschung [C]* **47**, 516-526.
- Haas K, Bauer M, Wollenweber E (2003) Cuticular waxes and flavonol aglycones of mistletoes. *Zeitschrift für Naturforschung [C]* **58**, 464-470.
- Hanley BA, Schuler MA (1988) Plant intron sequences: evidence for distinct groups of introns. *Nucleic Acids Research* **16**, 7159-7176.
- Haralampidis K, Bryan G, Papadopoulou K, Bakht S, Melton R, Osbourn AE (2001) A new class of oxidosqualene cyclases directs synthesis of antimicrobial phytoprotectants in monocots. *PNAS* **98**, 13431-13436.
- Haralampidis K, Trojanowska M, Osbourn AE (2002) Biosynthesis of triterpenoid saponins in plants. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* **75**, 31-49.
- Haridas V, Higuchi M, Jayatilake GS, Bailey D, Mujoo K, Blake ME, Arntzen CJ, Gutterman JU (2001) Avicins: triterpenoid saponins from *Acacia victoriae* (Benth) induce apoptosis by mitochondrial perturbation. *PNAS* **98**, 5821-5826.
- Harley R (1991) The greasy pole syndrome. In: Ant-plant interactions. (Eds CR Huxley und DF Cutler) pp. 430-433. (Oxford University Press : Oxford)
- Hart EA, Hua L, Darr LB, Wilson WK, Pang J, Matsuda SPT (1999) Directed evolution to investigate steric control of enzymatic oxidosqualene cyclization. An isoleucine-to-valine mutation in cycloartenol synthase allows lanosterol and parkeol biosynthesis. *Journal of the American Chemical Society* **121**, 9887-9888.
-

- Hayashi H, Hiraoka N, Ikeshiro Y, Kushiro T, Morita M, Shibuya M, Ebizuka Y (2000) Molecular cloning and characterization of a cDNA for *Glycyrrhiza glabra* cycloartenol synthase. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **23**, 231-234.
- Hayashi H, Huang P, Inoue K, Hiraoka N, Ikeshiro Y, Yazaki K, Tanaka S, Kushiro T, Shibuya K, Ebizuka Y (2001a) Molecular cloning and characterization of isomultiflorenol synthase, a new triterpene synthase from *Luffa cylindrica*, involved in biosynthesis of bryonolic acid. *European Journal of Biochemistry* **268**, 6311-6317.
- Hayashi H, Huang P, Kirakosyan A, Inoue K, Hiraoka N, Ikeshiro Y, Kushiro T, Shibuya M, Ebizuka Y (2001b) Cloning and characterization of a cDNA encoding b-amyirin synthase involved in glycyrrhizin and soyasaponin biosyntheses in licorice. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **24**, 912-916.
- Hayashi H, Huang PY, Inoue K (2003) Up-regulation of soyasaponin biosynthesis by methyl jasmonate in cultured cells of *Glycyrrhiza glabra*. *Plant and Cell Physiology* **44**, 404-411.
- Hayashi H, Huang PY, Takada S, Obinata M, Inoue K, Shibuya M, Ebizuka Y (2004) Differential expression of three oxidosqualene cyclase mRNAs in *Glycyrrhiza glabra*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **27**, 1086-1092.
- Hemmers H, Gülz P-G, Marner FJ (1988) Triterpenoids in epicuticular waxes of three European *Euphorbia* species. *Zeitschrift für Naturforschung [C]* **43**, 799-805.
- Hemmers H, Gülz P-G, Marner FJ (1989a) Tetra- and pentacyclic triterpenoids from epicuticular wax of *Euphorbia cyparissias* L., Euphorbiaceae. *Zeitschrift für Naturforschung [C]* **44**, 563-567.
- Hemmers H, Gülz P-G, Marner FJ, Wray V (1989b) Pentacyclic triterpenoids in epicuticular waxes from *Euphorbia lathyris* L., Euphorbiaceae. *Zeitschrift für Naturforschung [C]* **44**, 193-201.
- Henry M, Rahier A, Taton M (1992) Effect of gypsogenin 3,O-glucuronide pretreatment of *Gypsophila paniculata* and *Saponaria officinalis* cell suspension cultures on the activities of microsomal 2,3-oxidosqualene cycloartenol and amyirin cyclases. *Phytochemistry* **31**, 3855-3859.
- Herrera JBR, Bartel B, Wilson WK, Matsuda SPT (1998) Cloning and characterization of the *Arabidopsis thaliana* lupeol synthase gene. *Phytochemistry* **49**, 1905-1911.
- Herrera JBR, Wilson WK, Matsuda SPT (2000) A tyrosine-to threonine mutation converts cycloartenol synthase to an oxidosqualene cyclase that forms lanosterol as its major product. *Journal of the American Chemical Society* **122**, 6765-6766.
- Hobl B (2005) Zusammensetzung, Struktur und Bildung der Kutikularwachse auf dem Hypokotyl von *Ricinus communis*. Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Fakultät für Biologie.
- Holloway PJ (1969) Chemistry of leaf waxes in relation to wetting. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **20**, 124-128.
- Holloway PJ (1970) Surface factors affecting the wetting of leaves. *Pesticide Science* **1**, 156-163.
- Holloway PJ (1982) Structure and histochemistry of plant cuticular membranes: an overview. In: The plant cuticle, Linnean Society Symposium Series, Vol. 10. (Eds DF Cutler, KL Alvin, and CE Price) pp. 1-32. (Academic Press : London)
-

- Hooker TS, Millar AA, Kunst L (2002) Significance of the Expression of the CER6 Condensing Enzyme for Cuticular Wax Production in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **129**, 1568-1580.
- Hostettmann K, Marston A (1995) Saponins. (Cambridge University Press : Cambridge)
- Husselstein-Müller T, Schaller H, Benveniste P (2001) Molecular cloning and expression in yeast of 2,3-oxidosqualene-triterpenoid cyclases from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* **45**, 75-92.
- Iturbe-Ormaetxe I, Haralampidis K, Papadopoulou K, Osbourn AE (2003) Molecular cloning and characterization of triterpene synthases from *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus*. *Plant Molecular Biology* **51**, 731-743.
- Jeffree CE (1986) The cuticle, epicuticular waxes and trichomes of plants, with reference to their structure, functions and evolution. In: Insects and the plant surface (Eds B Juniper und R Southwood) pp. 23-135. (E. Arnold : London)
- Jeffree CE (2006) The fine structure of the plant cuticle. In: Biology of the plant cuticle. (Eds M Riederer und C Müller) pp. 11-125. (Blackwell : Oxford)
- Jeffree CE, Johnson RPC, Jarvis PG (1971) Epicuticular wax in the stomatal antechamber of sitka spruce and its effects on the diffusion of water vapour and carbon dioxide. *Planta* **98**, 1-10.
- Jenks MA, Tuttle HA, Feldmann KA (1996) Changes in epicuticular waxes on wildtype and *eceriferum* mutants in *Arabidopsis* during development. *Phytochemistry* **42**, 29-34.
- Jetter R, Kunst L, Samuels AL (2006) Composition of plant cuticular waxes. In: Biology of the plant cuticle. (Eds M Riederer und C Müller) pp. 145-181. (Blackwell : Oxford)
- Jetter R, Riederer M (1994) Epicuticular crystals of nonacosan-10-ol: *in vitro* reconstitution and factors influencing crystal habits. *Planta* **195**, 257-270.
- Jetter R, Riederer M (1995) In vitro reconstitution of epicuticular wax crystals. Formation of tubular aggregates by alkanediols. *Botanica Acta* **108**, 111-120.
- Jetter R, Schäffer S (2001) Chemical composition of the *Prunus laurocerasus* leaf surface. Dynamic changes of the epicuticular wax film during leaf development. *Plant Physiology* **126**, 1725-1737.
- Jetter R, Schäffer S, Riederer M (2000) Leaf cuticular waxes are arranged in chemically and mechanically distinct layers: evidence from *Prunus laurocerasus* L. *Plant, Cell and Environment* **23**, 619-628.
- Juniper BE (1995) Waxes on plant surfaces and their interactions with insects. In: Waxes: Chemistry, molecular biology and functions. (Ed. RJ Hamilton) pp. 157-176. (The Oily Press : West Ferry)
- Kajikawa M, Yamato KT, Fukuzawa H, Sakai Y, Uchida H, Ohyama K (2005) Cloning and characterization of a cDNA encoding beta-amyrin synthase from petroleum plant *Euphorbia tirucalli* L. *Phytochemistry* **66**, 1759-1766.
- Kawano N, Ichinose K, Ebizuka Y (2002) Molecular cloning and functional expression of cDNAs Encoding Oxidosqualen cyclases from *Costus speciosus*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **25**, 477-482.
-

- Knoche M, Peschel S, Hinz M, Bukovac MJ (2000) Studies on water transport through the sweet cherry fruit surface: characterizing conductance of the cuticular membrane using pericarp segments. *Planta* **212**, 127-135.
- Knoll F (1914) Über die Ursache des Ausgleitens der Insektenbeine an wachsbedeckten Pflanzenteilen. *Jahrbuch der wissenschaftlichen Botanik* **54**, 448-497.
- Kolattukudy PE, Croteau R, Buckner JS (1976) Biochemistry of plant waxes. In: Chemistry and biochemistry of natural waxes. (Ed. PE Kolattukudy) pp. 289-347. (Elsevier : Amsterdam)
- Kolesnikova MD, Xiong Q, Lodeiro S, Hua L, Matsuda SP (2006) Lanosterol biosynthesis in plants. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **447**, 87-95.
- Kunst L, Jetter R, Samuels AL (2006) Biosynthesis and transport of plant cuticular waxes. In: Biology of the plant cuticle. (Eds M Riederer and C Müller) pp. 182-215. (Blackwell : Oxford)
- Kunst L, Samuels AL (2003) Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax. *Progress in Lipid Research* **42**, 51-80.
- Kushiro T, Shibuya M, Ebizuka Y (1998)  $\beta$ -Amyrin synthase. Cloning of oxidosqualene cyclase that catalyzes the formation of the most popular triterpene among higher plants. *European Journal of Biochemistry* **256**, 238-244.
- Kushiro T, Shibuya M, Ebizuka Y (1999a) Chimeric triterpene synthase. A possible model for multifunctional triterpene synthase. *Journal of the American Chemical Society* **121**, 1208-1216.
- Kushiro T, Shibuya M, Ebizuka Y (1999b) Cryptic regioselectivity in deprotonation step of triterpene biosynthesis catalyzed by new members of lupeol synthase. *Tetrahedron Letters* **40**, 5553-5556.
- Kushiro T, Shibuya M, Masuda K, Ebizuka Y (2000a) A novel multifunctional triterpene synthase from *Arabidopsis thaliana*. *Tetrahedron Letters* **41**, 7705-7710.
- Kushiro T, Shibuya M, Masuda K, Ebizuka Y (2000b) Mutational studies on triterpene synthases: engineering lupeol synthase into  $\beta$ -amyrin synthase. *Journal of the American Chemical Society* **122**, 6816-6824.
- Laurent P, Dooms C, Braekman JC, Daloz D, Habib-Jiwan JL, Rozenberg R, Termonia A, Pasteels JM (2003) Recycling plant wax constituents for chemical defense: hemi-biosynthesis of triterpene saponins from beta-amyrin in a leaf beetle. *Naturwissenschaften* **90**, 524-527.
- Lichtenthaler HK, Rohmer M, Schwender J (1997) Two independent biochemical pathways for isopentenyl diphosphate and isoprenoid biosynthesis in higher plants. *Physiologia Plantarum* **101**, 643-652.
- Lodeiro S, Schulz-Gasch T, Matsuda SP (2005) Enzyme redesign: two mutations cooperate to convert cycloartenol synthase into an accurate lanosterol synthase. *Journal of the American Chemical Society* **127**, 14132-14133.
- Lodeiro S, Segura MJR, Stahl M, Schulz-Gasch T, Matsuda SPT (2004) Oxidosqualene Cyclase Second-Sphere Residues Profoundly Influence the Product Profile. *Chem Biol Chem* **5**, 1581-1585.
- Mahato SB, Sen S (1997) Advances in triterpenoid research, 1990-1994. *Phytochemistry* **44**, 1185-1236.
-

- Manheim BS, Mulroy TW (1978) Triterpenoids in epicuticular waxes of *Dudleya* species. *Phytochemistry* **17**, 1799-1800.
- Markstädter C, Federle W, Jetter R, Riederer M, Hölldobler B (2000) Chemical composition of the slippery epicuticular wax blooms on *Macaranga* (Euphorbiaceae) ant-plants. *Chemoecology* **10**, 33-40.
- Martin-Smith M, Subramanian G, Connor HE (1967) Surface wax components of five species of *Cortaderia* (Gramineae) - a chemotaxonomic comparison. *Phytochemistry* **6**, 559-572.
- Mercure EW, Kunoh H, Nicholson RL (1994) Adhesion of *Colletotrichum graminicola* conidia to corn leaves: a requirement for disease development. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **45**, 407-420.
- Meusel I, Neinhuis C, Markstädter C, Barthlott W (1999a) Chemical composition and recrystallization of epicuticular waxes: coiled rodlets and tubules. *Plant Biology* **2**, 462-470.
- Meusel I, Neinhuis C, Markstädter C, Barthlott W (1999b) Ultrastructure, chemical composition, and recrystallization of epicuticular waxes: transversely ridged rodlets. *Canadian Journal of Botany* **77**, 706-720.
- Meyer MM, Xu R, Matsuda SPT (2002) Directed evolution to generate cycloartenol synthase mutants that produce lanosterol. *Organic Letters* **4**, 1395-1398.
- Milla P, Athenstaedt K, Viola F, Oliaro-Bosso S, Kohlwein SD, Daum G, Balliano G (2002a) Yeast oxidosqualene cyclase (Erg7p) is a major component of lipid particles. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 2406-2412.
- Milla P, Viola F, Bosso SO, Rocco F, Cattel L, Joubert BM, LeClair RJ, Matsuda SPT, Balliano G (2002b) Subcellular localization of oxidosqualene cyclases from *Arabidopsis thaliana*, *Trypanosoma cruzi*, and *Pneumocystis carinii* expressed in yeast. *Lipids* **37**, 1171-1176.
- Morita M, Shibuya M, Kushiro T, Masuda K, Ebizuka Y (2000) Molecular cloning and functional expression of triterpene synthases from pea (*Pisum sativum*). New a-amyrin-producing enzyme is a multifunctional triterpene synthase. *European Journal of Biochemistry* **267**, 3453-3460.
- Morita M, Shibuya M, Lee M-S, Sankawa U, Ebizuka Y (1997) Molecular cloning of pea cDNA encoding cycloartenol synthase and its functional expression in yeast. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **20**, 770-775.
- Müller C (2006) Plant-insect interactions on cuticular surfaces. In: Biology of the plant cuticle. (Eds M Riederer und C Müller) pp. 398-422. (Blackwell : Oxford)
- Müller C, Riederer M (2005) Plant surface properties in chemical ecology. *Journal of Chemical Ecology* **31**, 2621-2651.
- Nagata T, Tsushida T, Hamaya E, Enoki N, Manabe S, Nishino C (1985) Camellidins, Antifungal Saponins Isolated from *Camellia japonica*. *Agricultural and Biological Chemistry* **49**, 1181-1186.
- Nes WD, Heftmann E (1981) A comparison of triterpenoids with steroids as membrane components. *Journal of Natural Products* **44**, 377-400.
-



- Nicholson RL, Kunoh H, Shiraishi T, Yamada T (1993) Initiation of the infection process by *Erysiphe graminis*: Conversion of the conidial surface from hydrophobicity to hydrophilicity and influence of the conidial exudate on the hydrophobicity of the barley leaf surface. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **43**, 307-318.
- Nordby HE, McDonald RE (1994) Friedelin, the major component of grapefruit epicuticular wax. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **42**, 708-713.
- Ohana P, Delmer DP, Carlson RW, Glushka J, Azadi P, Bacic T, Benziman M (1998) Identification of a novel triterpenoid saponin from *Pisum sativum* as a specific inhibitor of the diguanylate cyclase of *Acetobacter xylinum*. *Plant and Cell Physiology* **39**, 144-152.
- Osbourn AE (1996) Preformed Antimicrobial Compounds and Plant Defense against Fungal Attack. *Plant Cell* **8**, 1821-1831.
- Osbourn AE (2003) Saponins in cereals. *Phytochemistry* **62**, 1-4.
- Osbourn AE, Qi X, Townsend B, Qin B (2003) Dissecting plant secondary metabolism - constitutive chemical defences in cereals. *New Phytologist* **159**, 101-108.
- Papadopoulou K, Melton RE, Leggett M, Daniels MJ, Osbourn AE (1999) Compromised disease resistance in saponin-deficient plants. *PNAS* **96**, 12923-12928.
- Petracek ME, Nuygen T, Thompson WF, Dickey LF (2000) Premature termination codons destabilize ferredoxin-1 mRNA when ferredoxin-1 is translated. *Plant Journal* **21**, 563-569.
- Phillips DR, Rasbery JM, Bartel B, Matsuda SP (2006) Biosynthetic diversity in plant triterpene cyclization. *Current Opinion in Plant Biology* **9**, 305-314.
- Podila GK, Rogers LM, Kolattukudy PE (1993) Chemical signals from avocado surface wax trigger germination and appressorium formation in *Colletotrichum gloeosporioides*. *Plant Physiology* **103**(1), 267-272.
- Poralla K (1999) Cycloartenol and other triterpene cyclases. In: *Comprehensive Natural Products Chemistry* (Eds. D Barton, K Nakanishi, O Meth-Cohn) pp. 299-319. (Elsevier : Amsterdam).
- Poralla K, Hewelt A, Prestwich GD, Abe I, Reipen IG, Sprenger GA (1994) A specific amino acid repeat in squalene and oxidosqualene cyclases. *Trends in Biological Science* **19**, 157-158.
- Post-Beittenmiller D (1996) Biochemistry and molecular biology of wax production in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **47**, 405-430.
- Qi X, Bakht S, Leggett M, Maxwell C, Melton R, Osbourn A (2004) A gene cluster for secondary metabolism in oat: Implications for the evolution of metabolic diversity in plants. *PNAS* **101**, 8233-8238.
- Rahman A, Ahamed A, Amakawa T, Goto N, Tsurumi S (2001) Chromosaponin I specifically interacts with AUX1 protein in regulating the gravitropic response of Arabidopsis roots. *Plant Physiology* **125**, 990-1000.
- Rashotte AM, Jenks MA, Nguyen TD, Feldmann KA (1997) Epicuticular wax variation in ecotypes of *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* **45**, 251-255.
- Riedel M, Eichner A, Jetter R (2003) Slippery surfaces of carnivorous plants: composition of epicuticular wax crystals in *Nepenthes alata* Blanco pitchers. *Planta* **218**, 87-97.
-

