



MASTERARBEIT | MASTER'S THESIS

Titel der Masterarbeit / Title of the Master's Thesis

„Variabilität des γ -Terpinensynthase Gens in
Origanum vulgare L. und *Origanum majorana* L.“

verfasst von / submitted by

Verena Elisabeth Göttl, BSc

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of
Magistra pharmaciae (Mag.pharm.)

Wien, 2025 | Vienna, 2025

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
Degree programme code as it appears on
the student record sheet:

UA 066 605

Studienrichtung lt. Studienblatt /
Degree programme as it appears on
the student record sheet:

Masterstudium Pharmazie

Betreut von / Supervisor:

Ao. Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr.nat.techn.
Johannes Novak

Inhaltsverzeichnis

1.	Zusammenfassung	1
2.	Abstract.....	2
3.	Einleitung	3
3.1.	Die Gattung <i>Origanum</i>	3
3.2.	Terpene.....	6
3.2.1.	Biosynthese der Terpene.....	6
3.2.2.	Monoterpene	7
3.3.	γ -Terpinensynthese.....	8
4.	Material und Methoden	9
4.1.	Pflanzenmaterial	9
4.2.	DNA-Extraktion	10
4.3.	Polymerase-Kettenreaktion	11
4.4.	Gelelektrophorese.....	12
4.5.	Gelextraktion.....	13
4.6.	Gateway-Klonierung	14
4.7.	Plasmid-Extraktion	16
4.8.	Nanodrop	17
4.9.	DNA-Sequenzierung	17
4.10.	Datenanalyse.....	18
5.	Ergebnisse.....	19
5.1.	Alignment der DNA-Sequenzen aller TPS2-Klone.....	19
5.1.1.	<i>Origanum vulgare</i>	21
5.1.2.	<i>Origanum majorana</i>	22
5.1.3.	Stammbaum und Netzwerk	23
5.2.	Alignment der Aminosäuren-Sequenz aller Klone	26
5.2.1.	<i>Origanum vulgare</i>	27
5.2.2.	<i>Origanum majorana</i>	28
5.2.3.	Strukturelle Unterschiede zwischen <i>O. majorana</i> - und <i>O. vulgare</i> -TPS2	28
6.	Diskussion	30
	Anhang	33
	Abkürzungsverzeichnis.....	41
	Literaturverzeichnis	43
	Abbildungsverzeichnis.....	49

1. Zusammenfassung

Origanum vulgare und *O. majorana* sind zwei der bekanntesten Arten der Gattung *Origanum*. Das Enzym γ -Terpinensynthase kommt in beiden Arten vor und ist maßgeblich an der Produktion der Monoterpene Thymol und Carvacrol, den Hauptbestandteilen des Ätherischen Öls der Cymyl-Chemotypen von *O. vulgare* beteiligt. Das Ätherische Öl von *O. majorana* enthält kein Carvacrol und wird dem Sabinyl-Typ mit *cis*-Sabinenhydrat als geschmacksgebende Komponente zugeordnet.

Im Zuge dieser Arbeit wurden die γ -Terpinensynthasen von *O. vulgare* und *O. majorana* untersucht, um herauszufinden, ob Thymol und Carvacrol in *O. majorana* aufgrund einer nicht funktionalen γ -Terpinensynthase nicht produziert werden kann.

Es wurden 68 Klone des γ -Terpinensynthase Gens, 20 aus *O. vulgare* und 48 aus *O. majorana*, isoliert und sequenziert, wobei Unterschiede in Länge und Basenabfolge der DNA-Sequenzen gefunden wurden. Die innerartliche Variabilität der Klone aus *O. vulgare* ist größer als die der Klone aus *O. majorana*.

Es konnte keine offensichtliche Ursache, wie z.B. Mutationen, die zu internen Stopp-Codons führen, für die unterschiedliche Monoterpenproduktion in *O. vulgare* und *O. majorana* gefunden werden, da in beiden Arten das TPS2-Gen intakt scheint. Interne Stopp-Codons waren zwar in beiden Arten vorhanden, jedoch waren die scheinbar intakten, vollständigen Sequenzen deutlich in der Überzahl.

Mit verschiedener Software wurden hohe Wahrscheinlichkeiten für das Vorhandensein und Funktionieren des Transportproteins für den Membrantransport in *O. majorana* berechnet. Auffällige Mutationen in Exon 1, die das Transportprotein beeinträchtigen könnten, konnten bisher nicht als Ursache identifiziert werden. Die zahlreichen Mutationen in Intron 1, die in die Genregulation eingreifen könnten, wären ebenfalls ein möglicher Ausgangspunkt für weiterführende Untersuchungen.

2. Abstract

Origanum vulgare and *O. majorana* are two of the best-known species of the genus *Origanum*. The enzyme γ -terpinene synthase is found in both species and is significantly involved in the production of the monoterpenes thymol and carvacrol, the main components of the essential oil of the cymyl-chemotypes of *O. vulgare*. *O. majorana*, however, produces no cymyl-compounds but is dominated by Sabinyl-compounds, sensorially important for the typical aroma of marjoram.

In this work, the γ -terpinene synthases of *O. vulgare* and *O. majorana* were investigated to find out whether thymol and carvacrol are not produced in *O. majorana* due to a nonfunctional γ -terpinene synthase.

68 clones of the γ -terpinene synthase gene, 20 from *O. vulgare* and 48 from *O. majorana*, were isolated and sequenced, revealing differences in the length and base order of the DNA sequences. The intraspecific variability of the clones from *O. vulgare* is greater than that of the clones from *O. majorana*.

No evident reason, such as mutations leading to internal stop codons, could be found for the different monoterpene production in *O. vulgare* and *O. majorana*, as the TPS2 gene appears intact in both species. Internal stop codons were present in both species, but the apparently intact, complete sequences were in majority.

Specific software calculated high probabilities for the presence and functionality of the transport protein for membrane transport in *O. majorana*. Conspicuous mutations in exon 1, that could affect the transport protein, have not yet been identified as a cause. The numerous mutations in intron 1, that could interfere with gene regulation, would also be a possible starting point for further investigations.

3. Einleitung

3.1. Die Gattung *Origanum*

Die Gattung *Origanum* L. (*Lamiaceae*) umfasst zurzeit 44 Arten, die hauptsächlich im mediterranen Raum vorkommen, wobei *O. vulgare* am weitesten verbreitet ist. [1] [2] Die Pflanzen sind mehrjährige, verholzende Kräuter, die vorwiegend in felsigen Regionen, auf meist kalkhaltigen Substraten wachsen. [1] Ein auffälliges morphologisches Merkmal der *Origanum*-Arten sind ihre Drüsenhaare, die aus Epidermiszellen gebildet werden. Drüsenhaare sind an Stängeln und Blättern zahlreich vorhanden, an Kelch und Blüten in geringerer Anzahl. Die Drüsenhaare speichern ein Ätherisches Öl mit sehr charakteristischem Geruch und Aroma. [3]

Origanum vulgare L. (Abb. 1), allgemein bekannt als Oregano oder Echter Dost ist weit über Europa und Asien verbreitet und wird bis zu 100 cm hoch. Die Stängel sind hell- bis dunkelbraun, ev. violett, weich behaart oder kahl. Die Blätter sind klein (6-40 mm lang, 5-30 mm breit), eiförmig, oval oder rundlich und mehr oder weniger stark behaart. Die Blüte besteht aus einem gezähnten Kelch und einer weißen oder rosa Krone, die sich in eine zweiteilige Oberlippe und ein ungeradzahlige Unterlippe gliedert. [1] Neben *O. onites* L., *O. syriacum* L. und *O. dubium* Boiss. macht *O. vulgare* den größten Teil des weltweit gehandelten Oreganos aus. [4]

Das Ätherische Öl der meisten *O. vulgare*-Unterarten, vor allem der drei Unterarten, die im östlichen Mittelmeerraum verbreitet sind, hat einen charakteristischen Oregano-Geruch, der auf die Hauptbestandteile, die Monoterpene Thymol und Carvacrol, zurückzuführen ist. [3]

Traditionell wird *O. vulgare* schleimlösend und spasmolytisch bei Atemwegserkrankungen, verdauungsfördernd und krampflösend bei Magen-Darm-Problemen, diuretisch und antiseptisch bei Harnwegserkrankungen und zur Linderung von Juckreiz bei Insektenstichen angewendet. [3] [5] [6]

Das Ätherische Öl hat starke antioxidative, antimikrobielle, insektizide und genotoxische Wirkungen. [7] [8] Zahlreiche Studien belegen die antimikrobielle Wirkung des Ätherischen Öls bzw. verschiedener Extrakte sowohl gegen grampositive als auch gegen gramnegative Bakterien, indem die Permeabilität der Zellmembran durch Schädigung dieser erhöht wird. [9] [10] [11] [12]

Die antimykotische Wirkung des Ätherischen Öls von *O. vulgare* kommt durch die Interferenz der Ergosterolsynthese zustande. [12] [13] [14]

Die Bildung von Komplexen mit freien Radikalen führt zu einer antioxidativen Wirkung, die in der Lebensmittelindustrie und Pharmazie Anwendung findet. [12] [15] [16]

Durch die Hemmung von proinflammatorischen Zytokinen kann eine entzündungshemmende Wirkung erzielt werden. [17] [18]

Aufgrund der negativen Nebenwirkungen vieler konventioneller Chemotherapeutika ist die antiproliferative und zytotoxische Aktivität, die in vielen Studien bestätigt wurde, interessant. [19] [20] [21] [22]

Origanum majorana L. (Abb. 2), allgemein bekannt und gehandelt als Majoran, ist endemisch auf Zypern, wird aber in vielen Ländern kultiviert. *O. majorana* wird bis zu 80 cm hoch. Die Stängel sind quadratisch, hell- bis dunkelbraun, ev. rötlich und meist filzig behaart. Die Blätter sind klein (3-35 mm lang, 2-30 mm breit), rund bis eiförmig, weißlich bis graugrün, filzig behaart und mehr oder weniger gestielt. Die Blüte besteht aus einem einlippigen Kelch und einer weißen Krone, die sich in eine zweiteilige Oberlippe und eine dreiteilige Unterlippe gliedert. [1]

Das Ätherische Öl von *O. majorana* hat einen charakteristischen Geruch, der auf einen der Hauptbestandteile, das Monoterpen *cis*-Sabinenhydrat, zurückzuführen ist. Es hat starke insektizide Wirkungen. [3] [8] [23]

Neben der Verwendung als Schädlingsbekämpfungsmittel, kann das Ätherische Öl von *O. majorana* auch in der Medizin angewandt werden. Es zeigt antiinflammatorische Effekte durch die Hemmung der Freisetzung entzündungsfördernder Zytokine. [24] [25]

Es weist außerdem antimikrobielle Aktivität gegen viele pathogene Bakterien und Pilze auf. [26] [27] [28]

Auch die zytotoxische Aktivität, sowie die antioxidative Wirkung als Radikalfänger wurde bereits in Studien nachgewiesen. [22] [29] [30]

Traditionell wird das Ätherische Öl von *O. majorana* in vielen Ländern bei Magen-Darm-Erkrankungen, Asthma, rheumatischen Erkrankungen sowie Kopf- und Zahnschmerzen verwendet. [25] [30] [31] [32]



Abb. 1 Origanum vulgare [33]



Abb. 2 Origanum majorana [34]

3.2. Terpene

Terpene oder Isoprenoide sind eine große Gruppe von Verbindungen, die in beinahe allen Lebewesen vorkommen und dort sowohl funktionelle als auch strukturelle Aufgaben erfüllen. Überlebensnotwendige Primärmetaboliten sind Sterole, Carotinoide und Wachstumsregulatoren. Monoterpene, Diterpene und Sesquiterpene gelten als Sekundärmetaboliten. Allen gemeinsam ist der Ursprung aus dem C5-Substrat Dimethylallyldiphosphat (DMAPP). [35] [36]

Terpene unterstützen Pflanzen bei der Abwehr von Fressfeinden und mikrobiellen Krankheitserregern. [23] [37] [38]

Ebenfalls sind Terpene, vor allem Monoterpene, ein Schutz vor thermischem Stress, wirken an der Pflanzenkommunikation mit und sind außerdem für die Anlockung von Bestäubern mitverantwortlich. (Abb. 3) [37] [39] [40]

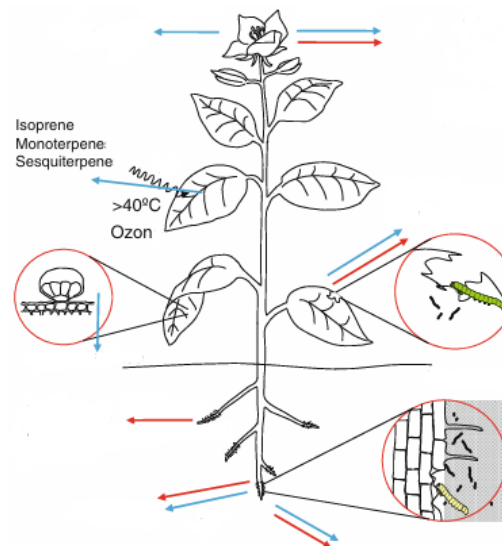


Abb. 3 Biologische Funktion von flüchtigen (blaue Pfeile) und nicht-flüchtigen (rote Pfeile) Terpenoiden in den Wechselwirkungen der Pflanzen mit ihrer Umwelt [37]

3.2.1. Biosynthese der Terpene

Es gibt zwei unterschiedliche Wege, um die Biosynthese von Terpenen zu starten und zu DMAPP zu gelangen. Einerseits den Methylerythritolphosphat (MEP)-Weg, ausgehend von Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-phosphat, der vorwiegend in Bakterien genutzt wird und andererseits den Acetat-Mevalonat-Weg, ausgehend von Acetyl-CoA über Mevalonsäure, der von Eukaryonten genutzt wird. In Pflanzen sind beide Biosynthesewege vorhanden, wobei der Acetat-Mevalonat-Weg im Zytosol und der MEP-Weg in den Plastiden stattfindet. [36] [37] [41]

Durch die Verknüpfung von DMAPP und seinem Isomer Isopentenylpyrophosphat (IPP) wird Geranylpyrophosphat (GPP), das Grundgerüst der Monoterpene, und Farnesylpyrophosphat (FPP), das Grundgerüst der Sesquiterpene aufgebaut. Nach dem gleichen Schema können daraufhin Di-, Tri- und Tetraterpene entstehen. [36] [37] [41]

3.2.2. Monoterpene

Monoterpene sind seit vielen Jahrzehnten als Bestandteile von Ätherischen Ölen bekannt. Sie werden unterteilt in azyklische, monozyklische und bicyklische Monoterpene. [42] [43]

Unter den monozyklischen Monoterpenen gibt es sechs natürlich vorkommende p-Menthan-Grundkörper-Diene – Limonen, Terpinolen, α -Terpinen, γ -Terpinen, α -Phellandren und β -Phellandren. [42]

γ -Terpinen (1-Methyl-4-(1-Methylethyl)-1,4-cyclohexadien) ist der Grundkörper der Monoterpene Carvacrol und Thymol, welche Hauptkomponenten im Ätherischen Öl der meisten *O. vulgare*-Unterarten, vor allem jener drei im östlichen Mittelmeerraum, sind. [3] [44] [45] [46]

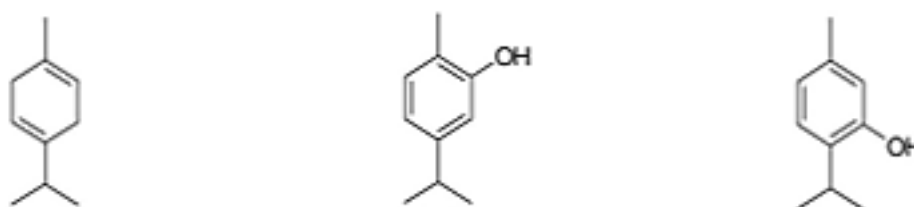


Abb. 4 Cymyl-Komponenten γ -Terpinen, Carvacrol und Thymol

Sabinen (4-Methylen-1-propan-2-ylbicyclo[3.1.0]hexan) ist der Grundkörper der Terpenoide *cis*-Sabinenhydrat (*cis*-4-Thujol) und *trans*-Sabinenhydrat (*trans*-4-Thujol), welche Hauptkomponenten im Ätherischen Öl von *O. majorana* sind. [3] [45]

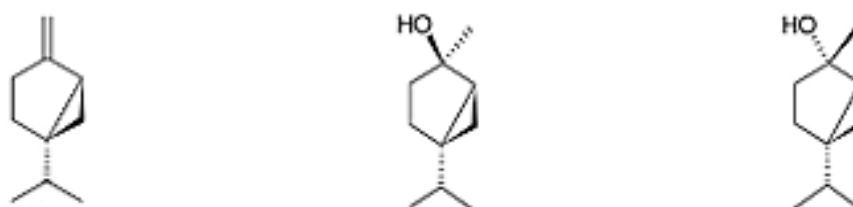


Abb. 5 Sabinyl-Komponenten Sabinen, *cis*-Sabinenhydrat und *trans*-Sabinenhydrat

