

Technische Universität München

Lehrstuhl für Genetik

Übertragung des DIBOA-Biosynthese-Weges von Mais
in *Arabidopsis thaliana*

Stefan Lenk

Vollständiger Ausdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: apl. Prof. Dr. R. A. Torres Ruiz

Prüfer der Dissertation:

- 1 Univ.-Prof. Dr. A. Gierl
- 2 Univ.-Prof. Dr. R. Hückelhoven

Die Dissertation wurde am 27.01.2015 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 10.03.2015 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Abkürzungsverzeichnis	3
1 Einleitung	5
1.1 Chemiefabrik Pflanze	5
1.2 Die Pflanze bildet Stoffe zur Abwehr gegen ihre Fraßfeinde und Pathogene	5
1.3 Benzoxazinoide sind universal wirksam	6
1.4 DIBOA-Biosynthese in Mais	7
1.5 Evolutionäre Entwicklung des DIBOA-Biosynthesewegs	10
1.6 Die Herausforderungen des Transfers ganzer Biosynthesewege	10
1.7 Strategie für den Transfer der DIBOA-Biosynthese	13
1.8 Ziel der Arbeit	15
2 Materialien und Methoden	16
2.1 Materialien	16
2.1.1 Chemikalien und Reagenzien	16
2.1.2 Plasmide	17
2.1.3 Bakterienstämme	17
2.1.4 Pflanzenlinien	18
2.1.5 Oligonukleotide	18
2.1.6 Antikörper	19
2.1.7 Antibiotika	20
2.2 Methoden	21
2.2.1 Pflanzenanzucht von <i>A. thaliana</i> -Pflanzen	21
2.2.2 Induktion der Indolinonsynthese in Pflanzenlinien mit alkoholinduzierbarem Promotor ..	21
2.2.3 Molekularbiologische Methoden	21
2.2.4 Proteinbiochemische Methoden	26
2.2.5 Naturstoffextraktion	28
2.2.6 Methoden zur Analyse von Stoffgemischen	32
2.2.7 Methoden zur Untersuchung der Auswirkung von biotischem Stress auf <i>A. thaliana</i>	36
3 Ergebnisse	37
3.1 Transkription der einzelnen <i>Bx</i> -Gene unter der Kontrolle verschiedener Promotoren	37
3.2 Charakteristika der einzelnen <i>Bx</i> -Gen-exprimierenden Pflanzenlinien	38
3.3 Charakterisierung von <i>Bx1</i> - und <i>Bx2</i> -exprimierenden Pflanzen	43

Inhaltsverzeichnis

3.3.1 Bildung von Indol und Indolinon in transgenen Pflanzen	43
3.3.2 Morphologie <i>Bx1</i> - und <i>Bx2</i> - exprimierender Pflanzen	44
3.3.3 Auswirkung der <i>Bx</i> -Genexpression auf den Metabolismus	48
3.3.4 Analyse abwehrrelevanter Stoffe.....	52
3.3.5 Einfluss der <i>Bx</i> -Genexpression auf die Widerstandsfähigkeit von <i>Arabidopsis</i> gegen biotische Faktoren.....	55
4 Diskussion	58
4.1 BX5 konnte nicht funktional exprimiert werden.....	58
4.2 Einfluss der Expression von <i>Bx1</i> und <i>Bx2</i> auf <i>Arabidopsis</i>	59
4.2.1 Auswirkung der Expression von <i>Bx2</i> in <i>A. thaliana</i>	59
4.2.2 Die gemeinsame Expression von <i>Bx1</i> und <i>Bx2</i> führt zur Indolinonsynthese	60
4.2.3 Auswirkungen der Indolinonsynthese auf das Gesamtmetabolom und die Produktion abwehrrelevanter Metabolite von <i>A. thaliana</i>	61
4.3 Auxin-Maxima sind in <i>35S::Bx1</i> x <i>35S::Bx2</i> -Pflanzen unverändert.....	62
4.4 Lehren aus der Übertragung der HBOA-Synthese.....	62
5 Anhang.....	66
6 Zusammenfassung.....	67
7 Summary.....	69
8 Literatur	71
Danksagung	80
Lebenslauf	81

Abkürzungsverzeichnis

Neben SI-Einheiten, Elementsymbolen und dem Ein- oder Dreibuchstabencode für Aminosäuren wurden folgende Abkürzungen verwendet:

<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
BSA	Bovines Serum Albumin
<i>B. cinerea</i>	<i>Botrytis cinerea</i>
<i>C. orientali</i>	<i>Consolida orientalis</i>
DIBOA	2,4-Dihydroxy-2H-1,4-benzoxazin-3-on
DIMBOA	2,4-Dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-on
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>
<i>E. cruciferarum</i>	<i>Erysiphe cruciferarum</i>
FAME	<i>fatty acid methyl ester</i>
H ₂ O _{bidest}	Wasser, doppeldestilliert
GABA	4-Aminobutyrat
GC/MS	<i>gas chromatography mass spectrometry</i>
GC-TOF-MS	<i>gas chromatographie-time of flight-mass spectrometry</i>
GDIBOA	2,4-Dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-on-Glucosid
GFP	grünfluoreszierendes Protein
Glc	Glucosid
HBOA	2-Hydroxy-2H-1,4-benzoxazin-3-on
HPLC	Hochdurchsatzflüssigchromatographie
Hyg	Hygromycin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IGP	Indol-3-Glycerin-Phosphat
IGL	Indol-Glycerol-Lyase
K _m	Michaelis-Menten-Konstante
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
LC-MS	<i>liquid chromatographie mass spectrometry</i>
<i>L. galeobdolon</i>	<i>Lamium galeobdolon</i>
<i>L. corniculatus</i>	<i>Lotus corniculatus</i>
MCS	multiple Klonierungsstelle
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure

Abkürzungsverzeichnis

MS	Murashige-Skoog
MSTFA	Methyl-N-Trimethylsilyltrifluoracetamid
MTX	Methotrexat
NADPH	Nicotinamidadeninukleotidphosphat
NIST	National Institute of Standards and Technology, USA)
RF	offener Leserahmen
PCA	Hauptkomponentenanalyse
PCR	Mehrfachkettenreaktion (engl. <i>poly chain reaction</i>)
qPCR	quantitative Mehrfachkettenreaktion (engl. quantitativ <i>poly chain reaction</i>)
PEG	Polyethylenglycol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPT	Phosphinothricin
QC	Qualitätskontrolle
SDS	Natriumdodecylsulfat
<i>Ssp</i>	<i>species</i>
<i>S. littoralis</i>	<i>Spodoptera littoralis</i>
TnI	Tage nach Infektion
TGS	Transkriptionelle Gen Stilllegung
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSAT/TSB	Tryptophan-Synthase-Untereinheit A beziehungsweise B
TST	TRIS-Salz-Tween
<i>T. aestivum</i>	<i>Triticum aestivum</i>
T-DNA	Transfer-DNA
ü/N	über Nacht
UDP	Uracildiphosphat
YEP	Hefe-Pepton
<i>Z. mays</i>	<i>Zea mays</i>
<i>Z. filipendulae</i>	<i>Zygaena filipendulae</i>

1 Einleitung

1.1 Chemiefabrik Pflanze

Aufgrund ihrer sessilen Lebensweise sind Pflanzen nicht nur gezwungen mit den Ressourcen auszukommen, die in ihrer unmittelbaren Umgebung zur Verfügung stehen, sie müssen sich auch intensiv mit den vorherrschenden abiotischen Bedingungen und koexistierenden Lebewesen auseinandersetzen. Um das zu bewerkstelligen, haben Pflanzen die Fähigkeit entwickelt lebenswichtige Stoffe zu synthetisieren. Dazu zählen auf der einen Seite Metabolite wie zum Beispiel Glucose, Fettsäuren und Aminosäuren, die von nahezu allen Pflanzen gebildet werden, sogenannte primäre Stoffwechselprodukte. Auf der anderen Seite bilden Pflanzen Stoffe, die für das Leben im Ökosystem von großer Bedeutung sind. Diese so genannten sekundären Pflanzeninhaltsstoffe werden von Stoffen des primären Stoffwechsels durch Modifikation abgezweigt und sind für die Interaktionen zwischen der biotischen und abiotischen Umwelt der Pflanzen wichtig. T. Hartmann hat 2007 die Welt der Sekundärmetabolite zusammengefasst. Es zeigte sich, dass die mehr als 200.000 sekundären Metabolite aus dem Kohlenstoff-, Stickstoff- und dem Fettsäurestoffwechsel abgeleitet werden und dass sie nahezu allen bekannten Stoffklassen angehören.

Zusammen mit der flexiblen Synthese bestimmter meist artspezifischer Metabolite sorgt erst deren große Diversität dafür, dass sich Pflanzen an ihre Umgebung anpassen können. Dabei sind bestimmte Pflanzenfamilien oder einzelne Spezies in der Lage, ganz spezifische Metabolite zu synthetisieren. Sie dienen unter anderen der Aufrechterhaltung von Symbiosen, der Reaktion auf abiotischen Stress (zum Beispiel Flavonoide), dem Aroma von Früchten, aber auch der Abwehr von Fraßfeinden oder Parasiten (zum Beispiel Benzoxazinone, cyanogene Glycoside oder Glucosinolate).

1.2 Die Pflanze bildet Stoffe zur Abwehr gegen ihre Fraßfeinde und Pathogene

Pflanzen haben im Laufe der Evolution verschiedenste Abwehrmechanismen entwickelt. Diese können konstitutiv ausgebildet oder bei Befall induziert werden. Der Befall wird in erster Linie durch mechanische Barrieren verhindert. So bilden Dornen, Stacheln, Trichome, die Kutikula und nicht zuletzt die pflanzliche Zellwand ein komplexes Bollwerk gegen Fraßfeinde und Parasiten. Hinzu kommen Verholzung und Verkieselung von Zellen, die es Feinden fast unmöglich macht, in die Pflanze einzudringen. Gelingt dies dennoch, müssen sich Herbivore auf ein Arsenal an chemischen Kampfstoffen einstellen (zusammengefasst durch Schaller, 2002).

1 Einleitung

Hierbei wird zwischen zwei Funktionstypen unterschieden. Auf der einen Seite gibt es Abwehrsubstanzen wie Camalexin, Terpene und Phenylpropane (Rauhut und Glawischnig 2009; Ebel, 1986). Die Synthese dieser sogenannten Phytoalexine wird durch die Anwesenheit von Feinden induziert. Auf der anderen Seite können Pflanzen Stoffe synthetisieren und lagern, die durch Zelldesintegration aktiviert werden und toxisch wirken (Vanetten *et al.*, 1994). Diese Abwehrstoffe sind chemisch reaktiv und nicht nur für Feinde, sondern auch für den Produzenten selbst toxisch. Deswegen werden unter anderem Gerbstoffe oder Alkaloide in ihrer biologisch aktiven Form in spezialisierten Zellkompartimenten beziehungsweise der Zellwand gespeichert. Andere Phytoanticipine, wie cyanogene Glycoside, Benzoxazinoide oder Glucosinolate, werden durch Glycosyltransferasen glycosiliert. Dadurch erfährt das aktive Molekül eine Stabilisierung, die Hydrophobizität wird erniedrigt und das Molekül kann somit in hohen Konzentrationen vakuolar gelagert werden (Jones und Vogt, 2001). Zur erneuten Aktivierung der gelagerten Glycoside bildet die Pflanze β -Glucosidasen. In Pflanzen mit intaktem Gewebe akkumulieren die Glucosidasen getrennt von ihrem Substrat. Erst mit Zerstörung der Zelle bei Befall kommt es zur Aufhebung der Kompartimentierung und der Aktivierung der Phytoanticipine. Der Grad der Freisetzung der Abwehrstoffe hängt vom Zerstörungsgrad des Gewebes ab (Osborn, 1999).

Während Glucosinolate zum Beispiel *A. thaliana* vor möglichen Feinden schützen (Halkier und Gershenzon, 2006), sind die vorherrschenden Abwehrverbindungen in Maiskeimlingen Benzoxazinoide.

1.3 Benzoxazinoide sind universal wirksam

Viele Vertreter der Gräser (*Poaceae*) haben die Eigenschaft, Benzoxazinoide aus Indol zu synthetisieren (Sicker *et al.*, 2000). Hierbei dominieren zwei verschiedene Benzoxazinoide als Endprodukt der Synthese in den einzelnen Spezies. So bildet zum Beispiel Roggen (*Secale cereale*) in den oberirdischen Pflanzenteilen 2,4-Dihydroxy-2H-1,4-benzoxazin-3-on (DIBOA) während Mais (*Zea mays*) und Weizenpflanzen (*Triticum aestivum*) hauptsächlich 2,4-Dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-on (DIMBOA) akkumulieren (Frey *et al.*, 2009). Beide Stoffe besitzen ein breites Wirkspektrum. Sie reagieren mit nucleophilen Aminosäureresten von Proteinen oder zweiwertigen Metallionen und inhibieren so deren Funktion (Pérez und Niemeyer, 1989). Gezeigt wurde dies zum Beispiel für die Enzyme Papain (Pérez und Niemeyer, 1989), α -Chymotrypsin (Cuevas *et al.*, 1990), Cholinesterase (Cuevas und Niemeyer, 1993) und die membranständigen H^+ -ATPasen (Friebe *et al.*, 1997). Des Weiteren zeigt DIMBOA ein inhibitorisches Potential auf Phosphorylierungsreaktionen und die Elektronentransportkette (Niemeyer *et al.*, 1986).

1 Einleitung

Dadurch erhöht die Synthese von Benzoxazinoiden die Widerstandsfähigkeit der Pflanzen gegen Pilze, Bakterien und Insekten. Beispielhaft hierfür ist eine verbesserte Resistenz gegen bakterielle Erkrankungen wie die Nässfäule, ausgelöst durch *Erwina* spp., oder Pilzkrankungen, ausgelöst durch *Helminthosporium turcicum* (Blattfleckenkrankheit) beziehungsweise *Diplodia maydis* (Stängelfäule). Beispiele durch Benzoxazinoid negativ beeinflusste Insekten sind verschiedene Blattläuse (*Metopolophium dirhodum*, *Sitobion avenae*), Motten (*Spodoptera littoralis*) oder Vertreter des europäischen Maiszünslers (*Ostrinia nubilalis*) (zusammengefasst durch Glauser *et al.*, 2011 und Niemeyer, 2009).

Zusätzlich reduzieren Benzoxazinoide die Wirkung von Aluminium und Herbiziden (Porschenrieder *et al.*, 2005; Hashimoto und Shudo, 1996; Hamilton, 1964). Speziell DIBOA zeigt einen signifikant negativen Effekt auf das Wurzel- beziehungsweise Sprosswachstum und die Keimung umgebender Pflanzen (Barnes und Putnam, 1987; Burgos *et al.*, 2004). Von Rad konnte 2001 nachweisen, dass wildtypische *A. thaliana*-Keimlinge ab einer Konzentration von 0,5 mM DIMBOA in ihrem Wachstum sichtlich gehemmt wurden. Monokotyle Keimlinge scheinen resistenter gegenüber DIMBOA zu sein. Eine Inkubation mit 1-2 mM hemmt das Keimlingswachstum, während die Inkubation mit 5 mM DIMBOA nach 5 Tagen lethal ist (Hashimoto und Shudo, 1996; Sahi *et al.*, 1995; Schulz *et al.*, 2006). Diese hohen Wirkkonzentrationen bedingen eine hohe DIBOA- oder DIMBOA-Konzentration in der Pflanze, zumal beide Stoffe sehr instabil sind und spontan in die Hauptabbauprodukte Benzoxazolin-2(3H)-on (BOA) beziehungsweise 6-Methoxy-Benzoxazolin-2(3H)-on zerfallen. Hierbei beläuft sich die Halbwertszeit bei maistypischem pH auf 24 Stunden. Aus diesem Grund akkumulieren Maiskeimlinge bis zu 19 mM DIMBOA. In einem der wenigen dikotylen Vertreter der Benzoxazinoidproduzenten *Consolida orientalis* beläuft sich dieser Wert sogar auf bis zu 36 mM DIBOA (Schullehner *et al.*, 2008).

1.4 DIBOA-Biosynthese in Mais

Die Benzoxazinoidbiosynthese in Mais konnte durch Frey *et al.* 1997 aufgeklärt werden (Abbildung 1.1). Die Biosynthese verläuft bis zum Intermediat Indol-Glycerin-3-Phosphat (IGP) parallel zur Tryptophanbiosynthese. Für dessen Synthese wird Chorismat über den Shikimatweg zu Anthranilat umgesetzt, aus dem nach drei weiteren enzymatischen Reaktionen IGP entsteht. Zur Bildung von Indol kommt es durch die Aktivität sogenannter IGP-Lyasen. Zu dieser Enzymkategorie gehören die α -Untereinheit der Tryptophansynthase (TSA) und das abzweigende Enzym der Benzoxazinoidsynthese BX1, die von paralogenen Genen codiert werden (Radwanski und Last, 1995; Frey *et al.*, 1997). Beide besitzen ein N-terminales Transitpeptid für die Lokalisation im plastidären Stroma, unterscheiden sich jedoch in der Interaktion mit anderen Enzymen:

1 Einleitung

Die Synthese von Tryptophan wird durch ein Tetramer katalysiert, bestehend aus α - und β -Untereinheit (TSA und TSB) der Tryptophansynthase. Das Indol, welches durch die α -Untereinheit freigesetzt wird, gelangt durch einen Tunnel zur β -Untereinheit, die Indol und Serin zu Tryptophan umsetzt. Beide Untereinheiten können zwar singulär aktiv sein, entfalten jedoch nur im Komplex die volle Aktivität. Dabei führen allosterische Interaktionen und Konformationsänderungen dazu, dass kein Indol aus der Tryptophansynthase entweichen kann (Dunn *et al.*, 1990; Kriechbaumer *et al.*, 2008; Peracchi *et al.*, 1995, 1996; Weischet und Kirschner, 1976).

Die IGP-Lyase BX1 hingegen ist als Monomer aktiv und 1400 Mal aktiver als die isolierte TSA-Untereinheit (Kulik *et al.*, 2005). BX1 katalysiert die Abzweigung vom Primärmetabolismus (Abbildung 1.1).

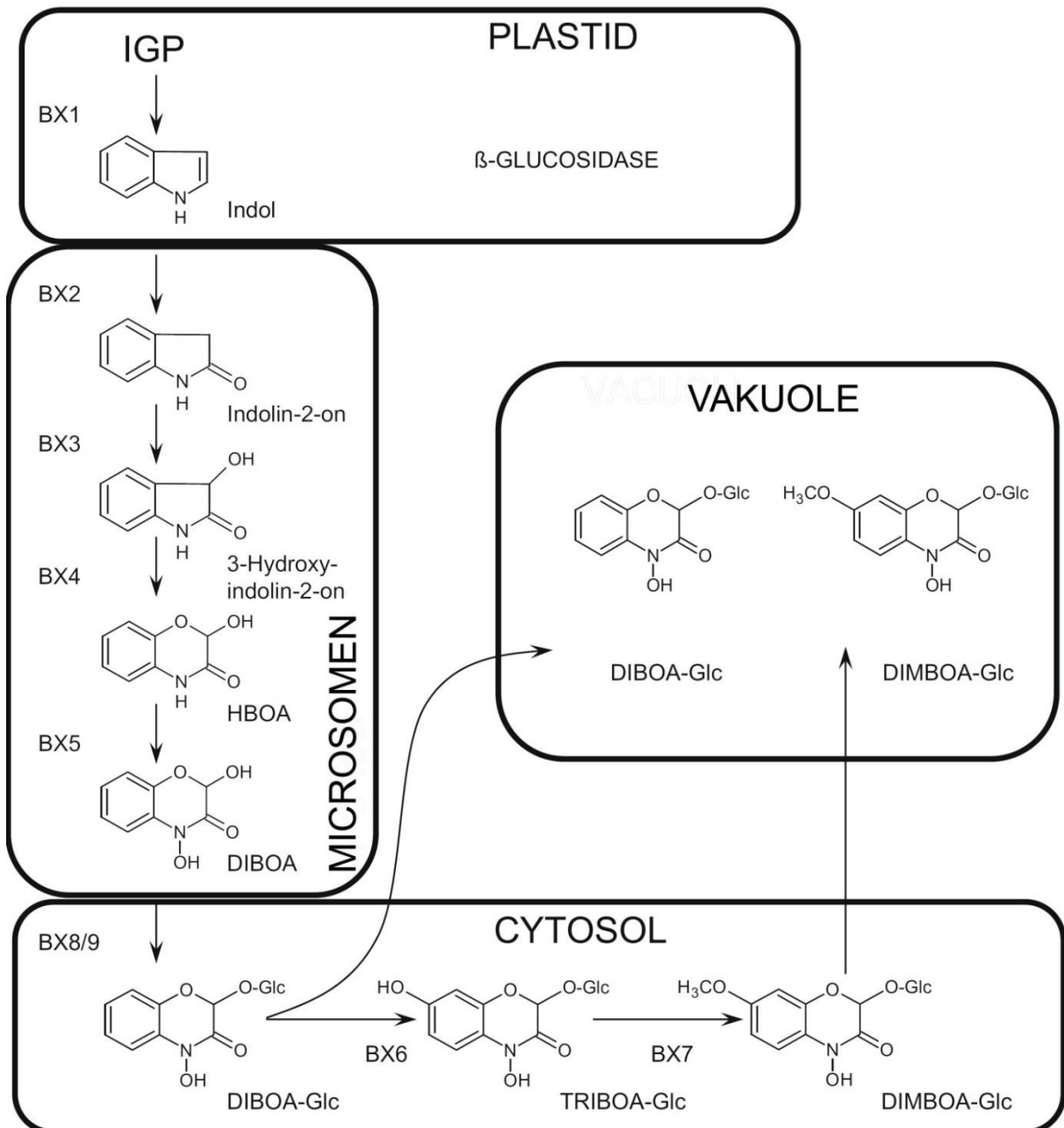


Abbildung 1.1: DIMBOA-Biosyntheseweg

Abbildung nach Frey *et al.*, 2009; modifiziert.

Durch die konsequente Einführung von vier Sauerstoffatomen in das Indolmolekül entsteht DIBOA, das erste toxische Zwischenprodukt. Diese Modifikation erfolgt mit Hilfe von vier verschiedenen Cytochrom-P450-Monooxygenasen der *Cyp71C*-Subfamilie. Dabei wird Indol mit Hilfe von BX2 zu Indolin-2-on umgesetzt. Durch die Einführung eines zweiten Sauerstoffatoms, katalysiert durch BX3, entsteht 3-Hydroxy-indolin-2-on. Anschließend erfolgt eine oxidative Ringerweiterung durch BX4, aus der 2-Hydroxy-2H-1,4-benzoxazin-3-on (HBOA) resultiert. BX5 katalysiert schließlich die Bildung von DIBOA durch Hydroxylierung des Stickstoffatoms (Frey *et al.*, 1995, 2009; Spitteller *et al.*, 2001).

Um Schäden durch reaktive DIBOA-Moleküle zu vermeiden und deren Löslichkeit zu erhöhen, werden diese glucosyliert. Diese Reaktion kann in Mais von zwei UDP-abhängigen Glucosyltransferasen katalysiert werden, namentlich BX8 und BX9 (v. Rad *et al.*, 2001). Das stabilisierte DIBOA-Molekül wird anschließend in Mais mit Hilfe der 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenase BX6 und der O-Methyltransferase BX7 zu DIMBOA-Glucosid umgesetzt, das in der Vakuole gespeichert wird (Jonczyk *et al.*, 2008; Frey *et al.*, 2009).

Wird die strukturelle Integrität der Zelle zerstört, werden die reaktiven Aglucone durch die Glucosidasen GLUI und GLUII gebildet (Babock und Esen, 1994).

1.5 Evolutionäre Entwicklung des DIBOA-Biosynthesewegs

Benzoxazinone kommen in relativ vielen Arten der *Poaceae* vor. Sporadisch gibt es sie auch in einigen zweikeimblättrigen Arten, die zu den Familien der *Plantaginaceae*, *Lamiaceae* und *Ranunculaceae* gehören. Um die Frage zu beantworten, ob die Biosynthese der Benzoxazinone einen monophyletischen Ursprung hat, oder ob sie unabhängig evolviert ist, wurden stellvertretend die Arten *Lamium galeobdolon* (*Lamiaceae*) und *Consolida orientalis* (*Ranunculaceae*) untersucht. Als Zwischenergebnis stellte sich heraus, dass sowohl die beteiligten IGL-Enzyme als auch Glycosyltransferasen und Glucosidasen unabhängig evolviert sind (Schullehner *et al.*, 2008; Dick *et al.*, 2012). Weitere biosynthetische Enzyme wurden noch nicht identifiziert. Neuere Befunde bestätigen, dass Sekundärstoffbiosynthesen unabhängig in verschiedenen Arten evolviert sein können.

Ein Beispiel hierfür ist die unabhängige Entwicklung der Biosynthese der cyanogenen Glycoside im gewöhnlichen Hornklee *Lotus corniculatus* und *Zygana filipendulae* (Sechsfleckwidderchen) (Zagrobely *et al.*, 2007; Jensen *et al.*, 2011).

1.6 Die Herausforderungen des Transfers ganzer Biosynthesewege

Eingriffe in den pflanzlichen Metabolismus zur verbesserten Produktion eines bestehenden beziehungsweise der Synthese eines neuen Stoffes oder dem Abbau eines ungewünschten Metabolits sind seit 1975 beschrieben und werden unter *Metabolic Engineering* zusammengefasst (DellaPenna, 2001). Meilensteine im Transfer ganzer Biosynthesewege von abwehrrelevanten Sekundärmetaboliten konnten erst in diesem Jahrtausend erreicht werden. Hierzu zählt die Übertragung des Dhurrin-Biosyntheseweges von *Sorghum bicolor* auf *A. thaliana* im Jahr 2001 durch Tattersall *et al.* beziehungsweise auf *Lotus japonicus* (Morant *et al.*, 2007). Dhurrin ist ein cyanogenes Glucosid, das aus Tyrosin gebildet wird. Die Expression von zwei sorghumspezifischen P450-Enzymen und einer Glycosyltransferase

1 Einleitung

unter dem 35S-Promotor in *Arabidopsis* führte zu einer Dhurrinakkumulation von bis zu 4 mg pro Gramm Frischgewicht, einer Konzentration, die auch in *Sorghum*-Keimlingen erreicht wird. Dadurch konnte eine Resistenz gegenüber dem Kohlerdfloh (*Phyllotreta nemorum*), einem nicht-spezialisierten Pathogen erreicht werden. Obwohl die Synthese dieses Abwehrstoffes von einer Aminosäure abzweigt, zeigten Pflanzen, die bis zu 1 mg Dhurrin pro Gramm Frischgewicht produzierten, keine phänotypische Veränderung und die Akkumulation von höheren Dhurrinkonzentrationen führte lediglich zu einem leicht verminderten Wachstum. Ein zusätzlicher Einfluss auf den Metabolismus wurde nicht beschrieben. Dass die Übertragung eines polygenen Biosyntheseweges nicht trivial ist, zeigte der Transfer der Dhurrin-Biosynthese auf *L. japonicus*. Hierbei führte die wiederholte Verwendung eines einzigen starken Promotors für alle Transgene zur Repression der Transgenexpression („Transkriptionelles Gene Silencing“, TGS) (Geu-Flores *et al.*, 2009).