- Riederer M (1991) Die Kutikula als Barriere zwischen terrestrischen Pflanzen und der Atmosphäre. Die Bedeutung der Wachsstruktur für die Permeabilität der Kutikula. *Naturwissenschaften* **78**, 201-208.
- Riederer M, Markstädter C (1996) Cuticular waxes: a critical assessment of current knowledge. In: Plant cuticles. (Ed. G Kerstiens) pp. 189-200. (BIOS Scientific Publishers : Oxford)
- Riederer M, Schönherr J (1986) Thermodynamic analysis of nonelectrolyte sorption in plant cuticles: the effects of concentration and temperature on sorption of 4-nitrophenol. *Planta* **169**, 69-80.
- Riederer M, Schreiber L (1995) Waxes - The transport barriers of plant cuticles. In: Waxes: Chemistry, molecular biology and functions. (Ed. RJ Hamilton) pp. 131-156. (The Oily Press : West Ferry)
- Riederer M, Schreiber L (2001) Protecting against water loss: analysis of the barrier properties of plant cuticles. *J.Exp.Bot.* **52**, 2023-2032.
- Sawai S, Akashi T, Sakurai N, Suzuki H, Shibata D, Ayabe S, Aoki T (2006) Plant lanosterol synthase: divergence of the sterol and triterpene biosynthetic pathways in eukaryotes. *Plant and Cell Physiology* **47**, 673-677.
- Schäfer UA, Reed DW, Hunter DG, Yao K, Weninger AM, Tsang EW, Reaney MJ, MacKenzie SL, Covello PS (1999) An example of intron junctional sliding in the gene families encoding squalene monooxygenase homologues in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus*. *Plant Molecular Biology* **39**, 721-728.
- Schönherr J, Riederer M (1989) Foliar penetration and accumulation of organic chemicals in plant cuticles. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* **108**, 1-70.
- Schreiber L, Schönherr J (1992) Analysis of foliar uptake of pesticides in barley leaves: role of epicuticular waxes and compartmentation. *Pesticide Science* **36**, 213-221.
- Schwab M, Noga G, Barthlott W (1995) Bedeutung der Epicuticularwachse für die Pathogenabwehr am Beispiel von *Botrytis cinerea*-Infektionen bei Kohlrabi und Erbse. *Gartenbauwissenschaften* **60**, 102-109.
- Segura MJR, Meyer MM, Matsuda SPT (2000) *Arabidopsis thaliana* LUP1 converts oxidosqualene to multiple triterpene alcohols and a triterpene diol. *Organic Letters* **2**, 2257-2259.
- Segura MJR, Lodeiro S, Meyer MM, Patel AJ, Matsuda SPT (2002) Directed evolution experiments reveal mutations at cycloartenol synthase residue His477 that dramatically alter catalysis. *Organic Letters* **4**, 4459-4462.
- Seibl J (1970) Massenspektrometrie. (Akademische Verlagsgesellschaft : Frankfurt am Main)
- Shibuya M, Zhang H, Endo A, Shishikura K, Kushiro T, Ebizuka Y (1999) Two branches of the lupeol synthase gene in the molecular evolution of plant oxidosqualene cyclases. *European Journal of Biochemistry* **266**, 302-307.
- Simpson BB, Ogorzaly, MC (2001) Economic botany. Plants in our world. 3<sup>rd</sup> ed. (McGraw-Hill : New York)
- Stevens JF, Hart H, Pouw AJA, Bolck A, Zwaving JH (1994) Epicuticular waxes of *Sedum* series *rupestris*. *Phytochemistry* **36**, 341-348.
-

- Suh MC, Samuels AL, Jetter R, Kunst L, Pollard M, Ohlrogge J, Beisson F (2005) Cuticular lipid composition, surface structure, and gene expression in *Arabidopsis* stem epidermis. *Plant Physiology* **139**, 1649-1665.
- Suzuki H, Achnine L, Xu R, Matsuda SPT, Dixon RA (2002) A genomics approach to the early stages of triterpene saponin biosynthesis in *Medicago truncatula*. *Plant Journal* **32**, 1033-1048.
- Suzuki H, Reddy MS, Naoumkina M, Aziz N, May GD, Huhman DV, Sumner LW, Blount JW, Mendes P, Dixon RA (2005) Methyl jasmonate and yeast elicitor induce differential transcriptional and metabolic re-programming in cell suspension cultures of the model legume *Medicago truncatula*. *Planta* **220**, 696-707.
- Suzuki M, Xiang T, Ohyama K, Seki H, Saito K, Muranaka T, Hayashi H, Katsube Y, Kushiro T, Shibuya M, Ebizuka Y (2006) Lanosterol synthase in dicotyledonous plants. *Plant Cell Physiology* **47**, 565-571.
- Svoboda JA, Ross SA, Nes WD (1995) Comparative studies of metabolism of 4-desmethyl, 4-monomethyl and 4,4-dimethyl sterols in *Manduca sexta*. *Lipids* **30**, 91-94.
- Tanaka N, Wada H, Dietz V, Wollenweber E (1992) Leaf surface terpenoids of the tree fern *Lophosoria quadripinnata*. *Phytochemistry* **31(1)**, 347-349.
- Talapatra B, Chaudhuri PK, Mallik AK, Talapatra SK (1983) Lagerenyl Acetate and Lagerenol, 2 Tetracyclic Triterpenoids with the Cycloartane Skeleton from *Lagerstroemia lancasteri*. *Phytochemistry* **22**, 2559-2562.
- Taton M, Benveniste P, Rahier A, Johnson WS, Liu HT, Sudhakar AR (1992) Inhibition of 2,3-oxidosqualene cyclases. *Biochemistry* **31**, 7892-7898.
- Taton M, Ceruti M, Cattel L, Rahier A (1996) Inhibition of higher plant 2,3-oxidosqualene cyclases by nitrogen-containing oxidosqualene analogues. *Phytochemistry* **43**, 75-81.
- Thoma R, Schulz-Gasch T, D'Arcy B, Benz J, Aebi J, Dehmlow H, Hennig M, Stihle M, Ruf A (2004) Insight into steroid scaffold formation from the structure of human oxidosqualene cyclase. *Nature* **432**, 118-122.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* **25**, 4876-4882.
- Tsurumi S, Wada H (1995) Chromosaponin I stimulates the elongation of cortical cells in lettuce roots. *Plant and Cell Physiology* **36**, 925-929.
- van der Heijden R, Threlfall DR, Verpoorte R, Whitehead IM (1989) Regulation and enzymology of pentacyclic triterpenoid phytoalexin biosynthesis in cell suspension cultures of *Tabernaemontanum divaricata*. *Phytochemistry* **28**, 2981-2988.
- van Hoof A, Green PJ (1996) Premature nonsense codons decrease the stability of phytohemagglutinin mRNA in a position-dependent manner. *Plant Journal* **10**, 415-424.
- Venkatramesh M, Nes WD (1995) Novel sterol transformations promoted by *Saccharomyces cerevisiae* strain GL7: Evidence for 9 beta,19-cyclopropyl to 9(11)-isomerization and for 14-demethylation to 8(14)-sterols. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **324**, 189-199.
- Vermeer CP, Nastold P, Jetter R (2003) Homologous very-long-chain 1,3-alkanediols and 3-hydroxyaldehydes in leaf cuticular waxes of *Ricinus communis* L. *Phytochemistry* **62**, 433-438.
-

- Vogg G, Fischer S, Leide J, Emmanuel E, Jetter R, Levy AA, Riederer M (2004) Tomato fruit cuticular waxes and their effects on transpiration barrier properties: functional characterization of a mutant deficient in a very-long-chain fatty acid beta-ketoacyl-CoA synthase. *Journal of Experimental Botany* **55**, 1401-1410.
- Waller GR, Jurzysta M, Thorne RLZ (1993) Allelopathic effect of saponins on weeds. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* **34**, 1-11.
- Walton TJ (1990) Waxes, cutin and suberin. In: *Methods in Plant Biochemistry*, Vol. 4. (Eds JL Harwood und J Boyer) pp. 106-158 (Academic Press : London)
- Wen M, Buschhaus C, Jetter R (2006) Nanotubules on plant surfaces: Chemical composition of epicuticular wax crystals on needles of *Taxus baccata* L. *Phytochemistry* **67**(16), 1808-1817.
- Wendt KU, Poralla K, Schulz GE (1997) Structure and function of a squalene cyclase. *Science* **277**, 1811-1815.
- Wendt KU, Schulz GE, Corey EJ, Liu DR (2000) Mechanismen der enzymatischen Bildung polycyclischer Triterpene. *Angewandte Chemie* **112**, 2930-2952.
- Wilkinson RE, Roberts JJ (1996) Wheat leaf epicuticular characteristics as rust inhibitors. *Journal of Environmental Science and Health [B]* **31**, 591-598.
- Wollenweber E, Dietz VH (1981) Occurrence and distribution of free flavonoid aglycones in plants. *Phytochemistry* **20**(5), 869-932.
- Wollenweber E, Doerr M, Siems K, Faure R, Bombarda I, Gaydou EM (1999) Triterpenoids in lipophilic leaf and stem coatings. *Biochemical Systematics and Ecology* **27**, 103-105.
- Wu T-K, Griffin JH (2002) Conversion of a plant oxidosqualene-cycloartenol synthase to an oxidosqualene-lanosterol cyclase by random mutagenesis. *Biochemistry* **41**, 8238-8244.
- Xia Y, Nikolau BJ, Schnable PS (1997) Developmental and hormonal regulation of the arabidopsis CER2 gene that codes for a nuclear-localized protein required for the normal accumulation of cuticular waxes. *Plant Physiology* **115**, 925-937.
- Xiong Q, Rocco F, Wilson WK, Xu R, Ceruti M, Matsuda SP (2005) Structure and reactivity of the dammarenyl cation: configurational transmission in triterpene synthesis. *Journal of Organic Chemistry* **70**, 5362-5375.
- Xu R, Fazio GC, Matsuda SPT (2004) On the origins of terpenoid skeletal diversity. *Phytochemistry* **65**, 261-291.
- Zhang H, Shibuya M, Yokota S, Ebizuka Y (2003) Oxidosqualene cyclases from cell suspension cultures of *Betula platyphylla* var. *japonica*: Molecular evolution of oxidosqualene cyclases in higher plants. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **26**, 642-650.
- Zhang JY, Broeckling CD, Blancaflor EB, Sledge MK, Sumner LW, Wang ZY (2005) Overexpression of WXP1, a putative *Medicago truncatula* AP2 domain-containing transcription factor gene, increases cuticular wax accumulation and enhances drought tolerance in transgenic alfalfa (*Medicago sativa*). *Plant Journal* **42**, 689-707.
-

## Anhang A

### Verwendete Medien und Puffer

#### 1% Agarosegel:

Agarose	0,38 g bzw. 0,8 g
0,5x TBE-Puffer	38 ml bzw. 80 ml
<i>Agarose durch Hitzezufuhr in Lösung bringen</i>	
1%-Ethidiumbromid-Gebrauchslösung	3 µl

#### Church-Puffer (400 ml):

1 M NaPO <sub>4</sub> , pH 7,0	200 ml
25% SDS	112 ml
0,5 M EDTA	8 ml
H <sub>2</sub> O bidest.	80 ml

#### DNA-Extraktions-Puffer (200 ml):

2% w/v CTAB [=Hexadecyltrimethylammoniumbromid]	4 g
1,42 M NaCl	16,83 g
20 mM EDTA	32 ml aus 0,5 M Stammlsg.
100 mM Tris pH 8.0	20 ml aus 1 M Stammlsg.
2% w/v PVP 40 [Polyvinylpyrrolidin]	4 g
5 mM Ascorbat	0,176 g
4 mM Diethyldithiocarbamat	0,137 g

*Autoklavieren*

#### Hefe-Medium YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose) (500 ml):

1% (Difco) Hefeextrakt (Puder)	5 g
2% Bacto Pepton	10 g
<i>nach Autoklavieren Zugabe von (steril filtriert):</i>	
2% Dextrose	10 g
20 µg/ml Ergosterol in EtOH/Tween80 (5mg/ml) (1:1)	10 mg in 5 ml
13 µg/ml Heminchlorid in 50% EtOH (Zugabe von NaOH, bis Heminchlorid gelöst)	6,5 mg
<i>für Platten vor dem Autoklavieren Zugabe von:</i>	
2% Difco Agar	10 g

#### Hefe-Resting-Medium:

0,1 M Kaliumphosphat; pH 7,0	
<i>nach Autoklavieren Zugabe von (steril filtriert):</i>	
3% Glucose	
13 µg/ml Heminchlorid in 50% EtOH (Zugabe von NaOH, bis Heminchlorid gelöst)	

**Hefe-SC-Minimalmedium (1000 ml):**

0,01% Adenin	100 mg
0,01% Arginin	100 mg
0,01% Cystein	100 mg
0,01% Leucin	100 mg
0,01% Lysin	100 mg
0,01% Threonin	100 mg
0,01% Tryptophan	100 mg
0,005% Aspartat	50 mg
0,005% Histidin	50 mg
0,005% Isoleucin	50 mg
0,005% Methionin	50 mg
0,005% Phenylalanin	50 mg
0,005% Prolin	50 mg
0,005% Serin	50 mg
0,005% Valin	50 mg
0,67% Yeast nitrogen base w/o aas	6,7 g
<i>nach Autoklavieren Zugabe von (steril filtriert):</i>	
20% Dextrose-Lösung	100 ml
20 µg/ml Ergosterol in EtOH/Tween80 (5mg/ml) (1:1)	20 mg in 5 ml
13 µg/ml Heminchlorid in 50% EtOH (Zugabe von NaOH, bis Heminchlorid gelöst)	13 mg
<i>für Platten vor dem Autoklavieren Zugabe von:</i>	
2% Difco Agar	20 g

**Hefe-SC-U-Induktionsmedium (1000 ml):**

s. SC-Minimalmedium, jedoch 2% Galaktose anstatt Dextrose

**LB-Medium (Lura-Bertani-Medium) (1000 ml):**

Trypton	10 g
Hefe	5 g
NaCl	10 g

*mit H<sub>2</sub>O bidest. auf 1 l auffüllen und auf pH 7 einstellen und autoklavieren*

**LB-Indikatorplatten (1000 ml):**

Trypton	10 g
Hefe	5 g
NaCl	10 g
Agar-Agar	10 g

*mit H<sub>2</sub>O bidest. auf 1 l auffüllen und auf pH 7 einstellen und autoklavieren*  
*nach dem Autoklavieren Zugabe von:*

Amp 50 (50 mg/ml); [Endkonz.: 100µg/ml]	2 ml
IPTG (1 M)	8 µl pro Platte
X-Gal (50 mg/ml)	20 µl pro Platte

**10x MOPS-Puffer (500 ml):**

MOPS	20,94 g
3 M NaOAc (pH 7,0)	8,4 ml
0,5 M EDTA (pH 8,0)	10,0 ml

*mit H<sub>2</sub>O bidest. auf 500 ml auffüllen*

**MOPS-Agarose-Formaldehyd-Gel (150 ml):**

Agarose	2,25 g
H <sub>2</sub> O bidest.	110 ml
<i>Agarose durch Hitzezufuhr in Lösung bringen</i>	
10x MOPS-Puffer	15 ml
Formaldehyd (37%)	25,1 ml

**RNA-Ladepuffer (400 µl):**

Formaldehyd (37%)	72 µl
Formamid	200 µl
Bromphenolblau-Lsg.	1,6 µl
Glycerol	18,4 µl
0,5 mg/ml Ethidiumbromid	8 µl
10x MOPS-Puffer	100 µl

**0,5x TBE-Puffer (1000 ml):**

Tris-Base	54 g
Borsäure	27,5 g
0,5 M EDTA, pH: 8,0	20 ml
<i>auf 1 l mit H<sub>2</sub>O auffüllen und autoklavieren</i>	

---

## Anhang B

### Klonierte und charakterisierte pflanzliche Epoxysqualenzyklen

**Tabelle B-1:** Genbank-Akzessionsnummern der NCBI-Datenbank und Referenzen pflanzlicher Epoxysqualenzyklen. In der Zusammenstellung berücksichtigt wurden ausschließlich auf ihre Funktion hin charakterisierte Zyklen.