Je nach Art und Herkunft des *Origanum* Pflanzenmaterials können der Gehalt und die Zusammensetzung der Monoterpene im Ätherischen Öl sehr unterschiedlich sein. *Origanum vulgare* aus dem östlichen Mittelmeerraum enthält oft viel Ätherisches Öl mit einem hohen Anteil an Cymyl-Komponenten (hauptsächlich γ -Terpinen, *p*-Cymen, Thymol und Carvacrol), was für einen sehr aktiven Cymyl-Biosyntheseweg bzw. eine sehr aktive γ -Terpinensynthese spricht. Andere *Origanum*-Arten bzw. Chemotypen wiederum enthalten oft weniger Ätherisches Öl mit einem geringeren Anteil an Cymyl-Komponenten und höheren Anteil an acyclischen Komponenten (z.B. Linalool) und/oder Sabinyl-Verbindungen (Sabinen, *cis/trans*-Sabinenhydrat, *cis*-Sabinenhydrataacetat). Im Ätherischen Öl von *O. majorana* finden sich üblicherweise

nur Spuren von Cymyl-Komponenten jedoch hohe Anteile an Komponenten aus dem Sabinyl-Biosyntheseweg, was darauf zurückzuführen sein könnte, dass in diesen Pflanzen die γ -Terpinensynthase nicht funktional oder kaum aktiv ist. [46]

3.3. γ -Terpinensynthase

Die γ -Terpinensynthase (systemisch: Geranyldiphosphatdiphosphat-Lyase) ist eine Monoterpen-Synthase. Sie katalysiert die Zyklisierung von GPP zu γ -Terpinen. [47] [48] [49] Die Hydroxylierung an Position 3 oder 6, katalysiert durch CYPs, führt in weiterer Folge zu Thymol und Carvacrol. (Abb. 6) [48]

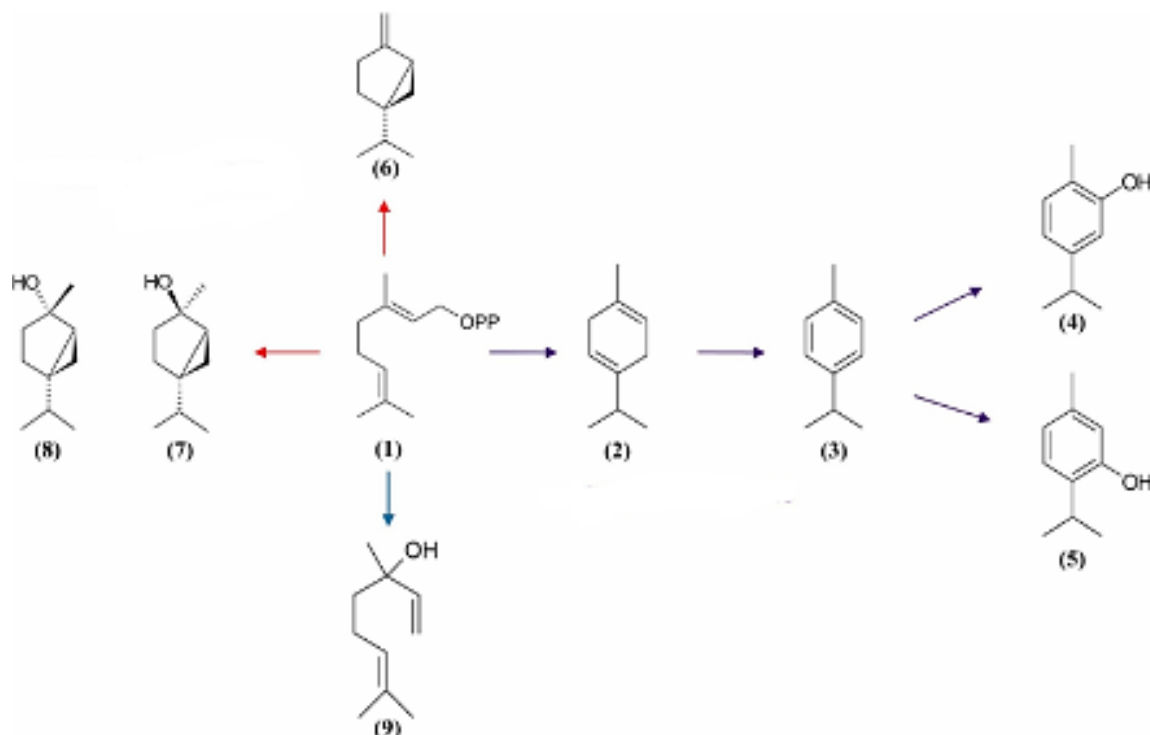


Abb. 6 Biosynthesewege wichtiger Monoterpene in *Origanum*, ausgehend von Geranylpyrophosphat GPP (1); Cymyl-Komponenten: (2)... γ -Terpinen, (3)...*p*-Cymol, (4)...Carvacrol, (5)...Thymol; Sabinyl-Komponenten: (6)...Sabinen, (7)...*cis*-Sabinenhydrat, (8)...*trans*-Sabinenhydrat und (9)...Linalool. [50]

Frühere Untersuchungen zur γ -Terpinensynthase in *Origanum*-Arten wurden bereits durchgeführt. [50] [49] [51] Auf Basis dieser ersten Erkenntnisse erscheint das γ -Terpinensynthase Gen in *O. majorana* intakt, warum in dieser Art keine oder nur geringe Anteile an Cymyl-Komponenten vorkommen ist nach wie vor unklar. [51] Wenig bekannt ist auch über die Anzahl der Genkopien, wie viele Varianten des γ -Terpinensynthase Gens existieren und wie groß die intra- und interspezifische Variabilität desselben ist.

4. Material und Methoden

Um die Variabilität der γ -Terpinensynthase sichtbar zu machen, bedurfte es einiger Schritte der Vorbereitung. Zuerst wurde durch DNA-Extraktion DNA aus dem Pflanzenmaterial extrahiert, wofür die CTAB-Methode angewandt wurde. Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) ist ein kationisches Tensid, welches mit DNA und RNA Komplexe bildet, um störende Polysaccharide und Proteine abtrennen zu können. [52] [53] [54]. Daraufhin konnte ein durch Primer genau definierter Abschnitt der DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion vervielfältigt werden (Entry-PCR). Durch Gelelektrophorese wurden die entstandenen PCR-Produkte aufgetrennt, um sie anhand ihrer Länge zu identifizieren. Die negativ geladenen DNA-Moleküle wanderten unter Einfluss eines elektrischen Feldes, je nach Länge mit unterschiedlicher Geschwindigkeit, durch die Gel-Matrix in Richtung Anode. Das Gel lag dabei in einer Pufferlösung. Durch Gelextraktion wurden die gewünschten Fragmente aus dem Gel isoliert. Dieser DNA-Abschnitt konnte dann wieder mittels Polymerase-Kettenreaktion vervielfältigt werden ($\Delta 12$ -PCR). Nach einer weiteren Gelelektrophorese und einer weiteren Polymerase-Kettenreaktion (attB-PCR) wurde mit der BP-Reaktion fortgefahren und das Produkt anschließend in *E. coli* transformiert. Nach der Inkubation und Extraktion konnten die eingebauten DNA-Abschnitte zur Identifikation sequenziert werden. Durch Vergleich mehrerer DNA-Sequenzen aus verschiedenen Plasmiden wurde die Variabilität der γ -Terpinensynthase innerhalb eines Individuums bzw. zwischen Individuen erkennbar.

4.1. Pflanzenmaterial

Die Blätter des an der Veterinärmedizinischen Universität Wien kultivierten *Origanum vulgare* L. stammen von zwei Individuen - d06-01 und f02-04. Sie wurden ebendort im Frühsommer 2023 geerntet, daraufhin getrocknet und bis zur Verwendung von der Arbeitsgruppe Funktionelle Pflanzenstoffe auf Silika-Gel aufbewahrt.

Die Blätter des an der Veterinärmedizinischen Universität Wien kultivierten *Origanum majorana* L. stammen ebenfalls von zwei Individuen - MH01 und PM3. Sie wurden ebendort im Frühsommer 2023 geerntet, daraufhin getrocknet und bis zur Verwendung von der Arbeitsgruppe Funktionelle Pflanzenstoffe auf Silika-Gel aufbewahrt.

4.2. DNA-Extraktion

Zur Vorbereitung für eine verkürzte Version der CTAB-Methode [54] nach dem Vorbild von Doyle & Doyle [55] wurde ein Mastermix aus 950 µl CTAB-Extraktionspuffer, 0,95 µl BME, 41 µl SDS (10%), 4,1 µl Proteinase K und 10 mg PVP40 hergestellt. Dieser wurde dann im Wasserbad (Gesellschaft für Labortechnik, Deutschland) einige min auf 65°C aufgeheizt, um das PVP in Lösung zu bringen und anschließend auf dem Vortex-Mischer (Scientific Industries, USA) vorsichtig gemischt.

0,25 bis 0,5 cm² frisch getrocknetes Pflanzenmaterial wurden in einem 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß mit Metallkügelchen in der Schwingmühle (Retsch GmbH, Deutschland) für ca. 3 min bei 30 Hz fein vermahlen. Dazu wurden anschließend 950 µl Mastermix pipettiert. Das Reaktionsgefäß wurde mit Hilfe eines Schaumstoffschwimmers bei 65°C für 30 min im Wasserbad inkubiert, zwischendurch wurde alle 10 min durchgemischt. Nach der Inkubation konnte die Probe aus dem Wasserbad genommen werden und wurde auf Raumtemperatur abgekühlt.

Für den ersten von zwei Waschschritten wurden 405 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zugegeben und die Probe kräftig durchgeschüttelt. Daraufhin wurde die Mischung für 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert (Hettich GmbH & Co KG, Deutschland). Der Überstand, in dem sich die DNA befindet, wurde abgehoben und in ein neues 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, die untere Phase wurde verworfen. Dieser Schritt wurde wiederholt.

Durch Zugabe von 540 µl Isopropanol und vorsichtiges Mischen und Schütteln für ca. 30 min kam es zur Fällung der DNA. Die Probe wurde für 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgeleert – die DNA verblieb als Pellet am Grund des Reaktionsgefäßes.

Es folgten zwei Waschschrritte. Für den ersten wurden 950 µl Wash I zugegeben, das Pellet wurde aufgeklopft, zweimal aufgeschüttelt und dann für 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgeleert und das Eppendorf-Reaktionsgefäß kopfüber abgetupft. Für den zweiten Waschschrtritt wurden 950 µl Wash II zugegeben, das Pellet wieder aufgeklopft und zweimal aufgeschüttelt. Anschließend wurde abermals für 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgeleert und das Eppendorf-Reaktionsgefäß kopfüber abgetupft.

Um das DNA-Pellet zu trocknen wurde das offene Reaktionsgefäß bei 60°C für 5-15 min in einem Thermoblock (Hangzhou Bioer Technology, China) inkubiert.

Zum Abschluss der DNA-Extraktion wurden 40 µl TE-Puffer (pH=8) zugegeben um das DNA-Pellet über Nacht im Kühlschrank zu lösen.

4.3. Polymerase-Kettenreaktion

Für die Vervielfältigung der γ -Terpinensynthase wurde zunächst ein PCR-Mastermix aus 11,76 μ l MQ-H₂O, 4 μ l Buffer 5x Phusion HF, 1 μ l DMSO (5%), 0,4 μ l A, C, G, T (je 10 mM), 0,8 μ l Primer F (10 pmol/l), 0,8 μ l Primer R (10 pmol/l) (*Tab. 1*) und 0,24 μ l Phusion HS II (2 U/ μ l) am DNA-freien Arbeitsplatz hergestellt. Die verwendeten Primer wurden zuvor an der Veterinärmedizinischen Universität Wien entwickelt und getestet. [51]

In einem PCR-Reaktionsgefäß wurde zu 19 μ l des vorbereiteten Mastermixes 1 μ l DNA-Extrakt in den Konzentrationen 1:10, 1:50 und 1:100 zugegeben. Diese Mischung wurde kurz zentrifugiert und anschließend im PCR-Thermocycler (Thermo Fisher Scientific, USA) inkubiert. Dieser wurde mit folgendem Temperaturprogramm für 40 Zyklen gestartet.

Zuerst wurde der Reaktions-Mix auf 96°C erhitzt, um die beiden DNA-Stränge zu trennen (Denaturierung), danach auf die spezifische Temperatur für die Primerbindung (knapp unter dem Schmelzpunkt der Primer, *Tab. 1*) abgekühlt (Annealing). Schließlich wurde auf die optimale Arbeitstemperatur der DNA-Polymerase Phusion HS II, welche 72°C beträgt, aufgeheizt. Diese fügte fehlende Nukleotide der DNA entlang an den Primer (Extension). So wurde die vorhandene DNA bei jedem Zyklus verdoppelt. [52]

Tab. 1 Liste der verwendeten Primer für die PCR

Primer	5'-3'-Sequenz	Annealing-Temperatur
Om TPS2_8F	CCCTTAGCATGCAAGTGTCC	60-62 °C
Om TPS2_2335R	GCTCGAAAATAAGGCCTCCC	60-62 °C
d12_OM2_8F	AAAAAGCAGGCTCCCTTAGCATGCAA GTGTCC	60-62 °C
d12_OM2_2335R	AGAAAGCTGGGTGCTCGAAAATAAGG CGTCCC	60-62 °C
attB B2 Adapter	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAG GCT	50-65 °C
attB B2 Adapter	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTG GGT	50-65 °C

4.4. Gelelektrophorese

Im Rahmen dieser Arbeit wurden SB-Gele und TAE-Gele verwendet.

Für die Herstellung eines 1%igen SB-Gels wurden 1,5 g Agarose und 150 ml 1x SB-Puffer bis zur Lösung der Agarose erhitzt und danach unter Rühren etwas abgekühlt. Danach wurden 4,5 µl peqGREEN untergerührt und das Gel wurde sofort in eine vorbereitete Gießform gegossen.

Analog dazu wurden für die Herstellung eines 1%igen TAE-Gels 1,5 g Agarose und 150 ml 1x ROTIPHORESE® 10x TAE-Puffer, der zuvor mit MQ-H₂O auf 1:10 verdünnt wurde, verwendet.

Nach dem vollständigen Abkühlen und Aushärten war das Gel zur Verwendung bereit.

Zur Kontrolle und Identifikation von PCR-Produkten wurde ein SB-Gel verwendet. 2 µl des PCR-Produkts wurden mit 0,4 µl Loading Dye vermischt und auf das Gel aufgetragen. Um die Abschätzung der Länge des PCR-Produkts zu erleichtern, wurde daneben 1 µl 100 kb DNA-Ladder aufgetragen. Nach einer Laufzeit von 60 min bei 120 V und 400 mA wurde das Ergebnis der Gelelektrophorese, eine Bande, im Gel-Dokumentations-System Dark Hood DH-50 (Biostep, Deutschland) sichtbar gemacht und dokumentiert.

Da das Resultat der PCR nicht eine Einzelbande, sondern ein Bandenmuster (Abb. 7) war, wurde das gewünschte DNA-Fragment mit der passenden Länge mittels Gelextraktion über ein TAE-Gel isoliert.

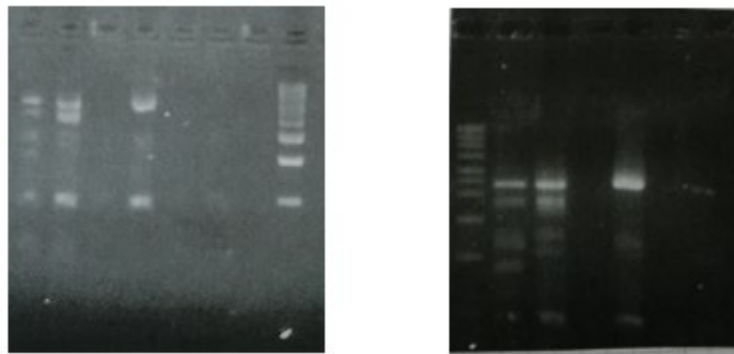


Abb. 7 Gelbild der vervielfältigten DNA auf SB-Gel (links) und TAE-Gel (rechts)
23.05.2003

4.5. Gelextraktion

Um ein gewünschtes DNA-Amplifikationsprodukt aus einem PCR-Produkt mit mehreren Amplifikationsprodukten zu isolieren, wurde die Gelextraktion angewandt. Dazu wurde das InnuPREP DOUBLEpure Kit zur Gelextraktion (IST Innuscreen GmbH, Deutschland, 2021) laut Anleitung verwendet.

