

Lehrstuhl für Genetik der
Technischen Universität München

Tryptophan- und Auxinbiosynthese in *Zea mays*

Verena Kriechbaumer
(Dipl.-Biol. Univ.)

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

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. G. Forkmann
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. A. Gierl
2. Univ.-Prof. Dr. E. Grill

Die Dissertation wurde am 2. November 2006 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 13. Dezember 2006 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Tryptophanbiosynthese	1
1.2 Auxin (IAA)	5
1.2.1 Auxinbiosynthese: Tryptophan-abhängig oder -unabhängig?	6
1.2.1.1 Tryptophan-unabhängige IAA-Biosynthese	7
1.2.1.2 Tryptophan-abhängige IAA-Biosynthese	7
1.2.2 Auxin im Mais-System	10
1.3 Ziele dieser Arbeit	12
2. Material und Methoden.....	13
2.1 Material und Bezugsquellen	13
2.1.1 Chemikalien und Reagenzien.....	13
2.1.2 Bakterien-Stämme	13
2.1.3 Phagenbanken	14
2.1.4 Hefestämme	14
2.1.5 Verwendete Vektoren	14
2.1.6 Oligonukleotide.....	15
2.1.7 Pflanzenmaterial und Anzucht.....	16
2.2 Pflanzenphysiologische Methoden	17
2.2.1 Wachstum in IAA-, IAN- bzw. IAM-haltigem Medium	17
2.2.2 Lanolin-Krümmungstest.....	17
2.3 Molekularbiologische Methoden	18
2.3.1 DNA-Isolierung	18
2.3.2 RNA-Isolierung	18
2.3.3 PCR-Techniken	18
2.3.4 Eluation von DNA-Banden aus Agarosegelen.....	18
2.3.5 DNA-Sequenzierung.....	19
2.3.6 Herstellung chemisch kompetenter <i>E.coli</i> Zellen.....	19
2.3.6.1 Herstellung chemisch kompetenter <i>E.coli</i> XL1 Blue-Zellen	19
2.3.6.2 Herstellung chemisch kompetenter <i>E.coli</i> BL21 (DE3)-Zellen.....	19
2.3.7 Klonierungen	20
2.3.7.1 Konstrukte für die heterologe Proteinexpression in <i>E.coli</i>	20
2.3.7.2 Köderplasmide für den Yeast-Two-Hybrid-Screen	20
2.3.7.3 Konstrukte für die Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i>	20
2.3.8 Durchführung von Yeast-Two-Hybrid-Screens	21
2.3.8.1 Hefemedien	21
2.3.8.2 Hefetransformation im kleinen Maßstab	21
2.3.8.3 Hefetransformation im großen Maßstab	22
2.3.8.4 β -Galactosidase-Test	22
2.3.8.5 Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefe	22
2.3.9 Herstellung transgener <i>Arabidopsis</i> -Pflanzen	23
2.3.9.1 Herstellung elektrokompenter Agrobakterien	23
2.3.9.2 Elektroporation von Agrobakterien	23
2.3.9.3 Plasmid Mini Prep von Agrobakterien	23
2.3.9.4 Pflanzentransformation.....	24

2.4	<i>Proteinbiochemische Techniken</i>	25
2.4.1	Proteinreinigung aus heterologer Expression in <i>E. coli</i>	25
2.4.2	Gesamtproteinbestimmung nach Bradford	25
2.4.3	Produktion von Antikörpern	25
2.4.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	26
2.4.5	Western Blots	26
2.4.6	Bestimmung der enzymatischen Eigenschaften heterologer Proteine	27
2.4.7	Bestimmung der endogenen Nitrilaseaktivität in Korn und Keimling	28
2.4.8	Nachweis der endogenen β -Cyanoalanin-Aktivität in Maiskörnern	28
2.4.9	Proteinreinigung aus Maiskörnern	28
2.4.10	Proteinreinigung aus Blattmaterial	30
2.4.11	Tryptophansynthase-Aktivitätstests	30
2.4.12	Isolierung von Indol-3-Glycerinphosphat aus <i>E. coli trpA2/F⁺trpA2</i> -Kulturen	31
2.4.13	Enzymatische IGP-Herstellung	32
2.4.14	IAN-Detektion und Quantifizierung via GC-MS	32
2.4.15	IAA-Quantifizierung in Körnern und Keimlingen	33
3.	Ergebnisse	34
3.1	<i>Tryptophansynthase-Komplex in Zea mays</i>	34
3.1.1	Mechanismus und Enzyme	34
3.1.2	α - und β -Aktivitäten in Maisextrakten	36
3.1.3	Komplexierung heterolog exprimierter α - und β - Untereinheiten	38
3.1.4	Aktivitäten heterolog exprimierter Proteine	40
3.2	<i>Kandidatengene der Auxinbiosynthese: Amidase</i>	42
3.2.1	Isolierung der cDNA von <i>ZmAmi1</i>	42
3.2.2	IAM-Effekte auf Koleoptile und Primärwurzel von Maiskeimlingen	43
3.3	<i>Kandidatengene der Auxinbiosynthese: Nitrilasen</i>	45
3.3.1	Nitrilaselokalisation und -quantifizierung	46
3.3.2	Physiologische Versuche: Wachstum in IAN-Medium	48
3.3.3	Physiologische Versuche: Lanolin-Krümmungstests	48
3.3.4	IAN-Detektion und -Quantifizierung via GC-MS	49
3.3.5	Charakterisierung von <i>in vitro</i> Enzymaktivitäten und Substratspezifitäten heterolog exprimierter Nitrilasen	50
3.3.6	pH- und Temperatur-Optima	52
3.3.7	Enzymaktivitäten im Heteromer aus beiden Nitrilasen	52
3.3.8	β -Cyanoalanin-Umsatz in wildtypischen und mutanten Körnern	54
3.3.9	Bestimmung endogener Nitrilaseaktivität in Korn und Keimling	55
3.3.10	Expression der Nitrilasen unter hormonellen und mechanischen Einwirkungen	56
3.3.11	IAA-Synthase-Komplex	57
3.3.12	Yeast-Two-Hybrid	59
3.3.12.1	Durchführung von Yeast-Two-Hybrid-Screens	59
3.3.12.2	Yeast-Two-Hybrid-Screens mit <i>ZmNit2</i> und <i>ZmNit1</i> gegen cDNA-Banken	60
3.3.12.3	Gerichteter Yeast-Two-Hybrid	61
3.3.13	Isolierung von Mu-getaggten Nitrilasemutanten	62
3.3.14	IAN-Sensitivität in Nitrilase-Mutanten	63
3.3.15	Primärwurzelwachstum in <i>ZmNit2</i> -Mutanten	65
3.3.16	IAA-Quantifizierung in Primärwurzel und Korn	65

