



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

TUM School of Life Sciences

Transgene Expression der DIBOA Biosynthese in *Arabidopsis thaliana* und  
ökophysiologische Untersuchung der Transgenen

Aleksej Abramov

Vollständiger Abdruck der von der TUM School of Life Sciences der Technischen Universität  
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzende: Prof. Dr. Chris-Carolin Schön

Prüfende der Dissertation:

1. Prof. Dr. Wilfried Schwab

2. Prof. Dr. Corinna Dawid

Die Dissertation wurde am 09.02.2022 bei der Technischen Universität München eingereicht  
und durch die TUM School of Life Sciences am 10.05.2022 angenommen.



# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	Sekundärmetabolite als Abwehrchemikalien der Pflanzen.....	1
1.2	Charakteristische Abwehrmetabolite in Arabidopsis und Mais .....	3
1.3	Biosynthese der BX.....	6
1.4	Transfer von Biosynthesen zwischen Pflanzenarten.....	7
1.5	Ziel der Arbeit.....	9
2	Material und Methoden.....	10
2.1	Materialien.....	10
2.1.1	Pflanzen .....	10
2.1.2	Mikroorganismen.....	10
2.1.3	Chemikalien .....	11
2.1.4	Puffer und Medien .....	12
2.1.5	Synthetische DNA und Oligonukleotide .....	12
2.1.6	Vektoren.....	15
2.2	Methoden .....	15
2.2.1	Molekularbiologische Methoden .....	15
2.2.2	Klonierungen.....	16
2.2.3	Transformation von Mikroorganismen .....	16
2.2.4	Pflanzenanzucht.....	17
2.2.5	Arabidopsis-Transformation und Selektion.....	18
2.2.6	Applikation von Chemikalien (Fütterungsexperimente).....	19
2.2.7	Bestimmung der Wirkung von ION auf die Vitalität von Hefe und Pflanzen .....	20
2.2.8	Extraktion von Metaboliten .....	21
2.2.9	Analysemethoden. ....	22
2.2.10	Auswertung der Analysen .....	24
2.2.11	Biochemische Analysen .....	25
2.2.12	Phytopathologische Analyse .....	28
3	Ergebnisse .....	31
3.1	Expression von BX-Enzymen in Hefe .....	31
3.1.1	Klonierung der Mais P450-Oxidoreduktase und Expression in <i>S. cerevisiae</i> ...	31
3.1.2	Die katalytischen Eigenschaften der P450-Enzyme BX2-BX5 sind unabhängig von der eingesetzten P450-Oxidoreduktase. ....	33
3.1.3	Transfer der BX-Biosynthese in Hefe: Koexpression der biosynthetischen Gene .....	35
3.2	Expression der BX-Biosynthese in Arabidopsis .....	39
3.2.1	Klonierungs- und Selektionsstrategie für Arabidopsis.....	39

3.2.2	Transgene Arabidopsis produziert GDIBOA .....	41
3.2.3	Der Metabolismus von Arabidopsis interferiert mit der BX-Biosynthese.....	43
3.3	Einfluss des Intermediats ION auf Phänotyp und Metabolismus von Arabidopsis .....	53
3.3.1	Indolinone rufen Veränderungen der Pflanzenmorphologie hervor .....	53
3.3.2	Die Indolinone ION/5HIONG und Salicylsäure beeinflussen gegenseitig ihre Konzentration .....	56
3.3.3	Einfluss der Indolinone auf das SA-Signalling .....	62
3.3.4	Einfluss von Indolinonen auf die Resistenz gegenüber Phytopathogenen .....	65
4	Diskussion.....	69
4.1	Transgene Hefe ist ein funktionierendes Expressionssystem zur Analyse einzelner BX- P450-Enzyme, eine Interaktion konnte nicht nachgewiesen werden .....	69
4.2	Transgene GDIBOA Biosynthese in Arabidopsis ist möglich .....	70
4.3	Limitierung der BX-Biosynthese durch Modifikation des Intermediats ION .....	73
4.4	Schlüsselbedingungen für effiziente BX-Biosynthese .....	75
4.5	ION/5HIONG sind Stressmetaboliten mit Einfluss auf SA-Homöostase und den morphologischen Phänotyp .....	76
4.6	ION/5HIONG beeinflusst über den SA-Gehalt die Systemische Erworbene Resistenz (SAR) .....	78
4.7	Evolution der BX-Biosynthese .....	79
5	Zusammenfassung.....	81
6	Literaturverzeichnis .....	85
7	Anhänge.....	94
8	Danksagung.....	100

# Abbildungsverzeichnis

Die im Rahmen dieser Arbeit erstellten Abbildungen und Tabellen wurden z.T. modifiziert in der Publikation "Engineering of benzoxazinoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*: Metabolic and physiological challenges" Abramov et al. 2021 verwendet.

Abbildung 1: BX Biosynthese und Katabolismus. ....	3
Abbildung 2: Stammbaum der Angiospermen.....	5
Abbildung 3: Clustal-Omega-Analyse der PORs ATR1 und ATR2 und der Mais PORs. ....	32
Abbildung 4: Metabolitanalyse transformierter Hefestämme .....	37
Abbildung 5: Wachstumskurve des Kontrollhefestamms ATR1 in ION .....	37
Abbildung 6: Die Fütterung des Stamms PB85243 mit Indol .....	38
Abbildung 7: Schema der T-DNA des Cluster-Konstrukts.....	39
Abbildung 8: Phänotypen Bx1 und Bx2 exprimierender Transgener.....	41
Abbildung 10: GDIBOA-Gehalt in verschiedenen transgenen Pflanzen bei Fütterung .....	46
Abbildung 11: Steigerung der Transkriptmengen durch Einkreuzung von p35S- Einzelkonstrukten. ....	47
Abbildung 12: Chemische Struktur von Indolin-2-on-5- $\beta$ -D-glucopyranosid (5HIONG). ....	48
Abbildung 13: Mengen von ION und 5HIONG in Bx1Bx2 .....	49
Abbildung 14: Hemmung der 5HIONG-Biosynthese in Pflanzen.....	51
Abbildung 16: Phänotypen transgener <i>Arabidopsis</i> in verschiedenen Entwicklungsstadien..	55
Abbildung 17: Wurzelwachstum in Anwesenheit von ION.....	56
Abbildung 18: Die relative Menge ausgewählter Phytohormone in den Transgenen.....	58
Abbildung 19: Einfluss der ION-Applikation auf den SA-Gehalt von <i>Arabidopsis Col-0</i> .....	59
Abbildung 20: Metabolitenprofil und Expression von Genen der Pathogenabwehr .....	60
Abbildung 21: Phänotyp von Transgenen mit unterschiedlichen ION und SA-Mengen. ....	62
Abbildung 22: Transkriptkonzentrationen SA-assoziiierter Gene .....	64
Abbildung 23: Verhältnis von 5HIONG zu ION in transgenen und gefütterten Pflanzen.....	65
Abbildung 24: Infektion verschiedener Genotypen durch <i>Erysiphe cruciferarum</i> .....	66
Abbildung 25: Quantitative Analyse der <i>E. cruciferarum</i> Infektion durch qPCR-Analyse.....	67
Abbildung 26: Ergebnisse des SAR-Assays .....	68
Abbildung 26: Metabolisches Netzwerk der BX Biosynthese in transgener <i>Arabidopsis</i> .....	80

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Pflanzenarten und Linien .....	10
Tabelle 2: Mikroorganismen .....	10
Tabelle 3: Verwendete Hefestämme.....	11
Tabelle 4: Liste der verwendeten Primer .....	12
Tabelle 5: Für Klonierungsarbeiten und Transformationen verwendete Vektoren.....	15
Tabelle 6: Liste der transgenen homozygoten Arabidopsis und Kreuzungsschemas.....	19
Tabelle 7: Programme der HPLC Analyse .....	23
Tabelle 8: Kenndaten zur Identifikation per LC-MS Analyse verwendeter Ionen.....	24
Tabelle 9: Eingesetzte Substratkonzentrationen für Mikrosomenassays .....	28
Tabelle 10: Substratkonzentrationen für die Bestimmung des $K_m$ -Werts.....	28
Tabelle 11: Mikrosomenaktivität bei unterschiedlichen Isolierungsmethoden .....	33
Tabelle 12: Kenndaten der in Hefe exprimierten BX-P450-Enzyme.....	34
Tabelle 13: $K_m$ -Werte von BX-P450-Enzymen bei Expression von Enzym-Paaren.....	35
Tabelle 14: Funktion der BX-Enzyme im heterologen Hefesystem .....	36
Tabelle 15: Transgene Arabidopsislinien.....	40
Tabelle 16: Metabolisierung von BX-Intermediaten in transgenen Pflanzen .....	42
Tabelle 17: Analyse von BX-Intermediaten und Tryptophan in Transgenen.....	42
Tabelle 18: Metaboliten-Profile von transgener Arabidopsis und Mais.....	43
Tabelle 19: Einfluss von Indolfütterung auf die Konzentration freien Indols und GDIBOAs ...	44
Tabelle 20: Ergebnisse des Isotop-Fütterungs-Experiments.....	45
Tabelle 21: 5HIONG in unterschiedlichen Pflanzenarten nach Fütterung mit ION .....	50
Tabelle 22: Umsatz von ION in 5HIONG in verschiedenen P450-Insertionsmutanten .....	52
Tabelle 23: Verteilung der BX in verschiedenen BX produzierenden Pflanzen .....	72

## Ahangsverzeichnis

Anhang 1: Metabolitanalyse in Mais. ....	87
Anhang 2: Phänotyp transgener Pflanzen in verschiedenen Entwicklungsstadien.....	88
Anhang 3: Phänotyp der Bx1Bx2 Pflanzen .....	88
Anhang 4: Phänotypen transgener Pflanzen .....	89
Anhang 5: Analyse der BX8-Aktivität in Mikrosomen und zytoplasmatischer Fraktion .....	90
Anhang 6: Medien zur Anzucht und Selektion von Mikroorganismen und Pflanzen.....	91
Anhang 7: Puffer für Assays.....	92

## Abkürzungsverzeichnis

5HIONG	Indolin-2-on-5- $\beta$ -D-Glucopyranosid
ABA	Abszissinsäure
ABT	1-Aminobenzotriazol
AtRBCS1	Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase kleine Untereinheit 1A (At1g67090)
ATR	Arabidopsis P450-Reduktase
BX	Benzoxazinoide
CBP60g	Calmodulin-bindendes Protein 60-like; At5g26920
cDNA	Komplementäre DNA
CDS	Kodierende Sequenz
cfu	Kolonie bildende Einheiten
CG	Cyanogene Glycoside
dai	Tage nach Keimansatz, im Fall von Arabidopsis nach Stratifizierung
DIBOA	2,4-Dihydroxy-1,4-Benzoxazin-3-on
DIMBOA	2,4-Dihydroxy-7-Methoxy-1,4-Benzoxazin-3-on
DMSO	Dimethylsulfoxid
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
EtOAc	Ethylacetat
GAP C	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase C (At3g04120)
GDIBOA	4-Hydroxy-3-Oxo-3,4-Dihydro-1,4-Benzoxazin-2-yl- $\beta$ -D-Glucopyranosid
GDIMBOA	4-Hydroxy-7-Methoxy-3-Oxo-3,4-Dihydro-1,4-Benzoxazin-2-yl- $\beta$ -D-Glucopyranosid
gDNA	Genomische DNA
FG	Frischgewicht
FMO1	Flavin-abhängige Monooxygenase 1; At1g19250
GS	Glucosinolate
HBOA	2-Hydroxy-1,4-Benzoxazin-3-on
HDMBOA	2-Hydroxy-4,7-Dimethoxy-1,4-Benzoxazin-3-on
HDM <sub>2</sub> BOA	2-Hydroxy-4,7,8-Trimethoxy-1,4-Benzoxazin-3-on
HION	3-Hydroxy-1,3-Dihydro-Indol-2-on / 3-Hydroxyindolin-2-on
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IAA	Indolessigsäure
ICS1	Isochorismatesynthase 1; At1g74710
IGL	Indol-3-Glycolphosphatlyase
IGP	Indol-3-Glycerolphosphat

ION	Indolin-2-on
ISTD	Interner Standard
JA	Jasmonic acid
LC-MS	Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie
LiAc	Lithiumacetat
m/z	Masse zu Ladung Verhältnis
MeOH	Methanol
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MM	Material und Methoden
MS	Murashige-Skoog Medium
MTX	Methotrexat
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
NahG	Salicylsäurehydroxylase
NASC	Nottingham Arabidopsis Stock Centre
NCP1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> P450-Reduktase (YHR042W)
NHP	N-Hydroxy-pipecolinsäure
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerasekettenreaktion
PHD	Prohexadion
POR	P450-Oxidoreduktase
PPT	Phosphinotricin
rcf	Relative Zentrifugalbeschleunigung
PR-1	Pathogenesis-related protein 1; At2g14610
RT	Raumtemperatur
RT-qPCR	quantitative PCR nach reverser Transkription
S3H	Salicylsäure-3-Hydroxylase; At4g10500
SA	Salicylsäure
SAR	Systemische erworbene Resistenz
SARD	SAR-Deficient 1; At1g73805
Sid2	SA induction deficient 2; At1g74710 siehe ICS1
SUR2	Superroot 2; Cyp83B1 (At4g31500)
TG	Trockengewicht
TRP	Tryptophan
TS	Tryptophansynthase
TSA	Alpha-Untereinheit der Tryptophansynthase
TSB	Beta-Untereinheit der Tryptophansynthase
UGT	Uridindiphosphat-Glycosyltransferase



UHPLC	Ultrahochleistungsflüssigkeitschromatographie
upm	Umdrehungen pro Minute
Vol	Volumen (entspricht dem Vielfachen eines Volumens)
WT	Wildtyp

# 1 Einleitung

## 1.1 Sekundärmetabolite als Abwehrchemikalien der Pflanzen

Pflanzliche Sekundäre Stoffwechselprodukte haben viele Funktionen: Sie fungieren als Frostschutz, als allelopathische Stoffe, als Lockmittel (Pigmentierung, volatile Stoffe) und in der Verteidigung als Repellents oder als toxische Abwehrstoffe. Im Pflanzenreich besteht eine ungeheure Vielfalt an Sekundärmetaboliten mit mehr als 200 000 unterschiedlichen Substanzen. Manche Stoffe werden nur von bestimmten Pflanzenfamilien oder Arten produziert, andere sind häufiger anzutreffen. Bei Abwehrstoffen besteht meist ein wechselseitiger Ausschluss. So können beispielsweise Gerstewildarten das Benzoxazinoid (BX) DIBOA und Gramin produzieren, es kommen aber in keiner Art beide Stoffe gleichzeitig vor (Grün *et al.*, 2005). Universelle Abwehrstoffe müssen oft in hohen Konzentrationen vorliegen um eine Wirkung zu entfalten. Im Fall von BX und Gramin liegt die notwendige Konzentration je bei 0,3–3,0  $\mu\text{mol/g}$  FG (Hanson *et al.*, 1981; Sicker *et al.*, 2000). Bedingung für die Etablierung einer Sekundärstoff-Biosynthese im Zuge der Evolution ist Flexibilität des vorliegenden metabolischen Netzwerks sowohl in Bezug auf Tolerierung reaktiver Substanzen als auch in der Bereitstellung von Energiereserven für die benötigte hohe Syntheserate. Daraus könnte die Konzentration auf nur eine oder wenige Stoffklassen innerhalb von Pflanzenfamilien, die dafür in großen Mengen synthetisiert werden resultieren. Die etablierte Vielfalt an Abwehrstoffen erschwert im Ökosystem das Auftreten von Generalisten.

Die Biosynthese kann bei Befall mit Pathogenen oder Herbivoren induziert werden, wie es beispielsweise bei Isoflavonoiden der Leguminosen der Fall ist (He *et al.*, 1998), oder sie können als vorgeformte Abwehrmetabolite vorhanden sein. Konstitutiv produzierte Abwehrstoffe bilden die erste sofort aktive Abwehrlinie und sollten gegen möglichst alle Arten von biologischem Stress wirken, also z.B. sowohl pathogene Mikroorganismen als auch herbivore Insekten kontrollieren. Das macht eine generelle ungerichtete Toxizität nötig. Typischerweise sind solche Abwehrstoffe chemisch instabil und reagieren mit vielen potentiellen Reaktionspartnern. Diese sind oft in Aminosäureresten zu finden. Die resultierende Inaktivierung von Proteinen schädigt alle, auch pflanzliche Gewebe. Um eine autotoxische Wirkung zu vermeiden liegen konstitutive Abwehrstoffe daher oft als 2-Komponenten Systeme vor. Der Abwehrstoff wird in einer inaktivierten Form physisch getrennt von der zweiten Komponente gelagert. Die aktivierende Komponente kann sich in einem anderen Zellkompartiment (z.B. Plastiden bei BX) oder in benachbarten Zellen befinden (z.B. Myrosinasen in Myrosinzellen bei Glucosinolaten (GS), Nintemann *et al.*, 2018). Bei einer Beschädigung des Gewebes durch Lyse oder Fraß kommen beide

Komponenten in Kontakt und der Abwehrstoff wird, z.B. durch Deglucosylierung, aktiviert. Beispiele für Abwehrstoffe im 2-Komponenten-System sind Dihydrochalcone (z.B. Apfel, *Malus domestica*), cyanogene Glucoside (CG, z.B. Mohrenhirse, *Sorghum bicolor*), Glucosinolate (GS, z.B. Arabidopsis) und Benzoxazinoide (BX, z.B. Mais, *Zea mays*).

Die Biosynthese von Sekundärmetaboliten zweigt vom Primärmetabolismus ab (Abbildung 1). Die Modifikation der Intermediate erfolgt oft durch Cytochrom P450-Enzyme (P450). P450 sind Monooxygenasen und katalysieren Hydroxylierungen, Oxygenierungen und weitere Reaktionen. Die für die Reaktion benötigten Elektronen werden in diesem Fall von NADPH über das Koenzym POR (P450-Oxidoreduktase) geliefert. Die POR ist ins Endoplasmatischen Retikulum (ER) integriert und der P450-POR-Komplex membrangebunden am ER lokalisiert. Das katalytische Zentrum der P450 befindet sich auf der zytosolischen Seite. Die Stabilisierung und Reaktivierung toxischer Metabolite erfolgt oft durch das Paar aus zytosolischer UDP-Glycosyltransferase (UGT) und in Plastiden oder anderen Zellkompartimenten gelagerter  $\beta$ -Glucosidase. Glucosylierung steigert die Wasserlöslichkeit und erleichtert den Transport in die Vakuole, die oft als Lagerorganell dient. Experimentelle Daten legen nahe, dass sekundäre Biosynthesewege oft in sogenannten Metabolons organisiert sind (Metabolon-Hypothese, Jensen *et al.*, 2015). Als Metabolons werden Enzymkomplexe bezeichnet, die alle Enzyme eines Biosyntheseweges umfassen. Als Charakteristikum von Metabolons wird Dynamik in der Assoziation und als wesentliche Komponente das Channelling von Intermediaten beschrieben (Srere, 1985; Zhang und Fernie, 2021). In der Theorie ermöglicht diese Organisation eine effizientere Biosynthese durch lokale Anreicherung der Intermediate und Begrenzung des Verlusts durch Diffusion. Freigesetzte Intermediate können durch nicht am Biosyntheseweg beteiligte Enzyme metabolisiert und dem Biosyntheseweg entzogen werden. Durch diese Abschottung bildet ein Metabolon eine Art Sub-Kompartiment, in dem ein bestimmter Biosyntheseweg kanalisiert wird. Mögliche allosterische Stimulationen zwischen den einzelnen Enzymen können die Umsatzrate der Enzyme im Vergleich zu Monomeren steigern (Laursen *et al.*, 2015). Nachgewiesen wurden die Komplexe für die Biosynthese von Dhurrin (Kristensen *et al.*, 2005; Laursen *et al.*, 2016) und Camalexin (Mucha *et al.*, 2019) und es gibt Ergebnisse, die auf ein Metabolon auch in der Biosynthese des Primärmetaboliten Lignin hindeuten (Bassard *et al.*, 2012). Die Metabolons in der Dhurrin- und Camalexinbiosynthese enthalten P450. Es wird vermutet, dass die POR als Nukleationszentrum eines Metabolons essentiell für dessen Bildung ist (Laursen *et al.*, 2016; Knudsen *et al.*, 2018). Im Fall der Dhurrin-Biosynthese ist die zytoplasmatische UGT Teil des Metabolons. P450 und UGTs katalysieren auch die Benzoxazinoid-Biosynthese und zumindest in Mais treten keine

nennenswerte Konzentrationen der Intermediate auf. Man kann daher vermuten, dass Benzoxazinoid-Biosynthese ebenfalls in einem Metabolon organisiert ist.

## 1.2 Charakteristische Abwehrmetabolite in Arabidopsis und Mais

Arabidopsis und Mais bilden familienspezifische Abwehrchemikalien, Glucosinolate (GS) und Camalexin bzw. Benzoxazinoide (BX). Die Biosynthesen sind aufgeklärt und die beteiligten Gene sind bekannt (Frey *et al.*, 1997; von Rad *et al.*, 2001; Böttcher *et al.*, 2009; Petersen *et al.*, 2018).

Im Kreuzblütler Arabidopsis wird Camalexin als Phytoalexin induziert gebildet während GS als Phytoantizipine konstitutiv vorliegen. Die Biosynthese der indolischen GS ist mit der von Camalexin durch gemeinsame Intermediate verknüpft. GS können in indolische und kettenverlängerte aromatische und aliphatische GS unterteilt werden. Die Biosynthese der aliphatischen GS beginnt mit der Aminosäure Methionin, die der aromatischen GS mit Phenylalanin, das Substrat der indolischen GS Biosynthese ist Tryptophan (TRP) (Halkier und Gershenzon, 2006; Abbildung 1). An der Biosynthese sind mehrere Enzymklassen beteiligt, darunter P450, C-S Lyasen, Sulfotransferasen, Glutathion-S Transferasen, Glutamat-Glyoxylat-Aminotransferasen und UGTs (Petersen *et al.*, 2018). Die Biosynthese der verschiedenen GS Klassen zeigt unterschiedliche, sich jedoch überschneidende

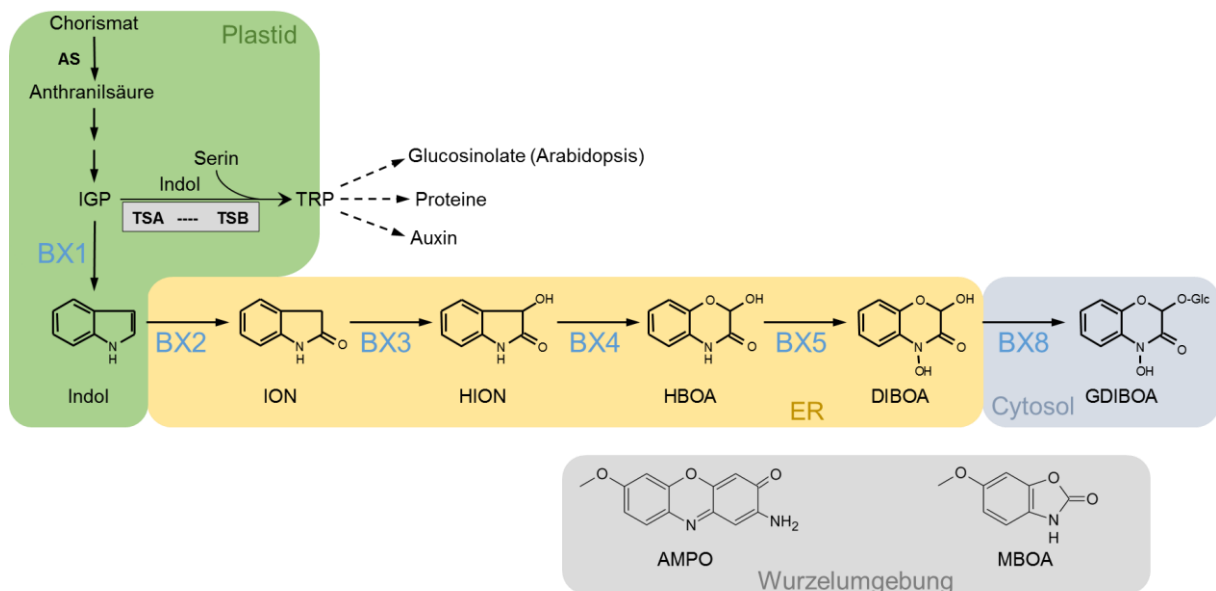


Abbildung 1: BX Biosynthese und Katabolismus. Die Biosynthese von Indol erfolgt im Plastid, die nachfolgenden Hydroxylierungen zu DIBOA durch P450 Enzyme am ER. Die Glucosylierung durch BX8 und BX9, die C7 Hydroxylierung durch die 2-Oxoglutarat-abhängige Dioxygenase BX6 und die abschließende Methylierung in der Biosynthese von DIMBOA-Glucosid finden im Zytosol statt. Der Katabolismus erfolgt über die Bildung von (M)BOA und durch mikrobielle Enzyme wird A(M)PO gebildet. Die BX-Biosynthese teilt sich mit Anthranilsäure einen Vorläufermetaboliten mit anderen Alkaloid-Biosynthesen und steht über Indol mit der Tryptophan- und der Auxinbiosynthese und in Brassicales zusätzlich mit der Glucosinolat-Biosynthese in Verbindung

Lokalisationsmuster. Aliphatische GS werden am stärksten in den Hauptaderleitbündeln der Rosettenblätter, in der Mitte der Rosette und im oberen Teil des Hypokotyls synthetisiert, während Biosynthesegene der indolischen GS in den größeren Blattadern und im Zentrum der Rosette eher schwächer exprimiert sind und die Expression in den peripheren Blattleitbündeln, im unteren Teil des Hypokotyls und in den Wurzelspitzen hoch ist (Nintemann *et al.*, 2018). GS werden in den am Phloem anliegenden S-Zellen gespeichert in die sie durch Plasmodesmata transportiert werden. Die Konzentration von GS in den S-Zellen liegt bei ca. 130µM/g FG (Nintemann *et al.*, 2018).

Benzoxazinoide sind Phytoantizipine die vor allem in Gräsern vorkommen. Die konstitutiv im Keimling und in jungen Pflanzen vorhandenen glucosylierten Benzoxazinoide werden über den 2-Komponenten Mechanismus von der plastidlokalisierten  $\beta$ -Glucosidase aktiviert. Die Aglucone sind chemisch instabile reaktive Abwehrstoffe. Benzoxazinoide können in Benzoxazolinone (z.B. MBOA) und Benzoxazinone unterteilt werden. Die beiden im Keimling von Gräsern in großen Mengen vorhandenen Vertreter DIBOA und DIMBOA sind zyklische Hydroxamsäuren und gehören zu den Benzoxazinonen. Ein Doppelringsystem aus einem aromatischen und einem heterozyklischen Ring mit Sauerstoff an Position 1 und Stickstoff an Position 4 bildet die Grundstruktur der Moleküle (Abbildung 1, DIBOA). Hydroxylierungen und anschließende O-Methylierungen an den Positionen C2, N4, C7 und C8 können in weiteren Derivaten (z. B. HDMBOA und HDM<sub>2</sub>BOA) vorhanden sein, die vor allem induziert nach Insektenbefall gebildet werden (Meihls *et al.*, 2013; Handrick *et al.*, 2016). Die Aglucone der Benzoxazinone sind zyklische Halbacetale, die durch Ringöffnung reaktive  $\alpha$ -oxo-Aldehyde als Intermediate bilden und als starke Elektrophile mit nukleophilen Resten z.B. von Aminosäuren reagieren. Durch diese ungerichtete Reaktion sind BX sowohl gegen Mikroorganismen als auch gegen Insekten wirksam. Bakteriostatische Wirkung wurde für *Erwinia* spp. gezeigt (Corcuera *et al.*, 1978). Eine fungizide Wirkung gegen *Fusarium* Arten konnte durch die Abbauprodukte MBOA und BOA nachgewiesen werden (Virtanen und Hietala, 1955; Glenn *et al.*, 2002). Diverse Insektenarten, darunter auch der Maiszünsler, werden von BX in ihrer Entwicklung inhibiert und Fraßschäden durch abstoßende Wirkung reduziert (Übersicht in Wouters *et al.*, 2016; Niculaes *et al.*, 2018). Nach Ringöffnung von Benzoxazinonen findet spontan die Bildung von Benzoxazolinonen statt und bei Exsudation in den Boden abgegebenes DIBOA und DIMBOA degradieren dort zu BOA bzw. MBOA. Durch weitere von Mikroben ausgeführte Schritte entstehen die Endprodukte APO und AMPO. Diese sind stabil und haben eine allelopathische Wirkung (Abbildung 1) (Macías *et al.*, 2004; Macías *et al.*, 2014).

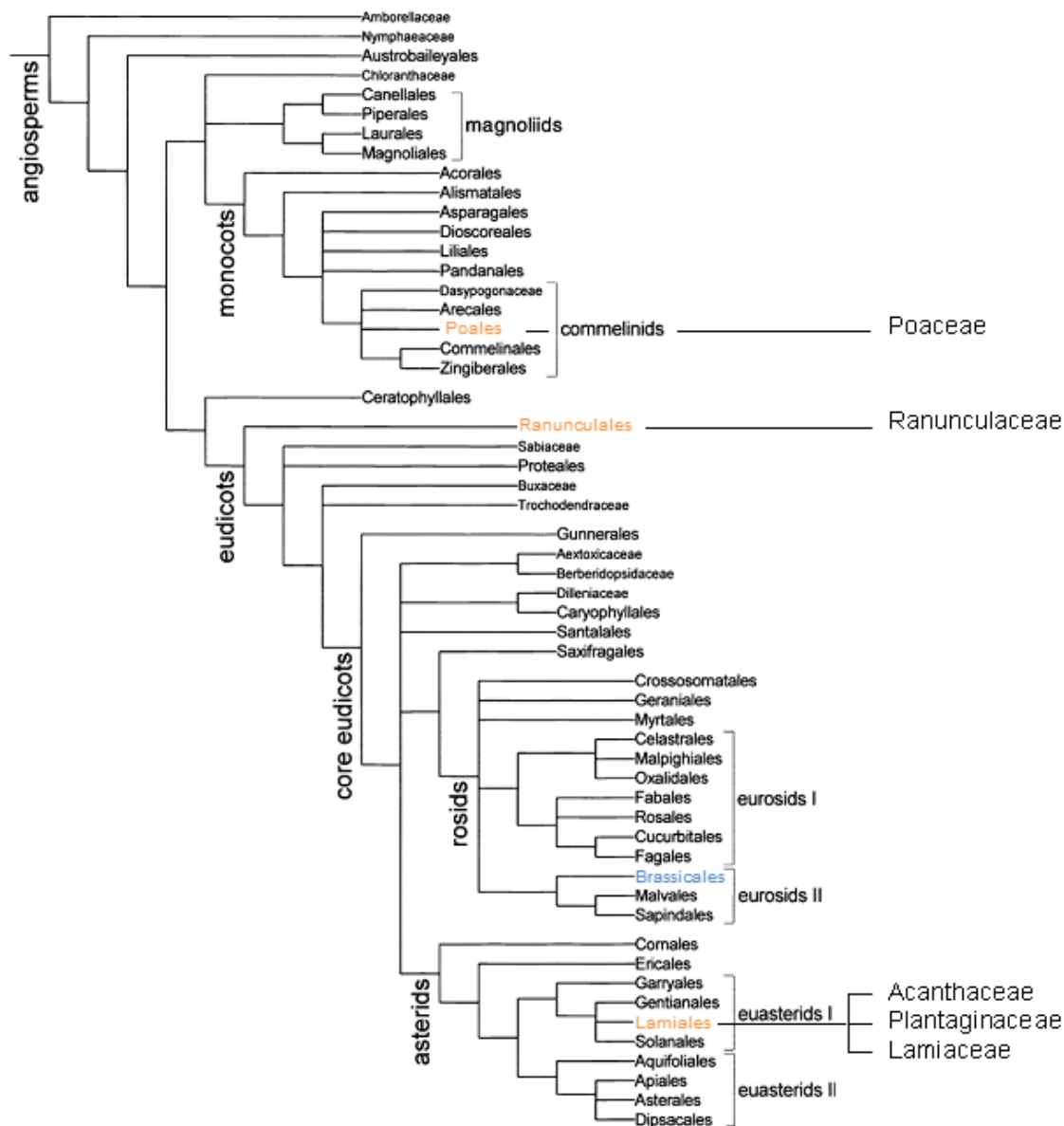


Abbildung 2: Stammbaum der Angiospermen. Die hervorgehobenen Ordnungen Poales, Ranunculales und Lamiales enthalten jeweils Arten, die BX synthetisieren, die Biosynthese ist dabei wahrscheinlich polyphyletischen Ursprungs (Dick et al., 2012; Hannemann et al., 2018). Arabidopsis gehört zu den Brassicaceae, kein Vertreter der Brassicales synthetisiert BX, die charakteristischen Abwehrstoffe sind in dieser Ordnung die Glucosinolate. Bild verändert nach The Angiosperm Phylogeny Group (2016)

Die Gräser Mais, Weizen und Roggen sind BX-produzierende Nutzpflanzen. Der Biosyntheseweg ist in den Gräsern monophyletischen Ursprungs (Grün et al., 2005). BX kommen auch in einigen phylogenetisch nicht verwandten Dikotyledonen vor (Abbildung 2, Niculaes et al., 2018) die den Biosyntheseweg wahrscheinlich durch jeweils unabhängig wiederholte Evolution erworben haben (Schullehner et al., 2008; Dick et al., 2012; Hannemann et al., 2018). Das wichtigste BX in Mais und Weizen ist (G)DIMBOA (2,4-

Dihydroxy-7-Methoxy-1,4-Benzoxazin-3-on-Glucosid), dessen Konzentration in jungen Pflanzen am höchsten ist und im millimolaren Bereich liegt (Schullehner *et al.*, 2008). Mit fortschreitendem Alter nimmt die Menge von DIMBOA in Mais ab (Schullehner *et al.*, 2008). In Mais ist (G)DIMBOA sowohl in Blättern zu finden als auch in den Wurzeln, dagegen sind in Maiskörnern BX nicht nachweisbar. In Roggenblättern findet sich hauptsächlich (G)DIBOA (2,4-Dihydroxy-1,4-Benzoxazin-3-on-Glucosid) während in den Wurzeln (G)DIMBOA zu finden ist (Rice *et al.*, 2005). Die BX-Konzentrationen in Roggenkeimlingen liegen in der gleichen Größenordnung wie bei Mais. In BX produzierenden Dikotyledonen ist (G)DIBOA das Hauptprodukt.

Da die Resistenz von Mais gegen Pathogene und Insekten wesentlich von BX vermittelt wird und der Abwehrmetabolit in Maiskörnern und zur Silage verwendeten reifen Pflanzen nicht oder in geringen Mengen vorhanden ist, wurde effiziente BX-Biosynthese in der Maiszüchtung positiv selektiert. Im Gegensatz zu anderen Abwehrstoffen, die in Nutzpflanzen oft auf Grund von Unverträglichkeit oder wegen ihres Geschmacks herausgezüchtet wurden (Quinolizidine alkaloiden von Lupinen, Alkaloide in Kartoffeln, Wink, 2003), sind BX daher auch in Hochleistungssorten von Mais in hohen Konzentrationen vorhanden (Grombacher *et al.*, 1989; Barry und Darrah, 1991).

### 1.3 Biosynthese der BX

Die Biosynthese der BX wurde in Mais vollständig (Frey *et al.*, 1997; von Rad *et al.*, 2001; Jonczyk *et al.*, 2008; Meihls *et al.*, 2013; Handrick *et al.*, 2016) und in anderen Gräsern zu großem Teil aufgeklärt (Nomura *et al.*, 2002; Grün *et al.*, 2005; Nomura *et al.*, 2008; Tanwir *et al.*, 2017; Übersicht in Niculaes *et al.* 2018). Sie beginnt in Mais mit der plastidlokalisierten Indolsynthese BX1, die die Verzweigungsstelle mit dem Primärmetabolismus bildet. BX1 ist ein Homolog der alpha-Untereinheit (TSA) der Tryptophansynthese (TS), beide Enzyme teilen sich das Substrat Indol-3-Glycerinphosphat (IGP) und produzieren Indol (Abbildung 1). In Mais ist ein weiteres Homolog von *Bx1* vorhanden, die Indol-3-Glycerinphosphatlyase *Igl* (Frey *et al.*, 2000). TSA ist nicht als Monomer, sondern ausschließlich als Teil der heterodimeren Tryptophansynthese nach allosterischer Aktivierung aktiv (Creighton und Yanofsky, 1966). Nach der Synthese im Komplex der TS wird Indol von der Untereinheit TSA zu TSB durch den die Einheiten verbindenden Tunnel weitergegeben und steht damit nicht für andere Stoffwechselwege zur Verfügung. Im Gegensatz dazu sind BX1 und IGL auch als Monomere aktiv und das von IGL gebildete freie Indol wird als gasförmiges Signal emittiert (Frey *et al.*, 2000; Zhuang *et al.*, 2012).

BX1 erzeugt Indol für die Biosynthese der BX, der Sekundärmetabolit-Biosyntheseweg steht an dieser Stelle damit in Konkurrenz zum Primärstoffwechsel. Die darauffolgenden

Additionen von Sauerstofffunktionen an Indol werden von den vier Cytochrom P450 Enzymen BX2 (CYP71C4), BX3 (CYP71C2), BX4 (CYP71C1) und BX5 (CYP71C3) katalysiert. Die erste Modifikation von Indol findet an der C2 Position statt, womit Indolin-2-on (ION) gebildet wird. BX3 katalysiert die Hydroxylierung von ION an der C3 Position und produziert damit 3-Hydroxyindolin-2-on (HION). Auf diese Reaktion folgt die Ringerweiterung von HION zu 2-Hydroxy-1,4-Benzoxazin-3-on (HBOA) durch BX4. BX5 katalysiert schließlich die Hydroxylierung des Stickstoffatoms des Heterozyklus und produziert 2,4-Dihydroxy-1,4-Benzoxazin-3-on (DIBOA). Das toxische DIBOA wird durch die UGT BX8 bzw. BX9 glucosyliert und als GDIBOA entweder gespeichert oder, wie in Mais, weiter modifiziert (Abbildung 1). Die Modifikation umfasst weitere Hydroxylierungen und Methylierungen des Moleküls, auf die jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht eingegangen wird. Die Gene der Biosynthese von GDIBOA sind in Mais in einem 264kb großen Cluster auf Chromosom 4 angeordnet. Die für die Modifikation zu GDIMBOA benötigten Gene *Bx6* und *Bx7* sind ebenfalls auf Chromosom 4 lokalisiert, liegen jedoch 1,7 bzw. 15 MB von dem Cluster entfernt.

#### **1.4 Transfer von Biosynthesen zwischen Pflanzenarten**

Aufgrund der Wirkung von BX als basale Abwehrchemikalien sind sie interessante Kandidaten für den Transfer in Pflanzenarten, die keine BX produzieren. Sollte der Transfer gelingen, wäre es möglich die Abwehrfähigkeit der Zielpflanze zu verändern. Die Konsequenzen der gleichzeitigen Produktion von zwei unterschiedlichen Stoffklassen zur Abwehr könnten untersucht werden und der oben erwähnte gegenseitige Ausschluss von Abwehrstoffen, der während der evolutionären Entwicklung der Biosynthesewege erfolgte, wäre möglicherweise aufgehoben. Im Erfolgsfall könnte das Pilotprojekt auch die Möglichkeit erforschen BX oder andere natürliche Abwehrstoffe in transgenen Nutzpflanzen zu verwenden.

Prinzipiell können ganze Biosynthesewege über verschiedene Reiche der Lebewesen ausgetauscht werden. So wurde z.B. die Biosynthese der Karminsäure aus der Cochenille-Schildlaus *Dactylopius coccus* teilweise in dem Schimmelpilz *Aspergillus nidulans* exprimiert (Frandsen *et al.*, 2018). Dass der Transfer kompletter Biosynthesen von Abwehrchemikalien zwischen Pflanzen möglich ist, wurde ebenfalls gezeigt. Die Biosynthesegene von Dhurrin wurden von *Sorghum bicolor* erfolgreich in Arabidopsis transformiert, woraufhin sich auch das Dhurrin-Metabolon in Arabidopsis bildete (Kristensen *et al.*, 2005). Die Biosynthese von Benzylglucosinolaten von Arabidopsis wurde stabil in *Nicotiana tabacum* etabliert. In diesem Fall wurde durch die Produktion der Fremdmetabolite eine neue biologische Interaktion, die Eiablage des Kreuzblütler-Spezialisten *Plutella xylostella* auf der Nichtwirtspflanze stimuliert (Møldrup *et al.*, 2012).



Für die Transformation eines Biosynthesewegs gibt es Grundvoraussetzungen. Der Biosyntheseweg sollte komplett aufgeklärt und alle beteiligten Gene bekannt sein. Für den Zielorganismus müssen Methoden existieren, die eine stabile Transformation ermöglichen. Der Zielorganismus müsste die Translation mit korrekter Proteinfaltung und posttranslationaler Modifikation unterstützen. Der Fremdstoff sollte keine Vergiftung im Zielorganismus hervorrufen die eine weitere Biosynthese unmöglich machen könnte. Wenn das Ziel eine autonome Biosynthese des "Xenobiotikums" ist, muss auch das Substrat des Biosynthesewegs vorliegen. Während die bisher zwischen Pflanzen übertragenen Abwehrstoffsynthesewege als ubiquitäres Ausgangssubstrat eine Aminosäure haben, also am Endpunkt des Primärstoffwechselwegs ihren Ausgang nehmen, greift die BX-Biosynthese auf das Intermediat IGP der TRP-Biosynthese zurück, Primär- und Sekundärstoffwechsel stehen in direkter Konkurrenz. Durch den BX-Biosynthesetransfer kann untersucht werden, in wieweit die Etablierung von konkurrierenden Stoffwechselwegen in einem bestehenden metabolischen Netzwerk tolerierbar ist. Die Ergebnisse können wichtige Hinweise auf die Frage liefern, warum die Evolution eine Vielfalt an Abwehrstoffen in einer Spezies nicht bevorzugt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die BX Biosynthese von *Zea mays* in *Arabidopsis* übertragen. Basis für die Versuche war, dass in vorherigen Untersuchungen die Aktivität der individuellen BX-Gene in heterologen Systemen nachgewiesen war (Grün *et al.*, 2005; Lenk, 2015). Der Versuch den kompletten Biosyntheseweg von GDIBOA in *Arabidopsis* zu exprimieren, indem alle *Bx*-Gene unter Kontrolle des Cauliflower Mosaik Virus 35S-Promoter (*p35S*) übertragen wurden, war jedoch nicht erfolgreich. Durch eine Reihe von Kreuzungen konnten zwar Pflanzen erzeugt werden, die alle für die Biosynthese benötigten Gene enthielten, in diesen Pflanzen war jedoch GDIBOA nicht nachweisbar (Lenk, 2015). Als Grund für die fehlende Biosynthese wurde die niedrige Expression der BX-Proteine vermutet. Bei Transfer mehrerer Gene (im Fall der BX-Biosynthese 6 Gene), kommt es oft zum Abschalten der Gene durch Silencing, wenn diese durch den Promoter *p35S* getrieben werden (Peremarti *et al.*, 2010; Møldrup *et al.*, 2012). Eine weitere Hürde könnte die Codonverwendung von Mais darstellen. Maisgene sind GC reich, was die Translation in *Arabidopsis* erschwert. Daher wurde eine neue Strategie des Gentransfers entwickelt. Um ein langes und arbeitsaufwändiges Kreuzungsschema zu vermeiden, wurde die Anzahl der zu transformierenden Konstrukte reduziert, indem die vier P450 BX Gene in einem Konstrukt zusammengefasst wurden. Die Verwendung von *p35S* wurde reduziert, die BX Gene wurden von endogenen *Arabidopsis* Promotoren getrieben. Die Codonverwendung wurde angepasst. Um die Bildung eines möglichen BX Metabolons zu erleichtern, wurde auch die POR aus Mais in *Arabidopsis* transformiert, da diese möglicher Bestandteil eines hypothetischen Multienzymkomplexes ist.