Um TGS und vor allem aufwändige Kreuzungen zu umgehen, wurde bei der Übertragung der Benzylglucosinolat-Biosynthese von *A. thaliana* auf Tabak eine besondere Art der Transgenzusammenstellung verwendet (Geu-Flores *et al.*, 2009). Es wurden bis zu drei Gene in einem offenen Leserahmen vereint und durch sogenannte 2A-Sequenzen voneinander getrennt. Diese Sequenz ist aus dem Maul-und-Klauenseuche-Virus abgeleitet und codiert für 21 Aminosäuren. Sie bewirkt durch die spezielle Abfolge der codierten Aminosäuren die Freisetzung des ersten gebildeten Propeptids aus dem Ribosom (*ribosomal skip*) am C-Terminus (de Felipe *et al.*, 2006) und den erneuten Beginn der Peptidbiosynthese. Dadurch konnten die drei finalen Gene der Benzylglucosinolat-Biosynthese in Tabakpflanzen funktional exprimiert werden. In Übereinstimmung mit der Übertragung der Dhurrinsynthese konnte auch hier keine Veränderung des pflanzlichen Phänotyps festgestellt werden. Das heißt, dass die proteinogenen Aminosäuren, von denen die Dhurrin- und die Benzylglucosinolat-Biosynthese ausgehen, in ausreichendem Maße nachgebildet werden können, um Engpässe für andere Prozesse zu vermeiden.

1 Einleitung

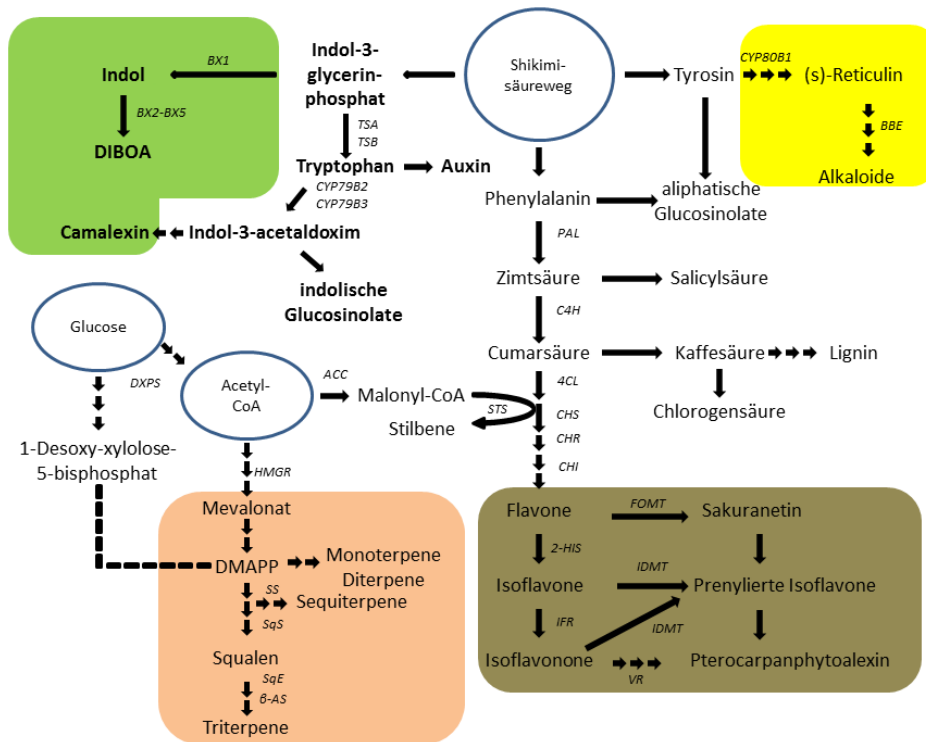


Abbildung 1.2:

Metabolismus der Stoffwechselprodukte des Shikimisäureweges.

Abbildung von Dixon, 2001, modifiziert.

Die DIBOA-Biosynthese zweigt vom Tryptophan-Biosyntheseweg ab (Abbildung 1.2). Tryptophan ist in *A. thaliana* das Substrat für die Synthese wichtiger Abwehrstoffe. Dazu gehören die indolischen Glucosinolate, die *A. thaliana*-Pflanzen eine konstitutive Resistenz gegen Pathogene vermitteln (Halkier und Gershenzon, 2006). Zum anderen wird Camalexin aus Tryptophan synthetisiert, das in *Arabidopsis* vorherrschendes Phytoalexin, dessen Biosynthese bei Pathogenbefall lokal induziert wird. Neuere Erkenntnisse zeigen, dass Camalexin nicht ausschließlich als Phytoalexin wirkt. Es wird in geringen Mengen in der Wurzel gebildet und hat einen Einfluss auf die Besiedelung der Wurzel mit dem Endophyten *Piriformospora indica* (Rauhut und Glawischnig, 2009; Nongbri *et al.*, 2012).

Zusätzlich wird das Phytohormon Auxin aus Tryptophan synthetisiert, dessen Homöostase enorm wichtig für die Entwicklung der Pflanze ist (Ljung, 2013). Aus diesem Grund wird es wichtig sein, die DIBOA-Biosynthese so zu modulieren, dass eine ausreichende Menge DIBOA produziert wird, gleichzeitig jedoch keine Interferenzen mit anderen bestehenden Biosynthesewegen auftreten.

1.7 Strategie für den Transfer der DIBOA-Biosynthese

Die einzelnen Syntheseschritte der DIBOA-Biosynthese können in Module unterteilt werden (Abbildung 1.3). Diese bestehen aus dem Abzweigungsmodul (BX1), dem Modifikationsmodul (BX2 bis BX5) und dem Stabilisierungsmodul (UDP-abhängige Glycosyltransferase BX8). Die komplette Übertragung des DIBOA-Biosyntheseweges benötigt sechs Gene. Zur Aktivierung wird eine spezielle Glucosidase benötigt.

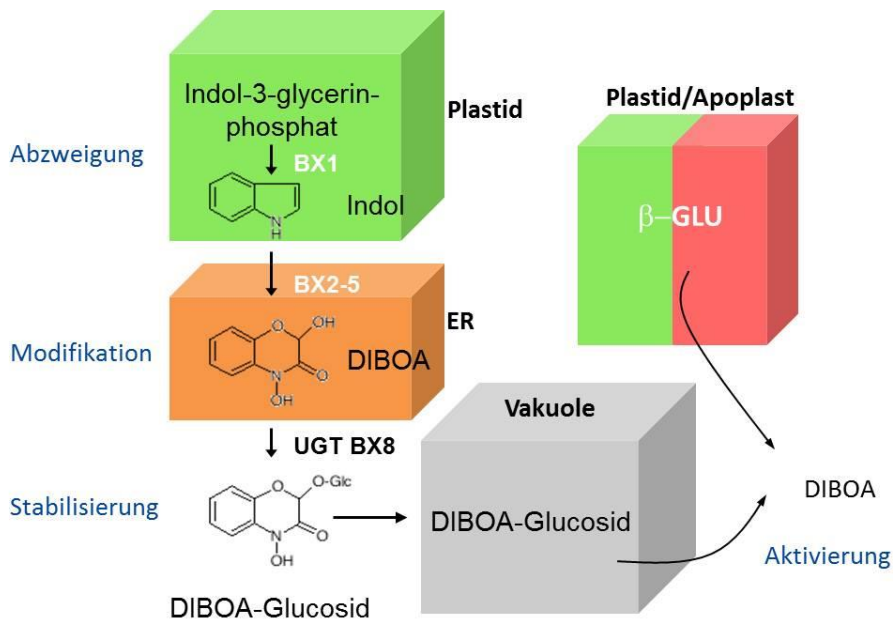


Abbildung 1.3: Modulare DIBOA-Biosynthese.

Für die DIBOA-Biosynthese in *Arabidopsis* wurden die einzelnen Schritte und beteiligten Enzyme in Module unterteilt. BX1 bildet das Abzweigungsmodul. Das Modifikationsmodul umfasst BX2-BX5. Das Stabilisierungsmodul beinhaltet die UDP-abhängige Glycosyltransferase BX8. Für das Aktivierungsmodul wurde die *C. orientalis*-spezifische Glucosidase CoBX8 verwendet.

Zur Expression von BX1 bis BX5 sowie BX8 werden die cDNA-Sequenzen von Mais verwendet. Um die Aktivierung zu gewährleisten, kann auf die cDNA-Sequenz der DIBOA-Glucosid spaltenden Glucosidase CoGLU1 zurückgegriffen werden. Diese ist, im Gegensatz zu Glucosidasen von Monokotylen, im Apoplasten lokalisiert und hat den Vorteil, dass sie mit *Arabidopsis*-typischen Glucosidasen näher verwandt ist (Dick *et al.*, 2012). Die Erfahrungen von früheren Versuchen, Biosynthesewege von Sekundärmetaboliten spezieübergreifend zu übertragen, zeigten Probleme mit „transkriptionellen Gene Silencing“ (TGS) bei der wiederholten Verwendung eines Promotors. Aus diesem Grund werden die *Bx*-Gene nicht ausschließlich unter der Kontrolle des CaM 35S-Promotors gestellt, der eine starke Expression eines Transgens bewirkt. Zusätzlich erfolgt die Expression des *Bx1*-Transgens unter der Kontrolle des *Nos*-Promotors (An *et al.*, 1988), der eine moderate Genexpression vermitteln soll, beziehungsweise eines alkoholinduzierten Promotors (Tomsett *et al.*, 2004). Darüber hinaus wird das Promotorspektrum für die Expression der kombinierten Transgene des Modifikationsmoduls um den *mas2'*-Promotor (Velten *et al.*, 1984) erweitert.

Alle Gene einzeln in Pflanzen zu transferieren und diese durch Kreuzung zu vereinen, führt zu sehr aufwändigen Kreuzungsschemata. Zusätzlich steigt die Gefahr des TGS mit jeder Generation, die ein Transgen in einer Pflanze exprimiert wird.

1 Einleitung

Aus diesem Grund werden die Gene des Kreuzungsmoduls zum einen einzeln unter der Kontrolle des 35S-Promotors exprimiert, zusätzlich werden jedoch jeweils zwei Gene des Modifikationsmoduls *Bx2*, *Bx3*, *Bx4* und *Bx5* auf einem Konstrukt vereint. Folgende Konstrukte mit kombinierten *Bx*-Genen kommen zum Einsatz:

- *Bx3* und *Bx5* jeweils unter der Kontrolle des 35S-Promotors
- *Bx2* und *Bx3* unter der Kontrolle des $p2'$ -Promotors und verbunden durch eine 2A-Sequenz
- *Bx4* und *Bx5* unter der Kontrolle des $p2'$ -Promotors und verbunden durch eine 2A-Sequenz

Die beiden letzten Konstrukte haben den Vorteil, dass beide Gene unter der Kontrolle desselben Promotors stehen und sich einen Terminator teilen.

1.8 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, die DIBOA-Biosynthese aus Mais auf die Modellpflanze *A. thaliana* zu übertragen. Der Fokus dieser Arbeit liegt in erster Linie auf der Frage, ob es möglich ist, diesen Biosyntheseweg funktional zu transferieren und welchen Einfluss die Übertragung auf den Metabolismus der Pflanze hat. Dabei wird geklärt werden, inwieweit sich die Expression der Biosynthesegene auf die Widerstandsfähigkeit der Pflanze gegen Pathogene auswirkt.

Des Weiteren soll geklärt werden, ob *Arabidopsis*-Pflanzen in der Lage sind, Teile der DIBOA-Biosynthese durch eigene Enzyme zu bewerkstelligen. Dies lässt im Anschluss Aussagen über die Evolution eines solchen Syntheseweges zu.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Die Chemikalien (analytischer Reinheitsgrad) folgender Firmen, wenn nicht anders gekennzeichnet, wurden zur Anfertigung dieser Arbeit verwendet:

Bio-Rad	USA
Boehringer	Mannheim
Fluka	Schweiz
Merck	Darmstadt
Roth	Karlsruhe
Serva	Heidelberg
Sigma-Aldrich	USA

DNA-Restriktionsenzyme und DNA-modifizierende Enzyme wurden von Promega (USA), Roche (Schweiz), New England Biolabs (USA) und Quiagen (Hilden) bezogen.

Die Synthese von Oligonukleotiden erfolgte im Auftrag durch die Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg).

Die Substrate HBOA und DIBOA wurden freundlicherweise von Prof. Sicker, Universität Leipzig, zu Verfügung gestellt. GDIBOA wurde aus *L. galeobdolon* isoliert.

Der DNA-Standard 1kb+ DNA-Marker und der RNA-Standard 0,5-10kb RNA-Marker wurde von Invitrogen (Darmstadt) beziehungsweise von PEQLAB (Erlangen) bezogen. Zur Größenbestimmung von Proteinen kam der Proteinstandard peqGold Protein Marker von PEQLAB (Erlangen) zur Anwendung.

2.1.2 Plasmide

Tabelle 2.1: verwendete Plasmide.

Plasmide	Resistenzmarker	Hersteller/Literaturnachweis
pBlueskript II KS	Ampicillin	Stratagene
pBlueBx1	Ampicillin	Dr. Monika Frey
pBlueBx2	Ampicillin	Dr. Monika Frey
pGEM®-T Easy	Ampicillin	Promega
pBar	Kanamycin	Dr. Monika Frey
pGAP-HYG	Ampicillin	Dr. Monika Frey
pET28a-His	Kanamycin	Novagen
11AATHSP_ <i>ZmBx5</i> _pMK-RQ	Kanamycin	GeneArt AG, life Technologies™
pML-Bart_ <i>AlcR</i> pBJ36_ <i>AlcA</i>	Ampicillin	Stratagene

2.1.3 Bakterienstämme

Tabelle 2.2: verwendete Bakterienstämme.

Bakterienstamm	Resistenzmarker	Hersteller/Literaturnachweis
<i>E. coli</i>		
XL1-Blue	Tetracyclin	Bullock <i>et al.</i> , 1978
pet28deltaH/B (#717)	Kanamycin	Dr. Monika Frey
<i>A. tumefaciens</i>		
GV3101	Rifampicin	van Larebeke <i>et al.</i> , 1974
GV3101 pMP90:RK	Rifampicin, Gentamycin, Kanamycin	Koncz und Schell, 1986

2.1.4 Pflanzenlinien

Tabelle 2.3: verwendete Pflanzenlinien.

Pflanzenlinie	Resistenzmarker	Hersteller/Literaturnachweis
<i>35S::Bx1</i>	PPT	Dr. Monika Frey
<i>35S::Bx2</i>	PPT	Dr. Monika Frey
<i>35S::Bx2</i>	MTX	Dr. Monika Frey
<i>35S::Bx3</i>	PPT	Dr. Monika Frey
<i>35S::Bx4</i>	PPT	Dr. Monika Frey
<i>35S::Bx5</i>	PPT	Dr. Monika Frey
<i>35S::Bx5At</i>	PPT	diese Arbeit
<i>35S::Bx8</i>	PPT	Dr. Monika Frey
<i>pNos::Bx1</i>	MTX	diese Arbeit
<i>p2'::Bx2,Bx3</i>	PPT	diese Arbeit
<i>p2'::Bx4,Bx5</i>	PPT	diese Arbeit
<i>AlcA::Bx1</i>	MTX	diese Arbeit

2.1.5 Oligonukleotide

Tabelle 2.4: PCR-Primer zur Amplifikation von *Bx1*, *pNos*, *NosT*.

Name	Sequenz 5'→ 3'	Gen	Annealing-temperatur
SL1_pNos_HindIII_for	AAGCTTAGCTTCACGCTGCCGCAAGCA	<i>pNos</i>	60°C
SL2_pNos_BamHI_rev	GGATCCTTATTGCCCCCGATCTGGA		
SL3_Bx1_BamHI_for	GGATCCATGGCTTTCGCGCCCAAAC	<i>Bx1</i>	60°C
SL4_Bx1_BamHI_rev	GGATCCTCATGGCAGCGGTTCTTCA		
SL5_NosT_BamHI_for	GGATCCGATCGTTCAAACATTTGGCAAT	<i>NosT</i>	60°C
SL6_NosT_EcoRI_rev	GAATCCCGATCTAGTAACATAGATGACA		
SL 13 Bx4.A BgIII	AGATCTCTCGAGGTATGGCTCTCGAAGC AG	<i>Bx4</i>	60°C
Betina #23	ACGCCTCGGCGGCGTCGCGGA	<i>Bx4</i>	60°C
SL15 Bx5.C SacI for	GCCGAGCTCATGAACCACA	<i>Bx5</i>	62°C
SL16 Bx5.C BamHI rev	GGATCCAGCCTAGCTAGACGCCCTA	<i>Bx5</i>	62°C

Tabelle 2.5: Primer zur Verwendung für RT-qPCR-Analysen.

Name	Sequenz 5' → 3'	Gen
A.t. GAPDH for	ATTAGGATCGGAATCAACGG	<i>A. t. GAPDH</i>
A.t. GAPDH rev	GCACCTTTCCGACAGCCTTG	<i>A. t. GAPDH</i>
qBx1fw	GAGGAGGAGCCGTCCGGTG	<i>Z.m. Bx1</i>
qBx1rev	GGCGTCACCTCCCTCAGCA	<i>Z.m. Bx1</i>
Bx2quantf	CCGGGAGCTCACCGACATCAA	<i>Z.m. Bx2</i>
Bx2quantr2	CTCCTGCCCCGCCGGCACGTT	<i>Z.m. Bx2</i>
Bx3QFW3	ACCGGAACCAAGGCCGGAACA	<i>Z.m. Bx3</i>
Bx3quantr2	CGTCCGGCGAGCGCATCGT	<i>Z.m. Bx3</i>
Bx4Qfw	GCTCTCCGGCGGCAAGCAG	<i>Z.m. Bx4</i>
Bx4Qrev	CCGTACATGTGACCTCGGC	<i>Z.m. Bx4</i>
Bx5QFw	TGGAGATGAGGAAGCTGTCC	<i>Z.m. Bx5</i>
Bx5QRev	CCGCTGTAGCTGTTGGACTT	<i>Z.m. Bx5</i>
Bx5AtQFw	ATGGTGCTTGGTCATCTACT	<i>A.t. Bx5</i>
Bx5AtQRev	TAGGCACAGCACCAGCTCT	<i>A.t. Bx5</i>

2.1.6 Antikörper

Tabelle 2.6: Antikörper für Western-Blot-Analysen.

Name	verwendete Verdünnung	Quelle
rabbitαBx1	1:300	Dr. Monika Frey
rabbitαBx2	1:300	Dr. Monika Frey
rabbitαBx3	1:300	Dr. Monika Frey
rabbitαBx4	1:300	Dr. Monika Frey
rabbitαBx5	1:300	Dr. Monika Frey
goatarabbit IgG (H+L)Fluorolink™ Cy™5	1:3.000	GE Healthcare, München, Deutschland
Goat Anti-Rabbit IgG, H & L Chain Specific Peroxidase Conjugate	1:10.000	Merk, Darmstadt, Deutschland

2.1.7 Antibiotika

Tabelle 2.7: verwendete Antibiotika.

Selektionssubstanzen	verwendete Endkonzentration in µg/ml
Kanamycin	50
Ampicillin	100
Carbenicillin	50
Rifampicillin	50
Tetracyclin	5
Hygromycin	10
Phosphinothricin	25
Methotrexat	2,5

2.2 Methoden

2.2.1 Pflanzenanzucht von *A. thaliana*-Pflanzen

Das Ausgangsmaterial der in der Arbeit verwendeten *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen bestand aus Samen des Ökotyps Columbia. Die Samen wurden entweder direkt auf Erde (EinheitstypT gemischt mit Quarzsand 3:1) ausgebracht oder selektioniert. Die Selektion erfolgte mittels 1xMS-Agarplatten nach Murashige und Skoog 1962 (4,4 g/l Murashige-Skoog-Salzen, 20,0 g/l Saccharose und 9,0 g/l Agar, pH 5,8), zu denen das entsprechende Antibiotikum (Tabelle 2.7) gegeben wurde. In beiden Fällen wurden die Samen 2 Tage einer Vernalisation bei 4 °C im Dunkeln unterzogen und in einer Pflanzenkammer (Hereaus Vötsch, 19 °C) entweder bei Dauerlicht oder einem Tag-Nacht-Rhythmus mit 12 Stunden Tag, 12 Stunden Nacht für 10 bis 14 Tage angezogen. Danach wurden die Pflanzen auf Erde vereinzelt und bis zur Reife in den Pflanzenkammern belassen.

Für die GC/MS-Analyse wurden die Samen auf quadratischen Petrischalen (10 x 10 cm) unter selektiven Bedingungen für zwei Tage bei 4°C vernalisiert und in einer Pflanzenkammer (Hereaus Vötsch, 19 °C, 12 Stunden Tag, 12 Stunden Nacht) in waagerechter Lage bei durchschnittlich $67,3 \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ zum Keimen gebracht. Nach sieben Tagen wurden die Keimlinge unter sterilen Bedingungen in quadratische Petrischalen (10 x 10 cm) auf 1/2xMS-Medium ohne Antibiotikum in einer Weise überführt, dass circa 20 Keimlinge 3 cm unter dem oberen Rand platziert wurden. Diese Platten wurden in einen 70° Winkel aufgestellt und unter durchschnittlich $61,8 \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ in der oben genannten Pflanzenkammer bis zum Erreichen des 5-Blattstadiums (circa 7 Tage) inkubiert.

2.2.2 Induktion der Indolinonsynthese in Pflanzenlinien mit alkoholinduzierbarem Promotor

Die Blätter von 6 Wochen alten Pflanzen wurden mit der Induktionslösung (2% Ethanol, 0,05% Silvet L-77) inkubiert. Die Induktionslösung war nach circa 10 Minuten verdunstet.

2.2.3 Molekularbiologische Methoden

RNA-Isolierung und cDNA-Synthese

Die Isolierung der Gesamt-RNA von Pflanzenproben erfolgte mit Hilfe des NucleoSpin®RNA Plant-Kit (Machery-Nagel, Düren) nach Angaben des Herstellers. Für die Gewinnung von

2 Materialien und Methoden

cDNA wurden 500 ng Gesamt-RNA verwendet. Die Synthese fand mit Hilfe des TaqMan Kits (Roche, Schweiz) nach Angaben des Herstellers statt.

Überprüfung der RNA-Qualität mittels Formaldehyd-Agarosegelelektrophorese

Die RNA-Proben wurden für die Qualitätskontrolle mit 4xRNA-Probenpuffer (8 % Formaldehyd, 0,03 % Bromphenolblau, 60 % deionisiertes Formamid in 2xNorthernpuffer) versetzt und 10 min bei 68 °C denaturiert. Anschließend erfolgte die denaturierende Gelelektrophorese mit Hilfe eines Formaldehyd-Agarosegels (1,2 % Agarose, 7 % Formaldehyd in 1xNorthernpuffer). Als Laufpuffer diente 1xNorthernpuffer (20 mM MOPS, 5 mM Natrium-Acetat, 2 mM EDTA, pH 7) bei circa 65 V. Die RNA wurde durch das Anfärben des Gels mit 0,1 % Toluidinblau in 10 % Ethanol sichtbar gemacht, wobei das Entfärben des Gels mit 10 % Ethanol den Kontrast erhöhte.

Allgemeine DNA-Klonierungstechniken

- Allgemeine Klonierungstechniken für DNA-Moleküle wurden nach Standardprotokollen oder nach Angaben der Hersteller durchgeführt. Zu diesen Techniken zählen:
- Agarosegelelektrophorese
- Behandlung von DNA-Molekülen mit Restriktionsendonucleasen, T4-DNA-Polymerasen, T4-DNA-Ligasen
- Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* – Zellen
- Hitzeschocktransformation von *E. coli* – Zellen

Plasmid-DNA-Isolierung

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* und *A. tumefaciens* wurde nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979) durchgeführt.

Klonierungsstrategien für die während der Arbeit angefertigten Konstrukte

p4/1_pNos::Bx1

Sowohl der *Nos*-Promotor als auch der *Nos*-Terminator wurden aus dem Plasmid pGAP-Hyg mit Mismatch-Primern mittels PCR amplifiziert. Infolgedessen erhielt der *Nos*-Promotor eine HindIII-Restriktionsschnittstelle am 5'-Ende und eine *Bam*HI-Restriktionsschnittstelle am 3'-Ende. Der *Nos*-Terminator wiederum wurde mit einer *Bam*HI-Restriktionsschnittstelle (5'-

Ende) und einer *EcoRI*-Schnittstelle (3'-Ende) amplifiziert. Zwischen den Terminator und den Promotor sollte das *Bx1*-Gen eingefügt werden, deswegen erhielt es analog zu den beiden anderen Fragmenten zwei *BamHI*-Restriktionsschnittstellen durch die Amplifizierung aus dem Plasmid pBlueBx1.

Die aufgereinigten PCR-Produkte wurden in den Vector pGEM®-T Easy zwischenkloniert, sequenziert und mit den entsprechenden Restriktionsverdauen wieder vereinzelt.

Parallel dazu erfolgte die Ersetzung der multiplen Klonierungsstelle (MCS) des Zielvektors p4/1#25 durch einen Adapter mit den Restriktionsschnittstellen *HindIII*, *BamHI*, *EcoRI* (von 5' zu 3'). Die oben genannten Fragmente wurden entsprechend ihren Restriktionsschnittstellen in den Zielvektor transferiert.

pBar_p2'::*Bx2*,*Bx3* und pBar_p2'::*Bx4*,*Bx5*

Die beiden Klonierung erfolgten in zwei Schritten, dabei diente der pET28-Vektor, der bereits den 2'-Promotor enthielt, als Zwischenstufe. Über die in 3' gelegenen Schnittstellen *BamHI* und *EcoRI* wurde der *Nos*-Terminator (oben) eingefügt. Die verbleibende *BamHI*-Schnittstelle zwischen Promotor und Terminator wurde genutzt, um die Kassette, bestehend aus dem offenen Leserahmen von *Bx2*, *Bx3* und der verbindenden 2A-Sequenz, einzufügen. Diese Kassette wurde aus dem Plasmid pICH31070Bx22aBx3 durch einen *BamHI*-Verdau gewonnen. Die Kombination aus Promotor, Genkassette und Terminator wurde im Anschluss durch die flankierenden *XbaI*-Schnittstellen in den pBarB-Vektor überführt.

Der offene Leserahmen von *Bx4* weist eine interne *BamHI*-Schnittstelle auf. Aus diesem Grund wurden der 5' gelegene Teil von *Bx4* und der 3' gelegene Teil von *Bx5* mit Hilfe von Mismatchprimern (Tabelle 2.4) aus dem Vektor pICH31070Bx42ABx5 amplifiziert. Dadurch wies der 5' gelegene Teil von *Bx4* eine 5' gelegene *BglI*-Schnittstelle und eine 3' gelegene *BamHI*-Schnittstelle auf. Dieses Fragment wurde zwischen den 2'-Promotor und den *Nos*-Terminator in das pET28-Rückgrat eingefügt. Anschließend konnten die beiden fehlenden Fragmente, ein mittleres Fragment (3'-Bereich von *Bx4*, 2A-Sequenz, 5'-Bereich von *Bx5*) und das 3' gelegene Fragment von *Bx5* über *BamHI*-Schnittstellen integriert werden. Die komplette Kassette wurde ebenfalls über *XbaI*-Schnittstellen in den pBar-Vektor überführt.

pBar35SBx5A.t

Der *Bx5*-ORF wurde an die Codonbenutzung von *A. thaliana* angepasst und zur Expression in *A. thaliana* in den binären Vektor pBar transferiert. Der Transfer des *Bx5A.t*-Gen aus dem Vektor 11AATHSP_ZmBx5_pMK-RQ in pBar erfolgte über *SmaI*- und *XbaI*-Restriktionsschnittstellen.

p4/1AlcRAIcABx1

Das 35S::*AlcR*-Fragment wurde durch einen partiellen *EcoRI*-Restriktionsverdau und einen *NotI*-Restriktionsverdau des Plasmids pML-Bart_*AlcR* gewonnen, wobei die *NotI*-Restriktionsschnittstelle durch eine T4-Polymerase behandelt wurde.