4. Diskussion	69
4.1 <i>Tryptophansynthase</i>	69
4.1.1 α - und β -Aktivitäten in Maisextrakten	69
4.1.2 Enzyme des Tryptophansynthase-Komplexes in <i>Zea mays</i>	71
4.1.2.1 Mögliche α -Untereinheiten	71
4.1.2.2 Duplikation der TSA-Gene.....	73
4.1.2.3 Mögliche β -Untereinheiten.....	75
4.1.2.4 Duplikation der β -Untereinheiten	75
4.2 IAA-Synthase	77
4.3 Nitrilasen	79
4.3.1 Funktion der Nitrilasen in der Auxinbiosynthese	79
4.3.2 IAN als Substrat.....	80
4.3.3 Regulation der Nitrilaseaktivität?	82
4.3.4 Nitrilasen und ihre enzymatische Aktivität	84
4.3.5 Nitrilase-Heteromere mit dualer Enzymaktivität	86
5. Zusammenfassung	90
6. Literatur	93

Abkürzungen

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

Å	Angström ($1 \text{ \AA} = 10^{-10} \text{ m}$)
ACC	1-Aminocyclopropan-1-Carboxylsäure
Ami	Amidase
3-AT	3-Amino-1,2,4-Triazol
<i>At</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A.thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Abb.	Abbildung
AD	Aktivierungsdomäne
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
BD	Bindedomäne
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
<i>bx</i>	Benzoxazineless-Mutation
β -Cy	β -Cyanoalanin
cDNA	Komplementäre DNA
CV	<i>Column volume</i> (Säulenvolumen)
DIBOA	2,4-Dihydroxy-1,4-Benzoxazin-3-on
DIMBOA	2,4-Dihydroxy-7-Methoxy-1,4-Benzoxazin-3-on
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTE	Dithioerithrol
DTT	Dithiothreitol
DW	<i>dry weight</i> (Trockengewicht)
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-N-N-N`-N`-Tetraacetat
FW	<i>fresh weight</i> (Frischgewicht)
g	Fallbeschleunigung ($g = 9,81 \text{ m/s}^2$)
GAP	Glycerinaldehyd-3-phosphat
GAPDH	Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
H ₂ O dest.	Destilliertes Wasser
H ₂ O-VE	Vollentsalztes Wasser
His	Histidin
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IAA	Indol-3-Essigsäure
IAM	Indol-3-Acetamid
IAN	Indol-3-Acetonitril
IAOx	Indol-3-Acetaldoxim
IGP	Indol-3-Glycerinphosphat
IGL	Indolglycerinphosphatlyase
kb	Kilobasenpaare
k_{cat}	Wechselzahl
k_{cat}/K_M	katalytischer Effizienzparameter
kDa	Kilo Dalton
K_M	Michaelis-Menten-Konstante
KAc	Kaliumacetat

KCl	Kaliumchlorid
Kol	Koleoptile
K-P	Kalium-Phosphat
l	Liter
<i>lacZ</i>	β -Galactosidase-Gen
Leu	Leucin
LiAc	Lithiumacetat
MeJa	Methyljasmonat
mM	millimolar
MS	Massenspektrometrie
μ M	micromolar
n	Anzahl der Wiederholungen von Experimenten
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
NAD	Nicotinamiddinukleotid
Na-P	Natriumphosphat
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
Nit	Nitrilase
n.K.	nach Keimung
n.P.	nach Pollinierung
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PW	Primärwurzel
Rf	<i>retention factor</i>
Rif	Rifampicin
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>
35S	CAMV („Cauliflower Mosaic Virus”)-35S-Promotor
<i>S.cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
Taq-Polymerase	<i>Thermus aquaticus</i> -DNA-Polymerase
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N-N-N'-N'-Tetramethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Trp	Tryptophan
TSA	α -Untereinheit der Tryptophansynthase
TSB	β -Untereinheit der Tryptophansynthase
U	Unit
UV	Ultraviolett
v	Volumen
V	Volt
V_{max}	maximale Umsetzungsgeschwindigkeit
w	Gewicht (<i>weight</i>)
W.n.P.	Wochen nach Pollinierung
WT	Wildtyp
<i>Zm</i>	<i>Zea mays</i>
$^{\circ}$ C	Grad Celsius

1. Einleitung

1.1 Tryptophanbiosynthese

Tryptophan ist ein essentieller Bestandteil der Ernährung. Menschen, Tiere und auch einige Eubakterien sind nicht in der Lage Tryptophan selbst zu synthetisieren und müssen es über die Nahrung aus Pflanzen und mikrobiellen Quellen aufnehmen (Crawford, 1989; Bentley, 1990), um neben Proteinen auch andere Verbindungen wie z.B. das Neurohormon Serotonin bilden zu können.

In Pflanzen ist die Aminosäure Tryptophan zusätzlich zu ihrer Rolle in der Proteinbiosynthese Ausgangspunkt einer Vielzahl von Sekundärmetaboliten wie Indolalkaloiden, Indolglucosinolaten und Phytoalexinen (Facchini, 2001; Glawischnig *et al.*, 2003; Pedras *et al.*, 2000). Indolalkaloide lassen sich in vielen Pflanzenfamilien wie den Apocynaceae oder Rubiaceae finden, die zahlreiche medizinisch wirksame Pflanzen umfassen. Glucosinolate, die bei Gewebeerstörung durch Myrosinasen zu biologisch aktiven Abbauprodukten hydrolysiert werden, sind als die charakteristischen Geschmacksstoffe in Brassicaceen wie Senf oder Kohl bekannt. Die Mannigfaltigkeit der sekundären Pflanzenstoffe bedingt auch eine große Zahl an beteiligten Genen. Bei *Arabidopsis thaliana* sollen etwa ein Viertel aller Gene (d.h. ca. 5000) am Sekundärmetabolismus beteiligt sein (The *Arabidopsis* genome initiative, 2000).

Tryptophan wird in den Chloroplasten gebildet und entweder über ein Transportsystem in das Cytoplasma exportiert oder direkt in den Plastiden weiterprozessiert (Berg *et al.*, 2002). Die Synthese aller aromatischen Aminosäuren geht von der Chorismatbiosynthese aus, in der durch Kondensation von Erythrose-4-phosphat mit Phosphoenolpyruvat ein offenkettiger C-7-Zucker gebildet wird, der nach Zyklisierung zuerst in das Intermediat Shikimat und dann in Chorismat überführt wird. Aus Chorismat und Glutamin entsteht unter Pyruvat-Freisetzung die Tryptophanvorstufe Anthranilat. Durch eine Kondensationsreaktion mit Phosphoribosylpyrophosphat entsteht ein aktiviertes Intermediat aus dem H₂O und CO₂ abgespalten und Indol-3-Glycerinphosphat (IGP) gebildet wird (Berg *et al.*, 2002) (Abb.1.1). Die anschließende Umsetzung von IGP zu Tryptophan wird von den Untereinheiten der Tryptophansynthase (EC 4.2.1.20) katalysiert, die bei Bakterien als $\alpha\beta\alpha$ -Komplex vorliegt. In diesem funktionellen Komplex, der bei *Escherichia coli* und *Salmonella typhimurium* bereits eingehend untersucht wurde, sind die α -Untereinheiten (*TrpA*) für die Spaltung des Indol-3-Glycerinphosphats in Indol und Glycerinaldehyd-3-phosphat zuständig, die β -Untereinheiten (*TrpB*) für die Anlagerung des Serins an Indol. Letzteres wird in der ersten Teilreaktion nicht freigesetzt, sondern an die β -Untereinheiten

weitergeleitet (= kooperativer Mechanismus); erst das gebildete Tryptophan verlässt den Komplex. Das β_2 -Paar arbeitet mit Pyridoxalphosphat als prosthetischer Gruppe; durch ihre Reaktion mit Serin entsteht intermediär eine Schiff-Base, welche dann mit Serin als Cosubstrat reagiert.