Das gesamte Volumen des DNA-Produkts wurde mit 2 µl Loading Dye vermischt und auf ein TAE-Gel aufgetragen. Nach einer Laufzeit von 60 min bei 120 V und 400 mA wurde das Bandenmuster mit Hilfe eines Transilluminators sichtbar gemacht und das DNA-Fragment mit der passenden Länge mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten.

Zur Vorbereitung der Extraktion des ausgeschnittenen Amplifikationsprodukts aus dem Gel wurde der Elution Buffer auf 50°C erwärmt.

Das ausgeschnittene Gelstück (max. 300 mg) wurde in ein 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben und mit 650 µl Gel Solubilizer bei 50°C im Thermoblock 10 min unter Schütteln vollständig gelöst. Zu dieser Lösung wurden 50 µl Binding Optimizer zugegeben und anschließend mit dem Vortex-Mischer vermischt.

In ein leeres 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß wurde eine Spin Filter-Säule eingesetzt, die gesamte Probe wurde auf das Säulchen aufgetragen und danach für 1 min bei 11.000 rpm zentrifugiert. Die DNA blieb am Filter des Säulchens haften, das Filtrat wurde verworfen und das Auffanggefäß wiederverwendet.

Für den ersten Waschschrift wurden 750 µl Washing Solution LS auf den Filter aufgetragen und es wurde für eine min bei 11.000 rpm zentrifugiert. Das Filtrat wurde abermals verworfen und das Auffanggefäß wiederverwendet. Für einen zweiten Waschschrift wurde dieser Vorgang wiederholt. Gleich darauf wurde für 2 min bei maximaler Umdrehungszahl (15.000 rpm) zentrifugiert, um die Ethanol-Reste auf der Filtermembran zu entfernen. Dann wurde das Auffanggefäß samt Inhalt entsorgt.

Die Spin Filter-Säule wurde in ein neues 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß eingesetzt, 15 µl erwärmter Elution Buffer wurde auf den Säulchen-Filter pipettiert und danach wurde 2 min bei Raumtemperatur inkubiert, um die DNA von der Säule zu lösen. Daraufhin wurde für eine min bei 11.000 rpm zentrifugiert. Um die Menge extrahierter DNA zu erhöhen, wurde das Filtrat, das die DNA enthielt, erneut auf die Spin Filter-Säule aufgetragen und es wurde ein weiteres Mal für eine min bei 11.000 rpm zentrifugiert.

Die extrahierte DNA im Elution Buffer konnte kurzzeitig bei 4 bis 8°C bzw. längerfristig bei -22 bis -18°C gelagert werden.

4.6. Gateway-Klonierung

Um die erhaltenen DNA-Fragmente für die Sequenzierung vorzubereiten, wurden sie in *E. coli* transformiert. Um diese zu vervielfältigen, wurde die Gateway-Klonierung angewandt. Sie besitzt eine hohe Klonierungseffizienz. [56] [57]

Zur Vorbereitung wurde das LB-Medium hergestellt, welches das am häufigsten genutzte komplexe Nährmedium zur Anzucht von *E. coli* ist. [58]

Nach Giuseppe Bertani [59] wurden für 300 ml LB-Medium 3 g Trypton/Pepton, 1,5 g Hefeextrakt und 3 g NaCl in 300 ml MQ-H₂O aufgelöst. Diese Mischung wurde für 25 min bei 121°C autoklaviert.

Nach dem Abkühlen konnte das Medium im Kühlschrank bei 4 bis 8°C gelagert werden.

Zur weiteren Verwendung wurden je 5 ml LB-Medium in Epprouvetten mit 5 µl Kanamycin (50mg/ml) versetzt, um mikrobielles Wachstum zu verhindern.

Außerdem wurden Kanamycin-LB-Agar-Platten benötigt, die als Nährboden für das Wachstum von *E. coli* dienen.

Die Gateway-Klonierung besteht im Wesentlichen aus drei Schritten: PCR, BP-Reaktion und Transformation in *E. coli*. [60]

Bei der PCR wurde das DNA-Fragment mit zwei beinahe identischen attB-Rekombinationsstellen (attB1, attB2) versehen. Diese stellten sicher, dass die DNA in Leserichtung transformiert wurde.

Für die BP-Reaktion wurden 1-5 µl attB1-PCR-Produkt (100 ng in TE-Puffer), 1 µl Gateway™ pDONR™221-Vektor und 2 µl BP-Klonase II vermischt und anschließend mit TE-Puffer auf 10 µl aufgefüllt. Diese Komponenten wurden mittels Vortex-Mischer vermischt und über Nacht bei 25°C im Thermoblock inkubiert.

Zur Vorbereitung auf die Transformation in *E. coli* wurde eine Box mit Eis bereitgestellt, das Wasserbad auf 42°C und der Thermoblock auf 37°C aufgeheizt.

E. coli wurde aus dem -80°C Gefrierschrank geholt und 30 min auf Eis gelagert.

Zur BP-Reaktion wurden 0,5 µl Proteinase K hinzugefügt und ein paar Mal auf- und abpipettiert. Diese Mischung wurde 10 min bei 37°C inkubiert und anschließend auf Eis gestellt. Die Lösung wurde schließlich zu OneShot™ TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Thermo Fisher Scientific, USA) hinzugefügt und es wurde 20 min auf Eis inkubiert. Nach einem „heat-shock“ bei 42°C für 60 sek im Wasserbad wurde das Reaktionsgefäß wiederum für 2 min auf Eis gelagert.

Anschließend wurden 250 µl S.O.C. Medium hinzugefügt. Das gut verschlossene Reaktionsgefäß wurde 1-2 Stunden bei 37°C über Kopf rotieren lassen, um den Bakterien Wachstum zu ermöglichen.

Schließlich wurden je 150 µl Lösung auf je eine LB-Agar-Platte verteilt und diese über Nacht bei 37°C inkubiert.

Auf der Agarplatte mit Kanamycin wuchsen nur *E. coli*-Bakterien, die das Plasmid aufgenommen haben, da nur diese eine Kanamycin-Resistenz besitzen.

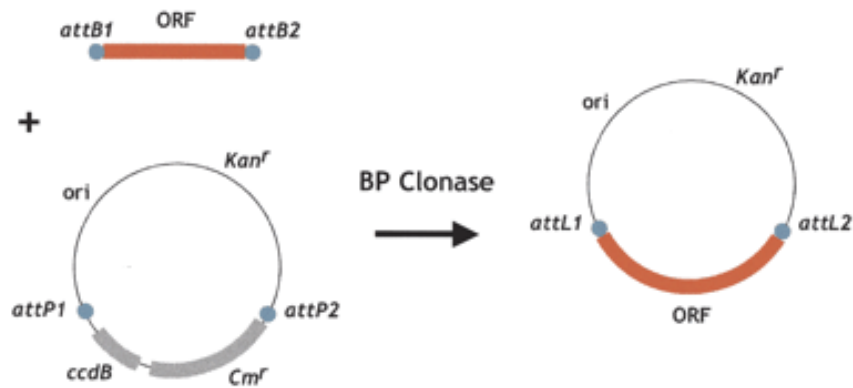


Abb. 8 Transformation mittels BP-Klonase [57] ORF...zur Replizierung vorgesehene DNA, ori...Replikationsursprung, Kan^r...Kanamycin-resistenz-gen, ccdB...*E. coli*-Todesgen

Nach der Inkubation wurden gut gewachsene *E. coli*-Kolonien mit einer sterilen Impföse gepickt und einzeln in Epruvetten mit je 5 ml Kanamycin-LB-Medium überführt. Die Epruvetten wurden mit Alufolie verschlossen und über Nacht im Schüttelwasserbad (GFL Gerätehersteller für Labortechnik GmbH, Deutschland) bei 37°C inkubiert. Danach konnte das Plasmid isoliert werden.

4.7. Plasmid-Extraktion

Um das gewünschte Plasmid aus *E. coli* zu isolieren, wurde das InnuPREP Plasmid MiniPrep Kit 2.0 (IST Innuscreen GmbH, Deutschland, 2021) laut Anleitung verwendet.

Aus dem 5 ml *E. coli* -Ansatz wurden vier Mal jeweils 1 ml entnommen und in ein 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Reaktionsgefäße wurden 1 min bei 14.000 rpm zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Das verbleibende Pellet wurde in 250 µl Resuspensionspuffer mittels Vortex-Mischer gelöst. Danach wurden 250 µl Lysepuffer hinzugefügt und es wurde sechs bis acht Mal invertiert, um die Zellmembran der Bakterien zu zerstören.

Anschließend wurden 350 µl Neutralisationspuffer hinzugefügt, erneut wurde sechs bis acht Mal invertiert und dann 8 min bei 14.000 rpm zentrifugiert, um alle nicht benötigten Zellbestandteile zu kompaktieren.

Nachdem eine Spin Filter-Säule in ein leeres 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß eingesetzt wurde, wurde der klare Überstand, der das Plasmid enthielt, auf die Spin Filter-Säule aufgetragen und 1 min bei 11.000 rpm zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen und das Auffanggefäß wiederverwendet.

Dann wurden 500 µl Washing Solution A auf die Spin Filter-Säule aufgetragen und es wurde 1 min bei 11.000 rpm zentrifugiert. Das Filtrat wurde wieder verworfen und das Auffanggefäß wiederverwendet.

Daraufhin wurden 700 µl Washing Solution B auf die Spin Filter-Säule aufgetragen, es wurde für 1 min bei 11.000 rpm zentrifugiert, das Filtrat wurde verworfen und das Auffanggefäß wiederverwendet. Es wurde 2 min bei 14.000 rpm zentrifugiert, um Spuren von Ethanol auf der Filtermembran zu entfernen. Dann wurde das Auffanggefäß samt Inhalt entsorgt.

Die Spin Filter-Säule wurde in ein neues 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß eingesetzt, daraufhin wurden 30 µl TE-Puffer auf den Filter pipettiert und es wurde 2 min bei Raumtemperatur inkubiert, um die DNA vom Filter der Säule zu lösen.

Schließlich wurde 1 min bei 11.000 rpm zentrifugiert, das Eppendorf-Reaktionsgefäß geschlossen und beschriftet.

Die extrahierte DNA im TE-Puffer konnte kurzzeitig bei 4 bis 8°C, längerfristig bei -22 bis -18°C gelagert werden.

4.8. Nanodrop

Für die Sequenzierung mussten die DNA-Produkte in einer bestimmten Konzentration vorliegen. Zur Messung der vorliegenden Konzentration in den Probengefäßen wurde die Spektrophotometrie mittels NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific, USA) angewandt.

Im NanoDrop One wurde mittels UV-Vis-Spektrophotometrie die Konzentration der DNA in 1 µl Probe bestimmt. Dafür wurde das Gerät zuerst mit 1 µl ddH₂O gereinigt und anschließend mit 1 µl TE-Puffer kalibriert. Schließlich wurde 1 µl Probe auf das Gerät pipettiert, die Messung gestartet und das Ergebnis gespeichert. Die erhaltenen Ergebnisse wurden dafür verwendet, die Konzentration der DNA auf 80 ng/µl zu bringen. Hierfür wurde das errechnete Volumen DNA-Lösung in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß mit MQ-H₂O auf 15 µl verdünnt. Diese konnte dann zur DNA-Sequenzierung verwendet werden. (Tab. 2)

Tab. 2 Ergebnisse aus der NanoDrop-Vermessung der Proben T067, T069-T071 aus *O. majorana* und der Proben T080, T081, T083-T085 aus *O. vulgare* und Berechnung zur Verdünnung der DNA auf 80 ng/µl in 15 µl vom 11.07.2023

Name	Conc. [ng/µl]	DNA	H ₂ O
MP T067	534.521	2,25	12,75
MP T069	459.223	2,61	12,39
MP T070	480.710	2,50	12,50
MP T071	397.536	3,02	11,98
MP T080	254.031	4,72	10,28
MP T081	446.363	2,69	12,31
MP T083	357.278	3,36	11,64
MP T084	418.299	2,87	12,13
MP T085	406.095	2,95	12,05

4.9. DNA-Sequenzierung

Zur Analyse der Primärstruktur der DNA wurde die DNA-Sequenzierung nach Sanger angewandt. Diese wurde von der Firma Microsynth Austria GmbH (1110 Wien) durchgeführt.

Für jeden Klon waren drei Sequenzierreaktionen erforderlich. In Tab. 3 sind die verwendeten Sequenzierprimer M13F, M13R und 465F aufgelistet.

Tab. 3 Liste der Primer für die Sequenzierung der γ -Terpinensynthase

Primer	5'-3'-Sequenz
M13F	GTAAAACGACGGCCAG
M13R	CAGGAAACAGCTATGAC
465F	CAGACTCCTCAGACTGCACGG

4.10. Datenanalyse

Die von Microsynth bereitgestellten Nukleotidsequenzen wurden mit der Software Geneious® 2023.1.2 (Dotmatics, Massachusetts, USA) analysiert. Sowohl der Vergleich der erhaltenen Sequenzen miteinander als auch mit Sequenzen aus der Datenbank von NCBI (National Center for Biotechnology Information, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) waren möglich.

Statistische Tests und Stammbaumberechnungen wurden mit der frei verfügbaren Software MEGA 11 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, Version 11.0.10) durchgeführt. [61]

Das Haplotypen-Netzwerk wurde mittels R und RStudio 2024.09.1 und dem Softwarepaket Pegas erstellt. [62] [63] [64]

Wahrscheinlichkeiten für das Vorhandensein eines Signalpeptids für den Membrantransport wurden mit der frei verfügbaren Software TargetP 2.0 (Subcellular location of proteins: mitochondrial, chloroplastic, secretory pathway, or other, Version 2.0) berechnet. [65]

5. Ergebnisse

Aus dem Pflanzenmaterial von *O. vulgare* wurden 20 aussagekräftige Klone des γ -Terpinensynthase Gens (TPS2), zwei von „230284“ und 18 von „230286“, sequenziert, sowie 48 Klone, 23 von „MH01“ und 25 von „PM3“, aus dem Pflanzenmaterial von *O. majorana*. Da es Schwierigkeiten gab „230284“ zu klonieren, stammten beinahe alle verfügbaren Klone aus *O. vulgare* von „230286“. Die Identität der hier erarbeiteten Sequenzen wurde mittels Vergleichs mit bereits publizierten Sequenzen [49] [50] und NCBI-Blast bestätigt.

5.1. Alignment der DNA-Sequenzen aller TPS2-Klone

Die Konsensus-Sequenz, die sich aus dem DNA-Alignment aller TPS2-Sequenzen ergab, war 2.375 Basenpaaren (bp) lang und beinhaltete sieben Exons und sechs Introns. (Abb. 9)

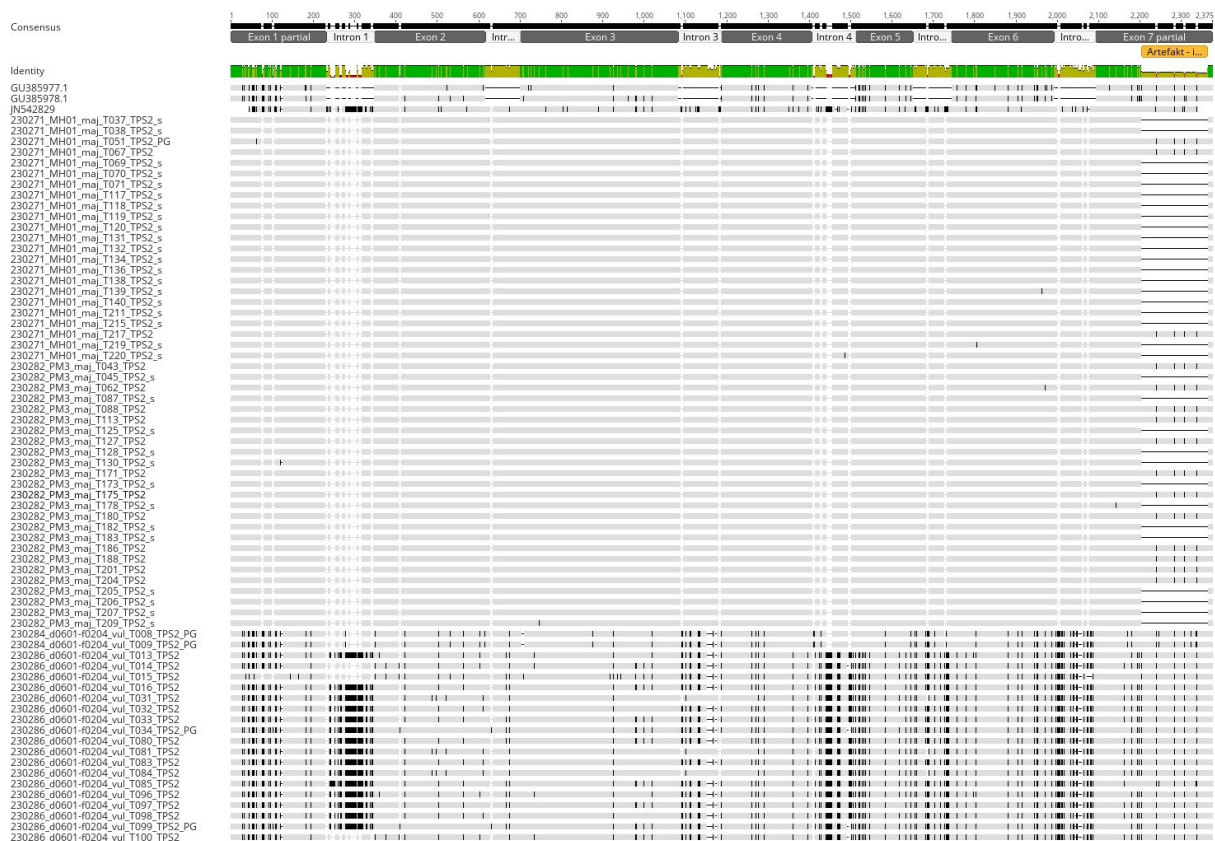


Abb. 9 Übersicht über das DNA-Alignment. Inkludiert sind drei TPS2-Gene aus der Literatur (*O. syriacum* [50], *O. vulgare* [49]) und die DNA-Sequenzen der Klone, die im Zuge dieser Masterarbeit ermittelt wurden. Exon-Intron Grenzen sind in der Konsensus-Sequenz dargestellt, die schwarzen Markierungen im Alignment kennzeichnen Unterschiede zur Konsensus-Sequenz.