Parallel dazu erfolgte die Ersetzung der multiplen Klonierungsstelle (MCS) des Zielvektors p4/1#25 durch einen Adapter mit den Restriktionsschnittstellen *EcoRI*, *SmaI*, *HindIII* (von 5' zu 3'). In einen zweiten Schritt wurde ein weiterer Primer mit den Restriktionsschnittstellen *SmaI*, *SapI*, *SpeI*, *HindIII* (von 5' zu 3') eingeführt.

In diesen Vektor konnte das 35S::*AlcR*-Fragment eingeführt werden. Zur Vorbereitung der Integration des *AlcA*::*Bx1*-Fragments wurde ein weiterer Adapter mit den Restriktionsschnittstellen *SpeI*, *PmlI* und *SpeI* (von 5' zu 3') eingeführt, wobei der Adapter in einer Weise designt wurde, dass die 5' gelegene *SpeI*-Restriktionsschnittstelle durch einen Basenaustausch zwar mit einer *SpeI*-Schnittstelle ligiert, jedoch nicht wieder für eine weitere Restriktion zur Verfügung steht.

Der offene Leserahmen (ORF) von *Bx1* wurde mit dem induziebaren *AlcA*-Promoter verbunden, indem sie in das Plasmid pBJ36_*AlcA* über *BamHI*- beziehungsweise *EcoRI*-Restriktionsschnittstellen integriert wurden. Das *AlcA*::*Bx1*-Fragment konnte über die Restriktionsschnittstellen *SapI* und *SpeI* isoliert und durch eine T4-Polymerasebehandlung der *SapI*-Schnittstelle in den oben genannten Vektor eingeführt werden.

Elektroporation von *A. tumefaciens*-Zellen

Die für die Elektroporation verwendeten *A. tumefaciens*-Zellen wurden nach Walkerpeach und Velten (1994) hergestellt und mittels eines Gene-Transfection-Pulser (BioRad, USA) in 2 mm Küvetten (Thermo Scientific) mit dem jeweiligen Vektor transformiert. Dafür wurden 10 ng bis 2 µg des Vektors eingesetzt. Die Transformation erfolgte unter folgenden Parametern: 400 Ω; 25 µF; 2,5 kV.

Die Selektion positiv transformierter Zellen erfolgte auf Agarplatten mit YEP-Medium (5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, 10 g/l Pepton, 15 g/l Agar, pH 6,8) und dem entsprechenden Antibiotikum für die verwendeten Resistenzmarker des *A. tumefaciens*-Stammes und des transformierten Plasmids (Tabellen 2.1 und 2.2).

Transformation von *A. thaliana*-Pflanzen mittels Agrobakterien

Die Transformation von *A. thaliana*-Pflanzen mittels *A. tumefaciens* wurde mit Hilfe der Methode „Floral Dip“ nach Clough und Bent, 1998 durchgeführt. Transgene Pflanzen wurden mit dem entsprechenden Antibiotikum selektioniert (Tabelle 2.7).

PCR-Verfahren

Standard-PCR

Zur Amplifikation von PCR-Fragmenten wurde die GoTaq-Polymerase (Promega, USA), nach Angaben des Herstellers, verwendet. Dabei wurden mit Mismatchprimern Restriktionschnittstellen eingeführt (Tabelle 2.6). Es wurde der Thermoblock UNO (Biometra, Göttingen) verwendet.

Quantitative PCR (qPCR)

Die Bestimmung der Quantität von Transkriptmengen erfolgte durch die Verwendung des LightCycler®480 (Roche, Schweiz). Für die Normierung wurde die Transkriptmenge des *House-keeping-Gens* Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase verwendet. Für die Reaktion kam der LightCycler®480 SYBR Green I Mastermix (Roche, Schweiz) zur Anwendung. Die PCR-Bedingungen sind in Tabelle 2.8 aufgeführt.

Tabelle 2.8: Bedingungen für qPCR-Analysen

Gen	Annealingtemperatur in °C	Extensionszeit in s	Extinktionsmessung bei °C
<i>GAPDH</i>	50	26	82
<i>Bx1</i>	58	15	88
<i>Bx2</i>	66	25	84
<i>Bx3</i>	65	25	84
<i>Bx4</i>	64	27	84
<i>Bx5 Z.m.</i>	64	27	84

DNA-Sequenzierung

Plasmid-DNA wurde vor der Sequenzierung mittels Polyethylenglycol (PEG) über Nacht, nach Sambrook *et al.*, 1989, gefällt. Die Sequenzierung erfolgte im Auftrag durch Eurofins MWG (Ebersberg).

2.2.4 Proteinbiochemische Methoden

Microsomenpräparation

Es wurden sowohl Microsomen von *Zea mays*-Keimlingen als auch von *Arabidopsis thaliana*-Blättern isoliert. Die Prozedur ist dabei die gleiche, lediglich die Pufferzusammensetzungen sind verschieden. Diese sind am Ende des Abschnittes aufgeführt.

Bis zu 16 g Blatt-/Keimlingsmaterial wurden mit Seesand und Polyclar (0,3g/g Plattmaterial) in 200 ml Extraktionspuffer gemörsert, über Mull filtriert und mit 15.000 xg für 10 min zentrifugiert. Nach der ersten Zentrifugation erfolgte die Pelletierung der Microsomen im Überstand in der Ultrazentrifuge bei 200.000 xg für 30 min. Die Pellets wurden in den Suspensionspuffer aufgenommen und erneut bei 200.000 xg für 30 min zentrifugiert. Das finale Pellet wurde in 0,6 bis 1,5 ml Suspensionspuffer aufgenommen, die Proteinkonzentration bestimmt und für Enzymtests sowie Western Blots verwendet.

Tabelle 2.9: Extraktionspuffer für Micosomen

<i>Zea mays</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Microsomen-Extraktionspuffer	
100 mM Ascorbat	250 mM Tricin
1 mM EDTA	50 mM Na ₂ SO ₄
5 mM DTT	5 g/l BSA
100mM TRIS, pH 7,5	2 mM EDTA
20% Saccharose	100 mM Ascorbat
20 % Glycerin	2 mM DTT
1mM PMSF	1 mM PMSF
	pH 8,2
Microsomen-Suspensionspuffer	
50 mM Kalium-Phosphatpuffer, pH 7,5	50 mM NaCl
2 mM DTT	100 mM Tricin
20 % Glycerin	250 mM Saccharose
	2 mM EDTA
	2 mM DTT
	pH 8,2

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine wurden in 1xLämmli-Puffer (50 mM TRIS pH 6,8; 2 % SDS; 10 % Glycerin; 5 % β -Mercaptoethanol; Bromphenolblau) mit Hilfe einer TRIS-Glycerin SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Lämmli, 1970) der Größe nach aufgetrennt. Für die Trenngele wurden 10 % beziehungsweise 12 % Polyacrylamid und für die Sammelgele 5 % Polyacrylamid verwendet. Die Gelelektrophorese erfolgte mittels der „Mighty-Small“ Apparatur (Hoefler, USA). Als Größenstandard kam der Proteinmarker II (PEQLAB Biotechnology GmbH, Erlangen) zum Einsatz. Nach der Auftrennung wurden die Proteingele zur direkten Visualisierung der Proteinbanden mit Coomassieblaufärbelösung (Sigma-Aldrich, USA; 1g/l Coomassie Brilliant Blue R-250, 50 % [v/v] Methanol, 10 % [v/v] Eisessig) gefärbt. Zur Erhöhung des Kontrastes wurden die Gele mit einer Entfärbelösung (10% [v/v] Methanol, 10 % [v/v] Eisessig) entfärbt. Für eine indirekte Detektion einzelner Proteinbanden erfolgte eine Weiterverwendung der Polyacrylamidgele für Western-Blot-Analysen.

Western Blot

Polyacrylamidgele, Whatman-Filterpapiere (Whatman GmbH, Dassel) und die Nitrozellulose-Membran (Amersham™ Hybond™-ECL Membran, GE Healthcare, München) wurden für Western-Blot-Analysen in Transferpuffer (5,83 g/l TRIS; 2,93 g/l Glycin, 3,75ml/l 10% SDS, 200ml/l Ethanol) für 15 min equilibriert. Die Proteine wurden mit Hilfe eines SemiDry-Blotters (Bio-Rad, USA), nach den Angaben des Herstellers, auf die Nitrozellulosemembran geblottet. Die Überprüfung des Übertrags erfolgte mittels der Anfärbung mit Ponceau-S-Lösung (Sigma-Aldrich, USA) nach Angaben des Herstellers. Unspezifische Bindungen wurden durch die Inkubation mit 5 % Bio-Magermilchpulver (Heirler Cenovis GmbH, Radolfzell) in 1xTST (6 g/l TRIS; 8,8 g/l NaCl; 5 ml Tween20) vermieden. Die Detektion erfolgte mittels primärer und sekundärer Antikörper (Tabelle 2.6), die in 5 % Bio-Magermilchpulver (Heirler Cenovis GmbH, Radolfzell) in 1xTST verdünnt wurden. Zwischen der jeweils 1 h dauernden primären und sekundären Antikörperinkubation wurde die Membran mehrmals mit 1xTST gewaschen. Das Signal der Cy5-gekoppelten Antikörper wurde im Red Fluorescence Modus des STORM Phosphoimager (Molecular Dynamics, Amersham Pharmacia Biotech, USA) detektiert. Antikörper, die mit einer *Horseradish Peroxidase* gekoppelt waren, wurden mit Hilfe des Amersham™ ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare, München) und der ImageQuant LAS-4000 CCD-Kamera (GE Healthcare, München) sichtbar gemacht. Die Datenverarbeitung erfolgte mit der MultiGauge-Software (GE Healthcare, München).

Bestimmung von Proteinkonzentrationen nach Bradford

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen erfolgte nach Bradford (1976) mit Hilfe des Bio-Rad® Protein Assays.

Enzymtests mit isolierten Microsomen

Das Gesamtvolumen der Enzymtests entsprach 200 µl. Es wurde 1 mM NADPH und die entsprechende Menge Substrat eingesetzt:

Indol	2,0 mM
Indolinon	1,0 mM
Hydroxyindolinon	0,3 mM
HBOA	0,3 mM
DIBOA	0,3 mM
Zimtsäure	0,3 mM

Alle Enzymtests erfolgten bei 25 °C für 1 h bei 400 U/min im MK13-Schüttler (Ditabis AG, Pforzheim). Die Reaktion wurde mit 200 µl 100% Methanol abgestoppt und von Schwebeteilchen durch Zentrifugation (18.000 xg, 10 min, 4°C) befreit. Die Ansäuerung des resultierenden Überstands erfolgte mit 500 µl 0,1 mM Essigsäure. Dieses Gemisch wurde dreimal mit 100% Ethylacetat ausgeschüttelt. Die Einengung der vereinigten Überstände erfolgte mit Hilfe eines Vakuumkonzentrators „BA-VC-300H“ (H. Saur Laborbedarf, Reutlingen) bis zur vollkommenen Trockenheit. Das Pellet wurde in 110 bis 200 µl 100% Methanol aufgenommen, wobei 100 µl analysiert wurden.

2.2.5 Naturstoffextraktion

Extraktion der Metabolite des DIBOA-Biosyntheseweges

Für die Extraktion von Indolinon, Hydroxyindolinon, HBOA und DIBOA wurden 0,5 bis 1,0 g Blattmaterial in flüssigen Stickstoff gemörsert und in 1,5 bis 3,4 ml H₂O_{bidest} aufgenommen. Durch die Zugabe von HCl wurde die Suspension auf pH 2 angesäuert. Die anschließende Abtrennung unlöslicher Bestandteile erfolgte mittels Zentrifugation (18.000 xg beziehungsweise 4.500 xg, 10 min). Die eigentliche Extraktion bildete das Ausschütteln des Überstandes mit 0,5 V Ethylacetat, welches wiederum durch Zentrifugation (18.000 xg, 1 min) von der wässrigen Phase abgetrennt wurde. Die Einengung der vereinigten Überstände erfolgte mit Hilfe eines Vakuumkonzentrators „BA-VC-300H“ (H. Saur

2 Materialien und Methoden

Laborbedarf, Reutlingen) bis zur vollkommenen Trockenheit. Das Pellet wurde in 110 bis 200 µl 100% Methanol aufgenommen, wobei 100 µl analysiert wurden.

Glucosinolatextraktion

6 Wochen alte Pflanzen wurden lyophilisiert und deren Trockengewicht bestimmt. Als interner Standard erfolgte die Zugabe von 10 µl 5 mM Benzylglucosinolat. Das getrocknete Material wurde in insgesamt 8 ml 80% Methanol gekocht und die Glucosinolate im Überstand an Fast Flow DEAE-Sepharose (GE Healthcare, München) gebunden, die mit 0,5 M Kaliumacetat pH 5,0 equilibriert wurde. Die Eluation der Glucosinolate erfolgte ü/N bei Raumtemperatur durch die Inkubation der Sepharose mit Sulfatase (2,5-3 mg/ml).

Das resultierende Glucosinolatgemisch wurde in 900 µl H₂O_{bidest} aufgenommen, im Vakuumkonzentrator „BA-VC-300H“ (H. Saur Laborbedarf, Reutlingen) bis zur vollkommenen Trockenheit eingengt und in 300 µl H₂O_{bidest} wieder aufgenommen, wobei 100 µl der Analyse dienen.

Camalexininduktion und –extraktion aus *A. thaliana*-Blättern

(nach Glawischnig *et al.*, 2004)

Die Bildung von Camalexin wurde bei 6 Wochen alten *A. thaliana*-Pflanzen durch eine zweistündige Bestrahlung unter einer UV-Lampe bei 254 nm (VL-8.MC, Vilber Lourmat, Eberhardzell, Deutschland) induziert. Die Induktion erfolgte bei abgeschnittenen Rosettenblättern, die circa 18 cm von der Lichtquelle entfernt waren. Die Anordnung unter der UV-Lampe war gleichverteilt. Bei 5 verschiedenen Genotypen sah die Anordnung wie folgt aus:

1	4	2	5	3
2	5	3	1	4
3	1	4	2	5
4	2	5	3	1
5	3	1	4	2

Die Induktion begann immer um circa 10 Uhr morgens. Die induzierten Blätter wurden für 22 Stunden in einer Pflanzenkammer (Hereaus Vötsch, 19 °C, 12 Stunden Tag, 12 Stunden Nacht) inkubiert.

Nach der Inkubation wurde das Frischgewicht bestimmt und die Blätter in 400 µl 80 % Methanol für 2 h unter ständigem Schütteln bei 68 °C inkubiert. Der Überstand wurde an-

2 Materialien und Methoden

schließlich zweimal abzentrifugiert (18.000 xg, mindestens 10 min). Die Analyse des Camalexingehaltes erfolgte mit 100 µl des Überstandes.

Extraktion von Camalexin aus *A. thaliana*-Wurzelgewebe

(nach Siemens *et al.*, 2008)

Das Wurzelgewebe von 6 Wochen alten Pflanzen wurde vom Erdreich befreit, mit flüssigem Stickstoff für 20 Minuten schockgefrostet, lyophilisiert und bei -20 °C gelagert. 20 mg des gefriergetrockneten Materials wurde anschließend gemörsert und dreimal in 50% Methanol für eine Stunde bei 68 °C inkubiert. Nach der Vereinigung der Überstände erfolgte die Reduktion der Methanolphase im Vakuumkonzentrator „BA-VC-300H“ (H. Saur Laborbedarf, Reutlingen). Die wässrige Phase wurde dreimal in 600 µl Chloroform ausgeschüttelt. Nach der Vereinigung der Chloroformphase erfolgte die Reduktion bis zur vollkommnenen Trockenheit. Das Pellet wurde in 250 µl 100% Methanol resuspendiert und 100 µl davon für die Analyse verwendet.

Extraktion von GDIBOA

Für die Extraktion von GDIBOA wurde 0,3 g Blattmaterial in flüssigem Stickstoff gemörsert und in 300 µl Assaypuffer [20 mM HEPES pH 8,2; 14 mM β-Mercaptoethanol, 0,5 mM EDTA pH 8,0) aufgenommen und bei 18.000 xg für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 4 V Folchlösung (2:1 Chloroform:Methanol, 1% HCl) ausgeschüttelt. Alle Schritte erfolgten unter gekühlten Bedingungen bei 4 °C. Analysiert wurden 100 µl der oberen Phase.

Extraktion von Metaboliten für die Analyse mittels GC-TOF-MS

(nach Kesten, 2011)

Das Pflanzenmaterial wurde sofort nach der Ernte in flüssigem Stickstoff gefroren und eine ausreichende Menge in Safe-Lock Reaktionsgefäße (Eppendorf AG, Hamburg) überführt. Drei vorgekühlte Stahlkugeln (3,2 mm Durchmesser) wurden hinzugegeben und das Material in der Retschmühle „MM 300“ (Retsch GmbH, Hahn) für 3 min bei 100 Hz zermahlen. Die Einsätze der Kugelmühle wurden zuvor in flüssigem Stickstoff vorgekühlt, sodass das Material während des Vorgangs nicht auftaute. Vom zermahlenden Material wurden pro Probe 20 mg abgewogen und in Safe-Twist Reaktionsgefäße (Eppendorf AG, Hamburg) überführt. Das Material war dabei zu jeder Zeit gefroren. Es wurden zwei vorgekühlte Stahlkugeln, 40 µl interner Standard und 1 ml Extraktionspuffer (-15°C) hinzugefügt. Eine Leerprobe wurde auf die gleiche Weise behandelt. Die Proben wurden kurz gevortext und anschließend

auf Eis gekühlt. Es folgten drei Extraktionsschritte in der Kugelmühle „FastPrep-24“ (MP Biomedicals Germany GmbH, Eschwege) für jeweils 40 s bei einer Geschwindigkeit von 6,5 m/s im CoolPrep-Adapter. Jedem Extraktionsschritt folgte ein Kühlungsintervall von 1 min. Anschließend wurden die Proben für 6 min bei 900 U/min und 4°C inkubiert, worauf sich eine Zentrifugation für 3 min bei 18000 xg und 4°C anschloss. Die Überstände wurden abgenommen und auf Eis gelagert. Zum Sediment wurden erneut 1 ml Extraktionspuffer (-15°C) gegeben und die Extraktion wiederholt. Die Überstände wurden vereinigt und für 20 s gevortext. Es wurde 1 ml abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und im Vakuumkonzentrator „BA-VC-300H“ (H. Saur Laborbedarf, Reutlingen) bis zur absoluten Trockenheit für 3 h eingengt. Der Rest der Probe wurde als Reserve bei -20°C gelagert. Die eingengten Proben wurden über Nacht bei -20°C gelagert.

Derivatisierung (Methoximierung und Trimethylsilylierung) von Metaboliten für die Analyse mittels GC-TOF-MS

(nach Kesten, 2011)

40 mg Methoxyamin-Hydrochlorid wurden in 1 ml wasserfreiem Pyridin gelöst. 20 µl der Lösung wurden zu jeder Probe, einer Leerprobe und einer Qualitätskontrolle (QC) gegeben. Die QC enthält 28 Substanzen in bekannten Konzentrationen (Lisec *et al.*, 2006) und dient der Kontrolle des Derivatisierungsvorgangs. Die Proben wurden anschließend 90 min bei 30 °C und 1300 U/min inkubiert. Nach der Methoximierung wurden 180 µl MSTFA (Methyl-N-Trimethylsilyltrifluoracetamid) hinzugegeben das jeweils 1,8 µl FAMES- (Fatty Acid Methyl Ester-) und n-Alkan-Standard enthielt. Die Proben wurden 30 min bei 37°C und 1300 U/min inkubiert.

Die Zusammensetzung der Qualitätskontrolle, die Konzentration der Komponenten nach Lisec (2006) sowie die Zusammensetzung und Retentionszeiten des FAME-Retentionszeitstandards beziehungsweise des Alkan-Retentionszeitstandards sind in Kesten 2011 aufgeführt.

Extraktion von Metaboliten für die Analyse mittels LC-MS

6 Wochen alte Pflanzen wurden in Stickstoff gefroren und entweder direkt lyophilisiert oder auf -70 °C gelagert. 50 mg des lyophilisierten Materials wurden mit 250 µl des internen Standards (0,2 mg BiochininA, 0,2 mg 4-Methylumbelliferyl-β-Glucuronid in 100 % Methanol) sowie 250 µl 100% Methanol vermischt und unlösliche Stoffe bei 18.000 xg, 4 °C für 1 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet mit 500 µl 100% Methanol resuspendiert. Dieser Schritt wurde noch zweimal wiederholt, die Überstände

gesammelt und im Vakuumkonzentrator „BA-VC-300H“ (H. Saur Laborbedarf, Reutlingen) bis zur vollkommenen Trockenheit eingeengt. In diesem Zustand lassen sich die Proben bei -20 °C lagern. Für die Analyse erfolgte die Resuspendierung in 100 µl 100 % Methanol, wobei 5 µl zur Analyse verwendet wurden.

2.2.6 Methoden zur Analyse von Stoffgemischen

Hochdurchsatzflüssigchromatographie (HPLC)

Die HPLC-Analysen erfolgten mittels der Ultimate 3000 (Dionex, Thermo Scientific, Waltham, USA) mit einem PDA-100-Diodendetektor (Dionex, Thermo Scientific, Waltham, USA) und der Bedienungs-/Auswertungssoftware Chromeleon. Die Trennung wurde nach dem *reversed phase*-Prinzip durchgeführt, wobei eine LiChrospher® 100 RP-18-Säule (Durchmesser 5 µm, Durchflussrate 1 ml/min) zur Anwendung kam.

Für die Analyse der einzelnen Naturstoffe mittels HPLC wurden folgende Gradienten aus 100 % Methanol oder Acetonitril beziehungsweise Essigsäure und 0,3 % (v/v) Ameisensäure verwendet:

Der Nachweis von Zimt- und Cumarsäure erfolgte mittels eines 13-minütigen Gradienten von 30 bis 100% Methanol in 0,3 % (v/v) Ameisensäure bei 310 nm.

Indolinon, Hydroxyindolinon und HBOA ließen sich mit Hilfe eines 13-minütigen Gradienten von 25 bis 35% Methanol in 0,3 % (v/v) Ameisensäure bei 254 nm analysieren.

Indolinon aus Blattextrakten wurde mit einem 12-minütigen Gradienten von 10 bis 30 % Acetonitril nachgewiesen.

Die unterschiedlichen Glucosinolate wurden durch die Verwendung eines 42-minütigen Gradienten von 0 auf 100 % Methanol in 0,3 % (v/v) Ameisensäure bei 229 nm analysiert. Die Retentionszeiten der analysierten Glucosinolate sind in Tabelle 2.11 dargestellt.

Für den direkten Vergleich von HBOA und DIBOA war die Auftrennung durch einen Gradienten nicht geeignet. Die Separierung von HBOA und DIBOA erfolgte isokratisch über 20 Minuten mit 22 % Essigsäure in 0,3 % (v/v) Ameisensäure, wobei die Analyse bei 254 nm stattfand.

Zur Analyse von Camalexin kam eine Kombination aus der „P680 HPLC Pump“, dem „ASI-100 Automated Injector“, dem „PDA-100 Photodiode Array Detector“ (Dionex, Thermo Scientific, Waltham, USA) und dem „RF-10AXL Shimadzu Fluoreszenzdetektor“ (Shimadzu, Duisburg, Deutschland) zum Einsatz. Die Analyse von Camalexin erfolgte durch die Verwendung eines 7 minütigen Gradienten von 50 bis 100 % Methanol in 0,3 % (v/v) Ameisensäure. Die Detektion erfolgte bei 278 nm und mit Hilfe des Fluoreszenzdetektors

2 Materialien und Methoden

(Emission 318 nm, Detektion 370 nm). Camalexin konnte nach 8,6 min nachgewiesen werden.

Quantifizierung der identifizierten Metabolite

Die Retentionszeit der Substanzen bei den einzelnen HPLC-Programmen wurde durch Standards der jeweiligen Substanz bestimmt. Die Konzentration in den einzelnen Proben wurde mit Hilfe der Peakflächen von Standards bekannter Konzentration (2 - 0,002 mM) und der daraus gebildeten Eichgerade ermittelt:

Die Quantifizierung der identifizierten Glucosinolate (Tabelle 2.11) erfolgte anhand eines internen Standards (Benzylglucosinolat), dessen Stoffmenge bekannt war (0,05 μmol). Bei der Quantifizierung wurden die in Tabelle 2.11 angegebenen Responsfaktoren berücksichtigt. Die Konzentration wurde in Bezug auf das Trockengewicht des eingesetzten Materials berechnet.

Tabelle 2.11: Glucosinolate, die mit der HPLC detektierbar sind. Es sind sowohl Retentionszeiten als auch Responsfaktoren angegeben.

Glucosinolat	Retentionszeit in [min]	Responsfaktor
3-Methylsulphinylpropyl (3-msp)	7,2	1,50
4-Methylsulphinylbutyl (4-msb)	9,6	1,00
Benzylglucosinolat (OH-benzyl)	21,3	0,95
4-Methylthiobutyl (4-mtb)	21,8	1,00
Indol-3-ylmethyl (i-3-ym)	23,8	0,25
8-Methylsulphinyloctyl (8-mso)	27,5	1,00
4-Methoxyindol-3-ylmethyl (4mi-3-ym)	28,9	0,25
N-Methoxyindol-3-ylmethyl (Nmi-3-ym)	34,2	0,25

Metabolitanalysen mittels LC-MS

Die Analyse von komplexen Stoffgemischen mittels LC-MS erfolgte am Lehrstuhl „Biotechnologie der Naturstoffe“ der TU München von Prof. Schwab. Die Analysen und die Auswertung wurden von Dr. Thomas Hoffmann durchgeführt.

Metabolitanalysen mittels GC-TOF-MS

Für die GC-TOF-MS kam ein System aus „MultiPurposeSampler MPS“ (Gerstel, Mülheim an der Ruhr), „7890A GC System“ (Agilent Technologies, Böblingen) und „PegasusR 4D GCxGCTOFMS“ (Leco Instruments, Michigan, USA) zum Einsatz. Es wurde pro derivatisierter Probe 1 µl splitlos bei 230°C in den Gaschromatographen injiziert. Der Fluss des Trägergases Helium betrug 2 ml/min. Zur Trennung wurde eine „Ultra Inert DB-35MS“ Kapillarsäule (0,32 mm Innendurchmesser, 30 m Länge, 0,25 µm Filmdicke) (Agilent Technologies, Böblingen) verwendet. Das Ofentemperaturprogramm wurde 2 min isothermisch bei 85°C gefahren und anschließend um 15°C pro min bis auf 360°C erhöht. Die Transferlinie und die Ionenquelle wiesen eine Temperatur von 250°C auf. Der Aufnahmebereich lag zwischen 50 m/z und 700 m/z bei 20 Aufnahmen pro Sekunde.