## 1.5 Ziel der Arbeit

Die enzymatische Aktivität der erstmals zur Transformation eingesetzten modifizierten Bx-Gene sollte zunächst in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* evaluiert werden. Durch parallele Expression mehrerer BX Gene in Hefe sollte in diesem heterologen System ein möglicher Einfluss von Enzyminteraktionen auf katalytische Eigenschaften analysiert werden. Außerdem sollte der Transfer aller sechs biosynthetischen Gene erfolgen um die BX-Biosynthese möglicherweise in das mikrobielle System einzuführen.

Das Hauptziel der Untersuchungen war es die Voraussetzungen für effiziente stabile transgene Expression der BX Biosynthese in Arabidopsis zu bestimmen. Um alle möglichen Interaktionspartner für die Ausbildung eines biosynthetische Multienzymkomplexes einsetzen zu können, wurde die POR von Mais isoliert. Die Auswirkungen der Biosynthese eines Fremdmetaboliten auf das metabolische Netzwerk sollten untersucht und mögliche Flaschenhälse der Expression aufgedeckt werden. Die Effekte von GDIBOA auf die transgene Pflanze und ihre Fähigkeit zur Abwehr von Pathogenen und Herbivoren sollte evaluiert werden. Die Ergebnisse sollten zusätzlich Einblick in Bedingungen der evolutionären Etablierung einer Sekundärstoffbiosynthese geben.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Pflanzen

Tabelle 1: Pflanzenarten und Linien

Art	Besonderheit/Anmerkung/Sorte	Bezugsquelle / Ursprung
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Col-0	LS Genetik TUM
<i>Arabidopsis thaliana</i>	sid2 (Col-0)	Dr. Corina Vlot, Helmholtz Zentrum München
<i>Arabidopsis thaliana</i>	NahG (Col-0)	Dr. Anton Schäffner, Helmholtz Zentrum München
<i>Arabidopsis thaliana</i>	sid2/NahG (Col-0)	Dr. Anton Schäffner, Helmholtz Zentrum München
<i>Brassica oleracea</i>	Brokkoli Atlantic	Dehner Gartencenter
<i>Consolida ajacis</i>		Templiner Kräutergarten
<i>Consolida ambigua</i>		Templiner Kräutergarten
<i>Delphinium grandiflorum</i>		Templiner Kräutergarten
<i>Eutrema salsuginea</i>		E. Glawischnig, S. Mucha, LS Mikrobielle Biotechnologie, TUM
<i>Lotus japonicus</i>		C. Gutjahr, LS Genetik TUM
<i>Nicotiana benthamiana</i>		LS Genetik LMU
<i>Ocimum basilicum</i>		Templiner Kräutergarten
<i>Pisum sativum</i>		Dehner Gartencenter
<i>Allium porrum</i>	D'elbeuf	Dehner Gartencenter
<i>Avena sativa</i>	Sommerhafer	BioSuisse
<i>Hordeum spontaneum</i>	var. transcaspicum Vavilov	Leibniz Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung
<i>Hordeum spontaneum</i>	var. ischnatherum	Leibniz Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung
<i>Hordeum spontaneum</i>	var. spontaneum	Leibniz Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung
<i>Hordeum vulgare</i>	Sommergerste Avalon	G. Schweizer, LFL Freising
<i>Setaria italica</i>	Herbstfeuer	Templiner Kräutergarten
<i>Sorghum bicolor</i>		Templiner Kräutergarten
<i>Zea mays</i>	B73	LS Genetik TUM
<i>Zea mays</i>	bx1 (B73)	LS Genetik TUM
<i>Zea mays</i>	bx3 (B73)	LS Genetik TUM

#### 2.1.2 Mikroorganismen

Tabelle 2: Mikroorganismen

Stamm	Art	Resistenz/Auxotrophie	Ursprung/Zitat
XL-1 Blue	<i>Escherichia coli</i>	Tetracyclin	Stratagene
GV3101 MP90	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Rifampicin, Gentamicin	Koncz et al. 1986
Wat11	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	$\Delta his \Delta met \Delta leu \Delta ura \Delta ade$	Pompon et al. 1996
BY4741	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	$\Delta his \Delta met \Delta leu \Delta ura$	Baker Brachmann et al. 1998

Tabelle 3: Verwendete Hefestämme, Vektoren und transferierte Gene. Zur Transformation eingesetzt wurde der auxotrophe Hefestamm BY4741. *Zea mays* Codonverwendung (zm), *Arabidopsis* Codonverwendung (at), \* matures Protein ohne Transitpeptid

Bezeichnung	Vektoren	Genotyp	Codon
BY4741	-	$\Delta his \Delta leu \Delta met \Delta ura$	-
ATR	pGREG503	ATR1	-
POR2	pGREG503	POR2	-
Bx1	pLHN	Bx1*, ZmPor2	-
POR1 BX2(zm)	pGREG503, pYeDP60	Bx2(zm), ZmPor1	Z.m
POR1 BX3(zm)	pGREG503, pYeDP60	Bx3(zm), ZmPor1	Z.m
POR1 BX4(zm)	pGREG503, pYeDP60	Bx4(zm), ZmPor1	Z.m
POR1 BX5(zm)	pGREG503, pYeDP60	Bx5(zm), ZmPor1	Z.m
POR2 BX2(zm)	pGREG503, pYeDP60	Bx2(zm), ZmPor2	Z.m
POR2 BX3(zm)	pGREG503, pYeDP60	Bx3(zm), ZmPor2	Z.m
POR2 BX4(zm)	pGREG503, pYeDP60	Bx4(zm), ZmPor2	Z.m
POR2 BX5(zm)	pGREG503, pYeDP60	Bx5(zm), ZmPor2	Z.m
ATR BX2(zm)	pGREG503, pYeDP60	Bx2(zm), Atr1	Z.m
ATR BX3(zm)	pGREG503, pYeDP60	Bx3(zm), Atr1	Z.m
ATR BX4(zm)	pGREG503, pYeDP60	Bx4(zm), Atr1	Z.m
ATR BX5(zm)	pGREG503, pYeDP60	Bx5(zm), Atr1	Z.m
ATR BX3(at)	pGREG503, pGREG506	Bx3(at), Atr1	A.t
ATR BX4(at)	pGREG503, pGREG506	Bx4(at), Atr1	A.t.
ATR BX5(at)	pGREG503, pGREG506	Bx5(at), Atr1	A.t.
POR BX2(zm)BX8	pGREG503, pYeDP60, pGREG505	Bx2(zm), Bx8(zm), ZmPor2	Z.m
POR BX3(zm)BX8	pGREG503, pYeDP60, pGREG505	Bx3(zm), Bx8(zm), ZmPor2	Z.m
POR BX4(zm)BX8	pGREG503, pYeDP60, pGREG505	Bx4(zm), Bx8(zm), ZmPor2	Z.m
POR BX5(zm)BX8	pGREG503, pYeDP60, pGREG505	Bx5(zm), Bx8(zm), ZmPor2	Z.m
ATR BX2(zm)BX8	pGREG503, pYeDP60, pGREG505	Bx2(zm), Bx8(zm), Atr1	Z.m
ATR BX3(zm)BX8	pGREG503, pYeDP60, pGREG505	Bx3(zm), Bx8(zm), Atr1	Z.m
ATR BX4(zm)BX8	pGREG503, pYeDP60, pGREG505	Bx4(zm), Bx8(zm), Atr1	Z.m
ATR BX5(zm)BX8	pGREG503, pYeDP60, pGREG505	Bx5(zm), Bx8(zm), Atr1	Z.m
POR BX2(at)BX8	pGREG503, pGREG505, pGREG506	Bx2(at), Bx8(zm), ZmPor2	A.t.
ATR BX2(at)BX8	pGREG503, pGREG505, pGREG506	Bx2(at), Bx8(zm), Atr1	A.t.
POR BX2BX3	pGREG503, pGREG505, pGREG 506	Bx2(at), Bx3(at), ZmPor2	A.t
POR BX3BX4	pGREG503, pGREG505, pGREG 506	Bx3(at), Bx4(at), ZmPor2	A.t
POR BX4BX5	pGREG503, pGREG505, pGREG 506	Bx4(at), Bx5(at), ZmPor2	A.t
ATR BX2BX3	pGREG503, pGREG505, pGREG 506	Bx2(at), Bx3(at), Atr1	A.t
ATR BX3BX4	pGREG503, pGREG505, pGREG 506	Bx3(at), Bx4(at), Atr1	A.t
ATR BX4BX5	pGREG503, pGREG505, pGREG 506	Bx4(at), Bx5(at), Atr1	A.t
PB85243	pESC-HIS, pESC-LEU, pXRM15, pGREG506	Bx2(at), Bx3(at), Bx4(at), Bx5(at), Bx8(at), ZmPor2	A.t
BxY	pESC-HIS, pEsc-LEU, pLHN, pXRM15	Bx1*, Bx2(at), Bx3(at), Bx4(at), Bx5(at), Bx8(at), ZmPor2	A.t

### 2.1.3 Chemikalien

Die in diese Arbeit verwendeten Chemikalien (analytischer Reinheitsgrad) wurden sofern nicht anders angegeben von den Firmen Bio-Rad Laboratories (Dreieich), Merck mit Sigma-Aldrich und Fluka (Darmstadt), Roth (Karlsruhe, und Serva (Heidelberg) bezogen. Enzyme für Modifikation von DNA, PCR und cDNA-Synthese wurden von New England Biolabs

(Frankfurt) und ThermoFisher Scientific-Applied Biosystems bezogen. Für die DNA- und RNA-Reinigung wurden Kits von Macherey und Nagel (Düren) eingesetzt.

Das Substrat DIBOA wurde von Prof. Dr. D. Sicker, Universität Leipzig und Frau Dr. L. Hannemann aus *Lamium galeobdolon* Blättern isoliert.

#### 2.1.4 Puffer und Medien

Sämtliche Puffer und Lösungen sind tabellarisch im Anhang aufgelistet (Anhang 6, Anhang 7)

#### 2.1.5 Synthetische DNA und Oligonukleotide

Codonoptimierte *Bx8* cDNA und Cluster-DNA (codonangepasste codierende Bereiche und Promoter-Terminatorsequenzen) wurden von GeneArt life technologies, Thermo Fisher Scientific synthetisiert.

Tabelle 4: Liste der verwendeten Primer

Primer	Sequenz 5' - 3'	T <sub>m</sub> [°C]
<b>Klonierung von Reduktase-Kandidaten</b>		
MTR_D f	GCCGAGTGACGTGACGAT	62
MTR_D Rev	TTTACCACACGTCCCTCAGATAT	61
MTR_C f	GGGTGGAAGCGAGTGACGAT	66
MTR_C Rev	GCTTATTTGAGGTGATGTGTCACCAT	58
MTR_A f	TAAACGATGGACTCGGCCA	64
MTR_A Rev	TTTACCACACATCCCTCAGATAT	65
MTR_B f	AGAGAGCGAGCGGCGAT	64
MTR_B Rev	AATGGGGGTGATGTGTCACCAT	67
MTR_B_SC_F:	cccggggaattctaataATGGCGGCACTGGAG	59/77
MTR_B_SC_Rev	gtcgactctagaAATGGGGGTGATGTGTCA	59/73
MTR_C_SC_F:	cccggggaattctaataATGGCGGCGCTGGA	63/73
MTR_C_SC_Rev:	gtcgactctagaGGCTTATTTGAGGTGATGTGTCA	62/73
Atr1_pt2_F_V2	TCACACACATGAATCTGATCGGTCT	63,7
Atr1_pt2_R	TCACCAGACATCTCTGAGGTATCTT	59,1
<b>Klonierung von <i>Bx</i>-Genen</b>		
AtCd_Bx2F	AGGATCCTAATAATGGCTGCTCAGCTCC	72
AtCd_Bx2Rw	TGTCGACTTCAAGCAGCCTGAGGAA	72
AtCd_Bx3F	AGGATCCTAATAATGGCTCTCGGAGC	70
AtCd_Bx3Rw	TGTCGACTTCAAGAAGCGATCCTAGG	70
AtCd_Bx4&5_For	AGGATCCTAATAATGGCTCTCGAGGCTG	71
AtCd_Bx4Rw	TGTCGACTTCACTTAGGGATTCTTGAACG	71
AtCd_Bx5_Rw	TGTCGACTTCAACGATCTTAGGCACG	72
Bx8At_Sma_f	accggggaataATGGCTGCTTCTTGC	72/57
Bx8At_Xho_Rev	actcgagtTCAGTAAGAGTTGATGAGGTG	66/56
Bx2_At_f	TGGATCTTAAGCCTAACGAGT	57
Bx1_NotI_Fw	AGCGGCCGCTAATATGGCTTTTCGCGCCCA	82
Bx1_BamHI_Rw	TGGATCCTCATGGCAGCGCTTCT	75

Bx1_SC_cor_fw	TGCGGCCGCTATAAATGAGCCGTCCGGTGTCCG	79
<b>Sequenzierung und qPCR Analyse</b>		
AtBx2F	GGCTGCTGCTGCTCAGAGA	65
AtBx2Rev	CCTGAGAACAGCCTCAGCCA	
AtBx3F	GCAGAGATTGCCTCTTCCTCCT	64
AtBx3Rev	AGCATGTGGGTAGTGAGGAGCT	
AtBx4F	AAGCTGCTGCTGTTCTTGGAGT	64
AtBx4Rev	AATGCCACATCGGTGCAGT	
AtTaBx5F	CTTCAGCTTGCTGTGGGACA	65
AtTaBx5Rev	GGCCTAGAAGCGAGGATGTGA	
AtBx8F	TGCTGGTGCTAGAGCACCTGA	64
AtBx8Rev	CAGTCATAACTCCGAGAGCAGGA	
CYP81F2_F	GACATCTTCTCCCTCCGTTA	56
CYP82F2_Rev	TGAACCTGGTCTCCGTAGTA	57
AtGAPDH_Q_rev	GCACCTTTCCGACAGCCTTG	50
AtGAPDH_Q_for	ATTAGGATCGGAATCAACGG	50
MTR_B_Seq3	CGTTCAGCTTCAGCTGGA	65
MTR_C_Seq3	ACGAGGAGCTATTGCTGCA	67
MTR_C_Seq4:	GCCTTGGAACAGGCAATA	63
Bx3QFW3	ACCGGAACCAAGGCCGGAACA	68
Alt_Bx3QFW3	ACCGGAACCAAGGGCGGAACA	68
Bx3quantr2	CGTCCGGCGAGCGCATCGT	70
Alt_Bx3quantr2	CGTCCGGCGAGCCATCGT	70
GAL10 Forward	AAAAAAAGTAAGAATTTTTGAA	43
Gal10 Reverse	CAACGTATCTACCACGATTTGA	54
Gal1 Forward	AGATATATAAATGCAAAAACCT	43
Gal1 Reverse	GTTCTTAATACTAACATAACT	43
TSBT2_f	CGGGAAGTCTTCGTTGGAGTCT	58
TSBT2_rev	TGTTGTGAGTAGATCTCAAAGCTGCTT	58
PR1_f	TGTTCTTCCCTCGAAAGCTCAA	60
PR1_rev	TTAGCCTTCTCGCTAACCAC	60
SAG101F	ATCCATGTTGTCTCTGGCGG	60
SAG101Rev	TCTTTGACGAAACGCGAG	60
FMO1f	AGGGCCGGAGATGTTTCAAG	60
FMO1Rev	CTCACCACCATTGTGCAAGC	60
FMO2_q_fw	AGAAAGTGCCCGTGATTGGT	58
FMO2_q_rev	GCGCCATTTGACAAGAAGCA	58
zmpor_q_F	GGATCTGGATGACTATGCTC	57,3
zmpor_q_R	CAACAGGAACAAGACGTTT	52,4
pGREG_promotor_seq_F	TGGGGTAATTAATCAGCGAAGCGATGA	63,4
ICS1 F	GCAAGAATCATGTTCTTACC	
ICS2 Rev	AATTATCCTGCTGTTACGAG	60
SARD1F	CTCTCGCCACATCAACAC	
SARD1Rev	CCCCTTTCTATCAGACATTCC	62
CBP60gF	GCACATCGACTTTCAAGG	
CBP60Rev	AACTCATCAGGACATCAGG	61
S3HF	GGATGATAAATGGGTCGCT	

S3HRev	TGTTTACTACGGCTCTATGG	61
Greg_Rev	GACCTAGACTTCAGGTTGTCT	54
Greg_Km_f	CCATTACGCTCGTCATCAA	56,6
GreG_KmRev	TGCCAATGATGTTACAGATGA	56
MS296_AtRbcS_F	TGATGGACGGTACTGGACAA	65
MS297_AtRbcS_R	GAAGCTTGGTGGCTTGTAGG	66
MS298_E.c. $\beta$ -tub_F	TGACAGCCCGGAATGAGT	66
MS299_E.c. $\beta$ -tub_R	TTGTCTTCGTTTCCCAGGTC	65
<hr/>		
Mutantenanalyse		
Sailseq503H01_Lp	CTGCTAAGGAAGGACGGCTACAACAATGGAGA	67
Sailseq503H01_Rp	ACTGCAAGACGAAAGTATGTGATGTCGCCTTGTGT	68
Sail_697_B07_Rp		
Cyp71B26	AGGGCCATACTTCTTTGAGAGCT	61
Sail_697_B07_Lp		
Cyp71B26	ACAGTAAGATGGCAATTCCATCCAAAATTTTAAACA	60
Salk_150892C_Rp		
Cyp71B2	AGCCGACCAAAGACGGTGGGGA	69
Salk_150892C_Lp		
Cyp71B2	TAGCAATCGCCATTGGCATTCCGGGA	68
SailB26RP2 Cyp71B26	GAAGTGATAGAATCCAAATGCTATCCATTTGTATGT	60
salk031939_Rp cyp81F1	ACTTCTCTGGCTCCTCCCAAATCTCTGGATCTC	68
salk031939_Lp cyp81F1	ACGTCGCATACAACCACACAACCGTTGGTACA	69
salk073776_Rp cyp81F2	ACGAGCATGAGCCCTTTGATGATGACGTCACT	69
salk073776_Lp cyp81F2	ACGCAGGGCTTCAATCTCCCACCA	68
salk012075C_Rp cyp81F2	TGGGTCTTGAGAGCTTCTTCTGCTCCTTCT	67
salk012075C_Lp cyp71B7	GTTGCGTTGCCAAAAGAAGAGAGTAACTGCCT	66
cs835866_Rp cyp81F3	ATGTTTTACTATGTGATTGTCCTTCTTTAGCT	64,2
cs835866_Lp cyp81F3	CAGCATTAGGCCTTTGATAGTGACGT	64,5
salk138918_Rp cyp81F4	TACCGAACTTGTTACTGTTTGTGTTTGTGAACGA	66,5
salk138918_Lp cyp81F4	TGGCGAGACGTTTTGAGGAGACGAT	67,5
salk093521c_Rp cyp71B25	TCAAAGCCAAGTCTCTCAGTTTCTTGACCATCA	68,7
salk093521c_Lp cyp71B25	TGCATGGAGCACTTATTACCAAATGAGTTAAGGTGA	68,6
salk005329_Rp cyp71B4	ATCTTCCTCCTGGCCCAGCAAAGCTT	68
salk005329_Lp cyp71B4	CTTGAGCTTTCTTCATAACCCGCGGTTTCT	67
Sail_398_H10_F	ATCCGCCATTGATTTGGCTTTAGA	59
Sail_398_H10_R	AGCATAGTCTTCCTCGAAAGAATGGT	60
Salk_026163_F	ATTGGGTGTGGGGCTTACCATTCTTCTTGT	69,5
Salk_026163_R	AGCCGGCTTAGCCACATTGAACGTA	68
pDAP101_LB3 LB	TAGCATCTGAATTTTATAACCAATCTCGATACAC	60
SALK_LBb1 LB	GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT	69
Salk LBb1.3	ATTTTGCCGATTTTCGGAAC	61
cs835866RP2	TGGAAATCCTCTCCTCGAACCGT	70

## 2.1.6 Vektoren

Tabelle 5: Für Klonierungsarbeiten und Transformationen verwendete Vektoren

Vektoren	Auxotrophiemarker	Antibiotikaresistenz	Promotor des Transgens	Ursprung
pESC-HIS	Histidin	Amp	pGAL1; pGAL10	Agilent
pESC-LEU	Leucin	Amp	pGAL1; pGAL10	Agilent
pXRM15	Methionin	Amp	-	Addgene; Chou et al. 2015
pGREG503	Histidin	Amp, Kan	pGAL1	Euroscarf
pGREG505	Leucin	Amp, Kan	pGAL1	Euroscarf
pGREG506	Uracil	Amp, Kan	pGAL1	Euroscarf
pXRM15-Bx8	Methionin	Amp	pGAL1	Nguyen 2018
pLHN	Uracil	Amp	pGAL1; pGAL10	Nguyen 2018
pGPTV-35SBarB	-	Kan; PPT	p35S	Becker et al. 1992; Dick et al. 2012
pYeDP60	Uracil, Adenin	Amp	pGAL10	Urban et al. 1990
pBluescript II KS+	-	Amp	-	Stratagene
pGEM-T easy	-	Amp	-	Promega

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 RNA Isolierung aus Pflanzen.

RNA aus Pflanzenmaterial wurde mit dem „NucleoSpin RNA Plant Kit“ (Macherey-Nagel, Düren, DE) nach Herstellerangaben isoliert. Die Konzentration der extrahierten RNA wurde mit dem Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek Instruments Inc., Winooski, USA) photometrisch gemessen. Eine weitere Kontrolle erfolgte durch Agarose Gelelektrophorese.

#### 2.2.1.2 Plasmid DNA Isolierung.

Plasmid DNA aus *E. coli* und *A. tumefaciens* wurde nach dem Prinzip der alkalischen Lyse nach Birnboim und Doly (1979) isoliert.

#### 2.2.1.3 Reverse Transkription.

cDNA wurde mit dem Kit „TaqMan Reverse Transcription Reagents“ (Thermo Scientific, USA) durch reverse Transkription nach Herstellerangaben synthetisiert.

#### 2.2.1.4 RT-qPCR.

Die Transkriptmenge wurde durch quantitative PCR gemessen. Dazu wurde der Lightcycler StepOnePlus (Applied Biosystems, Thermo Scientific, USA) und das Kit Kapa Cyber Fast (ABI Prism, Thermo Scientific, USA) Green nach Herstellervorgaben verwendet. Es wurde die Methode „Relative standard curve“ verwendet. Die Transkriptmengen wurden mit dem Housekeeping Gen *GAP C* normiert. Durch Schmelzkurvenanalyse wurde die Qualität der Amplifikation geprüft. Primer und Annealingtemperaturen sind in Tabelle 4 angegeben

Weitere molekularbiologische Verfahren wie PCR, Ligation, DNA Restriktion mit Endonukleasen, Agarosegelelektrophorese wurden nach Standardprotokollen bzw. Anleitungen der jeweiligen Kits durchgeführt. Die PCR Programme wurden an Primersequenzen und Fragmentgröße angepasst.



Alle Sequenzierungen wurden durch Eurofins Genomics Germany GmbH (Ebersberg) ausgeführt

## **2.2.2 Klonierungen**

### **2.2.2.1 Klonierung von *ZmPor*.**

*ZmPOR* Kandidaten wurden durch eine Peptid-BLAST Suche gegen ATR1 identifiziert. RNA wurde aus Mais extrahiert, in cDNA transkribiert und mit genspezifischen Primern (Tabelle 4) mittels PCR amplifiziert. Die DNA-Amplifikate wurden in pBluescriptII-KS+ kloniert. Die Isolierung der beiden Gene *ZmPor1* und *ZmPor2* wurde durch Sequenzierung verifiziert. Die cDNA-Sequenz wurde anschließend über die *SmaI/SalI* Schnittstellen in den Hefeexpressionsvektor pGREG\_503 und über die Schnittstellen *SmaI/XbaI* in das Ti-Plasmid pGPTV\_35SBarB kloniert.

### **2.2.2.2 Klonierung der *Bx*-Gene in Hefevektoren**

Für die transgene Expression der *Bx*-Gene in Hefen wurden Vektoren mit einzelnen *Bx*-Genen erstellt. Es wurden sowohl CDS mit maisspezifischer Codonverwendung als auch CDS mit Arabidopsis-angepasster Codonverwendung kloniert. Die CDS wurden ggf. *via* PCR aus vorliegenden Klonen (Frey *et al.*, 1997, Cluster-Konstrukte) amplifiziert, in passende Klonierungsvektoren ligiert und anschließend in die Hefeexpressionsvektoren kloniert (pESC, pXRM15, pGREG).

### **2.2.2.3 Erstellung des Vektors pLHN.**

Die Vektoren pGREG506 und pESC-LEU wurden mit den Restriktionsenzymen *AhdI* und *NaeI* geschnitten. Das entstandene Fragment des Vektors pGREG506 enthält den Uracil-Auxotrophiemarker, das Fragment des Vektors pESC-LEU zwei Multiple Cloning Sites und dem bakteriellen Replikationsursprung. Durch Ligation entstand ein Vektor mit zwei MCS und dem Uracil Auxotrophiemarker. Die Gene *Bx1* und *ZmPor2* wurden nacheinander durch Restriktion und anschließende Ligation in den entstandenen Vektor kloniert.

### **2.2.2.4 Erstellung des Vektors pXRM15-*Bx8*.**

Die Erstellung des Vektors pXRM15-*Bx8* ist in der Bachelorarbeit von Le Hoang Nguyen (2018) beschrieben. Der *pGal1* Promotor, die CDS von *Bx8* und der *tCyc1* Terminator wurden als *SacI* -*KpnI* -Fragment aus dem Vektor pGREG505-*Bx8* geschnitten und in den Vektor pXRM15 ligiert.

## **2.2.3 Transformation von Mikroorganismen**

### **2.2.3.1 Transformation von *Escherichia coli*.**

Chemisch transformationskompetente *E. coli* des Stamms XL1-blue (Stratagene) wurden nach Sambrook und Green (2012) transformiert.

### **2.2.3.2 Anzucht und Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*.**

Elektrokompetente *Agrobacterium tumefaciens* (Stamm GV3101 mp90) wurden nach Walkerpeach und Velten (1994) erzeugt. Die Elektroporation erfolgte in 2ml Küvetten im Gene-Transfection-Pulser (BioRad, USA) mit Einstellungen: 2,5kV, 400, 25µF. Es wurden 100ng Plasmid-DNA eingesetzt. Die Zellen wurden auf YEB-Agar Medium ausplattiert und durch Gentamicin, Rifampicin und Kanamycin selektiert. Zur Bestätigung der erfolgreichen Transformation wurde Plasmid-DNA isoliert, *E. coli* transformiert und die Identität des retransformierten Plasmids bestätigt.

### **2.2.3.3 Transformation von *Saccharomyces cerevisiae*.**

Für alle Arbeiten mit Hefen wurde der *S. cerevisiae* Stamm BY4741 ( $\Delta his \Delta leu \Delta met \Delta ura$ ) verwendet. Die Transformation erfolgte nach Gietz und Woods (2002). Eine 50ml Kultur wurde bis zu einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,8 angezogen, durch Zentrifugation bei 2000 rcf geerntet, mit H<sub>2</sub>O gewaschen und in 1ml 100mM LiAc resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Zellpellet in 400µl 100mM LiAc aufgenommen und in 50µl Aliquots aufgeteilt. Einzelstrang Träger-DNA wurde durch Aufkochen von Lachssperma-DNA (10 mg/ml) für 5 min bei 95°C und sofortiges Kühlen auf Eis hergestellt. Es wurden 240µl PEG 4000 (50% w/v), 36µl 1M LiAc, 50µl Träger-DNA, 1µg Plasmid DNA und 34µl H<sub>2</sub>O zu einem Zell-Aliquot gegeben und die Suspension wurde gemischt. Der Hitzeschock erfolgte bei 42°C für 40 min. Die Zellen wurden geerntet, in H<sub>2</sub>O aufgenommen und auf SC-Agar Medium ausplattiert. Die Selektion erfolgte über die jeweiligen Auxotrophiemarker (Tabelle 2). Durch sequentielle Transformation wurden mehrere *Bx*-Gene und *ZmPor* in einem Hefestamm vereinigt. Zur Erstellung des BxY Stamms wurden alle vier Plasmide gleichzeitig transformiert.

## **2.2.4 Pflanzenanzucht**

### **2.2.4.1 Arabidopsis und *Nicotiana benthamiana*.**

Samen wurden zur Sterilisation ca. 2 Minuten in 80% Ethanol inkubiert. Nach der Abnahme des Ethanols wurden die Samen in einer Lösung aus 1,2% Natriumhypochlorit und 0,1% Triton X-100 fünf Minuten lang geschüttelt und anschließend 5x mit je 1 Vol. sterilem voll entsalzten H<sub>2</sub>O gewaschen. Zur besseren Verteilung auf Platten wurden die Samen in 0,1% Agar aufgenommen und ausplattiert. Alternativ wurden Samen direkt auf Erde ausgestreut. Arabidopsis wurde 2 Tage bei +4°C im Dunklen stratifiziert. Arabidopsis Keimlinge wurden ca. 10 dai in Einzeltöpfe mit CL-T Erde pikiert und ab ca. 17 dai gedüngt. Die Anzucht erfolgte, wenn nicht anders angegeben bei „Kurztag“.

### **2.2.4.2 Weitere Pflanzen.**

Samen wurden ausgestreut und mit Erde bedeckt. Zur Vernalisierung von *Consolida ambigua* wurden die Töpfe für vier Tage in +4°C inkubiert 4 Tage in RT gestellt und wieder

für vier Tage in +4°C inkubiert. *Consolida ajacis* wurde 4 Tage bei +4°C im Dunklen stratifiziert. *D. grandiflorum* wurde bei RT in der Klimakammer gekeimt. *Pisum sativum*, *Brassica oleracea*, *Ocimum basilicum* und *Allium porrum* wurden direkt in Erde angezogen. Die Gräser *Hordeum vulgare* und *H. spontaneum*, *Setaria italica*, *Sorghum bicolor* und *Avena sativa* wurden auf Keimpapier gekeimt und in Erde überführt. Mais wurde in Keimpapierrollen bei 28°C im Dunklen gekeimt. Als Anzucherde wurde die Einheitserde ED73 verwendet.

Pflanzen wurden in der Klimakammer "GroBank" (CLF Plant Climatics, DE) bei folgenden Bedingungen angezogen:

„Kurztag“: 12h Tag 350  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , 22°C / 12h Nacht 18°C; 50-70% RH

„Maize2“: 16h Tag 650  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , 25°C / 8h Nacht 18°C; 50-70%RH

Folgende Pflanzenarten wurden mit dem Programm „Maize2“ angezogen: *Zea mays*, *Hordeum sp.*, *A. sativa*, *A. porrum*, *S. italica*, *S. bicolor*.

*Lotus japonicus* wurde von Prof. Caroline Gutjahr zur Verfügung gestellt.

## **2.2.5 Arabidopsis-Transformation und Selektion.**

Arabidopsis wurde nach der Floral-dip Methode transformiert (Clough und Bent, 1998). Der eingesetzte T-DNA-Vektor pBAR vermittelt PPT-Resistenz. Samen inkubierter Pflanzen wurden auf MS-Agar Medium (4,4061g/l MS Medium, 20 g/l Saccharose, 8 g/l Agar, 0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$  Methotrexat bzw. 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$  Phosphinothricin) ausplattiert, T0 Pflanzen selektiert und die T1-Pflanzen nachfolgend eingesetzt. Die Keimung wurde ab ca. 7 dai bonitiert. Das Verhältnis von vitalen Keimlingen zu der Gesamtzahl gibt entsprechend der Mendelschen Regeln einen Hinweis auf den Genotyp der Elternpflanze. Nachkommenschaften mit weniger als 5% nicht keimenden Samen oder sich nicht entwickelnden Keimlingen wurden als homozygot erachtet. Analysiert wurden jeweils mindestens 100 Samen. Resistente Keimlinge wurden weiter gezogen.

Tabelle 6: Liste der transgenen homozygoten Arabidopsis und Kreuzungsschemas zur Erstellung der mehrfach-transgenen Pflanzen

Linienbezeichnung	Kreuzung	Codonverwendung	Selektion
<b>Elternlinien</b>			
p35S::Bx1		Zm	PPT
pSUR2::Bx1		Zm	PPT
pNOS::Bx1		Zm	PPT
p35S::Bx2		Zm	MTX
p35S::Bx3		Zm	PPT
NahG		-	-
p35S::ZmPOR2		Zm	PPT
pSUR2::Bx8		Zm	MTX
Cluster		At	PPT
<b>Nachkommenschaften</b>			
ClusterBx8	Cluster x pSUR2::Bx8	At	PPT/MTX
Cluster+	ClusterBx8 x p35S::ZmPOR2	At	PPT/MTX
Bx1C+	p35S::Bx1 x Cluster+	At/Zm	PPT/MTX
SurBx1C+	pSUR2::Bx1 x Cluster+	At/Zm	PPT/MTX
NosBx1C+	pNOS::Bx1 x Cluster+	At/Zm	PPT/MTX
Bx1Bx2	pSUR2::Bx1 x p35S::Bx2	Zm	PPT/MTX
Bx1Bx2Bx3	Bx1Bx2 x p35S::Bx3	Zm	PPT/MTX
Bx1Bx2NahG	Bx1Bx2 x NahG	Zm	PPT
Bx1Bx2C+	Bx1Bx2 x C+	At/Zm	PPT/MTX
Bx1Bx2Bx3C+	Bx1Bx2Bx3 x C+	At/Zm	PPT/MTX
Bx1Bx3C+	Bx1C+ x p35S::Bx3	At/Zm	PPT/MTX

## 2.2.6 Applikation von Chemikalien (Fütterungsexperimente)

### 2.2.6.1 Fütterung von Hefe mit Benzoxazinoid-Intermediaten.

Die Fütterung von Hefekulturen erfolgte nach Grün (1997). YPGE Medium wurde mit einer Vorkultur auf eine OD<sub>600</sub> von ca 0,2 inokuliert und auf eine OD<sub>600</sub> von 0,8 angezogen. Die Substrate wurden in EtOH gelöst auf eine Endkonzentration von 1 mM Indol bzw. 0,5mM HION zugegeben und die Kultur wurde über Nacht bei 28°C inkubiert. 1 ml der Kultur wurde abzentrifugiert und der Überstand mit 36µl 3N HCl angesäuert. Der Überstand wurde durch 2x Zentrifugation bei 18000 rcf gereinigt und 3x mit 0,5 Vol EtOAc ausgeschüttelt. Die organischen Phasen wurden vereinigt und in der Vakuumzentrifuge bis zur Trockenheit eingedampft. Das Pellet wurde in 60µl MeOH gelöst. Die Analyse erfolgte über HPLC. Die Extraktion aus den Zellen erfolgte wie in 2.2.8.3 beschrieben.

### 2.2.6.2 Fütterung von Pflanzen.

Für Fütterungsexperimente wurden Blätter von Arabidopsis (Rosette) (23-28 dai) und *N. benthamiana* (38 dai) am Petiolus abgeschnitten, in das Fütterungsmedium (50mM MES in

H<sub>2</sub>O, Substrat) in 25ml Glasbecher gestellt und in der Pflanzenkammer bei „Kurztag“ für 8h inkubiert. Die Pflanzen wurden mit 2mM Indol, 1mM ION, 265µM HION bzw. 230µM HBOA gefüttert. Für die Fütterung mit isotopmarkierten Substraten wurden diese sowohl für Indol als auch für Anthranilsäure in einer Konzentration von 1mM eingesetzt. War das Substrat vorher in Methanol als Stammlösung gelöst, wurde zur Negativkontrolle das entsprechende Volumen Methanol zugegeben. Nach der Inkubation wurde die Inkubationslösung mit Küchenpapier sorgfältig entfernt, die Blätter in Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert.

Für die Fütterung von *P. sativum* wurden junge nicht stark verholzte Zweige von 18 dai Pflanzen mit mehreren Blättern eingesetzt. *H. vulgare* wurden bis 10 dai angezogen und am Hypokotyl abgeschnitten.

## **2.2.7 Bestimmung der Wirkung von ION auf die Vitalität von Hefe und Pflanzen**

### **2.2.7.1 Hefeinkubation:**

Die optische Dichte der Kultur (OD<sub>600</sub>) wurde für Anzucht in Kontrollmedium und Medium mit 1 mM ION alle 60 Minuten gemessen.

### **2.2.7.2 Pflanzeninkubation: Messung des Wurzelwachstums in Gegenwart von ION.**

Arabidopsis bzw. *N. benthamiana* Samen wurden wie oben beschrieben sterilisiert, stratifiziert und unter Kurztag-Bedingungen auf ½ MS-Agar Medium angezogen. Je zehn Samen wurden pro Genotyp eingesetzt und die Samen entlang einer horizontalen Linie im Abstand von 2 cm vom oberen Rand einer quadratischen Petrischale ausgelegt. Die mit Parafilm verschlossenen Platten wurden vertikal inkubiert. Das Medium enthielt Konzentrationen von 1mM bzw. 2mM ION, ION-freies Medium wurde als Kontrolle eingesetzt. Pro Ansatz wurden 4 Wiederholungen ausgewertet, dabei wurde die Anordnung der verschiedenen Genotypen permutiert, um Fehler, die aufgrund von Randeffekten entstehen zu reduzieren. Die Wurzellänge wurde nach 7 Tagen (Arabidopsis) bzw. 11 Tagen (*N. benthamiana*) gemessen. *H. vulgare* wurde auf feuchtem Keimpapier im Dunklen bei RT zum Keimen gebracht. Die gekeimten Samen wurden auf Keimpapier ausgelegt, das mit Wasser oder einer wässrigen Lösung von entsprechenden Konzentrationen von ION durchtränkt war. Das Keimpapier wurde zusammengerollt und die Rollen in ein 2-Liter-Becherglas gestellt, dessen Boden rund 0,5cm hoch mit der entsprechenden Lösung bedeckt war. Das Becherglas wurde mit einem Plastikbeutel abgeschlossen und die Samen 3 Tage bei 22°C in der Pflanzenkammer inkubiert.

## 2.2.8 Extraktion von Metaboliten

### Extraktion von Pflanzenstoffen: Benzoxazonoide und Intermediate.

Für die Analyse der pflanzlichen Inhaltsstoffe wurden zwei Extraktionsmethoden angewendet. Durch die Methanolextraktion konnten mehr Inhaltsstoffe gewonnen werden die entsprechenden Chromatogramme hatten aber hohes Hintergrundrauschen. Mit der „Folchextraktion“ (Folch *et al.*, 1957) werden die lipophilen Teile des Rohextrakts entfernt, dadurch wird der Hintergrund reduziert. Es werden aber auch einige Substanzen verloren was zu Signalen unterhalb der Detektionsgrenze führen kann. Für die Quantifizierung der transgen gebildeten BX und deren Intermediate wurde daher das Rohextrakt der Methanolextraktion benutzt.

#### 2.2.8.1 Methanolextraktion

Gefrorenes Pflanzenmaterial wurde lyophilisiert (0,1mbar) und trocken gemörsert. Zu 50 mg Pulver wurden 500µl MeOH mit 0,004mg/ml des internen Standards 4-Methylumbelliferyl-Glucuronid zugegeben und gevortext. Nach Zentrifugation (1min, 18000 rcf) wurde der Überstand abgenommen. Eine zweite und dritte Extraktion erfolgte mit reinem MeOH, alle Überstände wurden vereinigt und MeOH in der Vakuumzentrifuge 20-60 min verdampft. Das Pellet wurde in 100µl MeOH aufgenommen und nach 5min Zentrifugation bei max. Drehzahl zur Entfernung von Präzipitaten für die Analyse per HPLC/LC-MS verwendet.

#### 2.2.8.2 Folchextraktion

Gefrorenes Pflanzenmaterial (1 g) wurde in Stickstoff gemörsert. 3,8 ml H<sub>2</sub>O wurden zugegeben, mit 50µl 3N HCl auf pH 2 angesäuert, gevortext und 5 min bei 65°C inkubiert. Nach Zentrifugation bei 18000 rcf für 5 Minuten wurde der Überstand 1:1 (v/v) mit der Folchlösung (33% MeOH, 66% Chloroform, 1% v/v 37% HCl) versetzt, gevortext und bis zur Phasentrennung inkubiert. Dieser Schritt wurde mehrmals wiederholt. Nach abschließender Zentrifugation für 1 min bei 18000 rcf wurde die obere Phase abgenommen und direkt für HPLC/LC-MS Analysen verwendet.

#### 2.2.8.3 Ethylacetatextraktion

Zum 1:2 Gemisch aus Assayansatz und Methanol (=1 Vol) wurden 2,5 Vol 100mM Essigsäure gegeben. Die angesäuerten Ansätze wurden drei Mal mit je 2 Vol Ethylacetat ausgeschüttelt, die oberen organischen Phasen wurden vereint und in der Vakuumzentrifuge bis zur Trockenheit verdampft. Das Pellet wurde in 40µl MeOH gelöst und für die Injektion in HPLC eingesetzt.

Die Extraktion aus Hefe erfolgte durch die Ethylacetatextraktion. 300µl des Kulturüberstands wurde wie oben beschrieben mit Ethylacetat ausgeschüttelt. Um die Inhaltsstoffe der Hefezellen zu analysieren wurden pelletierte Hefezellen aus 1 ml Kulturaliquot mit 200µl H<sub>2</sub>O

gewaschen und in 200µl H<sub>2</sub>O wieder aufgenommen. Glasperlen von ungefähr gleichem Volumen wurden zugegeben und die Zellen in der Kugelmühle FastPrep24 3x 20 Sekunden bei 6 m/s mit zwischenzeitiger Kühlung aufgeschlossen. Nach dem Abzentrifugieren der Zellreste und Glasperlen wurde der Überstand wie oben beschrieben mit Ethylacetat extrahiert.

## **2.2.9 Analysemethoden.**

### **2.2.9.1 HPLC-Analyse.**

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie erfolgte mit dem System „UltiMate 3000“ (Dionex, Thermo Scientific, USA) und dem UV-Detektor PDA100 (Dionex, Thermo Scientific, USA) nach dem Reverse Phase Prinzip. Als Säule kam das Modell Multohigh 100 RP-18 5µM (Göhler HPLC-Analysetechnik, Chemnitz, DE) bei 40°C zum Einsatz. Die Flussrate war 1ml/min. Die Verwendete Programme sind in Tabelle 7 aufgelistet. Die Analyse erfolgte mittels der Software Chromeleon (Dionex, Thermo Scientific, USA).