Von den 20 Klonen des TPS2-Gens aus *O. vulgare* ergaben Klon T008 und T009 mit 2.265 bp die kürzesten und T031, T081 und T084 mit 2.336 bp die längsten Sequenzen. Insgesamt wurden in *O. vulgare* acht unterschiedlich lange Sequenzen und elf unterschiedliche Varianten geklont. Von den 48 TPS2-Klonen aus *O. majorana* ergab Klon T130 mit 2.107 bp die kürzeste Sequenz, 15 Klone, darunter beispielsweise T171 und T217, wiesen mit 2.270 bp die längsten Sequenzen auf. Insgesamt wurden drei unterschiedlich lange Sequenzen und elf unterschiedliche Varianten geklont.

Bei allen 68 Klonen waren sieben Exons und sechs Introns vorhanden. Exon 1 und Exon 7 waren unvollständig. Im Vergleich mit den in der Literatur beschriebenen vollständigen TPS2-Sequenzen [50] fehlten die ersten sieben bp von Exon 1 und die letzten elf bp von Exon 7. Alle Introns begannen mit den Basen GT und endeten mit AG, dadurch ließen sich Exon-Intron-Grenzen im Vergleich mit den schon publizierten mRNA-Sequenzen gut definieren. Die Längen aller Exons und Introns sind in *Tab. 4* ersichtlich.

Tab. 4 Position der Exon- und Intron-Grenzen im Alignment und Länge der Exons und Introns.

Exon	von	bis	Länge		Intron	von	bis	Länge
1	1	232	232 bp		1	233	346	114 bp
2	347	616	270 bp		2	617	700	84 bp
3	701	1.082	382 bp		3	1.083	1.186	104 bp
4	1.187	1.405	219 bp		4	1.406	1.512	107 bp
5	1.513	1.651	139 bp		5	1.652	1.743	92 bp
6	1.744	1.992	249 bp		6	1.993	2.092	100 bp
7	2.093	2.375	283 bp					

Ein Vergleich der Konsensus-Sequenzen von *O. vulgare* und *O. majorana* ergab eine Übereinstimmung von 90,2%.

5.1.1. *Origanum vulgare*

Beim Vergleich aller klonierten TPS2-Sequenzen (20) von *O. vulgare* war das DNA-Alignment 2.361 bp lang und zu 90% ident. Insgesamt gab es 125 Polymorphismen, davon waren 93 „Single Nucleotide Polymorphisms“ (SNPs) und 22 „Insertions-Deletions“ (Indels), deren Verteilung in Tab. 5 ersichtlich ist.

Tab. 5 Anzahl (Prozent, bezogen auf die jeweilige Exon- bzw. Intron-Länge/bezogen auf die Gesamtlänge des DNA-Alignments) an SNPs und Indels im TPS2-Alignment von *O. vulgare* und deren Verteilung in Exons und Introns.

Exon	SNPs	Indels		Intron	SNPs	Indels
1	17 (7,3/0,72)	3 (3,4/0,13)		1	9 (7,9/0,38)	7 (47,4/0,30)
2	14 (5,2/0,59)	1 (0,7/0,04)		2	1 (1,2/0,04)	1 (1,2/0,04)
3	11 (2,9/0,47)	1 (0,3/0,04)		3	7 (6,7/0,30)	3 (16,3/0,13)
4	5 (2,3/0,21)	0		4	8 (7,5/0,34)	4 (23,4/0,17)
5	11 (8,0/0,47)	0		5	7 (7,6/0,30)	1 (2,2/0,04)
6	3 (1,2/0,13)	0		6	1 (1,0/0,04)	1 (12,0/0,04)
7	13 (4,6/0,55)	0				

Die variabelsten Exons, bezogen auf die Exonlänge, waren Exon 1 und Exon 5 (Tab. 5), wobei in Exon 1 mehr als die Hälfte aller Polymorphismen in nur einer einzigen klonierten Sequenz (T015) und in Exon 5 beinahe alle Polymorphismen in nur zwei der klonierten Sequenzen (T008 und T009) vorkamen. Allein in der Sequenz T015 waren 48 Polymorphismen vorhanden, das waren 38,4% aller Polymorphismen im *O. vulgare* TPS2-Alignment. In den Sequenzen T008 und T009 waren 66 Polymorphismen vorhanden, das waren 52,8% aller Polymorphismen im *O. vulgare* TPS2-Alignment. Untereinander waren die letzteren beiden Sequenzen aber zu 100% ident. Außerdem waren 54 von ihren 66 Polymorphismen (81,8%) ident mit Polymorphismen der klonierten Sequenzen aus *O. majorana*. Wurden die oben genannten drei Sequenzen aus dem DNA-Alignment genommen, so waren die verbleibenden Sequenzen zu 94,1% miteinander ident.

Die Exons 4 und 6 waren vergleichsweise konserviert, da hier nur wenige SNPs und keine Indels vorkamen.

Die variabelsten Introns, bezogen auf die Intronlänge, waren Intron 1 und Intron 4, die wenigsten Polymorphismen kamen in Intron 2 und Intron 6 vor.

5.1.2. *Origanum majorana*

Beim Vergleich aller klonierten TPS2-Sequenzen (48) von *O. majorana* war das DNA-Alignment 2.272 bp lang und die klonierten Sequenzen waren zu 99,1% ident. Insgesamt gab es zehn Polymorphismen, davon waren neun SNPs und einer eine Deletion. Deren Verteilung über Exons und Introns ist in *Tab. 6* ersichtlich.

Tab. 6 Anzahl (Prozent, bezogen auf die jeweilige Exon- bzw. Intron-Länge/bezogen auf die Gesamtlänge des DNA-Alignments) an SNPs und Indels im DNA-Alignment von O. majorana und deren Verteilung in Exons und Introns.

Exon	SNPs	Indels		Intron	SNPs	Indels
1	2 (0,9/0,09)	1 (2,6/0,04)		1	0	0
2	0	0		2	0	0
3	1 (0,3/0,04)	0		3	0	0
4	0	0		4	1 (0,9/0,04)	0
5	0	0		5	0	0
6	3 (1,2/0,13)	0		6	0	0
7	2 (0,7/0,09)	0				

Auffällig war bei den klonierten Sequenzen von *O. majorana*, dass mehr als die Hälfte am Ende der Sequenz eine Deletion von 156 bp aufweisen. Diese waren T037, T038, T069, T070, T071, T117, T118, T119, T120, T131, T132, T134, T136, T138, T139, T140, T211, T215, T219, T220, T045, T087, T125, T128, T130, T173, T178, T182, T183, T205, T206, T207 und T209.

Vermutlich handelte es sich dabei um ein methodisch bedingtes Artefakt, das dadurch entstand, dass (unter den verwendeten PCR-Bedingungen) die ersten neun bp des Primers Om TPS2_2335R (*Tab. 1*) zusätzlich an einer zweiten Stelle in Exon 7 binden konnten und dadurch neben dem gewünschten ein zusätzliches, geringfügig kürzeres PCR-Produkt entstand. [51] Dieses wurde dann ebenfalls in *E. coli* eingebaut und sequenziert.

5.1.3. Stammbaum und Netzwerk

Die Software MEGA 11 identifizierte das „Tamura 3-Parameter-Modell“ [66] als jenes, das das Muster an SNPs im Alignment der genomischen DNA am besten beschreibt.

Der „Disparity Index Test of Substitution Pattern Homogeneity“ identifizierte im vorliegenden Alignment keine Sequenz, die ein stark abweichendes Substitutionsmuster zum allgemein beobachteten Substitutionsmuster aufweist.

Der „Pattern Disparity Index“ identifizierte im Alignment der genomischen DNA kaum Sequenzpaarungen, deren Unterschiede sich nicht durch evolutionäre Differenzierung oder zufällig auftretende Mutationen erklären lassen. Jedoch wiesen fast alle Sequenzpaarungen, an denen die Klone T008 und T009 (beides *O. vulgare*) beteiligt waren Werte über 0 auf, was auf eine vergleichsweise hohe Mutationsrate in diesen Sequenzen hinwies. Diese beiden Sequenzen waren schon zuvor im Alignment durch eine vergleichsweise große Anzahl an Mutationen aufgefallen (Kapitel 5.5.1.).

Das Verhältnis von Transitionen zu Transversionen betrug 1,71, was in etwa dem zu erwartenden Verhältnis entsprach.

Die genetische Distanz über das gesamte Alignment der genomischen DNA betrug 0,0344.

Die Sequenzen der Klone T008 und T009 aus dem ersten *O. vulgare* Individuum waren ident. Die TPS2-Sequenzen aus dem zweiten *O. vulgare* Individuum wiesen untereinander eine genetische Differenz von 0,0093 auf. Die genetische Distanz der Sequenzen innerhalb der Individuen MH01 und PM3 von *O. majorana* war mit 0,00015 und 0,00014 beinahe ident.

Aus dem erarbeiteten TPS2-Alignment wurden nachfolgender Stammbaum (Abb. 10) und nachfolgendes Netzwerk erstellt (Abb. 11).

Die Sequenzen der beiden Arten trennten sich artenspezifisch auf.

Sowohl im Stammbaum als auch im Netzwerk war erkennbar, dass die genetische Distanz zwischen einzelnen Sequenzen von *O. majorana* geringer war als jene zwischen einzelnen Sequenzen von *O. vulgare*. Die beiden Sequenzen von „230284“, die schon zuvor durch die hohe Anzahl an Mutationen auffielen, gruppierten außerhalb des *O. vulgare*-Astes. Außerdem fielen sie durch eine höhere genetische Distanz zu den übrigen Sequenzen aus *O. vulgare* als die Sequenz aus *O. syriacum* auf.

In *O. majorana* wurden in den 48 geklonten TPS2-Sequenzen elf verschiedene Haplotypen identifiziert, wobei 27 der Klone dem häufigsten Haplotyp II und zwölf Klone Haplotyp IV angehörten. Alle anderen Haplotypen kamen nur einmal vor. In den 20 geklonten TPS2-Sequenzen von *O. vulgare* wurden ebenfalls elf verschiedene Haplotypen identifiziert, wobei maximal drei Klone einem Haplotypen angehörten. Fünf Haplotypen konnten wiederholt isoliert werden, die restlichen sechs Haplotypen lagen einzeln vor.

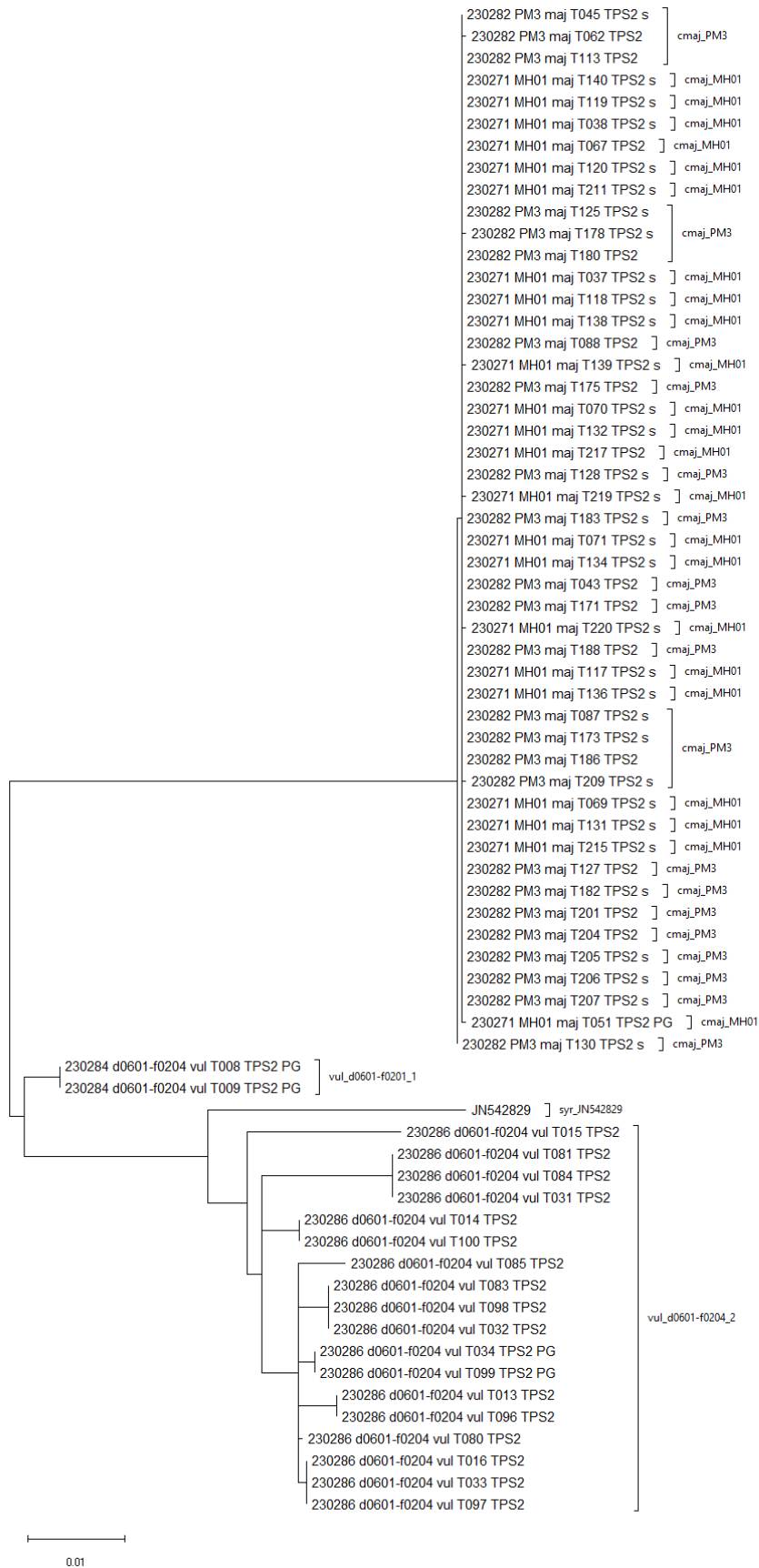


Abb. 10 NJ-Stammbaum basierend auf der genomischen DNA aller klonierten TPS2-Sequenzen inkl. der DNA-Sequenz „JN542829“ aus der Literatur [50].

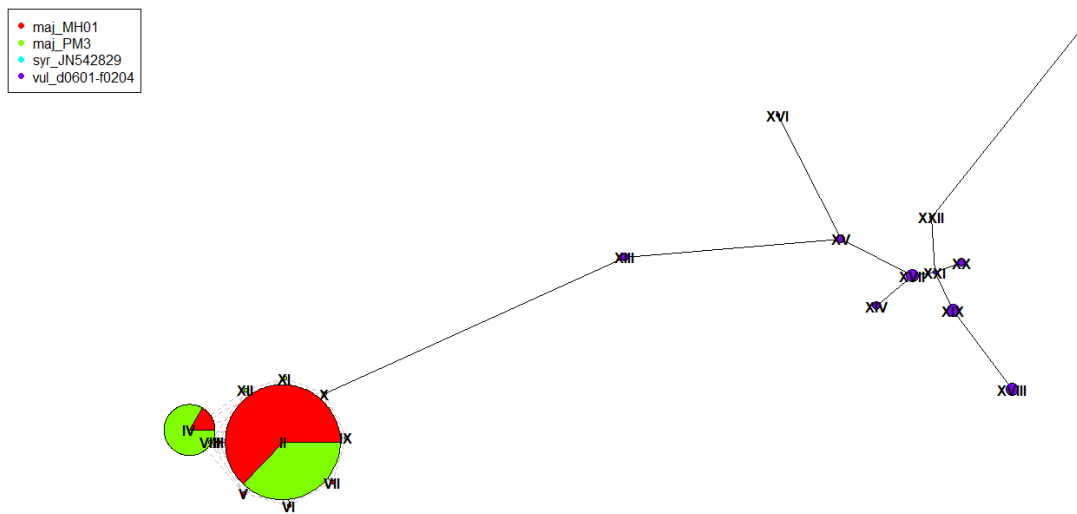


Abb. 11 Haplotypen-Netzwerk basierend auf der genomischen DNA aller klonierten Sequenzen inkl. der DNA-Sequenz „JN542829“ (Haplotyp I) aus der Literatur [50]. Die Häufigkeit der Haplotypen I – XXII ist durch die Größe des jeweiligen Kreises gekennzeichnet.