Enzym	Pflanze	Name	Nukleotid-Akzessions-Nummer	Protein-Akzessions-Nummer	Referenz
CAS	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtCAS1	U02555	AAC04931	Corey <i>et al.</i> 1993
MFS	<i>Arabidopsis thaliana</i>	ATLUP1	U49919	AAD05032	Herrera <i>et al.</i> 1998
MFS	<i>Arabidopsis thaliana</i>	ATLUP2	AC002986	AAC17070	Husselstein-Muller <i>et al.</i> 2001; Kushiro <i>et al.</i> 2000b
MFS	<i>Arabidopsis thaliana</i>	ATLUP5	AC007152	AAF98208	Ebizuka <i>et al.</i> 2003
MFS	<i>Arabidopsis thaliana</i>	ATPEN6	AC007260	AAD30585	Ebizuka <i>et al.</i> 2003
bAS	<i>Avena strigosa</i>	AsbAS1	AJ311789	CAC84558	Haralampidis <i>et al.</i> 2001
LUS	<i>Betula platyphylla</i>	BPW	AB055511	BAB83087	Zhang <i>et al.</i> 2003
CAS	<i>Betula platyphylla</i>	BPX1	AB055509	BAB83085	Zhang <i>et al.</i> 2003
CAS	<i>Betula platyphylla</i>	BPX2	AB055510	BAB83086	Zhang <i>et al.</i> 2003
bAS	<i>Betula platyphylla</i>	BPY	AB055512	BAB83088	Zhang <i>et al.</i> 2003
CAS	<i>Costus speciosus</i>	CSI	AB058507	BAB83253	Kawano <i>et al.</i> 2002
MFS	<i>Costus speciosus</i>	CSV	AB058508	BAB83254	Kawano <i>et al.</i> 2002
bAS	<i>Euphorbia tirucalli</i>	EtAS	AB206469	BAE43642	Kajikawa <i>et al.</i> 2005
bAS	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	GgbAS1	AB037203	BAA89815	Hayashi <i>et al.</i> 2001b
CAS	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	GgCAS1	AB025968	BAA76902	Hayashi <i>et al.</i> 2000
LUS	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	GgLUS1	AB116228	BAD08587	Hayashi <i>et al.</i> 2004
MFS	<i>Lotus japonicus</i>	LJAMY2	AF478455	AAO33580	Iturbe-Ormaetxe <i>et al.</i> 2003
CAS	<i>Luffa cylindrica</i>	LcCAS1	AB033335	BAA85267	Hayashi <i>et al.</i> 2001a
IMS	<i>Luffa cylindrica</i>	LcIMS1	AB058643	BAB68529	Hayashi <i>et al.</i> 2001a
bAS	<i>Medicago truncatula</i>	MtbAS	AJ430607	CAD23247	Suzuki <i>et al.</i> 2002
LUS	<i>Olea europaea</i>	OEW	AB025343	BAA86930	Shibuya <i>et al.</i> 1999
CAS	<i>Panax ginseng</i>	PNX	AB009029	BAA33460	Kushiro <i>et al.</i> 1998
bAS	<i>Panax ginseng</i>	PNY	AB009030	BAA33461	Kushiro <i>et al.</i> 1998
bAS	<i>Panax ginseng</i>	PNY2	AB014057	BAA33722	Kushiro <i>et al.</i> 1998
MFS	<i>Pisum sativum</i>	PSM	AB034803	BAA97559	Morita <i>et al.</i> 2000
CAS	<i>Pisum sativum</i>	PSX	D89619	BAA23533	Morita <i>et al.</i> 1997
bAS	<i>Pisum sativum</i>	PSY	AB034802	BAA97558	Morita <i>et al.</i> 2000
CAS	<i>Ricinus communis</i>	RcCAS	DQ268870	ABB76767	Guhling <i>et al.</i> 2006
LUS	<i>Ricinus communis</i>	RcLUS	DQ268869	ABB76766	Guhling <i>et al.</i> 2006
LUS	<i>Taraxacum officinale</i>	TRW	AB025345	BAA86932	Shibuya <i>et al.</i> 1999



## Anhang C

### Primerdesign zur homologiebasierten Klonierung pflanzlicher Epoxysqualenzyklassen

<b>AtCAS1</b>	MWRLKIA	7	atgtggaaactgaagatcgcg	21	} <b>Cycloartenol-synthasen</b>
<b>CASBPX2</b>	MWRLKIA	7	atgtggaagctgaagatcgcg	21	
<b>Gg1CAS</b>	MWRLKIA	7	atgtggaagctcaagattgcg	21	
<b>PsCAS1</b>	MWRLKVA	7	atgtggaagcttaaattgca	21	
<b>PNX</b>	MWRLKIE	7	atgtggaagctcaaggttgcg	21	
<b>BPY</b>	MWRLKIA	7	atgtggaggcttaagatcgca	21	} <b>β-Myrin-synthasen</b>
<b>GgbAS1</b>	MWRLKIA	7	atgtggaggctgaagatagcg	21	
<b>MtbAS</b>	MWRLKIG	7	atgtggaagctgaagattgga	21	
<b>PNY</b>	MWRLKIA	7	atgtggaagcttaagatagcg	21	
<b>PNY2</b>	MWRLMTA	7	atgtggaggctaatgacagcc	21	
<b>PSY</b>	MWRLKIA	7	atgtggaggctgaagatagca	21	
<b>BPW</b>	MWRLKIA	7	atgtggaagctgaagatagcg	21	} <b>Lupeol-synthasen</b>
<b>GgLUS1</b>	MWRLKIG	7	atgtggaagctgaagatagga	21	
<b>OEW</b>	MWRLKIA	7	atgtggaagctgaagattgct	21	
<b>TRW</b>	MWRLKIA	7	atgtggaagctgaaaatagca	21	
<b>AtLUP1</b>	MWRLKIG	7	atgtggaagctgaagatagga	21	} <b>multifunktionale Triterpensynthasen</b>
<b>AtLUP2</b>	MWRLKIG	7	atgtggagactaagaattgga	21	
<b>LJAMY2</b>	MWRLKVA	7	atgtggaagctgaaggtagca	21	
<b>PSM</b>	MWRLKIG	7	atgtggaagctgaagatagga	21	
<b>LcIMS1</b>	MWRLKVA	7	atgtggaggcttaaggtagca	21	

#### Primerdesign:

OGN3S	→ ATGTGGARGYTRAHRA <b>Y</b> WG
OGN4S	→ ATGTGGARGYTRAHRA <b>T</b> WG
OGN5S	→ ATGTGGARGYTRAHRA <b>Y</b> AG
OGN6S	→ ATGTGGARGYTRAHRA <b>T</b> AG

**Abbildung C-1:** Aminosäuresequenz-Alignment (links) und Nukleotidsequenz-Alignment (rechts) für den N-terminalen Sequenzbereich von 2,3-Oxidosqualenzyklassen sowie das daraus resultierende Primerdesign. In den Alignments sind die Positionsnummern der jeweils letzten Aminosäure bzw. des letzten Nukleotids angegeben.

	QW2					
<b>AtCAS1</b>	HQNE <b>DGGWG</b> 165	ca	ccagaatg	agga	aggagggttggggt 495	} <b>Cycloartenol-synthasen</b>
<b>CASBPX1</b>	HQNE <b>DGGWG</b> 176	ca	ccagaatg	aagatgggggttggggt 528		
<b>CASBPX2</b>	HQNK <b>DGGWG</b> 165	ca	ccagaaca	aagatgggtgggtgggga 495		
<b>GglCAS</b>	HQNK <b>DGGWG</b> 165	ca	ccagaaca	aggatgggtgggtggggt 495		
<b>LcCAS1</b>	HQNK <b>DGGWG</b> 173	ca	ccagaata	aagatgggggttggggt 519		
<b>PNX</b>	HQNR <b>DGGWG</b> 165	ca	ccagaac	agagatgggtgggtggggt 495		
<b>PsCAS1</b>	HQNK <b>DGGWG</b> 165	ca	ccagaaca	aggatgggtgggtggggt 495	} <b>β-Amyrin-synthasen</b>	
<b>BPY</b>	HQNE <b>DGGWG</b> 166	ca	ccagaatg	aagatgggtgggtgggga 498		
<b>GgbAS1</b>	HQNE <b>DGGWG</b> 166	ca	ccagaatg	aagatggagggtggggg 498		
<b>MtbAS</b>	HQNE <b>DGGWG</b> 166	ca	caaaatg	aagatggaggatggggg 498		
<b>PNY</b>	HQNE <b>DGGWG</b> 168	ca	ccagaatg	aagatggcgggtgggga 504		
<b>PNY2</b>	HQNE <b>DGGWG</b> 166	ca	ccagaacg	atgatgggtggctgggga 498		
<b>PSY</b>	HQNE <b>DGGWG</b> 166	ca	ccagaacg	aagatggagggtggggg 498	} <b>Lupeol-synthasen</b>	
<b>BPW</b>	HQNE <b>DGGWG</b> 164	ca	ccagaacg	aagatggaggctggggg 492		
<b>GgLUS1</b>	HQNE <b>DGGWG</b> 167	ca	ccagaatg	aagatgggtgggtgggga 501		
<b>OEW</b>	HQNE <b>DGGWG</b> 165	ca	ccagaatg	aagatggagggttggggg 495		
<b>TRW</b>	HQNE <b>DGGWG</b> 166	ca	ccagaatg	aagatggagggttgggga 498	} <b>multifunktionale Triterpensynthasen</b>	
<b>AtLUP1</b>	HQNE <b>DGGWG</b> 167	ca	ccagaacg	aagatgggtggatgggga 501		
<b>AtLUP2</b>	HQNE <b>DGGWG</b> 167	ca	ccagaacg	aagatgggtgggtgggga 501		
<b>LJAMY2</b>	HQNE <b>DGGWG</b> 166	ca	ccagaatg	aagatggagggttgggga 498		
<b>PSM</b>	HQNE <b>DGGWG</b> 166	ca	ccagaatg	aagatggagggttgggga 498		
<b>LcIMS1</b>	HQNE <b>DGGWG</b> 166	ca	ccagaatg	aagatgggggatggggg 498		

**Primerdesign:**

<b>OGT4S</b>	CAYCAGAA <b>YGAAGATGGW</b>
<b>OGT5S</b>	AYCAGAA <b>YGAWGATGGHGG</b>
<b>OGT6S</b>	AYCAGAA <b>YGAAGATGGWGG</b>
<b>OGT7S</b>	GAAYGAWGATGGHGGNTGGG
<b>OGT8S</b>	GAAYGAAGATGGWGGNTGGG
<b>OGT9S</b>	AAYGAWGATGGHGGNTGGGG
<b>OGT10S</b>	AAYGAWGATGGHGGNTGGG
<b>OGT11S</b>	CAGAA <b>YGAWGATGGHGGNTGGG</b>
<b>OGC5S</b>	CAGAA <b>YRRRGAYGGDGGNTGGG</b>
<b>OGC6S</b>	CAGAA <b>YRARGATGGDGGNTGGG</b>

**Abbildung C-2:** Aminosäuresequenz-Alignment (links) und Nukleotidsequenz-Alignment (rechts) für den das QW2-Motiv umfassenden Sequenzbereich (gelb hervorgehoben) und das daraus resultierende Primerdesign für die Klonierung von Triterpen- bzw. Cycloartenolsynthasen. In den Alignments sind die Positionsnummern der jeweils letzten Aminosäure bzw. des letzten Nukleotids angegeben.

	QW4				
<b>AtCAS1</b>	QQPSGGWGESY	659	caacaaccttcggg	gggctggggagaaagctat	1977
<b>CASBPX1</b>	ELASGGWGESY	669	gagctcgccttcagg	tgggtggggagaaagttac	2007
<b>CASBPX2</b>	QLPSGGWGESY	659	cagcttccttcagg	tgggtggggagagagttat	1977
<b>GglCAS</b>	QLPSGGWGESY	659	cagctcccatctgg	tgggtggggagagagctat	1977
<b>LcCAS1</b>	ELASGGWGESY	667	gagcttgcttcgg	tgggtggggagaaagttat	2001
<b>PNX</b>	QVASGGWGESY	659	caagttgcttctg	ggtgggtggggagagagttac	1977
<b>PsCAS1</b>	QLPSGGWAESY	659	cagctcccatctg	ggtgggtggggagaaagttat	1977
} <b>Cycloartenol-synthesen</b>					
<b>BPY</b>	QRDNGGWGESY	661	caaagagataatg	ggtgggtggggagagagctat	1983
<b>GgbAS1</b>	QREDGGWGESY	661	cagagagaggatg	ggtggatggggggagagagctat	1983
<b>MtbAS</b>	QREDGGWGESY	661	cagagagaggatg	ggtgggtggggggagagagctat	1983
<b>PNY</b>	QMDDGGWGESY	662	cagatggatgatg	ggtgggtggggagaaagctac	1986
<b>PNY2</b>	QRSDGGWGESY	660	caacgcagtgatg	ggtgggtggggagaaagctat	1980
<b>PSY</b>	QREDGGWGESY	661	cagagagaggacg	ggtgggtggggggaaagctat	1983
} <b>β-Amyrin-synthesen</b>					
<b>BPW</b>	QLPNGGWGESY	658	cagctacctaata	ggtggatggggagaaagttac	1974
<b>GgLUS1</b>	QLPNAGWGESY	658	cagcttcctaata	gctgggtggggagaaagttac	1974
<b>OEW</b>	QLPDGGWGESY	659	caattaccggatg	ggtggatggagtgaagctac	1977
<b>TRW</b>	QLPDGGWGESY	661	caacttcggatg	ggtggatggggagagagttat	1983
} <b>Lupeol-synthesen</b>					
<b>AtLUP1</b>	QRDDGGWGESY	659	caaagagatgatg	ggaaggtgggggtgaaagctat	1977
<b>AtLUP2</b>	QNQEGGWGESY	667	caaaaccaggagg	tgggtggggagagagagctat	2001
<b>LJAMY2</b>	QSKDGGWGESY	661	caatcaaaggatg	ggtgggtggggagagagttat	1983
<b>PSM</b>	QREDGGWGESH	661	caaagagaggatg	ggtgggtggggggagagagctat	1983
<b>LcIMS1</b>	QNPEGGWGESY	658	cagaatccagaag	ggagggtttggagagagctac	1974
} <b>multifunktionale Triterpen-synthesen</b>					

**Primerdesign:**

OGN1A	← ATGGHGGDTGGRGDGARAGYYA
OGN2A	← ATGGTGGDTGGGGDGARAGYYA
OGN3A	← GGTGGDTGGRGDGARAGYYA

**Abbildung C-3:** Aminosäuresequenz-Alignment (links) und Nukleotidsequenz-Alignment (rechts) für den das QW4-Motiv umfassenden Sequenzbereich (gelb hervorgehoben) und das daraus resultierende Primerdesign für die Klonierung von 2,3-Oxidosqualenzyklassen. In den Alignments sind die Positionsnummern der jeweils letzten Aminosäure bzw. des letzten Nukleotids angegeben.

<b>AtCAS1</b>	DFPQQEI	722	gattttccaacaggaaata	2166	} <b>Cycloartenol-synthasen</b>
<b>CASBPX1</b>	DFPQEEI	732	gattttcctcaaggaggatt	2196	
<b>CASBPX2</b>	DFPQEEI	722	gattttcctcaaggaggaaatc	2166	
<b>Gg1CAS</b>	DFPQQEI	722	gattttccgcaacaggaaata	2166	
<b>LcCAS1</b>	DFPQEEI	730	gattttcctcaaggaggatc	2190	
<b>PNX</b>	DFPQEEI	722	gattttccacaggaggagatc	2166	
<b>PsCAS1</b>	DFPQEEI	722	gattttccgcaaggaggaaata	2166	
<b>BPY</b>	DFPQQEI	724	gattttcctcaacaggaaatc	2172	} <b>β-Amyrin-synthasen</b>
<b>GgbAS1</b>	DWPQQEI	724	gattggccccaacaggaaatc	2172	
<b>MtbAS</b>	DWPQQEI	724	gattggccccaacaggaaatc	2172	
<b>PNY</b>	DFPQQEI	725	gattttccccaacaggaaata	2175	
<b>PNY2</b>	DFPQQEI	723	gattttccccaacaggaaatc	2169	
<b>PSY</b>	DWPQQEI	724	gattggccaacaggaaatc	2172	
<b>BPW</b>	DFPQQEI	721	gattttcctcaacaggaaatc	2163	} <b>Lupeol-synthasen</b>
<b>GgLUS1</b>	DFPQEEI	721	gattttcccaacaggaggatt	2163	
<b>OEW</b>	DFPQEEI	722	gattttcctcaaggaggaaat	2166	
<b>TRW</b>	DFPQEEI	724	gattttcctcaacaggaaatc	2172	
<b>AtLUP1</b>	DFPQQEI	722	gattttcctcaacaggaaata	2166	} <b>multifunktionale Triterpensynthasen</b>
<b>AtLUP2</b>	DFPQQEV	730	gattttccgcaacaggaggta	2190	
<b>LJAMY2</b>	DWPQQDI	724	gattggccccaacaggatatt	2172	
<b>PSM</b>	DWPQQEL	724	gattggccccaacaggaaatt	2172	
<b>LcIMS1</b>	DFPQEEI	721	gattttcctcaaggaggaaat	2163	

**Primerdesign:**

OGN7A

←  
GAYTTTCCTCAAWAGGAAAT

**Abbildung C-4:** Aminosäuresequenz-Alignment (links) und Nukleotidsequenz-Alignment (rechts) und das daraus resultierende Design für den Antisense-Primer OGN7A. In den Alignments sind die Positionsnummern der jeweils letzten Aminosäure bzw. des letzten Nukleotids angegeben.

<b>AtCAS1</b>	WALGEYR	750	tgggcgttgggggagtaccgt	2250	} <b>Cycloartenol-synthesen</b>
<b>CASBPX1</b>	WALGEYR	760	tgggccttgggagaatatacgt	2280	
<b>CASBPX2</b>	WALGEYR	750	tgggcattgggagagtaccgc	2250	
<b>Gg1CAS</b>	WALGEYR	750	tgggcgttgggagaatacgt	2250	
<b>LcCAS1</b>	WALGEYR	758	tgggccttgggagaatatacgc	2274	
<b>PNX</b>	WALGEYR	750	tgggccttgggagaatatacga	2250	
<b>PsCAS1</b>	WALGEYR	750	tgggcgttaggagaatacgc	2250	
<b>BPY</b>	WALAEYR	752	tgggctctggcagaatacgc	2256	} <b>β-Amyrin-synthesen</b>
<b>GgbAS1</b>	WALAEYR	752	tgggctctagctgagtatacgt	2256	
<b>MtbAS</b>	WALAEYR	752	tgggctctagccgagtatacgt	2256	
<b>PNY</b>	WALAEYR	753	tgggctctagcagagtatacgg	2259	
<b>PNY2</b>	WALAEYR	751	tgggcttttagcagaatacga	2253	
<b>PSY</b>	WALAEYR	752	tgggctctagctgagtatacgt	2256	
<b>BPW</b>	WALGEYR	749	tgggctcttgggagaatatacgg	2247	} <b>Lupeol-synthesen</b>
<b>GgLUS1</b>	WALGEYR	749	tgggctatgggagagtatacgt	2247	
<b>OEW</b>	WALGEYR	750	tgggctctcggtaggatacgt	2250	
<b>TRW</b>	WALGEYR	752	tgggcacttggtagaatacgt	2256	
<b>AtLUP1</b>	WALAEYR	750	tgggcactcgcagaatacga	2250	} <b>multifunktionale Triterpensynthesen</b>
<b>AtLUP2</b>	WALTLYT	758	tgggcctcacactatac---	2271	
<b>LJAMY2</b>	MALAEYR	752	atggccctagctgaatatacgt	2256	
<b>PSM</b>	WALAEYR	752	tgggctctagctgaatatacgt	2256	
<b>LcIMS1</b>	MALGEYC	749	atggcgttgggagaatattgt	2247	

**Primerdesign:**

OGN4A	←	TGGGCHYTNGWSGARTAYCG
OGN5A	←	TGGGCTCTYGSWARTAYCG
OGN6A	←	TGGGCACTYGSWARTAYCG

**Abbildung C-5:** Aminosäuresequenz-Alignment (links) und Nukleotidsequenz-Alignment (rechts) und das daraus resultierende Design für die Antisense-Primer OGN4A, OGN5A und OGN6A. In den Alignments sind die Positionsnummern der jeweils letzten Aminosäure bzw. des letzten Nukleotids angegeben.