Der *E.coli* $\alpha\beta\alpha$ -Komplex befindet sich in einem schnellen Gleichgewicht mit freien Untereinheiten, die ungebunden allerdings relativ instabil sind (Nishio *et al.*, 2005). Mittels Dichtegradientenzentrifugation mit den isolierten und assoziierten Untereinheiten wurde gezeigt, dass es sich bei TrpA um ein monomeres Protein handelt, während TrpB als Homodimer vorliegt (Creighton und Yanofsky, 1966). Obwohl die isolierten TrpA- und TrpB-Proteine ihre jeweilige Reaktion mit messbarer Rate katalysieren können, laufen beide Einzelreaktionen und die physiologische Gesamtreaktion im Komplex wesentlich effizienter ab; beispielsweise erhöht sich die katalytische Effizienz der α -Untereinheit durch die Komplexbildung um das 1850fache (Weischet und Kirschner, 1976). Dies beruht auf einer Konformationsänderung am α L6-Loop, die das aktive Zentrum der TSA in einen geschlossenen hoch aktiven Zustand versetzt (Schneider *et al.*, 1998). Ein Vergleich der Kristallstruktur der monomeren α -Untereinheit von *E.coli* mit dem *S.typhimurium*-Komplex weist anstatt der 2' Helix einen Loop auf, wodurch sich die Konformation des aktiven Zentrums verändert. Diese Region ist wichtig für Aktivierung und β -Bindung. Auch nimmt die in diesem Loop gelegene katalytische Aminosäure Asp60 im Monomer eine völlig andere Position ein als im Komplex (Nishio *et al.*, 2005).

Durch die Komplexbildung nähern sich die beiden aktiven Zentren der Untereinheiten räumlich einander an. Kristallisation des Gesamtkomplexes aus *Salmonella typhimurium* ergab einen Abstand von lediglich 25 bis 30 Å und zusätzlich eine tunnelartige Verbindung, die Raum für bis zu vier Moleküle Indol bietet (Hyde *et al.*, 1988). Weitere Experimente zeigten, dass Indol in der Tat durch diesen Tunnel zum aktiven Zentrum der β -Untereinheit transportiert wird (Dunn *et al.*, 1990) und dass dieser Transport von der Konformation des Enzyms abhängig ist. So werden durch die Bindung von Serin, dem zweiten Substrat der β -Untereinheit, die Konformation des Enzyms und damit der Transport von Indol im intramolekularen Tunnel beeinflusst (Anderson *et al.*, 1991). Ebenso verändert die Bindung von IGP an die α -Untereinheit die Konformation des Enzyms, so dass durch eine wechselseitige Aktivierung der beiden Untereinheiten durch allosterische Interaktion die beiden Teilreaktionen an den Untereinheiten „im Takt“ ablaufen und aufeinander abgestimmt sind. Dadurch wird die größtmögliche Effizienz bei der Zusammenarbeit der beiden Untereinheiten gewährleistet (Pan *et al.*, 1997). Ein Vergleich der Umsatzraten in Komplex und Einzelkomponenten spricht dafür,

dass die IGP-Spaltung und nicht der Indol-Transfer oder die β -Reaktion den limitierenden Schritt darstellt (Lane und Kirschner, 1991).

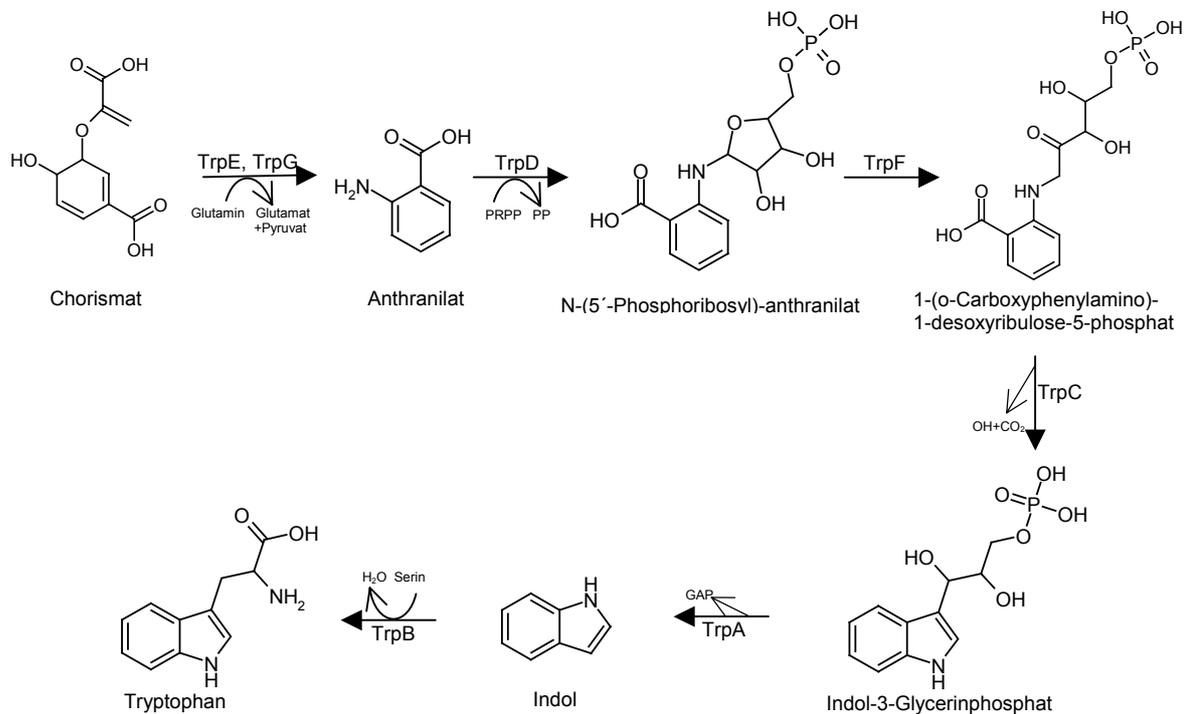


Abbildung 1.1: Reaktionen und Enzyme der Tryptophanbiosynthese in *E. coli*.

TrpE und TrpG: große und kleine Untereinheit der Anthranilatsynthase; TrpD: Anthranilatphosphoribosyltransferase; TrpF: N-(5'-Phosphoribosyl)-Anthranilatisomerase; TrpC: Indol-3-Glycerinphosphatsynthase; TrpA: α -Untereinheit der Tryptophansynthase; TrpB: β -Untereinheit der Tryptophansynthase.