Tabelle 7: Programme der HPLC Analyse

Programmname	Retentionszeit [min]	% B	% C	Detektion (Wellenlänge)	Lösemittel
MeOH indolinone opt 8	-4	12	0		
	3	12	0		
	12	50	0	249	
	17	50	0	280	A: 0,3% Ameisensäure
	18	100	0	<b>254</b>	B: MeOH
	19	100	0	243	
	20	12	0		
	21	12	0		
MeOH indolinone opt 15	-4	10	0		
	4	10	0		
	5	12	0		
	14	50	0	249	
	19	50	0	280	A: 0,3% Ameisensäure
	20	100	0	<b>254</b>	B: MeOH
	22	100	0	243	
	23	10	0		
testwater	-4	0	0		
	18	0	0		
	19	0	100		
	24	0	100	243	A: 10% Essigsäure
	25	100	0	254	B: MeOH
	27	100	0	280	C: H <sub>2</sub> O
	28	0	100	290	
	31	0	100		
32	0	0			
MeOH_Diboa v1	-5	12	0		
	3	12	0		
	12	50	0	249	
	17	50	0	254	A: 0,3% Ameisensäure
	18	100	0	270	B: MeOH
	19	100	0	280	
	20	12	0		
	21	12	0		
ACN_Ghent	-5	5			
	3	5			
	16	30		255	A: 0,3% Ameisensäure
	18	100		265	B: Acetonitril
	19	100		290	
	21	5			
MeOH_cinnamic acid	-4	20		277	
	5	20		232	A: 0,3% Ameisensäure
	20	100		254	B: Acetonitril
	21	100		280	
	22	20		311	



### 2.2.9.2 LC-ESI-MS<sup>n</sup>- und LC-ESI-TOF-MS-Analyse.

Die Proben wurden am Lehrstuhl für Biotechnologie der Naturstoffe von Dr. Thomas Hoffmann analysiert. Dabei kam ein System aus Agilent 1100 (HPLC) und Agilent 6320 (Agilent Tech. Inc., Kanada) mit entsprechender Software zum Einsatz. Als HPLC Säule diente das Modell LUNA 3µm C18(2), 100Å 150x2mm (Phenomenex, Aschaffenburg, DE), die Flussrate war 0,2ml/min. Als Lösemittel A wurde 0,1% Ameisensäure in Wasser, als Lösemittel B 0,1% Ameisensäure in Methanol eingesetzt. Es wurden 5µl Methanolextrakt bzw. 10µl Folchextrakt injiziert. Die Flüssigkeitschromatographie wurde mit folgendem Programm ausgeführt: 0-30 min 50%B, 30-35 min Gradient 50-100%B, 35-50 min 100% B, 50-55 min Gradient 100%-0% B, 55-65 min 0%B. Für die Massenspektrometrie lag die Kapillarspannung bei -3000V, die Spannung der Endplatte bei -500V. Der Kapillarausgang war auf 121 V eingestellt, die Spannungsamplitude der Oktopol RF lag bei 171 Vpp. Das Trocknungsgas (N<sub>2</sub>) hatte eine Temperatur von 300°C und eine Flussrate von 9 l/min. Das Vernebelungsgas hatte einen Druck von 2 bar. Als Stoßgas wurde Helium eingesetzt. Für die Analyse der MS2 Massen wurden Ionen mit folgenden Massen (m/z) als Vorläufer ausgewählt: 132, 133, 148, 150, 164, 188, 205, 312, 334, 344, 366, 493, 623, 709.

### 2.2.10 Auswertung der Analysen

Die Quantifizierung von GDIBOA in Arabidopsisextrakten wurde am Lehrstuhl für Lebensmittelchemie und molekulare Sensorik (TUM) *via* LC-ESI-TOF-MS von Dr. Timo Stark durchgeführt.

#### 2.2.10.1 Auswertung der HPLC und LC-MS Analysen.

Inhaltsstoffe wurden in der HPLC-Analyse anhand der Retentionszeit und UV-Absorptionsspektrum identifiziert. In LC-ESI-MS<sup>n</sup> -und LC-ESI-TOF-MS-Analysen wurde zusätzlich das Masse zu Ladung Verhältnis (m/z) des jeweiligen Ions und das MS2 Fragmentierungsmuster zur Identifikation benutzt. Zur Quantifizierung wurden die Werte der Peakflächen der identifizierten Verbindungen verwendet. Eine Eichgerade wurde aus einer Verdünnungsreihe des jeweils bekannten Standards erstellt und zur Bestimmung der

Tabelle 8 Kenndaten zur Identifikation per LC-MS Analyse verwendeter Ionen

Voller Name der Verbindung	Verbindung	Retentionszeit [Minuten]	Molekulargewicht [g/Mol]	MS1 [m/z]	MS2 Hauptfragment [m/z]
Indolin-2-on; Oxindol	ION	27,1	133,15	134 [M+H] <sup>+</sup>	106
3-Hydroxy-1,3-Dihydro-Indol-2-on	HION	19,9	149,147	132 [M-OH] <sup>+</sup>	104; 86
2-Hydroxy-1,4-Benzoxazin-3-on	HBOA	23,5	165	148 [M-OH] <sup>+</sup>	120
2,4-Dihydroxy-1,4-Benzoxazin-3-on	DIBOA	24	181	164 [M-OH] <sup>+</sup>	136; 108; 80
2-(β-D-Glucopyranosyloxy)-4-Hydroxy-1,4-Benzoxazin-3-on	GDIBOA	23,6	343	366 [M+Na] <sup>+</sup>	185; 203; 231
Indolin-2-on-5-β-D-Glucopyranosid	5HIONG	12,6	311	312 [M+H] <sup>+</sup> ; 623[2M+H] <sup>+</sup>	150
L-Tryptophan	TRP	16,2	204	205 [M+H] <sup>+</sup> ; 188 [M-O] <sup>+</sup>	118; 146; 170
2-hydroxy-1,4-Benzoxazin-3-on glucosid	GHBOA	23,5		326[M-H] <sup>-</sup>	108; 136; 164

Stoffmenge in den Proben eingesetzt. Bei der Quantifizierung wurde die Verlustrate durch die Extraktion beachtet. Diese wurde aus dem Verhältnis der Peaks der internen Standards 4-Methylumbelliferylglucuronid und Biochanin in den Standardproben und in den Extrakten berechnet. Für die Quantifizierung von GDIBOA in Pflanzenextrakten wurden jeweils drei technische Wiederholungen von drei biologischen Replikaten benutzt.

#### **2.2.10.2 Analyse der Isotopenfütterung.**

Die Intensität des EIC Signals wurde ohne Normierung mit ISTD für die Quantifizierung verwendet. Die Identifizierung der Isotopmarkierten Produkte erfolgte an Hand der Massenverschiebung der Ionen (6 u Anthranilat bzw. 9 u Indol). Hintergrundwerte im Bereich des markierten Produkts in der ungefütterten Probe wurden bestimmt und von den Werten bei Isotopfütterung abgezogen. Die Gesamtintensität für ein Produkt wurde als Summe der Signalintensitäten der markierten und nichtmarkierten Substanz bestimmt. Der Anteil isotopmarkierten Produkts wurde darauf bezogen und als Prozentwert angegeben.

#### **2.2.10.3 Messung der Phytohormonkonzentration der Pflanzen**

Die Messung des Phytohormongehalts in den Pflanzen wurde am Lehrstuhl für Lebensmittelchemie und molekulare Sensorik (TUM) von Richard Hammerl und Michael Gigl via LC-MS durchgeführt. Zur Aufbereitung der Proben wurden Pflanzen im Stickstoff gemörsert. Zu ca. 200mg Rohmaterial in 2ml Schraubverschlussgefäßen, die Zirkoniumkugeln (1,4 - 2,8mm) enthielten wurden 20µl des internen Standards zugegeben, der isotopmarkierte Phytohormone (u.a. Salicylsäure-d<sub>4</sub> 2,5µg/ml in Acetonitril) als Eichstandard enthielt. Das Material wurde danach für 20 min bei RT inkubiert um mögliche Abbaureaktionen zu standardisieren. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von eiskaltem EtOAc gestoppt. Die Proben wurden (ggf. nach einer Lagerung bei -20°) durch 3x30 Sekunden bei 6000 hz in der Kugelmühle Percellys Homogenizer (Bertin Technologies, FR) homogenisiert. Die Zellreste wurden abzentrifugiert, der Überstand durch ein Filter mit der Maschenweite 0,45 µm gefiltert und bis zur völligen Trockenheit eingedampft. Das Pellet wurde in 70µl Acetonitril aufgenommen. Die Analyse per UHPLC-MS/MS wurde wie in Caudhary et al.(2019) beschrieben durchgeführt. Es wurden 2µl injiziert.

#### **2.2.11 Biochemische Analysen**

##### **2.2.11.1 Bestimmung der Gesamtproteinmenge.**

Die Proteinmenge in Mikrosomenfraktionen wurde nach Bradford (1976) bestimmt. Dabei kam das „Bio-Rad Protein Assay“ zum Einsatz (Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, DE).

### **2.2.11.2 Mikrosomenisolation aus Hefe.**

Die Anzucht und Isolation von Hefemikrosomen via Ultrazentrifugation wurde nach Grün (1997) durchgeführt. 250ml YPGE Medium wurden mit einer Vorkultur auf eine OD<sub>600</sub> von 0,2 angeimpft. Die Kultur wurde bis zu einer OD<sub>600</sub> von ca. 1 angezogen. Die Genexpression wurde durch Zugabe von 27 ml 20% w/v Galactose induziert und die Kultur über Nacht weiter inkubiert. Die Hefezellen wurden pelletiert (4°C mit 6000 g). Die Zellpellets wurden in insgesamt 30 ml kaltem TEK Puffer gewaschen und die Pellets in 2,5ml kaltem TES-B Puffer resuspendiert. Zum Zellaufschluss wurden 15 g Glasperlen und 3x20 Sekunden in der Kugelmühle FastPrep24 (MP Biochemicals, USA) mit 4 m/s geschüttelt. Der Überstand wurde abgenommen und die Glasperlen vier Mal mit 5ml kaltem TES-B gewaschen. Die vereinigten Überstände wurde 10 Minuten bei 4°C und 14000 upm im JA 20 Rotor (Beckmann Coulter Inc., Brea, USA) zentrifugiert, der Überstand wurde nochmal 10 Minuten bei 4°C und 14000 upm Zentrifugiert. Die Mikrosomen wurden aus dem so gewonnenen Lysat durch Ultrazentrifugation oder PEG-Vernetzung gewonnen.

Die Ultrazentrifugation erfolgte 50 Minuten bei 4°C und 50000 upm im Rotor 70 Ti (Beckmann Coulter Inc., Brea, USA). Die Pellets wurden in insgesamt 1,5ml TEG Puffer aufgenommen und durch Pottern auf Eis homogenisiert. Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -70°C gelagert.

Für die PEG-Vernetzung wurde das Volumen des Lysats auf 25ml mit kaltem TES-B aufgefüllt. Eine Salzkonzentration von 150mM wurde durch Zugabe von 940µl 4M NaCl eingestellt. 2,5g PEG4000 wurden hinzugegeben und durch Rühren gelöst. Nach 15 Minuten Inkubation auf Eis folgte eine Zentrifugation bei 10500 upm im JA 20 Rotor für 10 Minuten bei 4°C. Das Pellet wurde mit TES-B gewaschen, in 2,5ml TEG Puffer aufgenommen und durch Pottern auf Eis homogenisiert. Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -70°C gelagert.

### **2.2.11.3 Mikrosomenpräparation aus Pflanzen.**

28dai Arabidopsis Pflanzen und etiolierte Maiskeimlinge (4 dai) wurden verwendet. Bei der Extraktion war das Material stets auf Eis oder auf 4°C gekühlt. Ca. 15 g Rosettenblätter bzw. Maiskeimlinge wurden in 200ml Extraktionspuffer (EB) mit 0,3 g Polyklar pro Gramm Pflanzenmaterial und Seesand bei 4°C gemörsert. Das Rohextrakt wurde durch mehrere Schichten Mull gefiltert und 10 min bei 15000 rcf und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde nochmals 10 min bei 14000 rcf und 4°C zentrifugiert. Es folgte die Zentrifugation des Überstands mit 40000 upm bei 4°C für 41 min im Rotor 70 Ti zur Pelletierung der Mikrosomen (Beckmann Coulter Inc., Brea, USA). Die Pellets wurden mit Suspensionspuffer gewaschen, in insgesamt 1 ml Suspensionspuffer aufgenommen und durch Pottern homogenisiert. Aliquots wurden nach Einfrieren im Stickstoff bei -70°C gelagert.

#### **2.2.11.4 Cytochrom C Reduktaseassay.**

Die Qualität der Mikrosomen wurde mit dem Reduktaseassay (Urban *et al.*, 1990; Urban *et al.*, 1994; Grün, 1997) bestimmt. Für 20µg Protein der Mikrosomenfraktion wurde die Absorption bei 550nm in 1ml Assaypuffer (1mM Cytochrom C, 37mM NADPH, 100mM KCN, 50mM KPi pH7,5) bestimmt. Die Reaktion wurde durch Zugabe des Proteins gestartet. Die Absorptionswerte wurden nach 10, 30, 60 und 120 Sekunden gegen Wasser bestimmt. Als Negativkontrolle wurde je eine Probe ohne NADPH im Puffer verwendet. Die Reduktaseaktivität wurde als Umsatz von Cytochrom C in nmol Cytochrom C pro Minute und mg Gesamtprotein ( $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ) nach der Formel  $((A_2 - A_0)/2)/0,021 * 50$  berechnet, wobei A2 und A0 für die Absorptionswerte bei den Zeitpunkten 2 min resp. 0 min stehen. Eine Steigung der Absorption von 0,021 entspricht einem nmol reduzierten Cytochrom C, der Koeffizient 50 rechnet die eingesetzte Menge von 20µg auf 1 mg um. Die Werte der Negativkontrolle wurden von der Positivprobe abgezogen.

#### **2.2.11.5 Zimtsäurehydroxylase-Assay.**

Zur Qualitätskontrolle von Pflanzenmikrosomen wurde ein Zimtsäurehydroxylaseassay durchgeführt. 25µg mikrosomales Protein wurde in insgesamt 200µl Reaktionsvolumen im Assaypuffer (50µM KPi pH7,5, 5mM Zimtsäure, 1mM NADPH) 30 Minuten bei 30°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit der Zugabe von 10µl 100% Essigsäure gestoppt, die Probe wurde gevortext und 5 min bei 18000g zentrifugiert. Der Überstand wurde zwei Mal mit 1Vol EtOAc extrahiert. Das EtOAc wurde in der Vakuumzentrifuge komplett verdampft und das Pellet in 100µl MeOH gelöst. Nach einem Zentrifugationsschritt zur Reinigung wurden zur HPLC Analyse mit dem HPLC Programm „MeOH\_cinnamic acid“ 15µl injiziert. Eichkurven wurden mit Zimtsäure und Cumarsäure erstellt. Ansätze ohne NADPH dienen als Negativkontrolle.

#### **2.2.11.6 UGT Assay.**

Die Glucosyltransferaseaktivität wurde nach Bailey und Larson (1989) gemessen. 5µg Protein (Mikrosomenfraktion) wurde in mit 0,75mM DIBOA und 1mM UDPG in einem finalen Volumen von 200µl im Assaypuffer (20mM HEPES pH8,2, 0,01% 2-Mercaptoethanol, 0,5mM EDTA) 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 800µl Folchlösung gestoppt, gevortext und auf Eis abgekühlt. Durch wiederholtes Schütteln wurde GDIBOA extrahiert. Nach 5 min Zentrifugation bei 18000g wurden 20µl der oberen Phase in die HPLC injiziert. Das Programm „MeOH indolinone opt8“ und MeOH\_Diboa v1 wurde zur Analyse verwendet.

### 2.2.11.7 P450 Assays.

Die *in vitro* Aktivität der P450 Enzyme wurde mit isolierten Mikrosomen von Pflanzen und Hefen in gleicher Weise durchgeführt. Es wurde 1 mg Gesamtprotein eingesetzt. Sollten mehrere Proben (z.B. Genotypen) miteinander verglichen werden, wurden die eingesetzten Proteinmengen an Hand der zuvor gemessenen Reduktaseaktivität normiert. Die Probe mit der geringsten Reduktaseaktivität wurde in einer Menge von 1 mg eingesetzt. Die Reaktion wurde in einem finalen Volumen von 200µl in 100mM KPi pH7,5 und 1mM NADPH angesetzt. Substratkonzentrationen und Inkubationszeiten sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 9: Eingesetzte Konzentrationen von Substraten und Inkubationszeiten bei den Mikrosomenassays

Substrat	finale Konz.	Inkub. Zeit	Stock Konz.
Indol	2 mM	20 min	100 mM
ION	1 mM	30 min	50 mM
HION	265 µM	30 min	13,25 mM
HBOA	200 µM	30 min	10 mM

Die entsprechenden Substratmengen wurden je in 4µl MeOH gelöst und zur Reaktion zugegeben. Die Reaktion wurde mit der Zugabe von Mikrosomen gestartet. Die Inkubation erfolgte bei RT und 200 upm im Schüttler und wurde durch Zugabe von 1 Vol MeOH gestoppt. Nach 5 min Zentrifugation bei 18000 rcf wurde der Überstand direkt für die Analyse per HPLC eingesetzt. Für qualitative HPLC Analysen wurde der Ansatz alternativ mit EtOAc extrahiert. Zur Bestimmung des  $K_m$ -Wertes der BX Enzyme wurde der P450 Assay bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen durchgeführt. Die Substratmengen (Tabelle 10) wurden jeweils im Volumen von 4µl gelöst in Methanol zugegeben. Zur Berechnung des  $K_m$ -Werts aus den Peakflächen der jeweiligen Produkte und den Substratkonzentrationen wurde die entsprechende Funktion der Software Prism 7 (GraphPad, San Diego, USA) eingesetzt.

Tabelle 10: Substratkonzentrationen für die Bestimmung der Substrataffinität der BX Enzyme

Substrat	Finale Konzentration [µM]									
Indol	12,5	25	50	75	125	250	500	1000	2500	5000
ION	12,5	25	50	75	125	250	500	1000	2500	5000
HION	5	15	50	150	250	350	500	750	1000	1500
HBOA	10	25	50	75	100	150	200	300	400	500

## 2.2.12 Phytopathologische Analyse

### 2.2.12.1 SAR Assay mit *Pseudomonas syringae*.

Der Pathogenitätsassay Assay wurde am Institut für biochemische Pflanzenpathologie (Helmholtz Zentrum München) von Marion Wenig und Dr. Corina Vlot nach Wenig et al.

(2019) durchgeführt. Dazu wurden die ersten beiden echten Blätter von 4,5 Wochen alten *Col-0* Pflanzen mit einer Lösung von 10mM MgCl<sub>2</sub> und 1mM ION (nur MgCl<sub>2</sub> in der Negativkontrolle) infiltriert. Nach drei Tagen wurden die beiden nachfolgenden Blätter mit dem Stamm *P. syringae* DC3000 pathovar tomato in einer Dichte von 10<sup>5</sup> cfu/ml in 10mM MgCl<sub>2</sub> infiltriert. Weitere vier Tage später erfolgte die Quantifizierung der Infektion. Der Bakterientiter aus einer normierten Blattfläche des zweiten Blätterpaars (drei 5mm Scheiben in 10mM MgCl<sub>2</sub> und 0,01% Silwet77) wurde auf NYGA Platten aufgetropft. Tropfen von 20µl einer fünffachen Verdünnungsreihe in 1:10 Schritten wurden aufgebracht und je die cfu/cm<sup>2</sup> bestimmt.

#### **2.2.12.2 Mehltau (*Erysiphe cruciferarum*) Pathogenitätsassay.**

Arabidopsis wurde unter „Kurztag“-Bedingung angezogen. *E. cruciferarum* wurde am Lehrstuhl für Pflanzenpathologie (TUM) wie in Ried et al. (2019) beschrieben zur Verstärkung der Virulenz auf wildtypischen Arabidopsis angezogen. Danach wurde der Mehltau auf *pad4* Mutanten transferiert und weiter angezogen bis die Pflanzen gut sichtbar mit dem Pilz bewachsen waren. Die Infektion fand in randomisierten Blocks von je vier Pflanzen pro Genotyp mit mindestens drei Inokulationen pro Experiment statt. Dazu wurden die Pflanzen unter ein Netz gestellt und die Sporen einer infizierten Arabidopsis-Pflanze durch Streifen über das Netz verteilt. Zur Messung der Sporendichte bei Infektion wurde eine Zählkammer auf Höhe der Blätter platziert. Die Sporendichte lag zwischen 1,5 und 7 pro mm<sup>2</sup>. Für die optische Auswertung wurden sieben Tage nach Infektion zehn Blätter pro Pflanze beginnend mit dem äußeren Rosettenkreis geerntet und in einer Lösung von 15% Essigsäure in Ethanol zwei bis drei Tage entfärbt. Nach vorsichtigem Abspülen der Entfärbelösung in Wasser wurden die Hyphen ca. zehn Sekunden in einer Lösung von 11% „Pelikan 4001 Königsblau“ Tinte in 22% Essigsäure gefärbt. Nach Abspülen der überschüssigen Färbelösung in Wasser wurde das Ergebnis photographisch dokumentiert.

Die molekulare Quantifizierung des Mehltaubefalls erfolgte durch qPCR. Je sechs Blätter pro Pflanze wurden geerntet und in Stickstoff gemörser. Die gDNA aller Proben wurden zur Erstellung einer Eichkurve verwendet. Eine sechstufige Verdünnungsreihe von je 1:5 Verdünnungen im Wasser wurde erstellt und in dem Standardcurve-Programm (Lightcycler StepOnePlus, StepOne Software v2.2.2, Applied Biosystems, Thermo Scientific, USA) verwendet. Als Markergen für Pflanzengewebe wurde das Gen der Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/oxygenase-Untereinheit RBCS1A, als Markergen für Mehltau β-Tubulin von *Erysiphe cruciferarum* ausgewählt. Die Quantifizierung des Befalls wurde nach Pfaffl (2001) berechnet. Die Primereffizienz mit der Verdünnungsreihe wurde bestimmt, indem zuerst die Ct-Werte der Reihe gegen den dekadischen Logarithmus der jeweiligen

DNA Menge (1 = unverdünnt) aufgetragen und die Steigung  $a$  der Regressionsgerade berechnet wurde. Die Primereffizienz  $e$  konnte mit der Formel

$$e = 10^{\left(\frac{-1}{a}\right)}$$

berechnet werden. Mittlere Ct-Werte der biologischen Replikate aus jeder Inokulation wurden berechnet ( $Ct^{\text{Genotyp}}$ ). Ein Kalibrierwert wurde durch das Mitteln der  $Ct^{\text{Genotyp}}$ -Werte von Rubisco des Referenzgenotyps (hier *Col-0* 30dai) erstellt. Die  $\Delta Ct$  Werte der Proben wurden durch die Differenz zu dem Kalibrierwert erstellt. Die Expressionsrate von  $\beta$ -Tubulin im Vergleich zu Rubisco wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{e(\beta\text{-Tubulin})^{\Delta Ct(\beta\text{-Tubulin})}}{e(\text{Rubisco})^{\Delta Ct(\text{Rubisco})}}$$

Schließlich wurden die Werte der jeweiligen Replikate gemittelt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Expression von BX-Enzymen in Hefe

#### 3.1.1 Klonierung der Mais P450-Oxidoreduktase und Expression in *S. cerevisiae*

Zentral für die Biosynthese der BX ist die Einführung von Sauerstoff-Funktionen durch die vier P450-Enzyme BX2-BX5. Obwohl für jedes der Enzyme die Funktion durch heterologe Expression in Hefe nachgewiesen ist (Frey *et al.*, 1997; Grün *et al.*, 2005), konnte die Gesamtreaktion in transgener Arabidopsis nicht reproduziert werden (Lenk, 2015). Im Hefesystem wird zur Analyse pflanzlicher P450s routinemäßig die Arabidopsis POR ATR1 eingesetzt. Die Interaktion mit dieser POR könnte zwar unter den Bedingungen in der Hefe ausreichend sein, nicht aber in der Konkurrenz mit einer Vielzahl endogener Enzyme wie sie in Arabidopsis vorliegen. Unterschiede in der Primär- und Tertiärstruktur zwischen ATR1 und der Maisreduktase könnten für die Funktion als Nukleationszentrum eines Multienzym-Komplexes (Metabolon) eine entscheidende Rolle spielen. Daher sollte eine Mais-POR für die Versuche eingesetzt werden, die im Expressionsprofil mit den BX-P450-Genen übereinstimmt, also hoch im Keimling exprimiert ist, dem Entwicklungsstadium der höchsten BX-Biosynthese. Durch eine Peptid-BLAST-Suche mit ATR1 als Suchsequenz im Maisgenom (B73 RefGen\_v3) wurden vier Genmodelle identifiziert, die putativ PORs repräsentieren. Die Expressionsmuster im eFP Browser (Winter *et al.*, 2007) zeigten für zwei Genmodelle hohe Expressionsrate in Keimlingen. Diese Gene, *Zm\_Por1* (Zm00001d026483) und *Zm\_Por2* (Zm00001d002024), wurden für die Klonierung ausgewählt. Die Identitäten zu ATR1 und ATR2 auf Proteinebene betragen 66% bzw. 70%. Die Maisgene weisen untereinander höhere Identität auf als ATR1 zu ATR2. Beide Maisgene bilden in der phylogenetischen Analyse einen von den Arabidopsis-Enzymen getrennten Ast (Abbildung 3). *ZmPor1* und *ZmPor2* wurden nach RT-PCR im Vektor pBluescript II-KS+ kloniert. Die Identität der Gene wurde durch Sequenzierung verifiziert und es folgte die Umklonierung in die Tandem-Expressionsvektoren pGPTV-35SBarB und pGREG503 (2.1.6) für die Transformation in Arabidopsis bzw. Hefe (2.2.3,2.2.5). Tabelle 3 enthält eine Liste mit den erstellten transgenen Hefelinien.



**A**

ATR1	tsialvagf-vvllwkktadrsgeikplmipkslmakdeddddldgsgktrvsiffgtg	59
ATR2	tsiavligcivmlvvrsgagnskrv---epklp-lvikpreeeiddgrkkvtiffgtg	55
Zm_POR2	TAAALVAGLLIIAVWFRSGGCTPSEK--VATPVRPPVVKVDADADVDDGRKRVTIFFCTQ	58
ZM_POR1	taaalvagllilavwfrsgggapskp--vatplrpppvkvdadadvddgkrvtiffgtg	58
	*: : : * : : : * : : .	
ATR1	tgtaefgakalseekaryekaav---kddyaaddqyeeklkketlaffcvatygdge	115
ATR2	tgtaefgakalgeekaryektrfkivdlddyaadddeyeeklkkedvafflatygdge	115
Zm_POR2	TGTAEGFAKSMAEEARARYEKAVFKVVDLDVYQAEDEEYEEKLKKETVVLFFLATYGDGE	118
ZM_POR1	tgtaefgaksmadearvryekavfkvvdlddyaqedeeyeeklkketvalfflatygdge	118
	*****: : : : * : : * : : .	
ATR1	ptdnaarfkwfteenerdtklqqaygvfalgnrkyehfknigivldeelckgkgrli	175
ATR2	ptdnaarfkwftegnrdrgewlknkygvfnglgrkyehfnkvakvddilveggaqlrv	175
Zm_POR2	PTDNAARFYKWFTEGKEKEVWLKDLKYGIFGLGNRQYEHFNKVAKVVDELVEEQGGKRLV	178
ZM_POR1	ptdnaarfkwftegkekevwkdklkygifglgnrkyehfnkvakvvdelleegqgkrlv	178
	*****: : : * : : * : : * : : .	
ATR1	evglgdddqsioddfnawkeslwseldkllkdeddk-svatpytavaipeyrvvthdprft	234
ATR2	qvglgdddqcioddftawrealwpeldtilreegdt-avatpytaavleyrvsihdseda	234
Zm_POR2	PVGLGDDDQCIEDDFTAWKELVWPELDQLLREDDDTTGASTPYTAAIFYRVVFIKSDL	238
ZM_POR1	pvglgdddqcioddftawkelvvpeldqllrdeddtngastpytaapeyrvvfidksdl	238
	*****: : : * : : * : : * : : * : : .	
ATR1	tqksmesnvangnttidihhpocrvdvavqkelhthesdrscihlefdisrtgityetgdh	294
ATR2	kfindinmangngytvfdaghykanvavkrelhtpesdrscihlefdiagsltyetgdh	294
Zm_POR2	SFDQRSWTLANGTCVIDIQHPCRSNVAVRKELHPASDRSCIHLEFDISGTCVLYTGDH	298
ZM_POR1	sfqdrswslangtgvidihhpocranvavrkelhkpasdrscihlefdisgtslvyetgdh	298
	. . . . . * : : * : : * : : * : : .	
ATR1	vgvyaenhveiveeagklghslldvlsihadkedgsples--avpppfpgpotlgtgla	352
ATR2	vgvldcnlsetvdearllidmspdyfslhaekedgtpiss--slpppf-ppcnlrlalt	351
Zm_POR2	VGVYAENSVPVEEVERLLEDLSPDTFFSIHADAEDGSPRKGGSLLAPPFPSPCTLRALL	358
ZM_POR1	vgvyaensvetveeaealldispdyfslhadaedgspkkgsslappfpspctlrall	358
	*** : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : .	
ATR1	ryadllnpprksalvalaayatepseaeeklhltspdgkdeysqviwasqrsllvmaaf	412
ATR2	ryacllsppkksalvalaahasdpteaeerklhaspagkdeyskvvvesqrsllvmaaf	411
Zm_POR2	RYADLLNPPKAALLALASHASDPAEAEERLFLASPSGKDEYSQWITASQRSLLVMAAF	418
ZM_POR1	ryadllnppkkaallalashasdpaeaeerlrlflaspagkdeysqvitwasqrsllvmaaf	418
	*** * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : .	
ATR1	psakpplgvffaaiaprlqpryysissprlapsrvhvtsalvygptptgrihgqvcstw	472
ATR2	psakpplgvffaivaprlqprfysisspkaetrihvtecalvyekmptgrihgqvcstw	471
Zm_POR2	PSAKPPLGVFFAAIAPRLQPRYYSISSPKMAPSRHVTCALVYGPSTPTRIHGQVCSTW	478
ZM_POR1	psakpplgvffaaiaprlqpryysisspkmapsrihvtecalvygspptgrihgqvcstw	478
	*****: : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : .	
ATR1	mknavpaekehcsqapifirasnfklpsnpstpvimvvgptglapfrglqermalked	532
ATR2	mknavpyeksencssapifvrgsnfklpsdkvpiimigpvtglapfrglqerlakes	531
Zm_POR2	MKNATIPLEYSBESWAPIFVRSNPKLPADPSTPIIMIGPVTGLAPFRGFLQERLAKQS	538
ZM_POR1	mknatipleysseeswapifvrgsnfklpadpstpiimigpvtglapfrglqerlalkqs	538
	***: * : * : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : .	
ATR1	geelgssllffgcrnrqmdfiyedelnfdggviselimafsregaqkeyvqhkmmeke	592
ATR2	gvelgpsvlffgcrnrmdfiyeelqrfvesgalaelvafsvregptkeyvqhkmmdka	591
Zm_POR2	Gaelgtsilffgcrnrnmdiviyedelqtfleegalselivafsvregptkeyvqhkmveka	598
ZM_POR1	gaelgtsilffgcrnrnmdiviyedelqtfleegalselivafsvregptkeyvqhkmveka	598
	* * * * : : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : .	
ATR1	aqvwdlikeeglyvegqdkmardvhrthltivqegvssseaeaiivklqtegrylr	652
ATR2	sdwnnisggalyvegqdkmardvhrslhtiaeqggsmdstkaegfknlqtsgrylr	651
Zm_POR2	TDIWNIIISGGYLYVCGDAKGMARDVHRMLHTIVQEGGLDNRKTESYVKSLOMEGRYLR	658
ZM_POR1	teiwniishggylyvegqdkmardvhrmlhtvqegglsskstesyvkslqmegrylr	658
	: : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : .	
ATR1	dvw	655
ATR2	dvw	654
Zm_POR2	DVW	661
ZM_POR1	dvw	661
	***	



Abbildung 3: Clustal-Omega-Analyse der PORs ATR1 und ATR2 und der Mais PORs. A Alignment der Proteinsequenzen, B Cladogramm, die reale Zweiglänge ist angegeben. Die putativen Ankersequenzen wurden nicht in die Analyse einbezogen.

### 3.1.2 Die katalytischen Eigenschaften der P450-Enzyme BX2-BX5 sind unabhängig von der eingesetzten P450-Oxidoreduktase.

Im Standard-Hefestamm WAT11 zur Expression von pflanzlichen P450 Proteinen (Pompon *et al.*, 1996), ist *Atr1* mit Galaktose induzierbarem Promoter in das Genom der Hefe integriert und ersetzt die Reduktase NCP1 der Hefe (Pompon *et al.*, 1996). Die Mais *Por*-Gene wurden im Vektor pGREG503 kloniert und basierend auf diesem autonom replizierenden Vektor in der Hefe exprimiert. Um in der vergleichenden Analyse der transgenen Hefen gleiche Expressionsbedingungen für die Pflanzen-*Pors* zu gewährleisten, wurde *Atr1* ebenfalls in pGREG503 kloniert. Für alle Arbeiten mit Hefen wurde der *S. cerevisiae* Stamm BY4741 (Tabelle 3) verwendet. Dieser Stamm enthält die hefeeigene Reduktase NCP1.

Mikrosomenpräparationen können unterschiedlich in Bezug auf Gesamtproteinkonzentration und Qualität der Mikrosomen sein. Stellvertretend für die Aktivität aller mikrosomalen Proteine wurde die Cytochrom P450 Oxidoreduktase-Reaktion genutzt (Benveniste *et al.*, 1986).

Diese Aktivität war generell gut reproduzierbar in den Präparationen und höher und einheitlicher wenn mikrosomale Proteine durch die PEG-Vernetzungsmethode aufgereinigt wurden (Tabelle 11). Verwendete Präparationen wiesen Aktivitäten auf, die einer Reduktion von rund 100 nmol CytC/min und mg Gesamtprotein entsprachen. Alle BX P450 Enzyme waren in Hefe in Mikrosomenassays, sowohl in Kombination mit ATR1 als auch mit *ZmPOR1* bzw. *ZmPOR2* funktionsfähig (Tabelle 12).

Tabelle 11: Mikrosomenaktivität bei unterschiedlichen Isolierungsmethoden. Die Ausbeute aktiver Mikrosomen wurde durch Bestimmung der Cytochrom C-Reduktaseaktivität bestimmt. A Ultrazentrifugation, B PEG4000-Vernetzung. \*Glawischnig, 1997

A		B	
Bezeichnung	Umsatz in nmol*min <sup>-1</sup> *mg <sup>-1</sup>	Bezeichnung	Umsatz in nmol*min <sup>-1</sup> *mg <sup>-1</sup>
BY4741 ATR1	113,4	BY4741 ATR1	96,5
By4741 ZmPOR1	8	BY4741 ZmPOR2	97,4
BY4741 ZmPOR2	7,6	Wat11	96,4
Wat11	24,6	W(N)*	42
		Wat11(EGI)*	174

Die Leistungsfähigkeit eines Enzyms wird durch drei Größen beschrieben: Die Wechselzahl  $K_{cat}$ , die angibt, wie viele Moleküle Substrat ein Molekül Enzym pro Zeiteinheit umsetzt, die theoretische maximale Geschwindigkeit  $V_{max}$  und die Michaelis-Menten Konstante  $K_m$ , die die Affinität des Enzyms zum Substrat beschreibt. Während für die Messung von  $K_{cat}$  und für die genaue Berechnung von  $V_{max}$  die Konzentration an aktiven Zentren des Enzyms, d.h. die

Anzahl der Enzymmoleküle bekannt sein muss, ist  $K_m$  unabhängig von der Enzymkonzentration. Da die Messung der Enzymkonzentration über den Rahmen dieser Arbeit hinausgehen würde, wurde für die verschiedenen POR-P450 Kombinationen die Substrataffinität  $K_m$  als wichtiger Kennwert bestimmt. In den Hefeexperimenten zeigte sich, dass *ZmPOR1* und *ZmPOR2* sich nicht in ihrer Leistung als P450 Reduktasen unterscheiden: Die  $K_m$ -Werte und die absolute Menge an Reaktionsprodukten der BX-Enzyme waren bei Verwendung beider Koenzyme immer in der gleichen Größenordnung (Tabelle 12). Daher wurde für die darauf folgenden Experimente und die transgene Expression in *Arabidopsis* nur *ZmPor2* eingesetzt. Die homologen Mais-PORs begünstigten nicht die Substratbindung der BX-P450 Enzyme. Tendenziell war die gemessene Substrataffinität bei Verwendung von ATR für alle vier P450 Enzyme höher. Allerdings war aus unbekanntem Gründen die Ausbeute aktiver Mikrosomen (bestimmt über die Cytochrom C-Reduktaseaktivität) in den Präparationen bei *ZmPOR1*-, *ZmPOR2*-Expression 6-15x geringer als bei den Präparationen von ATR1- exprimierenden Hefen.

Tabelle 12: Kenndaten der in Hefe exprimierten BX-P450-Enzyme. Für den Vergleich von  $V_{max}$  bei Einsatz unterschiedlicher POR-Enzyme wurde auf die Mikrosomenaktivität normiert und der Wert relativ zum ATR1-exprimierenden Stamm angegeben. \*Literaturwert Grün, 1997.

Untersuchtes Enzym	Hefelinie	$K_m$ [ $\mu$ M]	$V_{max}$ relativ	$V_{max}$ relativ normiert
BX2	ATR BX2(zm)	8,3 $\pm$ 3,3	1,00	1
	POR1 BX2(zm)	23 $\pm$ 16	0,11	2,3
	POR2 Bx2(zm)	28,5 $\pm$ 12,6	0,11	2,2
	PB85243	3,4 $\pm$ 4,6	-	-
	BX2 in Wat11*	38	-	-
BX3	ATR Bx3(zm)	400 $\pm$ 145	1,00	1
	POR1 Bx3(zm)	1844 $\pm$ 200	1,30	8,3
	POR2 Bx3(zm)	1150 $\pm$ 96	0,79	7,2
	PB85243	2800 $\pm$ 330	-	-
	BX3 in Wat11*	10	-	-
BX4	ATR Bx4(zm)	79 $\pm$ 38	1,00	1
	POR1 Bx4(zm)	188 $\pm$ 61	1,21	13,4
	POR2 Bx4(zm)	142 $\pm$ 61	0,94	11,2
	PB85243	233 $\pm$ 62	-	-
	BX4 in Wat11*	36	-	-
BX5	ATR Bx5(zm)	3,3 $\pm$ 2,2	1,00	1
	POR1 Bx5(zm)	10,5 $\pm$ 3,1	0,59	8,3
	POR2 Bx5(zm)	15,1 $\pm$ 3,9	0,59	9,6
	PB85243	35,6 $\pm$ 12	-	-
	BX5 in Wat11*	4,7	-	-

Aufgrund der geringen Menge aktiver Mikrosomen waren quantitative Auswertungen schwierig, da daher die Produktmengen gering waren. Außerdem hätten bei der Präparation vorhandene inhibierende Substanzen relativ angereichert sein können. Wurde die bestimmte Aktivität der jeweiligen Mikrosomen in die Auswertung einbezogen, errechnete sich für Ansätze mit Mais-PORs theoretisch eine erhöhte  $V_{max}$  (Tabelle 12) allerdings unter der Voraussetzung, dass die Expression aller Transgenen in den Hefen gleich gut war. Es ergab sich kein Hinweis, dass homologe und heterologe pflanzliche PORs die Aktivität von BX2-BX5 unterschiedlich beeinflussen.

### 3.1.3 Transfer der BX-Biosynthese in Hefe: Koexpression der biosynthetischen Gene

Nach der Metabolontheorie (Laursen *et al.*, 2015) können die einzelnen Enzyme eines Multienzymkomplexes sich gegenseitig allosterisch stimulieren und so die Enzymeffizienz steigern. Um zu prüfen, ob diese Aussage auch für die BX Enzyme zutrifft, wurden Paare in der Synthesekette aufeinander folgender BX Enzyme (codonoptimierte Versionen, Tabelle 3) sowohl in ATR1- als auch in *ZmPOR2*-Stämmen koexprimiert. Die Substrataffinität wurde für BX3, BX4 und BX5 in Kombination mit den substratbildenden oder produktumsetzenden Enzymen mit isolierten Mikrosomen bestimmt (Tabelle 13). Für BX3 wurde keine signifikante Veränderung festgestellt. Dagegen ändert sich der  $K_m$ -Wert für das BX4-BX5-Paar. Koexpression erhöhte zweifach die Affinität von BX4 für HION, während der  $K_m$ -Wert von BX5 für HBOA verdoppelt wurde.

Tabelle 13: Bestimmung des  $K_m$ -wertes von BX-P450-Enzymen bei Expression von Enzym-Paaren.

getestetes Enzym	Kombination	$K_m$
BX3	BX3	2700
	BX2/3	1915
	BX3/4	2400
BX4	BX4	220
	BX3/4	160
	BX4/5	120
BX5	BX5	4,7
	BX4/5	8,7

Die Verwendung von Vektoren mit zwei Promotor-MCS-Terminator Regionen erlaubt es bis zu acht Gene in einem Hefestamm mit nur vier Auxotrophien zu exprimieren (Tabelle 5). Mit diesen Vektoren wurden transgene Hefen erstellt, die die *Bx*-Gene *Bx2-Bx5*, *ZmPor2* und die UGT *Bx8* gleichzeitig exprimieren (Stamm PB85243). Die Michaelis-Menten Konstante  $K_m$  für

individuelle Enzyme wurde durch Koexpression aller *Bx*-Gene nur für BX2 positiv verändert (Tabelle 12). Ansonsten ergaben die Mikrosomenassays dieser Linie jeweils keine positive Veränderung der katalytischen Daten eines Enzyms verglichen mit der Expression als alleinigem Transgen. Jedoch wurde bei Einsatz von ION bzw. HION als Substrat in der HPLC-Analyse auch Peaks beobachtet, die HBOA respektive DIBOA zugeordnet werden konnten (Tabelle 14A), d.h. es erfolgten *in vitro* konsekutive Reaktionen von BX3, BX4 und BX5.

Um zusätzlich zu den P450-Genen und der UGT des Biosynthesewegs auch das "Branchpoint"-Enzym BX1 in Hefe zu exprimieren wurde zunächst der Vektor pLHN (Tabelle 5) erstellt, der den URA Selektionsmarker für Hefen und die CDS von *Bx1* und *ZmPOR2* trägt. Für die Expression der restlichen Gene wurden die bereits vorhandenen Konstrukte *pESC-HIS\_BX2Bx5*, *pESC-LEU\_Bx4BX3* und *pXRM15\_Bx8* (Tabelle 3, Tabelle 5,) verwendet. Die erfolgreiche Transformation von Hefe (resultierender Stamm BxY) mit diesen vier Vektoren wurde durch das Wachstum auf Selektionsmedium gezeigt, die Expression der Gene konnte dagegen nicht verifiziert werden. In den beiden *Bx1*-Transformanten BxY und der *Bx1*-Einzelgentransformante (Stamm Bx1, Tabelle 3) konnte keine Biosynthese von Indol nachgewiesen werden, allerdings traten in beiden Hefen spezifische Metabolit-Peaks auf, die in Kontrollhefen nicht erschienen und nicht identifiziert werden konnten (Abbildung 4). Sie könnten auf Metabolisierung von Indol in den *Bx1*-exprimierenden Stämmen zurückzuführen sein.