5.2. Alignment der Aminosäuren-Sequenz aller Klone

Das Aminosäuren (AS)-Alignment aller TPS2-Sequenzen war 589 AS lang und enthielt 31 variable Stellen (Abb. 12). Fünf AS-Sequenzen, nämlich T051 (aus *O. majorana*) und T008, T009, T034 und T099 (aus *O. vulgare*) endeten vorzeitig durch Frameshift und/oder interne Stopp-Codons.



Abgesehen von diesen sechs Sequenzen, waren die verkürzten Artefakte 531 AS und alle kompletten Sequenzen 588 AS lang.

Vier konservierte AS-Motive, die in allen TPS zu finden sind [67] [68] [69], waren auch hier im Alignment präsent und in allen für diese Studie klonierten Sequenzen identisch. An den Alignment-Positionen 52 bis 62 befand sich das $RRx_{(8)}W$ -Motiv, welches hier im Alignment der AS-Abfolge $RRSGNYQASIW$ entsprach. Das Motiv RxR an den Positionen 308 bis 310 beinhaltete als variable AS Asparaginsäure. Ein weiteres generell konserviertes Motiv, nämlich $DDxxD$, befand sich an den Positionen 345 bis 349, wobei Valin und Tyrosin zwischen den Asparaginsäuren lagen. $GTLxEL$ bildete an den Positionen 352 bis 357 ein konserviertes Motiv mit Asparaginsäure als variabler AS.

5.2.1. *Origanum vulgare*

Die AS-Sequenzen von *O. vulgare* wiesen, die beiden Pseudogen-Varianten ausgenommen, innerartlich eine Übereinstimmung von 99,2% auf. Besonders auffällig war die Anzahl der Abweichungen in Sequenz T015, die sich an 13 Positionen von der Konsensus-Sequenz aller vollständigen AS-Sequenzen unterschied. An gleich neun dieser 13 Positionen traten nur in dieser Sequenz Abweichungen auf. Alle anderen AS-Sequenzen unterschieden sich in maximal drei AS voneinander, die an insgesamt nur acht Positionen im Alignment auftraten.

Eine Besonderheit war die Position 266. Hier traten die AS Valin und Isoleucin in gleicher Häufigkeit auf. Auch in den beiden *O. vulgare* Sequenzen aus der Literatur [49] kam an dieser Position jeweils eine dieser beiden AS vor.

Unter den AS-Sequenzen von *O. vulgare* waren bis auf drei Sequenzen, nämlich T013, T096 und wie schon vorhin erwähnt T015, die sich von allen anderen unterschieden, jeweils zwei oder drei Sequenzen identisch. Untereinander gleich waren T016, T033 und T097, außerdem T032, T083 und T098, und auch T080 und T085 unterschieden sich auf AS-Ebene nicht voneinander. Diese acht Sequenzen beinhalteten zusätzlich an allen Positionen die gleiche AS wie zumindest eine der beiden Literatur-Sequenzen, bis auf eine Ausnahme. An Position 519 wurde in beiden schon publizierten Sequenzen die AS Lysin beschrieben, in den hier klonierten Sequenzen kam stattdessen durchwegs Glutamin vor.

In den 20 erfolgreich klonierten Sequenzen aus *O. vulgare* waren, die beiden Pseudogen-Varianten eingeschlossen, insgesamt zehn unterschiedliche AS-Sequenzvarianten vorhanden.

5.2.2. *Origanum majorana*

Die Aminosäure-Sequenzen von *O. majorana* wiesen innerartlich eine Übereinstimmung von 99,96% auf. Lediglich fünf AS-Sequenzen unterschieden sich von den anderen durch eine AS.

Die Sequenz T139 enthielt an Position 485 Glycin anstelle von Arginin, bei der Sequenz T219 war an der Position 432 Prolin durch Glutamin ausgetauscht. Die Sequenz T062 enthielt an Position 487 Valin anstelle von Alanin, der Sequenz T130 fehlte die AS Methionin an Position 38 und bei der Sequenz T178 war and der Position 511 Lysin durch Glutaminsäure ausgetauscht.

In den 48 erfolgreich klonierten Sequenzen aus *O. majorana* waren neun unterschiedliche AS-Sequenzvarianten vorhanden.

5.2.3. Strukturelle Unterschiede zwischen *O. majorana*- und *O. vulgare*-TPS2

Im Überblick über die verschiedenen Sequenzvarianten des AS-Alignments mit Vorhersage der Sekundärstruktur (*Anhang - Abb. 17*) wurden die Auswirkungen der Unterschiede in der AS-Abfolge auf die Proteinstruktur erkennbar. Die deutlichsten Unterschiede gab es in Exon 1 (*Abb. 13*), vor allem ist hier der Unterschied zwischen den beiden inkludierten Arten am größten.

Im Exon 1 der Monoterpensynthasen ist üblicherweise ein Signalpeptid lokalisiert, das für den Membrantransport dieser Enzyme verantwortlich ist. Die Wahrscheinlichkeit, dass ein solches Signalpeptid auf den hier erarbeiteten Sequenzen vorhanden ist, berechnete die Software TargetP 2.0 mit 0,376 für die Literatursequenz GU385977 aus *O. vulgare* und mit 0,344 für die Sequenz T067 aus *O. majorana*.

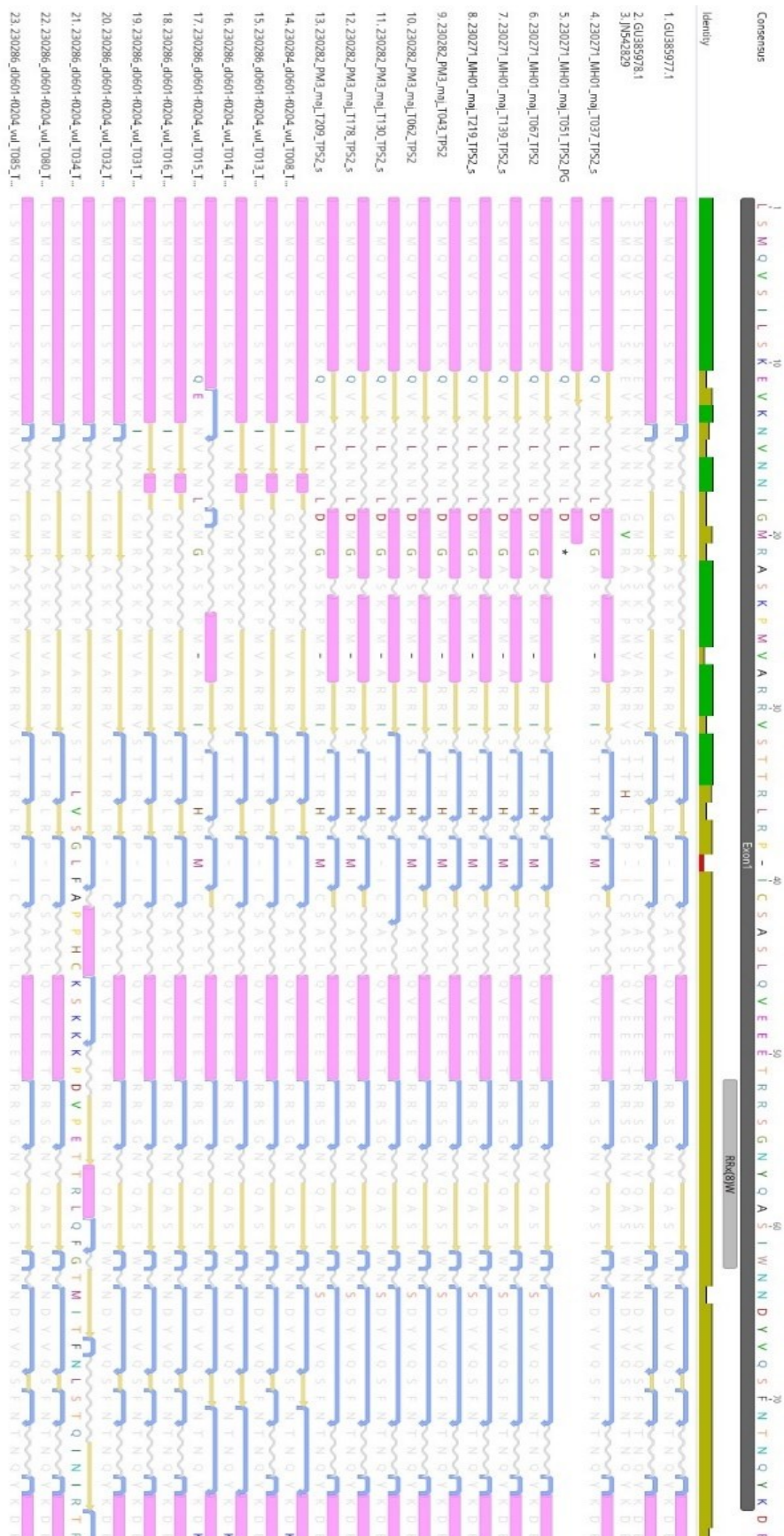


Abb. 13 Vorhersage der Sekundärstrukturelemente (Wahrscheinlichkeit 65%) von Exon 1 ausgewählter Sequenzen (rosa Balken = α -Helix, gelber Pfeil = β -Faltblatt, blaue Pfeile = β -Schleife, graue Welle = Coil)

6. Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war es die Variabilität des γ -Terpinensynthase Gens in *O. vulgare* und *O. majorana* sowohl innerartlich als auch zwischen den Arten aufzuzeigen, sowie nach Anhaltspunkten zu suchen, die das fast völlige Fehlen der Cymyl-Komponenten in *O. majorana* erklären könnten. Verfügbare Publikationen beschäftigten sich bisher mit der Isolierung und Charakterisierung verschiedener Terpensynthasen in *O. vulgare* (RNA-Sequenzen), nicht klonierten genomischen Sequenzen oder klonierten, kurzen Teilstücken des TPS2-Gens in verschiedenen *Origanum*-Arten [49] [50] [67]. [49] und [50] lieferten erste Hinweise auf das Vorhandensein intra-individueller Variation sowie einen ersten Eindruck von intra- und inter-spezifischer Variabilität.

Aus allen 68 hier geklonten DNA-Sequenzen wurden 22 verschiedene Sequenzvarianten definiert, jeweils elf in *O. vulgare* und in *O. majorana*. Innerartlich waren die Unterschiede der Haplotypen in *O. vulgare* deutlich größer als in *O. majorana*. Die innerartliche Identität der Sequenzen lag bei 90% (*O. vulgare*) und 99,1% (*O. majorana*).

In *O. vulgare* war ein Vergleich zwischen den beiden inkludierten Individuen nicht möglich, da aus „230284“ nur zwei aussagekräftige Klone isoliert werden konnten. Keine einzige der hier isolierten *O. vulgare* Sequenzen entsprach einer der beiden publizierten RNA-Sequenzen von Crocoll [49], zwei Klone, nämlich T080 und T085, waren den beiden publizierten Sequenzen am ähnlichsten und unterschieden sich nur in zwei AS-Positionen von einer der beiden.

In *O. majorana* konnte im Vergleich der beiden inkludierten Individuen kein nennenswerter Unterschied in der Variabilität festgestellt werden. In beiden Individuen beschränkten sich die Polymorphismen auf einzelne SNPs. Jedoch war in *O. majorana* vor allem die verkürzte Sequenzvariante auffällig, die in beiden Individuen, deutlich häufiger aber in „MH01“ (87% der geklonten Sequenzen) als in „PM3“ (52% der geklonten Sequenzen) vorkam. Diese könnte ein methodisch bedingtes Artefakt sein, das durch die hier verwendeten PCR-Bedingungen entstand [51]. Die vermutete zweite interne Bindungsstelle für den Primer Om TPS2_2335R in Exon 7 war in *O. majorana* neun bp lang komplementär zu den ersten neun Basen des Reverse-Primers. In *O. vulgare* waren aufgrund zweier SNPs in diesem Bereich nur sieben der ersten neun bp des Primers komplementär, was bei den verwendeten PCR-Bedingungen für eine Bindung nicht ausreichen dürfte. Um die Artefaktbildung zu verhindern, könnte in zukünftigen Untersuchungen versuchsweise die Annealing-Temperatur der PCR-Reaktion erhöht werden bzw. alternativ der Reverse-Primer verkürzt oder versetzt werden.

Aus den 62 vollständig geklonten DNA-Sequenzen, die Pseudogene ausgenommen, konnten 15 verschiedene AS-Varianten definiert werden, acht aus *O. vulgare* und sieben aus *O. majorana*.

In *O. vulgare* wurden zwei Genvarianten vorgefunden, die als mutmaßliche Pseudogene identifiziert wurden. Diese wurden jeweils zweimal isoliert (T034 & T099 und T008 & T009, die einzigen zwei isolierten Klone aus „230284“), weshalb sie als abgesichert gelten können.

Mit Ausnahme einer Genvariante (T051), die als mutmaßliches Pseudogen identifiziert wurde, zeigten die TPS-Genvarianten in *O. majorana* keine strukturellen Auffälligkeiten und schienen intakt. Im DNA-Sequenz-Alignment bzw. noch deutlicher im AS-Alignment fiel jedoch eine Häufung an Nukleotid- bzw. AS-Substitutionen in Exon 1 auf. Diese Häufung an Substitutionen zeigte sich nicht nur im Vergleich zu *O. vulgare*, sondern auch im Vergleich zu aus *O. onites* L. isolierten TPS-Varianten [70]. Die Unterschiede in der AS-Sequenz resultierten auch in deutlichen Unterschieden der Sekundärstruktur (Abb. 13). Da in diesem Genbereich das Transitpeptid, das für den Transport des Enzyms durch die Chloroplastenmembran verantwortlich ist, lokalisiert ist [49], könnten die Abweichungen im Monoterpenspektrum von *O. majorana* auf ein nicht funktionales Transitpeptid zurückzuführen sein. Diese Vermutung wurde jedoch durch die Software TargetP 2.0 nicht unmittelbar bestätigt, die in beiden *Origanum*-Arten mit ähnlich großer Wahrscheinlichkeit in Exon 1 ein Signalpeptid lokalisiert. Diese Ergebnisse sprechen bezüglich Lokalisierung eines Transportpeptids trotz deutlicher AS-Sequenzunterschiede für keinen relevanten Unterschied zwischen den beiden untersuchten Arten. Um die strukturellen Unterschiede in Exon 1 als unmittelbare Ursache für die Unterbrechung des Cymyl-Biosyntheseweges und die fehlende Produktion von Thymol und Carvacrol zu bestätigen wären weiterführende Untersuchungen notwendig.

Nicht nur in Exon 1, auch im nachfolgenden, sehr variablen Intron 1 wurden im Vergleich *O. majorana* - *O. vulgare* sehr deutliche, artspezifische Muster festgestellt. Verschiedene Studien befassen sich damit, dass auch Introns eine regulierende Funktion bezüglich der Expression eines Gens haben könnten. [71] [72] [73] Die auffällig stark unterschiedlichen, artspezifischen Muster in Intron 1 könnten im Zusammenhang mit einer mehr oder weniger starken Expression des TPS2 -Gens stehen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in diesem ersten Überblick keine strukturellen Abweichungen im TPS2-Gen von *O. majorana* detektiert werden konnten, die das unterschiedliche Monoterpen-Spektrum von *O. vulgare* und *O. majorana* erklären könnten. Alle der in Terpensynthasen konservierten AS-Motive waren durchgehend intakt, aus drei der vier inkludierten Individuen wurden neben wenigen Pseudogenen eine Überzahl an scheinbar intakten TPS2-Sequenzen isoliert.

Um oben genannte Hypothesen überprüfen zu können sind weiterführende Studien nötig. Eine Möglichkeit wäre Expressionsstudien mit verschiedenen TPS2-Genvarianten (vgl. Crocoll [49]) durchzuführen, um ihren Einfluss auf die Aktivität des Cymyl-Biosyntheseweges zu testen oder um den Einfluss von Introns, besonders Intron 1, auf die Genexpression zu überprüfen.