## Anhang D

### Verwendete Oligonukleotidprimer

**Tabelle D-1:** Degenerierte Oligonukleotidprimer für die homologiebasierte Klonierung pflanzlicher Oxidosqualenzyklassen. Angegeben sind neben der Länge und der Schmelztemperatur  $T_m$  [°C] auch der Degenerierungsgrad DG sowie die Position der Primer (5'-Ende) bezogen auf die Nukleotidsequenz der Cycloartenolsynthase AtCAS1 aus *Arabidopsis thaliana* (Corey *et al.* 1993).

Name	Sequenz (5'-3')	Position	Länge	$T_m$	DG
OGA1S	TTYGGHAGYCAARMRTGGGAT	1236	21	57,5	96
OGC1S	TAYAATGGMAGYCARYTVTGGGA	1236	23	58,8	96
OGC5S	CAGAAARRRGAYGGDGGNTGGG	472	22	67,1	384
OGC6S	CAGAAVRARGATGGDGGNTGGG	472	22	64,9	96
OGL1S	TTTGGVTGYCARHTGTGGGAT	1236	21	63,8	36
OGN1A	TRRCTYTCHCYCCAHCDCCAT	1976	22	62,7	432
OGN1S	TGGRTYKSNARGATGGVHTVA	1203	22	60,5	3456
OGN2A	TRRCTYTCHCCCCAHCACCAT	1976	22	67,4	72
OGN2S	TGGGTYKCNARGATGGVHTVA	1203	22	61,5	864
OGN3A	TRRCTYTCHCYCCAHCACC	1976	20	60,6	144
OGN3S	ATGTGGARGYTRAHRAYWG	1	19	52,0	192
OGN4A	CGRTAYTCSWCNARDGCCCA	2249	20	59,2	384
OGN4S	ATGTGGARGYTRAHRATWG	1	19	50,9	96
OGN5A	CGRTAYTCSWCRAAGGCCCA	2249	20	58,5	32
OGN5S	ATGTGGARGYTRAHRAYAG	1	19	52,0	96
OGN6A	CGRTAYTCSWCRAAGGCCCA	2249	20	59,3	32
OGN6S	ATGTGGARGYTRAHRATAG	1	19	50,9	48
OGN7A	ATTCCTWTTGAGGAAARTC	2165	20	50,1	4
OGT10S	AAYGAWGATGGHGGNTGGG	475	19	57,4	48
OGT11S	CAGAAAGAWGATGGHGGNTGGG	472	22	62,7	48
OGT1S	CAKWSYTTYGGNHWGYCARNHR	1230	21	57,9	12288
OGT2S	CAGAGTTTYGGNHWGYCARNHR	1230	21	58,2	1536
OGT3S	TTYGGNHWGYCARNHRTGGGAT	1236	21	62,8	1536
OGT4S	CAYCAGAAYGAAGATGGW	469	19	57,3	8
OGT5S	AYCAGAAYGAWGATGGHGG	470	19	55,2	24
OGT6S	AYCAGAAYGAAGATGGWGG	470	19	54,5	8
OGT7S	GAAYGAWGATGGHGGNTGGG	474	20	60,0	48
OGT8S	GAAYGAAGATGGWGGNTGGG	474	20	59,4	16
OGT9S	AAYGAWGATGGHGGNTGGGG	475	20	60,0	48

Symbolschlüssel der degenerierten Nukleotide: R = A + G, Y = C + T, M = A + C, K = G + T, S = G + C, W = A + T, H = A + T + C, D = G + A + T, V = G + A + C, N = A + C + G + T.

**Tabelle D-2:** Spezifische Oligonukleotidprimer für die *Ricinus communis* Lupeolsynthese R<sub>c</sub>LUS1. Angegeben sind neben der Länge und der Schmelztemperatur T<sub>m</sub> [°C] auch die Position der Primer (5'-Ende) innerhalb der Transkript-Nukleotidsequenz von R<sub>c</sub>LUS1.

Name	Sequenz (5'-3')	Position	Länge	T <sub>m</sub>
OGLS10A	CCCAAGAAGATATACCAGTT	682	20	54,7
OGLS11A	ACCAGTTGCACCACCA	672	16	59,6
OGLS12A	GATATACCAGTTGCACCACC	677	20	59,3
OGLS12S	ATATAACCACTAATCTCATGC	1	20	52,3
OGLS13A	TCGCCCTCTTTCACAAGCA	639	19	67,1
OGLS13S	GTCTACATTACAGGACACC	424	19	55,2
OGLS14A	GTGCTGTGACCTTCAATGTG	548	20	61,9
OGLS14S	ATCAAGTGAATAGTGTCG	919	20	56,4
OGLS15A	GGTGCCTGTAATGTAGAC	442	19	55,2
OGLS15S	GAGCCAGCAAGAGCAGGA	1627	18	58,4
OGLS16A	GACGCACACTATTCCACTTG	940	20	58,4
OGLS16S	GCAAAGAGGATGTGGCGAAT	19	20	66,2
OGLS17A	GCTTGATTGCTGATGAAG	1736	19	55,2
OGLS18A	CATAGACTGAGTTCATCAC	2356	19	53,0
OGLS19A	ATACCGATTATTGGTAGTC	2398	19	50,9
OGLS1A	CCACCATCATCTCTTTGTGATT	1991	22	56,5
OGLS1S	ACAAGTCTAGCTCTTCAGGC	1282	20	57,3
OGLS2A	TTTAGTAGAAAATCAACACC	1970	20	49,1
OGLS2S	AAGTCTAGCTCTTCAGGCC	1284	20	49,4
OGLS3A	GCCTGAAGAGCTAGACTTG	1300	19	56,7
OGLS3S	ATCACAAAGAGATGATGGTGG	1971	21	55,9
OGLS4A	TCATGAGAGAGGTCGCTAG	1328	19	56,7
OGLS4S	TGCTTCTCTTATGGTACCTG	1867	20	55,3
OGLS5A	AGTGTAGGTCCTATTTTC	1343	17	47,9
OGLS6A	TTTCTGAAGTCGCCCGA	1409	17	52,8
OGLS7A	GTAGGCAGCACTTCAAGC	1510	18	56,0
OGLS8A	CACTCGTACACACCAAG	723	17	52,2
OGLS9A	CAAGAAGATATACCAGTT	683	18	45,5
OGLS9S	CACATTGAAGGTCACAGCAC	529	20	61,9

**Tabelle D-3:** Spezifische Oligonukleotidprimer für das Fragment der potenziellen *Ricinus communis* Triterpensynthese R<sub>c</sub>TTS2. Angegeben sind neben der Länge und der Schmelztemperatur T<sub>m</sub> [°C] auch die Position der Primer (5'-Ende) innerhalb der Transkript-Nukleotidsequenz von R<sub>c</sub>TTS2.

Name	Sequenz (5'-3')	Position	Länge	T <sub>m</sub>
OGLSB1A	TTTCGTCGCCCAGATTGCTG	49	20	70,5
OGLSB1S	CTCAGCAATCTGGGCGACGA	28	20	71,0
OGLSB2A	TCAACCCCTTCCGCACAG	677	19	70,7
OGLSB2S	CTGTGCGGAAGGGGGTTGA	659	19	70,7
OGLSB3A	CATTCACTGTAACTTCTTCCA	650	21	56,8
OGLSB3S	CAAGCAAACCTCGGATGAAGG	84	20	64,6
OGLSB4A	CCTTCATCCGAGTTTGCTTG	103	20	64,6
OGLSB4S	TGGAAGAAGTTACAGTGAATG	633	21	56,8
OGLSB5A	CACATTGAACCTCGCACCG	668	19	67,8
OGLSB5S	CGGTGCGAGGTTCAATGTG	350	19	67,8

**Tabelle D-4:** Spezifische Oligonukleotidprimer für die *Ricinus communis* Cycloartenolsynthase RcCAS1. Angegeben sind neben der Länge und der Schmelztemperatur  $T_m$  [°C] auch die Position der Primer (5'-Ende) innerhalb der Transkript-Nukleotidsequenz von RcCAS1.

Name	Sequenz (5'-3')	Position	Länge	$T_m$
OGCS1A	TGAACTGCGAATGCTGTGTC	1359	20	65,2
OGCS1S	GACACAGCATTTCGAGTTCA	1340	20	65,2
OGCS2A	CCATTCTCCATTTGAGCGTT	2234	20	63,8
OGCS2S	AACGCTCAAATGGAGAATGG	2216	20	63,8
OGCS3A	TAATGAATGAATGTGCCTTTT	1427	21	58,5
OGCS3S	AGTATCCGTAAAGCCTGTGA	2000	20	58,8
OGCS4A	AAGCCACATCTCAGGG	817	16	56,8
OGCS4S	CATAAAAGGTTTGGTGGCTG	1954	20	61,8
OGCS5A	AGGGATTATTACCAGACCACT	797	21	57,9
OGCS6A	GATTATTACCAGACCACT	797	18	47,9
OGCS7A	GCCCCTTCTCCCTCATTGG	681	19	68,0
OGCS8A	GGACCTTCACCAAGCAGCCT	663	20	67,7
TYCS1A	CAATGCGCCAGTGATAGACA	504	20	64,8
TYCS1S	AAAGAAGAAAAGAAATGTGGAAGC	72	24	62,5
TYCS2A	TTGCGTGCTTGATTCCAGTCTATT	999	24	67,5
TYCS2S	TGATTATGGCGTCTATGTTTCT	439	24	66,1
TYCS3A	TCCAGAGTTGACTTCCATTAT	1341	22	61,3
TYCS3S	CAGGGAGGATGTGGTGTCA	843	19	64,9
TYCS4A	CTCAACGTACGGGTAGTCAAATA	1773	22	60,4
TYCS4S	TTGCTGAAGATGGGATGAA	1286	19	61,8
TYCS5A	GCCCGGCATCAATCAGACTC	2165	20	69,1
TYCS5S	ATGGTGATGGTGGCTTTCCTACTT	1662	24	67,4
TYCS6A	AAGAGACCTAAAGAGACGAAATA	2428	24	58,2

**Tabelle D-5:** Spezifische Oligonukleotidprimer für die *Lycopersicon esculentum*  $\beta$ -Amyrinsynthase LeTTS1. Angegeben sind neben der Länge und der Schmelztemperatur  $T_m$  [°C] auch die Position der Primer (5'-Ende) innerhalb der Transkript-Nukleotidsequenz von LeTTS1.

Name	Sequenz (5'-3')	Position	Länge	$T_m$
AMYT	CGGTATTCAGCCAAACCCCA	2340	20	59,4
LEASA1A	GCTCAGCTGGGAATACT	527	17	55,0
LEASA2A	AAGGTGGAAGAAAAACAAA	473	20	57,7
LEASA3A	CTCCAAGAAACTGTATCCG	299	19	57,2
OGAS1A	CATCATTATCTCACTGGC	1388	19	54,5
OGAS2A	GTCATGTCCTTTTCTAAGCG	1419	20	55,3
OGAS2S	AAATGCCTGATGGTTCATGG	1890	20	55,3
OGAS3A	CATTCCTTTGAAATCACCAG	1474	20	53,2
OGAS3S	TGCTTCACATATGGTTCCTG	1928	20	55,3
OGAS4A	GTTCCATCCATTCAAAA	792	18	52,0
OGAS4S	TCTTGAGGGCTTGTGTC	1954	18	56,0
OGAS5A	ATGTTTTTCCCCACGAAGG	755	19	63,6
OGAS6A	AGAATCCATTTCTTGCTCTA	711	21	59,3
OGAS7A	CACGCATTATTTACACCGCC	683	20	64,9
OGASG1A	ATTTAGTTGTTTTCTAATGGTAAT	2376	24	53,8



**Tabelle D-6:** Spezifische Oligonukleotidprimer für die potentielle *Lycopersicon esculentum* Triterpensen-synthese LeTTS2. Angegeben sind neben der Länge und der Schmelztemperatur  $T_m$  [°C] auch die Position der Primer (5'-Ende) innerhalb der Transkript-Nukleotidsequenz von *LeTTS2*.

Name	Sequenz (5'-3')	Position	Länge	$T_m$
OGASG1S	AGATGTGGAAGTTGAAGATTG	61	21	58,2
OGAS6A	AGAATCCATTTCCCTTGCTCTA	685	21	59,3
LEASB1S	AGGGTTGTGGTAGTCAATC	1291	19	56,2

**Tabelle D-7:** Sonstige Oligonukleotidprimer, die zur cDNA-Erststrangsynthese, für Sequenzierungsreaktionen, für die Klonierung der Full-length-Klone von *RcLUS1*, *RcCAS1*, *LeTTS1* und *LeTTS2*, zur Synthese der Positivkontrolle für die RT-PCR bzw. Northern-Blot-Technik sowie für Site-directed mutagenesis-Versuche verwendet wurden.

Name	Sequenz (5'-3')	Länge	$T_m$
AP	GGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTTTT	37	75,2
AUAP	GGCCACGCGTCGACTAGTAC	20	66,9
PY2A	GGGCGTGAATGTAAGCGTGACATAA	25	71,1
RCACTINA	GAGCTGCTCTTGGCAGTCTCAAGTTC	26	71,1
RCACTINS	CGTTCTCTCCTTGTATGCCAGTGGTC	26	71,3
RCLSF257WA	AAGTGATCCGACAGTAACACCACATTTTTGCTGGGTGTAAG	41	76,9
RCLSF257WS	CTTACACCCAGCAAAAATGTGGTGTACTGTCCGATCACTT	41	76,9
RCLST416HA	GAAGAGCTAGACTTGTGTCCCAATGTTGACTTCCGAAACTCTGCAT	46	79,8
RCLST416HS	ATGCAGAGTTTCGGAAGTCAACATTGGGACACAAGTCTAGCTCTTC	46	79,8
SP6	ATTTAGGTGACACTATAG	18	42,6
T3	AATTAACCCTCACTAAAGGG	20	53,2
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	20	50,8
LETS2C5S	TTGGAGCTCAAGATGTGGAAGTTGAAGATTGCAA	34	71,7
LETS2C6A	CCCGAATTCCTATATGTAGTTGTGTTTTAATGGT	34	69,3
LETS1C3A	CCCGCGCCGCTTAGTTGTTTTCTAATGGTAATAC	35	75,4
LETS1C4S	TTGGAGCTCAGGATGTGGAAATTGAAAATTGCTG	34	71,7
LETS1C5A	CCCGAATTCCTAGTTGTTTTCTAATGGTAATAC	33	67,7
RCCS1C1A	ATTGCGGCCGCTTATGAAGCCTTGAGAACCCG	32	82,9
RCCS1C1S	TTGAGGTACCATGTGGAAGCTAAGGATTGCA	31	75,2
RCCS1C2S	TTGGAATTCAAAATGTGGAAGCTAAGGATTGC	32	74,1
RCTS1C1A	ATTGCGGCCGCTCATAAATTATTGGTGAATC	31	75,8
RCTS1C1S	TTGGAGCTCAGGATGTGGCGAATTAATAATAG	31	73,7