Tabelle 14: Funktion der BX-Enzyme im heterologen Hefesystem. A Im Mikrosomenassay gebildetes Produkt bei Einsatz der jeweiligen Substrate. B Metabolitanalyse des Überstands nach Fütterung transgener Hefestämme. HPLC-UV Analyse. n.d. erwartetes Produkt nicht detektierbar, u.M: unbekannte Metabolite

A				
Hefelinie	Substrate			
	Indol	ION	HION	HBOA
ATR	-	-	-	-
POR2 BX2(zm)	ION	-	-	-
POR2 BX3(zm)	-	HION	-	-
POR2 BX4(zm)	-	-	HBOA	-
POR2 BX5(zm)	-	-	-	DIBOA
PB85243	n.d.	HBOA	DIBOA	DIBOA

B				
Hefelinie	Substrate			
	Indol	ION	HION	HBOA
ATR	n.d.	HION-Isomer	n.d.	n.d.
POR2 Bx2(at)	n.d.	-	-	-
PB85243	n.d; u.M	HION	HBOA	DIBOA

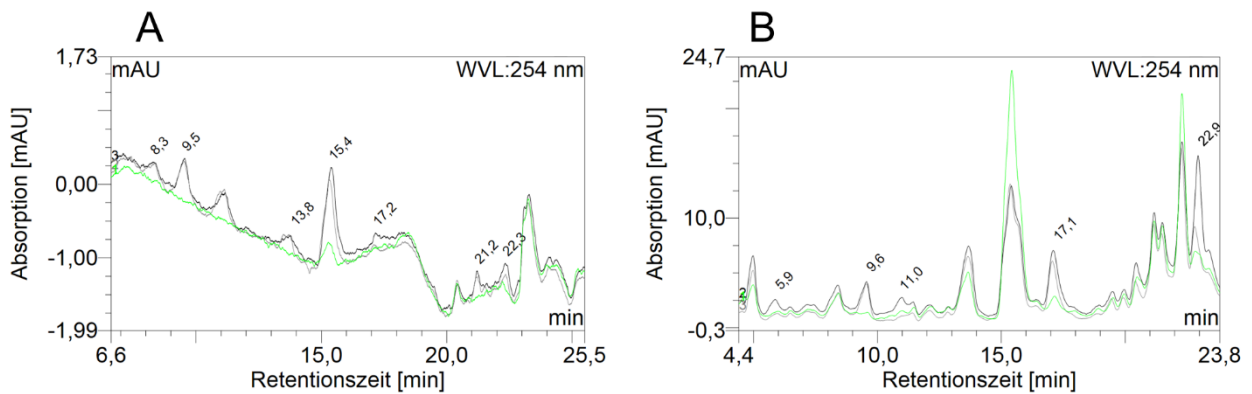


Abbildung 4: Metabolitanalyse transformierter Hefestämme, repräsentative Chromatogramme. Extrakte der aufgeschlossenen Zellen der Stämme ATR, Bx1 und BxY zeigen, dass die beiden *Bx1*-exprimierenden Stämme Metabolite aufweisen, die in dem nur mit *Atr1* transformierten Kontrollstamm nicht vorhanden sind. HPLC-UV Chromatogramme. A: Extrakte aufgeschlossener Zellen, B: Extrakt des Kulturüberstands. Schwarze Linie: Bx1, graue Linie: BxY, grün: ATR. Standards (nicht gezeigt) hatten folgende Retentionszeiten: TRP: 11,59 min, ION: 20,52 min, HION: 13,12 min, HBOA: 16,83min

Enzymkomplexe können während der Mikrosomenisolation instabil werden. Dies könnte für Assoziation der zytoplasmatischen UGT BX8 mit den mikrosomalen P450-Enzymen kritisch sein. Wäre diese Interaktion essentiell, könnte der Nachweis der vollständigen Reaktionssequenz der GDIBOA-Synthese *in vitro* mit isolierten Mikrosomen fälschlicherweise negativ sein. Als Alternative wurde deshalb Fütterung als *In vivo*-Assay eingesetzt. Kritische Parameter sind hier die Aufnahme und Ausscheidung der zugesetzten Substrate und mögliche Metabolisierung. In der Tat ergab sich für die Wachstumskurve des Hefestamms ATR eine Hemmung durch ION, was auf eine Interaktion mit dem Hefemetabolismus hinweist (Abbildung 5).

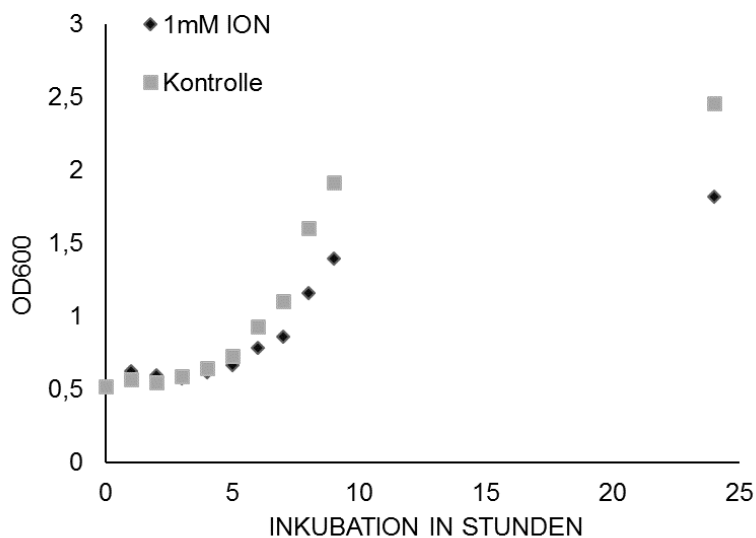


Abbildung 5: Wachstumskurve des Kontrollhefestamms ATR1 im Kontrollmedium (graues Quadrat) und bei Zusatz von 1 mM ION (schwarze Raute). Die Optische Dichte  $OD_{600}$  wurde im Spektrophotometer bestimmt

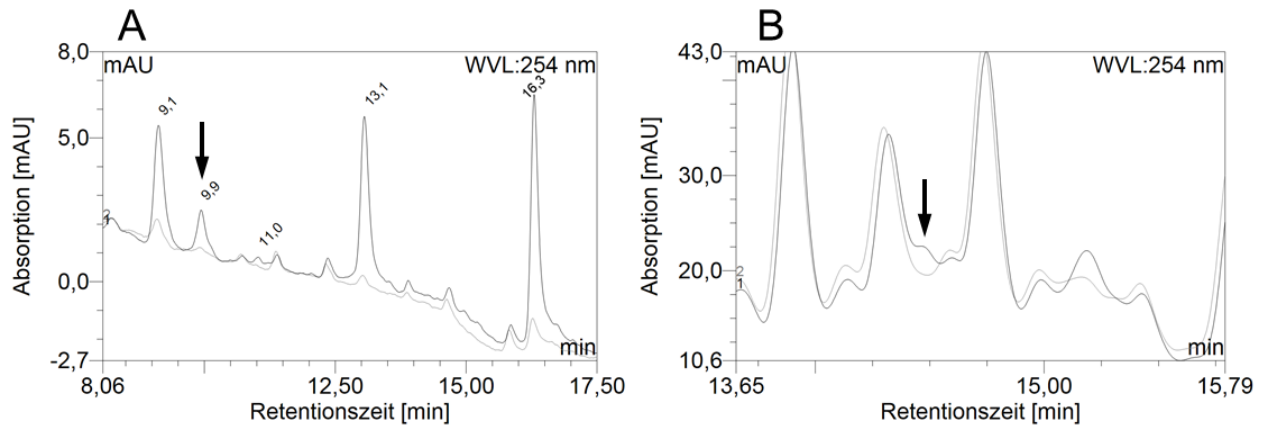


Abbildung 6: Die Fütterung des Stamms PB85243 mit Indol führt zu Produktion von TRP und ION und darüber hinaus mehrerer unbekannter Metabolite, die in der Kontrolle nicht vorhanden sind. HPLC-UV Chromatogramm. A Pelletierte aufgeschlossene Zellen, B Kulturüberstand. Schwarze Linie: induzierte Positiv-Probe gefüttert mit Indol, graue Linie: induzierte Kontrolle ohne Indol Zugabe. Der Pfeil in A zeigt auf TRP, der Pfeil in B zeigt die Position von ION. Die verwendeten Standards (nicht gezeigt) hatten folgende Retentionszeiten: ION: 14,39 min, HION: 11,5 min, Isatin: 12,9min, HBOA: 12,82min, DIBOA: 13,05min, GDIBOA: 12,01 min

In den Fütterungsversuchen wurde der Stamm PB85243 eingesetzt. Mehrere UV-Peaks unbekannter Metabolite wurden bei Fütterung mit Indol in den Zellen beobachtet (Abbildung 6), das erste erwartete BX-Intermediat ION wurde nur in sehr geringen Mengen nahe der Detektionsgrenze gefunden. Dagegen war die Menge freien Tryptophans erhöht (Abbildung 6 Peak bei 9,9 Minuten). Die Fütterung mit ION führte zu keinem klar detektierbaren BX Intermediat. Im Kulturmedium erschien jedoch ein Substanzpeak, der möglicherweise von HION gebildet wird. Als zweite Kontrolle wurde in der Hefefütterung der Stamm POR2BX2(at) eingesetzt. Bei Indolzugabe konnte auch hier kein ION detektiert werden. Beide Ergebnisse könnten auf ION-Katabolismus und Export zurückzuführen sein. Da ION eine schädliche Wirkung hat, könnten Metabolisierung als Entgiftungsreaktion und Ausscheidung induziert werden. Bei HION Zugabe wurde nur HBOA nachgewiesen, zugesetztes HBOA konnte von den transgenen Hefen in DIBOA umgesetzt werden (Tabelle 14B). In Fütterungsexperimenten konnte im Gegensatz zur Mikrosomenanalyse keine Weiterführung von Syntheseschritten festgestellt werden.

Die Ergebnisse haben gezeigt, dass die zwei aus Mais isolierten PORs funktional sind und sich in ihrer Aktivität untereinander nicht unterscheiden. Sie können im Hefesystem die gewöhnlich verwendete ATR1 ersetzen, bieten jedoch im Vergleich zu dieser keinen Vorteil für die Aktivität der BX Enzyme. Die codonveränderten BX P450 Enzyme erwiesen sich ebenfalls als funktionsfähig. Die Mehrfachexpression der BX Enzyme zeigte keine wesentlichen Verbesserungen der Enzymaktivität gegenüber der Einzelexpression.

## 3.2 Expression der BX-Biosynthese in Arabidopsis

Nachdem die Funktion von Teilketten der Biosynthese im Hefestamm PB85243 gezeigt werden konnte (Tabelle 14A), sollte der GDIBOA-Biosyntheseweg durch Transfer aller beteiligter Gene in Arabidopsis modellhaft etabliert werden. Insbesondere sollte die Wechselwirkung mit dem endogenen pflanzlichen Metabolismus untersucht werden.

### 3.2.1 Klonierungs- und Selektionsstrategie für Arabidopsis

Um eine Vergiftung der Pflanzen durch phytotoxisches DIBOA zu vermeiden (von Rad *et al.*, 2001; Dick *et al.*, 2012), musste vor der Vervollständigung des Biosynthesewegs mit *Bx1* zuerst die UGT *Bx8* in die Pflanze eingebracht werden. Daher bestand die Klonierungs- und Transformationsstrategie daraus, die P450 Gene mit *Bx8* und der *ZmPDR2* durch Kreuzung zu vereinigen und *Bx1* am Schluss zu integrieren.

Die Verwendung von starken konstitutiven Promotoren zur heterologen Expression von Genen kann "Silencing"-Reaktionen in der Pflanze hervorrufen (Geu-Flores *et al.*, 2009). Aus diesem Grund wurde der Einsatz des 35S-Promotors für die Expression der BX P450 Gene auf die Einzel-Gen-Konstrukte beschränkt. Für die Expression der vier P450 Gene *Bx2-Bx5*, lokalisiert in einer T-DNA wurde von Linlin Zheng ein synthetisches Konstrukt, genannt „Cluster“ erstellt (Abbildung 7). In Cluster werden Codon-angepasste *Bx* Gene jeweils von Arabidopsis-eigenen Promotor-Terminator Sequenzen flankiert. Für *Bx2* wurde dabei der Promotor von *Cyp83B1* (*pSUR2*) gewählt, für *Bx3* die Promotorsequenz von *Cyp83A1*, für *Bx4* die von *Cyp79B2* und für *Bx5* der Promotor von *Cyp71B7*. Außerdem wurde der Promotor *pSUR2* auch zur Expression von *Bx8* eingesetzt. Da das Maisenzym *Bx5* transgen *in vitro* und *in vivo* in Arabidopsis eine zu niedrige Aktivität gezeigt hatte (Lenk, 2015), wurde für *Bx5* (wie in den Hefeansätzen) die Sequenz des Weizenhomologs *TaBx5* verwendet. Zu Beginn des Projekts lagen bereits transgene Arabidopsis-Linien vor, die als Einzelkonstrukte *Cluster* (Selektion PPT), *pSUR2::Bx8* (Selektion MTX), *p35S::Bx1* (Selektion PPT), *pSUR2::Bx1* (Selektion PPT) und *pNOS::Bx1* (Selektion MTX) enthielten (Tabelle 15). Homozygote Transformanten wurden durch Selektion der Samen auf PPT bzw. MTX haltigem MS Medium identifiziert (2.2.5).

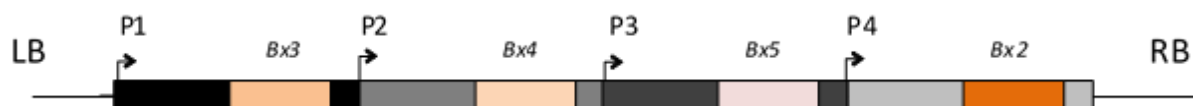


Abbildung 7: Schema der T-DNA des Cluster-Konstrukts. Die *Bx*-Gene wurden unter Erhalt der Arabidopsis-Start und Stopp-Codons mit Promoter- und Terminatorsequenz von Arabidopsis-Genen fusioniert. Die codierende Sequenz wurde jeweils an die Arabidopsis-Präferenz angepasst. Promotor-Terminatorsequenzen sind als schwarze und graue Boxen dargestellt. P1: *Cyp83A1*, P2: *Cyp79B2*, P3: *Cyp71B7*, P4: *Cyp83B1*. LB T-DNA Left Border, RB T-DNA right border.



*ZmPor2* wurde in den Vektor pGBTV-35SBarB kloniert, *via Agrobacterium tumefaciens* (2.2.3.2) durch "Floral dip" in *Arabidopsis* transformiert (2.2.5) und anschließend homozygote Pflanzen selektioniert (PPT-Resistenz). Die für die Transgene *Cluster* und *pSUR2::Bx8* homozygoten Linien wurden miteinander gekreuzt. Homozygote Nachkommen der F2 wurden identifiziert und mit der homozygoten *p35S::ZmPor2*-Linie gekreuzt. Die Selektion der Homozygoten erfolgte jeweils über Resistenz gegen PPT und MTX und durch PCR-Analyse in der F3. Eine Linie, die für *Cluster*, *pSUR2::Bx8* und *p35S::ZmPor2* homozygot ist wurde identifiziert (genannt Cluster+, Tabelle 6, Tabelle 15). Die Vervollständigung des Biosynthesewegs erfolgte durch die Kreuzung von Cluster+ mit Linien, die *Bx1* getrieben von *p35S*, *pSUR2* oder *pNOS* exprimierten (Tabelle 15). Die drei Promotoren wurden aufgrund ihrer unterschiedlichen Expressionsstärke in *Arabidopsis* ausgewählt. Wie *p35S* vermittelt *pSUR2* eine hohe Expression in den meisten Geweben von *Arabidopsis*, im Gegensatz zum standardmäßig eingesetzten konstitutiven 35S-Promotor aber nicht in Antheren und Stigmata der Blüten. Aus früheren, unpublizierten Arbeiten war bekannt, dass die gleichzeitige Überexpression von *Bx1* und *Bx2* mit dem *p35S*-Promotor in *Arabidopsis* zu einem Phänotyp führt, der sich in Zwergwuchs und männlicher und weiblicher Sterilität äußert (Abbildung 8A). Die Expression von *pSUR2::Bx1* und *p35S::Bx2* gleichzeitig erzeugt dagegen Pflanzen, die zwar kleinwüchsig und in ihrer Entwicklung verlangsamt aber dennoch fertil sind (Abbildung 8B). Der Promotor *pNos* stammt vom Nopalinsynthasegen der Agrobakterien und ist ein relativ schwacher Promotor, *pNosBx1 p35S::Bx2* Pflanzen sind morphologisch wildtypisch (nicht dargestellt).

Tabelle 15: Transgene Arabidopsislinien. Transferierte Maisgene sind aufgeführt. Präsenz in homozygoter Form ist durch xx, in heterozygoter Form durch x angegeben

Bezeichnung	Genotyp	Bx1	Bx2	Bx3	Bx4	Bx5	Bx8	ZmPor2
NosBx1	<i>pNos::Bx1</i>	xx						
SurBx1	<i>pSUR2::Bx1</i>	xx						
Bx1	<i>p35S::Bx1</i>	xx						
Bx1Bx2	<i>pSUR2::Bx1 p35S::Bx2</i>	xx	xx					
Bx1Bx2Bx3	<i>pSUR2::Bx1 p35S::Bx2 p35S::Bx3</i>	xx	xx	xx				
Bx1C+	<i>p35S::Bx1 Cluster+</i>	xx	xx	xx	xx	xx	xx	xx
Bx1Bx2C+	<i>pSUR2::Bx1 p35S::Bx2 Cluster+</i>	xx	xx	x	x	x	x	x
Bx1Bx3C+	<i>pSur2::Bx1 p35S::Bx3 Cluster+</i>	xx	x	xx	x	x	x	x
Bx1Bx2Bx3C+	<i>pSUR2::Bx1 p35S::Bx2 p35S::Bx3 Cluster+</i>	xx	xx	xx	x	x	x	x
Cluster+	<i>Bx2 Bx3 Bx4 Bx5 Bx8 ZmPor2</i>		xx	xx	xx	xx	xx	xx
Cluster	<i>Bx2 Bx3 Bx4 Bx5</i>		xx	xx	xx	xx		
Bx1Bx2NahG	<i>pSUR2::Bx1 p35S::Bx2 p35S::NahG</i>	x	x					
Por2	<i>p35S::ZmPor2</i>							xx
Bx8	<i>pSUR2::Bx8</i>						xx	
Bx1Bx2Col-0	<i>pSur2::Bx1 p35S::Bx2</i>	x	x					

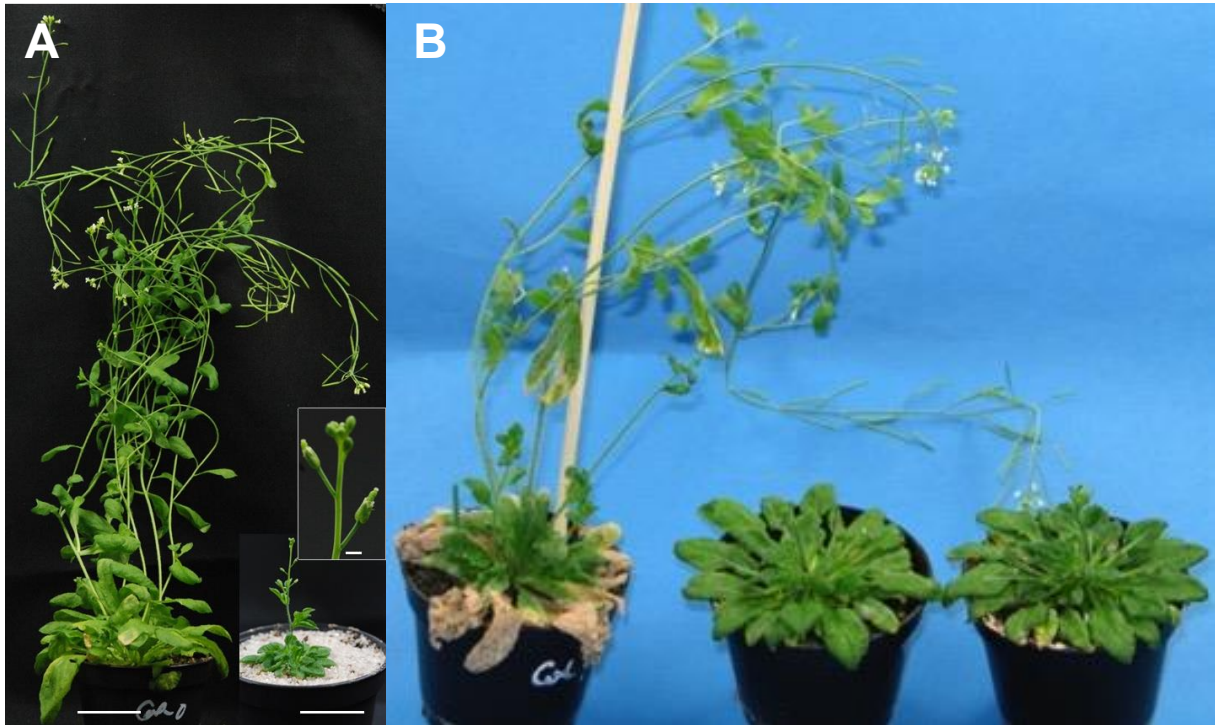


Abbildung 8: Phänotypen *Bx1* und *Bx2* exprimierender Transgener. A *p35SBx1p35SBx2*, links *Col-0* zum Vergleich. Die Transgenen sind zwergwüchsig und männlich und weiblich steril. B *pSUR2Bx1 p35SBx2 (Bx1Bx2)*, links *Col-0* zum Vergleich. Die Transgenen sind zierlich, sind verlangsamt in der Entwicklung und fertil.

### 3.2.2 Transgene *Arabidopsis* produziert GDIBOA

Cluster+ Pflanzen wurden *in vivo* (Fütterung, Tabelle 16B) und *in vitro* (Mikrosomen-Präparation, Tabelle 16A) untersucht. In Mikrosomenassays zeigte sich, dass alle transformierten P450 Enzyme der Linie einzeln aktiv sind. Bei Zugabe von HION wurde DIBOA detektiert, d.h. die Reaktionskette konnte teilweise reproduziert werden. Der Einsatz der Substrate Indol und ION führte zur Synthese des nächsten Produkts ION bzw. HION, dabei wurde bei ION Zugabe auch ein HPLC-UV Peak beobachtet, der HBOA repräsentieren könnte. Die Identifizierung *via* MS wurde nicht vorgenommen. Weitere BX-Intermediate wurden nicht nachgewiesen.

Wurden die Pflanzen gefüttert, ergaben sich wesentliche Unterschiede (Tabelle 16B). Es traten für *Col-0* und die transgene Linie übereinstimmende Änderungen des Metabolitenprofils auf. Applikation von Indol führte zur Steigerung der Menge an freiem TRP.

Bei Fütterung mit ION trat prominent eine Substanz auf, die anschließend (siehe 3.2.3.3) als 5HIONG identifiziert wurde. HBOA wurde wahrscheinlich durch Glycosylierung modifiziert, da diese Metabolisierung auch in *Col-0* erfolgte war sie unabhängig von der UGT BX8.

Abweichend vom Metabolit-Muster im Mikrosomenassay und beschränkt auf *Cluster+* wurde bei Fütterung mit HION und HBOA GDIBOA nachgewiesen, was die Funktionalität von BX8 beweist. Die Analyse zeigte die Funktionalität der transferierten *Bx*-Gene auf, aber auch den

starken Einfluss endogener Enzyme, z.B. von Glycosyltransferasen. DIBOA hingegen wurde in nachweisbarem Umfang nur von der spezifischen UGT BX8 glucosyliert.

Tabelle 16: Metabolisierung von BX-Intermediaten in transgenen Pflanzen. A Produkte im Mikrosomen-Ansatz (HPLC-UV-Analyse), B Produkte in der Fütterung (LC-MS-Analyse). n.d. nicht nachweisbar.

A				
Genotyp	Substrate			
	Indol	ION	HION	HBOA
<i>Cluster+</i>	ION	HION HBOA	HBOA DIBOA	DIBOA
<i>Por2</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

B				
Genotyp	Substrate			
	Indol	ION	HION	HBOA
<i>Cluster+</i>	TRP	5HIONG	HBOA DIBOA GDIBOA	HBOA-Glc HBOA-diGlc GDIBOA
<i>Col-0</i>	TRP	5HIONG	n.d.	HBOA-Glc

Im nächsten Schritt wurden Inhaltsstoffe der Linien die zusätzlich *Bx1* trugen (*pNos::Bx1*, *Cluster+*; *pSUR2::Bx1*, *Cluster+*; *p35S::Bx1*, *Cluster+*) und damit für alle Gene der BX-Biosynthese heterozygot waren, analysiert. Im Methanolextrakt (2.2.8.1) von Rosettenblättern, geerntet 28 dai, konnte GDIBOA *via* LC-MS (2.2.9.2) in den Linien *pSUR2::Bx1Cluster+* und *p35S::Bx1Cluster+* nachgewiesen werden (Tabelle 17). Auch Intermediate des BX-Biosynthesewegs sowie unspezifische Metabolisierungsprodukte wurden detektiert. LC-MS Peaks, die in Retentionszeit und Masse ION, HION, HBOA und 5HION entsprechen, traten in den Chromatogrammen auf. Im Extrakt der Linie *pNOS::Bx1Cluster+* wurden keine Intermediate oder Endprodukte gefunden. Im Mittelpunkt der Analyse stand im Folgenden der Genotyp *p35S::Bx1Cluster+*, bezeichnet als *Bx1C+* (Tabelle 15).

Tabelle 17: Analyse von BX-Intermediaten und Tryptophan in Transgenen nach Transfer aller *Bx*-Gene durch Einkreuzen von *Bx1*-Konstrukten in *Cluster+*-Pflanzen. LC-MS- Analyse, n.d. nicht nachweisbar, 0 keine Änderung, + Steigerung, x Produkt detektierbar.

	$\Delta$ TRP	Indol	ION	HION	HBOA	GDIBOA
<i>pNOS::Bx1</i> , <i>Cluster+</i>	0	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
<i>pSUR2::Bx1</i> , <i>Cluster+</i>	+	n.d	x	x	x	x
<i>p35S::Bx1</i> , <i>Cluster+</i>	+	n.d	x	x	x	x

Die Quantifizierung von GDIBOA im Methanolextrakt von *Bx1C+* durch LC-TOF-MS/MS ergab eine Konzentration von  $3,7 \pm 0,7$  nmol/g TG (Tabelle 18). Diese ist verglichen zu den in Roggen und Mais vorhandenen Mengen  $5 \times 10^4$  geringer. Mais produziert bis zu  $19 \mu\text{mol}$  DIMBOA pro Gramm Frischgewicht (Campos *et al.*, 1989; Schullehner *et al.*, 2008), was ungefähr  $200 \mu\text{mol/g}$  TG entspricht. In Roggenblättern finden sich zwischen  $0,01 \mu\text{mol}$  GDIBOA/g TG (alte Blätter) und  $200 \mu\text{mol}$  GDIBOA /g TG (junge Blätter, Rice *et al.*, 2005; Copaja *et al.*, 2006). Für eine Funktion als Abwehrstoff gegen Pathogene und Insekten wird GDIBOA in Konzentrationen von mindestens  $1 \mu\text{mol/g}$  TG benötigt (Long *et al.*, 1975; Campos *et al.*, 1989). Um transgen Abwehrfähigkeit gegen Bakterien, Pilze oder Insekten durch BX zu erzeugen, müsste die Menge synthetisierten BX gesteigert werden. Dafür musste die Ursache der geringen Effizienz gefunden werden.

Tabelle 18: Metaboliten-Profile von transgener Arabidopsis, Mais *Bx*-Mutanten und jeweiliger Wildtyp-Linien. 5HIONG kann nicht absolut quantifiziert werden die relative Abundanz im Vergleich zu ION wurde aus den jeweiligen Peakflächen (HPLC-UV-Analyse) bestimmt. \* LC-MS-TOF Analyse, \*\* Hintergrundwerte.

Genotyp	TRP [ $\mu\text{mol/g}$ TG]	ION [ $\mu\text{mol/g}$ TG]	GDIBOA [nmol/g TG]	5HIONG/ION Verhältnis
<i>Col-0</i>	$1,34 \pm 0,28$	$0,28 \pm 0,19^{**}$	n.a.	n.a.
<i>Bx1</i>	$1,91 \pm 0,07$	n.a.	n.a.	n.a.
<i>Bx1Bx2</i>	$2,35 \pm 1$	$52,7 \pm 13$	n.a.	$5,8 \pm 0,8$
<i>Bx1Bx2Bx3</i>	$0,57 \pm 0,1$	$0,52 \pm 0,12$	n.a.	$10 \pm 2,3$
<i>Bx1C+</i>	$2,32 \pm 0,22$	$2,1 \pm 0,75$	$3,7 \pm 0,7^*$	$6,2 \pm 2,1$
<i>Bx1Bx2C+</i>	$1,82 \pm 0,26$	$66,5 \pm 9,6$	$11 \pm 2,9^*$	$4,7 \pm 0,07$
<i>Bx1Bx3C+</i>	$0,37 \pm 0,02$	$0,89 \pm 0,35$	$42,7 \pm 8,8^*$	$7,2 \pm 0,75$
<i>Bx1Bx2Bx3C+</i>	$0,31 \pm 0,04$	$4,35 \pm 0,95$	$194 \pm 8,5^*$	$10,5 \pm 2,5$
<i>B73 Wt</i>	$6,6 \pm 1,3$	$0,4^{**}$	n.a.	$5,2 \pm 1,6$
<i>B73 bx1</i>	$10,8 \pm 1,2$	$0,35^{**}$	n.a.	$6 \pm 6,4$
<i>B73 bx3</i>	$11,7 \pm 2,2$	24	n.a.	$0,3 \pm 0,1$

### 3.2.3 Der Metabolismus von Arabidopsis interferiert mit der BX-Biosynthese.

#### 3.2.3.1 Die BX-Biosynthese konkurriert mit dem Primärmetabolismus

Indol als volatile Substanz wird von manchen Pflanzen entwicklungspezifisch in Blüten oder induziert (Frey *et al.*, 2000) als Duftstoffkomponente freigesetzt. Ansonsten ist freies Indol ein seltener Metabolit in Pflanzen. Das für die Tryptophan (TRP)-Biosynthese notwendige Indol wird durch die Alpha-Untereinheit (TSA) der Tryptophansynthase (TS) synthetisiert und durch die Beta-Untereinheit (TSB) im TS-Komplex zu TRP umgesetzt. In BX produzierenden Pflanzen wird freies Indol durch BX1 synthetisiert und ist das Eingangssubstrat der BX-Biosynthese. Transgene Expression von *Bx1* und Fütterung von Indol greifen in die Indol-Homöostase ein. Fütterung von Indol führte bei *Col-0* zu einer Anreicherung von freiem TRP.

Auch bei transgener Expression von *Bx1* und *Bx1* in Kombination mit *Cluster+* (*Bx1C+*) wiesen die Pflanzen signifikant erhöhte Konzentration an freiem TRP auf (Tabelle 18). In Mais wurde die Konzentration von freiem TRP ebenfalls durch den Status der BX-Biosynthese beeinflusst. Sowohl in der *bx1*-Mutante als auch in der *bx3*-Mutante war die TRP Konzentration fast zweimal höher als im Wildtyp (Tabelle 18). Um die Konkurrenz der Biosynthesen genauer zu untersuchen, wurden *Col-0*, *Cluster+* und *Bx1C+* Pflanzen mit Indol gefüttert. In allen Fällen erfolgte eine mehr als 10-fache Zunahme der TRP-Konzentration auf rund 10 -16  $\mu\text{mol/g TG}$  (Tabelle 19). Die zusätzliche Steigerung der Indol-Konzentration durch exogene Gabe führte in *Bx1C+* dagegen nicht zu entsprechend erhöhter GDIBOA-Konzentration.

Tabelle 19: Einfluss von Indolfütterung auf die Konzentration freien Indols und GDIBOAs. MES Puffer-Kontrolle, \*statistisch nicht signifikant

	TRP [ $\mu\text{mol/g TG}$ ]			GDIBOA [ $\text{nmol/g TG}$ ]		
	<i>Col-0</i>	<i>Cluster+</i>	<i>Bx1C+</i>	<i>Col-0</i>	<i>Cluster+</i>	<i>Bx1C+</i>
Indol	10,4 $\pm$ 3,5	16,2 $\pm$ 1,9	9,44 $\pm$ 1,1	n.d	2,73 $\pm$ 1,28	2,4 $\pm$ 0,6*
MES	0,84 $\pm$ 0,04	0,94 $\pm$ 0,33	0,81 $\pm$ 0,04	n.d	0,86 $\pm$ 0,41	2,17 $\pm$ 1,17

Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass durch BX1 eine Kanalisierung von Indol in die BX-Biosynthese besteht, z.B. durch eine Assoziation mit BX2. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde eine Verfolgung von Metaboliten mittels Isotopenmarkierung durchgeführt.

Wenn ein "Channeling" BX1-BX2 stattfände, würde extern verabreichtes Indol nur in geringem Maß zur BX-Biosynthese beitragen. Dagegen sollte zugegebenes IGP als BX1-Substrat über BX2 in DI(M)BOA eingebaut werden. Sind TRP- und BX-Biosynthese unterschiedlich zugänglich für zugesetzte Substrate, sollten sich die Verteilungsmuster für Indol und Indol-Vorläufersubstrat in den jeweiligen Endprodukten unterscheiden. Einbauraten können über isotopmarkierte Substrate nachgewiesen werden. Markiertes Indol (Indol\* 126 g/mol) ist käuflich, IGP ist instabil und nicht als isotopenmarkiertes Molekül verfügbar. Deshalb wurde auf markiertes Anthranilat (Anthranilat\* 143 g/mol), das im Shikimisäureweg in IGP umgesetzt wird (Abbildung 1) zurückgegriffen. Die Einbauraten (Anthranilatmarkierung +6 Dalton, Indolmarkierung +9 Dalton) wurden für Tryptophan und DI(M)BOA bei Mais (B73 Wildtyp und *bx1*-Mutante) und in transgener Arabidopsis (*Cluster+*, *Bx1Bx2C+*) untersucht. Zusätzlich wurden *Bx1Bx2* Pflanzen und der von ION abgeleitete Metabolit 5HIONG (Indolin-2-on-5- $\beta$ -D-Glucopyranosid, siehe Kapitel 3.2.3.3) analysiert. 5HIONG findet sich in *Bx1Bx2* und *Bx1Bx2C+* Transgenen in substantiellen Mengen und erlaubt damit eine verlässliche quantitative Analyse der Isotopmarkierung. Gemeinsames Intermediat von BX und 5HIONG ist durch BX1 und BX2 erzeugtes ION. Eine zwischen

beiden Enzymen bestehende Kanalisierung wäre in beiden Biosynthesen etabliert. Maiskeimlinge (4 dai) und Rosettenblätter (28 dai) wurden wie beschrieben gefüttert (2.2.6.2), Extrakte wurden mit der Folch-Methode (2.2.8.2) gewonnen und TRP, ION, 5HIONG und DI(M)BOA mit LC-MS analysiert. In allen Ansätzen war die Anreicherung von Indol abgeleiteter Markierung in den Metaboliten (TRP, ION, 5HIONG, BX) höher als die von Anthranilat abgeleitete (Tabelle 20). Ein signifikanter Unterschied der Raten zwischen einerseits TRP und andererseits DI(M)BOA oder 5HIONG bestand nicht. In wildtypischem Mais war die Einbaurrate von Anthranilat-abgeleitetem Indol in Tryptophan geringfügig höher als der Anteil dieser Markierung in DIMBOA. Ein umgekehrtes Verhältnis wäre bei BX1-BX2-Kanalisierung zu erwarten. Durch das zu BX1 homologe Enzym IGL erfolgt in der Mais *bx1*-Mutante eine DIMBOA-Hintergrundbiosynthese. Sie betrug 2,5% der Konzentration von wildtypischem Mais und der Markierungsgrad war bei Anthranilat\*-Fütterung bei 14%, und bei Zugabe von Indol\* bei 50%. In Mais und transgener Arabidopsis ergab sich damit kein Hinweis, dass Indol von BX1 zu BX2 geschleust wird.

Tabelle 20: Anteil Isotop-markierten Tryptophans, 5HIONGs und BXs nach Fütterung isotop-markierten Anthranilats (MG +6) und Indols (MG +9). Als BX wurde in Mais DIMBOA analysiert, in Arabidopsis GDIBOA. \* Geringe GDIBOA Konzentration, daher Unsichere Mengenbestimmung. \*\* BX werden auch von der *bx1* Mutante produziert, was auf die Aktivität des Homologs IGL zurückzuführen ist. Die gebildete Menge an BX beträgt ca. 2,5% des Wildtypwerts. Wildtypische Maiskeimlinge beinhalten ca. 30mM GDIMBOA (Zheng et al. 2015). Der geringe Markierungsgrad ist durch den GDIMBOA-Pool im WT *B73* bedingt

	TRP+6	TRP+9	5HIONG+6	5HIONG+9	BX +6	BX +9
<i>B73 bx1</i>	17	28	n.a.	n.a.	14**	48
<i>B73</i>	30	50	n.a.	n.a.	1,1	3,5
<i>Col-0 x Cluster+</i>	76	90	n.d	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Bx1C+</i>	64	87	5,1	4,12	4,3*	17,8*
<i>Bx1Bx2C+ 8h</i>	58	87	0,33	55	n.d.	n.d.
<i>Bx1Bx2C+ 24h</i>	59	76	1,9	56	n.d.	n.d.
<i>Bx1Bx2 8h</i>	73	93,5	1,2	4,12	n.d.	n.d.
<i>Bx1Bx2 24h</i>	80	93,2	7,3	9,3	n.d.	n.d.
<i>Col-0</i>	77	90	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

### 3.2.3.2 Die Expressionsrate von *Bx2* und *Bx3* hat wesentlichen Einfluss auf die DIBOA-Produktion

Die Konkurrenz mit dem Primärstoffwechsel wurde als wahrscheinliche Ursache für die Limitierung der BX-Biosynthese erkannt. Einfluss auf die Verteilung des gemeinsamen Substrats hat die Effizienz des jeweiligen Biosynthesewegs, die wesentlich von sogenannten "Bottleneck"-Enzymen abhängt. Um zu untersuchen, welcher Schritt begrenzend für die

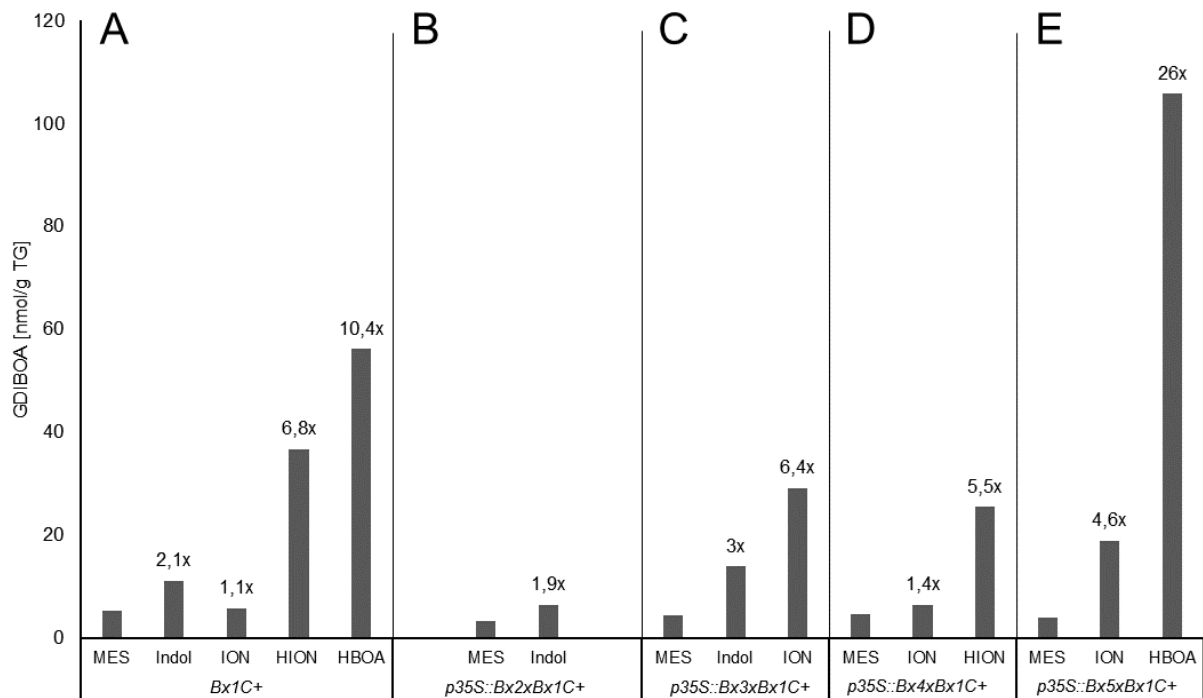


Abbildung 9: GDIBOA-Gehalt in verschiedenen transgenen Pflanzen bei Fütterung von Intermediaten. A Die Transgene *Bx1C+* trägt alle *Bx*-Gene. Verglichen mit der Pufferkontrolle (MES) ergibt sich eine Steigerung der GDIBOA-Konzentration insbesondere mit den Substraten HION (Produkt von BX3) und HBOA (Produkt von BX4). B-E Fütterung von Pflanzen, die individuelle *Bx*-Gene durch einkreuzen von *p35S*-Konstrukten überexprimieren. B *Bx2*-Überexpression, C *Bx3*-Überexpression, D *Bx4*-Überexpression, E *Bx5*-Überexpression. Überexpression führt bei BX3 und BX5 zu rund 6-facher, bzw. 2,5-facher Steigerung der GDIBOA-Konzentration bei Fütterung des Substrats verglichen mit der entsprechenden Fütterung der *Bx1C+*-Ausgangspflanze.

GDIBOA-Biosynthese ist, wurde zunächst *Bx1C+* mit allen Intermediaten gefüttert (Abbildung 9A). Die Zunahme des Endprodukts war moderat bei Zugabe der BX1 und BX2 Produkte Indol und ION. Dagegen wurde durch exogenes HION und HBOA eine rund 7- bis 10-fache Zunahme von GDIBOA erreicht (Abbildung 9A). Dieses Ergebnis legte nahe, dass durch BX3 eine Schlüsselreaktion katalysiert wird. Im Folgenden wurde der individuelle Einfluss der modifizierenden Enzyme BX2-BX5 auf die BX-Biosynthese systematisch durch Modulation der jeweiligen transkriptionalen Expressionsstärke untersucht. Dazu wurden einzelne *Bx-P450* Gene im Hintergrund des *Bx1C+* Genotyps als *p35S*-Promoter-Konstrukte überexprimiert. Eingesetzt wurde eine *Bx1C+* Pflanze die alle transgen exprimierten Gene homozygot trug. Die homozygote *Bx1C+* Pflanze wurde je mit homozygoten Arabidopsis Linien gekreuzt, die am Lehrstuhl für Genetik für die Einzelkonstrukte *p35S::Bx2*, *p35S::Bx3*, *p35S::Bx4*, *p35S::Bx5* erstellt worden waren. Die durch Kreuzung entstandenen Pflanzen waren für alle Transgene heterozygot, wobei jeweils eins der P450 Gene zweifach vorhanden war, exprimiert über das Cluster-Konstrukt und über das *p35S*-Konstrukt während *Bx1* nur in einer Kopie vorlag. Durch RT-qPCR wurde die Transkriptionsrate der jeweiligen Gene quantifiziert. Da die Codonverwendung der *p35S*-kontrollierten P450-Gene und die der

im Cluster+ lokalisierten unterschiedlich war, konnten bei der qPCR durch Verwendung unterschiedlicher Primer (Tabelle 4) alle *Bx*-Gene individuell analysiert werden. Die Transkriptmenge der im Cluster lokalisierten *Bx*-Gene lag jeweils im Bereich des "Housekeeping"-Gens *GAP C*. Die Kreuzungen wiesen einen fünf- bis sechsfachen Anstieg der Transkriptmenge für die Gene *Bx2*, *Bx3* und *Bx5* auf. *Bx4* wurde durch das Einkreuzen von *p35S::Bx4* nicht überexprimiert und die Transkriptmenge entsprach der von homozygoten Cluster+ Pflanzen (Abbildung 10).