Im Gegensatz zur separaten Synthese der TSA- und TSB-Untereinheiten in Bakterien, produzieren Pilze wie *Saccharomyces cerevisiae* oder *Neurospora crassa* ihre aktive Tryptophansynthase als Dimer aus einem Polypeptid, das die fusionierten TSA- und TSB-Domänen enthält (Dettwiler und Kirschner, 1979; Matchett und DeMoss, 1975). Dies bietet einen Regulationsmechanismus für die Synthese der Untereinheiten, was in Bakterien durch die Lage der Tryptophansynthase-Gene in einem Operon gelöst wird (Yanofsky und Crawford, 1987).

Da TSB-Gene aus *Arabidopsis* und Mais keine Informationen der TSA-Untereinheiten codieren (Last *et al.*, 1991; Wright *et al.*, 1992), stärkt das die Hypothese, dass pflanzliche Tryptophansynthase-Enzyme wie in Prokaryoten aus einzelnen Untereinheiten aufgebaut sind. In Mais ließ sich anhand von Fütterungsexperimenten Einbau von Indol und Serin in Tryptophan nachweisen, was darauf hinweist, dass die Tryptophansynthase in Mais analog zu anderen höheren Pflanzen und Mikroorganismen verläuft (Gupta *et al.*, 1982). Wie das Bakterienenzym stellt die pflanzliche Tryptophansynthase einen Komplex aus

zwei Paaren von Untereinheiten ($\alpha\beta\beta\alpha$) dar, die aber auch voneinander getrennt werden können (Delmer und Mills, 1968). Die Komplexierung von α - und β -Untereinheiten in *Arabidopsis*-Blattextrakten konnte durch Cochromatographie in einer Immunoaffinitätsreinigung gezeigt werden (Radwanski *et al.*, 1995). Im Komplex wird von den α -Untereinheiten produziertes Indol zu den β -Untereinheiten transportiert. β -Untereinheiten agieren auch ohne Komplex mit einer α -Untereinheit als vollständig aktiv, die Eigenaktivität der pflanzlichen α -Untereinheit wurde bisher nicht schlüssig nachgewiesen (Nagao und Moore, 1972). Maiskeimlingsextrakte sind in der Lage nach Zugabe von Indol Tryptophan herzustellen (Wright *et al.*, 1992). Unabhängig vom Channeling im Komplex – also vom Transport des von der α -Untereinheit produzierten Indols zur β -Untereinheit – scheint also auch die Möglichkeit zu bestehen direkt freies Indol zu verwerten.

Die Mais- β -Untereinheiten *ZmTSB1* und *ZmTSB2*, die beide starke Homologien zu Tryptophansynthase- β -Genen anderer Organismen aufweisen, wurden über die Mutante *orange pericarp (orp)* identifiziert. Diese Mutante besitzt keine nachweisbare Tryptophansynthase- β -Aktivität und ist daher für Tryptophan auxotroph (Wright *et al.*, 1991). Ferner akkumuliert sie aufgrund der Feedback-Regulierung der Tryptophanbiosynthese große Mengen an den Tryptophanvorstufen Anthranilat und Indol, das vom Endosperm ins Perikarp diffundiert und dort die namensgebende orange Färbung bewirkt (Wright *et al.*, 1992).

1.2 Auxin (IAA)

Ein wichtiges Tryptophanderivat im Pflanzenreich ist das am häufigsten vorkommende Auxin Indol-3-Essigsäure (IAA), das bereits vor mehr als 50 Jahren erstmals aus Pflanzen isoliert wurde (Luckwill, 1952). IAA beeinflusst verschiedenste Prozesse wie tropische Antworten auf Licht und Schwerkraft, embryonale und vaskuläre Entwicklung und den generellen Aufbau der Wurzel- und Sprossarchitektur. Dabei fördert Auxin die Seitenwurzelbildung, wirkt aber inhibierend auf die Entstehung von Seitensprossen und sorgt so für Apikaldominanz. IAA könnte wohl auch für „*Induces Almost All*“ stehen und wurde von Ottoline Leyser kürzlich in einem Radiointerview als „*brains of the plant world*“ bezeichnet (Vogel, 2006).

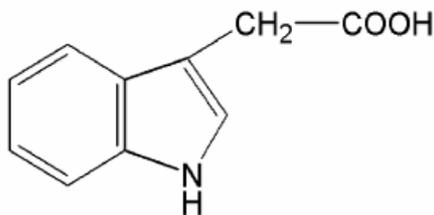


Abbildung 1.2: Struktur der Indol-3-Essigsäure (IAA).

IAA wird in allen stark teilungsaktiven Geweben gebildet: im Apikalmeristem des Sprosses, in der Wurzelspitze und in jungen Blättern und von dort aus unidirektional transportiert. Da der Großteil von IAA im Apikalmeristem gebildet wird, kommt es zu einem Konzentrationsgradienten zwischen Spross und Wurzel, der für viele Effekte der Pflanzenentwicklung verantwortlich zeichnet. Bei niedrigen, sprich physiologischen Konzentrationen wird das Streckungswachstum von Spross und Koleoptile gefördert. Dabei sorgt der basipetale IAA-Transport dafür, dass im Apikalmeristem gebildetes IAA zu den subapikalen Zellen, die durch ihre Teilung das Wachstum bewirken, gelangt. Hohe durch exogenes IAA erzeugte Konzentrationen hemmen das Streckungswachstum durch Aktivierung der Synthese des „Stresshormons“ Ethylen. Ähnliches ist auch bei der Wurzelbildung zu beobachten. Bei niedrigen, physiologischen IAA-Konzentrationen wird das Wachstum der Primärwurzel gefördert, bei hohen durch exogenes IAA erzeugten Konzentrationen wird dieses gehemmt und die Bildung von Seiten- und Adventivwurzeln verstärkt. Weitere durch Auxin induzierte Effekte sind der Photo- beziehungsweise der Gravitropismus. Diese Effekte werden dadurch hervorgerufen, dass Auxin lateral ungleichmäßig verteilt ist. Beim Phototropismus kommt es zu einem lateralen IAA-Transport weg von der stärker beleuchteten Sprossseite, was ein verstärktes Zellwachstum auf der lichtfernen Seite und damit eine Krümmung zum Licht zur Folge hat. Beim Gravitropismus wird genau das gleiche Prinzip genutzt, nur wird diesmal nicht durch

Licht sondern durch die Schwerkraft der laterale IAA-Transport ausgelöst (Taiz und Zeiger, 2000).