## Anhang E

### Klonierte Sequenzdaten

1	atataccact	aatctcatgc	aaagagg <b>atg</b>	tggcgaatta	aaatagctga	gggaggaaat	60
61	aacccttata	tttatagcac	aaacaat	caggggaaggc	aaatttgggt	at	120
121	aatgctggta	ctcctgaaga	acaagccgag	gttgaagaag	ctcgtcaaaa	cttctggaaa	180
181	aatcgatttc	agg	taactctgat	ctcctttggc	aactccagtt	tctaagggag	240
241	aaaaat	agcaaaaaat	tccaaaagta	aagg	atggcgagga	gatcacaagt	300
301	gaaatagctg	cagccgcttt	gaggagaagc	gtccacttgt	tttcggcctt	<b>gaggcaagc</b>	360
361	<b>gatggcatt</b>	<b>gg</b> gtgtgcaga	aaatggaggc	ctgctgttct	ttttgcctcc	cttgg	420
421	gctgtctaca	ttacaggaca	ccttaatact	gtat	cagagcatcg	caaagaaatc	480
481	ctccgttaca	tatactgtca	<b>tcagaatgaa</b>	<b>gatgggtggat</b>	<b>ggg</b> gaataca	cattgaaggt	540
541	cacagcacta	tgttttgcac	agttctta	tatatatgta	tgcgtatact	tgg	600
601	cgtgatgg	gaatagaaaa	tgctt	agagggcgaa	aatggatact	cgatcatggt	660
661	ggtgcaactg	gtatatcttc	ttggggaaa	acatggcttt	cgatacttgg	tgtgtacgag	720
721	tgggatggga	ccaatcccat	gccccagag	ttttgggcct	ttccatcttc	ttttccctta	780
781	caccagcaa	aaatg	ttactgtcgg	atcacttaca	tgccaatgtc	gtacttgtac	840
841	gggaagaggt	ttgttgg	aatcacacca	ctcattctac	aaataagaga	agaaatctat	900
901	aatgaacctt	acaacaaaat	caagtgg	agtgtgcg	at	aaaggaagac	960
961	aactat	cacatccaac	gatacagaaa	ctgttatggg	atgctctgta	tacatttagc	1020
1021	gagcctctat	tctctcgttg	gcccttcaac	aaattgagag	agaaggctct	caagataaca	1080
1081	atggatcaca	ttcattatga	agatcacaac	agtcggtaca	tactattgg	atgcgttgag	1140
1141	aagccgttat	gcatgcttgc	ctgttggatt	gaagatcctc	atggggaaagc	gtttaagaag	1200
1201	caccttgcca	gaattgcaga	ttacatatgg	gttggagaag	atggaataaa	gatgcagagt	1260
1261	ttcggaa	aaacatggga	cacaagtcta	gctcttcagg	cctgatagc	tagcgacctc	1320
1321	tctcatgaaa	taggacctac	actaaaacaa	ggacacgtct	tcacgaagaa	ttctcaggca	1380
1381	actgagaacc	cttcggg	cttcagaaaa	atgtttcg	atatctccaa	aggagcttgg	1440
1441	acattctctg	ataaagatca	aggatggcaa	gtttct <b>gatt</b>	<b>gtacagcaga</b>	<b>aag</b> cttgaag	1500
1501	tgctgcctac	ttttctcaat	gatgcctccc	gaaattg	gtgagaaaat	ggaacctgaa	1560
1561	aagg	attcagtcaa	tgtcatactt	tctcttcaga	gccaaaatgg	tgg	1620
1621	gcttgggagc	cagcaagagc	aggatcatgg	atggag	tcaacctgt	agagttcatg	1680
1681	gaggatcttg	tcg	cgagtatgtg	gag	catcagcaat	ccaagcacta	1740
1741	gttct	aaaaattata	tccccgacac	aggaacaaag	agattgaaaa	ttgtatcata	1800
1801	aatgctgcgc	agttcattga	aaatata <b>caa</b>	<b>gaa</b> ctgatg	<b>gtt</b> catg	ta	1860
1861	gggatatgct	tctcttatgg	tacctggttt	gcactgaaag	gatttagctgc	tgctggaag	1920
1921	acatatgaaa	attg	tattcgtaaa	ggtgttgatt	ttctactaaa	atca <b>caaaga</b>	1980
1981	<b>gatgatgg</b>	<b>gat</b> gggcaga	gagttatctt	tcatgtccaa	agaagg	tg	2040
2041	gagg	gatcaaatct	agttcaaac	gcttgggcaa	tgatggg	gatt	2100
2101	ggacaggcca	aaagagacc	tatgcctctt	catcgcgctg	caaagttatt	aattaattct	2160
2161	caaacagatc	ttggtgattt	tcctcaacag	gaacttacag	gagcattcat	gaggaattgc	2220
2221	atgctgcact	atgcactatt	taggaatact	tttcccattt	gggcttggc	agaatatcgg	2280
2281	cgacatgtct	tattcccttc	tgctggattt	gg	tcaccaataa	ttta <b>tga</b> gtg	2340
2341	atgaactcag	tctatgtact	taattaat	gttttaattg	actaccaata	atcgg	2400
2401	ctacaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaa				2426

**Abbildung E-1:** Nukleotidsequenz des Transkripts der *Ricinus communis* Lupeolsynthase RclUS1. Start- und Stopcodon sind jeweils fett gedruckt; die Sequenzbereiche, die dem DCTAE-Substratbindungsmotiv (grün) sowie dem QW3-Motiv (rot) entsprechen, sowie die nicht codierenden Sequenzbereiche (grau) sind farblich hervorgehoben.

1	actgcaacaa	acagaacgaa	ctgctatcat	tttactcaaa	caagttaaca	tcaattaaag	60
61	aaattgaaaa	aaaagaagaa	aagaa <b>atgtg</b>	gaagctaagg	attgcagaag	gaagtggaaa	120
121	tccatggcctt	agaactacaa	acgatcacat	tgggagacaa	gtctgggaat	ttgattcatc	180
181	taaaatcgga	tctccagaag	agctctcaca	aatcgaaaaat	gctcgtcaaa	atttcaccaa	240
241	aaaccgcttt	attcacaagc	atagttcaga	tctactcatg	cgcattcagt	tttcgaagga	300
301	aaatccaata	tgtgaagtgt	taccgcaagt	aaaagtgaaa	gaatcagaac	aagttaccga	360
361	ggagaaagtg	aaaattacgt	taagaagggc	attgaattac	tattcatcta	tt <b>caagctga</b>	420
421	<b>tgatggacat</b>	<b>tggcctggtg</b>	attatggcgg	tcctatgttt	ctaatgcctg	gcttgattat	480
481	agctctgtct	atcactggcg	cattgaatgc	aattttatct	gaggaacata	agcgcgaaat	540
541	gtgtcgatat	ctatacaacc	ac <b>cagaatag</b>	<b>agatggcgggt</b>	<b>tggggcttac</b>	acattgaggg	600
601	accaagcaca	atgtttggga	gtgtattgtg	ttatgtttcg	ttaaggctgc	ttggtgaagg	660
661	tcccaatgag	ggagaagggg	cagtcgagag	aggccgtaat	tggattctca	aacatggtgg	720
721	tgctactgca	attacgtcct	ggggaaaaat	gtggccttca	gtacttgag	catatgagtg	780
781	gtctggtaat	aatcccttac	cccctgagat	gtggccttctc	ccttacattc	tcccagtcca	840
841	tccagggagg	atgtggtgtc	actgccggat	ggtatatctt	cccattgtcat	atttatatgg	900
901	gaaaaggttt	gttggtccaa	tcacaccaac	agttttgtct	ttgagaaagg	agctgtatac	960
961	tgtcccatat	catgaaatag	actggaatca	agcacgcaac	caatgtgcaa	aggaagattt	1020
1021	gtactatcca	catcctatgt	tgcaagatgt	actttgggca	actcttcata	agtttggtga	1080
1081	acctattctt	atgcattggc	ctggaaaaag	gttgagagaa	aaggctattc	aaactgcgat	1140
1141	tgaacacata	cactatgaag	atgaaaaatac	tcgttacata	tgcatagggc	ctgtaaacaa	1200
1201	ggtgttaaat	atgctttgct	gttgggtgga	agacccaaac	tcagaagctt	ttaagttgca	1260
1261	tcttccaaga	ttatatgact	acctctggct	tgctgaagat	gggatgaaaa	tgcagggtta	1320
1321	taatggaagt	caactctggg	acacagcatt	cgcagttcaa	gcaattgtgt	caactaatct	1380
1381	tattgaggaa	tatggtccga	ctctaaaaaa	ggcacattca	ttcattaaaa	aaatgcaggt	1440
1441	tttggaaaaat	tgtccaggag	atcttaattt	ttggtatcgc	cacatttcaa	aaggtgcatg	1500
1501	gccattttca	actgctgatc	atggatggcc	catctcagac	<b>tgcacagcag</b>	<b>ag</b> ggaataaa	1560
1561	agctcttatg	ttgttatcaa	agattccttc	agagattggt	ggggaaggat	taaatgcaaa	1620
1621	ccggttatat	gatgcagtg	atggtgttct	ctcattacag	aatggtgatg	gtggccttcc	1680
1681	tacttatgag	ctctcaagat	cttatagttg	ggtggagttt	atcaaccctg	ctgaaacttt	1740
1741	tgggtgacatt	gttattgact	accogtacgt	tgagtgtact	tcagctgcaa	ttcaagcttt	1800
1801	gacatcattc	cgtaaatcat	atcctgaaca	tcagcgagaa	gagatagaat	gttgtatcaa	1860
1861	aaaggcagct	aagttcatgg	aaaaaattca	<b>gatatcagat</b>	<b>ggctcatgg</b>	atggctcatg	1920
1921	gggtgtttgc	ttcacctatg	gtacatgggt	tggcataaaa	ggtttggtgg	ctgccggaaa	1980
1981	aagctttggt	aattgttcca	gtatccgtaa	agcctgtgat	tttctgttgt	ctaaa <b>cagtg</b>	2040
2041	<b>tccttctggt</b>	<b>ggetggggag</b>	agagttatct	ttcatgtcaa	aagaaggttt	attccaatct	2100
2101	tgaaggtgac	aggtctcatg	tggtaaatac	tgcttgggct	atggttgagtc	tgattgatgc	2160
2161	cgggcaggct	gagagagacc	caacaccatt	gcatcgtgca	gcaagatatt	taataaacgc	2220
2221	tcaaatggag	aatggagatt	ttccacagca	ggaaatcatg	ggagtattca	ataggaattg	2280
2281	catgataaca	tatgcggcct	acagagacat	tttcccaatt	tgggcattgg	gagaataaccg	2340
2341	ttgccgggtt	ctcaaggctt	<b>cataa</b> acaag	tggaaaaaac	gttagaaaaat	aatatcattt	2400
2401	ctgggttattt	cgtctcttta	ggtctctttt	caaaaaattg	ctagaaatgc	ttcacacact	2460
2461	cttagagtta	ttttaacttt	aggcctcacc	agactttatt	tgatggggact	caaaaaaaaaa	2520
2521	aaaaaaaaa						2529

**Abbildung E-2:** Nukleotidsequenz des Transkripts der *Ricinus communis* Cycloartenolsynthase RcCAS1. Start- und Stopcodon sind jeweils fett gedruckt; die Sequenzbereiche, die dem DCTAE-Substratbindungsmotiv (grün) sowie dem QW3-Motiv (rot) entsprechen, sowie die nicht codierenden Sequenzbereiche (grau) sind farblich hervorgehoben.

```

1   acgtaagggc aacatatatt tcaaatttca tatattttat tgttgagggtg gtagacgtta 60
61  agagttcatt cgaacattcg attaaaggat gtggaaattg aaaattgctg aagggcaaaa 120
121 tgggccatat ttgtatagta caaataacta tgttgacga caaacgtggg agttcgatcc 180
181 aaatgggtgga acgatagaag aacgggctaa gatagaagag gctcgtcaac aattttgaa 240
241 taatcgttat aaagtcaagc ctagtagtga tcttctttgg cggatacagt ttcttgagga 300
301 gaaaaatttc aaacaaaaaa ttccagcagt aaaagttgaa gaaggtgaag aaattagcca 360
361 tgaagttgct acaattgcat tgcatagagc agttaatttc ttctcagctt tacaggcaac 420
421 tgatggatcat tggcctgctg aaaatgctgg tcctttgttt tttcttcac ctttggttat 480
481 gtgtatgtat atcactgggc atcttaatac agtattccca gctgagcatc gaaaggaaat 540
541 tcttcggtat atatactgtc atcagaacga agatgggtgga tgggggtttgc acatagaagg 600
601 tcacagtact atgttctgta cagctctgag ttacatttgc atgaggatcc ttggagaagg 660
661 accagatggc ggtgtaaata atgctgtgct tagagcaagg aaatggattc ttgatcatgg 720
721 tagtgtcacc gcaattcctt cgtggggaaa aacatggctc tcgattcttg gagtttttga 780
781 atggatagga accaatccaa tgccacctga gttttggatt ctccatctt ttcttcccgt 840
841 gcatccagca aaaatgtggt gttactgtcg aatggctctac atgccgatgt cttacctcta 900
901 tgggaagaga ttcgttggtc caatcacacc tctcattttg caactaaggg aagagttata 960
961 tgatcgacca tacgatgaaa ttaactggaa gaaagtgcgc catgtatgtg caaaggagga 1020
1021 tctttattac cctcatccat tggttcaaga tttgatgtgg gatagtctct acatatgtac 1080
1081 cgagcctttg ttgaccggtt ggcctttcaa caagctgaga aacaaagctc ttgaagttac 1140
1141 catgaaacac atacactatg aagacgagaa tagtcgatac atcaccatcg gatgtgtcga 1200
1201 aaaagtattg tgcattgctt cttgttgggt cgaggatcct aacggcgatt atttcaaaaa 1260
1261 acatcttgct aggatccctg attatztatg ggtagctgaa gatggaatga aaatgcagag 1320
1321 tttcggtagt caagaatggg atactggttt tgctatccaa gcactattgg ccagtgagat 1380
1381 gaatgatgag atagcagata cgcttagaaa aggacatgac tttataaaac aatctcaggt 1440
1441 gacgaacaat cegtctggtg atttcaaagg aatgtatcga catatctcaa aaggatcatg 1500
1501 gactttttca gatcaagatc atggatggca agtctctgat tgcaactgctg aagcattaaa 1560
1561 gtgctgcctt ctgttgtcta caatgcctcg tgaattagtc ggtcaggcaa tggagccagg 1620
1621 gcgattgtat gactcgggtga atgttgttct ttcattacag agcaaaaatg gcggttttagc 1680
1681 agcatgggaa cctgcaggag cctccgagta tttggagctg ctgaatccta ctgaattttt 1740
1741 cgcgacatt gtcattgagc acgagtacgt cgaatgcact gcctcatcaa ttcaagcact 1800
1801 tgttctgttt aagaagctgt atcccggaca cagaaccaag gagattaaca tattcattga 1860
1861 taatgctggt aaatatcttg aagatgtaca aatgcctgat ggttcatggt atggtaactg 1920
1921 ggggtgtttg ttcacatatg gttcctgggt tgctcttggg gggcttgttg cagcaggcaa 1980
1981 gtcctacaac aactctgcag ctgttcgtaa aggcgttgaa tttctgctaa gaacacaaag 2040
2041 atccgatggt ggttggggcg aaagctaccg ttcttgcca gacaaggat atagagaact 2100
2101 cgaaacaaat gactcaaate ttgtacaaac tgcattgggca ttgatgggat tgattcactc 2160
2161 tggacaggct gatagagatc cgaaacccct tcaccgtgca gcaaagttgt tgatcaattc 2220
2221 tcagatggaa gatggtgact tcccacagca ggaaattact ggagttttta tgaagaattg 2280
2281 catgttgcat tatgcagcat acagaaatat atatccatta tgggggtttgg ctgaataccg 2340
2341 caaaaatgta ttattacat tagaaaaaa ctaaatatat ataatttttc gatatagagt 2400
2401 gcaatttgggt cctttttttt tttgggtgta atgtgagtga tgtaacaaaa gtaaaaattc 2460
2461 atagcctaag ttaattttat tattttgtat tacataattt gtgaataaag aaagttacat 2520
2521 aaaaaaata aaaaa 2535

```

**Abbildung E-3:** Nukleotidsequenz des Transkripts der *Lycopersicon esculentum*  $\beta$ -Amyrinsynthase LeTTS1. Start- und Stopcodon sind jeweils fett gedruckt; die Sequenzbereiche, die dem DCTAE-Substratbindungsmotiv (grün) sowie dem QW3-Motiv (rot) entsprechen, sowie die nicht codierenden Sequenzbereiche (grau) sind farblich hervorgehoben.

```

1      aaaaacatga tttataatTTT cttctctttc agcctactaa acttgaagaa gatattaaca 60
61      agatgtggaa gttgaagatt gcaaaaggac tagatgatcg atacttgtat agtacaaaata 120
121     actatattgg acgacaaaata tgggagttcg atccaaatgc tggacaata gaagaacaag 180
181     ccaaaatcga agaggcacgt caacattatt ggaacaatcg ttacaaaggt aagcctaata 240
241     gtgatcttct ttggagaatg cagtttttga gagaggagaa tttcaaacag agaattagag 300
301     cagtaaaagt agaagaagga gaagaaatta gccatgaaat tgctacagtt gcattgcata 360
361     gagctgttca tttcttctca gccttacagg ctactgatgg acattggcct gctgaaagtg 420
421     ctggctctct cttcttttct ccacctctcg ttatgtgtat gtatatcact gggcatctta 480
481     atactgtata tccagctgaa catcggaagg aaattcttct ttatatatac tgtcaccaga 540
541     atgaagatgg tggatggggt ttgcatatag aaggtcacag tactatgttc tgtacagcta 600
601     tgagttacat ttgcatgagg atccttggag aaggaccaga aggcggtggt aataatgcgt 660
661     gtgctagagc aaggaaatgg attccttgatc atggtagtgt catcgccatt ccttcttggg 720
721     gaaaaacatg gctctcgatt cttggagctt tcgaatggat aggaaccaat ccaatgccac 780
781     ctgagttttg gattcttcca tcttttcttc ccgatgcatcc agcaaaaatg tgggtgttact 840
841     gccgaacggt ctacatgcca atgtcttata tctatgggaa gagatttgtt ggtccaatca 900
901     cacctcttat tttgaaattg agggaagagc tgtatgatca gacatatgat gaaattaact 960
961     ggaaaaaagt ggcctatgta tgtgctaagg aggatcttta ttaccgcat ccttttgttc 1020
1021    aagatttgat gtgggatagt ctctacatat gtaccgagcc tctattgact cgttggcctt 1080
1081    tcaacaagtt gagaaataaa gctcttgaag ttaccatgaa acacatacac tatgaagacg 1140
1141    agaatagtcg atacatcacc atgggatgtg tggaaaaagt attgagtatg ctcgcttgtt 1200
1201    gggttgagga tcccaatggc gatcatttca aaaaacatct tgctaggatc ccagattttt 1260
1261    tatgggtagc tgaagacgga atgaaaatgc agggttgtgg tagtcaatca tgggatgcta 1320
1321    gtcttgctat tcaagcgcta ttggccagtg agatgtatga tgagatatca gatactctta 1380
1381    aaaatggaca cgactttata aaacaatctc aggtgaagga caatccttct ggtgatttta 1440
1441    aagtgatgta tcggcatatc tcaaaaggat catgggcttt tgcagatcaa gatctcggat 1500
1501    ggcaagtatc gattgcaact gccgaagcgt taaagtgtcg ccttctcttc tctacaatgc 1560
1561    ctctgaaat agttggtgag gcaatggatc cagtgcgact gtatgactcg gtgaatgta 1620
1621    ttctttcatt acagagcaag aatggggggt tatcagcgtg ggaacctgca ggggccccag 1680
1681    agtatttgga gttgttaaat cctactgaat ttttcgagga tattgtgatt gagcacgagc 1740
1741    atgttgagtg cactagctcg gcaatccaag cacttgctcg ttttaagaag ctataccctg 1800
1801    gacaccgaac cacggagggt gacaatttta ttaataatgg tgttaaatat attgaagatg 1860
1861    tacaggagcc tgacggttca tggtatggta actggggcgt gtgcttcata tacgcttcct 1920
1921    ggtttgctct tggagggcct gctgctgtag gcttgtcgta cagcaactgt gcagctgttc 1980
1981    gtaaaagcgt agaatttctt ctaagaacac aaaggtctga tggtgggtgg ggagaaagct 2040
2041    accgttcttg tctgacaag gtatatcgag agcttgaaac agaacactcg aatcttgtac 2100
2101    aaactgcatg ggcattgatg ggattgattc actctggcca ggttgagaga gatccgaggc 2160
2161    ctctccaccg cgcagcaaag ctgttaatta attttcagat ggaagatggt gacttcccac 2220
2221    aacaggagat aactggtggt ttcttgagga attgcatgat gcactatgca ttatatagga 2280
2281    atatatttcc attgtgggggt ttggctgaat accgcaggaa tgttttagta ccattaaaac 2340
2341    acaactacat atagagaatg caatttgggc cttccgcgga ttccgtatat agcggggagct 2400
2401    tagtgaatcg agttgtccgt tgtttgtttt ttgtgttaat gtaagtgatc acccaagtag 2460
2461    tggttagata tgactatgat cgacctgtta ggttgtggag cctaattaat atttgttcta 2520
2521    ctgcaatatt tattctccat ttattctcta taacctaaaa tactttgaaat tattaatata 2580
2581    tatacccacc gccgtggaag ttactcacg ggggtgttacc acgaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2640
2641    aaaaaaa 2647

```

**Abbildung E-4:** Nukleotidsequenz des Transkripts der *Lycopersicon esculentum* Triterpensynthase LeTTS2. Start- und Stopcodon sind jeweils fett gedruckt; die Sequenzbereiche, die dem DCTAE-Substratbindungsmotiv (grün) sowie dem QW3-Motiv (rot) entsprechen, sowie die nicht codierenden Sequenzbereiche (grau) sind farblich hervorgehoben.