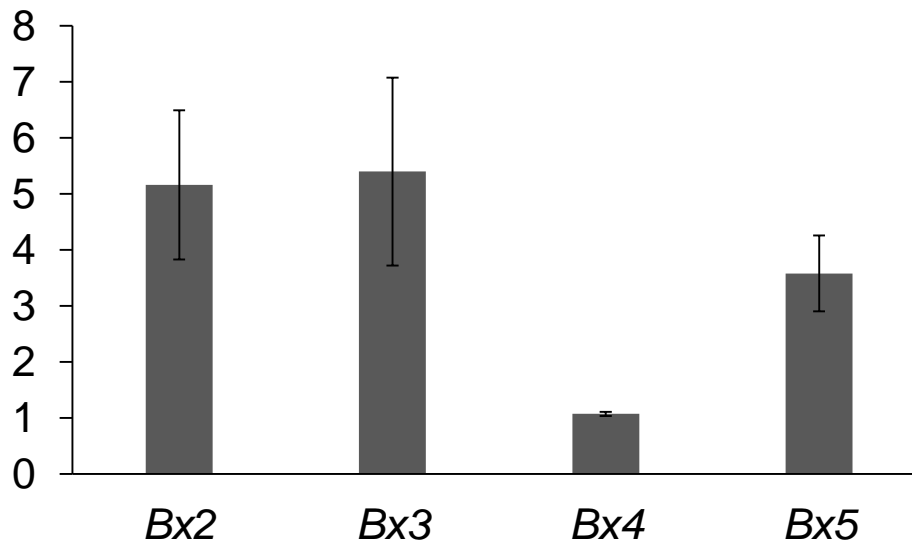


Abbildung 10: Steigerung der Transkriptmengen durch Einkreuzung von p35S-Einzelkonstrukten der *Bx*-Gene. Die Transkriptmenge ist relativ zum Wert in *Bx1C+xCol-0* angegeben.

Extraktanalysen dieser individuellen Überexpressionspflanzen (28 dai, Methanol Extrakt, 2.2.8.1) zeigten keine signifikante Steigung der GDIBOA Konzentration *per se* (MES-Kontrolle, Abbildung 9B, C, D, E). Bei Fütterung bestätigte sich die Schlüsselstellung von *BX3*. Mit erhöhter Expression von *Bx3* (*p35S::Bx3 x Bx1C+*) erfolgt bei Inkubation mit dem *BX3*-Substrat ION ein 6,0-facher Anstieg an GDIBOA im Vergleich zur entsprechenden Fütterung von *Bx1C+* (Vergleich Abbildung 9C mit Abbildung 9A). Nicht nur bei Zugabe des *BX3*-Substrats, sondern auch bei Fütterung mit Indol hatte die Überexpression von *Bx3* einen positiven Einfluss (3-fache Erhöhung, Abbildung 9C). Das zweite Gen, dessen Überexpression zu einer Steigerung der GDIBOA-Konzentration bei Fütterung des Substrats führte, ist *Bx5*, die GDIBOA-Konzentration ist 2,5-fach erhöht (Abbildung 9E verglichen mit Abbildung 9A). Die Steigerung der transkriptionalen Expression von *Bx2* hingegen erhöhte bei Fütterung mit Indol die gebildete GDIBOA Menge nicht.

Während das Endprodukt GDIBOA in den *BX1C+* Transgenen in einer Konzentration von wenigen nmol/g TG gebildet wurde, wurde das Intermediat ION in *Bx1Bx2* Pflanzen in substantiellen Mengen von 70µmol/g TG nachgewiesen (Tabelle 18), d.h. exogene Zugabe



von Indol war bei hohem Expressionslevel von *Bx1* und *Bx2* nicht notwendig für effiziente Indol-Hydroxylierung durch BX2. Durch Kreuzung von *Bx1Bx2* mit *Bx1Cluster+* wurde parallel die Transkriptmenge der beiden Gene erhöht. In der Folge ergab sich eine Steigerung der GDIBOA-Konzentration um das 3-fache ( $11 \pm 2,9$  nmol/g TG, Tabelle 18). Da BX3, das Enzym, das als Flaschenhals der Biosynthese erkannt wurde, von Zulieferung des Substrats durch BX1 und BX2 abhängt, wurden die Genotypen *pSUR2::Bx1*, *p35S::Bx3*, *Cluster+* und *pSUR2::Bx1*, *p35S::Bx2*, *p35S::Bx3*, *Cluster+* durch Kreuzung der entsprechenden homozygoten Pflanzen erstellt (Tabelle 15). In diesen Linien kam es zu gesteigerter GDIBOA-Biosynthese. Die *Bx1*, *Bx3*-Überexpressionslinie produzierte elf Mal mehr GDIBOA als *Bx1C+* ( $42,7 \pm 8,8$  nmol/g TG, Tabelle 18). Pflanzen vom Genotyp *pSUR2::Bx1 p35S::Bx2 p35S::Bx3 Cluster+* wiesen  $194 \pm 8,5$  nmol/g TG GDIBOA auf, was der 52-fachen Menge von *Bx1C+* entspricht. Dieser Wert liegt im niedrigen Bereich der im Roggen zu findenden BX Konzentration.

Bei Genotypen mit gesteigerter GDIBOA-Konzentration (im Bereich von rund  $0,05 \mu\text{mol/g}$  TG) war die Konzentration freien Tryptophans reduziert (Tabelle 18). Das zeigte, dass die Effektivität der ersten Reaktionen der BX-Biosynthese für die Verteilung des gemeinsamen Intermediats Indol zwischen Primär- und Sekundärmetabolismus bestimmend ist.

### 3.2.3.3 Behinderung der BX-Biosynthese in Arabidopsis durch Metabolisierung von Intermediaten

In BX-bildenden Gräsern sind Biosynthese-Intermediate nicht nachweisbar oder in geringen Mengen vorhanden. Dagegen waren ION, HION und HBOA bei der Analyse des *Bx1C+* Extrakts detektierbar (Tabelle 16, Abbildung 25). In der LC-MS Analysen traten Substanz-Peaks auf, die als Hexose-Derivate der Intermediate interpretiert wurden (Tabelle 16, Tabelle 18). Die BX-Intermediate, die in Arabidopsis Fremdstoffe darstellen, wurden nicht nur im Gegensatz zu den Gräsern freigesetzt, sondern auch durch endogene Enzyme metabolisiert. Ein prominentes Metabolisierungsprodukt wurde gleichermaßen in *Bx1Bx2*-Pflanzen, bei der Fütterung von *p35S::Bx2*-Pflanzen mit Indol und des Wildtyps *Col-0* mit ION nachgewiesen.

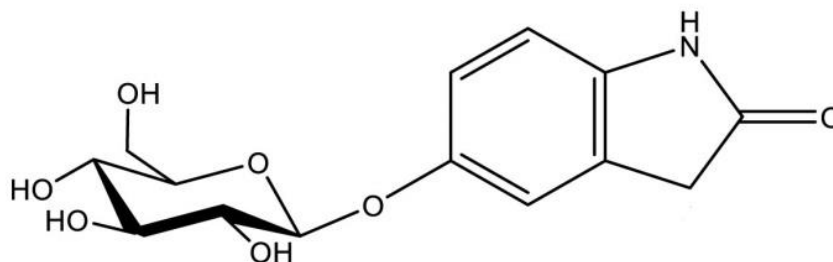


Abbildung 11: Chemische Struktur von Indolin-2-on-5- $\beta$ -D-glucopyranosid (5HIONG).

Gleichzeitig lag die Menge des BX-Intermediats HION in den Transgenen mit vollständigem BX-Biosyntheseweg unter der Detektionsgrenze. Die unbekannte Substanz ist charakterisiert durch eine Retentionszeit von 12 min (bei Standard LC-MS Bedingungen, 2.2.9.2), eine  $m/z$  von 312 und ein Absorptionsmaximum im UV Bereich bei 250 nm. Der Metabolit wurde von Dr. Timo Stark und Dr. Thomas Hoffmann isoliert und über NMR-Analyse als Indolin-2-on-5- $\beta$ -D-glucopyranosid (5HIONG) identifiziert (Abbildung 11).

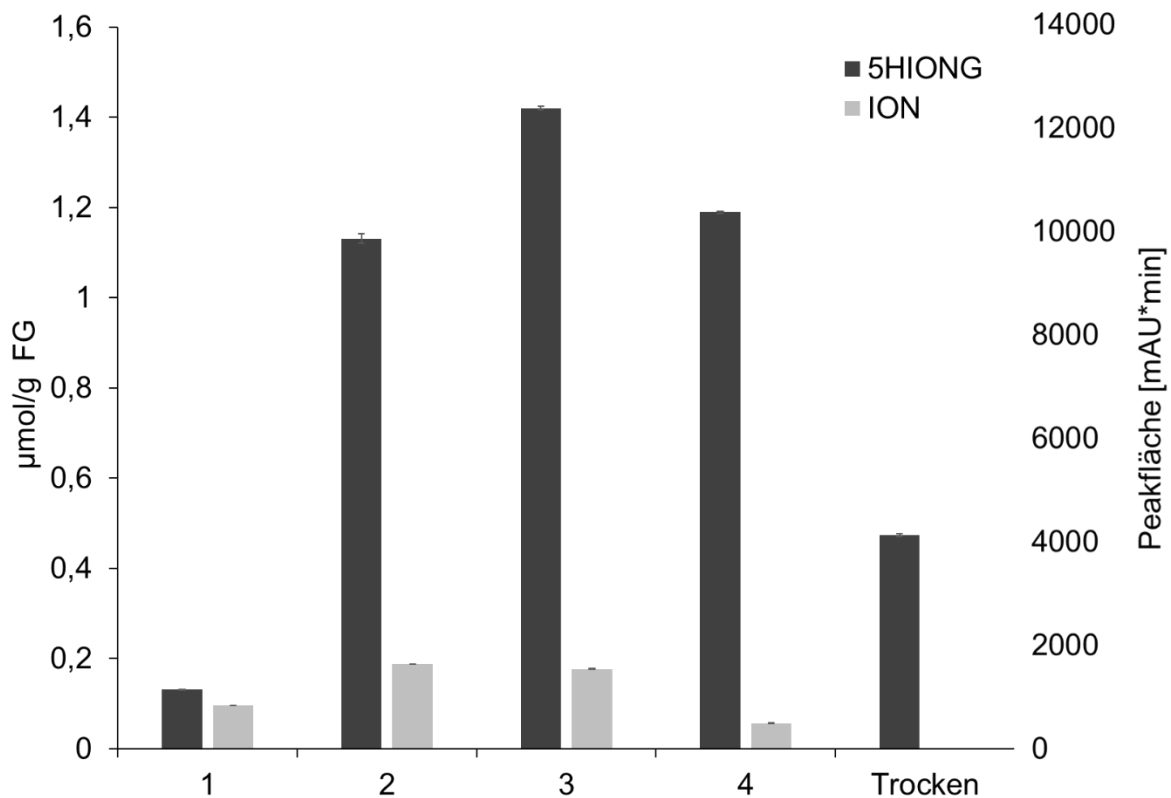


Abbildung 12: Die per HPLC-UV gemessenen Mengen von ION in der Linie *Bx1Bx2* in  $\mu\text{mol/g}$  FG und Peakintensität für 5HIONG. Die X-Achse gibt das Alter der untersuchten Pflanzen in Wochen an. Die letzte Messung erfolgte mit trockenen, abgestorbenen Blättern seneszenten Pflanzen.

5HIONG wurde auch in relativ großen Mengen in *Bx1Bx2C+* Pflanzen detektiert. Die Konzentration von 5HIONG in *Bx1Bx2* Pflanzen nahm in der Entwicklung zu und erreichte drei bis 4 Wochen nach Keimbeginn ihr Maximum (Abbildung 12). Dagegen blieb die Konzentration von ION weitgehend konstant über die ersten Wochen der Entwicklung, verringerte sich mit der Alterung und war, im Gegensatz zu 5HIONG, in seneszentem Material nicht mehr nachweisbar. Zusammengefasst deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass ION in *Arabidopsis* effizient zu 5HIONG metabolisiert wird und damit nicht für die BX-Biosynthese zur Verfügung steht. Eine besondere Rolle von BX3 in der transgenen GDIBOA-Biosynthese besteht damit in der Konkurrenz mit endogenen Enzymen um ION und damit verbunden mit der Reduzierung der hohen Mengen des in *Arabidopsis* auftretenden ION-Metaboliten 5HIONG (s.u.).

Tabelle 21: Relative Menge von 5HIONG in unterschiedlichen Pflanzenarten nach Fütterung mit 1 mM ION. Das Verhältnis der Peakflächen in HPLC-UV-Analyse ist angegeben

Art	Familie	Verhältnis 5HIONG/ION
<i>Arabidopsis thaliana</i>		0,077
<i>Eutrema salsuginea</i>	Brassicaceae	0,030
<i>Brassica oleracea</i>		0,125
<i>Pisum sativum</i>	Fabaceae	0,010
<i>Lotus japonicus</i>		0,009
<i>Nicotiana benthamiana</i>	Solanaceae	0,009
<i>Ocimum basilicum</i>	Lamiaceae	0,008
<i>Consolida ambigua</i>		0,004
<i>Consolida ajacis</i>	Ranunculaceae	0,007
<i>Delphinium grandiflorum</i>		0,003
<i>Allium porrum</i>	Amaryllidaceae	0,047
<i>Avena sativa</i>		0,002
<i>Setaria italica</i>	Poaceae	0,002
<i>Sorghum bicolor</i>		0,001
<i>Hordeum sp.</i>		0,008

Es stellte sich die Frage, ob diese Metabolisierung von ION auf *Arabidopsis* beschränkt ist oder verbreitet im Pflanzenreich auftritt. Deshalb wurde eine Auswahl von Dikotyledonen (Brassicaceae, Fabaceae, Solanaceae, Lamiaceae, Ranunculaceae) und Monokotyledonen (Amaryllidaceae, Poaceae) im Fütterungsversuch mit 1mM ION analysiert (Tabelle 21). Alle Pflanzen akkumulierten nach der Fütterung ca.  $760 \pm 21 \mu\text{mol/g}$  TG ION. In allen Extrakten trat zusätzlich ein Metabolit mit der Retentionszeit und dem UV-Spektrum von 5HIONG auf. Da keine authentische Substanz für 5HIONG erhältlich ist, konnte keine absolute Quantifizierung anhand einer Standardverdünnungsreihe erstellt werden. Die Metabolisierung in Pflanzen wurde stattdessen relativ, als Verhältnis des putativen 5HIONG Peak zu ION-Peak im Chromatogramm gemessen. Der ION-Metabolit wurde in unterschiedlichen relativen Mengen detektiert (Tabelle 21). Innerhalb von Pflanzenfamilien zeigte sich eine einheitliche Kompetenz zur Biosynthese des ION-Metaboliten. Mit einem durchschnittlichen Anteil von 0,054 lag die Rate bei Brassicaceae am höchsten (Tabelle 21). Die gleiche Größenordnung wurde von *Allium porrum* erreicht. Damit wurde nachgewiesen, dass ION von Monokotyledonen und Dikotyledonen gleichermaßen umgesetzt werden kann. Die analysierten Vertreter der Fabaceae, Solanaceae und Ranunculaceae hatten mit Werten von 0,01 bis 0,006 einen geringeren Anteil des ION-Metaboliten als die Brassicaceae. Die geringste Umsetzung von ION in 5HIONG wurde bei den Poales nachgewiesen. Mit Ausnahme von *Hordeum spontaneum* lagen die Werte bei rund 0,002. Die Ergebnisse zeigten, dass ION quer durch das Pflanzenreich eine Substanz darstellt, die mit endogenen Enzymen prozessiert wird. Obwohl der absolute Nachweis nicht geführt wurde legen die

Kenndaten in den Chromatogrammen nahe, dass in allen untersuchten Pflanzen der gleiche Metabolit, 5HIONG gebildet wurde.

Für die Analyse wurden Pflanzenspezies eingesetzt, die keine BX synthetisieren. In Mais gibt es mit der Mutante für das Gen *Bx3* eine Linie, in der die BX-Biosynthese nach der Bildung von ION unterbrochen ist. In dieser Pflanze kann also das Potential von Mais zur alternativen Metabolisierung von ION untersucht werden. Für vergleichende Analyse lag im genetischen Hintergrund der Linie *B73* die nahezu isogene *bx3*-Mutanten-Linie (*B73-bx3*) vor. In *B73-bx3* wurde ION in einer Konzentration von 24  $\mu\text{mol/g}$  TG gemessen (Tabelle 18) und damit in der Größenordnung, die in *Bx1Bx2Cluster+* auftrat. 5HIONG war jedoch nur in geringen Mengen vorhanden (Tabelle 18). Per LC-MS konnten Peaks detektiert werden, die im Vergleich mit *B73* spezifisch bei der Mutante *B73-bx3* auftraten, für die der Metabolit aber nicht identifiziert werden konnte (Anhang 1). Diese Beobachtung führt zur Hypothese, dass angereichertes ION in Mais vorwiegend zu unbekanntem Produkten metabolisiert wurde, nicht aber zu 5HIONG, was im Gegensatz zu den untersuchten nicht BX-produzierenden Pflanzen steht (Tabelle 21).

### 3.2.3.4 An der Metabolisierung von ION zu 5HIONG in Pflanzen sind Monooxygenasen beteiligt.

Da die alternative Metabolisierung von ION ein wesentliches Hindernis der Biosynthese von BX in Arabidopsis darstellt, war es von Interesse die zugrundeliegenden enzymatischen

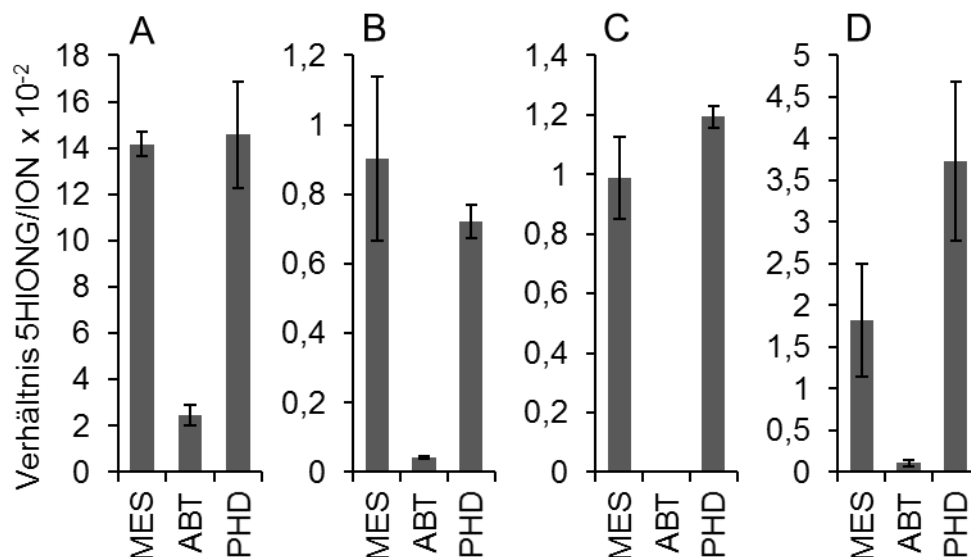


Abbildung 13: Hemmung der 5HIONG-Biosynthese in Pflanzen. ION (1mM) wurde zusammen mit den Inhibitoren 1-Aminobenzotriazol (ABT, 0,5mM) und Prohexadion (PHD, 0,1%) und als Kontrolle in MES-Puffer (MES) gefüttert. Der relative 5HIONG-Gehalt bezogen auf vorhandenes ION ist angegeben (Peak-Flächen in HPLC-Analyse). A *Arabidopsis Col-0*, B *Nicotiana benthamiana*, C *Pisum sativum*, D *Hordeum vulgare*.

Tabelle 22: Umsatz von ION in 5HIONG in verschiedenen P450-Insertionsmutanten von Arabidopsis. Die Analysen innerhalb eines Ansatzes sind gruppiert und die parallel bestimmten Werte für Wildtypen sind angegeben. Im Fall segregierender Populationen wurden die Werte von Mutanten und wildtypischen Geschwistern bestimmt. Bis auf *fmo1* zeigte keine Mutante eine signifikant geringere Produktion von 5HIONG. Der Unterschied bei *fmo1* ist wahrscheinlich durch die veränderte SA Homöostase bedingt.

Arabidopsis Enzym	T-DNA Linie	5HIONG/ION
Cyp71B7	SALK_012075C	0,074
Cyp71B2	SALK_150892C	0,078
Cyp71A12	GABI_414A10*	0,061
Cyp71A13	SALK_105136*	0,061
Cyp71A18	WiscDsLox297300_18A*	0,091
Cyp71B15	SALK_026585*	0,066
Cyp71B6	GABI305A04*	0,084
Cyp71B23	SALK_130555*	0,075
Cyp79B3	SALK_066556*	0,109
Cyp79B2	SALK_130570*	0,109
-	Col-0	0,081
Cyp71B4	SALK_005329	0,070
Cyp71B25	SALK_093521C	0,054
-	Col-0	0,068
Cyp81F1	SALK_031939	0,054
-	Col-0	0,058
FMO1	SALK_026163	0,090
	Col-0	0,123
Cyp81F4	SALK_138918	0,088
-	Col-0	0,077

Reaktionen zu analysieren. Mutagenese relevanter Enzyme könnte die Effizienz der transgenen BX-Biosynthese erhöhen. In der Biosynthese von 5HIONG erfolgt wie in der von HION eine Hydroxylierung des Substrats ION, allerdings in Position C5 im aromatischen Ringsystem (Abbildung 11). Dadurch wird das Substrat für die nachfolgende O5-Glucosylierung erzeugt. Die Hydroxylierung als erster Schritt ist also die Voraussetzung für den ION-Metabolismus in den untersuchten nicht BX-produzierenden Pflanzen. Hydroxylierungen werden in Pflanzen überwiegend durch Monooxygenasen (P450-Enzyme) oder 2-Oxoglutarat-abhängige Dioxygenasen vermittelt (de Carolis und de Luca, 1994; Chapple, 1998). Eine Eingrenzung der Enzymklassen wurde durch Fütterungsversuche mit spezifischen Inhibitoren unternommen. Monooxygenasen werden spezifisch durch 1-Aminobenzotriazol (ABT) inhibiert, Dioxygenasen durch Prohexadion (PHD). Arabidopsis, *Nicotiana benthamiana*, *Pisum sativum* und *Hordeum vulgare* wurden mit 1mM ION kombiniert mit 0,5mM ABT bzw. 0,1% PHD gefüttert und der Umsatz von ION zu 5HIONG wiederum als Verhältnis von Produkt zu Substrat gemessen. In allen vier Pflanzenarten zeigte sich eine signifikante Reduktion der 5HIONG Produktion durch ABT gegenüber der Kontrolle, während Prohexadion keinen Einfluss hatte (Abbildung 13). Dieses Ergebnis deutet auf eine prominente Rolle von P450 Enzymen bei der Hydroxylierung von ION hin.

Etwa 250 Gene kodieren in Arabidopsis P450 Enzyme, für einen kleinen Teil ist Funktion und Substrat *in vitro* oder *in planta* bekannt. Insbesondere sind P450 beschrieben, die an der Biosynthese indolischer Glucosinolate und Camalexin beteiligt sind oder in Beziehung zur Auxin-Biosynthese stehen. Diesen ist gemeinsam, dass ihr Substrat von Indol abgeleitet ist, damit besteht strukturell eine Verbindung mit ION. Es wurde eine Auswahl von Enzymen erstellt, deren bekannte Substrate ein Indol-Grundgerüst enthalten (Tabelle 22). Verfügbare T-DNA Insertionsmutanten (NASC und zur Verfügung gestellt von Prof. Erich Glawischnig) der entsprechenden Gene wurden verifiziert und homozygot mutante Pflanzen mit ION gefüttert. Die Umsatzrate war in keiner der getesteten Mutanten signifikant kleiner als in wildtypischen Geschwisterpflanzen, d.h. keines der Kandidatengene stellt die ION 5-Hydroxylase dar.

Der Transfer der BX Biosynthese in Arabidopsis führt insgesamt zu einer Interferenz mit dem metabolischen Netzwerk der Pflanze, die die Effizienz der Biosynthese senkt. Die phytotoxischen Intermediate werden von den intrinsischen Enzymen modifiziert.

### **3.3 Einfluss des Intermediats ION auf Phänotyp und Metabolismus von Arabidopsis**

#### **3.3.1 Indolinone rufen Veränderungen der Pflanzenmorphologie hervor**

Mit Ausnahme von Bx1Bx2C + unterschieden sich *Cluster+*-Überexpressionspflanzen phänotypisch nicht von den *Col-0* Kontrollpflanzen, (Abbildung 14). Bx1Bx2C + war zierlicher als *Col-0* und stand damit in einer Reihe mit den anderen Linien, die sowohl *Bx1* und *Bx2* überexprimieren (Abbildung 14B, Anhang 2). Am deutlichsten war der abweichende Phänotyp wie beschrieben in der *p35S::Bx1 p35S::Bx2* exprimierenden Linie (Abbildung 8A, s. 3.2.1). Die transgene Linie Bx1Bx2 und die heterozygote aus der Kreuzung von Bx1Bx2 mit *Col-0* (Bx1Bx2Col-0) hatten einen im Vergleich dazu abgemilderten Phänotyp, der sich in kleinem Wuchs (Abbildung 8B) und einer allgemein verzögerten Entwicklung äußerte (Abbildung 14B). Der Größenunterschied der Rosetten von Bx1Bx2Col-0 zu *Col-0* war bereits 14 dai deutlich (Abbildung 14B). Bei paralleler Anzucht bildeten sich Blütenstände später und die Seneszenz war verzögert verglichen mit *Col-0* (Abbildung 14B). Die Rosettenblätter wiesen bereits vor Ausbildung der Infloreszenzen gelbe Spitzen auf (Anhang 3) bei ansonsten grünen sich entwickelnden Blättern. Dieser Phänotyp war auch in der Linie Bx1Bx2C+ ausgeprägt (Anhang 2). Dagegen waren Bx1C+, Bx1Bx3C+, Bx1Bx2Bx3C+ und Bx1Bx2Bx3 in Bezug auf diese Merkmale weitgehend wildtypisch (Abbildung 14A, Abbildung 14B, Anhang 2). Die Ausprägung des Zwergwuchses korrelierte mit der Menge an ION und 5HIONG, die in den Pflanzen akkumuliert wurde (Tabelle 18). Dieser Befund führte zu der Hypothese, dass eines der Indolinone (ION, 5HIONG) eine schädliche Wirkung auf die

Entwicklung von Arabidopsis oder generell auf Pflanzen haben könnte. Diese Hypothese wurde in Wurzelwachstumsexperimenten in Gegenwart von ION (siehe 2.2.7.2) mit Arabidopsis *Col-0*, *N. benthamiana* und *H. vulgare* überprüft (Abbildung 15). Da in allen Pflanzen ION in 5HIONG überführt wurde (Tabelle 21), konnten beide Substanzen nicht getrennt untersucht werden. Die eingesetzten ION-Konzentrationen von 1mM und 2mM liegen in dem Bereich, der in den transgenen Pflanzen gefunden wurde (0,8 mM bis zu 6 mM ION, Tabelle 18). Bei einer Konzentration von 1mM ION im Medium wurde das Wurzelwachstum von sieben Tage alten *Col-0* im Vergleich zur Kontrolle signifikant gehemmt (Abbildung 15). Auch 14 Tage alte *N. benthamiana* zeigten in Anwesenheit von 1mM ION ein verringertes Wurzelwachstum (Abbildung 15). *H. vulgare* Keimlinge als Vertreter der Gräser wurden drei Tage ION ausgesetzt. Auch diese zeigten nach der Inkubationszeit eine signifikant kürzere Wurzel im Vergleich zu den Kontrollen. Die Änderung des Wurzelwachstums war in allen drei Spezies von der ION Konzentration abhängig. Zudem war die Keimungsrate von Arabidopsis bei Konzentrationen von 1 bis 2 mM negativ beeinflusst und bei 5mM ION im Medium war die Keimung vollständig unterbunden (Ergebnis nicht dargestellt). Die Ergebnisse zeigten, dass Indolinone generell in Pflanzen mit Entwicklungsprozessen interferieren.

A



B

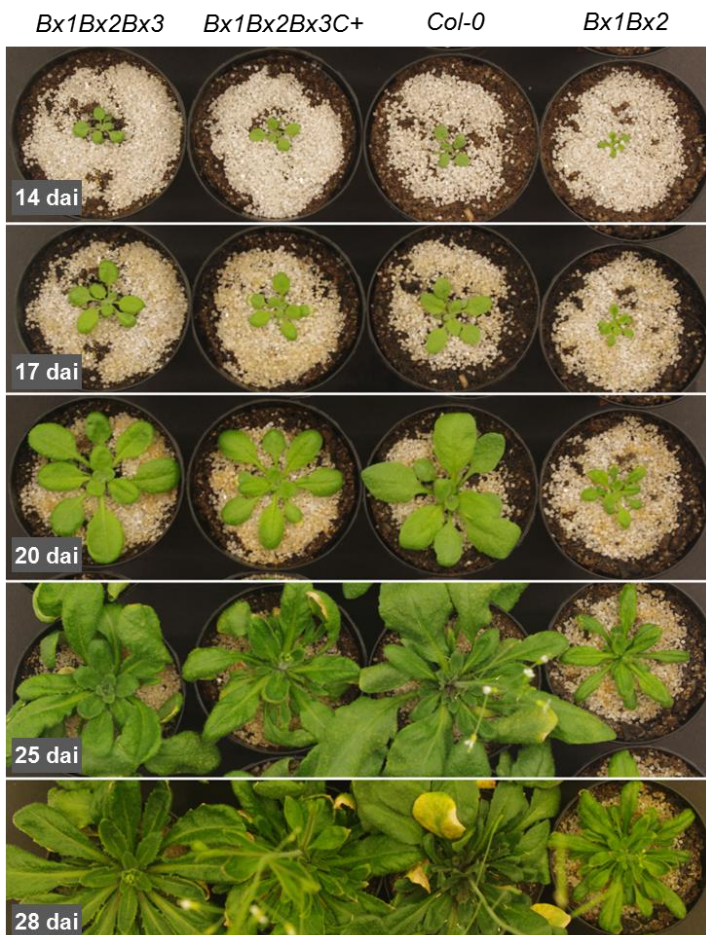


Abbildung 14: Phänotypen transgener Arabidopsis in verschiedenen Entwicklungsstadien. A Repräsentative *Cluster+*-Pflanzen kombiniert mit *p35S*- und *pSUR2*-Konstrukten der Gene *Bx1*, *Bx2*, *Bx3*. *Col-0* und *Bx1Bx2Bx3*-Pflanzen sind zum Vergleich gezeigt. Nur *Bx1Bx2C+* weicht in der Morphologie vom Wildtyp ab. B Repräsentative Pflanzen der *p35S* und *pSUR2* getriebenen Expression der Gene *Bx1*, *Bx2*, *Bx3* und *Col-0* zum Vergleich. Nur der Genotyp *Bx1Bx2* weicht vom Wildtyp ab.



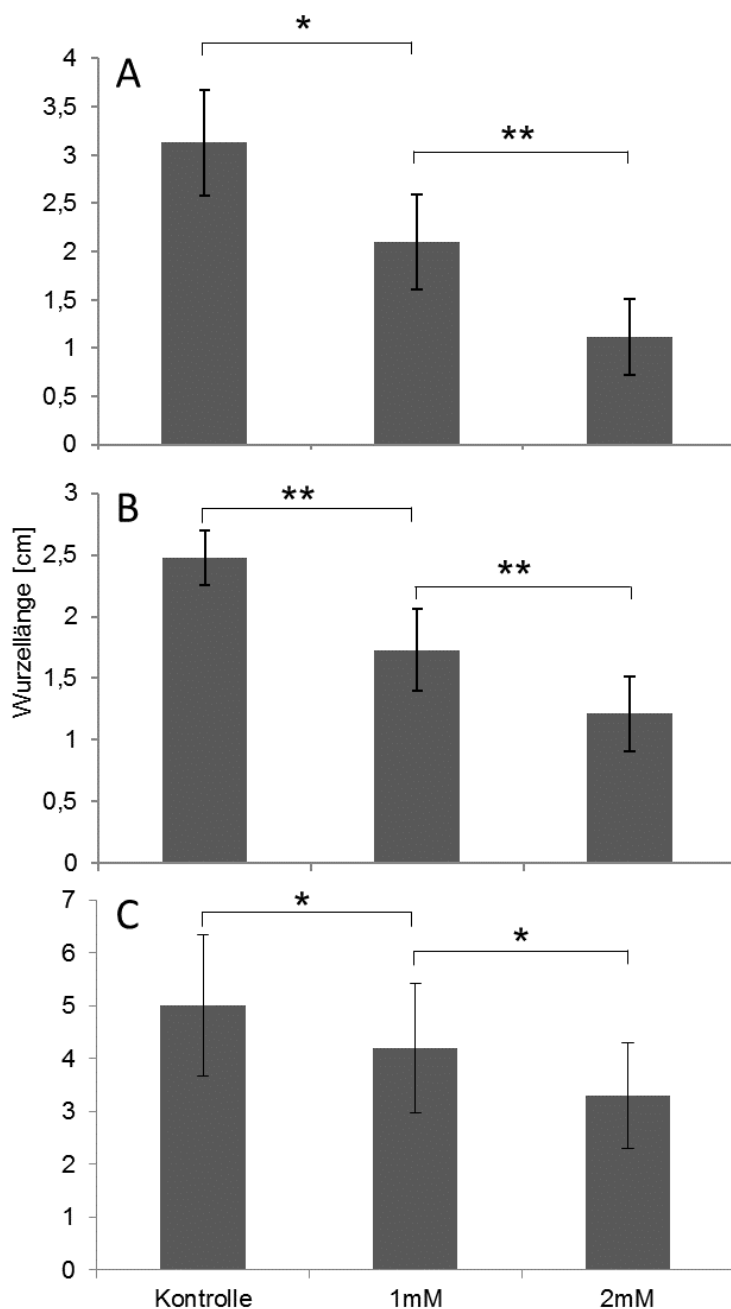


Abbildung 15: Wurzelwachstum in Anwesenheit von ION. Wurzellängen nach Wachstum in Medium mit 1mM und 2 mM ION A *Arabidopsis Col-0*, Inkubation 7 Tage, B *Nicotiana benthamiana*, Inkubation 14 Tage, C *Hordeum vulgare*, Inkubation 3 Tage. Kontrolle, Medium ohne Zusatz Asterisks zeigen den p-Wert des t-Tests an, \* $<0,005$ , \*\* $<0,0005$

### 3.3.2 Die Indolinone ION/5HIONG und Salicylsäure beeinflussen gegenseitig ihre Konzentration

Abweichungen im morphologischen Phänotyp von Pflanzen sind mit Veränderungen der Hormonhomöostase verbunden. Die beobachteten phänotypischen Unterschiede zwischen ION-akkumulierenden Genotypen und *Col-0* gaben Anlass die Konzentrationen von Phytohormonen zu untersuchen. Das Augenmerk lag dabei auf Auxin, da BX-Biosynthese und Auxin-Biosynthese in dasselbe biochemische Netzwerk eingebunden sind (Abbildung 1).

Die Versuche zur Toxizität der Indolinone zeigten, dass ihre Gegenwart für die Pflanze eine Stressbedingung darstellt. Deshalb wurden die Phytohormone Abscisinsäure (ABA), Jasmonat (JA) und Salicylsäure (SA), die bei abiotischem und biotischem Stress wirksam werden, in die Analyse einbezogen. Zwei Gruppen von Pflanzen, die Genotypen *Col-0*, *Bx1C+*, *Bx1Bx3C+*, *Bx1Bx2Bx3C+*, *Bx1Bx2Bx3* (Wildtyp Morphologie, geringe ION und 5HIONG-Konzentration) und die Genotypen *Bx1Bx2C+*, *Bx1Bx2* (abnorme Morphologie, hohe Konzentration von ION und 5HIONG), wurden einer gezielten massenspektrometrischen Analyse auf den Gehalt der Phytohormone unterzogen (2.2.10.3). Es konnten keine signifikanten Änderungen in den „steady state“-Mengen von IAA, die mit dem ION Gehalt oder der Ausprägung des morphologischen Phänotyps korrelierten (Abbildung 16) detektiert werden. In der Linie *Bx1Bx2C+* wurden etwa 3-fach erhöhte JA Werte gemessen, *Bx1Bx2*-Genotypen, die ähnlich hohe ION und 5HIONG Mengen akkumulierten, zeigte jedoch keine Änderung an JA. Die Konzentration von ABA war in den Genotypen *Bx1Bx2C+* und *Bx1Bx2* rund um den Faktor 3 erhöht, aber nur für *Bx1Bx2* war der Wert signifikant unterschiedlich zu *Col-0*. Eine deutliche Korrelation mit der Konzentration der Indolinone zeigte der Gehalt an Salicylsäure, der in *Bx1Bx2* und *Bx1Bx2C+* 3- bis 5-fach erhöht war. Der Pearson Korrelationskoeffizient zwischen den detektierten SA und ION Mengen in den analysierten Genotypen lag bei  $r=0,95$  (Abbildung 16, Abbildung 20). *Bx1Bx2C+* Pflanzen hatten den höchsten SA Gehalt obwohl die ION Menge in diesen Pflanzen geringer war als in *Bx1Bx2*. Wird die SA-Konzentration auf die Werte von ION und 5HIONG zusammen bezogen löst sich der Widerspruch auf.

Nach diesen Ergebnissen stellte sich die Frage, ob ION/5HIONG in Pflanzen eine Steigerung der SA-Konzentration induzieren. Deshalb wurde *Col-0* mit ION inkubiert. Die routinemäßig ausgeführte Fütterung erfolgte mit abgeschnittenen Blättern, die Verwundung führte zu einer dreifachen Steigerung der SA-Konzentration im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Eine Steigerung bei ION-Applikation relativ zur erheblichen wundinduzierten Steigerung war vorhanden, aber nicht signifikant. (Abbildung 17).

Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass SA neben der prominenten Rolle in der Pathogenabwehr (s.u.) Veränderungen der Pflanzenmorphologie bewirken kann, z. B. eine Reduktion der Pflanzengröße (Šašek *et al.*, 2014). Nachdem die Korrelation von SA und ION Gehalt in Transgenen festgestellt wurde, sollte geklärt werden, ob Indolinone selbst oder mittelbar über erhöhte SA-Konzentration die beobachteten morphologischen Veränderungen verursachten. Dazu wurden die beiden Metabolite getrennt. Erreicht wurde dies durch die Kreuzung der SA und ION akkumulierenden transgenen Linie *Bx1Bx2* mit der transgenen Linie *p35S::NahG* (*NahG*). Das Gen *NahG* aus *Pseudomonas putida* kodiert die Salicylsäurehydroxylase, die SA zu Catechol abbaut und hat somit einen dominanten Effekt.

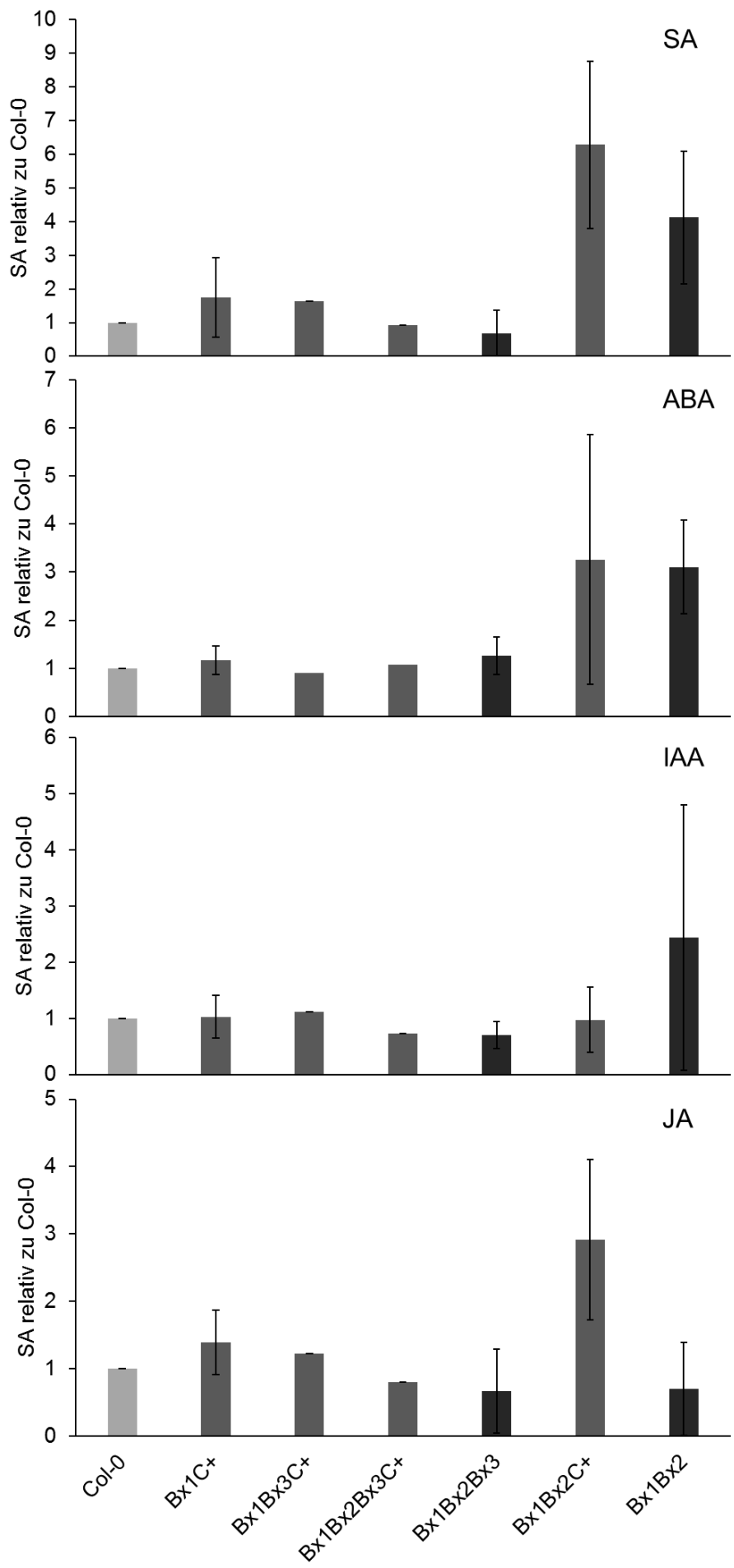


Abbildung 16: Die relative Menge ausgewählter Phytohormone in den Transgenen, normiert jeweils auf *Col-0*.

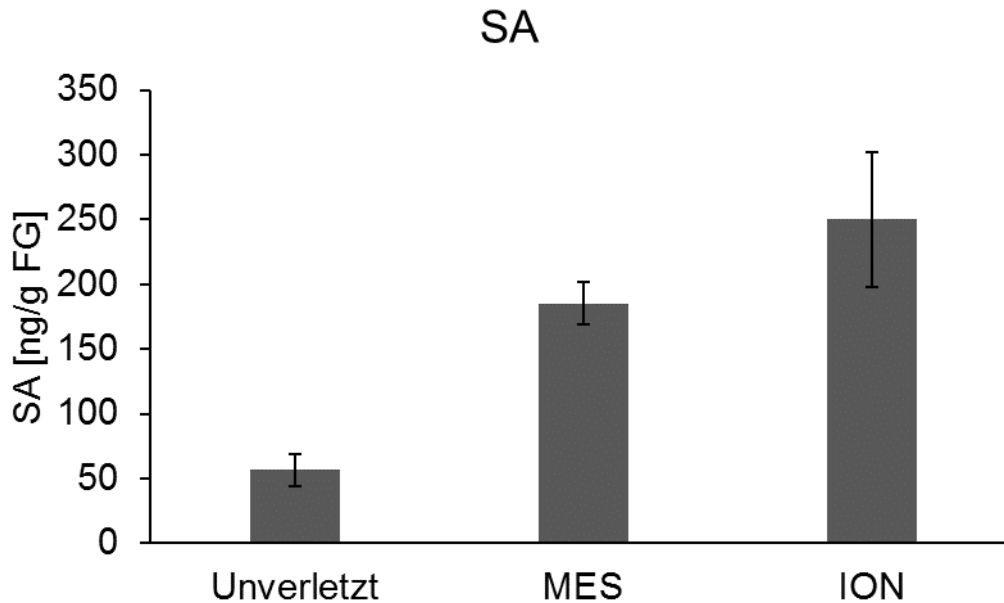


Abbildung 17: Einfluss der ION-Applikation auf den SA-Gehalt von *Arabidopsis Col-0*. Die Konzentration von SA wurde in unbehandelten Pflanzen, in Puffer inkubierten Pflanzen (MES) und in 1 mM ION inkubierten Pflanzen bestimmt. Die Steigerung an SA ist nicht statistisch signifikant, es ist jedoch eine Tendenz zu beobachten.