Um Kontaminationen während der Extraktion und Derivatisierung festzustellen, wurden in beiden Schritten Leerproben in gleicher Weise behandelt. Die Effizienz der Derivatisierung und die Reproduzierbarkeit der Gerätefunktion wurden anhand der QC ermittelt. Die Detektorspannung wurde vor jedem Lauf so eingestellt, dass die Ionenzahl über den m/z-

Bereich des in der QC enthaltenen Ribitols einen Wert zwischen 8×10^6 und 10×10^6 aufwies. Um Sensitivitätsdefizite während eines Laufs zu ermitteln, wurde nach jedem Lauf nochmals eine QC analysiert. War eine Abweichung von mehr als 20% vom vorherigen Wert festzustellen, wurde der Versuch wiederholt.

Zur Dekonvolution, Peakzuordnung und Quantifizierung kam die ChromaTOF Software v4.24 (Leco Instruments, Michigan, USA) zum Einsatz. Die Basislinie wurde knapp über das Hintergrundrauschen gelegt. Die Glättung der Daten erfolgte über fünf Datenpunkte. Die durchschnittliche Peakbreite wurde mit drei Sekunden definiert. Nur Signale mit einem Signal-Rausch-Verhältnis über 10 wurden analysiert. Die Zuordnung der Peaks wurde mit Hilfe von kommerziellen und öffentlichen Massenspektrumsbibliotheken durchgeführt. Dabei kamen die NIST 08- (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, USA) und die „GOLM METABOLOME DATABASE“ (Hummel *et al.*, 2007) zum Einsatz. Zusätzlich zur ersten Zuordnung der Peaks anhand der Ähnlichkeiten der Massenspektren der Peaks zur Datenbank durch die ChromaTOF Software wurde eine händische Zuordnung anhand der Retentionszeitindizes und der selektiven Massen der Metabolite durchgeführt. Unbekannte Metabolite wurden anhand ihrer Retentionsindizes und selektiven Massen benannt.

Die Zuordnung aller Peaks erfolgte mittels einer ausgewählten Probe pro Lauf, in der alle Peaks festgestellt werden konnten. Diese Peaks wurden in eine Referenzliste übernommen, mit der die ChromaTOF Software eine Referenzmethode durchführen kann, d.h. die Peaks aller Proben werden automatisch anhand der Referenzliste zugeordnet. Die Bestimmung der Peakfläche erfolgt dann durch das System. Für jedes durchgeführte Experiment wurde eine neue Referenzliste angelegt, da es zwischen den Experimenten zu Sensitivitätsunterschieden des Geräts und zu Retentionszeitverschiebungen unter den Peaks kommen kann. Für die Quantifizierung wurden vier bis fünf selektive Massen eines jeden Metaboliten herangezogen.

Zur Datenanalyse wurden die Medianwerte aller ermittelten Signalintensitäten des internen Standards (Ribitol) gebildet. Die Ribitol-Signalintensität jedes Replikats wurde anschließend durch den Medianwert geteilt, um die Extraktionseffizienz zu erhalten. Mit dieser Extraktionseffizienz wurde die Signalintensität aller ermittelten Metaboliten jedes Replikats normalisiert. Der Medianwert der Signalintensitäten aller Metaboliten über alle Replikate wurde ermittelt. Analog zum internen Standard wurden die ermittelten Signalintensitäten jedes Metaboliten durch diesen Medianwert geteilt. Die so normalisierten Daten wurden zur weiteren Analyse verwendet. Die „Principal Component Analysis“ (PCA) wurde mit Hilfe des metaP-Servers erstellt (Kastenmüller *et al.*, 2011). Zusätzlich wurde er verwendet, um hoch- und herabregulierte Metaboliten auf „KEGG-Pathways“ (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) zu identifizieren. Die Signifikanz dieser Ergebnisse wurde mit Hilfe des

Zweistichproben-t-Tests der Microsoft Excel Software überprüft. Dabei wurde der heteroskedastische t-Test verwendet. Bei Ergebnissen des Tests, die 5 % nicht überschritten, wurden die Werte der Metaboliten als signifikant unterschiedlich definiert. Für jeden Genotyp und Linie wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen der ermittelten Metaboliten berechnet.

2.2.7 Methoden zur Untersuchung der Auswirkung von biotischem Stress auf *A. thaliana*

*Assay mit *Erysiphe cruciferarum**

Dieses Assay wurde in Kooperation und freundlicher Unterstützung von Dr. Corina Weis (Lehrstuhl für Phytopathologie der TU München, Prof. Hückelhoven) durchgeführt.

6 Wochen alte *A. thaliana*-Pflanzen wurden mit direkt von infizierten Pflanzen gewonnenen Sporen von *E. cruciferarum* gleichmäßig infiziert. Die Blätter der Pflanzen wurden 5 Tage nach Infektion phänotypisch charakterisiert und die gebildeten Conidiophoren pro Kolonie gezählt. Pro Wiederholung wurden von jedem Genotyp bei 5 Pflanzen je ein Blatt mit insgesamt mindestens 30 Kolonien ausgezählt. Dieses Experiment wurde 3 Mal wiederholt, so dass pro Genotyp mindestens 90 Kolonien ausgezählt wurden.

Für die bessere Quantifizierung der Conidiophoren wurden die Blätter in einem Ethanol-Eisessig-Gemisch (6:1) entfärbt und mit essigsaurer Tinte (25 % Essigsäure: 75% Tinte, königsblau 4001 Pelikan, Hannover) gefärbt.

*Assay mit *Botrytis cinerea**

Dieses Assay wurde in Kooperation und freundlicher Unterstützung von Dr. Corina Weis (Lehrstuhl für Phytopathologie der TU München, Prof. Hückelhoven) durchgeführt.

6 Wochen alte *A. thaliana*-Pflanzen wurden mit zweimal 1 µl einer *B. cinerea*-Sporensuspension (ca. 200.000 Sporen/ml H₂O_{bidest.} versetzt mit 20 mM KH₂PO₄ pH 6,4) betropft, 2 Tage unter einer Haube inkubiert und der Befall nach 3 bis 5 Tagen bewertet. Hierbei wurde zwischen befallen und nicht befallen unterschieden. Ein Blatt wurde als befallen gewertet, wenn es gelbe Verfärbungen aufwies, die über die Tropfstelle hinausgingen. Pro Pflanze wurden je 3 Blätter mit *B. cinerea*-Sporen infiziert.

3 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit ist es zu bestimmen, wie und mit welchen Konsequenzen in Bezug auf Metaboliten, Vitalität und biotische Interaktionen die DIBOA-Glucosid-Biosynthese von Mais (die *Bx*-Gene *Bx1* bis *Bx5* sowie *Bx8*) in eine andere Pflanze transferiert werden kann. Dazu wurde das Modellsystem *Arabidopsis thaliana* herangezogen und verschiedene Promotor-*Bx*-Gen-Konstrukte erstellt. Im Rahmen dieser Dissertation war eine erschöpfende Charakterisierung nur für die Gene *Bx1* und *Bx2* möglich. Für die anderen Gene wurde eine basale Charakterisierung der transgenen Pflanzen vorgenommen.

3.1 Transkription der einzelnen *Bx*-Gene unter der Kontrolle verschiedener Promotoren

Die Übertragung des DIBOA-Biosyntheseweges erfolgte mit Expressionskonstrukten, die sowohl konstitutive als auch induzierbare Promotoren aufwiesen. Eine starke konstitutive Genexpression der Gene *Bx1* bis *Bx5* und *Bx8* sollte durch die Verwendung des *CamV 35S*-Promotors gewährleistet werden. Dieser gilt jedoch als anfällig für transkriptionelle Genstilllegung (TGS). Deshalb sollten zusätzlich moderate Promotoren verwendet werden. Im Zuge der transgenen Expression der cyanogenen Glucosinolate führte dies zu einer besseren Endproduktausbeute (Geu-Flores *et al.*, 2009). So kamen der *Nos*-Promotor für die Kontrolle der *Bx1*-Genexpression und der *p2'*-Promotor für die Expression von *Bx2* und *Bx3* beziehungsweise *Bx4* und *Bx5* zur Anwendung. *Bx3* und *Bx5* wurden zusätzlich auf einer Transfer-DNA (T-DNA) beide unter der Kontrolle des 35S-Promotors als Tandemkonstrukt vereinigt (Abbildung 3.1).

Um die Anzahl der notwendigen transgenen Pflanzen zu reduzieren, wurde versucht, *Bx2* mit *Bx3* und *Bx4* mit *Bx5* zu kombinieren. Dazu wurden diese zu einem Transkript vereinigt, das über die virale 2A-Sequenz verbunden wurde. Diese 2A-Sequenz führt während der Translation zur Terminierung und Neuintiierung der Peptidsynthese, ohne dass das Ribosom die mRNA entlässt. Dadurch werden aus einer mRNA zwei Proteine gebildet (Donnelly *et al.*, 2001; Trichas *et al.*, 2008).

3 Ergebnisse

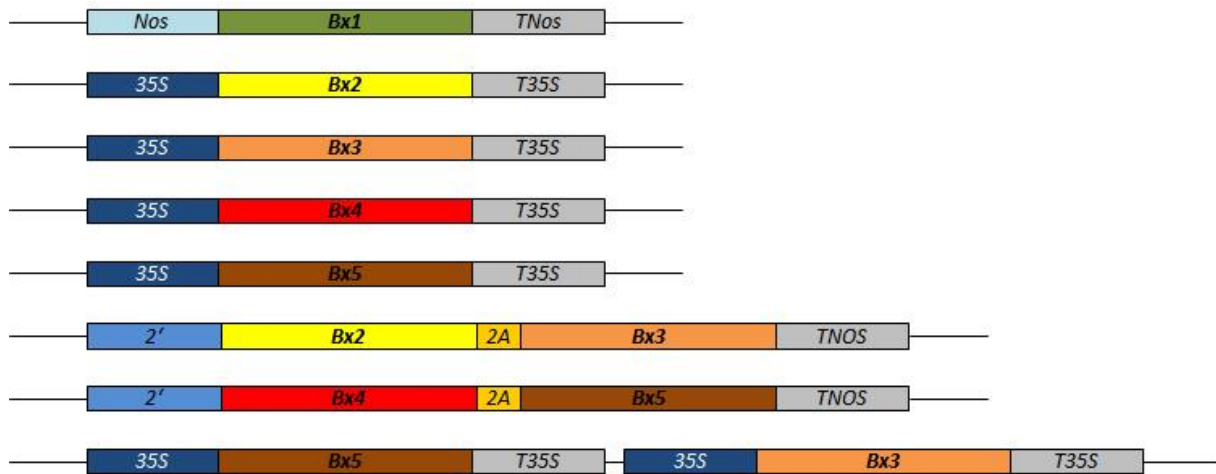


Abbildung 3.1: Schematische Übersicht der verwendeten Expressionskonstrukte.

Abgebildet sind sowohl die Einzelgenkonstrukte unter der Kontrolle des 35S- und des *Nos*-Promotors sowie die Konstrukte, in denen zwei *Bx*-Gene kombiniert wurden.

Für eine induzierbare *Bx1*- und *Bx2*-Transkription sind Transgene erstellt worden, die zum einen aus dem Gen für ein Aktivatorprotein (*AlcR*) bestehen, das unter der Kontrolle des 35S-Promotors transkribiert wird. Zum anderen wurde das Zielgen unter der Kontrolle eines aktivatorabhängigen Promotors (*AlcA*) gestellt. In Anwesenheit von Alkohol kann das Aktivatorprotein an den entsprechenden Promotor binden und die Expression des nachgeschalteten Gens aktivieren (Tomsett *et al.*, 2004). Eine ausführliche Charakterisierung der Pflanzenlinien mit induzierbarer *Bx1*- und *Bx2*-Transkription ist in der Masterarbeit von Dorothee Wozny zusammengefasst.

3.2 Charakteristika der einzelnen *Bx*-Gen-exprimierenden Pflanzenlinien

Alle Transgene, die ein einzelnes Gen unter der Kontrolle des 35S-Promotors transkribierten, wiesen eine ähnliche hohe mRNA-Konzentration im Verhältnis zur *GAPDH*-mRNA-Konzentration auf (Abbildung 3.2). Die beiden Transgene *35S::Bx1* und *35S::Bx2* waren circa um den Faktor sechs stärker exprimiert als das am schwächsten transkribierte Transgen *35S::Bx4*. *Bx1* unter der Kontrolle des *Nos*-Promotors zeigte eine zehnfach geringere Transkriptionsrate als das *35S::Bx1*-Transgen. Verglichen mit den 35S-Konstrukten zeigten die Konstrukte unter der Kontrolle des *p2'*-Promotors eine um circa ein Drittel geringere Transkriptionsrate. Hier wurde die Konzentration des 3'-gelegenen Gens im 2A-Fusionskonstrukt bestimmt.

Die schwächste Transkriptionsrate wiesen die Transgene *Bx3* und *Bx5* des Tandemkonstrukts auf. Sie war im Vergleich zu den Einzelgenkonstrukten etwa 20- respektive 50-mal geringer.

3 Ergebnisse

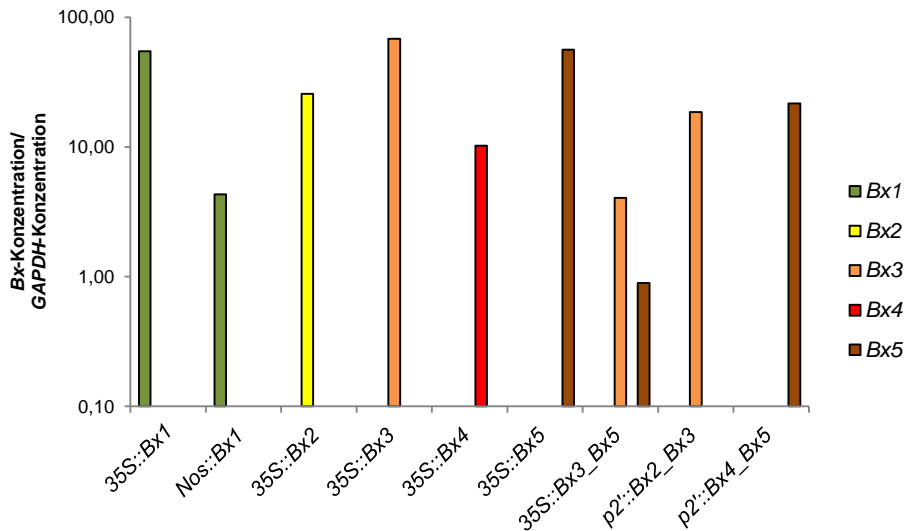


Abbildung 3.2: Transkriptionsraten der einzelnen Bx-Transgene.

Dargestellt ist die Transkriptmenge der einzelnen und kombinierten Bx-Transgene in separaten Linien. Für die Transgene, bei denen zwei Gene durch eine 2A-Sequenz kombiniert wurden, wurde die Transkriptmenge anhand des 3' auf der mRNA liegenden Gens bestimmt.

Um die Aktivität von BX2 bis BX5 in *A. thaliana* zu testen, wurden microsomale Fraktionen von Rosettenblättern mit den entsprechenden Substraten des DIBOA-Biosyntheseweges inkubiert und die entstandenen Produkte analysiert (Tabelle 3.1).

Zur Kontrolle wurden Microsomen von wildtypischen *A. thaliana Col-0*-Pflanzen isoliert. Für diese war kein Substratumsatz zu detektieren.

Wurden *Bx2*, *Bx3* und *Bx4* unter der Kontrolle des 35S-Promotors exprimiert, erfolgte in den Microsomen der Umsatz des jeweiligen für das P450-Enzym spezifischen Substrats (Tabelle 3.1). Die Umsatzrate lag in der Größenordnung der parallel untersuchten Maismicrosomen.

Bei beiden Pflanzen war die gebildete Produktmenge für BX3 am höchsten. Ein Umsatz von HBOA zu DIBOA konnte lediglich in Maismicrosomen nachgewiesen werden. Keine der *Bx5*-exprimierenden transgenen Pflanzen wies BX5-Aktivität auf.

Die microsomalen Fraktionen von Pflanzen mit paralleler Expression von zwei Bx-Genen zeigten einen geringeren Substratumsatz verglichen mit den jeweiligen Einzelgenstransformanten. So war der Umsatz von Indolinon zu Hydroxyindolinon durch BX3 in den 35S::*Bx3*-Microsomen im Vergleich zu 35S::*Bx3_Bx5*-Microsomen doppelt so hoch. Die Kombination von Bx-Genen durch eine 2A-Sequenz war nicht erfolgreich. Ausschließlich Microsomen aus Pflanzen, die das *p2::Bx4_Bx5*-Transgen integriert hatten, zeigten einen Umsatz von Hydroxyindolinon zu HBOA (BX4-Reaktion). Auch mit diesen Microsomen war kein Umsatz von HBOA zu DIBOA (BX5-Reaktion) nachzuweisen.

Die unterschiedlichen Transkriptionsraten der einzelnen Bx-Konstrukte für *Bx2* bis *Bx5* spiegeln sich nicht in der Aktivität der Microsomen wieder. Dies verdeutlicht ein Vergleich des Einzelgenkonstruktes für *Bx3* mit dem Konstrukt, in dem *Bx3* mit *Bx5* kombiniert ist. Die Transkriptionsrate von *Bx3* in Kombination mit *Bx5* liegt zehnmal unter der des Einzelgenkonstruktes. Dennoch ist die microsomale Aktivität lediglich um den Faktor 2 reduziert. Das Einzelgenkonstrukt für *Bx4* ist circa dreimal schwächer transkribiert als die

3 Ergebnisse

Fusion aus *Bx4* und *Bx5*-Gen mittels der 2A-Sequenz. Dennoch zeigen die microsomalen Fraktionen der einzelgenexprimierenden Pflanzen eine circa zehnfach stärkere Aktivität.

Pflanzen-Genkonstrukte	Substrat				Produkt in nmol/ng microsomalen Proteins			
	Indol 2,00 mM	Indolinon 1,00 mM	Hydroxy- indolinon 0,30 mM	HBOA 0,22 mM	Indolinon	Hydroxyin- dolinon	HBOA	DIBOA
<i>Col-0</i>	x				nn	nn	nn	nn
<i>Col-0</i>		x				nn	nn	nn
<i>Col-0</i>			x				nn	nn
<i>Col-0</i>				x				nn
<i>Mais</i>	x				3,40	nn	nn	nn
<i>Mais</i>		x				10,40	nn	nn
<i>Mais</i>			x				1,42	n
<i>Mais</i>				x				n
<i>35S::Bx2</i>	x				1,68	nn	nn	nn
<i>35S::Bx3</i>		x				5,26	nn	nn
<i>35S::Bx3_Bx5</i>		x				2,89	nn	nn
<i>35S::Bx3_Bx5</i>				x			nn	nn
<i>35S::Bx4</i>			x				2,02	nn
<i>35S::Bx5</i>				x				
<i>2::Bx2_Bx3</i>	x				nn	nn	nn	nn
<i>2::Bx2_Bx3</i>		x				nn	nn	nn
<i>2::Bx4_Bx5</i>			x				0,25	nn
<i>2::Bx4_Bx5</i>				x				nn

Tabelle 3.1: Umsatz von Stoffen der DIBOA-Biosynthese in *A. thaliana*- und Mais-Microsomen.
n-nachweisbar; nn-nicht nachweisbar

Durch die Kreuzung der *Bx2*, *Bx3*, *Bx4* und *Bx5* exprimierenden Pflanzen mit der *35S::Bx1*- beziehungsweise *Nos::Bx1*-Pflanzenlinie sollten alle Biosyntheseschritte vereint werden.

3 Ergebnisse

Pflanzen-Genkonstrukte	Produkt in $\mu\text{mol/mg}$ Frischgewicht			
	Indolinon	Hydroxy-indolinon	HBOA	DIBOA
<i>Col-0</i>	nn	nn	nn	nn
<i>35S::Bx1,Bx2</i>	22,10	3,35	nn	nn
<i>35S::Bx1,Bx2,Bx3,(Bx5)</i>	11,80	46,00	nn	nn
<i>35S::Bx1,Bx2,Bx3,Bx4,(Bx5)</i>	11,00	1,83	1,04	nn
<i>Nos::Bx1,35S::Bx2,Bx4</i>	1,50	0,27	nn	nn
<i>Nos::Bx1,35S::Bx3,(Bx5)</i>	nn	nn	nn	nn
<i>Nos::Bx1,35S::Bx2Bx3,Bx4,(Bx5)</i>	nn	0,36	?	nn

Tabelle 3.2: Nachweis der DIBOA-Biosynthesewegzwischenprodukte.
 nn-nicht nachweisbar,?-nachweisbar, jedoch nicht eindeutig identifizierbar

Für die Kreuzungen standen die Pflanzenlinien mit den Monogenkonstrukten für *Bx1*, *Bx2* und *Bx4* unter der Kontrolle des *35S*-Promotors zur Verfügung. Zusätzlich wurde eine Pflanzenlinie eingekreuzt, die *Bx1* unter der Kontrolle des *Nos*-Promotors exprimierte. Die Expression von *Bx3* und *Bx5* erfolgte mit Hilfe des Tandemkonstruktes (Abbildung 3.1).

Die Benzoxazinoïdaufreinigung erfolgte aus Blättern sechs Wochen alter Pflanzen der gekreuzten Linien (Tabelle 3.2). Pflanzen mit *35S::Bx1*-Transgen akkumulierte deutlich mehr Biosyntheseprodukte als Pflanzen mit dem moderaten *Nos::Bx1*-Transgen. Blattextrakte von *Nos::Bx1 x 35S::Bx2*- als auch *35S::Bx1 x 35S::Bx2*-Pflanzen wiesen geringe Mengen Hydroxyindolinon auf. Dies deutet darauf hin, dass *A. thaliana* in der Lage ist, Indolinon in Hydroxyindolinon umzusetzen. Pflanzen, die *Bx1*, *Bx2*, *Bx3* und *Bx4* mit Hilfe des *35S*-Promotors transkribierten, akkumulierten HBOA. Ob auch *Nos::Bx1,35S::Bx2,Bx3,Bx4*-Pflanzen HBOA aufweisen, konnte nicht geklärt werden. Die chromatographische Auswertung der Blattextrakte dieser Pflanzen zeigte einen Peak zur Retentionszeit von HBOA. Aufgrund der geringen Menge war das Spektrum dieses Peaks nicht eindeutig als HBOA zu identifizieren.

Während *35S::Bx1,Bx2,Bx3,Bx4,Bx5*-Pflanzen signifikante HBOA-Konzentrationen aufwiesen, war DIBOA in diesen Pflanzen nicht nachweisbar. Wie im *in vitro*-Test scheint *Bx5* auch *in vivo* in diesen Pflanzen nicht funktional exprimiert zu sein.

Ein Problem könnte die geringe Transkriptionsrate des *Bx3/Bx5*-Kombinationskonstruktes sein. Beide Gene wiesen die niedrigsten Transkriptionsraten von allen getesteten Konstrukten auf. Allerdings spricht die Aktivität von *Bx3* gegen ein Problem auf Ebene der

Transkription. Das mit *Bx5* kombinierte *Bx3*-Gen zeigt im Vergleich zu *Bx5* eine ähnliche Transkriptionsrate. Im Gegensatz zu *Bx5* reicht die *Bx3*-Expression in *35S::Bx1,Bx2,Bx3,Bx4,Bx5*-Pflanzen aus, um genügend Hydroxyindolinon für die HBOA-Biosynthese bereitzustellen.

Dies deutet auf Probleme mit der Translation hin. Hierbei könnte die speziesspezifische Verwendung von bestimmten Codons im offenen Leserahmen des *Bx5*-Transgens eine Rolle spielen. Um dies auszuschließen, wurde die Sequenz des ursprünglich maisspezifischen *Bx5*-Leserahmens an die Codonverwendung von *A. thaliana* angepasst.

Die *Bx5*-Transkriptionsraten in Pflanzen mit dem maisspezifischen *35S::Bx5*-Transgen (*35S::ZmBx5*) und dem *35S::Bx5*-Transgen, dessen Codonverwendung an *A. thaliana* angepasst wurden (*35S::AtBx5*), lagen über der von GAPDH. Mit einer Western-Blot-Analyse der microsomalen Fraktionen dieser Pflanzen sollte geklärt werden, ob BX5 translatiert wird (Abbildung 3.3). Sie zeigt, dass in beiden getesteten microsomalen Fraktionen von *Bx5*-transkribierenden Pflanzen BX5 nachweisbar ist. Die BX5-Signalintensität ist in der microsomalen Fraktion von Pflanzen mit *ZmBx5*-Transgen stärker als von Pflanzen mit *AtBx5*-Transgen, so dass davon auszugehen ist, dass die speziesspezifische Verwendung von bestimmten Codons im offenen Leserahmen keine Auswirkung auf die *Bx5*-Translation in *A. thaliana* hat. Verglichen mit der Akkumulation des BX5-Proteins in fünf Tage alten Maiskeimlingen ist die BX5-Konzentration in *A. thaliana* geringer.

Im Vergleich mit dem *35S::ZmBx5*-Transgen weist das *35S::Bx2*-Transgen eine ähnlich starke Transkriptionsrate auf. Dennoch zeigt die Western-Blot-Analyse von Microsomen aus *35S::Bx2*-Pflanzen eine deutlich höhere BX2-Konzentration verglichen mit Maismicrosomen.

3 Ergebnisse

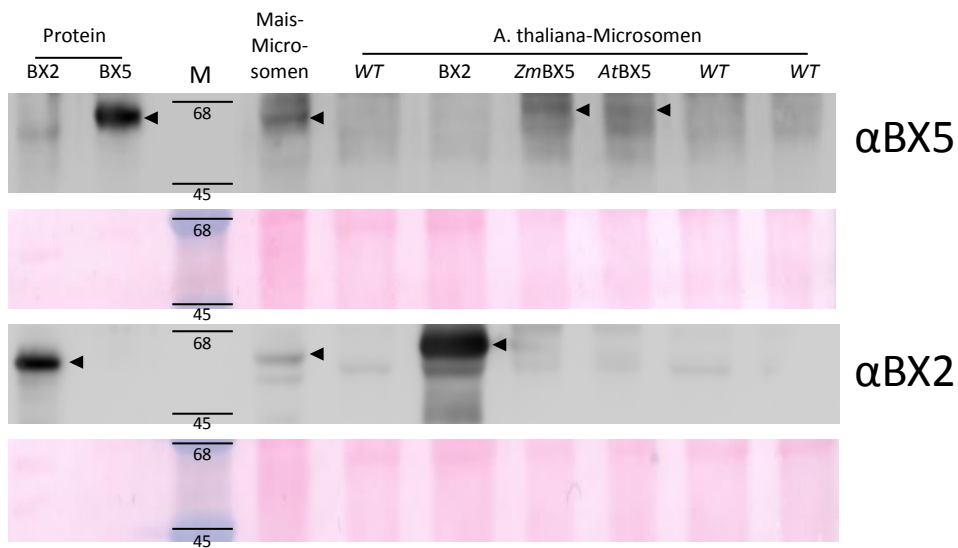


Abbildung 3.3: Western-Blot-Analyse von microsomalen Fraktionen Bx2- und Bx5-exprimierender Pflanzen.

Getestet wurden 22 µg microsomalen Fraktionen auf die Akkumulation des BX2- (αBX2) beziehungsweise des BX5-Proteins (αBX5). Microsomale Fraktionen der folgenden Pflanzen wurden analysiert: 5 Tage alte etiolierte Maiskeimlinge (Mais), wildtypische *A. thaliana*-Pflanzen (WT), *A. thaliana*-Pflanzen mit 35S::*Bx2*-Transgen (BX2), *A. thaliana*-Blätter mit 35S::*ZmBx5*-Transgen (*ZmBX5*) und *A. thaliana*-Pflanzen mit 35S::*AtBx5*-Transgen (*AtBX5*). Für beide Blots wurden die gleichen Maismicrosomen verwendet. Als Kontrolle dienten 40 ng des jeweiligen heterolog exprimierten Proteins. Als Ladekontrolle diente die Anfärbung der Nitrocellulosemembran mit Ponceau-Rot. Die Markerbanden (M) entsprechen 45 und 68 kDa.