1	atataccact	aatctcatgc	aaagaggatg	tggcgaatta	aaatagctga	gggaggaaat	aacccttata	70
71	tttatagcac	aaacaatttt	caggggaaggc	aaatttgggt	atttgatcct	aatgctggta	ctcctgaaga	140
141	acaagccgag	gttgaagaag	ctcgtcaaaa	cttctggaaa	aatcgatttc	aggccaagcc	taactctgat	210
211	ctcctttggc	aactccagtt	tctaagggaa	aaaattttaa	agcaaaaat	tccaaaagta	aaggttgaag	280
281	atggcggagg	gatcacaagt	gaaatagctg	cagccgcctt	gaggagaagc	gtccacttgt	tttcggcctt	350
351	gcaggcaagc	gatggccatt	ggtgtgcaga	aaatggaggc	ctgctgttct	ttttgcctcc	cttggttttt	420
421	gctgtctaca	ttacaggaca	ccttaatact	gtatttttct	cagagcatcg	caaagaaatc	ctccgttaca	490
491	tatactgtca	tcagaatgaa	gatgggtgat	ggggaataca	cattgaaggt	cacagcacta	tgttttgcac	560
561	agttcttaat	tatatatgta	tgcgtatact	tggggaagca	cgtgatggtg	gaatagaaaa	tgcttgtgaa	630
631	agaggcggaa	aatggatact	cgatcatggt	ggtgcaactg	gtatatcttc	ttggggaaa	acatggcttt	700
701	cggtaaagtc	aatttggctgt	gaatcttctg	tgctagattc	ttattacggt	gcttcaattt	agttgatttg	770
771	agttgtaaaa	aattttcaaaa	tttcatccac	tgtagatact	tgggtgtgtac	gagtgggatg	ggaccaatcc	840
841	catgccccca	gagttttggg	cctttccatc	ttcttttccc	ttacaccag	gttcgtatat	gtatctattt	910
911	tcactgttta	attaggggaga	aaaattgatc	ttactgttctg	attaataatgc	acctcaggaa	tttctattcta	980
981	gtctagtacc	gaattcaggt	tttttcatgt	ttacctcttg	cctgttttatt	tttctacacg	aatatgatata	1050
1051	ccaattaatt	atataacaatc	tctgcagcaa	aaatgttttt	ttactgtcgg	atcacttaca	tgccaatgtc	1120
1121	gtactttgac	gggaagaggt	ttggttggtc	aatcacacca	ctcattctac	aaataagaga	agaaaatctat	1190
1191	aatgaacctt	acaacaaaat	caagtggaa	agtgtgcgtc	atttatgtgc	aaaggtaata	gcaggttca	1260
1261	tttccttttc	aaggactaat	ttacaatcat	tttctgaaat	ttgattttaga	gtgtaaaaact	atataatgtg	1330
1331	ccattacagg	aagacaacta	ttttccacat	ccaacgatac	agaaactgtt	atgggatgct	ctgtatacat	1400
1401	ttagcgagcc	tctattctct	cgttggccct	tcaacaaaat	gagagagaag	gctcccaaga	taacaatgga	1470
1471	tcacattcat	tatgaagatc	acaacagctg	gtacatcact	attggatgcg	ttgagaaggt	aacatgattt	1540
1541	taaaaactaag	gaaaaaaaat	agtgcacgca	tatatatagt	ggtaaatggtt	cttctgatct	gagattcatt	1610
1611	ttttaattca	aacgaaaaca	gccgttattg	atgcttgctt	gttggattga	agatcctcat	ggggaagcgt	1680
1681	ttaagaagca	ccttgccaga	attgacagtt	acatatgggt	tggagaagat	ggaataaaga	gcaggtaaac	1750
1751	tacacactcc	catgaagctt	actatgacaa	aagagataca	tgtttcttct	tttattttat	tattattatt	1820
1821	gaaatatta	aagttaaact	tgatatatga	ggagaagcat	aaatctaagc	tcatttgcag	agtttcggaa	1890
1891	gtcaaacatg	ggacacaagt	ctagctcttc	aggccctgat	agctagcgac	ctctctcatg	aaataggacc	1960
1961	tacactaaaa	caaggacacg	tcttcacgaa	gaattctcag	gtgtctgcac	ttatatacta	tgttgtttct	2030
2031	tcttctttaa	ttaccatcca	tagtacgaga	tgaatgaata	tttcttctat	tttgggcttt	tctttctgtt	2100
2101	tttcaaaagc	aaactgagaac	ccttcggcgc	acttcagaaa	aatgtttctg	catatctcca	aaaggacttg	2170
2171	gacatttctc	gataaagatc	aaggatggca	agtttctgat	tgtacagcag	aaagcttgaa	ggtaattaag	2240
2241	ttttttgact	acagcttaaa	atcgcacaaa	caattgagaa	ttaaacatcg	cttataaata	atcatgggtg	2310
2311	tcaatttctc	ttatgttgca	gtgctgccta	cttttctcaa	tgatgcctcc	cgaaattggt	gggagaaaa	2380
2381	tggaaacctg	aaaggtctat	gattcagatc	atgtcatact	ttctcttctc	gtaagaatta	tttgcctcta	2450
2451	aatgctgtca	atggactagt	cgtctagtta	ttatatagt	tatatgacat	cgaggatata	atctttttac	2520
2521	tatttttaatt	gatatttact	actgtgattt	ttccataatg	taacagtcog	tgtaatttca	atactcatta	2590
2591	attatthaact	gcagagccaa	aatggtggtt	tcacagcttg	ggagccagca	agagcaggat	catggatgga	2660
2661	ggtaaactatt	tcaaaaatact	gaatcaagaa	ctagaaatca	atgcattttc	tttctttaa	agttgcaagc	2730
2731	agttcattgg	aaagttcaga	ttttattgag	agtcatttca	tctttttaa	ttaaaattt	atcaactcgg	2800
2801	ttttcaatat	acttatttta	ttaaagttct	ctagtccaag	taacataat	tcattaacat	gccaacattc	2870
2871	ttttgctctc	aattagtggc	tcaaccctgt	agagttcatg	gaggatcttg	togttgagca	cgagtaagaa	2940
2941	tcttactcca	atctcatttt	gtagtaagca	aattactgtt	aaatgattag	tgtagtactc	tggactagt	3010
3011	cccagcctac	taataaaaata	gcgatgcagg	tatgtggagt	gcacttcac	agcaatccaa	gcactagtcc	3080
3081	tttttaaaaa	attatatccc	cgacacagga	acaaagagat	tgaaaattgt	atcataaatg	ctgcgcagtt	3150
3151	cattgaaaat	atacaagaac	ctgatggttc	atggatcagat	taattaaatg	tttcttgggt	cctagccaaa	3220
3221	gttcatttag	aaagtaaat	acatgtataa	taaaggatta	atcaatttca	ttaccgcag	tatggaaatt	3290
3291	gggggatatg	cttctcttat	ggtacctggt	ttgcaactgaa	aggattagct	gctgctggaa	ggacatata	3360
3361	aaattgttct	gctatctgta	aaggtgttga	ttttctacta	aaatcaaaa	gagatgatgg	tggatgggca	3430
3431	gagagttatc	tttcatgtcc	aaagaaggtg	tacaatcaat	gtcttgggtt	ttacataaat	taaaaaaat	3500
3501	ttataaaaata	aaaggagttt	aattatctgt	cactaattaa	atataataat	tactacttta	cgagataaat	3570
3571	actcgaattt	tactagctta	atcttactagt	aaactcgttg	atcttctctt	attatataatg	taaaaacaaa	3640
3641	taaagtttgg	ccatattgat	tcaatatcag	gtgtatgttc	cttttgagg	taatcgatca	aatctagtct	3710
3711	aaactgcttg	ggcaatgatg	ggtttgattt	atggaggaca	ggtgagtta	tagttcagtc	atgtaagagt	3780
3781	caatttataa	tatcatctcc	tagttccatt	tatggttatg	taatgtgaca	aacttcttat	aattaggcca	3850
3851	aaagagacc	tatgcctctt	catcgcgccg	caaagttatt	aattaattct	caaacagatc	tgggtgattt	3920
3921	tctcaacag	gtatcttcat	tcactttaaa	gaaataagaa	gaggaaaact	aatgacagat	agatttacca	3990
3991	attggttgatt	gcttaattac	ttaattgttg	caggaactta	caggagcatt	catgaggaat	tgcatgctgc	4060
4061	actatgcact	atthaggaat	acttttccca	tttgggcttt	ggcagaatat	cggcgacatg	tcttattccc	4130
4131	ttctgctgga	tttggttttg	gattcaccaa	taatttatga	gtgatgaact	cagtctatg		4189

**Abbildung E-5:** Genomische Sequenz der *Ricinus communis* Lupeolsynthase RCLUS1. Start- und Stopcodon sind jeweils fett gedruckt. Die Sequenzbereiche, die dem DCTAE-Substratbindungsmotiv (grün) sowie dem QW3-Motiv (rot) entsprechen, sind farblich hervorgehoben. Die nicht codierenden Intron-Bereiche sind grau unterlegt, nicht codierende Bereiche am 5'- und 3'-Ende sind kursiv gedruckt.