Die Linie Bx1Bx2NahG akkumulierte wie erwartet ION, enthielt aber nur Spuren von SA die weit unterhalb von Wildtyp Werten lagen (Abbildung 18). Die Reduktion des SA-Gehalts führte nicht zu einer Reversion des Phänotyps (Abbildung 19A). Von Beginn der Keimung an waren Bx1Bx2NahG-Pflanzen kleiner als die Wildtyppflanzen. Allerdings zeigten sie mit zunehmendem Alter auch stärkeres Wachstum verglichen mit Bx1Bx2-Pflanzen, die Durchmesser der Rosetten waren beginnend mit Tag 18 (dai) signifikant größer (Abbildung 19B, Anhang 4). In jedem Entwicklungsstadium war der Rosettendurchmesser der Kontrollpflanzen signifikant größer als der der beiden transgenen Linien. Die Ergebnisse zeigten, dass die Indolinone *per se* zur Veränderung des Pflanzenwachstums führen, dieser Effekt aber durch die Steigerung der SA-Konzentration noch verstärkt wird. Die Mais *B73-bx3*-Mutante, die ION enthält (siehe 3.2.3.3) zeigte dagegen keinen morphologischen Phänotyp und war fertil. Die Metabolitenanalyse der Maismutante wies keine Erhöhung des SA-Gehalts auf (Tabelle 18).

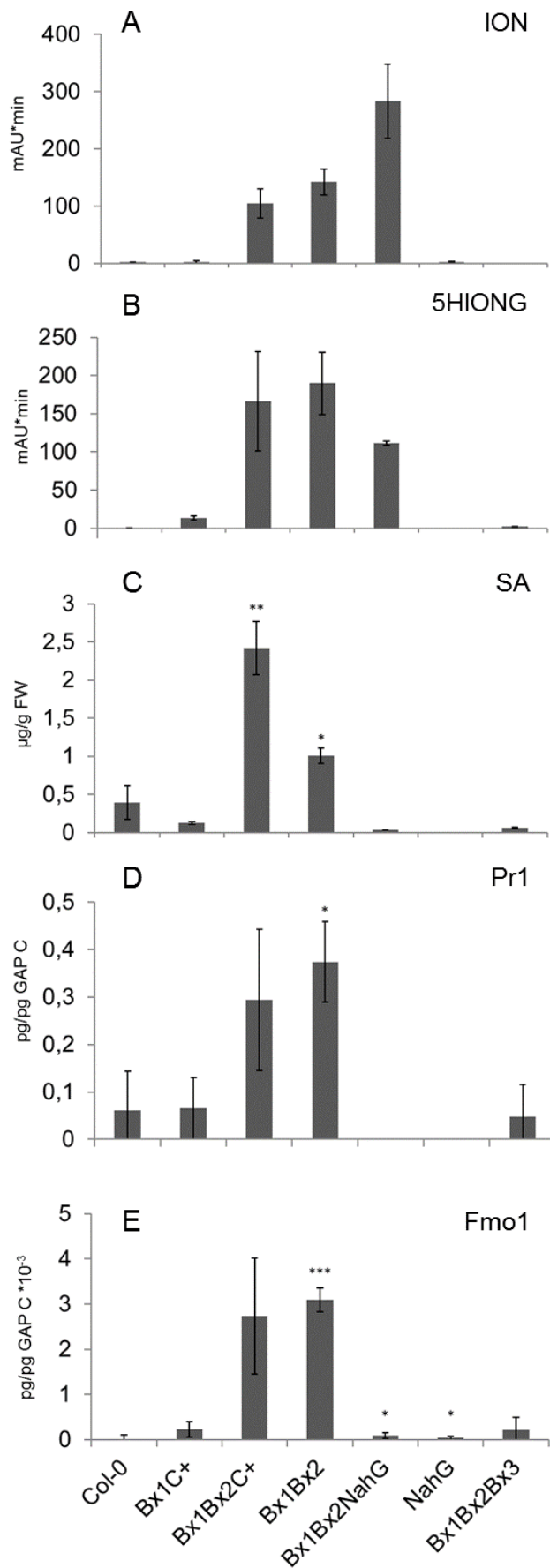


Abbildung 18: Metabolitenprofil und Expression von Genen der Pathogenabwehr. "Steady state" Transkriptmengen der Gene sind normalisiert mit den Werten von *GAP C*. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung für drei unabhängige Replikate an. Die Asterisks geben den p-Wert des t-Tests an gegen Col-0 an, \* $<0,05$ , \*\* $<0,00625$ , \*\*\* $<0,001$

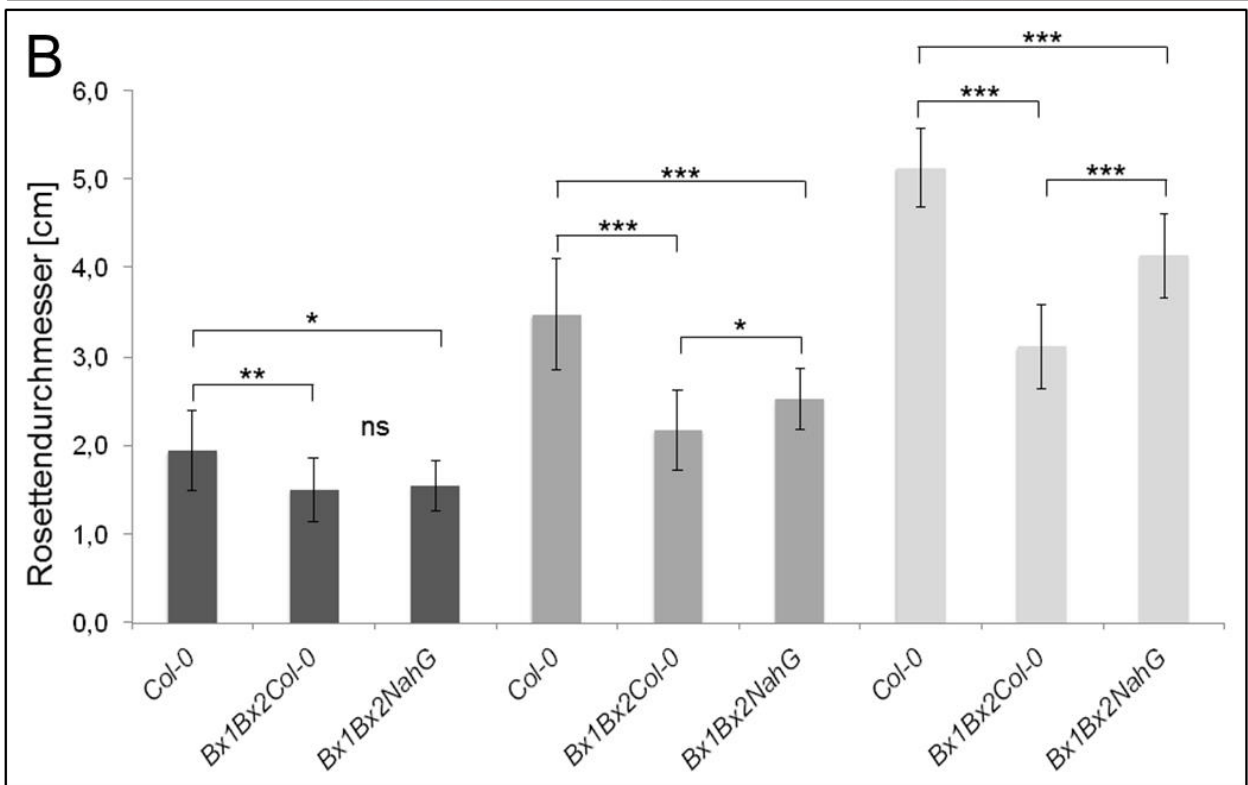
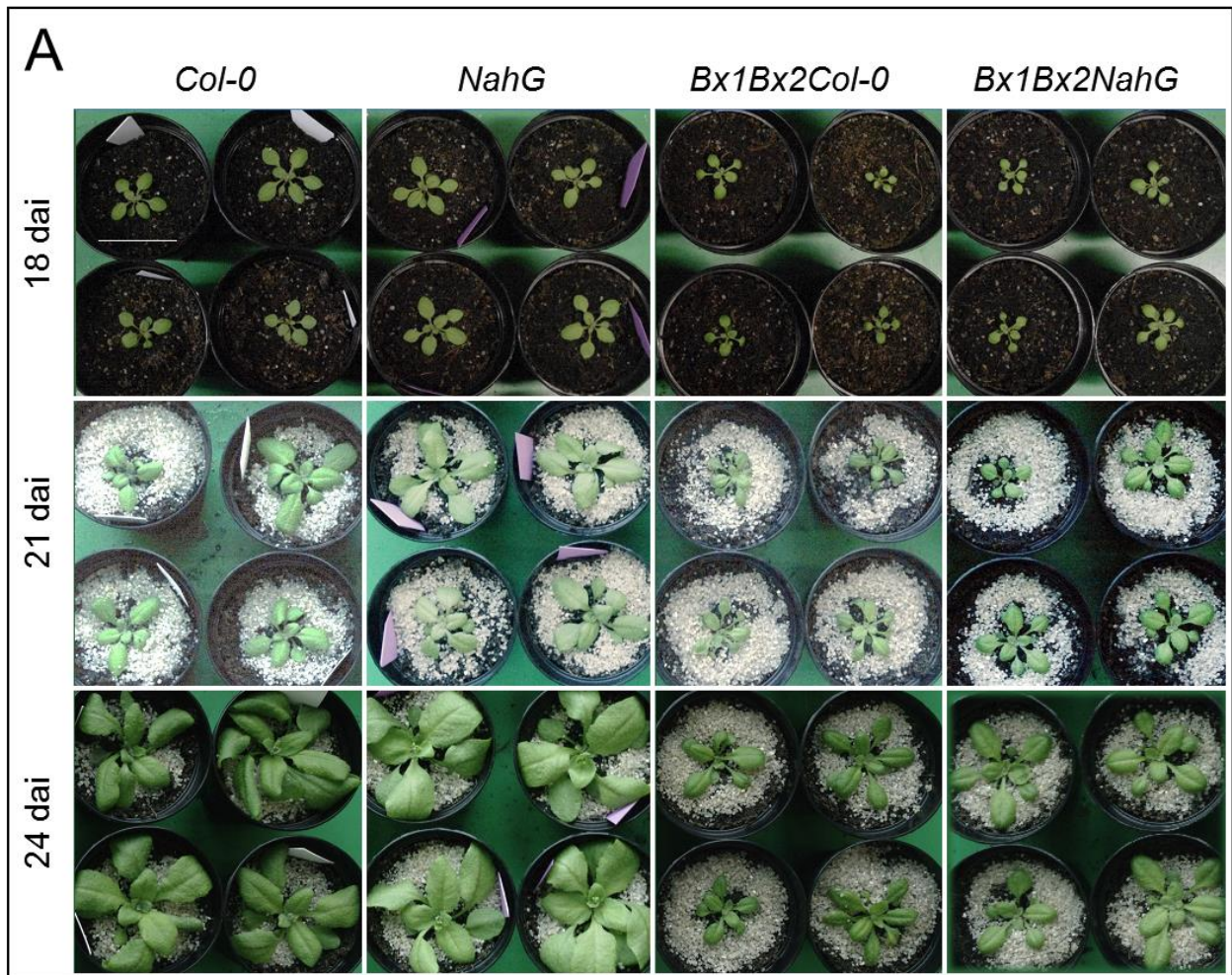


Abbildung 19: Phänotyp transgener Arabidopsis mit unterschiedlicher Indolinon- und SA-Akkumulation in verschiedenen Entwicklungsstadien (18, 21 und 24 dai). A Phänotypen repräsentativer Vertreter der Genotypen *Col-0*, *NahG*, *Bx1Bx2Col-0*, *Bx1Bx2NahG*, Werte für Indolinone und SA sind in Abbildung 20 angegeben. Sowohl *Bx1Bx2Col-0* als auch *Bx1Bx2NahG* Pflanzen sind zu allen Zeitpunkten zierlicher als die Kontrollen und die Entwicklung ist verzögert (Blühzeitpunkt). B Bestimmung des Rosettendurchmessers für *Col-0* und die transgenen *Bx1Bx2Col-0* und *Bx1Bx2NahG*. Für alle Zeitpunkte ergeben sich signifikante Unterschiede zwischen den Transgenen und *Col-0*. Ab 21 dai zeigt sich ein signifikanter Unterschied auch zwischen *Bx1Bx2Col-0* und *Bx1Bx2NahG*. Die SA-freie Pflanze hat einen intermediären Phänotyp. Die Werte wurden für je 14-15 Pflanzen 18 (dunkelgraue Balken), 21 (mittelgraue Balken) und 24 dai (hellgraue Balken) bestimmt. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung, Asterisks den p-Wert des t-Tests, \* $<0,05$ ; \*\* $<0,01$ ; \*\*\* $<0,001$ ; ns nicht signifikant.

### 3.3.3 Einfluss der Indolinone auf das SA-Signalling

SA vermittelt basale und systemisch erworbene Resistenz (Systemic Acquired Resistance, SAR; Vlot et al., 2009). Die SA-Konzentrationen erhöhen sich sowohl lokal als auch in systemischen Gewebe nach Pathogeninfektion (Malamy et al., 1990; Métraux et al., 1990). Indikativ für die SA-vermittelte Stressantwort der Pflanzen ist *PR1*. Dieses Markergen für pflanzliche Abwehr war, korrelierend mit erhöhten SA-Werten in gesteigerten Mengen in den jeweiligen transgenen Pflanzen vorhanden (Abbildung 18). Neben SA spielt 1-Hydroxy-2-Piperidincarbonsäure (NHP, N-hydroxypipicolinic acid) eine Rolle in basaler Immunität und SAR. Der letzte Schritt der Biosynthese erfolgt durch die Flavinmonooxygenase *FMO1*. *FMO1* stellt ein Markergen für SA-unabhängige SAR dar. SA und NHP-Biosynthese sind miteinander über gemeinsame regulatorische Gene (*SARD*, *CBP60g*) und Feedback-Mechanismen verbunden (Sun et al., 2020). Das Transkriptmuster von *FMO1* entsprach in den Transgenen dem von *PR1*. Insbesondere war *FMO1* in den *Bx1Bx2NahG*-Pflanzen nur in geringer Menge vorhanden was zeigt, dass der durch Indolinone erzeugte Stress überwiegend spezifisch Auslöser für SA-Akkumulation ist. Um zu untersuchen, auf welcher Ebene erhöhte Indolinon-Konzentration die SA-Homöostase beeinflusst, wurden die Transkriptmengen des Schlüsselenzyms der Biosynthese (Isochorismatsynthase 1, *ICS1*), des Katabolismus (Salicylsäure-3-hydroxylase, *S3H*, ) und der regulatorischen Gene (*SAR-deficient 1*, *SARD*, *AT1G73805*; *Calmodulin binding protein 60-like g*, *CBP60g*) in den verschiedenen Genotypen mit qPCR bestimmt (Abbildung 20). In den beiden *NahG*-exprimierenden Pflanzen *NahG* und *Bx1Bx2xNahG* war die *SARD*-Transkriptmenge unter der Nachweisgrenze. Gleichzeitig waren sowohl *ICS1* als auch *S3H* nur in Konzentrationen im Bereich des Kontrollwertes vorhanden, d.h. die Transkriptmengen dieser drei Gene war abhängig von der Präsenz von SA und unabhängig von Indolinonen. Dagegen war die *CBP60g*-Transkriptkonzentration in allen Genotypen ähnlich und lediglich für *Bx1Bx2* signifikant höher als in *Col-0*, ein offensichtlicher Zusammenhang mit der Indolinon-

Biosynthese war nicht ersichtlich.

SA Anreicherung hatte einen reziproken Effekt auf die Synthese von 5HIONG. Wie oben erwähnt kann 5HIONG mengenmäßig nicht bestimmt werden und jeweils nur die Peakfläche ausgemessen werden. Wurden die Peakflächen von 5HIONG und ION zueinander ins Verhältnis gesetzt (HPLC-UV bzw. LC-MS Analysen) ergab sich in *Bx1Bx2* ein Verhältnis größer 1, in *Bx1Bx2xNahG* ein Verhältnis kleiner 1. Das Ergebnis legte nahe, dass die Metabolisierung von ION in Anwesenheit von SA verstärkt wurde (Abbildung 21A). Diese Interaktion wurde durch Fütterung *Col-0* und *NahG*-Pflanzen mit ION bestätigt (Abbildung 21B). *Col-0*-Pflanzen hatten einen signifikant höheren Anteil an 5HIONG. Auch in der *fmo1*-Mutante, die analog untersucht wurde war die Synthese von 5HIONG reduziert (Tabelle 13). Ob dies mit verringerter Biosynthese von NHP zusammenhängt oder durch Wechselwirkung von SA und NHP bedingt ist bleibt unklar.



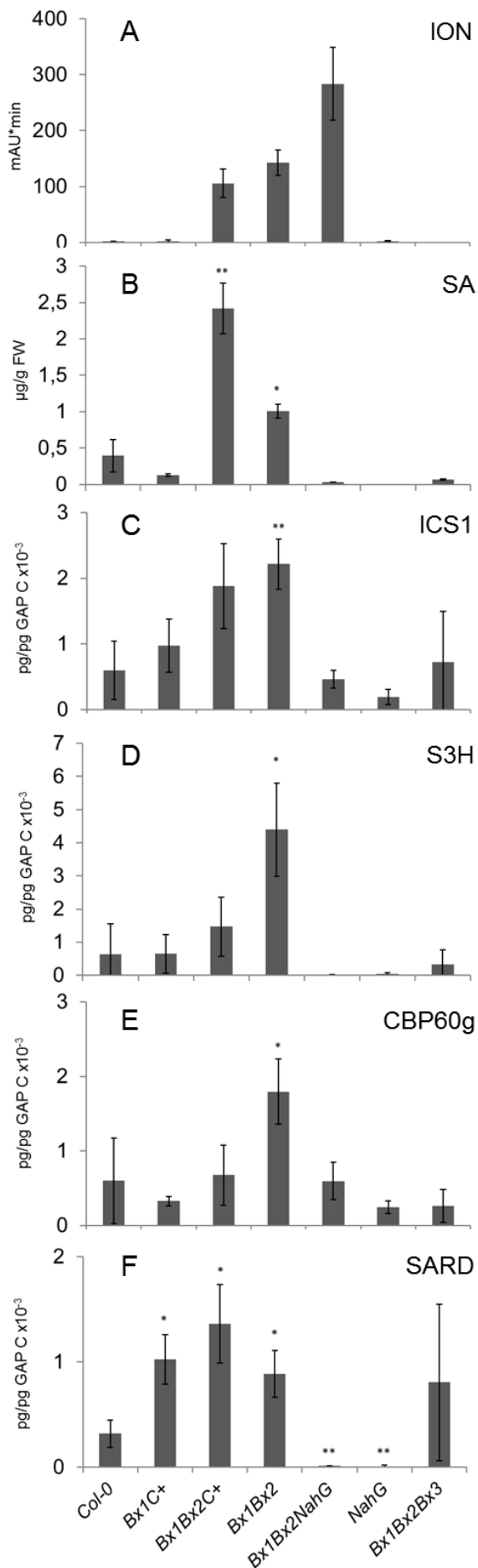


Abbildung 20: Transkriptkonzentration von Genen der SA-Biosynthese (Isochorismatsynthase 1; ICS1), des Katabolismus (SA 3-hydroxylase; S3H) und regulatorischer Gene (Calmodulin Binding Protein 60-like g; CBP60g und SAR Deficient 1; SAR1). A, B Zum Vergleich sind die Werte von der ION (Signalintensitäten) und SA Konzentration angegeben. Expressionslevel der Gene sind normalisiert auf die Transkriptmengen von *GAP C*. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung für drei unabhängige Replikate an. Die Asterisks geben den p-Wert des t-Tests an gegen Col-0 an, \* $<0,05$ , \*\* $<0,00625$ , \*\*\* $<0,001$ .

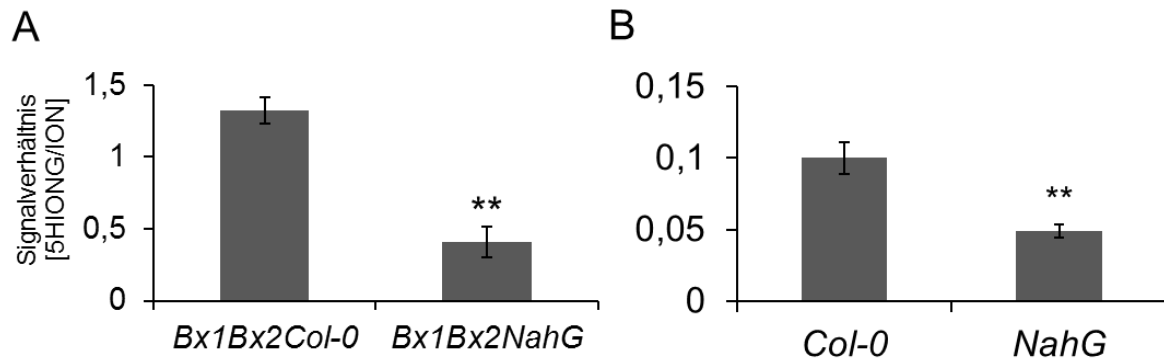


Abbildung 21: Verhältnis von 5HIONG zu ION in transgenen und ION-gefütterten Pflanzen. A Verhältnis in transgenen Pflanzen mit hoher Konzentration von Indolinonen in Gegenwart von SA (Bx1Bx2Col-0) und in Abwesenheit von SA (Bx1Bx2NahG). B Verhältnis bei Fütterung von ION zu *Col-0* und der NahG-exprimierenden Pflanze. Die Konzentration von ION ist in den Transgenen lag bei  $9,8 \pm 4 \mu\text{mol/g TG}$  und bei Fütterung  $3,6 \pm 0,6 \mu\text{mol/g TG}$ . Die Werte von zwei Wiederholungen mit je 5 Pflanzen sind dargestellt. Mit Asterisks sind p-Werte des t-Tests angegeben \* $<0,1$  und \*\* $<0,01$ .

### 3.3.4 Einfluss von Indolinonen auf die Resistenz gegenüber Phytopathogenen

Da in transgenen Pflanzen eine Korrelation der Biosynthese von Indolinonen und Anreicherung von SA gefunden wurde, stellte sich die Frage ob in den Transgenen die basale und systemische Resistenz verändert war. Es wurden zwei biotrophe Pathogene *Erysiphe cruciferarum* und *Pseudomonas syringae pathovar tomato* für Untersuchungen ausgewählt.

Um die Grundresistenz gegen Pilzbefall zu evaluieren wurden die Linien *Col-0*, Bx1Bx2, NahG und Bx1Bx2xNahG (30 dai, angezogen unter Kurztagbedingungen) mit *Erysiphe cruciferarum* inokuliert. Sieben Tage nach Inokulation mit  $1,5-7 \text{ Sporen} \cdot \text{mm}^{-2}$  (siehe 2.2.12.2) wurden je 10 Blätter beginnend mit den äußersten Rosettenblättern der infizierten Pflanzen geerntet, in Fixierlösung entfärbt und anschließend die Pilzhyphen mit Tinte gefärbt wie von Ried et al. (2019) beschrieben (2.2.12.2). Die Analyse wurde in 3 unabhängigen Blöcken mit je vier Ansätzen pro Genotyp durchgeführt (12 biologische Replikate). Die Evaluierung geschah optisch (Abbildung 22). Der Befall variierte abhängig vom Entwicklungszustand der Pflanzen und robuste genotypspezifische Unterschiede wurden nicht erhalten.

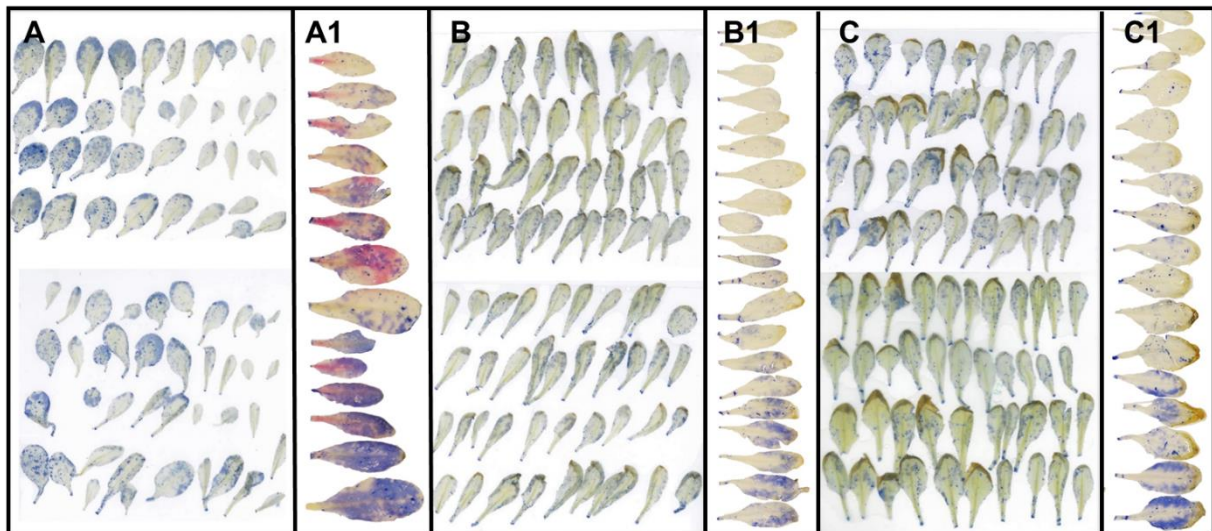


Abbildung 22: Infektion verschiedener Genotypen durch *Erysiphe cruciferarum*. A *Col-0*; B *Bx1Bx2*; C *Bx1Bx2NahG*. Pflanzen wurden mit *E. cruciferarum* inokuliert und 7 Tage nach Infektion analysiert. Nach Fixierung und Entfernung des Chlorophylls wurden Pilzhyphen durch Färbung mit Tinte sichtbar gemacht. Drei unabhängige Inokulationen wurden durchgeführt und je von 4 Pflanzen 10 (A, B, C), bzw. 3 (A1, B1, C1) äußere Rosettenblätter untersucht.

Um eine quantitative Aussage über das Ausmaß des Pilzbefalls zu erhalten, wurde eine relative Quantifizierung von Pilzgenom zu Pflanzengenom durch qPCR-Amplifikation von spezifischen Genen vorgenommen (nach Reiner *et al.*, 2015; 2.2.12.2). Dazu wurden je vier Pflanzen (27dai, Anzucht im Kurztag) pro Genotyp (*Col-0*, *Bx1Bx2xCol-0*, *Bx1Bx2NahG*, *NahG*) in drei Versuchen mit *E. cruciferarum* mit einer Sporendichte von  $4 - 18 \text{ mm}^{-2}$  inokuliert. Da *Bx1* und *Bx2* exprimierende Pflanzen sich langsamer entwickelten als *Col-0*- und *NahG*-Pflanzen (siehe 3.3.1) wurden außerdem 23 dai *Col-0* als fünfte Gruppe von Pflanzen verwendet um entwicklungs- bzw. altersbedingte Unterschiede der Anfälligkeit gegenüber dem Pilz in einer weiteren Kontrolle zu prüfen. Wie zuvor wurden 10 Blätter pro Pflanze fünf und sieben Tage nach Inokulation mit dem Pilz geerntet. Das Material wurde mit Stickstoff eingefroren und anschließend unter Stickstoff durch Mörsern homogenisiert. Von einem Aliquot wurde die DNA extrahiert. Als pilzspezifisches Gen diente *E. c.  $\beta$ -Tubulin* und als pflanzenspezifisches die Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase-Untereinheit *AtRBCS1A*. Die Quantifizierung der  $\beta$ -*Tubulin*-Konzentration wurde mit der  $\Delta\Delta\text{Ct}$  Methode durchgeführt. Die Werte wurden relativ zu *AtRBCS1A* in 28dai *Col-0* Pflanzen berechnet. Zwischen Replikaten schwankten die Werte und es konnte kein eindeutiger Effekt festgestellt werden, der auf Unterschiede im ION- oder SA-Gehalt der Genotypen zurückzuführen gewesen wäre (Abbildung 23). Ein Einfluss von Indolinonen auf die basale Resistenz gegenüber *E. cruciferarum* als Vertreter biotropher Pathogene konnte nicht festgestellt werden. Entgegen der Erwartung war auch für die SA-freien *NahG*-Pflanzen kein signifikanter Unterschied in der Anfälligkeit erkennbar.

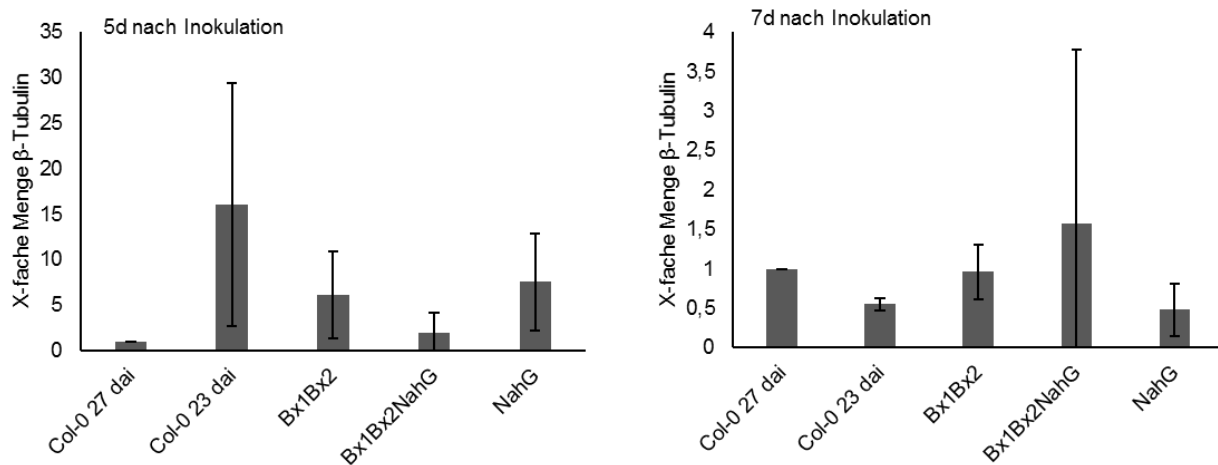


Abbildung 23: Quantitative Analyse der *E. cruciferarum* Infektion durch qPCR-Analyse. Drei Blöcke mit je 4 Pflanzen jedes Genotyps (27 dai) wurden 5 und 7 Tage nach Inokulation analysiert. Parallel wurden *Col-0* Pflanzen 23 dai verwendet. qPCR wurde für die Mengenbestimmung der *E. cruciferarum*  $\beta$ -Tubulin-mRNA und Arabidopsis Rubisco-mRNA (*AtPBCS1A*) eingesetzt. Das Verhältnis wurde mit der Delta-Delta Ct- Methode bestimmt. Gezeigt sind die Werte bezogen jeweils auf den Wert von *Col-0*, 27 dai. Signifikante Unterschiede für die unterschiedlichen Genotypen konnten nicht festgestellt werden.

Um den Einfluss von Indolinonen auf die systemische erworbene Resistenz zu bestimmen, wurde der etablierte SAR-Assay mit *Pseudomonas syringae* (Stamm DC3000) eingesetzt (Wenig et al. 2019). Neben *Col-0* wurden die Mutanten *fmo1* (s. o.) und die SA-freie Biosynthesemutante "*salicylic acid induction deficient 2*" (*sid2*, Mutation in *ICS1*, s. 3.3.3) in die Analyse einbezogen. In die ersten beiden Blätter dieser Linien wurde 1mM ION infiltriert. Kontrollen wurden jeweils parallel mit Puffer behandelt. Drei Tage nach der ION Behandlung wurde *P. syringae* (Stamm DC3000) in die beiden nachfolgenden systemischen Blätter inokuliert. Vier Tage nach Inokulation wurde der Bakterientiter bestimmt (siehe 2.2.12.1). Der Versuch wurde in zwei unabhängigen Wiederholungen ausgeführt. Das Bakterienwachstum war nach ION-Behandlung gegenüber der Kontrolle im Wildtyp signifikant gehemmt. Die Mutanten *sid2* und *fmo1* betreffen unterschiedliche Signalwege der SAR. SA-freie *sid2* Pflanzen zeigen keinen Unterschied zwischen ION und Pufferapplikation (Abbildung 24). SAR Induktion mit Indolinonen war also abhängig von der Gegenwart von SA. In der *fmo1*-Mutante war das Bakterienwachstum im gleichen Umfang gehemmt wie im Wildtyp. Indolinone haben also keinen Einfluss auf die durch NHP-vermittelte SAR, sondern wirken mittelbar über Steigerung des SA-Gehalts. Die Expression des BX Biosynthesewegs in

Arabidopsis führte durch die Akkumulation von Intermediaten zu einer Pathogen-Stressantwort, die SAR auslöst, jedoch die basale Resistenz nicht steigert.

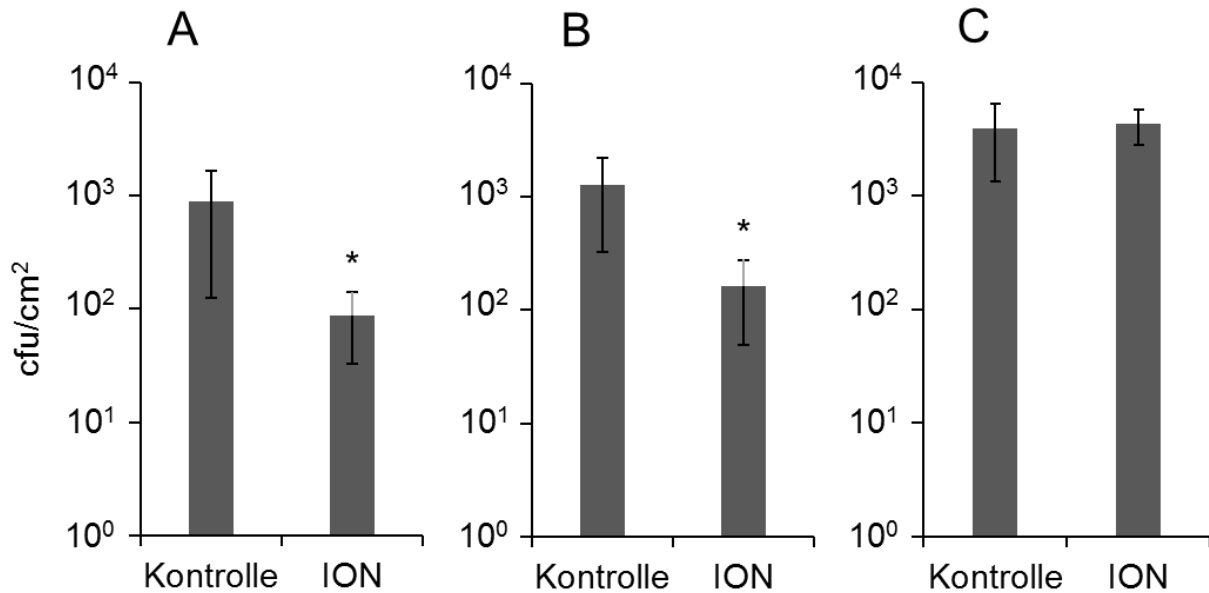


Abbildung 24: *Pseudomonas syringae* Titer in systemischen Blättern nach ION-Applikation. Wildtyppflanzen *Col-0* (A), *fmo1*-Mutante (B), *sid2* Mutante (C) wurden analysiert. Drei Tage nach Infiltration von 1 mM Ion oder Puffer als Kontrolle wurden die systemischen Blätter mit *P. syringae* (Stamm DC3000) inokuliert. Vier Tage später wurde der Titer von *P. syringae* bestimmt. Mit Asterisks sind die p-Werte im t-Test angegeben \* < 0,05

## 4 Diskussion

### 4.1 Transgene Hefe ist ein funktionierendes Expressionssystem zur Analyse einzelner BX-P450-Enzyme, eine Interaktion konnte nicht nachgewiesen werden

Ziel des Projekts war es in einer Pflanze (*Arabidopsis*) zwei unterschiedliche Abwehrstoffklassen zu synthetisieren, den endogenen Metaboliten (GS) und eine pflanzliche Abwehrchemikalie (BX) die in anderen Spezies (Gräsern) analoge Schutzfunktion hat. Transgene Hefe wurde als leicht zugängliches System eingesetzt um die Funktionalität der erstmals in dieser Arbeit eingesetzten modifizierten Sequenzen der P450 von Bx2-Bx5 zu verifizieren.

Die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* stellt ein leicht handhabbares eukaryotisches Modellsystem dar. Modifizierte Hefe mit induzierbarer P450-Oxidoreduktase (ATR1) ist ein klassisches System für die heterologe Expression von P450 Enzymen (Urban *et al.*, 1990). Für die enzymatische Analyse von P450-Enzymen ist von Vorteil, dass Hefe nur drei endogene P450 besitzt, von denen zwei die Zwischenschritte in der Ergosterolbiosynthese katalysieren (Nelson, 2018) und damit keine Konkurrenz für die Biosynthese von pflanzlichen Sekundärmetaboliten darstellen. Die jeweilige enzymatische Funktion der durch modifizierte Gene codierten Enzyme BX2-BX5 wurde bestätigt. Hefe wurde auch eingesetzt, um den Einfluss der homologen P450-Oxidoreduktase (*ZmPOR1*, *ZmPOR2*) auf die Aktivität der P450 zu untersuchen. Für *Arabidopsis* wurde gezeigt, dass sich für spezifische Reaktionen die Effizienz der beiden Enzyme ATR1 und ATR2 zur Vermittlung der eingebundenen P450-Enzymaktivität unterscheidet (Sundin *et al.*, 2014). Um auszuschließen, dass von BX-P450-Enzymen katalysierte Reaktionen aufgrund unzureichender Interaktion mit der heterologen POR limitiert sind, wurden zwei Mais PORs identifiziert, kloniert und ihr Einfluss auf die Hydroxylierungen in Hefe analysiert. *Arabidopsis*- und Mais-PORs unterscheiden sich, die Identität auf Aminosäureebene beträgt für die beiden relevanten, in der jungen Maispflanze exprimierten *ZmPORs* verglichen mit ATR1 ca. 67%. Es ergab sich dennoch kein signifikanter Unterschied in der P450-Aktivität bei Einsatz der heterologen oder homologen *ZmPORs* (Abschnitt 3.1.2, Tabelle 12).

In Hefe sind Mehrfachtransformationen durchführbar, so konnte z.B. eine ganze pflanzliche Signalkaskade in Hefe nachgebildet werden (Ruschhaupt *et al.*, 2019). Analog wurde mit PB85243 auch eine transgene Hefe erzeugt, die bis auf Bx1 die Gene des gesamten BX-Biosynthesewegs und zusätzlich *ZmPor2* trägt (Tabelle 3). Nachfolgend wurde der gesamte BX-Biosyntheseweg in Hefe transformiert (Linie BxY). Weder mit PB85243 nach Zugabe des BX1 Produkts Indol noch mit BxY konnte GDIBOA-Biosynthese nachgewiesen werden, obwohl bei PB85243 alle Einzelreaktionen in Mikrosomen (BX2-BX5, Tabelle 14) oder im

Zytosol (BX8, Anhang 5) erfolgten. Die Metabolitenanalyse zeigte, dass die Hydroxylierung von Indol in der Hefe nicht effektiv ist. Bei Indol-Fütterung erhöht sich die Tryptophan-Konzentration und in den *Bx1*-exprimierenden transgenen Hefen treten wahrscheinlich von Indol abgeleitete Metaboliten, auf (Abbildung 4, Abbildung 6). Als weiterer kritischer Punkt wurde die Toxizität von Indolinon erkannt (Abbildung 5). Beide Hindernisse für effektive transgene BX-Biosynthese in Verbindung mit dem Eingangsmetaboliten ION wurden nachfolgend auch für Arabidopsis evident.

Das Hefesystem ist geeignet mögliche Änderungen katalytischer Daten isoliert und gemeinschaftlich vorliegender Enzyme zu bestimmen, da das heterologe mikrobielle System besser als z.B. die Expression in Pflanzen, einen gleichbleibenden Hintergrund bietet. Es standen parallel zu den P450-*ZmPor*-Einzeltransformanten, P450-Doppeltransformanten und mit PB5243 eine Hefe zur Verfügung die alle Gene exprimiert, die potentiell zu einem „Metabolon“ beitragen: die vier P450, die UGT BX8 und die Mais-POR. Die POR dient als mögliche Nukleationsstruktur für die Verankerung im ER.

In der paarweisen Analyse von in der Biosynthesekette aufeinander folgender Enzyme in den Hefen konnten nur geringe Veränderungen des  $K_m$ -Wertes im Vergleich mit Einzeltransformanten nachgewiesen werden (Tabelle 13). Allerdings ist nicht gewährleistet, dass die untersuchten Enzyme in adäquaten Mengenverhältnissen vorliegen um Assoziation, Änderung der katalytischen Daten und schließlich GDIBOA-Biosynthese zu ermöglichen. Durch die Induzierbarkeit der POR und transgener P450-Gene wird eine hohe Konzentration der untersuchten Enzyme gewährleistet, die Stöchiometrie von Coenzym und P450 könnte bei paralleler Expression von mehreren P450 aber gestört und die Effizienz der Reaktion beeinträchtigt sein, sodass nicht genügend Substrat entlang des Biosynthesewegs gebildet wird. Analysen mehrerer P450 parallel in Hefe wurden bisher soweit bekannt nicht publiziert und systematische Untersuchungen dazu wurden bisher nicht gemacht.

#### **4.2 Transgene GDIBOA Biosynthese in Arabidopsis ist möglich**

Die Biosynthese des BX DIBOA und seine Glucosylierung erfordert das Zusammenspiel von sechs Enzymen, die koordinierte transgene Expression der Gene *Bx1-Bx5* und *Bx8*. Die vollständige Etablierung des Biosynthesewegs kann nach Transfer der einzelnen Gene durch Kreuzung oder durch sukzessive Transformation erfolgen. Beide Verfahren werden bei großer Anzahl von Genen durch das Fehlen alternativer Selektionsmarker erschwert. Deshalb wurde z. B. die Methode der Expression polycistronischer Sequenzen, basierend auf Virensystemen, etabliert (Donnelly *et al.*, 2001). Dieser Ansatz war für den *Bx*-Gentransfer nicht erfolgreich (Lenk, 2015). Um den Transfer zu erleichtern wurden deshalb die vier P450-Gene in einer T-DNA vereinigt (Cluster). Damit konnte die Anzahl der erforderlichen T-DNA-Transfers auf vier (*Bx1*, *Cluster*, *Bx8*, *ZmPor2*) reduziert werden. Die

Gene wurden an den Arabidopsis-Codon-Gebrauch angepasst der, wie der von Hefe, eine Präferenz für A/T Codons aufweist. Durch Expression in Hefe (s. o.) wurde die prinzipielle Funktionalität dieser angepassten Gene gezeigt. Mit transgener Arabidopsis, die alle Gene der BX-Biosynthese ausprägte (Bx1C+) konnte erstmals heterologe BX-Biosynthese nachgewiesen werden. Die Konzentration war allerdings mit 3,7nmol/g TG äußerst gering. Beispiele heterologer Biosynthesewege zeigen, dass es keine prinzipielle Limitierung bei der Ausbeute fremder Biosyntheseprodukte gibt. Sowohl für die CG-Biosynthese in Arabidopsis (Tattersall *et al.*, 2001) als auch für die GS-Biosynthese in *Nicotiana tabacum* (Møldrup *et al.*, 2012) wurden Konzentrationen der Metabolite im Bereich der Ursprungspflanzen erreicht und diese lagen zwischen 0,5 µmol/g FG (GS in *N. tabacum*, 3-7 µmol/g FG *Brassica oleracea*) und 13 µmol/g FG (Dhurrin in Arabidopsis, entspricht dem Wert in *Sorghum bicolor*). Gründe für die geringe BX-Biosyntheserate können niedrige Enzymkonzentrationen, die Verfügbarkeit von Substraten und Abzug von Intermediaten aus dem Biosyntheseweg durch endogene Konkurrenzreaktionen sein.