3.3 Charakterisierung von *Bx1*- und *Bx2*-exprimierenden Pflanzen

3.3.1 Bildung von Indol und Indolinon in transgenen Pflanzen

Für eine zuverlässige Extraktion des intrazellulären Indols und dessen Quantifizierung mittels HPLC ist Indol zu flüchtig. Aus diesem Grund wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Ted Turling in Neuchâtel durch Natalie Veyrat der Gehalt an Indol gemessen, der über 3 Stunden von *A. thaliana*-Pflanzen abgegeben wurde. Die Ergebnisse sind im Anhang dargestellt (Abbildung 5.2). Sie zeigen, dass durch die heterologe Expression des *Bx1*-Gens ein Anstieg der Indolfreisetzung zu beobachten war. Ein morphologischer Unterschied zwischen wildtypischen *Arabidopsis* und Pflanzen mit 35S::*Bx1*-Transgen bestand nicht (Abbildung 3.5). Die Daten weisen auf eine Verbindung zwischen der Transkriptionsrate von *Bx1* und der Freisetzung des Indols hin (vergleiche Abbildungen 3.2 und 5.2). Pflanzen, die *Bx1* unter der Kontrolle des 35S-Promotors exprimierten, gaben circa 4 ng Indol über eine Dauer von 3 Stunden an die Umgebung ab. Wurde *Bx1* unter der Kontrolle des *Nos*-Promotors exprimiert, war sowohl die Transkriptionsrate als auch die Indolabgabe im Vergleich zu 35S::*Bx1*-Pflanzen um ein Zehntel niedriger. *Bx2*-exprimierende Pflanzen emittierten wie wildtypische Pflanzen keine signifikanten Mengen Indol.

3 Ergebnisse

Darüber hinaus zeigte die Analyse des Indolinongehalts in wildtypischen sowie transgenen Pflanzen, dass durch BX2 Indol in planta zu Indolinon umgesetzt wurde (Abbildung 3.4). Eine starke *Bx1*-Transkription durch die Kontrolle des 35S-Promotors führte zusammen mit dem 35S::*Bx2*-Transgen zu einer signifikant höheren Indolinonakkumulation im Vergleich zu *Nos>::Bx1 x 35S>::Bx2*-Pflanzen.

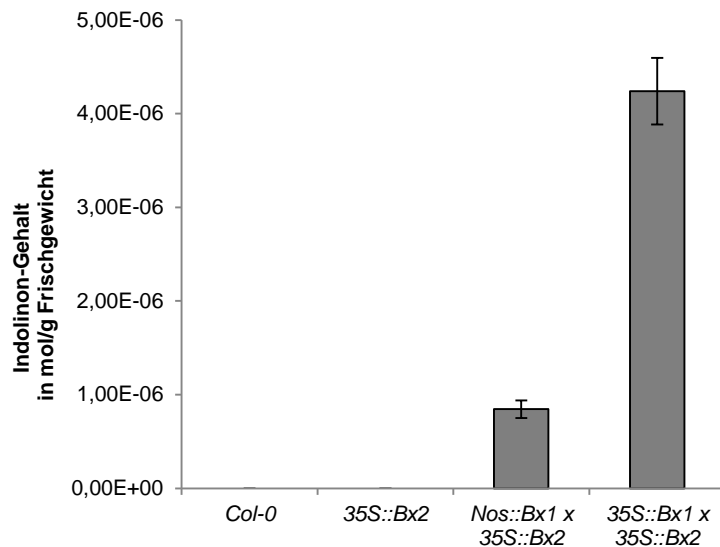


Abbildung 3.4: Indolin-2-on-Gehalt von Kreuzungen aus verschiedenen *Bx1*- und 35S::*Bx2*-Transgenen.

Der Gehalt wurde für Rosettenblätter sechs Wochen alter Pflanzen bestimmt, die noch keine Infloreszenz gebildet hatten. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung von drei Replikaten.

Interessant ist zudem, dass die Expression von *Bx2* allein nicht zu einer detektierbaren Akkumulation von Indolinon führte. Daraus folgt, dass in *Col-0*-Pflanzen nicht genügend Indol verfügbar ist, um Indolinon zu bilden.

3.3.2 Morphologie *Bx1*- und *Bx2*- exprimierender Pflanzen

Alle Pflanzen, in denen ein einzelnes *Bx*-Gen exprimiert war, zeigten unabhängig vom verwendeten Promotor einen wildtypischen Phänotyp (Abbildung 3.5). Die Kreuzung aus *Nos>::Bx1*-Pflanzen mit den 35S::*Bx2*-Pflanzen entwickelte sich ebenfalls wie *Col-0*-Pflanzen. Wurden hingegen *Bx1* und *Bx2* je unter der Kontrolle des 35S-Promotors in einer Pflanze exprimiert, war bereits nach 12 Tagen ein stark reduziertes Wachstum der Keimlinge im Vergleich zum Wildtyp zu beobachten. Die ersten echten Blätter hatten keine wildtypisch runde Form, sondern liefen spitz zu und waren kelchförmig nach oben gewandt. Die 35S::*Bx1 x 35S>::Bx2*-Pflanzen konnten den Wachstumsrückstand gegenüber allen anderen Pflanzenlinien nicht aufholen. Im Gegensatz zu den ersten beiden Rosettenblättern waren die darauffolgenden Rosettenblätter wildtypisch. Die Rosette blieb im weiteren Verlauf des Wachstums gedrungen und war mit circa 3 cm etwa halb so groß wie *Col-0*-Rosetten. Die auswachsenden Infloreszenzen wiesen an ihren Blütenständen mehr als zwei Tragblätter

3 Ergebnisse

auf. Eine weitere Arbeit mit $35S::Bx1 \times 35S::Bx2$ -Pflanzen wurde dadurch erschwert, dass sowohl ihre männlichen als auch weiblichen Geschlechtsorgane steril waren.

Kreuzungen von $35S::Bx1$ -Pflanzen mit zwei unabhängigen $Bx2$ -Transgenen (Vektor $pBar_35S::Bx2$ und $p4/1_35S::Bx2$) resultierten in identischen morphologischen Phänotypen.

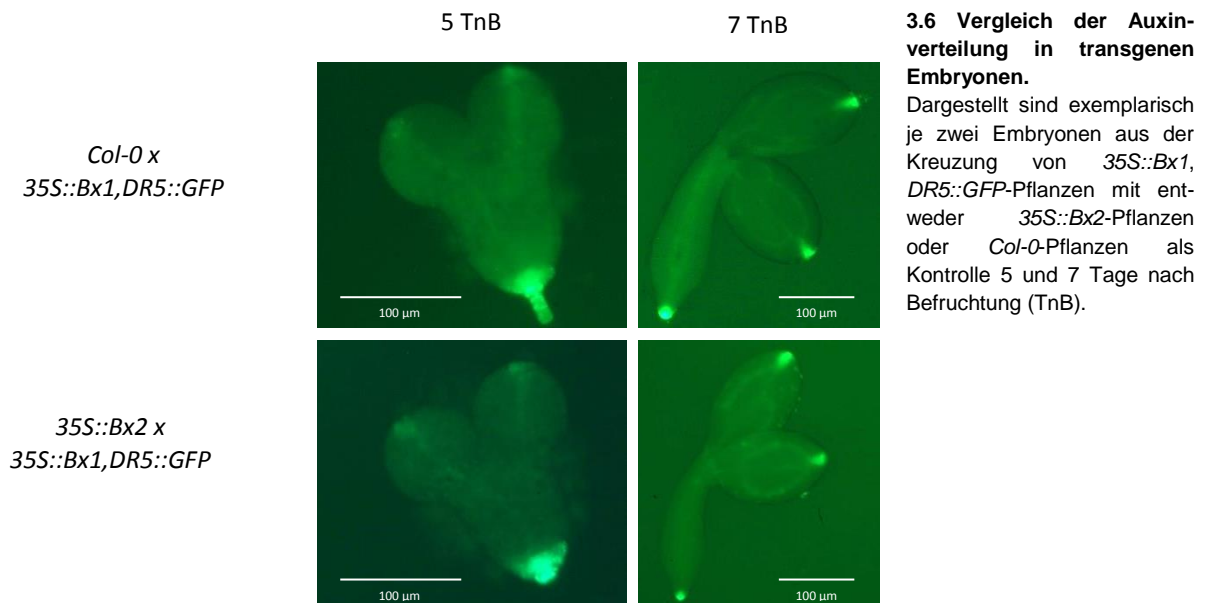


Durch die Verwendung einer Reporterlinie, die es ermöglichte, die Verteilung von Auxin in der Pflanze nachzuvollziehen, sollte geklärt werden, ob der Phänotyp des Keimlings auf eine veränderte Auxinverteilung zurückzuführen war. Diese Reporterlinie exprimierte das grünfluoreszierende Protein (GFP) unter dem auxinabhängigen *DR5*-Promotor (Chandler *et al.*, 2007). Sie wurde in einem ersten Schritt mit $35S::Bx1$ -Pflanzen gekreuzt. Die homozygoten Nachkommen dieser Kreuzung wiesen keine Unterschiede zu Nachkommen

3 Ergebnisse

der *DR5::GFP*-Reporterlinie auf. Sie wurden in einem zweiten Schritt mit Individuen der *35S::Bx2*-Linie gekreuzt und deren Nachkommen auf Unterschiede in der Auxinverteilung untersucht. Als Kontrolle erfolgte parallel die Kreuzung von homozygoten *35S::Bx1* x *DR5::GFP*-Pflanzen mit *Col0*-Pflanzen.

Die Analyse der Embryonen in verschiedenen Stadien der Embryogenese zeigte keine Unterschiede in der Entwicklung und in den Auxinmaxima zwischen Pflanzen, die zusätzlich zu *GFP* auch *Bx1* beziehungsweise *Bx1* und *Bx2* exprimierten (Abbildung 3.6).



Alle untersuchten transgenen Keimlinge wiesen die gleichen Auxinmaxima an der Spitze des Hypokotyls sowie an der Spitze der beiden Anlagen der späteren Kotyledonen auf.

3 Ergebnisse

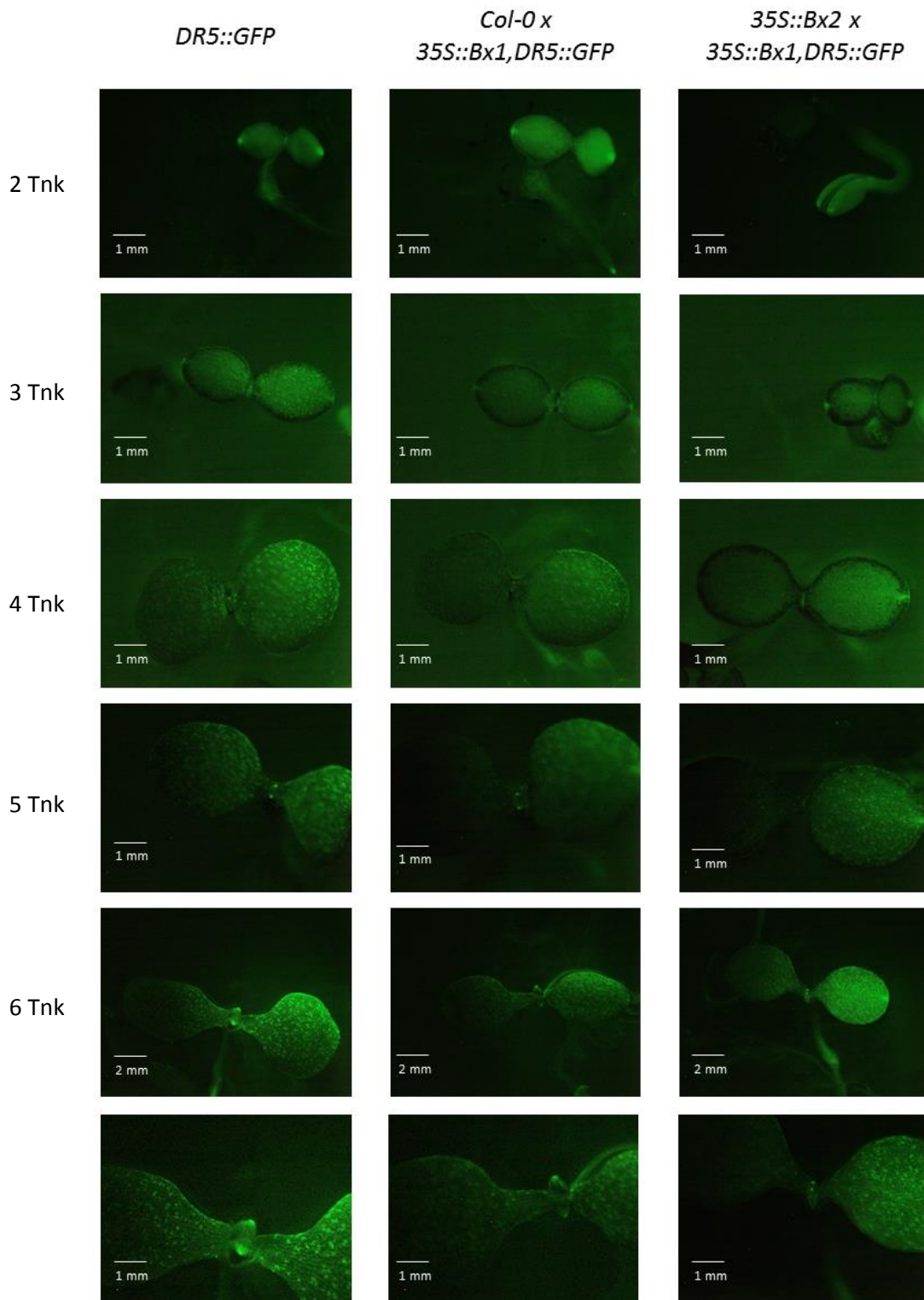


Abbildung 3.7: Vergleich der Auxinverteilung in transgenen Keimlingen.

Gezeigt sind Keimlinge, die neben dem *DR5::GFP* das *Bx1* und *Bx2*-Transgen enthielten, im Vergleich mit Keimlingen ohne *Bx2*-Transgen, 2 bis 6 Tage nach der Keimung (Tnk).

Die Keimlinge dieser Kreuzungen allerdings offenbarten bereits nach drei Tagen sichtbare Unterschiede (Abbildung 3.7). Aus der Analyse von mindestens 15 Keimlingen aus sechs verschiedenen Schoten pro Genotyp ging hervor, dass Pflanzen, die sowohl *Bx1* als auch *Bx2* exprimierten, schon nach zwei Tagen ein vermindertes Wachstum im Vergleich zu den Kontrollkeimlingen aufwiesen. Diese waren nach zwei Tagen bereits geöffnet und wiesen Auxinmaxima an den Blattspitzen sowie zwischen den Keimblättern auf. *Bx1*/*Bx2*-exprimierende Keimlinge waren noch nicht geöffnet. Es waren lediglich die Auxinmaxima an den Blattspitzen deutlich zu sehen.

Am dritten Tag nach der Keimung erschienen ihre Kotyledonen kleiner, verglichen mit den Kontrollpflanzen desselben Alters. Sie entsprachen in ihrer Morphologie den Kontrollkeimlingen des Vortags. Die beiden Auxinmaxima an der Spitze des angelegten Blattpaares waren nicht als distinkte Punkte zu erkennen, sie bildeten vielmehr eine Linie zwischen den beiden Kotyledonen.

Am vierten Tag nach der Keimung waren *Bx1*- und *Bx2*-exprimierende Keimlinge vergleichbar mit Kontrollkeimlingen vom dritten Tag. Die Auxinmaxima der Kontrollkeimlinge konnten am vierten Tag deutlich als einzelne Punkte unterschieden werden. Im Vergleich zu Triplemutanten waren die Außenseiten der Kotyledonen nach unten gewölbt. Dies war am Tag fünf nach der Keimung auch bei *Bx1*/*Bx2*-exprimierenden Keimlingen der Fall; im Unterschied zu vier Tage alten Kontrollkeimlingen erschienen die zentralen Auxinmaxima enger beieinander. Ein Tag später waren sie in *Bx1*/*Bx2*-exprimierenden Keimlingen weiter auseinander gerückt und die Anlagen der ersten Blätter waren zu erkennen, vergleichbar mit den Kontrollpflanzen am fünften Tag nach der Keimung.

3.3.3 Auswirkung der *Bx*-Genexpression auf den Metabolismus

Eine möglichst umfangreiche Metabolitanalyse sollte Aufschluss darüber geben, wie die Expression von *Bx1* und *Bx2* das Metabolom der Pflanzen beeinflusst. Der erste Schritt hierzu bildete eine gaschromatographische Auftrennung von Pflanzenextrakten. Diese Analyse erfolgte in Zusammenarbeit mit Christopher Kesten und ist in der Masterarbeit (Kesten, 2011) detailliert beschrieben.

In der Analyse, in der 14 Tage alte, auf Selektionsmedium angezogene Pflanzen verwendet wurden, unterschieden sich lediglich *35S::Bx1* x *35S::Bx2*-Pflanzen von den anderen getesteten Transgenen (Abbildung 3.8). Unterschiede zeigten sich für Phenylalanin, 4-Aminobutyrat (GABA), Asparagin, Glutamin und Cystein, Metabolite die darauf hindeuten, dass die Pflanzen gestresst waren.

3 Ergebnisse

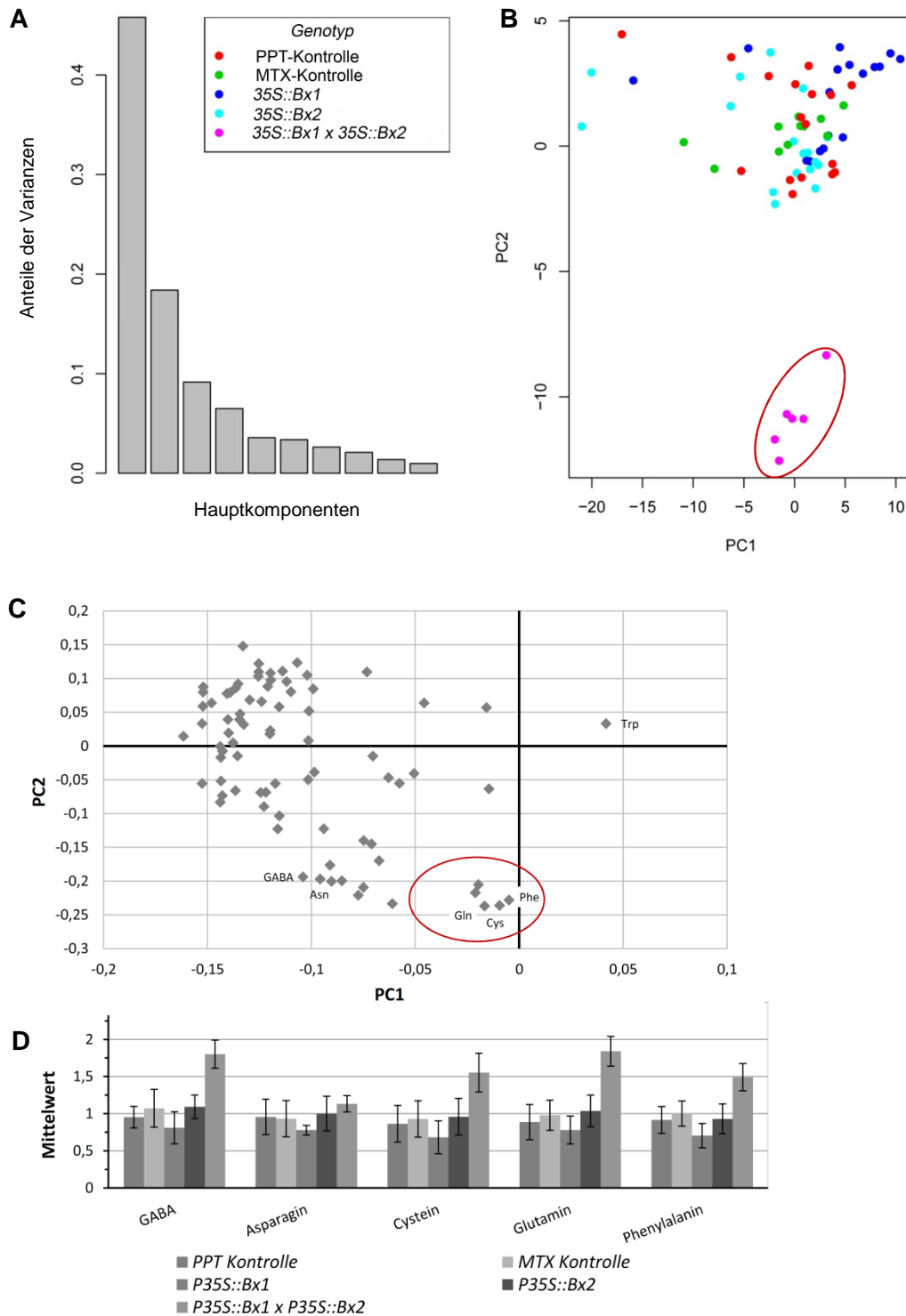


Abbildung 3.8: Hauptkomponentenanalyse der Bx1- und Bx2-exprimierenden Pflanzen.

Vergleich der Metabolome der Kreuzung 35S::Bx1 x 35S::Bx2 mittels Hauptkomponentenanalyse. **A** Verteilung der Varianzen der Hauptkomponenten **B** Hauptkomponentenanalyse **C** Abbildung der PCA Loadings mit Angabe der einzelnen Metabolite, die für die unterschiedliche Gruppierung der Metabolome verantwortlich sind. GABA: 4-Aminobutyrat, Asn: Asparagin, Gln: Glutamin, Cys: Cystein, Phe: Phenylalanin, Trp: Tryptophan **D** Quantifizierung der Metabolite, die den größten Unterschied aufweisen. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung von sechs Replikaten.

Auf Grund der Sterilität der 35S::Bx1 x 35S::Bx2-Pflanzen musste auf heterozygote Pflanzenlinien zurückgegriffen werden, die eine Selektion auf die entsprechenden Marker

3 Ergebnisse

Phosphinothricin (PPT) beziehungsweise Methotrexat (MTX) mit sich brachte. Pflanzen, die ausschließlich den jeweiligen Marker exprimierten, unterschieden sich unter Selektionsdruck in den GC-MS-Analysen von wildtypischen, nicht selektierten Pflanzen. Um eine Vergleichbarkeit der einzelnen Linien zu gewährleisten, wurden stets 14 Tage alte Pflanzen verwendet. Allerdings zeigte sich bereits zu diesem Zeitpunkt ein deutlicher optischer Unterschied zwischen *35S::Bx1 x 35S::Bx2*-Pflanzen und den anderen transgenen Pflanzenlinien.

Mit der gaschromatographischen Analyse konnten die Zwischenprodukte der DIBOA-Biosynthese nicht nachgewiesen werden. Zusätzlich mussten für diese Methode schwer verdampfbare beziehungsweise leicht zersetzbare Metabolite der Pflanzenextrakte derivatisiert werden. Die Derivatisierungseffektivität ist für jeden Metaboliten unterschiedlich und beeinflusst die Quantifizierung einzelner Bestandteile der Extrakte.

Deswegen wurde für eine weitere Metabolomanalyse eine flüssigchromatographische Auftrennung (LC-MS) von Pflanzenextrakten verwendet. Dieser ging eine einstufige Methanolextraktion voraus. Zusätzlich wurde auf die Analyse von *35S::Bx1 x 35S::Bx2*-Pflanzen verzichtet. Dies brachte den Vorteil, dass homozygote Pflanzenlinien verwendet werden konnten, die nach sechswöchigem Wachstum morphologisch miteinander vergleichbar waren und nicht selektiert werden mussten.

Die Analyse von Methanolextrakten aus Rosettenblättern sechs Wochen alter Pflanzen mittels LC-MS ergab, dass sich die Metabolitzusammensetzung der getesteten Pflanzenlinien kaum unterschied. Lediglich zwei Metabolite zeigten in *Nos::Bx1 x 35S::Bx2*-Pflanzen eine unterschiedliche Konzentration (Abbildung 3.9). Diese akkumulierten Indolinon und in vergleichbaren Mengen einen weiteren Stoff, der ein Molekülmasse von 311 aufwies und der Summenformel $C_{15}H_{24}N_2O_5$ besaß, jedoch nicht identifiziert werden konnte.

3 Ergebnisse

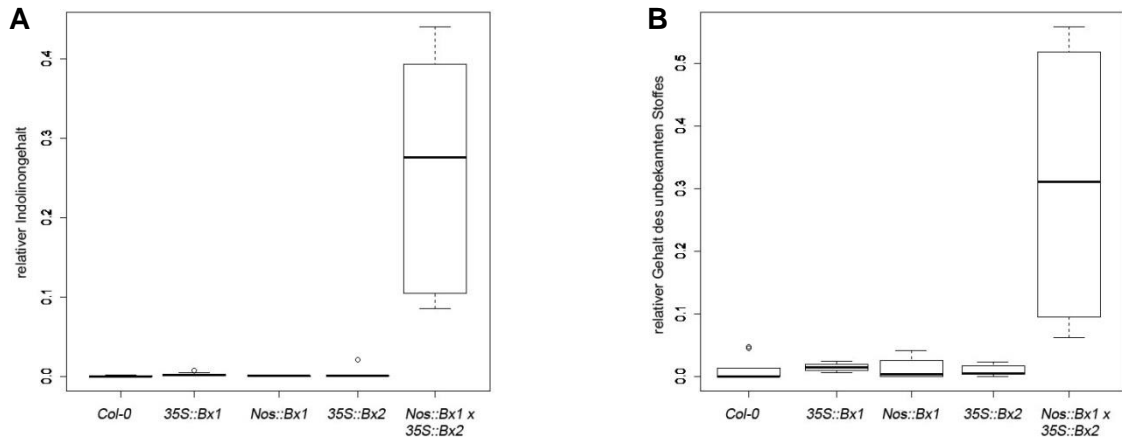


Abbildung 3.9: LC-MS-Analyse von *Bx1*- und *Bx2*-exprimierenden Pflanzen im Vergleich zu *Col-0*.

Die Methanolextraktion von 6 Wochen alten *A. thaliana*-Rosetten zeigt die Akkumulation von Indolinon und einem weiteren unbekanntem Stoff in *Nos::Bx1 x 35S::Bx2*-Pflanzen. **A** Boxplot des relativen Gehaltes von Indolinon in den getesteten Pflanzenlinien. **B** Boxplot des relativen Gehaltes des unbekanntem Stoffes in den getesteten Pflanzenlinien. Pro Pflanzenlinie wurden 10 Pflanzen untersucht.

Zur weiteren Charakterisierung des unbekanntem Metaboliten wurden homozygote *AlcA::Bx1 x 35S::Bx2*-Pflanzen verwendet. Die alkoholinduzierte *Bx1*-Expression und die daraus resultierende alkoholabhängige Indolinonsynthese in *AlcA::Bx1 x 35S::Bx2*-Pflanzen wurde in der Masterarbeit von Dorothee Wozny (2012) zusammengefasst.