Anhang

Tab. 7 Verwendete Chemikalien und deren Lieferanten

Chemikalien	Lieferanten
CTAB	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
NaCl	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
BME	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
SDS 10%	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Proteinase K	Thermo Fisher Scientific, USA
PVP40	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Chloroform	Merck KGaA, Deutschland
Isoamylalkohol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Isopropanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
NH ₄ Cl (15mM)	Merck KGaA, Deutschland
70% EtOH	Merck KGaA, Deutschland
MQ-H ₂ O	Merck KGaA, Deutschland
10 mmol/l Tris HCl	Merck KGaA, Deutschland
1 mmol/l EDTA	Merck KGaA, Deutschland
Buffer 5x Phusion HF	Thermo Fisher Scientific, USA
DMSO	Thermo Fisher Scientific, USA
A, C, G, T (20 mM)	Solis BioDyne OÜ, Estland
Agarose	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
SB-Puffer	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
peqGREEN	VWR International GmbH, USA
ROTIPHORESE® 10x TAE-Puffer	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Loading Dye	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts
100 kb DNA-Ladder	VWR, Pennsylvania
Trypton/Pepton	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
NaCl	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Kanamycin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
BP-Klonase II	Thermo Fisher Scientific, USA
S.O.C. Medium	Thermo Fisher Scientific, USA

Tab. 8 Verwendete Reagenzien und deren Zusammensetzung

Reagens	Zusammensetzung
CTAB-Extraktionspuffer, 1 l	10 g CTAB, 41 g NaCl, 1 l Tris-EDTA-Puffer
Chloroform/Isoamylalkohol (24:1), 500 ml	480 ml Chloroform, 20 ml Isoamylalkohol
Wash I, 1 l	1,16 g NH ₄ Cl, 1 l 70% EtOH
Wash II, 500 ml	350 ml 70% EtOH, 150 ml MQ-H ₂ O
TE-Puffer (pH=8), 1 l	10 ml 1 M Tris-HCl, 2 ml 0,5 M EDTA, 1l MQ-H ₂ O
DMSO 5%	5 µl DMSO, 45 µl MQ-H ₂ O

Tab. 9 Liste aller Klone mit zugehörigem Kurznamen, der im Text verwendet wurde und der Art, aus der sie isoliert wurden

Klonname	Kurzname	Art
230271_MH01_maj_T037_TPS2_s	T037	<i>O. majorana</i>
230271_MH01_maj_T038_TPS2_s	T038	<i>O. majorana</i>
230271_MH01_maj_T051_TPS2_PG	T051	<i>O. majorana</i>
230271_MH01_maj_T067_TPS2	T067	<i>O. majorana</i>
230271_MH01_maj_T069_TPS2_s	T069	<i>O. majorana</i>
230271_MH01_maj_T070_TPS2_s	T070	<i>O. majorana</i>
230271_MH01_maj_T071_TPS2_s	T071	<i>O. majorana</i>
230271_MH01_maj_T117_TPS2_s	T117	<i>O. majorana</i>
230271_MH01_maj_T118_TPS2_s	T118	<i>O. majorana</i>
230271_MH01_maj_T119_TPS2_s	T119	<i>O. majorana</i>
230271_MH01_maj_T120_TPS2_s	T120	<i>O. majorana</i>
230271_MH01_maj_T131_TPS2_s	T131	<i>O. majorana</i>
230271_MH01_maj_T132_TPS2_s	T132	<i>O. majorana</i>
230271_MH01_maj_T134_TPS2_s	T134	<i>O. majorana</i>
230271_MH01_maj_T136_TPS2_s	T136	<i>O. majorana</i>
230271_MH01_maj_T138_TPS2_s	T138	<i>O. majorana</i>
230271_MH01_maj_T139_TPS2_s	T139	<i>O. majorana</i>
230271_MH01_maj_T140_TPS2_s	T140	<i>O. majorana</i>
230271_MH01_maj_T211_TPS2_s	T211	<i>O. majorana</i>
230271_MH01_maj_T215_TPS2_s	T215	<i>O. majorana</i>
230271_MH01_maj_T217_TPS2	T217	<i>O. majorana</i>

Klonname	Kurzname	Art
230271_MH01_maj_T219_TPS2_s	T219	<i>O. majorana</i>
230271_MH01_maj_T220_TPS2_s	T220	<i>O. majorana</i>
230282_PM3_maj_T043_TPS2	T043	<i>O. majorana</i>
230282_PM3_maj_T045_TPS2_s	T045	<i>O. majorana</i>
230282_PM3_maj_T062_TPS2	T062	<i>O. majorana</i>
230282_PM3_maj_T087_TPS2_s	T087	<i>O. majorana</i>
230282_PM3_maj_T088_TPS2	T088	<i>O. majorana</i>
230282_PM3_maj_T113_TPS2	T113	<i>O. majorana</i>
230282_PM3_maj_T125_TPS2_s	T125	<i>O. majorana</i>
230282_PM3_maj_T127_TPS2	T127	<i>O. majorana</i>
230282_PM3_maj_T128_TPS2_s	T128	<i>O. majorana</i>
230282_PM3_maj_T130_TPS2_s	T130	<i>O. majorana</i>
230282_PM3_maj_T171_TPS2	T171	<i>O. majorana</i>
230282_PM3_maj_T173_TPS2_s	T173	<i>O. majorana</i>
230282_PM3_maj_T175_TPS2	T175	<i>O. majorana</i>
230282_PM3_maj_T178_TPS2_s	T178	<i>O. majorana</i>
230282_PM3_maj_T180_TPS2	T180	<i>O. majorana</i>
230282_PM3_maj_T182_TPS2_s	T182	<i>O. majorana</i>
230282_PM3_maj_T183_TPS2_s	T183	<i>O. majorana</i>
230282_PM3_maj_T186_TPS2	T186	<i>O. majorana</i>
230282_PM3_maj_T188_TPS2	T188	<i>O. majorana</i>
230282_PM3_maj_T201_TPS2	T201	<i>O. majorana</i>
230282_PM3_maj_T204_TPS2	T204	<i>O. majorana</i>
230282_PM3_maj_T205_TPS2_s	T205	<i>O. majorana</i>
230282_PM3_maj_T206_TPS2_s	T206	<i>O. majorana</i>
230282_PM3_maj_T207_TPS2_s	T207	<i>O. majorana</i>
230282_PM3_maj_T209_TPS2_s	T209	<i>O. majorana</i>
230284_d0601-f0204_vul_T008_TPS2_PG	T008	<i>O. vulgare</i>
230284_d0601-f0204_vul_T009_TPS2_PG	T009	<i>O. vulgare</i>
230286_d0601-f0204_vul_T013_TPS2	T013	<i>O. vulgare</i>
230286_d0601-f0204_vul_T014_TPS2	T014	<i>O. vulgare</i>
230286_d0601-f0204_vul_T015_TPS2	T015	<i>O. vulgare</i>
230286_d0601-f0204_vul_T016_TPS2	T016	<i>O. vulgare</i>

Klonname	Kurzname	Art
230286_d0601-f0204_vul_T031_TPS2	T031	<i>O. vulgare</i>
230286_d0601-f0204_vul_T032_TPS2	T032	<i>O. vulgare</i>
230286_d0601-f0204_vul_T033_TPS2	T033	<i>O. vulgare</i>
230286_d0601-f0204_vul_T034_TPS2_PG	T034	<i>O. vulgare</i>
230286_d0601-f0204_vul_T080_TPS2	T080	<i>O. vulgare</i>
230286_d0601-f0204_vul_T081_TPS2	T081	<i>O. vulgare</i>
230286_d0601-f0204_vul_T083_TPS2	T083	<i>O. vulgare</i>
230286_d0601-f0204_vul_T084_TPS2	T084	<i>O. vulgare</i>
230286_d0601-f0204_vul_T085_TPS2	T085	<i>O. vulgare</i>
230286_d0601-f0204_vul_T096_TPS2	T096	<i>O. vulgare</i>
230286_d0601-f0204_vul_T097_TPS2	T097	<i>O. vulgare</i>
230286_d0601-f0204_vul_T098_TPS2	T098	<i>O. vulgare</i>
230286_d0601-f0204_vul_T099_TPS2_PG	T099	<i>O. vulgare</i>
230286_d0601-f0204_vul_T100_TPS2	T100	<i>O. vulgare</i>

```

1  GTCAACAACA TTGGCGTGAG AGCATCTAAA CCAATGGTGG CGAGGCGCGT CTCTACCACT
61 CATCTCCGGC CTATTTGCTC CGCCTCACTG CAAGTCGAAG AAGAAACCCG ACGTTCCGGA
121 AACTACCAGG CTTCCATTTG GAACAATGAT TACGTTCAAT CTTTCAACAC AAATCAATAT
181 AAGGTATATA TTATACACAT ATATATACAA TACAGTATGC TAAATGTTTC TTTTCTAATT
241 CAGTATGTAT CTATTTATGC ATTGATCTAT GTGTGTGCAG GACGAGAAGC ACTTGAAAAA
301 GAAAGAAGAG CTGATTGCAC AAGTAAAGAT ATTGTTGAAC AAAAAAATGG AGGCTGTTAA
361 ACAATTGGAG TTGATTGAAG ACTTGAGAAA TCTAGGGTTG ACTTATTATT TTCAAGATGA
421 GGTAAAGAAG ATTCTTACTT CCATATATAA TGATCACAAA TGCTTCAAAA ACGAACAAGT
481 TGGGGATTTG TATTTCACTT CTCTCGGATT CAGACTCCTC AGACTGCACG GTTTCGATGT
541 CTCAGAAGGT GATCGATCAG ACCTTAACATA ACATGTGTAT TTTCTTTTCT TGAGTCTAAT
601 TAAATCGAAA TTGTATTGAT ATCGAATGCA GAGGTGTTTA ACTTTTTTTAA GAACGAGGAT
661 GGTAGTGATT TCAAGGCGAG CCTTGGTGAA AATGTAAAAG ACGTATTGCA GCTTTACGAA
721 GCATCTTTCC TTATARGGGA AGGTGAGGTT ATACTGGAGC AAGCAAGAGT ATTTTCCACC
781 AAACATCTTG AAAAGAAAGT TGATGAGGGA ATTAATGATG AGAAATTATT AGCATGGATT
841 CGCCATTCTT TGGCTCTCCC TCTTCATTGG AGGATTCAAA GGCTAGAGGC GAGATGGTTC
901 TTAGATGCTT ACAGGGCGAG GAAAGACATG ATTCCTCTTA TTTTCGAGCT CGGGAAAAATC
961 GACTTCCATA TCATTCAAGA AACACAACATA GAAGAACTCC AAGAAGTCTC AAAGTACGTA
1021 TAAAATACTA AATATATCCA AACATTAATC TTATTTTRTTA TTTGTGCATC TCTACTAATA
1081 GAAACATTTT TCGACCTTTT ATTGGATATA TATATAGGTG GTGGACTAAT TCAAACCTCG
1141 CCGAGAAACT CCCATTTGTG AGAGATAGAA TTGTGGAGTG CTACTTTTGG GCGCTTGGGC
1201 TCTTTGAACC ACATGAGTAT GGTATATCAGA GGAAAATGGC TGCCATTATT ATCACTTTTCG
1261 TTACGATCAT AGACGATGTT TATGACGTCT ACGGTACACT CGACGAGCTG CAGCTATTCA
1321 CCGACGCGAT TCGAAAGTCA GTATAAAATT TATGTTATGT ATCTAAATCA TCATTGATGA
1381 AATATAATCT GGCTAAATAG GCCTTAACCA ATTAATGA GAATTTTCAAG TGGGACTTTC
1441 AATCAATAAG CACACTTCCA TATTACATGC AAGTTTGCTA TTTGGCACTC TACACCTATG
1501 CTTCTGAAC TGGCTTATGAT ATTCTCAAAG ATCAAGGTTT CAACAGTATT GCTTATCTAC
1561 AGAGATCGGT ATATATATTT TCTCTCTCCT ACAACATTTT TTCTATAAGT TTTAATCATT
1621 TGAAGAAACT GATTATAAAT TTGTGTTTTT TGATTTGCAG TGGCTGAGTT TGGTTGAAGG
1681 ATTTTTTCAA GAGGCAAAAT GGTACTACGC CGGGTACACG CCRACCCTAG CAGAATACCT
1741 AGAGAACGCC AAAGTTTCAA TATCATCTCC TACTATTATC TCTCAAGTTT ACTTCACTCT
1801 TCCGAATTCG ACTGAGAGAA CCGTTGTCTG AAACGTCTTC GGATACCACA ACATACTCTA
1861 TCTTTCAGGG ATGATTTTAA GGCTTGCTGA TGATCTTGGC ACAACTCAGG TAGACATTAA
1921 TGAATTTTTA TTTTGATTAA TTTTGAGAGT TTATATATTA GTATATTTAT AAATCCCAAA
1981 TGTATATATT TGTAAATATA GTTTGAGCTG AAGAGAGGGG ACGTGCAAAA GGCAATCCAG
2041 TGTTACATGA AGGACAACAA TGCTACAGAG AAAGAAGGGG CTGAGCACGT GAAGTATCTG
2101 TTGCGGGAGG CCTGGAAGGA GATGAACACG GCGATGGCGG ACCCCGAGTG CCCGTTGTCTG
2161 GAAGATCTGG TGGATGCTGC TGCTAATCTG GGAAGAGCAT CTCAGTTCAT ATACCTCGAG
2221 GGAGATGGCC ACGGCGTTCA GCACTCAGA

```

Abb. 14 DNA-Sequenz „JN542829“ des γ -Terpinensynthase Gens aus *O. syriacum* L. [50]

```

1  ATGGCTACCC  TTAGCATGCA  AGTGTCCATA  CTTAGCAAGG  AAGTGAAAAA  TGTCAACAAC
61 ATTGGCATGA  GAGCATCTAA  ACCAATGGTG  GCGAGGCGCG  TCTCTACCAC  TCGTCTCCGG
121 CCTATTTGCT  CCGCCTCACT  GCAAGTCGAA  GAAGAAACCC  GACGTTCCGG  AAACCTACCAG
181 GCATCAATTT  GGAACAATGA  TTACGTTCAA  TCTTTCAACA  CAAATCAATA  TAAGGACGAG
241 AAGCACTTGA  AAAAGAAAGA  AGAGCTGATT  GCACAAGTAA  AGATATTGTT  GAACACAAAA
301 ATGGAGGTTG  TTAAACAATT  GGAGTTGATT  GAAGACTTGA  GAAATCTAGG  GTTGACTTAT
361 TATTTTCAAG  ATGAGGTTAA  GAAGATTCTA  ACTTCTATAT  ATAATGATCG  CAAATGCTTC
421 AAAAACGAAC  AAGTTGGGGA  TTTGTATTTT  ACTTCTCTTG  GATTCTAGACT  CCTCAGACTG
481 CACGGTTTCG  ATGTCTCGGA  AGAGGTGTTT  AACTTTTTTA  AGACCGAGAA  TGGTAGTGAT
541 TTCAAGGCGA  GCCTTGGTGA  AAATATAAAA  GACGTATTGC  AGCTTTACGA  AGCATCTTTC
601 CTTATAAGGG  AAGGTGAAGT  TATACTGGAG  CAAGCAAGAG  TATTTTCCAC  CAAACATCTT
661 GAAAAGAAAG  TTGATGAGGG  AATTAATGAT  GAAAAATTAT  TAGCATGGAT  TCGCCATTCT
721 TTGGCTCTCC  CTCTTCATTG  GAGGATTCAA  AGGCTAGAGG  CGAGATGGTT  CTTAGATGCT
781 TATAAGGCGA  GGAAAGACAT  GGTTCCTCTT  ATTTTCGAGC  TTGGGAAAAT  CGACTTCCAT
841 ATCATTCAAG  AAACACAAC  AGAAGAAGTC  CAAGAAGTCT  CAAAGTGGTG  GACTAATTCA
901 AACCTCGCCG  AGAACTCCC  ATTTGTGAGA  GATAGAATTG  TGGAGTGCTA  CTTTGGGCG
961 CTTGGGCTCT  TTGAACCACA  TGAGTATGGT  TATCAGAGGA  AAATGGCTGC  CATTATTATC
1021 ACTTTCGTTA  CGATCATAGA  CGATGTTTAC  GACGTCTACG  GTACACTCGA  CGAACTGCAG
1081 CTATTCACCG  ACGCGATTCT  AAAATGGGAC  TTTCAATCAA  TAAGCACACT  TCCATACTAC
1141 ATGCAAGTTT  GCTATTTGGC  ACTCTACACC  TATGCTTCTG  AACTGGCTTA  TGATATTCTC
1201 AAAGATCAAG  GTTTCAACAG  TATTGCTTAT  CTACAAAGAT  CGTGGCTGAG  TTTGGTGGAA
1261 GGATTTTTC  AAGAGGCAAA  ATGGTACTAC  GCCGGGTACA  CGCCGACCCT  AGCAGAATAC
1321 CTAGAGAACG  CCAAAGTTTC  AATATCACCT  CCTACTATTA  TCTCTCAAGT  TTACTTCACT
1381 CTTCCGAATT  CGACTGAGAG  AACGGTTGTC  GAAAACGTCT  TCGGATACCA  CAACATACTC
1441 TACCTTTCCG  GAATGATTTT  AAGGCTTGCA  GACGATCTTG  GCACTACTCA  GTTTGAGCTG
1501 AAGAGAGGGG  ACGTGCAAAA  GCGATCCAG  TGTTACATGA  AGGACAACAA  TGCTACAGAG
1561 AAAGAAGGGG  CTGAGCATGT  GAAGTATCTG  TTACGAGAGG  CGTGGAAGGA  GATGAACACG
1621 GCGATGGCGG  ACCCGAGTG  CCCGTTGTCT  GAAGATCTGG  TGGATGCTGC  TGCTAATCTG
1681 GGGAGAGCAT  CTCAGTTCAT  ATATCTGGAG  GGAGATGGCC  ACGGCGTTCA  GCACTCAGAG
1741 ATTCATAACC  AAATGGGAGG  CCTTATTTTC  GAGCCATATG  TGTGA