Ausschlaggebend für die Genexpression ist die Wahl des Promoters. Expressionsrate und Verteilungsmuster müssen passend zur Genfunktion sein, also in relevanten Geweben erfolgen. BX-produzierende Pflanzen weisen den Sekundärmetaboliten in verschiedenen Pflanzenteilen und in unterschiedlichen Entwicklungsstadien vom Keimling bis zur Blüte auf (Tabelle 23). Für die bisher isolierten BX-Gene der Gräser, Ranunculaceae und Lamiaceae wurden Expressionsraten im Bereich von Housekeeping-Genen beschränkt auf BX-enthaltenden Geweben nachgewiesen (Frey *et al.*, 1997; Grün *et al.*, 2005; Schullehner *et al.*, 2008; Dick *et al.*, 2012). Eine Sonderstellung nimmt die UGT Bx8/Bx9 ein, die auch in Geweben, die keine BX aufweisen hoch exprimiert ist. Dadurch wird die Bedeutung der Glukosylierung zur Reduzierung der Autotoxizität unterstrichen.



Tabelle 23: Verteilung der BX in verschiedenen BX produzierenden Pflanzen

Species	BX (Agklukon)	Gewebe/Organ	Level umol/g FG		
Maize	DIMBOA	Keimlingswurzel	13,0-19,0		
		Sprossbürtig Wurzeln	2,8		
		"Crown roots" adulte Pflanze			
		Keimlingsspross	13,0-19,0		
		Scutellum (3 dai)	5,7		
	HDMBOA, DIM2BOA, HDM2BOA*	Blatt, adulte Pflanze	n.d		
		Maiskorn	n. d.		
		Pathogen/Herbivor-induziert	0,05-10**		
		<i>Consolida orientalis</i>	DIBOA	Wurzel (Keimling, junge Pflanze)	n.d.
				Keimblätter (Keimling, junge Pflanze)	0,2
junge Blätter, adulte Pflanze	24,0				
alte Blätter, adulte Pflanze	17,0				
Blütenknospen	34,0				
Blüten	36,0				
<i>Lamium galeobdolon</i>	DIBOA	junge Adventivwurzeln	1,1		
		junge Blätter	19,0		
		alte Blätter	17,0		
		Blütenknospen	7,7		
		Blüten	5,0		
		<i>Aphelandra squarrosa</i>	DIBOA ***	Wurzel <1 - 5 cm	0,032-0,042
Wurzel 10 cm, Spitze	0,150				
Wurzel 10 cm, Seitenwurzel	0,058				
Wurzel 10 cm, ohne Spitze und Seitenwurzel	0,064				

Daten aus Schullehner et al.

\* Meihls et al., Handrick et al.

\*\* lokale Konzentration nicht bestimmt

\*\*\*DIMBOA zwischen n.d. und 0,0004 umol/g FG

n.d. nicht nachweisbar

Da die Expression der *Bx*-Gene mit dem konstitutiven Standardpromoter *p35S* nicht erfolgreich war (Lenk, 2015) und um die Gefahr des "Gene Silencings" durch mehrfachen Einsatz des gleichen Promoters zu vermeiden wurden alternative Promotoren gesucht, die eine angemessen moderate bis hohe Expression in Blattgewebe vermitteln. Dies würde dem Muster in *L. galeobdolon* entsprechen. Vorarbeiten hatten gezeigt, dass hohe Expression von *Bx1* und *Bx2* in Arabidopsis zu Zwergwuchs, insbesondere aber auch zu männlicher und weiblicher Sterilität führt. Deshalb war geringe Expression in der Blüte ein weiteres Kriterium der Promoterauswahl. Auf dieser Basis wurden Promotoren der GS-Biosynthese ausgewählt (Abbildung 7). Die mit diesen Promotoren als Treiber erhaltenen Transkriptmengen lagen auf dem Niveau des Housekeeping Gens *Gap C* (Abschnitt 3.2.3.2). Allerdings zeigten Analysen von Nintemann et al. (2018) auf Zellebene, dass sich die Expressionsmuster der aliphatischen und indolischen GS Biosynthesegene in Arabidopsis überschneiden, aber unterschiedliche Verteilungsschwerpunkte in den Geweben aufweisen. In „Cluster“ wird *Bx3* vom Cyp83A1-Promoter kontrolliert, dem Markerenzym der aliphatischen GS Biosynthese. Andere *Bx*-Gene in „Cluster“ stehen unter der Kontrolle von Promotoren der Biosynthesegene von indolischen GS. Die Expression der *Bx*-Gene im Cluster überlappt daher nicht in allen Zellen und es zeigte sich, dass insbesondere die Expression von *Bx3* kritisch ist (s. u.). Da in den Analysen der transgenen Pflanzen das Aglukon nicht

nachweisbar ist (Tabelle 16), kann davon ausgegangen werden, dass die *Bx8*-Expression ausreichende UDP-DIBOA-Glukosyltransferase-Aktivität gewährleistet. Für *Bx1* stand ein Set von Konstrukten mit unterschiedlich starken Promotoren zur Verfügung; nur bei Einsatz der starken Promotoren *p35S* und *pSUR2* war GDIBOA nachweisbar (Tabelle 17).

Im Fall der GS Biosynthese in *N. tabacum* wurde eine starke Begrenzung der Syntheserate durch die Versorgung mit Kosubstraten erkannt. Eine Anpassung des Schwefelmetabolismus in *N. tabacum* konnte diesen Engpass beseitigen (Møldrup *et al.*, 2011; Petersen *et al.*, 2018). In der BX-Biosynthese kann die direkte Konkurrenz mit dem Primärstoffwechsel, der Tryptophan-Biosynthese (Abbildung 25), limitierend sein. Untersuchungen mit Maismutanten zeigten, dass beide Biosynthesewege konkurrieren: fällt die BX-Biosynthese in Mutanten aus, erhöht sich die Konzentration freien Tryptophans (Tabelle 18, persönliche Mitteilung JE Brotherton). In Transgenen mit substantieller GDIBOA-Biosynthese (*Bx1Bx3C+*, *Bx1Bx2Bx3C+*) reduziert sich der TRP-Gehalt ebenso signifikant (Tabelle 18). Das weist darauf hin, dass BX eine wesentliche Ressourcensenke darstellen. Mit Isotopenmarkierungsexperimenten (Tabelle 19) wurde ausgeschlossen, dass die Konkurrenz beider Biosynthesewege durch eine Kanalisierung von durch BX1 synthetisierten Indols zu BX2 beeinflusst wird. Verglichen mit dem Maiskeimling ist die Tryptophankonzentration in Arabidopsis Rosettenblättern gering (Tabelle 18) und damit ist möglicherweise eine stärkere Limitierung für indolbasierte Biosynthesen gegeben. Allerdings werden für die transgen gebildeten Indolinone Konzentrationen von bis zu 70 µmol/g TG (Tabelle 18) erhalten. In diesen Pflanzen ist jedoch die Pflanzenmasse reduziert (siehe Abbildung 14) so dass eine Begrenzung der metabolischen Kapazität bei wildtypischer Morphologie nicht ausgeschlossen werden kann.

Um Flaschenhalse in der transgenen GDIBOA-Biosynthese zu identifizieren wurden alle Substrate in Fütterungsexperimenten eingesetzt und eine systematische Überexpression aller P450-Enzyme durch Einkreuzen der individuellen *p35S*-Konstrukte vorgenommen. Mit der Erhöhung und Ausweitung der *Bx3*-Expression als wesentlicher Komponente wurde in Verbindung mit paralleler Steigerung der *Bx2*-Expression die GDIBOA-Konzentration in den unteren in Roggenblättern gefundenen Bereich von rund 200 nmol/gTG geschoben (Tabelle 18).

#### **4.3 Limitierung der BX-Biosynthese durch Modifikation des Intermediats ION**

Die Sonderstellung der BX3-Reaktion für die DIBOA-Biosynthese besteht darin, dass der Abzug des BX-Substrats ION über Metabolisierung durch endogene Enzyme der wesentliche Faktor für die Limitierung der BX-Biosynthese war. *Bx1 Bx2* und *Bx1Bx2C+* exprimierende Pflanzen weisen parallel zu hohen Konzentrationen von ION den Metaboliten 5HIONG auf (Tabelle 18, Abschnitt 3.2.3.3) dessen Identität in Analysen von Timo Stark und Thomas

Hoffmann aufgedeckt wurde. Während sich der ION-Gehalt in der Arabidopsis-Entwicklung bis zur dritten Wachstumswoche verdoppelt, dann abnimmt und in der seneszenten Pflanze nicht mehr nachweisbar ist, nimmt die Konzentration von 5HIONG mehr als zehnfach zu und ist auch in der seneszenten Pflanze noch hoch konzentriert. 5HIONG ist also ein stabiler Metabolit (Abbildung 12). Für ein weites Spektrum von Pflanzenspezies, einschließlich monokotyler und dikotyler Pflanzen konnte gezeigt werden, dass ION ebenfalls schnell metabolisiert wird. Obwohl der molekulare Nachweis nicht geführt wurde, legen alle Daten in LC-MS- und NMR-Analyse nahe, dass zunächst durch Hydroxylierung und anschließende Glycosylierung jeweils 5HIONG gebildet wird (Abbildung 11, Abbildung 25). Diese Abfolge für die Metabolisierung von ION scheint in Pflanzen vorgegeben zu sein und könnte auf ubiquitärer Verbreitung hydroxylierter Indolverbindungen zurückzuführen sein. Freies Indol wird in mikrobiellen Systemen über die Tryptophanase gebildet, in Pflanzen ist es als generell nicht freigesetztes Produkt der TSA nicht in substantiellen Mengen verfügbar. Es wurde aber gezeigt, dass der Übergang zwischen funktionellen TSA und BX1-Enzymen, die freies Indol synthetisieren fließend sein kann und in Pflanzen liegen oft mehrere zu TSA homologe Gene vor (Schullehner *et al.*, 2008). In der Tat wird volatiles Indol in Pflanzen oft als Botenstoff eingesetzt und fungiert durch Priming in der Abwehr (Erb *et al.*, 2015; Shen *et al.*, 2018). Auch eine Funktionalisierung von Indol findet in Pflanzen statt. Prominentes Beispiel eines hydroxylierten Indolmetaboliten ist Indigo bzw. Indican oder Isatin. Es wurde angenommen (Maier *et al.*, 1990) und kürzlich z. B. für *Polygonum tinctorium* gezeigt, dass freies Indol Substrat der Hydroxylierung sein kann. In diesem Fall wird die Hydroxylierung durch eine flavinabhängige Monooxygenase katalysiert (FMN, Inoue *et al.*, 2021). Die Stabilisierung erfolgt durch Glukosylierung und eine Funktion in der Abwehr wird postuliert, die analog zu anderen Systemen durch Bildung des Aglukons aktiviert wird. Die Biosynthese und biologische Aktivität hydroxylierten Indols insbesondere von 5HION wurde auch in tierischen Systemen nachgewiesen (Beckett und Morton, 1966; Crumeyrolle-Arias *et al.*, 2008). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Fütterungsversuche mit ION haben ebenfalls ein breites Wirkspektrum gezeigt, da das Wachstum von Pflanzen und Hefe reduziert wurde. In Pflanzen wird die Metabolisierung des "Xenobiotikums" einheitlich im wesentlichen durch P450-Enzyme ausgeführt (3.2.3.3). Durch Hemmung wurde eine wesentliche Beteiligung von oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen ausgeschlossen (Abbildung 13). Die Hydroxylierung durch FMNs wurde zwar nicht experimentell überprüft, der Anteil dürfte aber gering sein, da bei P450-Hemmung die Reduktion der 5HIONG Biosynthese mindestens 80% beträgt. Diese ubiquitär gefundene Hydroxylierung erfolgt im Gegensatz zur für BX- und Indigo-Biosynthese spezifischen Reaktion nicht am Heterozyklus sondern am aromatischen Ring. Sie ist besonders effizient in den Brassicaceen, die mit Indolglucosinolaten und Camalexin zwei von Indol abgeleitete Metabolite besitzen. Die

Beteiligung ausgewählter Kandidatenenzyme dieser Sekundärmetabolit-Biosynthesen bei der ION Hydroxylierung konnte durch Mutantanalyse ausgeschlossen werden. Wie tierische multifunktionelle P450-Oxygenasesysteme der Detoxifizierung könnte ein entsprechendes Enzymreservoir in Pflanzen parallel zu jeweils Biosyntheseweg-spezifischen P450 vorliegen. In Mais fehlen entsprechende Enzyme, denn die Menge an 5HIONG in der *bx3*-Mutante ist gering obwohl ION in substantiellen Mengen vorhanden ist (Tabelle 18). Die nachfolgende Glucosylierung erfolgt ebenfalls in einem weiten Pflanzenspektrum effizient und erfordert UGTs mit entsprechendem Substratspektrum.

#### **4.4 Schlüsselbedingungen für effiziente BX-Biosynthese**

ION ist in Mais nur in der *bx3*-Mutante nachweisbar, generell werden in wildtypischem Mais keine Intermediate der BX-Biosynthese detektiert. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass sich, wie für Sekundärmetabolit-Biosynthesen postuliert (Knudsen *et al.*, 2018), ein BX-Metabolon bildet, das Intermediate im Komplex einschliesst und den Flux auch durch allosterische Interaktion erhöht. Im *in vitro*-Ansatz mit Maismikrosomen werden alle Substrate effizient umgesetzt, es handelt sich also in jedem Fall nicht um ein völlig geschlossenes System (Frey *et al.*, 1997). Konzeptionell passend für die BX-Biosynthese wäre die für die CG-Biosynthese gefundene allosterische Aktivierung im letzten zur Toxizität des Produkts führenden Biosyntheseschritt (Kristensen *et al.*, 2005), d. h. in diesem Fall eine Interaktion von BX8 mit BX5. Dadurch würde eine Anreicherung des reaktiven Aglukons vermieden. In Mais konnte BX8-Aktivität mit isolierten Mikrosomen nachgewiesen werden, die Ergebnisse müssen aber verifiziert werden. In beiden heterologen Systemen, Arabidopsis und Hefe, wurde keine Assoziation von BX8 mit den BX-P450 gefunden (Anhang 5). Da alle biosynthesischen Gene und das Koenzym POR in Arabidopsis transferiert wurden, könnten hypothetisch bestehende Unterschiede in der Bildung von Metabolons in Gräsern (z.B. Mais) und Arabidopsis bedingt sein durch speziesspezifische Ausprägung spezifischer Domänen des ER, die Lipid-Umgebung und akzessorische Proteine, die chaperonartig Multienzymkomplexbildung unterstützen (Bassard und Halkier, 2018; Zhang und Fernie, 2021).

Die Sonderstellung von *Bx3* für die DIBOA-Biosynthese (Abbildung 25) kann durch Konkurrenz mit intrinsischen ION-modifizierenden P450 erklärt werden (s.o.). Da in Pflanzen eine große P450-Genfamilie existiert (rund 250 Gene in Arabidopsis) und Vertreter durch ihre Funktion in manigfaltigen Stoffwechselwegen (Phytohormon-Biosynthese, Phenylpropanoid-Biosyntheseweg, Lignin-Biosynthese, Camalexin-Biosynthese) präsent in allen Zellen sind, kann Konkurrenz um die ER-gebundene POR bestehen. Erhöhte BX3-Konzentration könnte allein über die Stöchiometrie die Konkurrenzreaktion der ION-5-Oxygenase verringern und Metabolitenfluss in Richtung BX-Biosynthese verschieben. Eine

weitere signifikante Steigerung der GDIBOA-Konzentration erfolgt, wenn parallel die *Bx2*-Expression erhöht wird (Tabelle 18). Die gleichzeitige Steigerung beider Enzymkonzentrationen könnte zu räumlicher Nähe, evtl. zur Assoziierung mit einer gemeinsamen POR führen und hypothetisch über Wechselwirkung von Indol-Hydroxylase BX2 und ION-Hydroxylase BX3 die Reaktion über die Verfügbarkeit des Substrats ION hinaus begünstigen. Da *Bx1Bx2Bx3* Pflanzen absolut nur 2% der in *Bx1Bx2*-Transgenen gebildeten 5HIONG Menge aufweisen, liegt die Vermutung nahe, dass die endogene Konkurrenzreaktion weitgehend ausgeschaltet wird.

#### **4.5 ION/5HIONG sind Stressmetaboliten mit Einfluss auf SA-Homöostase und den morphologischen Phänotyp**

Hohe Expression von *Bx1* und *Bx2* führt zu starken morphologischen Veränderungen (Abbildung 25) wie Zwergwuchs, Blattspitzenseneszenz und, bei Expression in der Blüte, zu männlicher und weiblicher Sterilität. Wurde *Bx1* mit dem weniger starken Promotor *pSUR2* exprimiert, war der Phänotyp milder (Abbildung 8, Abbildung 14; Anhang 2, Anhang 3). Die anschließende Überexpression von *Bx3* verringert wie beschrieben die Konzentration von ION/5HIONG mehr als 50-fach und der wildtypische Phänotyp wird vollständig wiederhergestellt. Die phänotypische Veränderung ist also verbunden mit dem Auftreten der in Arabidopsis ungewöhnlichen Metaboliten ION/5HIONG. Da aber ION von Arabidopsis sofort in 5HIONG metabolisiert wird und die Mengen von ION und 5HIONG korrelieren, konnte nicht geklärt werden, ob die beobachteten Veränderungen der Pflanzenmorphologie und Entwicklung durch ION oder 5HIONG verursacht werden. Bisher besteht keine Möglichkeit die Bildung von 5HIONG zu inhibieren. Synthetisches 5HIONG konnte nicht erworben werden, daher waren keine Experimente möglich, die eine direkte schädliche Wirkung des Metaboliten zeigen könnten.

Metabolischer Stress wirkt sich meist auf das Phytohormonprofil aus. Auxin und BX sind über ihre Biosynthesewege miteinander verbunden (Abbildung 25), daher wurde eine Wechselwirkung vermutet. Die Auxinkonzentration in der Pflanze ist jedoch nicht signifikant unterschiedlich wenn ION/5HIONG-Genotypen mit WT und Transgenen ohne substatiellen Gehalt an Indolinonen ("nicht ION-Pflanzen") verglichen werden (Abbildung 16). Auch das Verteilungsmuster von Auxin während der Embryo- und Keimlingsentwicklung ist nicht beeinflusst (Lenk, 2015; Abramov *et al.*, 2021). Die Auxin-Biosynthese ist also nicht vom zusätzlichen Abzweig vom TRP-Biosyntheseweg beeinflusst.

Wie Auxin ist auch die Biosynthese indolischer GS mit dem Biosyntheseweg der BX über Indol verbunden. Vorangegangene Untersuchungen von *Bx1Bx2* Pflanzen durch Linlin Zheng haben ergeben, dass das GS-Muster der Transgenen verändert ist. Während keine generelle Auswirkung auf die Gesamtmenge indolischer GS gezeigt werden konnte, war in

Bx1Bx2 das Verhältnis von Indolyl-3-Methylglucosinolat zu 4-Methoxyindolyl-3-Methylglucosinolat in Richtung des letzteren verschoben, was einen Hinweis auf metabolischen Stress darstellt (Abramov *et al.* 2021).

Hormone, die bei biotischem und abiotischem Stress der Pflanze wichtige Rollen spielen sind JA, SA und ABA. Wurden ION/5HIONG-Genotypen und Nicht-ION-Pflanzen gegenübergestellt so ergab sich tendenziell eine Zunahme verbunden mit ION/5HIONG für ABA und signifikant für SA. Der SA-Spiegel wurde von größeren Mengen an ION (in *Bx1Bx2*, *Bx1Bx2C+* Genotypen) besonders stark beeinflusst, daher wurden die Arbeiten auf die Analyse der SA Homöostase konzentriert. Die SA Konzentration korreliert mit der ION Menge in den Transgenen (Abbildung 25). Der molekulare Mechanismus hinter dieser Reaktion ist unbekannt, weder die Expression der SA-Biosynthesegene noch die des Katabolismus weisen ein mit ION/5HIONG-Konzentration übereinstimmendes Expressionsmuster bei den verschiedenen Genotypen auf (Abbildung 20). Dagegen werden die Transkriptlevel der in der SA-Signalkaskade nachgelagerten Gene *PR1* und *FMO1* erhöht (Abbildung 18). In *N. benthamiana* wurde durch 3-Acetyl-3-Hydroxyindolin-2-on, einem Derivat von HION bzw. ION, eine ähnliche Reaktion hervorgerufen (Li *et al.*, 2008). Es könnte eine allgemeine Phytotoxizität von ION-Derivaten existieren, die in Pflanzen zu morphologischen Veränderungen führen. Morphologische Abweichungen bei transgener Expression von Sekundärmetabolit-Biosynthesen durch das Auftreten von Intermediaten sind nicht beschränkt auf Indol-Abkömmlinge. Fehlt bei der Expression von CG in Arabidopsis die spezifische UGT, zeigen die Pflanzen Zwergwuchs (Kristensen *et al.*, 2005). Eine Analyse der Phytohormonzusammensetzung wurde in diesem Fall nicht gemacht. Dagegen wurde eine erhöhte SA-Konzentration im Zusammenhang mit der Biosynthese eines ungewöhnlichen GS in Arabidopsis gefunden, ohne dass in diesem Fall eine veränderte Morphologie erwähnt wird (Brader *et al.*, 2006). Neben seiner bekannten Rolle in der Pathogenabwehr trägt SA auch zur Reaktion der Pflanze auf abiotischen Stress bei, hat Einfluss auf Entwicklungsprozesse, vegetatives Wachstum und Seneszenz (Scott *et al.*, 2004; Rajjou *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2010; Rivas-San Vicente und Plasencia, 2011; Vogelmann *et al.*, 2012; Šašek *et al.*, 2014). Der besonders bei *Bx1Bx2*-Pflanzen ausgeprägte vom Wildtyp abweichende Phänotyp könnte mittelbar durch SA -Einfluss ausgelöst sein. SA-freie, ION/5HIONG enthaltende Pflanzen (*Bx1Bx2NahG*, Abbildung 19) liegen phänotypisch zwischen Wildtypen und den SA-enthaltenden Geschwisterpflanzen (*Bx1Bx2Col-0*, Abbildung 19). ION/5HIONG hat also sowohl direkt als auch mittelbar über SA Einfluss auf Entwicklung und Morphologie (Abbildung 25). Die induzierte SA-Anreicherung als Antwort auf ION/5HIONG-Präsenz wurde auch im Fütterungsexperiment gezeigt (Abbildung 17). Umgekehrt greift SA in den ION-Metabolismus ein. Gefüttertes und endogenes ION wird in *NahG*-Pflanzen in signifikant geringerem Umfang in 5HIONG

umgesetzt als in SA-enhaltenen Pflanzen (Abbildung 21). Es besteht ein Feedback-Mechanismus in dem durch ION/5HIONG induzierte SA den Umsatz von ION beeinflusst.

#### **4.6 ION/5HIONG beeinflusst über den SA-Gehalt die Systemische Erworbene Resistenz (SAR)**

SA vermittelt sowohl basale als auch systemische erworbene Resistenz. Transgene Expression von Sekundärmetaboliten kann die Resistenzeigenschaften beeinflussen. Im Fall der transgenen Modifikation des GS-Spektrums wurde gefunden, dass Resistenz aufgrund der Toxizität der Metabolite erzeugt wurde, aber auch eine Verschiebung der SA- und JA-vermittelten Resistenzen auftrat, sehr wahrscheinlich durch die Steigerung der SA-Konzentration (Brader *et al.*, 2006). Für die transgenen ION/5HIONG-Pflanzen konnte keine erhöhte basale Resistenz gegenüber dem biotrophen Mehltauerreger *Erysiphe cruciferarum* festgestellt werden. Weder ION/5HIONG alleine noch die Kombination mit erhöhter Konzentration von SA beeinflusste die Proliferation des Pathogens. Dagegen führte Arabidopsis *Col-0* lokal appliziertes ION zu reduzierter Vermehrung von *Pseudomonas syringae pathovar tomato* im systemischen Blatt (Abbildung 24) und fungiert also als Auslöser von SAR (Abbildung 25). Dies ist das Standardsystem für die Analyse von SAR (Wenig *et al.*, 2019). Die systemische Resistenz ist abhängig von SA-Biosynthese, aber nicht vom SA-unabhängigen Induktionsnetzwerk in das FMO1 eingebunden ist (Abbildung 24). Der Unterschied in beiden Ansätzen, dem *Pseudomonas* Pathoassay und dem *Erysiphe* Pathoassay mit Transgenen, ist konstitutive Expression gegenüber transienter Gabe des Fremdmoleküls. Ständiger "Stress" könnte das regulatorische Netzwerk der Resistenzreaktionen eingreifen und sie abschwächen. Wie im Fall der ION-Präsenz in den *Bx1Bx2*-Transgenen führen Mutationen in den Enzymen des SA-Katabolismus zu konstitutiver Steigerung des SA-Gehalts. Auch in dieser Situation konnte nicht in jedem Fall eine eindeutige Verbindung zwischen SA und lokaler Resistenz gegen die *Pseudomonas*-Infektion gezeigt werden (Zhang *et al.*, 2017). Allerdings ist die Transkriptmenge des Markergens *PR1* für SA vermittelte Resistenz in den ION/5HIONG Pflanzen erhöht und damit Resistenz zu erwarten. Die Versuche mit *Erysiphe cruciferarum* zeigten, dass das Ausmaß der Infektion für *Col-0* stark vom Entwicklungszustand der Pflanze abhängen kann, u.a. von der Blattgröße und der Blattoberfläche. Da sich ION/5HIONG Pflanzen in diesen Parametern stark unterscheiden, könnte im Fall der konstitutiven Expression die SA-vermittelte basale Resistenz durch morphologische und physiologische Unterschiede aufgehoben werden. Dadurch können die unterschiedlichen Ergebnisse in den verschiedenen Versuchsansätzen erklärt werden (Abbildung 22).

#### 4.7 Evolution der BX-Biosynthese

Die minimalen Voraussetzungen der Biosynthese von BX sind Indol-Biosynthese, vier Hydroxylierungen und die Glukosylierung des gebildeten Aglukons. In Gräsern führen vier P450-Enzyme diese Hydroxylierungen aus, die substrat- und reaktionsspezifisch sind. Die Ergebnisse transgener Expression haben für die BX-Biosynthese und auch für die Biosynthese von CG gezeigt, dass die Expression von Teilen der Biosynthesewege zu schwerer Beeinträchtigung der Pflanzen führt. Für die CG-Biosynthese wurde klar gezeigt, dass die CG-spezifische UGT notwendig ist, in diesem Fall nicht nur um die Toxizität der Substanz zu verringern sondern auch zur Steigerung der Biosynthese als wesentlicher Komponente des Metabolons (Tattersall *et al.*, 2001). Im Fall der BX im transgenen Ansatz werden Intermediate der Biosynthese ebenfalls durch endogene Enzyme glycosyliert (Abbildung 25). Dagegen wurde in vorhergehenden Versuchen nachgewiesen, dass in *Arabidopsis* keine DI(M)BOA-Glucosyltransferase vorhanden ist und die Aglukone Nekrosen auslösen (von Rad *et al.*, 2001; Dick *et al.*, 2012). Eine Etablierung der Biosynthesen vom Ende her wie von Horowitz (1945) postuliert, in diesem Fall auf der Basis einer ausreichenden DIBOA-Glukosylierung, erscheint denkbar.

Die BX-P450-Gene liegen in Mais in einem Cluster vor und sind zueinander homolog. Eine Genese durch Duplikationen ist wahrscheinlich, promisköse Enzyme könnten sich danach zu spezifischen Enzymen entwickelt haben. *Bx2* nimmt durch die Lage im Genom in engster Nachbarschaft mit *Bx1* (Frey *et al.*, 1997), durch stärkste Differenzierung der Sequenz gegenüber den drei anderen P450-Genen (Frey *et al.*, 1995) und nicht zuletzt durch die Funktion als erste Hydroxylase in der Biosynthese eine Sonderstellung ein. Phylogenetische Untersuchungen haben eine besondere Bedeutung von *Bx2* für die Evolution der Biosynthese ausgewiesen (Dutartre *et al.*, 2012). Die Untersuchungen mit transgener *Arabidopsis* haben nun gezeigt, dass *Bx3* wesentlich für die Etablierung der Biosynthese ist. Da die BX3 katalysierte Hydroxylierung in einem weiten Pflanzenspektrum in Konkurrenz mit der 5-Hydroxylierung (Abbildung 25) steht, kann davon ausgegangen werden, dass entsprechende Konkurrenzenzyme auch während der Evolution der BX-Biosynthese vorhanden waren. Die Analysen zeigen auch, dass das Ausmaß der ION 5-Hydroxylierung in verschiedenen Pflanzenspezies unterschiedlich ist, am geringsten ist sie bei den Gräsern. Gleichzeitig wird in Mais durch ION/5HIONG kaum eine Steigerung der SA-Konzentration detektiert (Daten nicht gezeigt), womit geringer Stress ausgelöst wird und damit eine gewisse Tolerierung der Intermediate in der Pflanze vorhanden ist. Beides, geringe Konkurrenz um das Substrat ION und moderater metabolischer Stress könnte die Etablierung der BX-Biosynthese in den Gräsern begünstigt haben.



Die BX-Biosynthese stellt eine metabolische Leistung in Konkurrenz mit der Primärstoffbiosynthese dar. Die Arbeiten haben gezeigt, dass die Verteilung zwischen beiden Wegen durch die Stärke der Senke des Biosynthesewegs bestimmt wird (Abbildung 25, Tabelle 18). BX sind keine „Supertoxine“, sondern nur in relativ hoher Konzentration wirksam. Die effiziente Wirkkonzentration liegt bei 1 µmol/g FG (Long *et al.*, 1975; Campos *et al.*, 1989). Hohe effektive Konzentrationen (rund 20 µmol/g FG) sind in den Gräsern wahrscheinlich auf das Keimlingsstadium und junge Gewebe ("Crown roots") beschränkt oder werden nach Schädlingsbefall lokal gebildet (Meihls *et al.*, 2013; Handrick *et al.*, 2016). In Dikotyledonen treten extrem hohe BX-Konzentrationen in Blüten aber auch über die gesamte Blattentwicklung auf (Tabelle 23). Abhängig von der Pflanzenspezies können damit unterschiedliche Limitierungen in Bezug auf Ressourcen und Sensitivität von Entwicklungsprozessen bestehen. Möglicherweise können die in den gemachten Ansätzen erreichten Mengen in Arabidopsis auf Pflanzenebene wegen der begrenzten Ressourcen nicht wesentlich übertroffen werden. Durch Beschränkung auf Gewebe, Stadien, induzierte Expression könnten wirksame Konzentrationen erreicht werden.

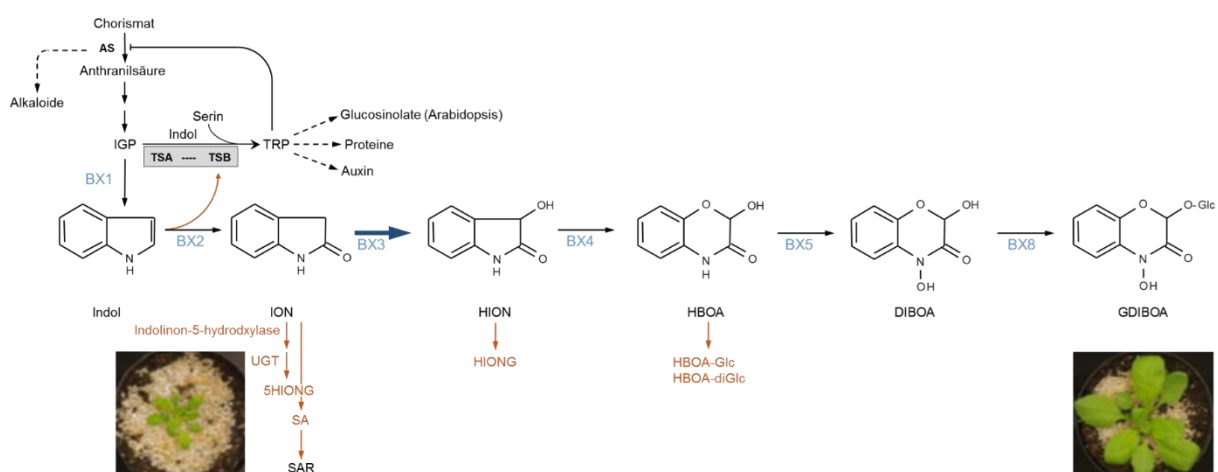


Abbildung 25: Metabolisches Netzwerk der BX Biosynthese in transgener Arabidopsis und Auswirkungen auf Pflanzenmorphologie und Pathogenabwehr. Überexpression von *Bx3* ist wesentlicher Treiber der BX-Biosynthese. Die alternative Hydroxylierung von ION durch endogene Enzyme und Bildung des stabilen Intermediats 5HIONG wird durch *BX3* reduziert. GDIBOA enthaltende Pflanzen sind wildtypisch. Im Gegensatz dazu beeinflusst ION/5HIONG die Morphologie der Pflanze und greift in die SA Homöostase ein. Indirekt wird durch erhöhten SA-Gehalt die Systemische Erworbene Resistenz beeinflusst. Orange Pfeile zeigen Reaktionen durch Arabidopsis-endogene Enzyme, die entstehenden Metabolite sind ebenfalls orange hervorgehoben. Steigerung der Indolbiosynthese durch *BX1* führt alternativ zur GDIBOA-Biosynthese zu erhöhter Tryptophankonzentration.

## 5 Zusammenfassung

Sekundäre Pflanzenstoffe bilden die chemische Abwehr der Pflanzen. Sie wirken unspezifisch und meist ist eine hohe Konzentration für die Wirksamkeit erforderlich. Ein daraus resultierender hoher Energie- und Ressourcenverbrauch begrenzt Pflanzenarten auf eine bestimmte Klasse von Abwehrstoffen. Benzoxazinoide (BX) sind Sekundärmetabolite die als Abwehrstoffe von einigen Gräsern, darunter Mais, produziert werden. BX funktionieren in einem 2-Komponenten System, in dem der Abwehrstoff in einer inaktivierten, glucosylierten Form in der Vakuole gelagert wird und von der zweiten Komponente, der räumlich getrennt im Plastid befindlichen  $\beta$ -Glucosidase, aktiviert wird. Der Kontakt der beiden Komponenten geschieht durch Zelldisruption bei Pathogenbefall bzw. Fraß. Die Biosynthese der BX zweigt in den Gräsern mit dem ersten, auch für die Tryptophanbiosynthese verwendeten Substrat Indol-3-Glycerinphosphat (IGP) vom Primärmetabolismus ab. Die plastidlokalisierte IGP Lyase BX1 produziert Indol. Dieses wird in vier Schritten durch die ER-gebundenen Cytochrom P450 Enzyme BX2, BX3, BX4 und BX5 zu Indolinon (ION), Hydroxyindolinon (HION), HBOA bzw. DIBOA oxygeniert. DIBOA wird durch die cytosolische Glucosyltransferase BX8 zu GDIBOA glucosyliert, um Autotoxizität zu vermeiden.

Ziel der Arbeit war es durch transgene Expression von insgesamt sieben Maisgenen die Biosynthese von BX in Arabidopsis zu etablieren. Arabidopsis besitzt keine BX, produziert dagegen die abwehrrelevanten Glucosinolate (GS) ebenfalls in hohen Mengen. Indolische GS sind wie BX mit dem Primärstoffwechsel über das Tryptophan-Netzwerk verbunden zu dem in Pflanzen generell das Phytohormon Auxin gehört und im Fall von Arabidopsis zusätzlich der induzierbare Abwehrmetabolit Camalexin. Es sollte untersucht werden ob das BX GDIBOA in Arabidopsis gebildet werden kann und ob Endprodukt und Intermediate sich auf das Arabidopsis-Netzwerk auswirken.

Die enzymatische Aktivität der transformierten Enzyme wurde vorher in Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) auf Funktion geprüft. Kloniert und transformiert wurden die Gene *Bx1* – *Bx5*, *Bx8* und das Koenzym der P450 *ZmPor* aus Mais. Die Codonverwendung der Mais-P450 Gene (GC-reich) wurde an Arabidopsis (AT-reich) angepasst. Im Hefeexpressionssystem waren alle klonierten BX Enzyme einzeln aktiv. Durch *in vivo* Fütterung von Hefekulturen und *in vitro* Messungen wurde untersucht ob eine für Enzyme von pflanzlichen Sekundärmetaboliten postulierte positive Interaktion (Metabolon Hypothese) für die BX-Biosynthese vorliegt. Es konnte keine wesentliche Steigerung der Substrataffinität durch Koexpression mehrerer *Bx*-Gene festgestellt werden.

Die Expression des GDIBOA Biosynthesewegs in Arabidopsis war erfolgreich. GDIBOA konnte zunächst in geringen Konzentrationen (3,7 nmol pro Gramm Trockengewicht) in den

Transformanten detektiert werden. Als Ursache für die geringe Syntheseeffizienz konnte der Verlust von Intermediaten und Metabolisierung dieser durch Arabidopsis endogene Enzyme identifiziert werden. Eine Interaktion mit dem Primärmetabolismus zeigte sich zunächst an veränderter Konzentration von Tryptophan in *Bx1* und *Bx1Bx2* exprimierenden Pflanzen. Fütterungsexperimente mit isotopmarkierten Substraten lieferten keine Hinweise auf ein Channelling von Indol zwischen BX1 und BX2. Analysen unterschiedlicher transgener Pflanzen haben ergeben, dass der effiziente Umsatz von ION, des ersten BX-spezifischen Intermediats, zu HION eine besonders wichtige Rolle für die Effizienz des Biosynthesewegs spielt. Entsprechend konnte die Konzentration von GDIBOA in den Transgenen durch zusätzliche Überexpression von *Bx2* und *Bx3* mehr als 50-fach gesteigert werden.

Eine Anreicherung von ION und des in wildtypischen Mais nicht nachweisbaren Metabolisierungsprodukts 5-Hydroxyindolinon-Glukosid (5HIONG) in Arabidopsis mit hoher *Bx1* und *Bx2* Expression führte zu einem veränderten Phänotyp. Die Pflanzen waren u.a. in ihrer Entwicklung verlangsamt und insgesamt kleinwüchsig. Die Metabolisierung von ION zu 5HIONG wurde für ein Spektrum von Pflanzen gezeigt und ein schädlicher der Einfluss auf die Wurzelentwicklung konnte für auch für Arabidopsis, Gerste und *N. benthamiana* gezeigt werden. In Arabidopsis wurde der morphologische Phänotyp sowohl durch eine direkte toxische Wirkung von ION als auch durch eine Anreicherung des Stresshormons Salicylsäure (SA) als Folge der hohen ION Konzentration verursacht. Die Metabolisierung von ION zu 5HIONG wurde reziprok durch die Anreicherung von SA verstärkt. ION löst in Arabidopsis mittelbar über SA-Anreicherung die SA-abhängige systemische erworbene Resistenz (SAR) aus. Pathoassays ergaben keine signifikante Änderung der Resistenzfähigkeit von ION anreichernden Genotypen gegenüber biotrophen Pathogenen.

Die Konzentration von GDIBOA in den Transgenen konnte in den Experimenten auf ca. 200 nmol/g TG gesteigert werden, was jedoch für eine effektive Wirkung von GDIBOA als Abwehrstoff (1µmol /g TG) nicht ausreichend ist.

Zusammenfassend war die transgene Expression des BX Biosynthesewegs aus Mais in Arabidopsis erfolgreich. Die Wirkung von ION auf den Metabolismus von Arabidopsis weist auf die besondere Rolle von BX3 in der Evolution des BX Biosynthesewegs hin. Eine Toleranz gegenüber toxischen Intermediaten und die Anwesenheit passender Enzyme zur Detoxifizierung von Endprodukten könnte also die Voraussetzung für die evolutionäre Entstehung von Abwehrstoff-Biosynthesen sein.

## Summary

Secondary metabolites constitute the chemical defence of plants. The mode of action is not directed towards a specific biotic stress and high amounts of the compounds are usually necessary for efficacy. The consequent high consumption of resources might restrict chemical defence of plant species to certain classes of compounds. Benzoxazinoids (BX) are secondary defence metabolites that are produced mainly by grasses, including maize. They act as a 2-component system whereby the inactive, glucosylated defence compound is stored in the vacuole and is activated by the second component, the plastid localised  $\beta$ -glucosidase. Both components come in contact upon cell disruption as a consequence of feeding or pathogen attack.

The biosynthesis of BX is branching off the primary metabolism with the substrate indole-3-glycerol phosphate that is shared with tryptophan biosynthesis. The plastid localised IGP lyase BX1 synthesises indole, which is subsequently oxygenised by the four ER bound cytochrome P450 enzymes BX2, BX3, BX4 and BX5 to yield indolinone (ION), hydroxyindolinone (HION), HBOA or DIBOA respectively. To avoid autotoxicity, DIBOA is glucosylated to GDIBOA by the cytosolic glycosyltransferase BX8.

The study aimed to establish the biosynthesis of BX in Arabidopsis by transgenic expression of seven maize genes. Arabidopsis does not contain BX but produces the defence associated glucosinolates (GS) likewise in high amounts. Indolic GS are connected with the primary metabolism through the tryptophan network. The inducible Arabidopsis defence compound camalexin and the phytohormone auxin are part of the same network. The objective was to investigate whether the BX DIBOA can be synthesised in Arabidopsis and how the intermediates influence the Arabidopsis metabolism.

The enzymatic activity of the transformed enzymes was first verified in *Saccharomyces cerevisiae*. The genes *Bx1-Bx5*, *Bx8* and the maize P450 coenzyme *ZmPor* were cloned and stably transformed into Arabidopsis. The codon usage of the maize genes (GC rich) was adapted to Arabidopsis (AT rich). In yeast, all cloned BX enzymes were active individually. The postulated positive interaction of the BX enzymes (metabolon hypothesis) has been probed by *in vitro* measurements and by feeding yeast culture *in vivo*. No significant increase in substrate affinity for the enzymes could be observed after co-expression of several *Bx* genes.

The expression of the GDIBOA biosynthesis pathway was successful. Initially GDIBOA could be detected in the transformants in low concentrations (3,7 nmol per gram dry weight). The loss and subsequent metabolism of intermediates by endogenous Arabidopsis enzymes was identified as the cause of the low synthesis efficiency. The interaction with the primary

metabolism became apparent by the altered concentration of tryptophan in transgenics expressing *Bx1* and *Bx1Bx2*. Feeding experiments with isotope labelled substrates revealed no channelling of indole between BX1 and BX2. Analyses of transgenes have shown the importance of the efficient conversion of the first BX specific intermediate ION to HION for the efficiency of the whole pathway. Hence, the concentration of GDIBOA in the transgenics could be increased more than 50-fold by additional overexpression of *Bx2* and *Bx3*.