IAA ist gewöhnlich als freies Molekül aktiv. Gleichwohl akkumulieren die meisten IAA-Metaboliten als Ester, gebunden an Inositol, CoenzymA, Zucker, Polysaccharide oder Glycoproteine und als IAA-Amid-Verbindungen mit Aminosäuren, kleinen Peptiden oder Proteinen (Cooke *et al.*, 2002). In Maisprimärwurzeln liegen 80% (Meristem) bis 60% (Wachstums- und Differenzierungszone) des IAA verestert vor (Saugy *et al.*, 1986). Ein Mechanismus der Veresterung von IAA wurde für *Zea mays* und *Arabidopsis thaliana* aufgeklärt (Szerszen *et al.*, 1994; Jackson *et al.*, 2001); die Amidbindung von IAA an Aminosäuren in *Arabidopsis* kann durch IAA-Amidosynthetasen der GH3-Genfamilie erfolgen (Staswick *et al.*, 2005). Die Freisetzung von IAA aus den Konjugaten erfolgt durch eine enzymatisch katalysierte Hydrolyse (Bartel und Fink, 1995). IAA kann auch via Decarboxylierung und oxidativen Biosynthesewegen abgebaut werden und so ermöglichen Biosynthese, Transport, Konjugation, Konjugathydrolyse und Degradierung in der Pflanzenzelle eine präzise homöostatische Regulation intrazellulärer IAA-Level (Ljung *et al.*, 2002; Woodward und Bartel, 2005).

Obwohl die Wirkung von Auxinen auf Pflanzen also bereits relativ gut bekannt ist, erschwert die wahrscheinliche Existenz mehrerer IAA-Biosynthesewege, die kombiniert und je nach Organismus, Entwicklungsstadium, Gewebe oder Umwelteinwirkung unterschiedlich reguliert auftreten können, die Aufklärung der Auxinbiosynthese erheblich (Normanly und Bartel, 1999; Bartel *et al.*, 2001). Des Weiteren könnten die Synthesemöglichkeiten eine Art metabolisches Netz bilden und sich der Aufrechterhaltung der Auxinhomeostase und lokalem IAA-Bedarf dynamisch anpassen.

1.2.1 Auxinbiosynthese: Tryptophan-abhängig oder -unabhängig?

In verschiedenen Pflanzen wurde aufgrund von Markierungsexperimenten, beispielsweise durch parallele Markierung mit [¹⁵N]Anthranilat und [²H₅]Tryptophan, die Funktion sowohl einer IAA-Biosynthese mit Tryptophan als Zwischenstufe als auch einer Tryptophan-unabhängigen Biosynthese postuliert. Der Anteil beider Wege an der Syntheseleistung war dabei abhängig von Umwelteinflüssen und dem untersuchten Organ (Östin *et al.*, 1999). Bislang sind jedoch keine Zwischenprodukte oder beteiligte Enzyme der Tryptophan-unabhängigen Biosynthese bekannt.

1.2.1.1 Tryptophan-unabhängige IAA-Biosynthese

Eine Tryptophan-unabhängige IAA-Biosynthese, ausgehend von Indol oder Indol-3-Glycerinphosphat (IGP), wurde dabei erstmals auf Grund der Charakterisierung von Tryptophan-auxotrophen Mutanten in Mais (*orp1*, *orp2*; Wright *et al.*, 1991) und *Arabidopsis thaliana* (Normanly *et al.*, 1993) postuliert, welche trotz Defekts in der Tryptophansynthese erhöhte Mengen an IAA synthetisieren. Die entsprechenden Enzymreaktionen und der Ursprung der Essigsäure-Seitengruppe konnten allerdings nicht identifiziert werden. Da die *Arabidopsis trp3-1*-Mutante, die einen Defekt in der α -Untereinheit der Tryptophansynthase (TSA) aufweist, darüber hinaus gegenüber Wildtyp-Pflanzen 250fach erhöhte Konzentrationen an IGP akkumuliert, welches aufgrund seiner Instabilität auch nicht-enzymatisch zu IAA umgesetzt wird, wurde die Aussage dieser Mutantenexperimente angezweifelt (Müller und Weiler, 2000a).

Des Weiteren ergaben sich in einer retrobiosynthetischen NMR-Analyse an Mais-endosperm im Laufe der Kornentwicklung bei Fütterungsexperimenten mit [U- $^{13}\text{C}_6$]Glucose und [1,2- $^{13}\text{C}_2$]Acetat unter physiologischen Bedingungen bereits klare Hinweise auf einen dominierenden Tryptophan-abhängigen IAA-Metabolismus, wobei die chemische Bindung zwischen Indolring und Seitenkette erhalten bleibt, und keine Anzeichen auf eine Beteiligung Tryptophan-unabhängiger Synthese hindeuten (Glawischnig *et al.*, 2000).

1.2.1.2 Tryptophan-abhängige IAA-Biosynthese

Die Umsetzung von Tryptophan zu IAA wurde in Koleoptilenspitzen (Koshiba *et al.*, 1995) und Körnern (Glawischnig *et al.*, 2000) von Mais, in Zellkulturen (Michalczuk *et al.*, 1992) und Hypocotylen (Ribnicky *et al.*, 1996) von Karotten und im Wurzel- und Blattsystem von *Arabidopsis thaliana* (Müller *et al.*, 1998; Müller und Weiler, 2000a) nachgewiesen. Einbauexperimente mit spezifischen Vorstufen und die Identifizierung enzymatischer Schritte *in vivo* zeigen mehrere Biosynthesewege von Tryptophan zu IAA auf (Abb.1.3).

IAA kann aus Tryptophan durch Desaminierung und Decarboxylierung über Indol-3-Acetaldehyd gebildet werden, das durch Aldehyddehydrogenasen oder Aldehydoxidasen zu IAA umgesetzt wird. Eine dazugehörige Aldehydoxidase (IAAId zu IAA) mit einem apparenten K_M -Wert von 3,2 μM wurde aus Maiskoleoptilen aufgereinigt (Koshiba *et al.*, 1996). Basierend auf Aminosäuresequenzen konnten zwei homologe Gene (*ZmAO-1* und *ZmAO-2*) isoliert werden, die beide in Wurzeln und Spross von Keimlingen (Sekimoto *et al.*, 1997), sowie in Körnern, wo auch endogene Aldehydoxidase-Aktivität nachgewiesen werden konnte (Cho, Kriechbaumer, Park, unveröffentlichte Daten), exprimiert sind. Da

dieses Enzym aber in Bezug auf Aldehyde ein breites Substratspektrum aufweist, müssen auch andere Funktionen – wie z.B. analog zur *Arabidopsis* Aldehydoxidase3 im letzten Schritt der Biosynthese von Abscisinsäure – in Betracht gezogen werden (Sekimoto *et al.*, 1997). Indolpyruvat wurde als endogener Bestandteil im Sprossgewebe von Tomaten identifiziert und der entsprechende Biosyntheseweg von Tryptophan über Indolpyruvat und Indol-3-Acetaldehyd (IAAld) in Bakterien charakterisiert (Cooney *et al.*, 1989).

Alternativ wird auch Indol-3-Acetamid (IAM) als Intermediat diskutiert. Dieser IAA-Syntheseweg wurde bei vielen Bakterien, so zum Beispiel bei *Pseudomonas savastanoi* (Magie *et al.*, 1963), *Agrobacterium* (Weiler und Schröder, 1987), *Azospirillum brasilense* (Bar und Okon, 1993) und *Streptomyces* (Manulis *et al.*, 1994) beschrieben. Die Synthese geht dabei immer von L-Tryptophan aus und bildet dann über zwei enzymatische Schritte IAA: eine Tryptophan-2-Monooxygenase decarboxyliert Tryptophan und das dabei gebildete IAM wird durch eine Indol-3-Acetamidhydrolase deaminiert; eine solche Amidase (AtAMI1), die IAM zu IAA umsetzen kann und bevorzugt in Blättern exprimiert ist, wurde nun auch in *Arabidopsis* identifiziert (Pollmann *et al.*, 2003).