1	aaagaagaaa	agaaatgtgg	aagctaagga	tgcagaagg	aagtggaaat	ccatggccta	gaactacaaa	70
71	cgatcacatt	gggagacaag	tctgggaatt	tgattcatct	aaaatcggat	ctccagaaga	gctctcacia	140
141	atcgaaaatg	ctcgtcaaaa	tttcaccaaa	aaccgcttta	ttcacaagca	tagttcagat	ctactcatgc	210
211	gcattcaggt	ttcttgctgt	gattctctgt	ttgttgacaa	tgccgaacga	actgagtcot	agttagttat	280
281	aatgtgctgt	tactgttggt	ttgtagtttt	cgaaggaaaa	tccaatatgt	gaagtgttac	cgcaagtaaa	350
351	agtгааагаа	tcagaacaag	ttaccgagga	gaaagtгaaа	attacgttaa	gaagggcatt	gaattactat	420
421	tcattctatt	<b>c aagctgatga</b>	<b>tgacattgg</b>	cctggtgatt	atggcggctc	tatgtttcta	atgcctggct	490
491	tggtaatfff	ttcattttcat	tgttagttta	ttgttttaat	tttaaatgft	tgtatggtga	ttcttgttac	560
561	tcattcagat	tatagctctg	tctatcactg	gcgcattgaa	tgcaatttta	tctgaggaac	ataagcgcga	630
631	aatgtgtcga	tatctataca	accaccagc	atgtgtttca	atagtttttc	atfittaccat	tgctgtcact	700
701	ttctctgtgt	ttcttataat	gtcaaaaatta	tggaaatftg	agaaatagaga	<b>tgccggttg</b>	ggcttacaca	770
771	ttgagggacc	aagcacaatg	tttgggagtg	tattgtgtta	tgtttcgtta	aggctgcttg	gtgaaggctc	840
841	caatgaggga	gaaggggag	tcgagagag	ccgtaattgg	attctcaaac	atggtggtgc	tactgcaatt	910
911	acgtcctggg	gaaaaatgtg	gctttcagtt	cagtttttca	aaatgcttta	gcttttagatt	tgttttagca	980
981	gttgcttaaa	gttttagagc	ttgatgggaa	caggtacttg	gagcatatga	gtggctctgg	aataatccct	1050
1051	taccacctga	gatgtggctt	ctcccctaca	ttctcccagt	ccatccagg	tcttgcctat	ttccatctcc	1120
1121	ttttaataat	gcatatata	aatattaata	tatatgtaca	ttactaggga	cataacaatg	taaacataca	1190
1191	tggatgtgt	tttttggtca	aaagggtaat	tataactcaa	caacactggc	caaatcatgc	tgacttgctg	1260
1261	aacatcagag	tgcagatgtg	cacatgcatt	tggcaattct	attaagcaag	tagttgcata	ttttattggc	1330
1331	tgtattgtc	aaataagact	tagaatcatg	tatcatgttc	ttctgtgaag	atftraaaatc	agatgggttt	1400
1401	gactatatgg	tcttcatctg	atatatgatt	attgggaaat	ttaagttata	aattggggaa	attccacata	1470
1471	ttcattcctg	gtaggagtca	aagtgttatt	tttcaacttc	tgcagggagg	atgtgggtgc	actgccgat	1540
1541	ggtatatctt	cccattgtcat	atftrtatgg	gaaaagggtt	gttgggtcaa	tcacaccaac	agttttgtct	1610
1611	ttgagaaaag	agctgtatac	tgtcccata	catgaaatag	actggaaatca	agcaccgaac	caatgtgcaa	1680
1681	aggttggtaa	ctaggatcat	agtgccacta	aatcccaagt	ccagcatgta	catattctcg	ttgtatccct	1750
1751	tttctacatc	tctttgcact	tgtaatggca	tctaaaagaa	atgctacacc	aagcactggt	tttatctctg	1820
1821	ttttaaccct	gctacgttgg	cataaacata	ttacttgttt	ttcttctttt	cttttgagg	aagatttgta	1890
1891	ctatccacat	cctatgttgc	aagatgtact	ttgggcaact	cttcataagt	ttgttgaacc	tattcttatg	1960
1961	cattggcctg	gaaaaagggt	gagagaaaag	gctattcaaa	ctgagattga	acacatacac	tatgaagatg	2030
2031	aaaatactcg	ttacataatg	atagggcctg	taaacaaagt	gtgagtttaa	gggttttcat	cactgctaat	2100
2101	tctcttagaa	aatftrtctta	cccttaattc	agaattatftg	ataaacaatg	atcacttaga	gcaacagata	2170
2171	tttccaaatt	ccaattaatt	tgattftttgt	ttttcagatg	ccttacttcc	gtttttggca	gttttttatt	2240
2241	ttataattat	tttggctctg	aggtgtttaa	tatgctttgc	tgttgggtgg	aagaccctaa	ctcagaagct	2310
2311	tttaagttgc	atcttccaag	attatatgac	tacctctggc	ttgctgaaga	tgggatgaaa	atgcaggctc	2380
2381	caaataatgt	ctgccaaact	taaatactft	gacgcacaaa	catagtgtgt	gaaaagttgt	caagcttcc	2450
2451	aggaacattg	gaatagaagc	caatcactga	tattgtgtta	cttgatatgc	atccatgcta	gtatgggtgc	2520
2521	tgtttctact	ttgtgtatg	catcaccaac	tgagataata	aaaaaaatat	aatttggtgt	ttcacagctt	2590
2591	attaccatgt	gtatfttcttc	aatftrtcttg	ggcaactcaga	gcaaaactgt	atcaataaaa	gatataataa	2660
2661	actggctgca	gggtttata	ggaagtcaac	tctgggacac	agcattcagca	gttcaagcaa	ttgtgtcaac	2730
2731	taatcttatt	gaggaatatg	gtccgactct	aaaaaggca	cattcattca	ttaaaaaaat	gcagggtgat	2800
2801	ttcccctct	caagcccttg	gtgtfttctca	ttgaggatt	catattatag	tctfttfaat	cttgaaatgt	2870
2871	ttactttgta	attgtatctt	tttggatttg	aaggfttttg	aaaattgtcc	aggagatctt	aattfttgg	2940
2941	atcgccacat	ttcaaaagt	gcattggcct	tttcaactg	tgatcatgga	tggccactct	<b>cagactgcac</b>	3010
3011	<b>agcagaggga</b>	atcaaaagat	gtgctccct	ttcttaagt	tttctgata	acttgcatgt	gattgtgttt	3080
3081	gtaggctctt	atgtttgtat	caaagattcc	ttcagagatt	gttggggaag	gattaaatgc	aaaccggtta	3150
3151	tatgatgcag	tgaatgttgt	tctctcatta	caggtaactc	atgcttgggt	atftttgaact	agacaaaaca	3220
3221	taccgatftg	ctaataaaac	ttcatcttct	gttatfttata	tatctctagt	tgctftttft	ttfttaatt	3290
3291	tgtttattcc	ctagacatgc	aatcagatcc	tatttaggag	cccatactat	gtatgaataa	gatatttatt	3360
3361	cctagaaaaa	actggcaagc	aaagatcata	tctfttgftag	caagcaaaga	tcatactftg	gtaggctctc	3430
3431	caaagatgtc	tcagcactaa	tgccaggtag	cactagacaa	ggtfttattg	ttagtfttaca	gatgactftg	3500
3501	gcattgtgat	taagcgaaaa	taattcatac	aatccagaag	aaataaatt	taataaaatc	tttatattca	3570
3571	tcattgtaaaa	gaggftttatt	aaattattat	actftfttftat	agtcagagat	atftraactatc	ataaatagta	3640
3641	catatcaaaa	ataggfttata	gtgtatttaa	tgtataact	tatgctctga	acgagcttac	tgttgagcta	3710
3711	attatggftt	tctaaaaaca	agctgattat	caagcttftg	aaatgaacta	gctcgcaagc	tctttaaagc	3780
3781	gccatcttat	gaatttgat	gagccagta	caaatacgt	caagctctgc	tatgacaaa	tcatttattg	3850
3851	acagctfttft	ttgagccaat	gcagcccgtc	caaagaccaa	ggctfttftg	ggftcccgat	taaaaggact	3920
3921	agtgctgaca	atctattgca	agtggtttga	gtgaaataag	catftgftt	ctgaagcatg	tgttatgtgc	3990
3991	ttctgtatgg	tttatgcgtt	gtftftfttat	atgactfttgc	ttfttatct	aggtataacc	acacatggaa	4060
4061	ggctagfttg	gattggctac	acgtatatgt	cctftfttct	tttggfttct	ctcccattg	aacttgata	4130
4131	ttcttftgtc	aatttccatg	agcatfttct	tcagfttct	tcaccaata	gacattgact	attatgctgt	4200
4201	cttgatggaa	taaacaaaat	tattfttct	tttctcatt	tattaaatta	ttggtgfttg	tggatgcacc	4270
4271	tttccccttg	aattfttacia	ataattact	gattfttacia	atctgatagc	agaacagaa	tgaaggatag	4340
4341	agaaacaaga	tgttcaaat	ttggaggct	tatagagg	ggcacattaa	tcattatgaa	catfttata	4410
4411	agctaataag	tctgtatftt	tcacagftct	cctgccatt	atcacagtgg	aattfttcaag	ggacacttcc	4480
4481	aaatattcat	gcattgtftt	tctatfttct	ctgcactgta	cagaatgggtg	atgggtggct	tctacttat	4550
4551	gagctctcaa	gatcttatag	ttggftggag	gtattatct	tcattgtgtt	cttgcata	ttgttatgta	4620
4621	ccattgtftt	ttctfttft	tctaattctg	cactfttatg	ttaaaaacca	tgttctgtag	taatctccaa	4690

```

4691 catatgtaag attagtgtta ataattatgc atggcatagt taatgagctg ttctctgacc ctccttgtgt 4760
4761 gatagatatt gtagactggt ttcagatfff tgacattagt gttgctaaac aagaaaccta ccatataatt 4830
4831 aattgatcta ttacctttat gtcagggggc ttgtttgggt atttcatata cttaggtggt ttagtagtaa 4900
4901 acccatttga tgtacttgct atgcctcctc ccagcttgcg tccaaactgt aatccttgct catcttcaga 4970
4971 gaaattatcc ataacgaaaa aaaagcaact caacaaatta atcaatgtcc cacagttaag gattttaaat 5040
5041 ttttagctggt atgggtattct ctctcttttg aagtcaaaga ataaatcact tttgtaaaac atacagaaaa 5110
5111 aacatcacca aatgaagtta tagttcttgt actcctaaaa gtaacaactt tttttccttt ttctcatttg 5180
5181 actgtttatc tttttcaatt tgcaaaaaca ccttagaatc tagcaagaca cataaaagat aggatacctt 5250
5251 gaatcgacaa ctttacctgc aaatgaaaca ttttaaatgat tgtcctctca agtagttttg tgagaaatta 5320
5321 taaatfffac aaagatgac taagcatgaa aattgaatta ttttaagata tacatatggt tgatatfita 5390
5391 aaattatcat atttatgatt ataaagcaag ctgtaattat atttgaagaa ataaacaaaa atacagaaac 5460
5461 atttttctga ctgtaaatg aaatfitaact aaaaagatta ataggtaaat atattcgaag aaagaatacg 5530
5531 ttgaaattat tgttatttat ggtttgggac attaaagggt tcgtgaaaga gtttgatatt tttttattgg 5600
5601 tttgaagttg tgtacttaat aattcttaca cactaaattt gaagaatagg acttaaaaac ttgtttaaga 5670
5671 acttctagga cttaatgtta aaaactagcc cactttcagg cttctactgc aagtatactt taaatfitaac 5740
5741 ttggttttac attggaacat aaattcttag caatfitaact atggcttttg cttcattfita ttataatttg 5810
5811 attgtcttta atfcactfff ctatgcctca actfffccat ttcagtttat caaccctgct gaaacttttg 5880
5881 gtgacattgt tattgactac ccgtaagtta ctgtcaatt caatfitaatc aactctggtg tgcttaacatc 5950
5951 attgttataa ttaaacacct ttttatatga ttataggtac gttgagtgta cttcagctgc aattcaagct 6020
6021 ttgacatcat tccgtaaac atatcctgaa catcagcgag aagagataga atgttgatc aaaaaggcag 6090
6091 ctaagttcat ggaaaaaatt cagatatcag atggctcatg gtatgataat cttcatctag aatfffact 6160
6161 tggatgtcct aatcaagtcc ataaactgtc cttgttgggt ccagttgtct gcattaatta tcaagatttc 6230
6231 atggcagat atcttaagt ccctaagcta catgctgaaa tccaactgaa aacttgaatc atttatctat 6300
6301 gctatcttta aatgcaaac tgttgacag g tatggctcat ggggtggtg cttcacctat ggtacatggt 6370
6371 ttggcataaa aggtttgggt gctgcccga aaagctttgg taattgttcc agtatccgta aagcctgtga 6440
6441 ttttctgttg tctaaacag t gtccttctgg tggtntnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 6510
6511 nnnnnnnnnn nnaaggtga caggtctcat gtggtaata ctgcttgggc tatgttgagt ctgattgatg 6580
6581 ccgggcaggt agttatgtct gttttattgt tttgctgcac atactattgt tggatactct atggctccgt 6650
6651 ttcactttgt gtggacaaaa gcgcttttaa atctfffct ctgagttttg aaaaatgctt ttgtataaaa 6720
6721 agtatgtaaa ttgatfitaag cagagttgat atgtttataa ctaattagac aaaccaaact ctatfitaat 6790
6791 aaagaaaaat ttgatctgct atttfitaaca cccaaatcaa tttgatfita ttcctggaat ctactggaag 6860
6861 ggtgttagta actgtttaga atcttatgaa agtaagattt ggttttctct aacagtagat cacatfitaact 6930
6931 tcttatatgg cctgcgtaag gtttgtatta actaactaat ccatatcatc aatfitaata gaacattfita 7000
7001 tattggaata aggtccaaat aggccctta actttgcagg tagggctgaa taggtccttt tgactfffct 7070
7071 gggtcatttt ttaacctaaa ccctagatga gagagtgaga gtcactctcc tttagaata aaaaagaaaa 7140
7141 gtttaagtaa aataaataaa tagtfaattt ttactaaggg ttcataattt tfaatgfaat tattaatagc 7210
7211 taattacttg tttgtfaaat ttaattfita tttfitaagaa tttttatttg tttttactc atagctcctc 7280
7281 cctagaaatg ggctaaagt aactgaaaa aagaaaagt ctggattaaa atgtccaaa aaggtcaaaa 7350
7351 gggctctatt ggcttgcct gtaaagfita ggggcctatg taaacctat tctttfita tttgataaga 7420
7421 tttgcgtact ttgtcaatc aatctgaaac tcttcatct tttatfita tttcattfita ataaatfita 7490
7491 caatggtact aactfitaat ctgaacag g tgagagagac ccaacacat tgcatcgtg agcaagatat 7560
7561 ttaataaacg ctcaaatgga gaatggagat tttccacagc aggtattctc cttggttga tagctttgtc 7630
7631 gtactgatt atgtctfff cttfffcca aatfitaaaa aaaaaagag aaccgtgaa ttcattgga 7700
7701 aatacacttc agttctggcc cgttfitaat gtagctaac gaatfitaact atagctcctt 7770
7771 actttatcat ataaatcat tttaatcct caaaaccaga ctctattaca ttaaaacag tggggactaa 7840
7841 agtgtaaac atgatgaggt tctfitaatc tctctfff tctgcctcc ctaattgat atfitaaga 7910
7911 cacattgtca gagctcatc gaatgatgct gccctfff at cctfffact tttctfita tctatfita 7980
7981 tctttctgt ctggattgt atfitaagt ttgtctgtg ttgtgattc attgagata acgatattg ctccttga 8050
8051 ttgaacactg tatttagfita aaatccggt gtgaactat tacaatgaa tttatgctc ctatgctaa 8120
8121 atagtaacta tagaattac tctgaagta aatattgta ttggaatac tctagaatc aatagagaa 8190
8191 ggaagagaga aaatcggctg gtttagaaag agagaaat tatagaaaga atagacaaa aagataat 8260
8261 tgaaaggtgt atfitaagtt tataaacat atfitaact tactataaaa tctattcga aattctgtta 8330
8331 gctttgttag aatfitaagtt aatcatagc aatfitaata tttfitaata gttgaattc gaatgaact 8400
8401 ttatfitaat taaatagta gatfitaag gggfitaaca atatfita gttaatctc tttatfita 8470
8471 ttttctatfita ttttctctt ttttctcagg aatcatggg agtattcaat aggaattgca tgataacata 8540
8541 tgccgctac agagacatt tcccaattg ggcattgga gaataccgt gccgggtct caaggctca 8610
8611 taacaagtg gaaaaacgt tagaaaaa tatcattct ggttatttc tctcttag tctct 8676

```

**Abbildung E-6:** Genomische Sequenz der *Ricinus communis* Cycloartenolsynthese RcCAS1. Start- und Stopcodon sind jeweils fett gedruckt. Die Sequenzbereiche, die dem DCTAE-Substratbindungsmotiv (grün) sowie dem QW3-Motiv (rot) entsprechen, sind farblich hervorgehoben. Die nicht codierenden Intron-Bereiche sind grau unterlegt, nicht codierende Bereiche am 5'- und 3'-Ende sind kursiv gedruckt.



## Anhang F

### Abbildungsverzeichnis

	Seite	
1-1	Biosynthesewege von Steroiden und Triterpenen	2
1-2	Mechanismus der Zyklisierung von 2,3-Oxidosqualen zu pentazyklischen Triterpenen über die Bildung instabiler kationischer Zwischenstufen	4
1-3	Schematische Darstellung der Sekundärstruktur einer 2,3-Oxidosqualenzyklase	5
1-4	Bandmodell der dreidimensionalen Struktur der menschlichen Lanosterolsynthase	6
1-5	Schematischer Aufbau der pflanzlichen Kutikula	8
1-6	Pentazyklische Triterpene als typische Wachskomponenten der pflanzlichen Kutikula	12
2-1	<i>Ricinus communis</i> : Samen, Blattstruktur, Blütenstand und Fruchtstand	17
2-2	Sprossachsenphänotypen von <i>Ricinus communis</i>	18
2-3	Verschiedene Altersstadien von <i>Ricinus communis</i>	19
2-4	<i>Lycopersicon esculentum</i> cv. Micro-Tom: Gesamt-Habitus, Blüte und Frucht	20
2-5	Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>Ricinus communis</i> -Zellmaterial	26
2-6	Beispiel eines PCR-Ansatzes mit <i>R. communis</i> cDNA als Template unter der Verwendung eines Annealing-Temperaturgradienten	27
2-7	Schematische Darstellung des Plasmidvektors pGEM-T (Promega) zur Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	28
2-8	Agarplatte mit Kolonien transformierter <i>E. coli</i> -Zellen nach 14 h Inkubation bei 37°C	29
2-9	Kontrollversuche nach der Klonierung von PCR-Fragmenten in den Expressionsvektor pGEM-T	30
2-10	Ausschnitt aus einem Sequenzierungs-Chromatogramm einer Sequenzierungsreaktion der NAPS-Unit	31
2-11	5'RACE zur Klonierung des 5'-Endes von <i>RcCAS1</i>	33
2-12	Gelelektrophorese von RNA-Proben, die aus verschiedenen Geweben und von verschieden alten Pflanzen isoliert wurde	34
2-13	Schematische Darstellung des Hefe-Expressionsvektors pYES2	38
2-14	Test-PCR mit <i>E. coli</i> -Zellmaterial als Template nach der Transformation mit dem Expressionsvektor pYES2 + Insert und der Primerkombination T7 und PYES2A	39
2-15	Restriktionsverdau der isolierten Plasmid-DNA als Positiv-Kontrolle	39
2-16	Prinzip der funktionellen Charakterisierung klonierter Oxidosqualenzyklasen: die Zyklisierung von 2,3-Oxidosqualen im transformierten Hefestamm GIL77	40
2-17	Schematische Darstellung des verwendeten Site-directed Mutagenese-Verfahrens	43
3-1	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von <i>R. communis</i> Sprossachseninternodien- und Blattoberflächen	46
3-2	Gaschromatogramm des kutikulären Gesamtwachses von 67 Tage alten <i>Ricinus communis</i> -Hypokotylen	48
3-3	Massenspektrum des silylierten Derivats von Hexacosan-1,3-diol	50
3-4	Wachsbelegung und chemische Zusammensetzung kutikulärer Wachse von 67 Tage alten Hypokotylen beider Phänotypen von <i>Ricinus communis</i>	51
3-5	Relative Homologenzusammensetzung aliphatischer Substanzklassen in kutikulären Wachsen 67 Tage alter Hypokotyle von <i>Ricinus communis</i>	53

	Seite	
3-6	Vergleich der kutikulären Wachsausbeuten bei 67 Tage alten <i>Ricinus communis</i> -Hypokotylen	55
3-7	Vergleich der jeweiligen relativen Anteile einzelner Substanzklassen an den epi- bzw. intrakutikulären Wachsschichten 67 Tage alter <i>R. communis</i> -Hypokotyle	57
3-8	Rasterelektronenmikroskopische Bilder zur Abhebemethode für die selektive Beprobung epikutikulärer Wachse	59
3-9	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen unterschiedlich alter Hypokotyl-oberflächen von Individuen des Glaucous-Phänotyps von <i>Ricinus communis</i>	61
3-10	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines Querschnitts durch die Hypokotyl-Epidermis einer 18 Tage alten <i>Ricinus communis</i> -Pflanze	60
3-11	Kutikuläre Gesamtwachsbelegung und Wachsbelegung von VLC-aliphatischer Verbindungen sowie Triterpenen im Laufe der Hypokotylentwicklung von <i>Ricinus communis</i>	63
3-12	Kutikuläre Wachsbelegung VLC-aliphatischer Substanzklassen im Laufe der Hypokotylentwicklung beider Sprossachsen-Phänotypen von <i>Ricinus communis</i>	65
3-13	Akkumulation des Triterpenols Lupeol als Wachskomponente in der Kutikula im Laufe der Hypokotylentwicklung beider Sprossachsenphänotypen von <i>Ricinus communis</i>	66
3-14	Relative Homologenzusammensetzung aliphatischer Substanzklassen im kutikulären Wachs von Glaucous-Individuen der Rizinuspflanze im Laufe der Hypokotylentwicklung	67
3-15	Übersicht über die Position und Spezifität degenerierter Primer zur Klonierung pflanzlicher Oxidosqualenzyklen	69
3-16	Aminosäuresequenz-Alignment des Indel-Bereichs pflanzlicher OSCs	70
3-17	Nukleotidsequenz-Alignment des Indel-Bereichs und das daraus resultierende Primerdesign zur Klonierung von Lupeol-, $\beta$ -Amyrin- bzw. Cycloartenolsynthasen	71
3-18	Konsensussequenz des klonierten Genfragments <i>RcLUS1a</i>	72
3-19	PCR-Fragmente unterschiedlicher Sequenzbereiche der <i>RcLUS1</i> -cDNAs	74
3-20	Schematische Darstellung der Strategie zur homologiebasierten Klonierung von <i>RcLUS1</i>	75
3-21	Aminosäuresequenz der <i>Ricinus communis</i> Lupeolsynthase <i>RcLUS1</i>	75
3-22	Sequenz des klonierten Genfragments <i>RcTTS2a</i>	77
3-23	Schematische Darstellung der Strategie zur homologiebasierten Klonierung von <i>RcCAS1</i>	78
3-24	Aminosäuresequenz der <i>Ricinus communis</i> Cycloartenolsynthase <i>RcCAS1</i>	79
3-25	Strategie zur Klonierung der genomischen Sequenz von <i>RcLUS1</i>	80
3-26	Exon-Intron-Muster der genomischen Sequenz von <i>RcLUS1</i>	80
3-27	Exon-Intron-Muster der genomischen Sequenz von <i>RcCAS1</i>	81
3-28	Schematische Darstellung der Strategie zur Klonierung von <i>LeTTS1</i>	82
3-29	Aminosäuresequenz der <i>Lycopersicon esculentum</i> $\beta$ -Amyrinsynthase <i>LeTTS1</i>	83
3-30	Aminosäuresequenz der <i>Lycopersicon esculentum</i> Triterpensynthase <i>LeTTS2</i>	84
3-31	Dünnschichtchromatographie der Gesamtextrakte der mit dem pYES2- <i>RcLUS1</i> -Konstrukt transformierten GIL 77 Hefezellen	86
3-32	Gaschromatographische Analyse TMS-derivatisierter Extrakte der mit <i>RcLUS1</i> transformierten Hefezellen	87