Accumulation of the ION metabolite 5-hydroxyiondolinone glucoside (5HIONG), which is not detectable in maize, led to an altered phenotype in *Arabidopsis* with high *Bx1* and *Bx2* expression. These plants showed a retarded development and a reduced growth. The metabolisation of ION to 5HIONG could be shown in a variety of plant species and the deleterious effect on root development was found for *Arabidopsis*, *N. benthamiana* and barley. In *Arabidopsis*, the altered morphological phenotype was caused directly by toxicity of ION as well as indirectly by accumulation of salicylic acid (SA) as a result of high ION concentrations. Inversely, the metabolisation rate of ION to 5HIONG was increased by accumulation of SA. By the accumulation of SA in *Arabidopsis*, ION indirectly triggers the SA-dependent systemic acquired resistance (SAR). Pathoassays have not shown any significant change in resistance against biotrophic pathogens in ION accumulating genotypes. Eventually, the concentration of GDIBOA in the transgenics could be increased to around 200 nmol/g DW. However, this is not sufficient for an effect of GDIBOA as a defence compound, which would require 1  $\mu\text{mol/g DW}$ .

In summary, the transgenic expression of the BX biosynthesis pathway of maize in *Arabidopsis* was successful. The effect of ION on the metabolism of *Arabidopsis* suggests a special role of BX3 in the evolution of the BX biosynthesis. Tolerance to toxic intermediates and the availability of appropriate enzymes for detoxification of the final products could be a requirement for the evolutionary development of defence compound biosyntheses.

## 6 Literaturverzeichnis

- Abramov, A., Hoffmann, T., Stark, T.D., Zheng, L., Lenk, S., Hammerl, R., Lanzl, T., Dawid, C., Schön, C.-C., Schwab, W., Gierl, A., und Frey, M.** (2021). Engineering of benzoxazinoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*: Metabolic and physiological challenges. *Phytochemistry* **192**, 112947.
- Bailey, B.A., und Larson, R.L.** (1989). Hydroxamic Acid Glucosyltransferases from Maize Seedlings. *Plant Physiol.* **90**, 1071-1076.
- Baker Brachmann, C., Davies, A., Cost, G.J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P., und Boeke, J.D.** (1998). Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: A useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast* **14**, 115-132.
- Barry, D., und Darrah, L.L.** (1991). Effect of Research on Commercial Hybrid Maize Resistance to European Corn Borer (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Econ. Entomol.* **84**, 1053-1059.
- Bassard, J.E., und Halkier, B.A.** (2018). How to prove the existence of metabolons? *Phytochem. Rev.* **17**, 211-227.
- Bassard, J.E., Richert, L., Geerinck, J., Renault, H., Duval, F., Ullmann, P., Schmitt, M., Meyer, E., Mutterer, J., Boerjan, W., De Jaeger, G., Mely, Y., Goossens, A., und Werck-Reichhart, D.** (2012). Protein-protein and protein-membrane associations in the lignin pathway. *Plant Cell* **24**, 4465-4482.
- Becker, D., Kemper, E., Schell, J., und Masterson, R.** (1992). New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left T-DNA border. *Plant Mol. Biol.* **20**, 1195-1197.
- Beckett, A.H., und Morton, D.M.** (1966). The metabolism of oxindole and related compounds. *Biochem. Pharmacol.* **15**, 937-946.
- Benveniste, I., Gabriac, B., und Durst, F.** (1986). Purification and characterization of the NADPH-cytochrome P-450 (cytochrome c) reductase from higher-plant microsomal fraction. *Biochem. J.* **235**, 365-373.
- Birnboim, H.C., und Doly, J.** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513-1523.
- Böttcher, C., Westphal, L., Schmotz, C., Prade, E., Scheel, D., und Glawischmig, E.** (2009). The Multifunctional Enzyme CYP71B15 (PHYTOALEXIN DEFICIENT3) Converts Cysteine-Indole-3-Acetonitrile to Camalexin in the Indole-3-Acetonitrile Metabolic Network of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **21**, 1830-1845.
- Brader, G., Mikkelsen, M.D., Halkier, B.A., und Tapio Palva, E.** (2006). Altering glucosinolate profiles modulates disease resistance in plants. *Plant J* **46**, 758-767.

- Bradford, M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Campos, F., Atkinson, J., Arnason, J.T., Philogène, B.J.R., Morand, P., Werstiuk, N.H., und Timmins, G.** (1989). Toxicokinetics of 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one (DIMBOA) in the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Hübner). *J. Chem. Ecol.* **15**, 1989-2001.
- Chapple, C.** (1998). Molecular-genetic analysis of plant cytochrome P450-dependent monooxygenases. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**, 311-343.
- Chaudhary, A., Chen, X., Gao, J., Leśniewska, B., Hammerl, R., Dawid, C., und Schneitz, K.** (2019). The Arabidopsis receptor kinase STRUBBELIG regulates the response to cellulose deficiency. *bioRxiv*, 775775.
- Chou, C.-C., Patel, M.T., und Gartenberg, M.R.** (2015). A series of conditional shuttle vectors for targeted genomic integration in budding yeast. *FEMS Yeast Res.* **15**.
- 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.
- Copaja, S., V., Villarroel, E., Bravo Héctor, R., Pizarro, L., und Argandoñ Víctor, H.** (2006). Hydroxamic Acids in *Secale cereale* L. and the Relationship with their Antifeedant and Allelopathic Properties. In *Zeitschrift für Naturforschung C*, pp. 670.
- Corcuera, L.J., Woodward, M.D., Helgeson, J.P., Kelman, A., und Upper, C.D.** (1978). 2,4-Dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one, an Inhibitor from *Zea mays* with Differential Activity against Soft Rotting *Erwinia* Species. *Plant Physiol* **61**, 791-795.
- Creighton, T.E., und Yanofsky, C.** (1966). Association of the  $\alpha$  and  $\beta$ 2 Subunits of the Tryptophan Synthetase of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **241**, 980-990.
- Crumeyrolle-Arias, M., Tournaire, M.-C., Rabot, S., Malpoux, B., und Thiéry, J.-C.** (2008). 5-hydroxyoxindole, an indole metabolite, is present at high concentrations in brain. *J. Neurosci. Res.* **86**, 202-207.
- de Carolis, E., und de Luca, V.** (1994). 2-Oxoglutarate-dependent dioxygenase and related enzymes: Biochemical characterization. *Phytochemistry* **36**, 1093-1107.
- 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.

- Donnelly, M.L.L., Luke, G., Mehrotra, A., Li, X., Hughes, L.E., Gani, D., und 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.
- Dutartre, L., Hilliou, F., und Feyereisen, R.** (2012). Phylogenomics of the benzoxazinoid biosynthetic pathway of Poaceae: gene duplications and origin of the Bx cluster. *BMC Evol. Biol.* **12**, 64.
- Erb, M., Veyrat, N., Robert, C.A.M., Xu, H., Frey, M., Ton, J., und Turlings, T.C.J.** (2015). Indole is an essential herbivore-induced volatile priming signal in maize. *Nat. Commun.* **6**, 6273.
- Folch, J., Lees, M., und Sloane Stanley, G.H.** (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **226**, 497-509.
- Frandsen, R.J.N., Khorsand-Jamal, P., Kongstad, K.T., Nafisi, M., Kannangara, R.M., Staerk, D., Okkels, F.T., Binderup, K., Madsen, B., Møller, B.L., Thrane, U., und Mortensen, U.H.** (2018). Heterologous production of the widely used natural food colorant carminic acid in *Aspergillus nidulans*. *Scientific Reports* **8**, 12853.
- Frey, M., Kliem, R., Saedler, H., und Gierl, A.** (1995). Expression of a cytochrome P450 gene family in maize. *Mol. Gen. Genet.* **246**, 100-109.
- Frey, M., Stettner, C., Paré, P.W., Schmelz, E.A., Tumlinson, J.H., und Gierl, A.** (2000). An herbivore elicitor activates the gene for indole emission in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 14801-14806.
- Frey, M., Chomet, P., Glawischnig, E., Stettner, C., Grün, S., Winklmaier, A., Eisenreich, W., Bacher, A., Meeley, R.B., Briggs, S.P., Simcox, K., und Gierl, A.** (1997). Analysis of a Chemical Plant Defense Mechanism in Grasses. *Science* **277**, 696-699.
- Geu-Flores, F., Olsen, C.E., und Halkier, B.A.** (2009). Towards engineering glucosinolates into non-cruciferous plants. *Planta* **229**, 261-270.
- Gietz, D.R., und Woods, R.A.** (2002). Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. In *Methods in Enzymology*, C. Guthrie und G.R. Fink, eds (Academic Press), pp. 87-96.
- Glawischnig, E.** (1997). Biochemische und genetische Aufklärung der Biosynthese von Benzoxazinonen in *Zea mays*. Dissertation am **Lehrstuhl für Genetik**, Technische Universität München.
- Glenn, A.E., Gold, S.E., und Bacon, C.W.** (2002). Fdb1 and Fdb2, *Fusarium verticillioides* loci necessary for detoxification of preformed antimicrobials from corn. *Mol Plant Microbe Interact* **15**, 91-101.



- Grombacher, A.W., Russell, W.A., und Guthrie, W.D.** (1989). Resistance to First-Generation European Corn Borer (Lepidoptera: Pyralidae) and DIMBOA Concentration in Midwhorl Leaves of the BS9 Maize Synthetic. *J. Kans. Entomol. Soc.* **62**, 103-107.
- Grün, S.** (1997). Funktionsbestimmung von vier P450-Enzymen des Maiskeimlings (*Zea mays*) durch heterologe Expression in *Saccharomyces cerevisiae*. Diplomarbeit am **Lehrstuhl und Institut für Genetik**, Technische Universität München, Freising.
- Grün, S., Frey, M., und Gierl, A.** (2005). Evolution of the indole alkaloid biosynthesis in the genus *Hordeum*: Distribution of gramine and DIBOA and isolation of the benzoxazinoid biosynthesis genes from *Hordeum lechleri*. *Phytochemistry* **66**, 1264-1272.
- Halkier, B.A., und Gershenzon, J.** (2006). Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**, 303-333.
- Handrick, V., Robert, C.A.M., Ahern, K.R., Zhou, S., Machado, R.A.R., Maag, D., Glauser, G., Fernandez-Penny, F.E., Chandran, J.N., Rodgers-Melnik, E., Schneider, B., Buckler, E.S., Boland, W., Gershenzon, J., Jander, G., Erb, M., und Köllner, T.G.** (2016). Biosynthesis of 8-O-Methylated Benzoxazinoid Defense Compounds in Maize. *Plant Cell* **28**, 1682.
- Hannemann, L., Lucaciu, C.R., Sharma, S., Rattei, T., Mayer, K.F.X., Gierl, A., und Frey, M.** (2018). A promiscuous beta-glucosidase is involved in benzoxazinoid deglycosylation in *Lamium galeobdolon*. *Phytochemistry* **156**, 224-233.
- Hanson, A.D., Traynor, P.L., Ditz, K.M., und Reicosky, D.A.** (1981). Gramine in Barley Forage - Effects of Genotype and Environment<sup>1</sup>. *Crop Sci.* **21**.
- He, X.-Z., Reddy, J.T., und Dixon, R.A.** (1998). Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L). XXII. cDNA cloning and characterization of an elicitor-inducible isoflavone 7-O-methyltransferase. *Plant Mol. Biol.* **36**, 43-54.
- Horowitz, N.H.** (1945). On the Evolution of Biochemical Syntheses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **31**, 153-157.
- Inoue, S., Morita, R., und Minami, Y.** (2021). An indigo-producing plant, *Polygonum tinctorium*, possesses a flavin-containing monooxygenase capable of oxidizing indole. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **534**, 199-205.
- Jensen, L.M., Jepsen, H.S.K., Halkier, B.A., Kliebenstein, D.J., und Burow, M.** (2015). Natural variation in cross-talk between glucosinolates and onset of flowering in *Arabidopsis*. *Front Plant Sci* **6**, 697.
- Jonczyk, R., Schmidt, H., Osterrieder, A., Fiesselmann, A., Schullehner, K., Haslbeck, M., Sicker, D., Hofmann, D., Yalpani, N., Simmons, C., Frey, M., und Gierl, A.** (2008). Elucidation of the final reactions of DIMBOA-glucoside biosynthesis in maize: characterization of Bx6 and Bx7. *Plant Physiol.* **146**, 1053-1063.

- Knudsen, C., Gallage, N.J., Hansen, C.C., Møller, B.L., und Laursen, T.** (2018). Dynamic metabolic solutions to the sessile life style of plants. *Nat Prod Rep* **35**, 1140-1155.
- Koncz, C., und Schell, J.** (1986). The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol. Gen. Genet.* **204**, 383-396.
- Kristensen, C., Morant, M., Olsen, C.E., Ekstrøm, C.T., Galbraith, D.W., Lindberg Møller, B., und Bak, S.** (2005). Metabolic engineering of dhurrin in transgenic *Arabidopsis* plants with marginal inadvertent effects on the metabolome and transcriptome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 1779.
- Laursen, T., Møller, B.L., und Bassard, J.-E.** (2015). Plasticity of specialized metabolism as mediated by dynamic metabolons. *Trends Plant Sci.* **20**, 20-32.
- Laursen, T., Borch, J., Knudsen, C., Bavishi, K., Torta, F., Martens, H.J., Silvestro, D., Hatzakis, N.S., Wenk, M.R., Dafforn, T.R., Olsen, C.E., Motawia, M.S., Hamberger, B., Møller, B.L., und Bassard, J.-E.** (2016). Characterization of a dynamic metabolon producing the defense compound dhurrin in sorghum. *Science* **354**, 890.
- Lee, S., Kim, S.-G., und Park, C.-M.** (2010). Salicylic acid promotes seed germination under high salinity by modulating antioxidant activity in *Arabidopsis*. *New Phytol.* **188**, 626-637.
- Lenk, S.** (2015). Transfer of the DIBOA biosynthesis pathway from maize to *Arabidopsis thaliana*. Dissertation am **Lehrstuhl für Genetik**, Technische Universität München, Freising.
- Li, Y., Zhang, Z., Jia, Y., Shen, Y., He, H., Fang, R., Chen, X., und Hao, X.** (2008). 3-Acetyl-3-hydroxyoxindole: a new inducer of systemic acquired resistance in plants. *Plant Biotechnol. J.* **6**, 301-308.
- Long, B.J., Dunn, G.M., und Routley, D.G.** (1975). Relationship of Hydroxamic Acid Content in Maize and Resistance to Northern Corn Leaf Blight. *Crop Sci.* **15**.
- Macías, F.A., Oliveros-Bastidas, A., Marín, D., Castellano, D., Simonet, A.M., und Molinillo, J.M.** (2004). Degradation studies on benzoxazinoids. Soil degradation dynamics of 2,4-dihydroxy-7-methoxy-(2H)-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (DIMBOA) and its degradation products, phytotoxic allelochemicals from gramineae. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 6402-6413.
- Macías, F.A., Oliveros-Bastidas, A., Marín, D., Chinchilla, N., Castellano, D., und Molinillo, J.M.G.** (2014). Evidence for an Allelopathic Interaction Between Rye and Wild Oats. *J. Agric. Food Chem.* **62**, 9450-9457.
- Maier, W., Schumann, B., und Gröger, D.** (1990). Biosynthesis of indoxyl derivatives in *Isatis tinctoria* and *Polygonum tinctorium*. *Phytochemistry* **29**, 817-819.

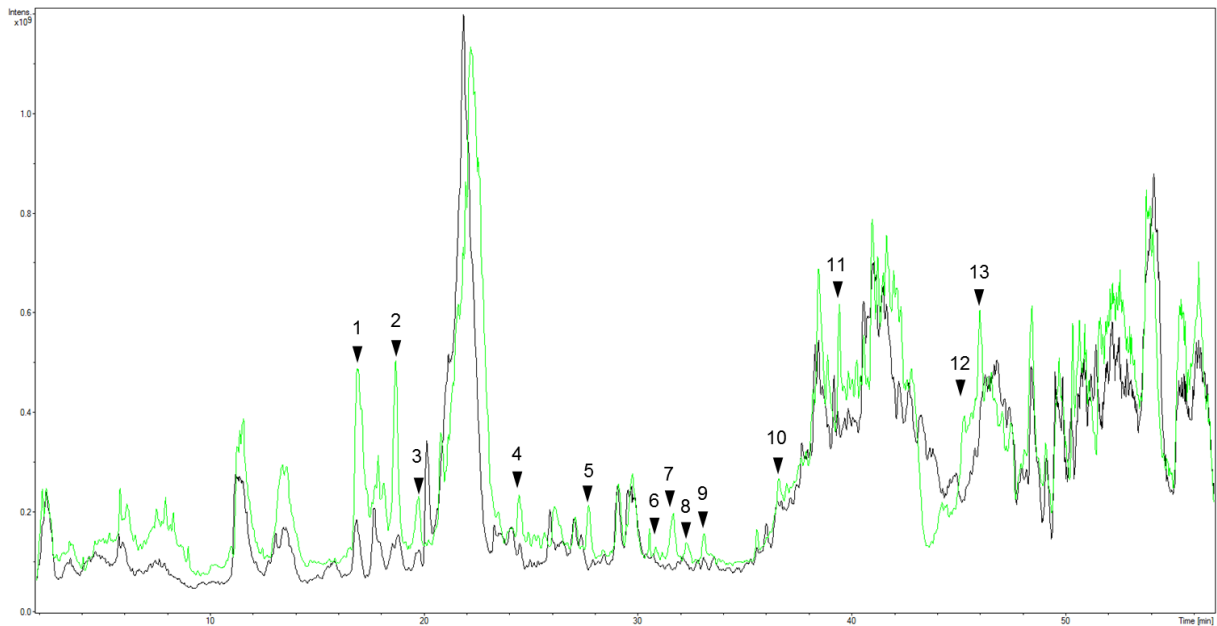
- Malamy, J., Carr, J.P., Klessig, D.F., und Raskin, I.** (1990). Salicylic Acid: A Likely Endogenous Signal in the Resistance Response of Tobacco to Viral Infection. *Science* **250**, 1002-1004.
- Meihls, L.N., Handrick, V., Glauser, G., Barbier, H., Kaur, H., Haribal, M.M., Lipka, A.E., Gershenzon, J., Buckler, E.S., Erb, M., Köllner, T.G., und Jander, G.** (2013). Natural Variation in Maize Aphid Resistance Is Associated with 2,4-Dihydroxy-7-Methoxy-1,4-Benzoxazin-3-One Glucoside Methyltransferase Activity. *Plant Cell* **25**, 2341-2355.
- Métraux, J.P., Signer, H., Ryals, J., Ward, E., Wyss-Benz, M., Gaudin, J., Raschdorf, K., Schmid, E., Blum, W., und Inverardi, B.** (1990). Increase in Salicylic Acid at the Onset of Systemic Acquired Resistance in Cucumber. *Science* **250**, 1004-1006.
- Møldrup, M.E., Geu-Flores, F., Olsen, C.E., und Halkier, B.A.** (2011). Modulation of sulfur metabolism enables efficient glucosinolate engineering. *BMC Biotechnol.* **11**, 12.
- Møldrup, M.E., Geu-Flores, F., de Vos, M., Olsen, C.E., Sun, J., Jander, G., und Halkier, B.A.** (2012). Engineering of benzylglucosinolate in tobacco provides proof-of-concept for dead-end trap crops genetically modified to attract *Plutella xylostella* (diamondback moth). *Plant Biotechnol. J.* **10**, 435-442.
- Mucha, S., Heinzlmeir, S., Kriechbaumer, V., Strickland, B., Kirchhelle, C., Choudhary, M., Kowalski, N., Eichmann, R., Hückelhoven, R., Grill, E., Kuster, B., und Glawischnig, E.** (2019). The Formation of a Camalexin Biosynthetic Metabolon. *Plant Cell* **31**, 2697.
- Nelson, D.R.** (2018). Cytochrome P450 diversity in the tree of life. *Biochim. Biophys. Acta* **1866**, 141-154.
- Nguyen, L.H.** (2018). Expression der DIBOA-Biosynthese aus Mais in *Saccharomyces cerevisiae*. Bachelorarbeit am **Lehrstuhl für Pflanzenzüchtung**, Technische Universität München, Freising.
- Niculaes, C., Abramov, A., Hannemann, L., und Frey, M.** (2018). Plant Protection by Benzoxazinoids—Recent Insights into Biosynthesis and Function. *Agronomy* **8**.
- Nintemann, S.J., Hunziker, P., Andersen, T.G., Schulz, A., Burow, M., und Halkier, B.A.** (2018). Localization of the glucosinolate biosynthetic enzymes reveals distinct spatial patterns for the biosynthesis of indole and aliphatic glucosinolates. *Physiol. Plant.* **163**, 138-154.
- Nomura, T., Ishihara, A., Imaishi, H., Endo, T., Ohkawa, H., und Iwamura, H.** (2002). Molecular characterization and chromosomal localization of cytochrome P450 genes involved in the biosynthesis of cyclic hydroxamic acids in hexaploid wheat. *Mol. Genet. Genomics* **267**, 210-217.

- Nomura, T., Nasuda, S., Kawaura, K., Ogihara, Y., Kato, N., Sato, F., Kojima, T., Toyoda, A., Iwamura, H., und Endo, T.R.** (2008). Structures of the three homoeologous loci of wheat benzoxazinone biosynthetic genes TaBx3 and TaBx4 and characterization of their promoter sequences. *Theor. Appl. Genet.* **116**, 373-381.
- Peremarti, A., Twyman, R.M., Gómez-Galera, S., Naqvi, S., Farré, G., Sabalza, M., Miralpeix, B., Dashevskaya, S., Yuan, D., Ramessar, K., Christou, P., Zhu, C., Bassie, L., und Capell, T.** (2010). Promoter diversity in multigene transformation. *Plant Mol. Biol.* **73**, 363-378.
- Petersen, A., Wang, C., Crocoll, C., und Halkier, B.A.** (2018). Biotechnological approaches in glucosinolate production. *J. Integr. Plant. Biol.* **60**, 1231-1248.
- Pfaffl, M.W.** (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**, e45-e45.
- Pompon, D., Louerat, B., Bronine, A., und Urban, P.** (1996). Yeast expression of animal and plant P450s in optimized redox environments. In *Methods in Enzymology*, E.F. Johnson und M.R. Waterman, eds (Academic Press), pp. 51-64.
- Rajjou, L., Belghazi, M., Huguet, R., Robin, C., Moreau, A., Job, C., und Job, D.** (2006). Proteomic Investigation of the Effect of Salicylic Acid on Arabidopsis Seed Germination and Establishment of Early Defense Mechanisms. *Plant Physiol.* **141**, 910.
- Reiner, T., Hoeffle, C., Huesmann, C., Ménesi, D., Fehér, A., und Hückelhoven, R.** (2015). The Arabidopsis ROP-activated receptor-like cytoplasmic kinase RLCK VI\_A3 is involved in control of basal resistance to powdery mildew and trichome branching. *Plant Cell Rep.* **34**, 457-468.
- Rice, C.P., Park, Y.B., Adam, F., Abdul-Baki, A.A., und Teasdale, J.R.** (2005). Hydroxamic Acid Content and Toxicity of Rye at Selected Growth Stages. *J. Chem. Ecol.* **31**, 1887-1905.
- Ried, M.K., Banhara, A., Hwu, F.-Y., Binder, A., Gust, A.A., Höfle, C., Hückelhoven, R., Nürnberger, T., und Parniske, M.** (2019). A set of Arabidopsis genes involved in the accommodation of the downy mildew pathogen *Hyaloperonospora arabidopsidis*. *PLoS Path.* **15**.
- Rivas-San Vicente, M., und Plasencia, J.** (2011). Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development. *J. Exp. Bot.* **62**, 3321-3338.
- Ruschhaupt, M., Mergner, J., Mucha, S., Papacek, M., Doch, I., Tischer, S.V., Hemmler, D., Chiasson, D., Edel, K.H., Kudla, J., Schmitt-Kopplin, P., Kuster, B., und Grill, E.** (2019). Rebuilding core abscisic acid signaling pathways of Arabidopsis in yeast. *EMBO J* **38**, e101859.
- Sambrook, J., und Green, M.R.** (2012). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* (CSHL Press).

- Šašek, V., Janda, M., Delage, E., Puyaubert, J., Guivarc'h, A., López Maseda, E., Dobrev, P.I., Caius, J., Bóka, K., Valentová, O., Burketová, L., Zachowski, A., und Ruelland, E.** (2014). Constitutive salicylic acid accumulation in pi4kIIIβ1β2 Arabidopsis plants stunts rosette but not root growth. *New Phytol.* **203**, 805-816.
- Schullehner, K., Dick, R., Vitzthum, F., Schwab, W., Brandt, W., Frey, M., und Gierl, A.** (2008). Benzoxazinoid biosynthesis in dicot plants. *Phytochemistry* **69**, 2668-2677.
- Scott, I.M., Clarke, S.M., Wood, J.E., und Mur, L.A.J.** (2004). Salicylate Accumulation Inhibits Growth at Chilling Temperature in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **135**, 1040.
- Shen, Q., Liu, L., Wang, L., und Wang, Q.** (2018). Indole primes plant defense against necrotrophic fungal pathogen infection. *PLOS ONE* **13**.
- Sicker, D., Frey, M., Schulz, M., und Gierl, A.** (2000). Role of natural benzoxazinones in the survival strategy of plants. *Int. Rev. Cytol.* **198**, 319-346.
- Srere, P.A.** (1985). The metabolon. *Trends Biochem. Sci.* **10**, 109-110.
- Sun, T., Huang, J., Xu, Y., Verma, V., Jing, B., Sun, Y., Ruiz Orduna, A., Tian, H., Huang, X., Xia, S., Schafer, L., Jetter, R., Zhang, Y., und Li, X.** (2020). Redundant CAMTA Transcription Factors Negatively Regulate the Biosynthesis of Salicylic Acid and N-Hydroxypipicolinic Acid by Modulating the Expression of SARD1 and CBP60g. *Molecular Plant* **13**, 144-156.
- Sundin, L., Vanholme, R., Geerinck, J., Goeminne, G., Höfer, R., Kim, H., Ralph, J., und Boerjan, W.** (2014). Mutation of the Inducible *ARABIDOPSIS THALIANA* *CYTOCHROME P450 REDUCTASE2* Alters Lignin Composition and Improves Saccharification. *Plant Physiol.* **166**, 1956-1971.
- Tanwir, F., Dionisio, G., Adhikari, K.B., Fomsgaard, I.S., und Gregersen, P.L.** (2017). Biosynthesis and chemical transformation of benzoxazinoids in rye during seed germination and the identification of a rye Bx6-like gene. *Phytochemistry* **140**, 95-107.
- Tattersall, D.B., Bak, S., Jones, P.R., Olsen, C.E., Nielsen, J.K., Hansen, M.L., Høj, P.B., und Møller, B.L.** (2001). Resistance to an Herbivore Through Engineered Cyanogenic Glucoside Synthesis. *Science* **293**, 1826-1828.
- The Angiosperm Phylogeny Group, Chase, M.W., Christenhusz, M.J.M., Fay, M.F., Byng, J.W., Judd, W.S., Soltis, D.E., Mabberley, D.J., Sennikov, A.N., Soltis, P.S., und Stevens, P.F.** (2016). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Bot. J. Linn. Soc.* **181**, 1-20.
- Urban, P., Cullin, C., und Pompon, D.** (1990). Maximizing the expression of mammalian cytochrome P-450 monooxygenase activities in yeast cells. *Biochimie* **72**, 463-472.

- Urban, P., Werck-Reichhart, D., Teutsch, H.G., Durst, F., Regnier, S., Kazmaier, M., and Pompon, D.** (1994). Characterization of recombinant plant cinnamate 4-hydroxylase produced in yeast. *Eur. J. Biochem.* **222**, 843-850.
- Virtanen, A.I., and Hietala, P.K.** (1955). 2(3)-Benzoxazolinone, an Anti-Fusarium Factor in Rye Seedlings. *Acta Chemica Scandinavica* **9**, 1543-1544.
- Vogelmann, K., Drechsel, G., Bergler, J., Subert, C., Philippar, K., Soll, J., Engelmann, J.C., Engelsdorf, T., Voll, L.M., and Hoth, S.** (2012). Early Senescence and Cell Death in *Arabidopsis saul1* Mutants Involves the PAD4-Dependent Salicylic Acid Pathway. *Plant Physiol.* **159**, 1477-1487.
- von Rad, U., Hüttl, R., Lottspeich, F., Gierl, A., and Frey, M.** (2001). Two glucosyltransferases are involved in detoxification of benzoxazinoids in maize. *Plant J* **28**, 633-642.
- Walkerpeach, C.R., and Velten, J.** (1994). Agrobacterium-mediated gene transfer to plant cells: cointegrate and binary vector systems. In *Plant Molecular Biology Manual*, S.B. Gelvin and R.A. Schilperoort, eds (Dordrecht: Springer Netherlands), pp. 33-51.
- Wenig, M., Ghirardo, A., Sales, J.H., Pabst, E.S., Breitenbach, H.H., Anritter, F., Weber, B., Lange, B., Lenk, M., Cameron, R.K., Schnitzler, J.-P., and Vlot, A.C.** (2019). Systemic acquired resistance networks amplify airborne defense cues. *Nat. Commun.* **10**, 3813.
- Wink, M.** (2003). Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry* **64**, 3-19.
- Winter, D., Vinegar, B., Nahal, H., Ammar, R., Wilson, G.V., and Provart, N.J.** (2007). An "Electronic Fluorescent Pictograph" browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS one* **2**, e718-e718.
- Wouters, F.C., Blanchette, B., Gershenzon, J., and Vassao, D.G.** (2016). Plant defense and herbivore counter-defense: benzoxazinoids and insect herbivores. *Phytochem. Rev.* **15**, 1127-1151.
- Zhang, Y., and Fernie, A.R.** (2021). Metabolons, enzyme–enzyme assemblies that mediate substrate channeling, and their roles in plant metabolism. *Plant Communications* **2**, 100081.
- Zhang, Y., Zhao, L., Zhao, J., Li, Y., Wang, J., Guo, R., Gan, S., Liu, C.-J., and Zhang, K.** (2017). *S5H/DMR6* Encodes a Salicylic Acid 5-Hydroxylase That Fine-Tunes Salicylic Acid Homeostasis. *Plant Physiol.* **175**, 1082-1093.
- Zhuang, X., Fiesselmann, A., Zhao, N., Chen, H., Frey, M., and Chen, F.** (2012). Biosynthesis and emission of insect herbivory-induced volatile indole in rice. *Phytochemistry* **73**, 15-22.

## 7 Anhänge



Anhang 1: Metabolitanalyse in Mais. TIC Chromatogramme von MeOH-Extrakt der Wildtyp-Line *B73* (schwarze Linie) und der Mutante *B73-bx3* (grüne Linie). In der Mutante zusätzlich auftretende Masse-Peaks sind mit Pfeilen markiert. Peak 1 repräsentiert Tryptophan.

Massen prominenter Peaks:

1: 204; 188;(TRP)	7: 586	13: 593
2: 591	8: 424	
3: 415	9: 499	
4: 655	10: 666	
5: 364; 382	11: 294	
6: 164	12: 510	



Anhang 2: Phänotyp transgener Pflanzen in verschiedenen Entwicklungsstadien. Pflanzen mit starker Expression von *Bx1* und *Bx2* sind zierlich und die Blüte ist verzögert (*Bx1Bx2Col-0*, *Bx1Bx2*, *Bx1Bx2C+*). Pflanzen mit hoher Expression von *Bx1*, *Bx2* und *Bx3* gleichen dem Wildtyp *Col-0* in Morphologie und Blühzeitpunkt

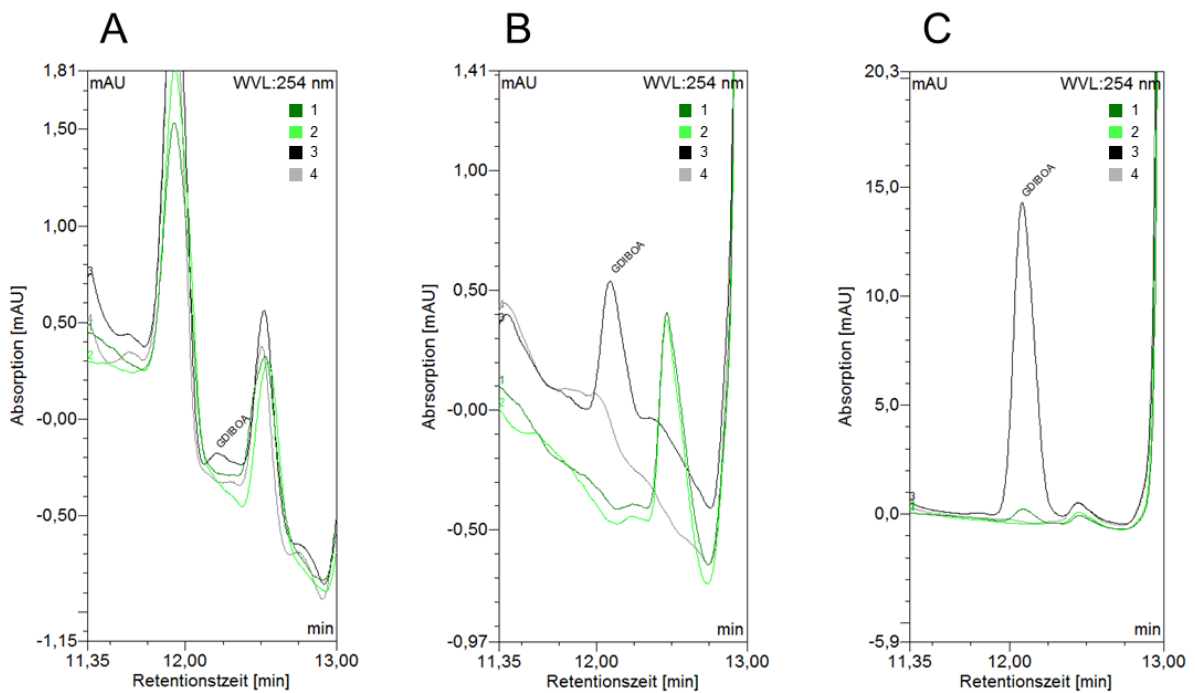


Anhang 3: Phänotyp der *Bx1Bx2* Pflanzen. Die Pfeile deuten auf gelbe, senescente Blattspitzen.





Anhang 4: Phänotypen transgener Pflanzen. *Bx1Bx2* und *Bx1Bx2NahG* haben mutanten Phänotyp, der bei *Bx1Bx2* stärker ausgeprägt ist



Anhang 5: Analyse der BX8-Aktivität in Mikrosomen und zytoplasmatischer Fraktion. A Hefe, untersucht wurden alle Kombinationen von BX8 mit den Bx-P450- Enzymen, exemplarisch dargestellt ist der Stamm *POR1BX5(zm)BX8*. B Arabidopsis *Cluster +*, C Mais *B73*. Im Enzymassay wurden das Pellet und der Überstand aufgeschlossener Zellen eingesetzt (A), bzw. Mikrosomenpräparationen und Überstand (B, C). HPLC- Chromatogramm, 1 grün Pellet bzw. Mikrosomen, 2 hellgrün Negativkontrolle zu Pellet bzw. Mikrosomen. 3, schwarz Überstand, 4 grau Negativkontrolle zu Überstand

## Anhang 6: Medien zur Anzucht und Selektion von Miroorganismen und Pflanzen

### Anzucht- und Selektionsmedien

#### Hefen

##### SC

Hefe-Stickstoff-Basismedium ohne Aminosäurer 0,67% w/v

Glucose 2% w/v

(Agar) 2% w/v

AS Gruppe 1 je 0,01% w/v

AS Gruppe 2 je 0,005% w/v

Gruppe 1 AS: Adenin, Arginin, Cystein, Leucin, Lysin, Threonin, Tryptophan, Uracil

Gruppe 2 AS: Asparaginsäure, Histidin, Isoleucin, Methionin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Tyrosin, Valin

##### YPG

Hefeextrakt 1% w/v

Pepton 1% w/v

Glucose 2% w/v

(Agar) 2% w/v

##### YPGE

EtOH 3% v/v  
in YPG

##### SGIW

Bactoaminosäuren 0,1% w/v

Hefe-Stickstoff-Basismedium ohne Aminosäurer 0,67% w/v

Glucose 2% w/v

L-Tryptophan 20 mg/l

#### Bakterien

NYGA Pepton 0,5% w/v

Hefeextrakt 0,3% w/v

Glycerin 2% v/v

Agar 1,8% w/v

##### YEB

Beef extract 0,5% w/v

Hefeextrakt 0,1% w/v

Pepton 0,1% w/v

Saccharose 0,5% w/v

pH 7,4

(Agar) 2% w/v

MgSO<sub>4</sub> 2mM

##### DYT

Pepton 1,6% w/v

Hefeextrakt 1% w/v

NaCl 0,5% w/v

Agar 1,5% w/v

#### Pflanzen

##### MS Medium

Murashige-Skoog Medium mit Vitaminen 4,406 g/l

Saccharose 2% w/v

pH 5,8 (KOH)

Agar 8 g/l

## Anhang 7: Puffer für Assays

Puffer		
<b>Mikrosomenpräparation Hefe</b>		
TE*		
Tris pH 7,5	50 mM	
EDTA pH 8	1 mM	
TEK		
KCl	0,1 M	in TE*
TES-B		
Sorbitol	0,6 M	
DTT	2mM	in TE*
TEG		
Glycerin	20% v/v	
DTT	2mM	in TE*
<b>Mikrosomenpräparation Pflanzen</b>		
<b>Extraktionspuffer Arabidopsis</b>		
Ascorbinsäure	100 mM	
EDTA	1 mM	
Tris	100 mM	
Glycerin	20% v/v	
Saccharose	20% w/v	
DTT	5 mM	
<b>Suspensionspuffer Arabidopsis</b>		
Kpi pH 7,5	50 mM	
Glycerin	20% v/v	
DTT	1 mM	
<b>Extraktionspuffer Mais</b>		
HEPES	100 mM	
Saccharose	0,8 M	
DTT	5 mM	pH 7,5
<b>Suspensionspuffer Mais</b>		
KPi pH 7,5	50 mM	
DTT	2 mM	
Glycerin	10 % v/v	
<b>PCR</b>		
KCl III		
Tris pH 8,8	10 mM	
KCl	50 mM	
MgCl <sub>2</sub>	2,5 mM	
KCl V		
Tris pH 8,8	10 mM	
KCl	50 mM	
MgCl <sub>2</sub>	2 mM	
DMSO		30 %
<b>Sonstiges</b>		
TE		
Tris	10 mM	
EDTA	0,5 mM	
pH 8		
PEG4000		
PEG 4000	50% w/v	in H <sub>2</sub> O
<b>Infiltrationsmedium für "floral dip"</b>		
MgCl <sub>2</sub>	10 mM	
Saccharose		5%
Silwet 77		0,05%
KPi pH 7,5		
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	20 ml	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	86 ml	
<b>Endkonzentrationen der Mediednzusatz</b>		
Ampicillin	100 mg/l	
Carbenicillin	100 mg/l	
Gentamicin	10 mg/l	
Kanamycin	50 mg/l	
MTX	0,25 mg/l	
PPT	25 mg/l	
Rifampicin*	50 mg/l	
X-Gal	40 mg/l	
iptg	0,2 mM	
*stock in DMSO		

## 8 Danksagung

Ich möchte mich zuerst bei Prof. Alfons Gierl dafür bedanken, dass er mich in seine Arbeitsgruppe aufgenommen und mir die Promotion ermöglicht hat. Seine Vorschläge und Hinweise waren vor allem in schwierigen Fragen hilfreich und wichtig.

Prof. Wilfried Schwab möchte ich für den Einsatz als Betreuer meiner Dissertation bedanken, für die Beratung und für die seine und die Hilfe der Mitarbeiter der Professur Biotechnologie der Naturstoffe bei MS Analysen.

Danke an PD. Thilo Fischer, der mich schon in meiner Masterarbeit betreut hat und sich als Mentor bei meiner Doktorarbeit eingesetzt hat.

Ich danke Dr. Thomas Hoffmann dafür, dass er viel seiner wertvollen Zeit für unsere Kollaboration aufgebracht hat und mir bei allen Fragen rund um die LC-MS stets geholfen hat.

Meinen Dank möchte ich auch Prof. Chris-Carolin Schön dafür ausdrücken, dass sie unsere Arbeitsgruppe in ihren Lehrstuhl aufgenommen und die Räumlichkeiten zur Verfügung gestellt hat und auch für die wertvollen Tipps bei Vorträgen und Publikationen. Ich möchte mich überdies dafür bedanken, dass sie sich dazu bereit erklärt hat den Vorsitz der Prüfungskommission zu übernehmen. Mein Dank gilt auch den Prüfern Prof. Wilfried Schwab und Prof. Corinna Dawid.

Mit Dankbarkeit erwähnt sei auch das von Prof. Claus Schwechheimer geführte Projekt SFB924 für die Finanzierung des Projekts, für die Unterstützung bei Reisen zu Konferenzen und den wissenschaftlichen Austausch mit anderen Arbeitsgruppen.

Ich möchte mich bei den folgenden Mitarbeitern des Lehrstuhls für Lebensmittelchemie und molekulare Sensorik für die Kollaborationen und Hilfe bedanken. Prof. Corinna Dawid für die Kollaboration mit unserem Projekt. Dr. Timo Stark für die Quantifizierung von Benzoxazinoiden in Arabidopsisextrakten. Dr. Richard Hammerl und Michael Gigl für die zeitaufwändigen Messungen der Phytohormone.

Ich danke Prof. Ralph Hüchelhoven, Dr. Alex Coleman und Dr. Martin Stegmann vom Lehrstuhl für Phytopathologie für die Hilfe bei allen Pathoassays mit Botrytis und Erysiphe.

PD. Dr. Corina Vlot und Marion Wenig vom BIOP am Helmholtz Zentrum München danke ich für die Beratung und Diskussionen über den Phytohormonhaushalt, Immunantworten, Salicylsäure und SAR sowie für die Durchführung der aufwändigen SAR Assays. Die Ergebnisse waren sehr wichtig.

Die Arbeitsatmosphäre bei den Pflanzenzüchtern war immer freundlich und motivierend. Das lag vor allem an dem außergewöhnlich freundlichen Team. Ich danke euch allen für die Gespräche übers Fach und darüber hinaus. Laura war nicht nur ein guter Gesprächspartner, sondern hat mir, wie Claudiu auch, in der Anfangsphase meiner Arbeit am Lehrstuhl sehr geholfen. Viktoriya, Sonja, Stella, Sylwia, Stefan, Daniel und alle anderen danke ich für die Diskussionen, ob wissenschaftlich oder nicht und für die Gesellschaft am Lehrstuhl.

Ich danke alle Studenten, die im Rahmen ihrer Abschlussarbeiten, Praktika oder Arbeiten als Hilfwissenschaftler an unserem Projekt mitgearbeitet haben. Insbesondere danke ich Le Hoang Nguyen, Benjamin Strickland und Sebastian Wagner für die Arbeiten an Hefen und Henriette Leicher, Marietta Lehnhard, Shuyao Chen und Jana Rohde für die Arbeiten an Arabidopsis.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Monika Fey. Danke für deine stete Unterstützung, Betreuung und Hilfe in allen Fragen, bei Vorträgen und Publikationen. Für die Diskussionen über unser Projekt und darüber hinaus; für die hilfreichen wissenschaftlichen und praktischen Tipps und Hinweise aber auch solche, die das wissenschaftliche Umfeld allgemein betreffen. Danke dafür, dass du mich auch noch in deinem Ruhestand weiterhin unterstützt. Danke aber auch für deine Geduld und die Freiheiten, die du mir erlaubt hast.