In Brassicaceen wurde ferner ein IAA-Biosyntheseweg via Indol-3-Acetaldoxim (IAOx) und Indol-3-Acetonitril (IAN) postuliert. Für jeden der beteiligten Schritte wurden die entsprechenden Enzymaktivitäten beschrieben (Helminger *et al.*, 1985) bzw. die verantwortlichen Gene kloniert (Bartel und Fink, 1994; Bartling *et al.*, 1994; Hull *et al.*, 2000; Mikkelsen *et al.*, 2000). Der Umsatz von Tryptophan zu IAOx wird dabei von Cytochrom P450-Enzymen der 79B-Unterfamilie katalysiert. In Mais ergab sich allerdings kein Hinweis auf das Vorhandensein von CYP79B-Homologen.

Die Synthese von IAA aus IAN wird durch Nitrilasen katalysiert. Diese Enzyme finden sich in einer Vielzahl von Pflanzenfamilien einschließlich Crucifereae, Gramineae und Musaceae (Thimann und Mahadevan, 1964), in Tieren (*Caenorhabditis elegans*), Pilzen (*Saccharomyces cerevisiae*) und vielen Bakterien (Pace und Brenner, 2001). Das *Arabidopsis*-Genom codiert vier Nitrilase-Isoenzyme (Bartel und Fink, 1994; Bartling *et al.*, 1992; 1994), von denen drei – AtNIT1/2/3 – *in vitro*-Umsatz von IAN zu IAA zeigen und eng geclustert vorliegen. Die häufigste Isoform AtNIT1 spielt eine Rolle während der Infektion mit dem Erreger der Kohlhernie („clubroot disease“) *Plasmodiophora brassicae* (Grsic-Rausch *et al.*, 2000). Die Bildung von Wurzelknöllchen bei einer solchen Infektion deckt sich mit höheren IAA- und Nitrilase-Leveln in infizierten Zellen. *Atnit1* knock-out-Mutanten entwickeln einhergehend mit niedrigeren Konzentrationen an freiem IAA als wildtypische Pflanzen auch kleinere Knoten und reagieren im Gegensatz zu *Atnit2*- und *Atnit3*-Mutanten nicht sensitiv auf exogenes IAN (Normanly *et al.*, 1997). Kürzlich wurde eine zusätzliche Regulation von AtNIT1 auf Proteinebene beobachtet: nach mechanischer Verwundung aggregiert AtNIT1-Protein und wird mit einer frühen Phase von

wundinduziertem Zelltod in Verbindung gebracht (Cutler und Somerville, 2005). *AtNIT2* wurde eine spezifische Rolle in der IAA-Biosynthese bei der Unterbrechung der Samenruhe zugesprochen, wohingegen *AtNIT3* spezifisch in schwefelarmem Wurzelwerk exprimiert wird (Vorwerk *et al.*, 2001; Kutz *et al.*, 2002). *AtNIT4* hingegen akzeptiert IAN überhaupt nicht als Substrat (Normanly und Bartel, 1999), sondern zeigt mit ihrer hohen Aktivität gegenüber β -Cyanoalanin eine wahrscheinliche Rolle bei der Cyanid-Detoxifikation auf (Piotrowski *et al.*, 2001).

Als mögliche IAA-Vorstufe wurde auch Tryptamin im Spross von Tomaten identifiziert (Cooney *et al.*, 1991). Tryptamin wird durch die Decarboxylierung von Tryptophan gebildet. Die entsprechenden Enzyme (Tryptophan-Decarboxylasen) sind in Pflanzen, die Indolalkaloide aus Tryptamin produzieren, wie z.B. *Catharanthus roseus* Zellkulturen, bereits gut charakterisiert. In diesem Fall geht der Bildung von Alkaloiden eine schnelle, aber transiente Steigerung der Decarboxylase-Aktivität (Eilert *et al.*, 1987) voraus, einhergehend mit einer Induktion des entsprechenden Transkripts, was durch Auxinzugabe unterdrückt werden kann (Pasquali *et al.*, 1992). Eine Überexpression der *Catharanthus* Tryptophan-Decarboxylase in *Brassica napus* resultiert – wahrscheinlich aufgrund von Konkurrenzreaktionen um Tryptophan – in einer drastischen Abnahme von Indolglucosinolaten. Dennoch zeigen sich solche Pflanzen morphologisch unverändert, was Tryptamin als Vorstufe von IAA in diesem System unwahrscheinlich erscheinen lässt (Chavadej *et al.*, 1994).

Es wurde auch die Beteiligung einer Flavin-abhängigen Monooxygenase an der IAA-Biosynthese erwogen, die Tryptamin als Substrat akzeptiert. Aus dem N-hydroxylierten Produkt könnte dann IAOx gebildet werden (YUCCA, Zhao *et al.*, 2001). *Loss-of-function*-Mutationen in vier von elf *Yuc*-Genen führen in *Arabidopsis* zu lokal verminderten Auxinkonzentrationen und Auxin-typischen Defekten in Entwicklung, Größe, Apikal-dominanz und Fertilität (Cheng *et al.*, 2006), während Überexpression zu erhöhter Auxinproduktion führt (Zhao *et al.*, 2001). *Yuc*-Gene konnten auch in anderen Pflanzengenomen einschließlich denen von Reis, Mais, *Medicago* und *Petunia* identifiziert werden. Generell besitzt diese Enzymfamilie geringe Substratspezifität. Allerdings eröffnet effizientes Channeling die Möglichkeit, dass auch relativ unspezifische Enzyme, wie Flavin-abhängige Monooxygenasen oder Nitrilasen an der IAA-Biosynthese beteiligt sein können.

In *Arabidopsis* wird die Komplexität noch durch die Vernetzung von Sekundär-metabolismus und IAA-Biosynthese erhöht. Daraus resultierte auch die Annotation einiger Gene des Sekundärmetabolismus als am IAA-Stoffwechsel beteiligte Gene, wie zum Beispiel den *superroot*-Genen. Daher ist die Untersuchung der IAA-Biosynthese in

Pflanzensystemen, die wie eben z.B. Mais keine Abwehrstoffe aus Tryptophan synthetisieren, viel versprechend. Zusätzlich zu Genomsequenzierungen werden zur Zeit auch Mutantenkollektionen anderer Modellpflanzen, wie etwa Reis, *Medicago*, *Lotus* oder *Physcomitrella* erstellt, anhand derer dann vielleicht generelle, für das gesamte Pflanzenreich gültige Mechanismen gefunden werden können.