	Seite	
3-33	Massenspektrum des silylierten Zyklisierungsproduktes des mit dem pYES2-RcLUS1-Konstrukt transformierten Hefestammes GIL 77 im Vergleich zu silyliertem authentischem Lupeol-Standard	88
3-34	Gaschromatogramm der über Dünnschichtchromatographie quantitativ gewonnenen Zyklisierungsprodukte Lupeol, $\beta$ -Amyrin und $\alpha$ -Amyrin	89
3-35	Dünnschichtchromatographie der Gesamtextrakte der mit dem pYES2-RcCAS1-Konstrukt transformierten GIL 77-Hefezellen	90
3-36	Gaschromatogramm TMS-derivatisierter Extrakte der mit RcCAS1 transformierten Hefezellen	91
3-37	Gaschromatogramm der TMS-derivatisierten Chloroform-Extrakte aus dem <i>in vitro</i> -Enzym-Test mit zellfreiem Extrakt	92
3-38	Massenspektrum des silylierten Zyklisierungsproduktes D des mit dem pYES2-RcCAS1-Konstrukt transformierten Hefestammes GIL 77 im Vergleich zu silyliertem Cycloartenol-Standard	93
3-39	Massenspektrum des silylierten sowie acetylierten Zyklisierungsproduktes E des mit dem pYES2-RcCAS1-Konstrukt transformierten Hefestammes GIL 77	94
3-40	Gaschromatographische Analyse TMS-derivatisierter Extrakte der mit LeTTS1 transformierten Hefezellen	95
3-41	Massenspektrum des silylierten Zyklisierungsproduktes des mit dem pYES2-LeTTS1-Konstrukt transformierten Hefestammes GIL77	96
3-42	Expression der <i>Ricinus communis</i> Lupeolsynthese und Cycloartenolsynthese in verschiedenen Organen	98
3-43	Expression der <i>Ricinus communis</i> Lupeolsynthese und Cycloartenolsynthese während der frühen Hypokotylentwicklung	99
3-44	Aminosäuresequenz-Alignment von Lupeol- und $\beta$ -Amyrinsynthasen im Bereich der jeweils konservierten Aminosäuren Leucin und Tryptophan	100
3-45	Dreidimensionale Darstellung der Aminosäurereste der menschlichen Lanosterolsynthese, die sich in einem Abstand von 5 Å vom Substrat befinden	101
3-46	Gaschromatogramm TMS-derivatisierter Gesamtextrakte mit <i>RcLUS1</i> -Wildtyp und <i>RcLUS1</i> -Mutante F257W transformierter Hefezellen	102
4-1	Fadenförmige Wachskristalle auf Sprossachsenoberflächen von <i>Macaranga tanarius</i>	104
4-2	Wachstumsbeobachtungen an Hypokotylen von <i>Ricinus communis</i> in der frühen Entwicklungsphase	112
4-3	Akkumulation kutikulärer Wachse pro Hypokotyl bzw. pro Epidermiszelle in den ersten 67 Tagen der Hypokotylentwicklung	113
4-4	Akkumulation der VLC-aliphatischen Verbindungen im kutikulären Wachs pro Hypokotyl bzw. pro Epidermiszelle in den ersten 67 Tagen der Hypokotylentwicklung	114
4-5	Triterpen-Akkumulation im kutikulären Wachs pro Hypokotyl bzw. pro Epidermiszelle in den ersten 67 Tagen der Hypokotylentwicklung	115
4-6	<i>Crematogaster (Decacrema)</i> Msp. 4 auf der wachskristallfreien Fläche einer Rizinuspflanze des Glaucous-Phänotyps	116
4-7	Ergebnisse der Lauffests mit Wachsläufer- sowie Nichtwachsläufer-Arten der Gattung <i>Crematogaster</i> auf beiden Sprossachsen-Phänotypen von <i>Ricinus communis</i>	117
4-8	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Haftstrukturen einer Nichtwachsläufer-Ameise nach dem Lauffest auf einem Individuum des Glaucous-Phänotyps von <i>Ricinus communis</i>	118

	Seite
<b>4-9</b> Akkumulation des Triterpenols Lupeol im kutikulären Wachs pro Hypokotyl bzw. pro Epidermiszelle in den ersten 67 Tagen der Hypokotylentwicklung	123
<b>4-10</b> Akkumulation verschiedener Triterpen-Verbindungen im kutikulären Wachs pro Epidermiszelle in den ersten 67 Tagen der Hypokotylentwicklung	124
<b>4-11</b> Zusammenfassende Darstellung der verschiedenen Prozesse, die zur Ausbildung des Glaucous- bzw. Glossy-Phänotypes von <i>Ricinus communis</i> führen	128
<b>4-12</b> Alignment der Aminosäuresequenzen von RcLUS1 und des klonierten Fragmentes <i>RcTTS2a</i> einer weiteren Triterpensynthese aus <i>Ricinus communis</i>	130
<b>4-13</b> Aminosäuresequenzalignment der klonierten Triterpensynthesen aus <i>Lycopersicon esculentum</i>	132
<b>4-14</b> Darstellung der phylogenetischen Verwandtschaftsbeziehungen pflanzlicher Epoxy-squalenzyklen auf der Grundlage eines Aminosäuresequenzalignments	139
<b>4-15</b> Phylogenetischer Stammbaum pflanzlicher Epoxy-squalenzyklen, erstellt auf der Basis eines Sequenzalignments der cDNA-Sequenzen	140
<b>4-16</b> Mechanismus der Zyklisierung von 2,3-Oxidosqualen, vermittelt durch die Lupeolsynthesen OEW, TRW und ATLUP1	143
<b>C-1</b> Aminosäuresequenz- und Nukleotidsequenzalignment für den N-terminalen Sequenzbereich von 2,3-Oxidosqualenzyklen sowie das daraus resultierende Primerdesign	169
<b>C-2</b> Aminosäuresequenz- und Nukleotidsequenzalignment für den das QW2-Motiv umfassenden Sequenzbereich und das daraus resultierende Primerdesign	170
<b>C-3</b> Aminosäuresequenz- und Nukleotidsequenzalignment für den das QW4-Motiv umfassenden Sequenzbereich und das daraus resultierende Primerdesign	171
<b>C-4</b> Aminosäuresequenz- und Nukleotidsequenzalignment und das daraus resultierende Design für den Antisense-Primer OGN7A	172
<b>C-5</b> Aminosäuresequenz- Nukleotidsequenzalignment und das daraus resultierende Design für die Antisense-Primer OGN4A, OGN5A und OGN6A	173
<b>E-1</b> Nukleotidsequenz des Transkripts der <i>Ricinus communis</i> Lupeolsynthese RcLUS1	178
<b>E-2</b> Nukleotidsequenz des Transkripts der <i>Ricinus communis</i> Cycloartenolsynthese RcCAS1	179
<b>E-3</b> Nukleotidsequenz des Transkripts der <i>Lycopersicon esculentum</i> $\beta$ -Amyrinsynthese LeTTS1	180
<b>E-4</b> Nukleotidsequenz des Transkripts der <i>Lycopersicon esculentum</i> Triterpensynthese LeTTS2	181
<b>E-5</b> Genomische Sequenz der <i>Ricinus communis</i> Lupeolsynthese RcLUS1	182
<b>E-6</b> Genomische Sequenz der <i>Ricinus communis</i> Cycloartenolsynthese RcCAS1	183/ 184

---

## Anhang G

### Tabellenverzeichnis

	Seite
<b>2-1</b> Werte der Temperatur- und Druckprogrammierung der für die quantitative und qualitative Analyse verwendeten Gaschromatographen	24
<b>3-1</b> Identifizierte Kutikulawachs-Komponenten von <i>Ricinus communis</i> -Hypokotylen des Glossy-, sowie des Glaucous-Phänotyps.	49
<b>3-2</b> Absolute und relative Zusammensetzung des kutikulären Wachses von Hypokotyl-Oberflächen 67 Tage alter <i>R. communis</i> Pflanzen beider Sprossachsen-Phänotypen.	52
<b>3-3</b> Absolute Ausbeuten der durch Abhebemethode und Nachextraktion 67 Tage alter Hypokotyle beider Phänotypen von <i>Ricinus communis</i> gewonnenen Wachsschichten	56
<b>3-4</b> Relative Zusammensetzung der Wachsschichten, die durch Abhebemethode und Nachextraktion 67 Tage alter Hypokotyle beider Phänotypen von <i>Ricinus communis</i> gewonnen wurden	58
<b>3-5</b> Ergebnisse des Datenbankvergleichs des klonierten Genfragmentes <i>RcLUS1a</i> von <i>R. communis</i> auf Nukleotid-Ebene	73
<b>3-6</b> Kombinationen spezifischer Primer, die für PCR-Ansätze zur Kontrolle der klonierten Gensequenz verwendet wurden	74
<b>3-7</b> Ergebnisse des Datenbankvergleichs der <i>Ricinus communis</i> Lupeolsynthase <i>RcLUS1</i> auf Aminosäuresequenz-Ebene	76
<b>3-8</b> Ergebnisse des Datenbankvergleichs des klonierten Genfragmentes <i>RcTTS2a</i> von <i>R. communis</i> auf Nukleotid-Ebene	77
<b>3-9</b> Ergebnisse des Datenbankvergleichs der <i>Ricinus communis</i> Cycloartenolsynthase <i>RcCAS1</i> auf Aminosäuresequenz-Ebene	79
<b>3-10</b> Ergebnisse des Datenbankvergleichs der <i>Lycopersicon esculentum</i> $\beta$ -Amyrinsynthase <i>LeTTS1</i> auf Aminosäuresequenz-Ebene	83
<b>3-11</b> Ergebnisse des Datenbankvergleichs der <i>Lycopersicon esculentum</i> <i>LeTTS2</i> auf Aminosäuresequenz-Ebene	85
<b>4-1</b> Bisherige Untersuchungen zur chemischen Schichtung der pflanzlichen Kutikula unter besonderer Berücksichtigung kutikulärer Triterpene	107
<b>4-2</b> Prozentuale Verteilung der Triterpenalkohole in unterschiedlichen Reifestadien von Tomatenfrüchten	131
<b>4-3</b> Übersicht der Sequenzübereinstimmungen der klonierten und charakterisierten Oxidosqualenzyklen <i>RcLUS1</i> , <i>RcCAS1</i> und <i>LeTTS1</i> mit anderen charakterisierten pflanzlichen OSCs auf Aminosäuresequenzebene	136
<b>B-1</b> Genbank-Akzessionsnummern der NCBI-Datenbank und Referenzen pflanzlicher Epoxysqualenzyklen	168
<b>D-1</b> Degenerierte Oligonukleotidprimer für die homologiebasierte Klonierung pflanzlicher Oxidosqualenzyklen	174
<b>D-2</b> Spezifische Oligonukleotidprimer für die <i>Ricinus communis</i> Lupeolsynthase <i>RcLUS1</i>	175
<b>D-3</b> Spezifische Oligonukleotidprimer für das Fragment der potentiellen <i>Ricinus communis</i> Triterpensynthase <i>RcTTS2</i>	175
<b>D-4</b> Spezifische Oligonukleotidprimer für die <i>Ricinus communis</i> Cycloartenolsynthase <i>RcCAS1</i>	176

---

	Seite
<b>D-5</b> Spezifische Oligonukleotidprimer für die <i>Lycopersicon esculentum</i> $\beta$ -Amyrinsynthase LeTTS1	176
<b>D-6</b> Spezifische Oligonukleotidprimer für die potentielle <i>Lycopersicon esculentum</i> Triterpensynthase LeTTS2	177
<b>D-7</b> Sonstige Oligonukleotidprimer, die zur cDNA-Erststrangsynthese, für Sequenzierungsreaktionen, für die Klonierung der Full-length-Klone von <i>RcLUS1</i> , <i>RcCAS1</i> , <i>LeTTS1</i> und <i>LeTTS2</i> , zur Synthese der Positivkontrolle für die RT-PCR bzw. Northern-Blot-Technik sowie für Site-directed Mutagenese-Versuche verwendet wurden	177

---

## Anhang H

### Verwendete Abkürzungen

AS	Aminosäure
bAS	$\beta$ -Amyrinsynthase
bp	Basenpaare
BSTFA	<i>N,O</i> -Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid
CAS	Cycloartenolsynthase
EWF	epikutikulärer Wachsfilm
EWK	epikutikuläre Wachskristalle
EZ	Epidermiszelle
FID	Flammenionisationsdetektor
GC	Gaschromatographie
IMS	Isomultiflorenolsynthase
IPP	Isopentenylpyrophosphat
ISTD	Interner Standard
IW	intrakutikuläre Wachse
LS	Lanosterolsynthase
LUS	Lupeolsynthase
M <sup>+</sup>	Molekülion
MS	Massenspektrometrie
MSD	mass selective detector
MTS	multifunktionale Triterpensynthase
OSC	2,3-Oxidosqualenzyklase; Epoxysqualenzyklase
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
RACE	rapid amplification of cDNA ends
REM	Rasterelektronenmikroskop
RT	Reverse Transkriptase
SB	Substratbindung
SHC	Squalen-Hopen-Zyklase
TLC	thin layer chromatography (Dünnschichtchromatographie)
TMS	Trimethylsilyl
TTS	Triterpensynthase
VLC	very-long-chain

Zu Abkürzungen verwendeter Primer und Bezeichnungen von pflanzlichen 2,3-Oxidosqualenzyklasen siehe Anhang D bzw. Anhang B.

---

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Markus Riederer sowie Herrn Prof. Reinhard Jetter für die exzellente Betreuung und beständige und vielfältige Unterstützung in allen Belangen meiner Arbeit. Am Julius-von-Sachs-Institut für Biowissenschaften fand ich stets ausgezeichnete Arbeitsbedingungen vor. Mit seinem Wechsel von Würzburg nach Vancouver gab mir Herr Prof. Jetter die Möglichkeit, ein neues Land zu entdecken und meinen Erfahrungshorizont in vielerlei Hinsicht zu erweitern. Mit seiner Diskussionsbereitschaft, seinem großen Engagement und seiner intensiven zeitlichen Zuwendung gab er mir die entscheidenden Impulse in vielen Phasen meiner Untersuchungen.

Herrn Prof. Yutaka Ebizuka (University of Tokyo) danke ich für das freundliche Überlassen des Hefestammes GIL 77 für die heterologen Expressionsversuche. Bei Herrn Dr. Gerd Vogg bedanke ich mich herzlich für seine Unterstützung in molekularbiologischen Laborfragen, ebenso wie bei Herrn Dr. Jürgen Zeier. Dank gebührt außerdem Herrn Dr. Owen Rowland (University of British Columbia, Kanada) für die Hilfe bei den Northern-Blot-Analysen.

Besonderen Dank schulde ich Frau Barbara Hobl für ihren großen Fleiß bei der Durchführung der praktischen Arbeiten der Wachsanalysen sowie der rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen und die gute Zusammenarbeit. Herrn Trevor Yeats danke ich sehr herzlich für die praktische Hilfestellungen bei Klonierungsarbeiten in Vancouver.

Frau Jutta Winkler-Steinbeck (Würzburg) und Herrn Bob Kantymir (Vancouver) gebührt Dank für die Anzucht und Pflege der Versuchspflanzen.

Meinen Freunden und Laborkollegen Dr. Michael Riedel und Christian Kinzler danke ich sehr herzlich für ihre zahlreichen Ratschläge und ihre große Hilfsbereitschaft. Meinen Eltern und meiner Frau Eva danke ich für ihre Unterstützung, Geduld und Liebe.

---



## Publikationsliste

Guhling O, Kinzler C, Dreyer M, Bringmann G, Jetter R (2005) Surface composition of myrmecophilic plants: cuticular wax and glandular trichomes on leaves of *Macaranga tanarius*. *Journal of Chemical Ecology* **31**, 2323-2341.

Guhling O, Hobl B, Yeats T, Jetter R (2006) Cloning and characterization of a lupeol synthase involved in the synthesis of epicuticular wax crystals on stem and hypocotyl surfaces of *Ricinus communis*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **448**, 60-72.

## Beiträge zu Tagungsbänden

Guhling O, Jetter R (2002) Glandular trichomes on lower leaf surfaces of the ant-plant *Macaranga tanarius*. Posterpräsentation, Tagung der Deutschen Botanischen Gesellschaft, Vereinigung für Angewandte Botanik, Freiburg i. Br.

Kinzler K, Guhling O, Jetter R (2002) Chemical composition of *Macaranga tanarius* plant surfaces. Posterpräsentation, 19<sup>th</sup> Annual Meeting of the International Society of Chemical Ecology, Hamburg.

## Lebenslauf

### Persönliche Angaben

Name: Ortwin Guhling  
Adresse: Jörgentorgasse 6  
97702 Münnerstadt

Geburtsdatum: 19.10.1974  
Geburtsort: Münnerstadt  
Familienstand: verheiratet, eine Tochter  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### Ausbildung

1980 – 1985: Volksschule Burglauer  
1985 – 1994: Johann-Philipp-von-Schönborn-Gymnasium Münnerstadt  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

1994 – 1995: Studium der Klassischen Archäologie an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

1995 – 2002: Studium der Biologie an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Br. und der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
Hauptfach: Ökophysiologie der Pflanzen  
Nebenfächer: Pflanzenphysiologie, Zell- und Entwicklungsbiologie  
Diplomarbeitsthema: „Zusammensetzung und Bildung der Oberflächenstrukturen auf verschiedenen Organen von *Macaranga tanarius*.“

2002 – 2004: Promotionsstudium im Fach Biologie an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Lehrstuhl für Botanik II mit Forschungsaufenthalten an der University of British Columbia, Vancouver, Canada, in der Arbeitsgruppe von Prof. Reinhard Jetter

2005: Beginn des Referendariats zur Ausbildung für den höheren Bibliotheksdienst an wissenschaftlichen Bibliotheken an der Universitätsbibliothek Stuttgart

2006: Fortsetzung des Referendariats an der Bayerischen Bibliotheksschule (Bayerische Staatsbibliothek München)

---

## **Erklärung**

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Die Dissertation wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch zu keinem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt.

Ich erkläre, dass ich bisher keine akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht habe.

Münnerstadt, den 17. November 2006

---