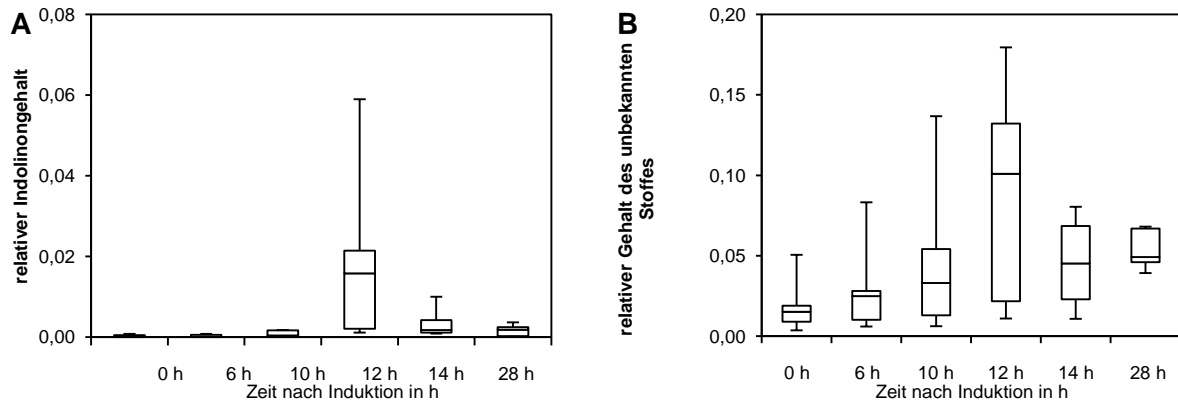


Abbildung 3.10: Induktion der Indolinonsynthese in *AlcA::Bx1 x 35S::Bx2*-Pflanzen.

6 Wochen alte *AlcA::Bx1 x 35S::Bx2*-Pflanzen wurden mit Alkohol induziert und Proben nach 0 bis 28 Stunden genommen. Boxplot der mittels LC-MS Analyse ermittelten Gehalte an **A** Indolinon und **B** des unbekanntem Stoffes, relativ zu einem internen Standard. Pro Zeitpunkt wurden Proben von 5 Pflanzen untersucht.

Mit Hilfe der Induktion von *AlcA::Bx1 x 35S::Bx2*-Pflanzen sollte die Kinetik der Akkumulation des unbekanntem Stoffes aufgeklärt werden (Abbildung 3.10). Die Ergebnisse der LC-MS-Analyse von alkoholinduzierten *AlcA::Bx1 x 35S::Bx2*-Pflanzen zeigten ein Maximum der Indolinonakkumulation nach 12 Stunden, wobei der Indolinongehalt innerhalb weiterer 16 Stunden wieder abfiel. Die Kinetik des unbekanntem Stoffes folgt der des Indolinons. Dessen Gehalt stieg vom Zeitpunkt der Induktion kontinuierlich an und war ebenfalls 12 Stunden nach der Induktion am höchsten. Im Vergleich mit dem internen Standard ist der unbekanntem

3 Ergebnisse

Metabolit höher konzentriert als Indolinon. Ein direkter Vergleich der beiden Metaboliten ist mit dieser Methode nicht möglich. Im Gegensatz zum Indolinon bleibt die Konzentration des unbekanntes Metaboliten auch 16 Stunden nach dem Maximum gegenüber dem Ausgangswert erhöht.

3.3.4 Analyse abwehrrelevanter Stoffe

Zur Abwehr von Pathogenen bilden *A. thaliana*-Pflanzen aliphatische sowie indolische Glucosinolate und Camalexin. Die indolischen Glucosinolate und Camalexin werden ausgehend von Tryptophan synthetisiert, also wird für ihre Synthese ebenfalls Indol benötigt. In einem ersten Schritt sollte getestet werden, ob die transgenvermittelte Indol- und Indolinonsynthese Einfluss auf die Akkumulation der konstitutiv synthetisierten Glucosinolate hat.

Die Untersuchungsergebnisse zeigten, dass der Glucosinolatgehalt von Rosettenblättern sechs Wochen alter, wildtypischer *Arabidopsis*-Pflanzen sich nicht signifikant von denen unterschied, die ein einzelnes *Bx*-Gen exprimierten (Abbildung 3.11). Die Expression von *Bx1* und *Bx2* zeigte ebenfalls keinen Einfluss auf die Glucosinolatsynthese. Sowohl die Konzentration der indolischen Glucosinolate, der aliphatischen Glucosinolate als auch die Gesamtglucosinolatkonzentration waren für alle transgenen Pflanzen nicht signifikant unterschiedlich zu wildtypischen Pflanzen.

3 Ergebnisse

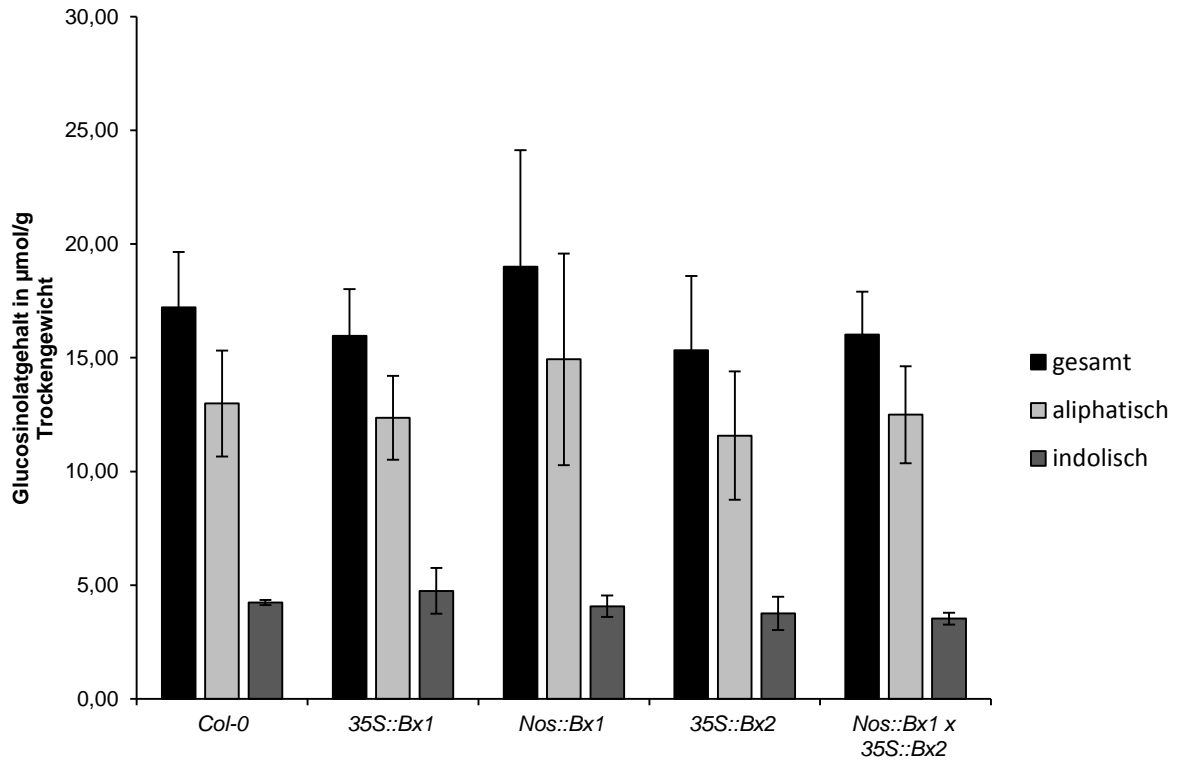


Abbildung 3.11: Glucosinolatgehalt in sechs Wochen alten *A. thaliana*-Blättern.

Angegeben sind die Glucosinolatkonzentrationen von Rosettenblättern sechs Wochen alter *A. thaliana*-Pflanzen. Dabei wird zwischen dem Gesamtglucosinolatgehalt (schwarz), dem Gehalt an aliphatischen Glucosinolaten (hellgrau) und dem Gehalt an indolischen Glucosinolaten (dunkelgrau) unterschieden. Das Experiment wurde zweimal mit je drei Replikaten wiederholt. Der Signifikanztest erfolgte mit Hilfe einer Varianzanalyse. Die Fehlerbalken bilden die Standardvariation von drei Replikaten ab.

Camalexin wird in *A. thaliana* konstitutiv in geringen Mengen in der Wurzel gebildet (Siemens *et al.*, 2008; Nongbri *et al.*, 2012). Große Mengen werden als Antwort auf biotische und abiotische Einflüsse gebildet. Es ist das Hauptphytoalexin in *A. thaliana* (Glawischnig *et al.*, 2004).

Eine Untersuchung des Camalexingehaltes in der Wurzel zeigte, dass sich dieser in transgenen *Bx1/Bx2*-Pflanzen nicht von dem wildtypischer Pflanzen unterscheidet (Abbildung 3.12).

3 Ergebnisse

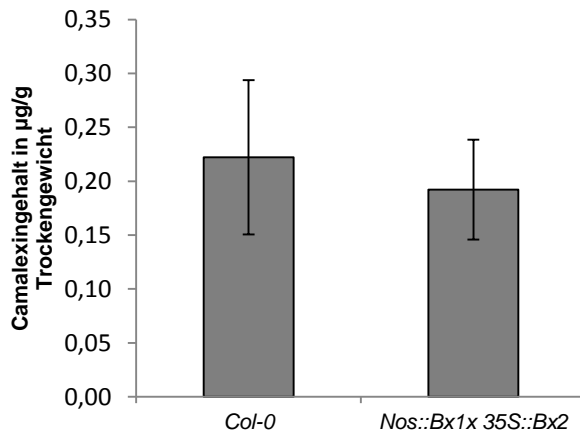


Abbildung 3.12: Camalexin Gehalt in Wurzeln

Dargestellt ist der Camalexin Gehalt in Wurzelextrakten. Die Wurzeln wurden von sechs Wochen alten Pflanzen isoliert. Die Standardabweichung ergibt sich aus 3 biologischen Replikaten mit je 12 Wurzeln pro Genotyp, wobei je 4 Wurzeln gemeinsam analysiert wurden.

Die Induktion der Camalexinbiosynthese durch UV-Licht zeichnet sich durch eine hohe Variabilität auf. Die anschließende Messung der Camalexinkonzentration in induzierten sechs Wochen alten Rosettenblättern zeigte, dass wildtypische Blätter zwischen 5 und 10 µg/g Frischgewicht akkumulierten, wobei *Nos::Bx1 x 35S::Bx2* signifikant weniger Camalexin aufwies als der Wildtyp (Abbildung 3.13).

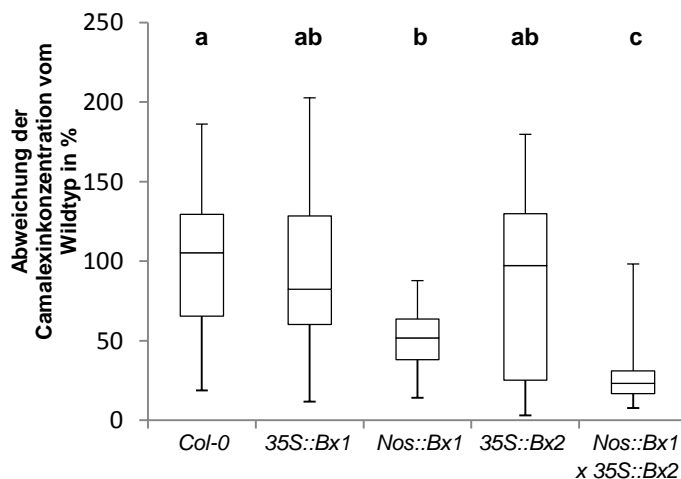


Abbildung 3.13: Abweichung der Camalexinkonzentration vom Wildtyp.

Boxplot der Abweichung der Camalexinkonzentration von der mittleren Camalexinkonzentration des Wildtyps. Die Abweichung ist in % angegeben. Die Boxen umfassen 50 % der Werte. Die Grenzfläche zwischen den beiden Quartilen bildet den Median ab.

Die Ergebnisse wurden aus 3 Wiederholungen ermittelt. Die Buchstaben bilden signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten der einzelnen Gruppen ab, die sich aus einer Varianzanalyse und dem anschließenden doppelseitigen t-Tests ergaben (Signifikanzniveau $p < 0,005$).

Die Varianzanalyse und anschließende t-Tests zeigten, dass in *35S::Bx1*- und *35S::Bx2*-Pflanzen ähnliche Camalexinkonzentrationen im Vergleich zum Wildtyp auftreten. Pflanzen mit *Nos::Bx1*-Transgen akkumulierten signifikant weniger Camalexin als Wildtyppflanzen. *Bx1*-/*Bx2*-exprimierende Pflanzen wiesen darüber hinaus eine signifikant niedrigere Camalexinkonzentration nach der UV-Induktion im Vergleich zu allen anderen Genotypen auf.

Die Untersuchung abwehrrelevanter Stoffe zeigte, dass die Bildung von Indolinon zwar keinen Einfluss auf die konstitutiv synthetisierten Glucosinolate hat, jedoch negativ auf die Bildung des Camalexin in seiner Eigenschaft als Phytoalexin wirkt.

3.3.5 Einfluss der *Bx*-Genexpression auf die Widerstandsfähigkeit von *Arabidopsis* gegen biotische Faktoren

Es sollte die Auswirkung der *Bx1*- und *Bx2*-Expression auf Insektenbefall und mikroskopische Pathogene bestimmt werden. In Kooperation mit Prof. Ted Turlings in Neuchâtel wurde untersucht, ob die Transgenexpression Einfluss auf die Motte *Spodoptera littoralis* hat. Diese sind Generalisten in Bezug auf DIBOA.

Die Auswirkung der *Bx1*- und *Bx2*-Expression auf den Befall durch Pilze wurde zum einen mit den nekrotrophen Pilz *Botrytis cinerea* und zum anderen mit dem biotrophen Pilz *Erysiphe cruciferarum* untersucht.

Wirkung der *Bx*-Genexpression auf die Widerstandsfähigkeit gegen *Spodoptera littoralis*

In Kooperation mit Prof. Ted Turlings in Neuchâtel hat Natalie Veyrat getestet, ob die Transkription von *Bx1* und *Bx2* das Fressverhalten von *S. littoralis*-Larven beeinflusst. Die Larven fraßen signifikant mehr Blattmaterial von *Bx1*-exprimierenden Pflanzen als von Pflanzen, die lediglich *Bx2* oder kein *Bx*-Transgen enthalten. Dieser Effekt verstärkte sich, wenn zusätzlich zum *Nos::Bx1*- auch das *35S::Bx2*-Transgen in einer Pflanze vorlag. Allerdings schien dies nicht zu einem höheren Gewicht der Larven zu führen. Ein weiterer Test, in dem die Larven vor die Wahl gestellt wurden, ob sie wildtypische Blätter oder Blätter von transgenen Pflanzen als Nahrungsquelle bevorzugen, ergab, dass Blätter von *Nos::Bx1* x *35S::Bx2*-Pflanzen zu einem höheren Anteil gefressen wurden als wildtypische Blätter (Abbildung 5.1).

Wirkung der *Bx*-Genexpression auf die Widerstandsfähigkeit gegen *Botrytis cinerea*

Der nekrotrophe Schlauchpilz *B. cinerea* hat ein breites Wirtsspektrum und führt bei Befall von *Arabidopsis*-Blättern zu deren Absterben. Um zu analysieren, welche Auswirkungen die Transgenexpression auf die Infektion von *A. thaliana*-Pflanzen mit *B. cinerea* hat, wurden bis zu drei Blätter sechs Wochen alter Pflanzen mit Botrytissporen inokuliert und Blätter bonitiert, die Merkmale einer fortschreitenden Infektion zeigten (Abbildung 3.14).

3 Ergebnisse

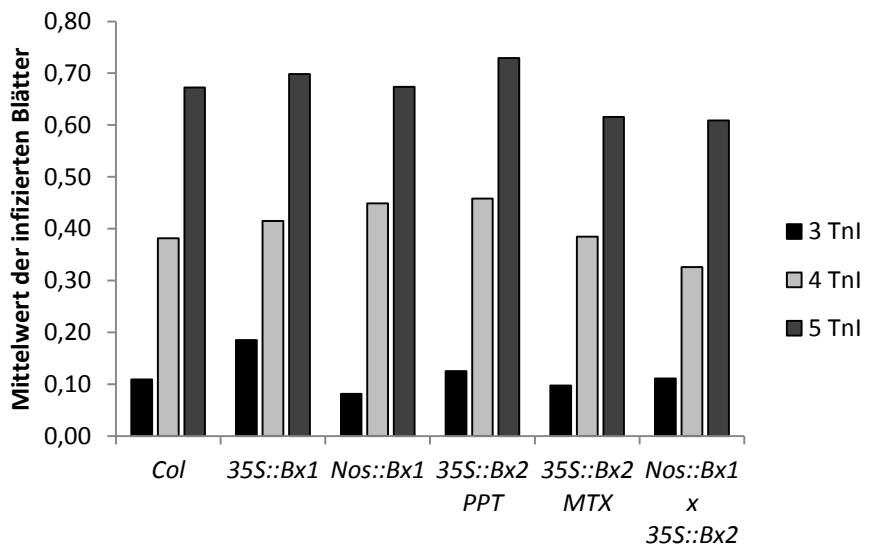


Abbildung 3.14: Anfälligkeit von *A. thaliana* gegen *B. cinerea*.

Sechs Wochen alte *A. thaliana*-Blätter wurden mit *B. cinerea*-Sporen inokuliert und 3 bis 5 Tagen nach Inokulation (TnI) auf Anzeichen eines Befalls (gelbe Verfärbung der Blätter) bonitiert. Pro Pflanze wurden drei Blätter mit Sporen behandelt. Das Experiment wurde drei Mal durchgeführt, wobei alle Wiederholungen die gleiche Tendenz zeigten. Abgebildet ist die letzte Wiederholung mit mindestens 45 infizierten Blättern pro Genotyp.

Aus dem Verhältnis der infizierten zu den nicht infizierten Blättern geht hervor, dass es keinen Unterschied zwischen der Infektion von wildtypischen Pflanzen und Pflanzen, die *Bx1* und *Bx2*, zusammen exprimieren, gibt.

Wirkung der *Bx*-Genexpression auf die Widerstandsfähigkeit gegen *Erysiphe cruciferarum*

Eine Inkubation mit *E. cruciferarum* sollte zeigen, ob die Akkumulation von Indolinon in Pflanzen der Kreuzung *Nos::Bx1* x *35S::Bx2* die Anfälligkeit für diesen Pilz verändert. Dazu wurde zum einen der Befall der *A. thaliana*-Blätter durch die Beobachtung der Blätter bewertet. Zum anderen konnte die Anzahl der gebildeten Konidiophoren pro *E. cruciferarum*-Kolonie als Gradmesser für die Vitalität des Pilzes verwendet werden.

Optisch konnte nach fünf Tagen kein Unterschied zwischen den verschiedenen Pflanzenlinien hinsichtlich des Befalls festgestellt werden. Nach sieben Tagen war ein stärkerer *E. cruciferarum*-Befall auf den Blättern der Kreuzung *Nos::Bx1* x *35S::Bx2* zu beobachten (Abbildung 3.15 A). Dies zeigte sich durch ein stärkeres Hyphenwachstum auf den Blättern.

Es stellte sich heraus, dass *Erysiphe* auf transgenen Pflanzen mehr Konidiophoren bildet als auf Wildtyppflanzen (Abbildung 3.15 B). Während die Unterschiede von *Col-0*-Pflanzen zu *Arabidopsis* mit *Nos::Bx1*-, *35S::Bx1*- und *35S::Bx2*-Transgen nicht signifikant waren, wies *E. cruciferarum* auf der Kreuzung *Nos::Bx1* x *35S::Bx2* eine signifikant höhere Anzahl gebildeter Konidiophoren pro Kolonie auf. *Erysiphe* bildete auf wildtypischen *Arabidopsis* im Durchschnitt 8 bis 9 Konidiophoren pro Kolonie. Im Gegensatz dazu lag dieser Wert auf

3 Ergebnisse

Blättern der Linie *Nos::Bx1 x 35S::Bx2* durchschnittlich bei 15 bis 16 und damit mehr als 1,5-mal so hoch wie auf *Col-0*-Pflanzen.

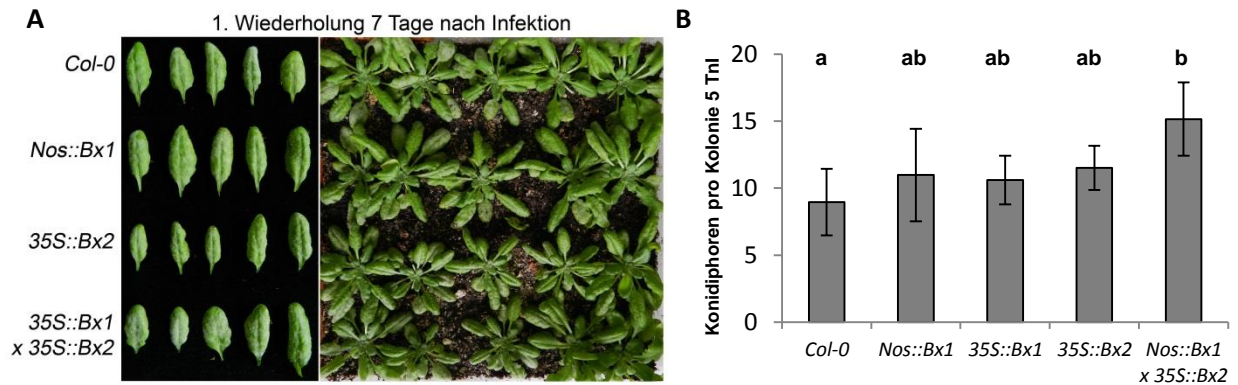


Abbildung 3.15: Anfälligkeit von *Nos::Bx1 x 35S::Bx2*-Pflanzen gegenüber *E. cruciferarum*.

A Optischer Phänotyp von *Arabidopsis*-Pflanzen, die mit *E. cruciferarum* infiziert wurden. **B** Anzahl der durchschnittlich gebildeten Konidiphoren pro *E. cruciferarum*-Kolonie. Abgebildet sind die Ergebnisse aus zwei Wiederholungen (für *35S::Bx1* eine Wiederholung). Für eine Wiederholung wurden mindestens 40 Kolonien auf mindestens vier Blättern ausgezählt. Die Buchstaben a und b bilden signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten der einzelnen Gruppen ab, die sich aus einer Varianzanalyse und dem anschließenden doppelseitigen t-Tests ergab (Signifikanzniveau $p < 0,005$). Eine dritte Wiederholung ergab im Durchschnitt eine niedrigere Konidiphorenanzahl bei allen Genotypen, wobei die Anzahl der Konidiphoren auf Blättern von *Nos::Bx1 x 35S::Bx2*-Pflanzen in gleicher Weise signifikant erhöht war. TnI – Tage nach Infektion

4 Diskussion

In Gräsern sind Benzoxazinoide potente Komponenten der chemischen Abwehr. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, in wie weit die DIBOA-Synthese von Mais auf *A. thaliana* übertragbar ist. Dafür wurden die Benzoxazinoidbiosynthesegene *Bx1* bis *Bx5* in *Arabidopsis* exprimiert und die Auswirkung der Expression untersucht. Besonderes Augenmerk wurde auf die Charakterisierung der Kreuzung aus *Bx1*- und *Bx2*- exprimierenden Pflanzen gelegt.

4.1 BX5 konnte nicht funktional exprimiert werden

Für die Biosynthese von DIBOA ist die Aktivität von *Bx5* notwendig. Hierfür konnten transgene *A. thaliana*-Pflanzenlinien selektiert werden, die eine *Bx5*-Transkriptionsrate im Bereich von GAPDH aufwiesen. Allerdings zeigten diese Pflanzenlinien keine nachweisbare BX5-Enzymaktivität. Trotz der starken Transkriptionsrate erreichten diese Linien, im Vergleich zu *Bx2*, eine sehr niedrige Translationsrate. Die unterschiedliche Verwendung von Codons in *Z. mays* und *A. thaliana*, wie sie durch Murray *et al.* 1989 beschrieben wurde, konnte als Ursache für die verminderte Translation von *Bx5* ausgeschlossen werden. Dies zeigt die Untersuchung einer *Bx5*-Pflanzenlinie, deren Transgen auf die Codonverwendung von *A. thaliana* angepasst wurde. Pflanzen dieser Linie transkribierten *Bx5* ebenfalls mit einer Rate, die mit der von GAPDH vergleichbar war. Dieses Transkript wurde jedoch nicht stärker in ein Protein umgesetzt als das ursprüngliche Konstrukt mit der cDNA aus Mais.

Bei dem Versuch, Teile der Glucosinolatbiosynthese von *A. thaliana* auf Tabak zu transferieren, tauchten Probleme bei der Expression von Transgenen mit Hilfe des 35S-Promotors auf. Es kam zu *silencing*-Effekten. Aus diesem Grund wurden *Bx5*-Konstrukte verwendet, die unter der Kontrolle des Aktin- beziehungsweise des Ubiquitinpromotors standen. Für keine der getesteten Linien konnte BX5-Aktivität nachgewiesen werden (Ergebnisse nicht veröffentlicht).

Ein generelles Problem beim Übertragen des *Bx5*-Gens auf andere Spezies scheint es nicht zu geben, da die Expression in Hefe erfolgreich war (Glawischnig *et al.*, 1999). Allerdings zeigte sich schon bei dieser transgenen Expression, dass BX5 die niedrigste spezifische Aktivität aufzeigte. Möglicherweise ist *Bx5* weniger aktiv als die übrigen P450-Monooxygenasen der DIBOA-Biosynthese.

Untersuchungen im hexaploiden Weizen *T. aestivum* zeigten, dass die *Bx*-Gene der unterschiedlichen Genome verschieden stark transkribiert waren. Im Weizen ist *Bx5* das am stärksten transkribierte Gen (im Vergleich zu *Bx1*-*Bx4*) (Nomura *et al.*, 2003 und 2005). Andererseits hat BX5 die geringste katalytische Aktivität. Die von drei Genomen codierten

TaBx5-Gene unterscheiden sich im K_m -Wert signifikant (Faktor 13). Daher sollte man für transgene Ansätze die effiziente Version des *TaBx5*-Gens verwenden.

Es kann sein, dass die Aktivität von BX5 zu gering ist, um die Bildung von DIBOA in *A. thaliana* beziehungsweise in *A. thaliana* Microsomen nachweisen zu können. Vielleicht ist aber DIBOA in der Pflanze instabil, so dass sein Nachweis nicht gelingt.

Um dennoch DIBOA in *A. thaliana* zu synthetisieren, wäre es interessant, *Bx5*-Gene anderer DIBOA-produzierender Spezies (zum Beispiel Weizen, Gerste oder orientalischer Rittersporn) zu exprimieren, um zu überprüfen, ob die Aktivität dieser Genprodukte nachweisbar ist.

4.2 Einfluss der Expression von *Bx1* und *Bx2* auf *Arabidopsis*

4.2.1 Auswirkung der Expression von *Bx2* in *A. thaliana*

Mit der Übertragung der DIBOA-Biosynthese sollte gezeigt werden, dass es möglich ist, DIBOA heterolog zu synthetisieren. Gleichzeitig lassen sich daraus Schlussfolgerungen über eine mögliche evolutionäre Neuentstehung eines solchen Biosyntheseweges ableiten.