1.2.2 Auxin im Mais-System

Aufgrund seiner ökonomischen Bedeutung stellt Mais ein bereits gut untersuchtes genetisches Modell dar. Der Hauptteil der IAA-Biosynthese findet bei Mais in reifenden Körnern statt, große Mengen an IAA-Estern werden dabei im Endosperm gelagert (Epstein *et al.*, 1980), was auf eine Beteiligung von IAA an der polaren Embryo- und Keimlingsentwicklung hinweist und das Maissystem für biochemische Analysen in dieser Richtung besonders geeignet macht.

Im Gegensatz zu *Arabidopsis* bildet Mais seine Phytoanticipine (DIBOA und DIMBOA) nicht aus Tryptophan sondern aus Indol und weist damit eine unterschiedliche Verzweigung zwischen IAA-Biosynthese und Sekundärmetabolismus auf. Für deren Biosynthese synthetisiert *ZmBX1* – ein Homologes zur Tryptophansynthase α – Indol, das in einer Folge von vier Cytochrom P450-Reaktionen zu 2,4-Dihydroxy-Benzoxazin-3-on (DIBOA) oxidiert wird (Frey *et al.*, 1997). Da Benzoxazinoidbiosynthese und -abbau und diskutierte IAA-Biosynthesewege keine gemeinsamen Zwischenprodukte aufweisen, kann im Maissystem eine Funktion von potentiellen IAA-Biosynthesegenen im Sekundärmetabolismus ausgeschlossen werden. Ein weiterer Pluspunkt für das Maissystem liegt darin, dass Mais nicht wie Brassicaceen Indolglucosinolate über IAOx synthetisiert, bei deren Abbau IAN als Intermediat auftritt (Hogge *et al.*, 1988). So werden die genetischen Vorteile, die *Arabidopsis thaliana* ansonsten als Modellsystem gelten lassen, durch die Komplexität des Indolmetabolismus in diesen Pflanzen und durch das Fehlen geeigneter Methoden gemindert. Deswegen konzentrierten sich die Experimente dieser Arbeit nun auf *Zea mays*, der keine Indolglucosinolate, aber im Korn ausreichend IAA (Epstein *et al.*, 1980) enthält.

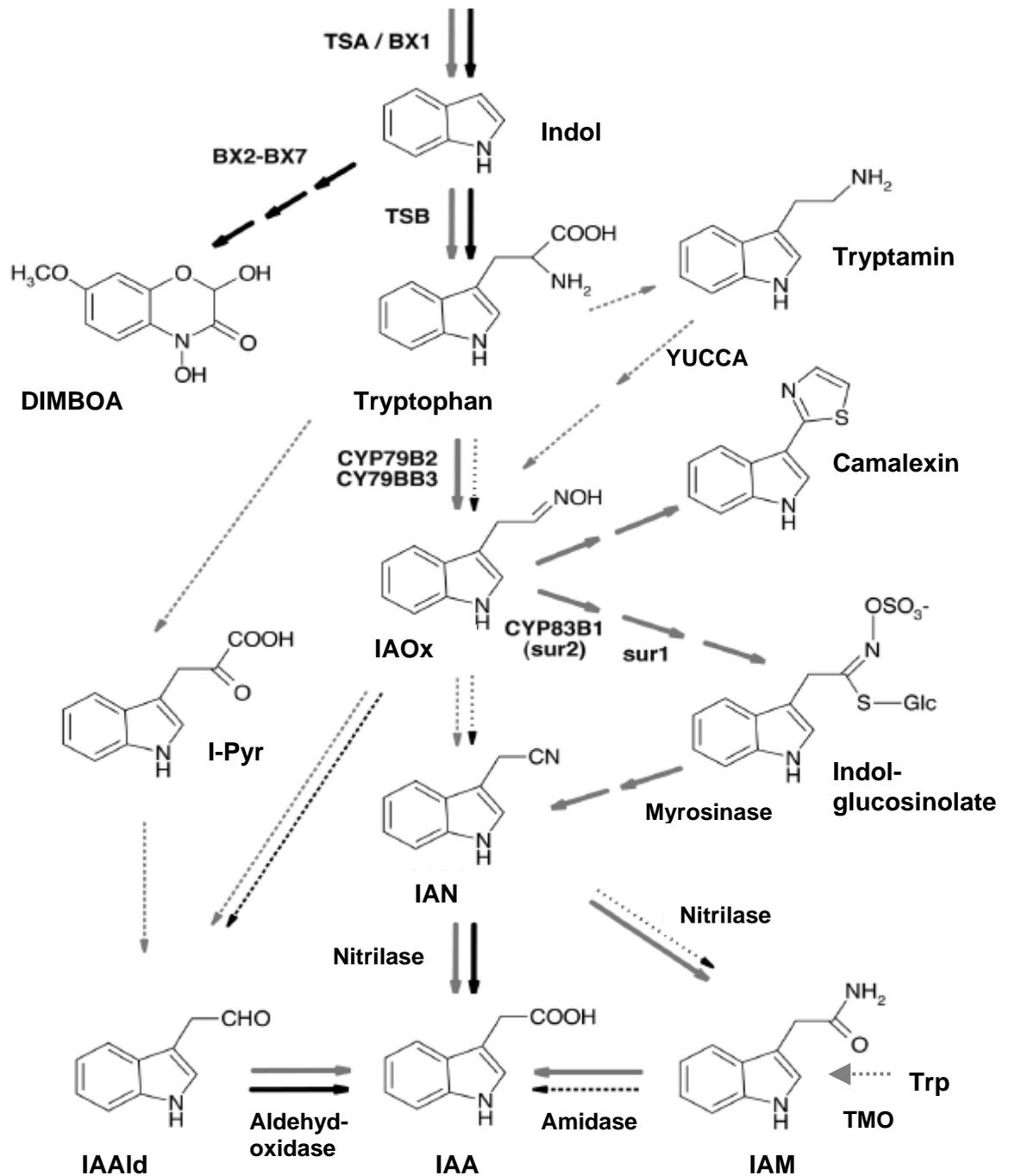


Abbildung 1.3: Tryptophan-Metabolismus und IAA-Biosynthese in *Zea mays* (schwarze Pfeile) and *Arabidopsis* (graue Pfeile). IAOx: Indol-3-Acetaldoxim; IAN: Indol-3-Acetonitril; IAA: Indole-3-Essigsäure; I-Pyr: Indol-3-Pyruvat; IAAld: Indol-3-Acetaldehyd; IAM: Indole-3-Acetamid; DIMBOA: 2,4-Dihydroxy-7-Methoxybenzoxazin-3-on; TMO: Tryptophan-2-Monooxygenase;

1.3 Ziele dieser Arbeit

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte zum einen der Tryptophansynthase-Komplex aus *Zea mays* charakterisiert und seine aktiven Untereinheiten identifiziert werden.

Zum anderen sollte im Zusammenhang mit der Aufklärung der Auxinbiosynthese der von Müller und Weiler (2000b) für *Arabidopsis thaliana* beschriebene IAA-Synthase-Komplex aus Maiskörnern isoliert werden, da dieses Modellsystem den Vorteil bietet, dass Auxin in hoher Konzentration im Korn gespeichert vorliegt und im Gegensatz zu *Arabidopsis* Gene aus Auxin- und Sekundärmetabolismus nicht interferieren.