```

Abb. 15 *m*-RNA-Sequenz „GU385977“ des γ -Terpinensynthase Gens aus *O. vulgare* L. (f02-04) [49]

```

1  ATGGCTACCC  TTAGCATGCA  AGTGTCCATA  CTTAGCAAGG  AAGTGAAAAA  TGTCAACAAC
61 ATTGGCATGA  GAGCATCTAA  ACCAATGGTG  GCGAGGCGCG  TCTCTACCAC  TCGTCTCCGG
121 CCTATTTGCT  CCGCCTCACT  GCAAGTCGAA  GAAGAAACCC  GACGTTCCGG  AAACCTACCAG
181 GCTTCAATTT  GGAACAATGA  TTACGTTCAA  TCTTTCAACA  CAAATCAATA  TAAGGACGAG
241 AAGCACTTGA  AAAAGAAAGA  AGAGCTGATT  GCACAAGTAA  AGATATTGTT  GAACACAAAA
301 ATGGAGGCTG  TTAAACAATT  GGAGTTGATT  GAAGACTTGA  GAAATCTAGG  GTTGACTTAT
361 TATTTTCAAG  ATGAGGTAA  GAAGATTCTT  ACTTCTATAT  ATAATGATCA  CAAATGTTTC
421 AAAAACGAAC  AAGTTGGGGA  TTTGTATTTT  ACTTCTCTTG  GATTCTAGCT  CCTCAGACTG
481 CACGGTTTCG  ATGTCTCAGA  AGAGGTGTTT  GACTTTTTTA  AGAACGAGGA  TGGTAGTGAT
541 TTCAAGGCGA  GCCTTGGTGA  AAATATAAAA  GACGTATTGC  AGCTTTACGA  AGCATCTTTC
601 CTTATAAGGG  AAGGTGAAGT  TATACTGGAG  CAAGCAAGAG  TATTTTCCAC  CAAACATCTT
661 GAAAAGAAAG  TTGATGAGGG  AATTAATGAT  GAAAAATTAT  TAGCATGGAT  TCGCCATTCT
721 TTGGCTCTCC  CTCTTCATTG  GAGGATTCAA  AGGCTAGAGG  CGAGGTGGTT  CTTAGATGCT
781 TACAGGGCGA  GGAAAGACAT  GATTCTCTTT  ATTTTCGAGC  TCGGGAAAAAT  CGACTTCCAT
841 ATCATTCAAG  AAACACAAC  AGAAGAAGTC  CAAGAAGTCT  CAAAGTGGTG  GACTAATTCA
901 AACCTCGCCG  AGAACTCCC  ATTTGTGAGA  GATAGAATTG  TGGAGTGCTA  CTTTGGGCG
961 CTTGGGCTCT  TTGAACCACA  TGAGTATGGT  TATCAGAGGA  AAATGGCTGC  CATTATTATC
1021 ACTTTCGTTA  CGATCATAGA  CGATGTTTAC  GACGTCTACG  GTACACTCGA  CGAACTGCAG
1081 CTATTCACCG  ACGCGATTCT  AAAATGGGAC  TTTCAATCAA  TAAGCACACT  TCCATACTAC
1141 ATGCAAGTTT  GCTATTTGGC  ACTCTACACC  TATGCTTCTG  AACTGGCTTA  TGATATTCTC
1201 AAAGATCAAG  GTTTCAACAG  TATTGCTTAT  CTACAAAGAT  CGTGGCTGAG  TTTGGTGGAA
1261 GGATTTTTC  AAGAGGCAAA  ATGGTACTAC  GCCGGGTACA  CGCCAACCCT  AGCAGAATAC
1321 CTAGAGAACG  CCAAAGTTTC  AATATCATCT  CCTACTATTA  TCTCTCAAGT  TTACTTCACT
1381 CTTCCGAATT  CGACTGAGAG  AACGGTTGTC  GAAAACGTCT  TCGGATACCA  CAACATACTC
1441 TACCTTTCCG  GAATGATTTT  AAGGCTTGCA  GATGATCTTG  GCACTACTCA  GTTTGAGCTG
1501 AAGAGAGGGG  ACGTGCAAAA  GGCAATCCAG  TGTTACATGA  AGGACAACAA  TGCTACAGAG
1561 AAAGAAGGGG  CTGAGCATGT  GAAGTATCTG  TTACGAGAAG  CGTGGAAGGA  GATGAACACG
1621 GCGATGGCGG  ACCCGAGTG  CCCGTTGTCT  GAAGATCTGG  TGGATGCTGC  TGCTAATCTG
1681 GGGAGAGCAT  CTCAGTTCAT  ATATCTGGAA  GGAGATGGCC  ACGGCGTTCA  GCACTCAGAG
1741 ATTCATAACC  AAATGGGAGG  CCTTATTTTC  GAGCCATATG  TGTGA

```

Abb. 16 *m*-RNA-Sequenz „GU385978“ des γ -Terpinensynthase Gens aus *O. vulgare* L. (d06-01) [49]

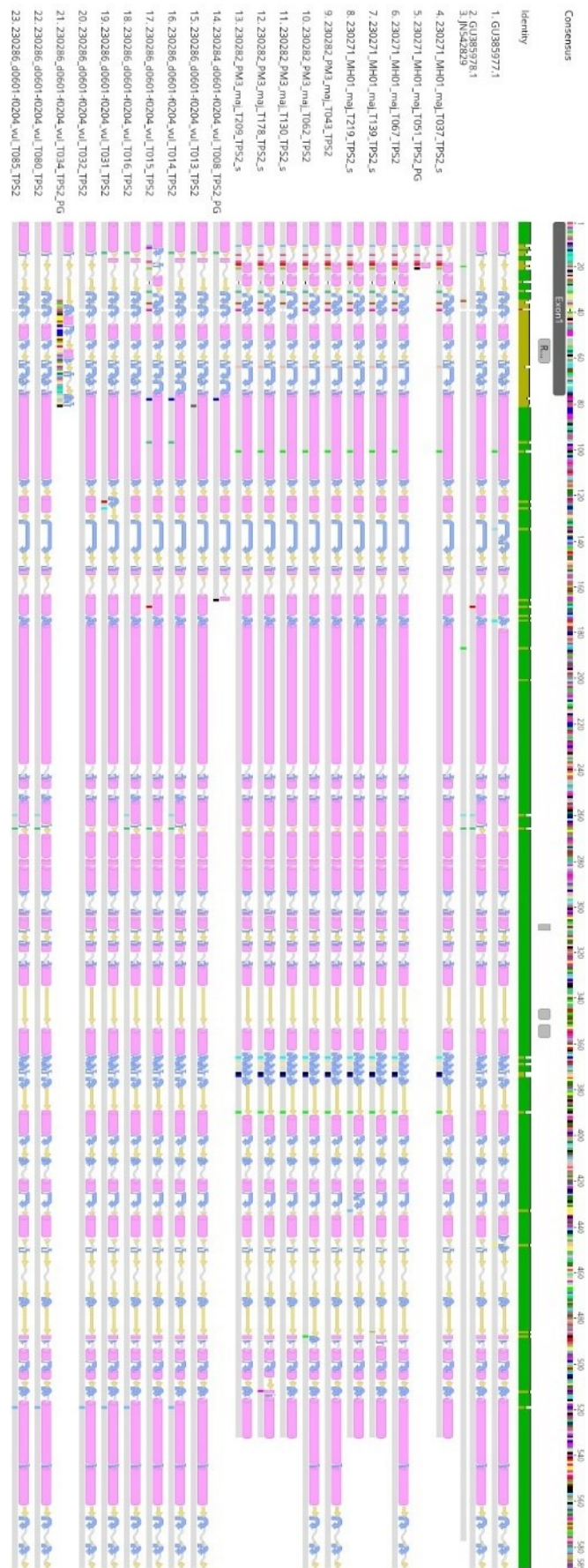


Abb. 17 AS-Alignment der unterschiedlichen Haplotypen inkl. Vorhersage der Sekundärstrukturelemente

Abkürzungsverzeichnis

A – Adenin
Acetyl-CoA – Acetyl-Coenzym A
AS – Aminosäure
BME – β -Mercaptoethanol
bp – Basenpaar(e)
C – Cytosin
CTAB – Cetyltrimethylammoniumbromid
CYP – Cytochrom P450
ddH₂O – doppelt destilliertes Wasser
ddNTP – 2',3'-Didesoxynukleotidtriphosphat
DMAPP – Dimethylallyldiphosphat
DMSO - Dimethylsulfoxid
DNA – Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
E. coli – Escherichia coli
EDTA – Ethylendiamintetraessigsäure (ethylenediaminetetraacetic acid)
EtOH – Ethanol
F – forward
FPP – Farnesylpyrophosphat
G – Guanin
GPP – Geranylpyrophosphat
HF – high fidelity
HS – hot start
Indel – Mutation durch Insertion oder Deletion
IPP – Isopentenylpyrophosphat
kb – 1000 Basenpaare (kilobase)
L. – botanisches Autorenkürzel von Carl von Linné (1707-1778)
LB – lysogeny broth
MEP – Methylerythritolphosphat
MQ-H₂O – Milli-Q®-Wasser – Reinstwasser
NaCl – Natriumchlorid
NH₄Cl - Ammoniumchlorid
PCR – Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)

PVP – Polyvinylpyrrolidin

R – reverse

rpm – Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)

SB = Natriumborat (sodium borate)

SDS – Natriumlaurylsulfat (sodium dodecyl sulfate)

SNP – Einzelnukleotid-Polymorphismus (Single Nucleotide Polymorphism)

T – Thymin

TAE – TRIS-Essigsäure-EDTA (TRIS-Acetate-EDTA)

TE-Puffer – wässrige Lösung aus TRIS und EDTA

TRIS – Trishydroxymethylaminomethan

Literaturverzeichnis

- [1] J. H. Letswaart, A Taxonomic Revision of the Genus *Origanum* (Labiatae), Bd. 4, Dordrecht: Springer, 1980, pp. 1-153.
- [2] T. Dirmenci , T. Yazici, T. Özcan, S. Çelenk und E. Martin, „A new species and an new natural hybrid of *Origanum* L. (Lamiaceae) from the west of Turkey,“ *Turkish Journal of Botany*, Bd. 42, Nr. 1, pp. 73-90, 2018.
- [3] S. E. Kintzios, *Oregano: The genera Origanum and Lippa*, London: Taylor & Francis, 2002.
- [4] B. Lukas und J. Novak, „*Origanum vulgare* L. and *Origanum onites* L. (Oregano),“ in *Medicinal, Aromatic and Stimulant Plants. Handbook of Plant Breeding*, vol 12, Cham, Springer, 2020, pp. 419-433.
- [5] M. Blumenthal, *The Complete German Commission E Monographs: Therapeutic Guide to Herbal Medicines*, Austin, Texas: Churchill Livingstone, 2000.
- [6] J. Bruneton , *Pharmacognosie: Phytochimie, Plantes médicinales*, Paris: Tec & Doc Lavoisier, 2009.
- [7] M. Soković, J. Glamočlija, P. D. Marin, D. Brkić und L. J. L. D. van Griensven, „Antibacterial Effects of the Essential Oils of Commonly Consumed Medicinal Herbs Using an In Vitro Model,“ *Molecules*, Bd. 15, Nr. 11, pp. 7532-7546, 2010.
- [8] M. B. Isman, „Plant essential oils for pest and disease management,“ *Crop protection*, Bd. 19, Nr. 8-10, pp. 603-608, 2000.
- [9] M. Khan, S. T. Khan, M. Khan, A. A. Mousa, A. Mahmood und H. Z. Alkhathlan, „Chemical Diversity in Leaf and Stem Essential Oils of *Origanum vulgare* L. and Their Effects on Microbicidal Activities,“ *AMB Express*, Bd. 9, Nr. 176, 2019.
- [10] S. Chouhan, K. Sharma und S. Guleria, „Antimicrobial Activity of Some Essential Oils-Present Status and Future Perspectives,“ *Medicine*, Bd. 4, Nr. 58, 2017.
- [11] M. Fournomiti, A. Kimbaris, I. Mantzourani, S. Plessas, I. Theodoridou, V. Papaemmanouil, I. Kapsiotis, M. Panopoulou, E. Stavropoulou, E. E. Bezirtzoglou und A. Alexopoulos, „Antimicrobial activity of essential oils of cultivated oregano (*Origanum vulgare*), sage (*Salvia officinalis*), and thyme (*Thymus vulgaris*) against clinical isolates of *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, and *Klebsiella pneumoniae*,“ *Microbial Ecology in Health and Disease*, Bd. 26, 2015.
- [12] M. T. Baratta, H. J. D. Dorman, S. Deans, D. M. Biondi und G. Ruberto , „Chemical Composition, Antimicrobial and Antioxidative Activity of Laurel, Sage, Rosemary, Oregano and Coriander Essential Oils,“ *Journal of Essential Oil Research*, Bd. 10, Nr. 6, pp. 618-627, 1998.
- [13] G. Vahedi, A. R. Khosravi, H. Shokri , Z. Moosavi, N. Delirezh , A. Sharifzadeh , A. Barin , S. Shahrokh und A. Balal , „Fungicidal effect of *Origanum vulgare* essential oil against *Candida glabrata* and its cytotoxicity against macrophages,“ *Journal of HerbMed Pharmacology*, Bd. 5, Nr. 2, pp. 78-84, 2016.

- [14] T. Baj , A. Biernasiuk , R. Wróbel und A. Malm , „Chemical Composition and in Vitro Activity of *Origanum vulgare* L., *Satureja Hortensis* L., *Thymus Serpyllum* L. And *Thymus Vulgaris* L. Essential Oils towards Oral Isolates of *Candida Albicans* and *Candida Glabrata*,” *Open Chemistry*, Bd. 18, pp. 108-118, 2020.
- [15] E. Hać-Szymańczuk, A. Cegiełka , M. Karkos , M. Gniewosz und K. Piwowarek , „Evaluation of Antioxidant and Antimicrobial Activity of Oregano (*Origanum vulgare* L.) Preparations during Storage of Low-Pressure Mechanically Separated Meat (BAADER Meat) from Chickens,” *Food Science and Biotechnology*, Bd. 28, pp. 449-457, 2018.
- [16] L. P. Stanojević , J. S. Stanojević , D. J. Cvetković und D. P. Ilić , „Antioxidant activity of oregano essential oil (*Origanum vulgare* L.),” *Biologica Nyssana*, Bd. 7, pp. 131-139, 2016.
- [17] F. V. Silva , A. G. Guimarães , E. R. S. Silva , B. P. Sousa-Neto, F. D. F. Machado , L. J. Quintans-Júnior, D. D. R. Arcanjo , F. A. Oliveira und R. C. M. Oliveira , „Anti-Inflammatory and Anti-Ulcer Activities of Carvacrol, a Monoterpene Present in the Essential Oil of Oregano,” *Journal of Medicinal Food*, Bd. 15, pp. 984-991, 2012.
- [18] N. Laothaweerungsawat , W. Neimkhum , S. Anuchapreeda , J. Sirithunyalug und W. Chaiyana , „Transdermal Delivery Enhancement of Carvacrol from *Origanum vulgare* L. Essential Oil by Microemulsion,” *International Journal of Pharmaceutics*, Bd. 579, p. 119052, 2020.
- [19] H. S. Elshafie , M. F. Armentano , M. Carmosino , S. A. Bufo , V. De Feo und I. Camele , „Cytotoxic Activity of *Origanum vulgare* L. on Hepatocellular Carcinoma Cell Line HepG2 and Evaluation of Its Biological Activity,” *Molecules*, Bd. 22, p. 1435, 2017.
- [20] K. R. Begnini , F. Nedel , R. G. Lund , P. H. D. A. Carvalho , M. R. A. Rodrigues , F. T. A. Beira und F. A. B. Del-Pino, „Composition and Antiproliferative Effect of Essential Oil of *Origanum vulgare* against Tumor Cell Lines,” *Journal of Medicinal Food*, Bd. 17, 2014.
- [21] S. R. Balusamy , H. Perumalsamy , M. A. Huq und B. Balasubramanian , „Anti-Proliferative Activity of *Origanum vulgare* Inhibited Lipogenesis and Induced Mitochondrial Mediated Apoptosis in Human Stomach Cancer Cell Lines,” *Biomedicine & Pharmacotherapy*, Bd. 108, pp. 1835-1844, 2018.
- [22] E. Zuhail und Y. Erdal, „Can *Origanum* be a hope for cancer treatment? A review on the potential of *Origanum* species in preventing and treating cancers,” *International Journal of Environmental Research and Public Health*, Bd. 33, Nr. 9, pp. 894-910, 2023.
- [23] E. Kakouri, D. Daferera, C. Kanakis, P.-K. Revelou, E. H. Kaparakou, S. Dervisoglou, D. Perdakis und P. A. Tarantilis, „*Origanum majorana* Essential Oil—A Review of Its Chemical Profile and Pesticide Activity,” *Life (Basel)*, Bd. 12, Nr. 12, p. 1982, 2022.
- [24] E. Arranz , L. Jaime, M. C. López de las Hazas, G. Reglero und S. Santoyo, „Supercritical fluid extraction as an alternative process to obtain essential oils with anti-inflammatory properties from marjoram and sweet basil,” *Industrial Crops and Products*, Bd. 67, pp. 121-129, 2015.
- [25] F. Bina und R. Rahimi, „Sweet Marjoram - A Review of Ethnopharmacology, Phytochemistry, and Biological Activities,” *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*, Bd. 22, Nr. 1, pp. 175-185, 2017.