Ein wichtiger Schritt für die Entwicklung des Benzoxazinoid-Biosyntheseweges in *Z. mays* ist die Genduplikation und Funktionalisierung der Alpha-Untereinheit der Tryptophansynthase (TSA). Neben der TSA, die für die Tryptophansynthase wichtig ist, und BX1, dem abzweigenden Enzym der Benzoxazinoid-Biosynthese, existieren noch zwei weitere Enzyme in Mais, die ebenfalls eine Indol-Glycerol-Lyase-Aktivität besitzen. Der Vorgang der Genduplikation scheint ein häufiges Ereignis in der Evolution der Pflanzen zu sein. So sind in allen untersuchten mono- und dikotylen Pflanzen mindestens zwei Indol-Glycerol-Lyasen (IGL) codiert. In *A. thaliana* existiert neben der im Tryptophan-Stoffwechsel wichtigen TSA noch eine weitere IGL, TSA2 genannt, deren biologische Funktion noch nicht aufgeklärt wurde (Schullehner *et al.*, 2008; Dick *et al.*, 2012).

Die Übertragung von *Bx2* allein, ohne das Gen für das abzweigende Enzym BX1, sollte zeigen, ob bereits im Wildtyp genügend Indol für BX2 zur Verfügung steht, um Indolinon zu synthetisieren. Aus den Ergebnissen geht hervor, dass dies nicht der Fall ist. In Pflanzen, die lediglich *Bx2* exprimierten, konnte kein Indolinon nachgewiesen werden. Dies untermauert die These, dass für die Entwicklung der DIBOA-Biosynthese erst ein entsprechendes abzweigendes Enzym zur Verfügung stehen muss, bevor sich modifizierende Enzyme als vorteilhaft erweisen (Frey *et al.*, 2009). Die AtTSA2 scheint hierfür nicht ausreichend zu sein. Dies kann mehrere Gründe als Ursache haben:

Entweder ist die TSA2-Indolsynthese zu ineffektiv für die Indolinonsynthese, oder sie findet in einem Kompartiment statt, das den Zugang zu verfügbarem Indol für BX2 erschwert. Es ist

auch vorstellbar, dass das Syntheseprodukt der TSA2 gleich wieder verstoffwechselt wird. Schließlich konnte gezeigt werden, dass wildtypische *A. thaliana* kein Indol emittieren.

4.2.2 Die gemeinsame Expression von *Bx1* und *Bx2* führt zur Indolinonsynthese

Durch die Übertragung von *Bx1* auf *Arabidopsis* konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, zusätzliches Indol in einer Quantität zu synthetisieren, dass es über die Pflanzenoberfläche abgegeben wird. Darüber hinaus war es möglich, Indolinon durch die gemeinsame Expression von *Bx1* und *Bx2* in einer Pflanze zu synthetisieren.

Die Übertragung einzelner Gene hatte keinen Effekt auf den morphologischen Phänotyp. Mit der gemeinsamen Expression der ersten beiden DIBOA-Biosynthesegene in einer Pflanze konnte ein starker Phänotyp beobachtet werden. Dies ist kein genereller Effekt, den Indolinon auf Pflanzen hat, da Maiskeimlinge ohne funktionierendes *Bx3*-Gen keinen Phänotyp zeigen, obwohl sie Indolinon in der gleichen Größenordnung akkumulieren wie *35S::Bx1 x 35S::BX2-A. thaliana*-Pflanzen (Wozny, 2012).

Es konnte gezeigt werden, dass die Indolinonakkumulation abhängig von der *Bx1*-Expression ist. Darüber hinaus geht aus den Ergebnissen hervor, dass die Ausprägung des Phänotyps von *Bx1 x Bx2*-Pflanzen abhängig von der Indolinonakkumulation ist. Pflanzen mit starker *Bx1*-Expression und hoher Indolinonakkumulation zeigten ab dem zweiten Tag der Keimung ein verlangsamtes Wachstum, mehr als zwei Tragblätter an den auswachsenden Infloreszenzen und waren steril.

Im Zuge der Übertragung der Dhurrin-Biosynthese auf *A. thaliana* konnte beobachtet werden, dass Pflanzen mit extrem starker Dhurrinakkumulation kleiner waren als wildtypische Pflanzen. Dennoch wiesen die Pflanzen keine weiteren morphologischen Veränderungen auf (Tattersall *et al.*, 2001).

Die Bildung von mehr als einem Tragblatt an den auswachsenden Infloreszenzen ist typisch für die *Wusche1*-Mutante. Diese hat einen Defekt in dem Homeoboxgen *Wus* (Laux *et al.*, 1996). Das könnte daraufhin weisen, dass Indolinon das diffizile Gleichgewicht der Faktoren stört, das für eine akkurate Aufrechterhaltung der Meristemzellen verantwortlich ist.

Nos::Bx1 x 35S::Bx2-Pflanzen mit moderater *Bx1*-Transkription und geringer Indolinonakkumulation zeigen keinen morphologischen Phänotyp und sind fertil. Es ist möglich, dass erst ab einer bestimmten Indolinonkonzentration in der Pflanze Auswirkungen auf den Phänotyp zu beobachten sind. Eine andere Möglichkeit ist, dass sich die Orte der Transkription unterscheiden. Es ist wenig darüber bekannt, wo der *Nos*-Promotor aktiv ist (Scofield *et al.*, 1992). Der *35S*-Promotor ist hingegen sehr gut charakterisiert (Benfey und Chua, 1990). Es ist erwiesen, dass er in nahezu jedem Organ stark exprimiert wird. Weiterhin wird angenommen, dass der *35S*-Promotor besonders in Zellen aktiv ist, die sich

in der S-Phase des Zellzyklus befinden (Jefferson *et al.*, 1987 und Nagata *et al.*, 1987). Das ubiquitäre Vorhandensein von Indolinon in allen Zellen könnte sich auf den Phänotyp der Pflanzen auswirken.

4.2.3 Auswirkungen der Indolinonsynthese auf das Gesamtmetabolom und die Produktion abwehrrelevanter Metabolite von *A. thaliana*

Ein Vergleich der Metabolome von *Bx1* und *Bx2* exprimierenden *A. thaliana*-Pflanzen mit dem Wildtyp zeigte, dass *35S::Bx1 x 35S::Bx2*-Pflanzen sich sehr stark von den restlichen Pflanzen unterschieden. Diese Analyse zeigte auch, dass diese Pflanzen sehr gestresst waren. Des Weiteren konnten keine Unterschiede von Metaboliten festgestellt werden, die mit dem Tryptophanstoffwechsel in Verbindung stehen (Abbildung 3.8). Das heißt, dass der Abzug von Indol durch *Bx1* keinen nachweisbaren Einfluss auf den Tryptophanstoffwechsel hat.

Der nähere Vergleich der Metabolome und der gebildeten Abwehrmetabolite von *Nos::Bx1 x 35S::Bx2*-Pflanzen mit *Col-0*-Pflanzen ergab, dass die Indolinonsynthese keine Auswirkung hat auf die konstitutiv vorhandenen Abwehrmetabolite, die aus IGP gebildet werden. Dazu gehören Vertreter der indolischen Glucosinolate und jenes Camalexin, das in der Wurzel gebildet wird (Mikkelsen *et al.*, 2000; Glawischnig *et al.*, 2004). Das heißt, dass das metabolische Netzwerk von *Arabidopsis* eine konstante Abzweigung von Indol durch *BX1* als zusätzlichen Verbraucher verkraftet.

Allerdings ist die induzierte Synthese des Camalexin in den Blättern nach der Induktion mit UV-Licht betroffen. So weisen *Nos::Bx1 x 35S::Bx2*-Pflanzen nach Induktion signifikant weniger Camalexin auf als wildtypische Pflanzen oder Pflanzen, die lediglich *Bx1* exprimieren. Hierfür kann es verschiedenen Gründe geben. Es ist vorstellbar, dass Indolinon auf die Enzyme der Camalexinsynthese hemmend wirkt. Dem spricht entgegen, dass die konstitutive Camalexinsynthese in der Wurzel nicht beeinträchtigt zu sein scheint, da kein signifikanter Unterschied in der Camalexinakkumulation zwischen Wildtyp und *Nos::Bx1 x 35S::Bx2*-Pflanzen bestand. Bei Pathogenbefall hingegen muss in kurzer Zeit eine Camalexinkonzentration von 5 bis 10 µg pro g Frischgewicht erreicht werden (Glawischnig *et al.*, 2004; Siemens *et al.*, 2008). Dies ist zehnmals mehr, als konstitutiv im Wurzelgewebe gebildet wird. Die geringere Camalexinakkumulation in *Nos::Bx1 x 35S::Bx2*-Pflanzen weist darauf hin, dass es Probleme mit der Bereitstellung von großen Mengen an Vorläufermolekülen für die Camalexinsynthese gibt. Dies wirkt sich auf der einen Seite in einer höheren Anfälligkeit gegenüber dem biotroph wachsenden Pilz *Erysiphe cruciferarum* aus. Auf der anderen Seite hat es keine Auswirkungen auf Bakterien und nekrotroph wachsende Pilze.

Bei der vergleichenden Metabolitanalyse von Wildtyp und *Nos::Bx1 x 35S::Bx2*-Pflanzen stellte sich heraus, dass ein Metabolit signifikant verändert vorlag. Da dieser Metabolit, mit einer Molekülmasse von 311 und der Summenformel $C_{15}H_{24}N_2O_5$, in wildtypischen *A. thaliana* vorkommt, aber noch nicht charakterisiert wurde, ist nicht klar, wie sich diese erhöhte Konzentration auswirkt. Durch die Untersuchung von Pflanzen, deren Indolinsynthese alkoholabhängig aktiviert werden kann, ist erwiesen, dass die erhöhte Akkumulation des unbekannten Metaboliten durch die Indolinsynthese bewirkt wird.

Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass Indolinon beziehungsweise der unbekannte Metabolit Auswirkungen auf die Abwehrfähigkeit gegen Insekten, genauer *S. littoralis*, hat. Dies ist ein Generalist, der nicht spezialisiert auf die Verwertung von Benzoxazinoiden ist. Es zeigte sich, dass die Larven dieser Mottenart im direkten Vergleich Blätter von indolinonproduzierenden Pflanzen wildtypischen Blättern vorziehen. Werden die Larven jedoch ausschließlich mit Material eines Genotyps gefüttert, gab es keinen Unterschied in der Gewichtszunahme der einzelnen Larven. Das heißt, dass die Blätter von *Nos::Bx1 x 35S::Bx2*-Pflanzen die Larven auf eine bestimmte Art und Weise anziehen, diese jedoch keinen höheren Nährgehalt aufweisen. Indol kann als attraktierendes Agens ausgeschlossen werden, da Pflanzen, die lediglich *Bx1* exprimieren und Indol emittieren keinen Effekt auf die Larven haben.

Die Charakterisierung des unbekannten Metaboliten wird Aufgabe zukünftiger Forschungsbemühungen sein. Interessant wird auch die Klärung der Frage, ob die Akkumulation des unbekannten Metaboliten einen Einfluss auf die oben genannten Effekte hat.

4.3 Auxin-Maxima sind in *35S::Bx1 x 35S::Bx2*-Pflanzen unverändert

Der Phänotyp von *35S::Bx1 x 35S::Bx2*-Pflanzen ließ eine Veränderung der Phytohormonhomöostase vermuten. Naheliegend war, die Auxinverteilung in der Pflanze zu untersuchen, weil Auxin und Indolinon über gemeinsame Vorläufer synthetisiert werden. Die Untersuchung der Auxinmaxima mit DR5::GFP-Konstrukten zeigte überraschenderweise keine signifikanten Unterschiede zu Wildtyp-Pflanzen.

Alternativ verursachen hohe Indolinonkonzentrationen oder der unbekannte Metabolit direkt oder indirekt den beobachteten Phänotyp.

4.4 Lehren aus der Übertragung der HBOA-Synthese

Der Transfer aller *Bx*-Gene als einzelne Transgene war sehr arbeitsintensiv. Um eine funktionierende HBOA-Synthese in *A. thaliana* zu etablieren mussten im Anschluss vier

Gene in einer Pflanze funktional exprimiert werden. Daraus resultierten aufwändige Kreuzungsschemata, die dazu führten, dass bis zum Abschluss dieser Arbeit keine Pflanzen zur Verfügung standen, die homozygot für die ersten vier Gene der DIBOA-Synthese waren. Aus diesem Grund wurde versucht die Gene des Modifikationsmoduls, *Bx2* bis *Bx5*, in zwei Konstrukten, gekoppelt durch die virale 2A-Sequenz des Maul- und Klauenseuche- verursachenden Virus, funktional zu exprimieren. Diese Sequenz bewirkt, dass zwei Proteine, die in einem offenen Leserahmen gemeinsam codiert sind, als zwei getrennte Proteine aus dem Ribosom entlassen werden. Dabei codiert die 2A-Sequenz 20 Aminosäuren, die an den gebildeten Proteinen verbleiben. Ein Prolin verbleibt an dem Protein, das 5' von der 2A-Sequenz auf der mRNA codiert ist. Die restlichen 19 Aminosäuren verbleiben an dem Protein, das 3' von der 2A-Sequenz auf der mRNA codiert ist (Donnelly *et al.*, 2001). Im Falle der heterologen Expression der Glucosinolatsynthesegene in *Nicotiana benthamiana* konnte das System erfolgreich getestet werden. In dieser Arbeit führte die Methode nicht zum Erfolg. Lediglich die Aktivität von *Bx2* konnte erfolgreich nachgewiesen werden. Da die Einzelgenkonstrukte von *Bx2*, *Bx3* und *Bx4* in *Arabidopsis* aktiv waren, liegt die Vermutung nahe, dass die zusätzlichen Aminosäuren der 2A-Sequenz die Expression beziehungsweise die Funktion der Enzyme stören.

Eine weitere Variante, die Anzahl der Transgene zu minimieren, die übertragen werden müssen, ist die Kombination von zwei getrennten offenen Leserahmen mit eigenem Promotor und Terminator. Dies wurde für *Bx3* und *Bx5* angewandt. Allerdings blieben die Transkriptionsraten dieses Konstruktes hinter denen der einzelgenenthaltenden Transgene zurück.

Darüber hinaus lassen sich Arbeitsschritte einsparen, indem mehrere Transgene gleichzeitig transformiert werden. Hierzu werden unterschiedliche *Agrobacterium tumefaciens*-Stämmen, die je ein Transgen enthalten, gemischt und gemeinsam für den *floral dip* verwendet (Dafny-Yelin und Tzfira, 2007). Alternativ lassen sich bereits transformierte Pflanzen durch einen erneuten *floral dip* mit zusätzlichen Transgenen transformieren (Joblings *et al.*, 2002).

Weiterhin zeigte sich, dass die Expressionsrate der *Bx*-Gene direkt mit der Synthese von Indol und Indolinon korreliert. Eine hohe Transkriptionsrate bewirkte eine hohe Endproduktkonzentration. Dabei spielt nicht nur die Transkription von *Bx1* eine Rolle. Es zeigte sich, dass eine verminderte *Bx2* Expression ebenfalls zu einer verminderten Indolinonsynthese führt (Wozny, 2012). Es wurde diskutiert, dass die Verwendung von zu starken Promotoren zu Problemen bei der Übertragung von Biosynthesewegen führt. Vor allem die transkriptive Genstilllegung (TGS) wurde als Problem erkannt (Mourrain *et al.*, 2006; Geu-Flores *et al.*, 2009). Im Laufe dieser Arbeit konnte kein TGS beobachtet werden. Weiterhin weisen die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass die Verwendung von moderaten Promotoren nicht

ausreichend ist, um genügend HBOA in *A. thaliana* zu synthetisieren und um letztendlich eine funktionierende DIBOA-Synthese zu etablieren. Dies legt die Verwendung von starken Promotoren nahe. Allerdings ist die Verwendung des 35S-Promotors zu überdenken, da dieser in der ganzen Pflanze exprimiert wird (Jefferson *et al.*, 1987) und zu Sterilität führt, wenn *Bx1* und *Bx2* unter dessen Kontrolle stehen. Die Verwendung von speziellen Promotoren, die ausschließlich in Blättern transkriptive Aktivität verleihen, hat den Vorteil, dass die Fortpflanzungsorgane nicht durch die Synthese von Indolinon oder der ektopischen Akkumulation anderer Metabolite belastet wird. Solche Promotoren wurden bereits charakterisiert (Peterson und Oliver, 2006). Für eine weiterführende biotechnologische Anwendung sind solche Promotoren ebenfalls von Vorteil. Sie erlauben die zielgerichtete Synthese von Abwehrstoffen im Blatt zur optimalen Verteidigung der Pflanze gegen Fraßfeinde und zur Vermeidung der Akkumulation von toxischen Stoffen in sexuellen Organen. Ein gänzlicher Ausschluss der Anreicherung von toxischen Zwischen- oder Endprodukten in Früchten kann durch eine spezifische *Bx*-Genexpression in vegetativem Gewebe nicht ausgeschlossen werden. So sind bereits Transporter bekannt, die für die Relokalisation von Abwehrmetaboliten vom Blatt in den Samen verantwortlich sind (Nour-Eldin *et al.*, 2012).

Neben der Wahl des Promotors scheint der passende Terminator eine Rolle zu spielen. Es ist bekannt, dass die Verwendung verschiedener Terminatoren die Expressionrate erhöhen kann (Nagaya *et al.*, 2010). Dies ist vor allem für die funktionale Expression von *Bx5* von Interesse.

Es wird immer wieder diskutiert, ob Enzyme eines Biosyntheseweges eine Einheit bilden, ein sogenanntes Metabolon, das es erlaubt das Produkt eines Enzyms direkt als Substrat eines nächsten Enzyms dienen kann. Dies würde erklären, warum bei den meisten Biosynthesewegen keine Zwischenprodukte, sondern lediglich die Endprodukte nachweisbar sind. Ein solches Metabolon wurde zum Beispiel für die Synthese von cyanogenen Glucosiden in *Lotus corniculatus* beziehungsweise *Z. filipendulae* diskutiert (Jensen und Møller, 2011). Im Zuge des Transfers der Dhurrin-Biosynthese sind ebenfalls Nebenprodukte aufgetreten, allerdings verglichen mit dem Endprodukt in sehr viel geringerer Quantität. Der Transfer von *Bx1* bis *Bx4* zeigt, dass alle Zwischenprodukte nachweisbar waren, was darauf schließen lässt, dass diese Enzyme in *A. thaliana* kein Metabolon bilden. Das postulierte Metabolon aus *L. corniculatus* beinhaltet alle Biosyntheseenzyme. Es ist nicht auszuschließen, dass *Bx1* bis *Bx4* keine geschlossene Einheit bilden, weil die restlichen Enzyme der DIBOA-Biosynthese *Bx5* und *Bx8* oder zusätzliche stabilisierende Faktoren, die lediglich in Mais vorhanden sind, fehlen. Es kann jedoch auch sein, dass ein gewisser Teil der exprimierten Enzyme miteinander interagiert, allerdings unterschiedliche Expressionsraten zu einem Ungleichgewicht der einzelnen Enzyme führen.

4 Diskussion

Eine erfolgreiche Expression von *Bx1* bis *Bx5* in *A. thaliana* würde zeigen, dass es möglich ist, den DIBOA-Biosyntheseweg von Mais auf andere Spezies zu übertragen. Dies ist für die Biotechnologie von Interesse. Die DIBOA-Biosynthese kann einen weiteren Baustein bilden, um Pflanzen in Monokulturen vor den Einflüssen der Umwelt zu schützen. Dies gilt vor allem dann, wenn es gelingt, die Biosynthese zum einen gewebsspezifisch und zum anderen induzierbar zu gestalten.

5 Anhang

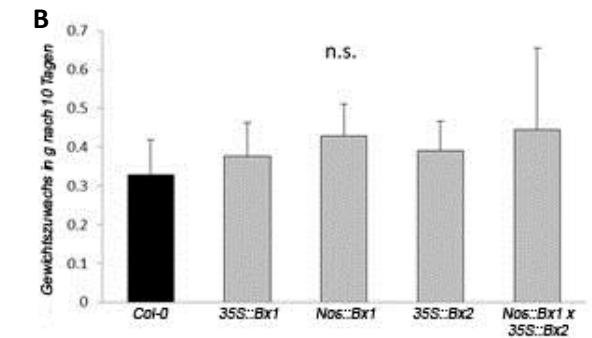
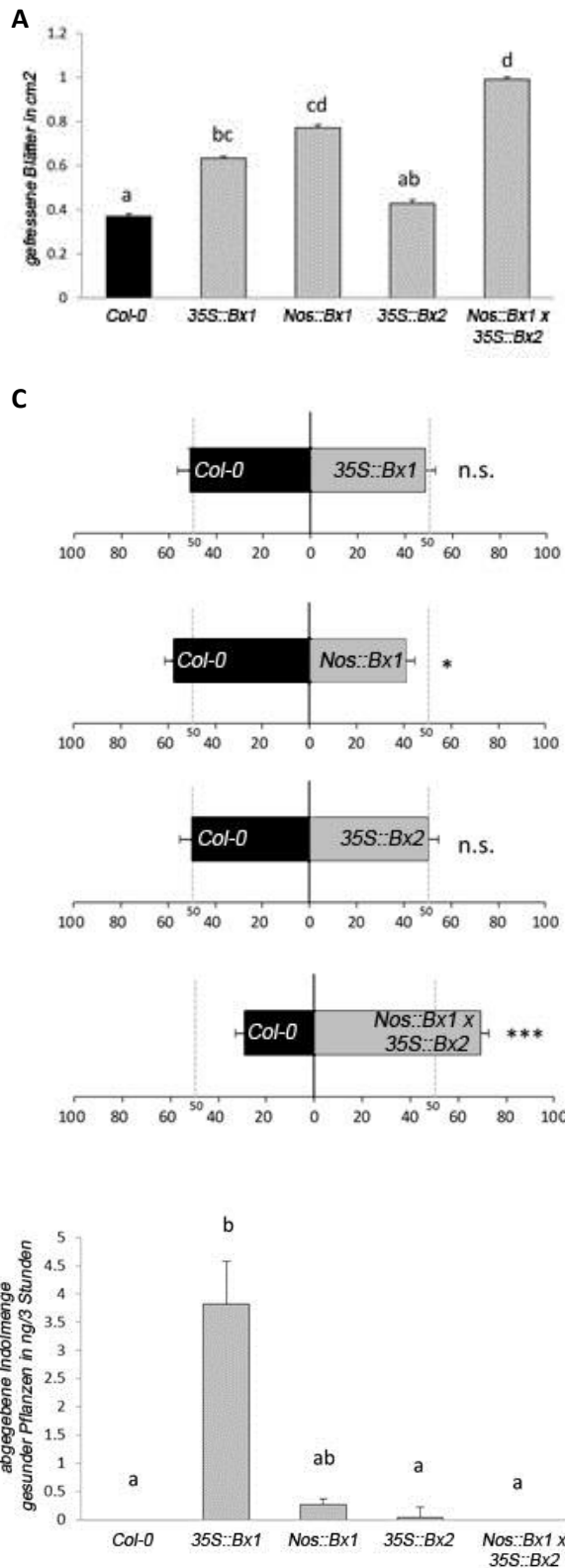


Abbildung 5.1: Auswirkung der Expression von Bx1 und Bx2 auf die Interaktion mit *Spodoptera litoralis*.

A Fütterungstest ohne Wahlmöglichkeit: Vergleich der gefressenen Blattfläche von Bx1- und Bx2-exprimierenden Pflanzen durch *Spodoptera litoralis*-Larven.

B Vergleich des Gewichtszuwachses von *Spodoptera litoralis*-Larven, die 10 Tage mit Bx1- und Bx2-exprimierenden Pflanzen gefüttert wurden.

C Fütterungstest mit Wahlmöglichkeit: Vergleich der prozentual gefressenen Blattfläche von Bx1- und Bx2-exprimierenden Pflanzen durch *Spodoptera litoralis*-Larven, wenn diese gemeinsam mit wildtypischem Blattmaterial angeboten wurden.

Abbildung 5.2: Abgegebene Indolmenge durch gesunde Pflanzen.

6 Zusammenfassung

Benzoxazinoide sind abwehrrelevante Sekundärmetabolite mit breitem Wirkspektrum, die in Gräsern (*Poaceae*) weit verbreitet sind. Sie wurden auch in Vertretern der *Lamiaceae* und *Ranunculaceae* nachgewiesen. Die Biosynthese der Benzoxazinoide wurde für *Z. mays* vollständig aufgeklärt. Ausgangspunkt der Synthese ist Indol-Glycerin-3-Phosphat (IGP), das auch Teil der Tryptophanbiosynthese ist. Das abzweigende Enzym BX1 setzt IGP zu Indol um, das durch die konsekutive Einführung von vier Sauerstoffatomen mit Hilfe der modifizierenden P450-Monooxygenasen BX2, BX3, BX4 und BX5 zu DIBOA umgesetzt wird. Dieses bildet das erste toxische Produkt des Benzoxazinoidbiosyntheseweges. Mit dieser Arbeit wurde untersucht, inwieweit die DIBOA-Biosynthese von Mais auf *A. thaliana* übertragbar ist und wie sich die Expression der Gene *Bx1* bis *Bx5* auf die Pflanze auswirkt.

Die maistypischen Benzoxazinoidbiosynthesegene *Bx1* bis *Bx5* wurden einzeln unter der Kontrolle des viralen CaMV-35S-Promotors exprimiert. Für eine moderate Expression von *Bx1* stand der *Nos*-Promotor zur Verfügung. Zusätzlich wurden jeweils zwei Gene der modifizierenden Enzyme auf einem Konstrukt vereint. Eine solche Kombination mit Hilfe der viralen 2A-Sequenz führte nicht zur funktionalen Expression beider Gene. Allerdings ist es gelungen *Bx1*, *Bx2*, *Bx3* und *Bx4* funktional zu exprimieren und das DIBOA-Vorläufermolekül HBOA *in vivo* zu synthetisieren. Eine funktionale Expression von *Bx5* konnte nicht nachgewiesen werden. Die unterschiedliche Codonverwendung in Mais und *Arabidopsis* konnte als Ursache ausgeschlossen werden.

Es wurde gezeigt, dass die Produktion von Indolinon durch BX1 und BX2 nachteilig für *A. thaliana* ist. Diese Enzyme bilden den Flaschenhals der DIBOA-Biosynthese, so dass die Charakterisierung der Expression dieser Enzyme in *Arabidopsis* besonders interessant war.

Während die Expression eines einzelnen *Bx*-Gens sich nicht auf den Phänotyp auswirkte, führte die gemeinsame Expression von *Bx1* und *Bx2* jeweils unter dem 35S-Promotor in einer Pflanze zur Anreicherung von hohen Indolinonkonzentrationen. Dies hatte zwar keinen Einfluss auf die Auxinmaxima im Embryo, resultierte jedoch in einem verzögerten Wachstum ab dem ersten Tag nach der Keimung und führte zur Sterilität dieser Pflanzen. Es zeigte sich, dass die indolinoninduzierten Effekte auf den optischen Phänotyp dosisabhängig waren, da Pflanzen mit fünffach niedrigerer Indolinonakkumulation (*Nos::Bx1* x *35S::Bx2*-Pflanzen) keinen optischen Phänotyp aufwiesen. Allerdings wirkte sich die Indolinonsynthese negativ auf die Widerstandsfähigkeit von *Arabidopsis*-Pflanzen aus. *Nos::Bx1* x *35S::Bx2*-Pflanzen zeigten eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber dem biotrophen Pathogen *E. cruciferarum*. Ebenso bevorzugten *S. littoralis*-Larven die transgenen Pflanzen als Nahrungsquelle gegenüber wildtypischen *Arabidopsis*-Pflanzen. Eine veränderte Widerstandsfähigkeit indolinonproduzierender Pflanzen gegenüber dem nekrotrophen Schlauchpilz *B. cinerea* war nicht nachweisbar..