- [26] S. G. Deans und K. P. Svoboda , „The antimicrobial properties of marjoram (*Origanum majorana* L.) volatile oil,“ *Flavour and Fragrance Journal*, Bd. 5, pp. 187-190, 1990.
- [27] Y. Al Dhaheri, S. Attoub, K. Arafat, S. AbuQamar, J. Viallet, A. Saleh, H. Al Agha, A. Eid und R. Iratni, „Anti-Metastatic and Anti-Tumor Growth Effects of *Origanum majorana* on Highly Metastatic Human Breast Cancer Cells: Inhibition of NFκB Signaling and Reduction of Nitric Oxide Production,“ *PLoS One*, Bd. 8, Nr. 7, 2013.
- [28] M. Charai, M. Mosaddak und M. Faïd, „Chemical Composition and Antimicrobial Activities of Two Aromatic Plants: *Origanum majorana* L. and *O. compactum* Benth.,“ *Journal of Essential Oil Research*, Bd. 8, Nr. 6, pp. 657-664, 1996.
- [29] A. T. H. Mossa und G. A. M. Nawwar, „Free radical scavenging and antiacetylcholinesterase activities of *Origanum majorana* L. essential oil,“ *Human & Experimental Toxicology*, Bd. 30, Nr. 10, pp. 1501-1513, 2011.
- [30] R. Erenler, O. Sen, H. Aksit, I. Demirtas , A. S. Yaglioglu, M. Elmasas und İ. Telci, „Isolation and identification of chemical constituents from *Origanum majorana* and investigation of antiproliferative and antioxidant activities,“ *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Bd. 96, Nr. 3, pp. 822-836, 2016.
- [31] F. Alakbarov, „Aromatic herbal baths of the ancients,“ *HerbalGram*, Bd. 57, pp. 40-49, 2003.
- [32] A. Bouyahya, I. Chamkhi, T. Benali, F.-E. Guaouguaou, A. Balahbib, N. El Omari , D. Taha, O. Belmehdi, Z. Ghokhan und N. El Menyiy , „Traditional use, phytochemistry, toxicology, and pharmacology of *Origanum majorana* L,“ *Journal of Ethnopharmacology*, Bd. 256, p. 113318, 2021.
- [33] B. Lukas , „*Origanum vulgare* d0601-f0204,“ Veterinärmedizinische Universität Wien, 2024.
- [34] F. Starr und K. Starr, „commons.wikipedia.com,“ [Online]. Available: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/f/fc/Starr_070906-8859_Origanum_majorana.jpg. [Zugriff am 21.02.2024].
- [35] J. Chappell, "The Biochemistry and Molecular Biology of Isoprenoid Metabolism," *Plant Physiology*, no. 107, pp. 1-6, 1995.
- [36] E. Oldfield und F.-Y. Lin, „Terpene Biosynthesis: Modularity Rules,“ *Angewandte Chemie International Edition English*, pp. 1124-1137, 27 Januar 2012.
- [37] D. Tholl, „Biosynthesis and Biological Functions of Terpenoids in Plants,“ in *Biotechnology of Isoprenoids*, Springer International Publishing Switzerland, 2015, pp. 63-106.
- [38] G.-I. Arimura, K. Matsui und J. Takabayashi, „Chemical and molecular ecology of herbivore-induced plant volatiles: proximate factors and their ultimate functions,“ *Plant and Cell Physiology*, Bd. 50, Nr. 5, pp. 911-923, 2009.
- [39] F. Loreto und V. Velikova, „Isoprene Produced by Leaves Protects the Photosynthetic Apparatus against Ozone Damage, Quenches Ozone Products, and Reduces Lipid Peroxidation of Cellular Membranes,“ *Plant Physiology*, Bd. 127, Nr. 4, pp. 1781-1787, 2001.

- [40] M. Rosenkranz, Y. Chen , P. Zhu und A. C. Vlot, „Volatile terpenes - mediators of plant-to-plant communication,“ *the plant journal*, Bd. 108, Nr. 3, pp. 617-631, 2021.
- [41] M. Rohmer, „The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants,“ *Natural Product Reports*, Nr. 5, pp. 565-574, 1999.
- [42] A. A. Newman, *Chemistry of Terpenes and Terpenoides*, London and New York: Academic Press London and New York, 1972.
- [43] P. Nuhn, *Naturstoffchemie*, Stuttgart: S.Hirzel Verlag, 2006.
- [44] J. Connolly and R. Hill, *Dictionary of Terpenoids Vol 1 Mono- and Sesquiterpenoids*, Cambridge: Chapman & Hall, 1991.
- [45] N. Arnold, B. Bellomaria, G. Valentini und H. J. Arnold, „Comparative Study of the Essential Oils from Three Species of *Origanum* Growing Wild in the Eastern Mediterranean Region,“ *Journal of Essential Oil Research*, Bd. 5, Nr. 1, pp. 71-77, 1993.
- [46] B. Lukas, C. Schmiderer und J. Novak, „Essential oil diversity of European *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae),“ *Phytochemistry*, Nr. 119, pp. 32-40, 2015.
- [47] A. J. Poulose und R. Croteau, „Biosynthesis of aromatic monoterpenes: Conversion of γ -terpinene to p-cymene and thymol in *Thymus vulgaris* L,“ *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Bd. 187, Nr. 2, pp. 307-314, 1978.
- [48] S. T. Krause, P. Liao , C. Crocoll, B. Boachon, C. Förster, F. E. Leidecker, N. Wiese, D. Zhao, J. C. Wood, C. R. Buell, J. Gershenzon, N. Dudareva und J. Degenhardt, „The biosynthesis of thymol, carvacrol, and thymohydroquinone in Lamiaceae proceeds via cytochrome P450s and a short-chain dehydrogenase,“ *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Bd. 118, Nr. 52, p. e2110092118, 2021.
- [49] C. Crocoll, J. Asbach, J. Novak, J. Gershenzon und J. Degenhardt, „Terpene synthases of oregano (*Origanum vulgare* L.) and their roles in the pathway and regulation of terpene biosynthesis,“ *Plant Molecular Biology*, Bd. 73, pp. 587-603, 2010.
- [50] B. Lukas, R. Samuel und J. Novak, „Oregano or marjoram? The enzyme γ -terpinene synthase affects chemotype formation in the genus *Origanum*,“ *Israel Journal of Plant Science*, Bd. 58, pp. 211-220, 2010.
- [51] A. Kiss, *Charakterisierung des γ -Terpinensynthase Gens in *Origanum majorana* L.*, Wien, 2023.
- [52] F. Lottspeich und J. W. Engels, *Bioanalytik*, Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2012.
- [53] T. Demeke und G. R. Jenkins, „Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits,“ *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, Bd. 396, pp. 1977-1990, 2010.
- [54] C. Schmiderer, B. Lukas und J. Novak, „Effect of different DNA extraction methods and DNA dilutions on the amplification success in the PCR of different medicinal and aromatic plants,“ *Journal of Medicinal and Spice Plants*, Bd. 18, Nr. 2, pp. 65-72, 2013.

- [55] J. J. Doyle und J. L. Doyle, „A Rapid Total DNA Preparation Procedure for Fresh Plant Tissue,“ *Focus (Madison)*, Bd. 12, pp. 13-15, 1990.
- [56] A. J. Walhout, G. F. Temple, M. A. Brasch, J. L. Hartley, M. A. Lorson, S. van den Heuvel und M. Vidal, „GATEWAY recombinational cloning: Application to the cloning of large numbers of open reading frames or ORFeomes,“ *Methods in Enzymology*, Bd. 328, pp. 575-592, 2000.
- [57] G. Marsischky und J. LaBaer, „Many Paths to Many Clones: A Comparative Look at High-Throughput Cloning Methods,“ *Genome Research*, Bd. 14, pp. 2020-2028, 2004.
- [58] G. Bertani, „Lysogeny at Mid-Twentieth Century: P1, P2, and Other Experimental Systems,“ *Journal of Bacteriology*, Bd. 186, Nr. 3, pp. 595-600, 2004.
- [59] G. Bertani, „Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*,“ *Journal of Bacteriology*, Bd. 63, Nr. 2, pp. 293-300, 1951.
- [60] J. Park, A. L. Throop und J. LaBaer, „Site-Specific Recombinational Cloning Using Gateway and In-Fusion Cloning Schemes,“ *Current Protocols in Molecular Biology*, Bd. 110, pp. 3.20.1-3.20.23, 2015.
- [61] K. Tamura, G. Stecher und S. Kumar, „MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11,“ *Molecular Biology and Evolution*, Bd. 38, pp. 3022-3027, 2021.
- [62] R Core Team, „R: A Language and Environment for Statistical Computing,“ R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>, Wien, 2024.
- [63] RStudio Team, „RStudio: Integrated Development for R,“ RStudio <http://www.rstudio.com/>, Boston, 2020.
- [64] E. Paradis, „pegas: an R package for population genetics with an integrated-modular approach,“ *Bioinformatics*, Bd. 26, Nr. 3, pp. 419-420, 2010.
- [65] J. J. Almagro Armenteros, M. Salvatore, O. Emanuelsson, O. Winther, G. von Heijne, A. Elofsson und H. Nielsen, „Detecting sequence signals in targeting peptides using deep learning,“ *Life Science Alliance*, Bd. 2, Nr. 5, p. e201900429, 2019.
- [66] K. Tamura, „Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G + C-content bias,“ *Molecular Biology and Evolution*, Bd. 9, pp. 678-687, 1992.
- [67] J. Bohlmann, G. Meyer-Gauen und R. Croteau, „Plant terpenoid synthases: Molecular biology and phylogenetic analysis,“ *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, Bd. 95, Nr. 8, pp. 4126-4133, 1998.
- [68] C. M. Starks, K. W. Back, J. Chappell und J. P. Noel, „Structural Basis for Cyclic Terpene Biosynthesis by Tobacco 5-Epi-Aristolochene Synthase,“ *Science*, Bd. 277, Nr. 5333, pp. 1815-1820, 1997.
- [69] B. Tohidi, M. Rahimmalek, A. Arzani und H. Trindade, „Sequencing and variation of terpene synthase gene (TPS2) as the major gene in biosynthesis of thymol in different *Thymus* species,“ *Phytochemistry*, Nr. 169, p. 112126, 2020.

- [70] C. A. Eder, *Genvarianten der γ -Terpinensynthase in der Gattung Origanum*, Wien, 2024.
- [71] D. Zalabák und Y. Ikeda, „First Come, First Served: Sui Generis Features of the First Intron,“ *Plants (Basel)*, Bd. 9, Nr. 7, p. 911, 2020.
- [72] I. B. Rogozin , L. Carmel, M. Csuros und E. V. Koonin, „Origin and evolution of spliceosomal introns,“ *Biology Direct*, Bd. 1, Nr. 11, 2012.
- [73] L. Fedorova und A. Fedorov, „Introns in gene evolution,“ *Genetica*, Bd. 118, Nr. 2-3, pp. 123-131, 2003.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	<i>Origanum vulgare</i> [33]	5
Abb. 2	<i>Origanum majorana</i> [34]	5
Abb. 3	Biologische Funktion von flüchtigen (blaue Pfeile) und nicht-flüchtigen (rote Pfeile) Terpenoiden in den Wechselwirkungen der Pflanzen mit ihrer Umwelt [37]	6
Abb. 4	Cymyl-Komponenten γ -Terpinen, Carvacrol und Thymol	7
Abb. 5	Sabinyll-Komponenten Sabinen, <i>cis</i> -Sabinenhydrat und <i>trans</i> -Sabinenhydrat	7
Abb. 6	Biosynthesewege wichtiger Monoterpene in <i>Origanum</i> , ausgehend von Geranylpyrophosphat GPP (1); Cymyl-Komponenten: (2)... γ -Terpinen, (3)... <i>p</i> -Cymol, (4)...Carvacrol, (5)...Thymol; Sabinyll-Komponenten: (6)...Sabinen, (7)... <i>cis</i> -Sabinenhydrat, (8)... <i>trans</i> -Sabinenhydrat und (9)...Linalool. [50]	8
Abb. 7	Gelbild der vervielfältigten DNA auf SB-Gel (links) und TAE-Gel (rechts) 23.05.2003	12
Abb. 8	Transformation mittels BP-Klonase [57] ORF...zur Replizierung vorgesehene DNA, ori...Replikationsursprung, Kan ^r ...Kanamycin-resistenz-gen, ccdB... <i>E. coli</i> -Todesgen	15
Abb. 9	Übersicht über das DNA-Alignment. Inkludiert sind drei TPS2-Gene aus der Literatur (<i>O. syriacum</i> [50], <i>O. vulgare</i> [49]) und die DNA-Sequenzen der Klone, die im Zuge dieser Masterarbeit ermittelt wurden. Exon-Intron Grenzen sind in der Konsensus-Sequenz dargestellt, die schwarzen Markierungen im Alignment kennzeichnen Unterschiede zur Konsensus-Sequenz.	19
Abb. 10	NJ-Stammbaum basierend auf der genomischen DNA aller klonierten TPS2-Sequenzen inkl. der DNA-Sequenz „JN542829“ aus der Literatur [50].	24
Abb. 11	Haplotypen-Netzwerk basierend auf der genomischen DNA aller klonierten Sequenzen inkl. der DNA-Sequenz „JN542829“ (Haplotyp I) aus der Literatur [50]. Die Häufigkeit der Haplotypen I – XXII ist durch die Größe des jeweiligen Kreises gekennzeichnet.	25
Abb. 12	Übersicht über das AS-Alignment. Inkludiert sind drei der TPS2-Gene aus der Literatur (<i>O. syriacum</i> , <i>O. vulgare</i> [50] [49]) und die 68 Sequenzen, die im Zuge dieser Masterarbeit ermittelt wurden. Die grauen Markierungen an der Konsensus-Sequenz kennzeichnen die Position von in Terpinensynthesen konservierten AS-Motiven, die roten Balken an der dritten Sequenz kennzeichnen den Übergang von einem Exon ins nächste. Die farbigen Markierungen im Alignment kennzeichnen Unterschiede zur Konsensus-Sequenz.	26
Abb. 13	Vorhersage der Sekundärstrukturelemente (Wahrscheinlichkeit 65%) von Exon 1 ausgewählter Sequenzen (rosa Balken = α -Helix, gelber Pfeil = β -Faltblatt, blaue Pfeile = β -Schleife, graue Welle = Coil)	29
Abb. 14	DNA-Sequenz „JN542829“ des γ -Terpinensynthase Gens aus <i>O. syriacum</i> L. [50]	37
Abb. 15	m-RNA-Sequenz „GU385977“ des γ -Terpinensynthase Gens aus <i>O. vulgare</i> L. (f02-04) [49]	38
Abb. 16	m-RNA-Sequenz „GU385978“ des γ -Terpinensynthase Gens aus <i>O. vulgare</i> L. (d06-01) [49]	39
Abb. 17	AS-Alignment der unterschiedlichen Haplotypen inkl. Vorhersage der Sekundärstrukturelemente	40

Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber der Bildrechte ausfindig zu machen und ihre Zustimmung zur Verwendung der Bilder in dieser Arbeit eingeholt. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werden, ersuche ich um Meldung bei mir.