6 Zusammenfassung

Eine Auswirkung der Indolinonsynthese auf konstitutiv gebildete Abwehrmetabolite, wie indolische und aliphatische Glucosinolate sowie in der Wurzel synthetisiertes Camalexin, konnte nicht nachgewiesen werden und scheidet als Ursache für die erhöhte Anfälligkeit gegenüber bestimmten Pathogenen aus. Allerdings akkumulieren *Nos::Bx1 x 35S::Bx2*-Pflanzen nach UV-Induktion eine geringere Menge des Phytoalexins Camalexin in den Blättern. Eine erhöhte Indolinonsynthese verursacht die Akkumulation eines unbekanntes Metaboliten, der eine Molekülmasse von 311 aufwies und der die Summenformel $C_{15}H_{24}N_2O_5$ besaß.

Die Identifizierung dieses Metaboliten kann zur Klärung der Ursache für die erhöhte Anfälligkeit gegenüber *E. cruciferarum* und *S. littoralis* beitragen und wird Einblicke in die Verstoffwechslung ektopisch synthetisierter Metabolite durch *A. thaliana*-Pflanzen.

7 Summary

Benzoxazinoids are broad-spectrum defensive secondary metabolites that are widespread/common in grasses (*Poaceae*). Additionally, they have been detected in members of *Lamiaceae* and *Ranunculaceae*. The benzoxazinoid biosynthesis has been fully elucidated in *Z. mays*. Starting point of the synthesis is indole-3-glycerol-phosphate (IGP) which is also part of the tryptophan biosynthesis. The branching enzyme BX1 converts IGP to indole which is in turn converted to DIBOA by means of consecutive introduction of four oxygen atoms, catalysed by the modifying p450 monooxygenases BX2, BX3, BX4, and BX5. DIBOA is the first toxic product of the benzoxazinoid pathway. This work investigated to what extent the DIBOA synthesis is transferable from maize to *Arabidopsis* and what effects this expression has.

The benzoxazinoid biosynthesis genes *Bx1* to *Bx5* from maize were individually expressed under the control of the viral CaMV 35S promoter. For a moderate expression of *Bx1* the *Nos* promoter was used. Additionally, two genes each of those coding for the modifying enzymes were combined in one construct. This combination by means of the viral 2A sequence did not lead to a functional expression of both genes. Functional expression of *Bx1*, *Bx2*, *Bx3*, and *Bx4* was achieved and the DIBOA precursor molecule HBOA was synthesised *in vivo*. A functional expression of *Bx5* could not be shown. The differing codon usage in maize and *Arabidopsis* could be eliminated as possible cause.

Production of indolinone by BX1 and BX2 proved to be detrimental for *A. thaliana*. These enzymes form the bottleneck of DIBOA biosynthesis, meaning that a characterisation of expression in *Arabidopsis* was particularly interesting for these enzymes.

While the expression of a singular *Bx* gene did not affect the phenotype, joint expression of *Bx1* and *Bx2*, each under the control of the 35S promoter, lead to an accumulation of high indolinone concentrations. This did not influence the embryos' auxin maxima, but resulted in retarded growth starting one day after germination and leading to sterility of these plants. The indolinone-induced effects on the phenotype proved to be dose-dependent since plants with a fivefold lower indolinone accumulation (*Nos::Bx1* x *35S::Bx2* plants) did not show a visible phenotype. Albeit, indolinone synthesis had negative effects on the resistance of *Arabidopsis* plants. *Nos::Bx1* x *35S::Bx2* plants displayed an increased susceptibility to the biotrophic pathogen *E. cruciferarum*. Likewise, *S. littoralis* larvae preferred transgenic plants to wild type *Arabidopsis* as food source. An altered resistance of indolinone-producing plants to the necrotrophic ascomycete *B. cinerea* could not be detected.

7 Summary

Indolinone synthesis had no detectable effects on constitutively formed defence compounds such as indolic and aliphatic glucosinolates, as well as root-synthesised camalexin, meaning that indolinone synthesis can be eliminated as possible cause for the increased susceptibility to certain pathogens. However, *Nos::Bx1 x 35S::Bx2* plants accumulated smaller amounts of the phytoalexin camalexin in their leaves after UV induction. Additionally, it could be shown that indolinone synthesis caused the accumulation of an unknown metabolite having the molecular mass of 311 and the molecular formula $C_{15}H_{24}N_2O_5$.

The identification of this metabolite will contribute to the clarification of the cause for the increased susceptibility to *E. cruciferarum* and *S. littoralis* and will provide insight into the metabolisation of ectopically synthesised metabolites by *A. thaliana* plants.

8 Literatur

An A, Costa MA, Mitra A, Ha S-B, Marton L (1988): Organ-specific and developmental regulation of the nopaline synthase promoter in transgenic tobacco plants. *Plant Physiol.* 88; 547-552.

Babock, G. D., Esen, A. (1994): Substrate specificity of maize β -glucosidase. *Plant Science* 101: 31-39.

Barnes, J. P. und Putnam, A. R. (1987): Role of benzoxazinones in allelopathy by rye (*Secale cereal L.*). *J. Chem. Ecol.* 13: 889-906.

Benfey, P., N., Chua N., H. (1990): The Cauliflower Mosaic Virus 35S Promoter: Combinatorial Regulation of Transcription in Plants. *Science.* 250: 959-966.

Birnboim, H. C. und Doly, J. (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening of recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7: 1513-1523.

Bradford, M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 7: 248-254.

Burgos, N. R., Talbert, R. E., Kim, K. S. und Kuk, Y. I. (2004): Growth inhibition and root ultrastructure of cucumber seedlings exposed to allelochemicals from rye (*Secale cereale*). *J Chem Ecol.* 30(3): 671-689.

Bullock, P., A, Myer, Y., P. (1978): Circular dichroism and resonance Raman studies of cytochrome b562 from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 17(15): 3084-3091

Chandler, J.,W., Cole, M., Flier, A., Grewe, B., Werr, W. (2007): The AP2 transcription factors DORNROSCHE and DORNROSCHE-LIKE redundantly control *Arabidopsis* embryo patterning via interaction with PHAVOLUTA. *Development* 134: 1653-1662.

Cheng, Y., Dai, X., Zhao, Y. (2007): Auxin Synthesized by the YUCCA Flavin Monooxygenases Is Essential for Embryogenesis and Leaf Formation in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 19(8): 2430–2439.

8 Literatur

Clough, S. J. und Bent, A.F. (1998): Floral Dip: A simplified method for *Agrobacterium* mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. Plant J. 16: 735-743.

Cuevas, L. und Niemeyer, H. M. (1993): Effect of hydroxamic acids from cereals on aphid cholinesterases. Phytochemistry 34: 983-985.

Cuevas, L., Niemeyer, H.M. and Perez, F.J. (1990): Reaction of DIMBOA, a resistance factor from cereals, with α -Chymotrypsin. Phytochemistry 29: 1429-1432.

de Felipe P, Luke GA, Hughes LE, Gani D, Halpin C, Ryan MD (2006): E unum pluribus: multiple proteins from a self-processing polyprotein. Trends Biotechnol. 24; 68-75.

Dafny-Yelin, M., Tzfira, T. (2007): Delivery of Multiple Transgenes to Plant Cells. Plant Physiology 145/ 4: 1118-1128.

DellaPenna, D. (2001): Plant metabolic engineering. Plant Physiology (125):160-163.

Dick, R., Rattei, T., Haslbeck, M., Schwab, W., Gierl, A. und Frey, M. (2012): Comparative Analysis of Benzoxazinoid Biosynthesis in Monocots and Dicots: Independent Recruitment of Stabilization and Activation Functions. Plant Cell 24:915-928.

Dixon R. A. (2001): Natural products and plant disease resistance. Nature 411, 843-847.

Donnelly, M. L., Luke, G., Mehrotra, A., Li, X., Hughes, L. E., Gani, D., Ryan, M. D. (2001): Analysis of the aphthovirus 2A/2B polyprotein 'cleavage' mechanism indicates not a proteolytic reaction, but a novel translational effect: a putative ribosomal 'skip.' J. Gen. Virol. 82: 1013-1025.

Dunn, M., F., Aguilar, V., Brzovic, P., Drewe Jr., W., F., Houben, K., F., Leja, C., L., Roy, M. (1990): The tryptophan synthase bienzyme complex transfers indole between the alpha- and beta-sites via a 25-30 Å long tunnel. Biochemistry 27: 8598–8607.

Ebel, J., (1986): Phytoalexin synthesis: the biochemical analysis of the induction process. Annu Rev Phytopathol 24:235-264.

Frey, M., Kliem, R., Saedler, H., Gierl, A., (1995): Expression of a cytochrome P450 gene family in maize. Mol. Gen. Genet 246: 100-109.

Frey, M., Chomet, P., Glawischnig, E., Stettner, C., Grün, S., Winklmaier, A., Eisenreich, W., Bacher, A., Meeley, R. B., Briggs, S. P., Simcox, K., Gierl, A. (1997): Analysis of a chemical plant defense mechanism in grasses. *Science* 277: 696-699.

Frey, M., Spiteller, D., Wilhelm Boland, D., Alfons Gierl, A. (2003): Transcriptional activation of Igl, the gene for indole formation in *Zea mays*: a structure–activity study with elicitor-active N-acyl glutamines from insects. *Phytochemistry* 65: 1047–1055.

Frey M., Schullehner K., Dick R., Fiesselmann A., Gierl A. (2009): Benzoxazinoid biosynthesis, a model for evolution of secondary metabolic pathways in plants. *Phytochemistry* 70: 1645–1651.

Friebe, A. Roth, U., Kück, P., Schabl, H., Schulz, M. (1997): Effects of 2,4-dihydroxy-1,4-benzoxazin-3-ones on the activity of plasma membrane H⁺-ATPase. *Phytochemistry* 44: 979-983.

Geu-Flores F, Olsen CE, Halkier BA (2009): Towards engineering glucosinolates into noncruciferous plants. *Planta* 229; 261-270.

Glauser, G., Marti, G., Villard, N., Doyen, G.,A., Jean-Luc Wolfender, J., Turlings, T., C., J., Matthias Erb, M., (2011): Induction and detoxification of maize 1,4-benzoxazin-3-ones by insect herbivores, *The Plant Journal* 68, 901–911.

Glawischnig, E., Grün, S., Frey, M. und Gierl, A. (1999): Cytochrome P450 monooxygenases of DIBOA biosynthesis: specificity and conservation among grasses. *Phytochemistry* 50(6): 925-30

Glawischnig, E., (2007): Camalexin. *Phytochemistry* 68: 401-406.

Glawischnig, E., Hansen, B., G., Olsen, C., E., Halkier, B., A., (2004): Camalexin is synthesized from indole-3-acetaldoxime, a key branching point between primary and secondary metabolism in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 8245-8250.

Halkier, B. A. and Gershenzon, J., (2006): Biology and Biochemistry of Glucosinolates, *The Annual Review of Plant Biology*. 57:303–33.

8 Literatur

Hartmann, T. (2007): From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry* 68: 2831-46.

Hamilton, R. (1964): A corn mutant deficient in 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one with an altered tolerance of atrazine. *Weeds* 12: 27-30.

Hashimoto, Y., Shudo, K. (1996): Chemistry of biologically active benzoxazinoids. *Phytochemistry* 43: 551-599.

Hummel, J., Selbig, J., Walther, D., Kopka, J. (2007): The Golm Metabolome Database: a database for GC-MS based metabolite profiling. *Topics in Current Genetics* 18: 75-95.

Jefferson R., A., Kavanagh' T., A., Bevan M., W. (1987): GUS fusions: ,B-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO Journal* 6/13: 3901 - 3907.

Jensen, K., Møller, B.,J., (2010): Plant NADPH-cytochrome P450 oxidoreductases. *Phytochemistry* 71: 132–141.

Jensen, N., Zagrobelny, M., Hjern, K., Olsen, C., K., Houghton-Larsen, J., Jonas Borch, J., Møller, B., L., Bak, S. (2011): Convergent evolution in biosynthesis of cyanogenic defence compounds in plants and insects. *Nature communication* 2: 273.

Joblings, S. A., Westcott, R. J., Tayal, A., Jeffcoat, R., Schwall, G., P. (2002): Production of a freeze–thaw-stable potato starch by antisense inhibition of three starch synthase genes. *Nat Biotechnol* 20: 295-299.

Jonczyk, R., Schmidt, H., Osterrieder, A., Fiesselmann, A., Schullehner, K., Haslbeck, M., Sicker, D., Hofmann, D., Yalpani, N., Simmons, C., Frey, M., Gierl, A. (2008): Elucidation of the final reactions of DIMBOA-glucoside biosynthesis in maize: characterization of Bx6 and Bx7. *Plant Physiol.* 146: 1053–1063.

Jones, P., Vogt, T. (2001): Glycosyltransferases in secondary plant metabolism: tranquilizers and stimulant controllers. *Planta* 213: 164-174.

Kastenmüller, G., Römisch-Margl, W., Wägele, B., Altmaier, E., Suhre, K. (2011): metaPServer: A web-based metabolomics data analysis tool. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* Volume 2011.

Kesten, C. (2011): Analyse der transgenen Expression von Schlüsselenzymen der Mais DIBOA-Biosynthese (BX1 und BX2) in *Arabidopsis thaliana* auf Ebene des Phänotyps, der Genexpression und des Metabolismus. Masterarbeit TU München

Koncz, C. und Schell, J. (1986): The promoter of T L-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Molecular Genetics and Genomics* 204: 383–396.

Kriechbaumer, V., Weigang, L., Fiesselmann, A., Letzel, T., Frey, M., Gierl, A., Glawischnig, E. (2008): Characterisation of the tryptophan synthase alpha subunit in maize. *BMC Plant Biol.*: 8:44

Kulik, V., Hartmann, E., Weyand, M., Frey, M., Gierl, A., Niks, D., Dunn, M., F., Schlichting, I. (2005): On the structural basis of the catalytic mechanism and the regulation of the alpha subunit of tryptophan synthase from *Salmonella typhimurium* and BX1 from maize, two evolutionarily related enzymes. *J Mol Biol.* 352(3): 608-620

Laux, T., Mayer, K., F, Berger, J., Jürgens, G. (1996):The WUSCHEL gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis*. *Development* 122: 87-96.

Lämmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during assembly of the heads of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

Lisec, J., Schauer, N., Kopka, J., Willmitzer, L., Fernie, A. R. (2006): Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. *Nature Protocols* 1: 387-396.

Ljung, K. (2013): Auxin metabolism and homeostasis during plant development. *Development* 140: 943-950.

Mikkelsen, M., D., Hansen, C., H., Wittstock, U., Halkier, B., A. (2000): Cytochrome P450 CYP79B2 from *Arabidopsis* catalyzes the conversion of tryptophan to indole-3-acetaldoxime, a precursor of indole glucosinolates and indole-3-acetic acid. *J. Biol.Chem.* **275**, 33712–33717.

Morant AV, Jørgensen K, Jørgensen B, Dam W, Olsen CE, Møller BL, Bak S (2007): Lessons learned from metabolic engineering of cyanogenic glucosides. *Metabolomics* 3; 383-398.

Mourrain, P., van Blokland, R., Kooter, J., M., Vaucheret, H. (2006): A single transgene locus triggers both transcriptional and post-transcriptional silencing through double-stranded RNA production. *Planta* 225(2): 365-379.

Murashige, T., Skoog, F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15(3): 473-497.

Murray, E., Lotzerl, J., Eberle, M. (1989): Codon usage in plant genes. *Nucleic Acids Research* 17 (2): 477-498.

Nagata, T., Okada, K., Kawazu, T., Takebe, I. (1987): Cauliflower mosaic virus 35 S promoter directs S phase specific expression in plant cells. May 1987, Volume 207/2-3: 242-244.

Nagaya, S., Kawamura, K., Shinmyo, A., Kato, K. (2010): The HSP terminator of *Arabidopsis thaliana* increases gene expression in plant cells. *Plant Cell Physiol.* 51(2): 328-332.

Niemeyer H. (2009): Hydroxamic Acids Derived from 2-Hydroxy-2H-1,4-Benzoxazin-3(4H)-one: Key Defense Chemicals of Cereals *J. Agric. Food Chem.* 57: 1677-1696.

Niemeyer H., M., Calcaterra N., B., Roveri O., A., (1986): Inhibition of mitochondria energy-linked reactions by 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4- benzoxazin-3-one (DIMBOA), a hydroxamic acid from *Gramineae*. *Biochem Pharmacol* 15:3909–3914.

Nomura, T., Ishihara, A., Imaishi, H., Ohkawa, H., Endo, T.R., and Iwamura, H. (2003): Rearrangement of the genes for the biosynthesis of benzoxazinones in the evolution of Triticeae species. *Planta* 217: 776–782.

Nomura, T., Ishihara, A., Yanagita, R.C., Endo, T.R., Iwamura, H. (2005): Three genomes differentially contribute to the biosynthesis of benzoxazinones in hexaploid wheat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 16490–16495.

8 Literatur

Nongbri, P., L., Johnson, J., M., Sherameti, I., Glawischnig, E., Halkier, B., A., Oelmüller, R. (2012): Indole-3-acetaldoxime-derived compounds restrict root colonization in the beneficial interaction between *Arabidopsis* roots and the endophyte *Piriformospora indica*. *Mol Plant Microbe Interact* 25(9): 1186-1197.

Nour-Eldin, H., H., Andersen, T., G., Burow, M., Madsen, S., R., Jørgensen, M., E., Olsen, C., E., Dreyer, I., Hedrich, R., Geiger, D., Halkier, B., A. (2012): NRT/PTR transporters are essential for translocation of glucosinolate defence compounds to seeds. *Nature* 488: 531-534.

Osbourn, A. E. (1999): Antimicrobial phytoprotectants and fungal pathogens; A commentary. *Fung. Genet. Biol* 26: 163-168.

Peterson, A., G., Oliver, D., J. (2006): Leaf-targeted phytochelatin synthase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol Biochem* 44 (11-12): 885-892.

Peracchi, A., Bettati, S., Mozzarelli, A., Rossi, G., L., Miles, E., W., Dunn, M., F. (1996): Allosteric regulation of tryptophan synthase: effects of pH, temperature, and alpha-subunit ligands on the equilibrium distribution of pyridoxal 5'-phosphate-L-serine intermediates. *Biochemistry* 35(6): 1872-1880.

Peracchi, A., Mozzarelli, A., Rossi, G., L. (1995): Monovalent Cations Affect Dynamic and Functional Properties of the Tryptophan Synthase alpha 2 beta 2 Complex. *Biochemistry* 34: 9459–9465.

Perez, F. J. und Niemeyer, H. M. (1989b) Reaction of DIMBOA with amines. *Phytochemistry* 28: 1831-1834.

Poschenrieder, C., Tolrà, R., P., Barceló, J. (2005): A role for cyclic hydroxamates in aluminium resistance in maize? *J Inorg Biochem.* 99(9): 1830-1836.

Radwanski, E. R., Last, R. L. (1995): Tryptophan biosynthesis and metabolism: biochemical and molecular genetics. *Plant Cell* 7, 921-934

Rauhut, T., Glawischnig E., (2009): Evolution of camalexin and structurally related indolic compounds. *Phytochemistry* 70 1638–1644.

Sahi, S. V., Anderson, C. E., Chilton, W. S. (1995): The corn wound metabolite DIMBOA causes cell death in tobacco and corn. *Plant Science* 108: 31-40.

Sambrook, J. Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989): *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York, USA.

Schaller A. (2002): Die Abwehr von Fressfeinden: Selbstverteidigung im Pflanzenreich, *Vierteljahrsschrift der Naturforschenden Gesellschaft in Zürich* 147/4: 141–150

Schullehner, K., Dick, R., Vitzthum, F., Schwab, W., Brandt, W., Frey, M., Gierl, A. (2008): Benzoxazinoid biosynthesis in dicot plants. *Phytochemistry* 69: 2668-2677.

Schulz, M., Knop, M., Kant, S., Sicker, D., Voloshchuk, N., Gryganski, A. (2006): Detoxification of allelochemicals - the case of benzoxazolin-2(3H)-one (BOA). In: *Allelopathy: a physiological Process with ecological implications*. (Reigosa, M.J., Pedrol, N., Gonzales, L. eds) Springer Dordrecht, The Netherlands. Pp. 157-170.

Scofield, S., R., Harrison, K., Nurrish, S., J., Jones J., D., G., (1992): Promoter Fusions to the Activator Transposase Gene Cause Distinct Patterns of Dissociation Excision in Tobacco Cotyledons. *The Plant Cell*, Vol. 4, 573-582.

Sicker, D., Frey, M., Schulz, M., Gierl, A., (2000): Role of natural benzoxazinones in the survival strategy of plants. *Int. Rev. Cytol.* 198, 319–346.

Siemens, J., Glawischnig, E., Ludwig-Müller, J. (2008): Indole Glucosinolates and Camalexin do not influence the development of the Clubroot Disease *in Arabidopsis thaliana*. *J. Phytopathology* 156: 332-337.

Spiteller, P., Glawischnig, E., Gierl, A., Steglich, W. (2001): Studies on the biosynthesis of 2-hydroxy-1,4-benzoxazin-3-one (HBOA) from 3-hydroxyindolin-2-one in *Zea mays*. *Phytochemistry* 57: 373-376.

Tattersall, D., B., Bak, S., Jones, P., R., Olsen, C., E., Nielsen, J., K., Hansen, M., L., Høj, P., B., Møller, B., L. (2001): Resistance to an herbivore through engineered cyanogenic glucoside synthesis. *Science* 293: 1826-1828.

8 Literatur

- Trichas, G., Begbie, J., Srinivas, S. (2008): Use of the viral 2A peptide for bicistronic expression in transgenic mice. *BMC Biol* 6: 40.
- Tomsett B., Tregova A., Garoosi A., Caddick M. (2004): Ethanol-inducible gene expression: first step towards a new green evolution? *Trends in Plant Science* 9(4):159-161.
- Vanetten, H., Mansfield, J. W., Bailey, J. A. und Farmer, E. E. (1994): Two classes of plant antibiotics: Phytoalexins versus phytoanticipins. *Plant Cell* 6:1191-1192.
- Velten J, Velten L, Hain R, Schell J (1984): Isolation of a dual plant promoter fragment from the Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *EMBO J.* 3; 2723-2730.
- van Larebeke, N., Engler, G., Holsters, M., van den Elsacker, S., Zaenen, J., Schilperoort, R. A. und Schell, J. (1974): Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall-inducing ability. *Nature* 252: 169-170.
- von Rad, U., Hüttl, R., Lottspeich, F., Gierl, A., Frey, M. (2001): Two glucosyltransferases are involved in detoxification of benzoxazinoids in maize. *Plant J.* 28: 633-642.
- Walkerpeach, C. R. und Velten, J. (1994): *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plant cells: cointegrate and binary vector systems. In: Gelvin SB, Schilperoort RA (eds) *Plant molecular biology manual*, 2nd edn. Kluwer, Dordrecht, B1:1–19.
- Weischet, W., O., Kirschner, K. (1976): Steady-state kinetic studies of the synthesis of indoleglycerol phosphate catalyzed by the alpha subunit of tryptophan synthase from *Escherichia coli*. Comparison with the alpha2 beta2-complex. *Eur J Biochem.* 65(2): 375-385.
- Wozny, D. (2012): Transgene Expression der Schlüsselenzyme BX1 und BX2 des DIBOA-Biosynthesewegs aus Mais in *Arabidopsis thaliana* mithilfe unterschiedlicher Promotoren – Phänotypische und biochemische Charakterisierung Masterarbeit TU München
- Zagobelny , M., Bak, S., Ekstrøm, C. T. , Olsen, C. E. & Møller, B. L. (2007): The cyanogenic glucoside composition of *Zygaena fi lipendulae* (*Lepidoptera: Zygaenidae*) as effected by feeding on wild-type and transgenic lotus populations with variable cyanogenic glucoside profiles . *Insect Biochem. Mol. Biol.* 37 , 10 – 18.

Danksagung

Es gibt sehr viele Personen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben und bei denen ich mich hiermit bedanken möchte.

Herrn Prof. Gierl danke ich für die Möglichkeit an seinem Institut diese Arbeit anzufertigen und für die fortwährende fachliche Diskussionsbereitschaft.

Besonderer Dank gilt Frau Dr. Monika Frey für die Unterstützung während der letzten mehr als drei Jahren. Insbesondere möchte ich für die vielen Ratschläge, die Kreuzung der Pflanzenlinien, die kontinuierliche wissenschaftliche Betreuung und ihre unerschöpfliche Geduld danken.

Prof. Dr. Ramon Torres und Dr. habil. Erich Glawischnig danke ich für ihr Fachwissen und ihre Hilfe.

Den restlichen Mitarbeitern und Ehemaligen danke ich für ihre Hilfe und den Spaß, den sie mir an der Arbeit vermittelt haben: Ottie Peiß, Peter Dobos, Heidi Miller-Mommerskamp, Linlin Zheng, Nicole Däschlein und Dr. Rafal Jonzyk. An dieser Stelle seien besonders erwähnt Michaela Matthes, Stefanie Mucha und Regina Dick für die viele Hilfe und Aktivitäten außerhalb des Labors .

Der guten Seele im Labor, Regina Hüttl, danke ich dafür, dass sie mein Projekt mit ihrer Arbeitskraft vorangetrieben hat und für ihre Hilfe sowie ihre Ratschläge.

Es gab viele Studenten, Masteranden und Bacheloranden denen ich dankbar für ihre Mitarbeit an meinem Projekt bin. Insbesondere möchte ich Christopher Kesten, Stefan Haberland, Monika Ostermeier und Dorothee Wozny für ihr Engagement danken.

Prof. Schwab und Dr. Thomas Hoffman danke ich für ihre LC-MS-Analysen und deren Auswertung.

Natalie Veyrat, der Gruppe um Dr. Corina Vlot und Dr. Corina Weis gilt mein Dank für die Arbeit mit den verwendeten Pathogenen.

Zuletzt möchte ich meinen Eltern, meiner Schwester und den Rest meiner Familie sowie meinen Freunden für ihre Unterstützung danken. Ein besonderer Dank gilt meiner eigenen kleinen Familie, die mir die letzten drei Jahre unvergesslich haben werden lassen.

Lebenslauf

Lebenslauf

Kontaktdaten:

Steinseestraße 15
81671 München

Persönliche Daten:

Geburtsdatum/-ort: 23.04.1984/ Schleiz
familiärer Status: verheiratet

01. 2010 bis 08. 2013

Promotion mit dem Thema:

**„Transfer der DIBOA-Biosynthese von Mais auf
Arabidopsis“**

Lehrstuhl für Genetik

Arbeitsgruppe von Prof. Alfons Gierl

Wissenschaftszentrum Weihenstephan in Freising

Studium:

03/2009 bis 11/2009 Wissenschaftlicher Aufenthalt am

Zentrum für Molekularbiologie an Pflanzen (ZMBP)

Arbeitsgruppe von Andreas Wachter

11/2007 bis 02/2009

Diplomarbeit zum Thema „Heterologe Proteinexpression zur
Gewinnung von polyclonalen Antikörpern“

Fritz-Lipmann-Institut, Leibniz Institut für Altersforschung, 07745
Jena

Arbeitsgruppe Biochemie von Prof. Frank Große

(Betreuer: PD. Dr. Helmut Pospiech)

10/2003 bis 02/2009 Studium der Biologie (Diplom)

Friedrich-Schiller-Universität, 07743 Jena

Hauptfach: Genetik

Nebenfächer: Biochemie, Mikrobiologie