Darüber hinaus war die Identifizierung und Charakterisierung von Kandidatengenomen der Tryptophan-abhängigen Biosynthese zu bearbeiten. Hierbei standen vor allem die beiden Maisnitrilasen in Form von heterolog exprimierten Proteinen und die entsprechenden Mutanten, aber auch eine Amidase im Blickfeld der Untersuchung.

2. Material und Methoden

2.1 Material und Bezugsquellen

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Die verwendeten Chemikalien (analytischer Reinheitsgrad) wurden von den Firmen Bio-Rad® (USA), Boehringer (Mannheim), Fluka (Schweiz), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma-Aldrich (USA) bezogen. Enzyme wurden von den Firmen Gibco/BRL (Eggenstein), New England Biolabs (USA), Qiagen (Hilden), Roche (Schweiz), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (USA) und Stratagene (USA) geliefert.

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von den Firmen Sigma-Genosys (Großbritannien) und Sigma-Ark (Darmstadt) synthetisiert. Hybridisierungsmembranen wurden von Amersham (GE Healthcare) bezogen. Die Aufreinigung rekombinanter Proteine aus *E.coli* wurde mit Ni-NTA Agarose von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) durchgeführt. Sequenziert wurde mit dem BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit von Applied Biosystems (USA). Des Weiteren wurden Agarose von Biozym, DNA-Affinitätssäulen von Qiagen (Düsseldorf) und Chromatographiesäulen von Amersham (GE Healthcare) und Bio-Rad® verwendet.

2.1.2 Bakterien-Stämme

Tabelle 2.1: Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Verwendung
<i>E.coli</i> XL1 Blue	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thireIA1 lac⁻ lac [F⁻proAB⁺ lacI^q lacZΔM15 Tn10 (Tet¹)]</i> ; Bullock <i>et al.</i> , 1987.	Standardklonierungen
<i>E.coli</i> BL21 (DE3)	<i>hsdS, gal, [λcl, ts857, cnd 1, hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi1, relA1]</i> ; Studier und Mofat, 1986.	Proteinexpression
<i>E.coli</i> <i>trpA2/F⁻trpA2</i>	<i>cysB trpA2/F⁻trpA2 cysB⁺</i> , Creighton und Yanofsky, 1972.	IGP-Herstellung
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV2260	C58C1 pTiB6s3ΔT CbR, Deblaere <i>et al.</i> , 1985.	<i>Arabidopsis</i> -Transformation

2.1.3 Phagenbanken

Es wurden folgende Phagenbanken verwendet:

- cDNA-Bank: CI31A, zwei Tage alte Keimlinge, pAD-GAL4-2.1 Phagemid Vektor (Dr. Annette Martin. Primärbank mit 3×10^6 Transformanden)
- cDNA-Bank: A609, Körner 15 Tage nach Pollinierung, pAD-GAL4-2.1 Phagemid Vektor (Dr. Annette Martin)

2.1.4 Hefestämme

Der Hefestamm *S.cerevisiae* YRG-2

Genotyp: *MATa ura3-52 his3-200 ade2-101 lys2-801 leu2-3 112 gal4-542 gal80-538*

LYS::UAS_{GAL1} –TATA_{Gal1} –HIS3 URA3::UAS_{GAL4 17mers(x3)} –TATA_{CYC1} –*lacZ* (Stratagene)

wurde als Ausgangsstamm zur Herstellung von Reporterstämmen für den Yeast-Two-Hybrid-Screen verwendet.

2.1.5 Verwendete Vektoren

Tabelle 2.2: Verwendete Vektoren

Vektor	Herkunft	Selektion	Organismus	Verwendung
pBluescript KS ⁺	Stratagene	Ampicillin	<i>E.coli</i>	Standardklonierungen
pET3a-His	Rosenberg <i>et al.</i> , 1987	Ampicillin	<i>E.coli</i>	Proteinexpression
pET28a-His	Novagen	Kanamycin	<i>E.coli</i>	Proteinexpression
pBD-GAL4 Cam	Stratagene	Chloramphenicol (-) Tryptophan	<i>E.coli</i> <i>S.cerevisiae</i>	Köderplasmid Yeast-Two-Hybrid-Screen
pAD-GAL4-2.1	Stratagene	Ampicillin (-) Leucin	<i>E.coli</i> <i>S.cerevisiae</i>	Aktivierungsplasmid Yeast-Two-Hybrid-Screen
pPS 48	KVL Dänemark	Ampicillin	<i>E.coli</i>	<i>ZmNit2</i> -Überexpression in <i>Arabidopsis</i>
pCambia 2300	www.cambia.org	Kanamycin	<i>E.coli</i> <i>A.thaliana</i>	<i>ZmNit2</i> -Überexpression in <i>Arabidopsis</i>

2.1.6 Oligonukleotide

Folgende Oligonukleotide wurden als Primer für PCR- und Sequenzierreaktionen verwendet:

Tabelle 2.3: Primer zur Herstellung von Expressionskonstrukten

Name des Primers	Verwendung	Sequenz 5'→ 3'
AmidF	Amidase-Klonierung in pET28a	GAG AAC TGG GAA CAT ATG GCG ATG GGG TTA
AmidR	Amidase-Klonierung in pET28a	TGC GCC TAT GCC GGA TCC ACA TCT ACT
Ami5	Amidase-Sequenzierung <i>reverse</i>	CTG AGC CAC ACT CAG GAG GAA
Ami6	Amidase-Sequenzierung <i>reverse</i>	CTG AAT TTG TAG TAG GCA CTC
Ami7	Amidase-Sequenzierung <i>forward</i>	CAG ATT CTC AAT GCT TCG GTA

Tabelle 2.4: Primer zum Nachweis von *Mu*-Insertionen in der genomischen Sequenz im Rahmen der Genotypisierung von Mais Nitrilase 1-, Nitrilase 2- und Amidase1-Mutanten.

Name des Primers	Verwendung	Sequenz 5'→ 3'
Aux23	<i>ZmNit2</i> WT- und <i>Mu</i> -Bande	TCA GGT CGA GAA TAG TGG CCC
Aux35	<i>ZmNit2</i> WT-Bande	TGG AGG GGG GAT GCT TTG TC
Aux7	<i>ZmNit1</i> WT- und <i>Mu</i> -Bande	TCC GAT TGG AAA AAT GGG TGC TC
Aux8	<i>ZmNit1</i> WT-Bande	ACC TCA GGT CGC GAG TAG TG
Mu2	<i>ZmNit1</i> , <i>ZmNit2</i> und <i>ZmAmi1</i> <i>Mu</i> -Bande	AGA GAA GCC AAC GCC AWG GCC TCY ATT TCG
Ami1	<i>ZmAmi1-1</i> und 1-4 WT- (500 bp) und <i>Mu</i> -Bande (250 bp)	TTC ACG GCC TCA CCT TCG CTA
Ami2	<i>ZmAmi1-2</i> WT- Bande (450 bp)	CCG TGT CAC TGG GTT CGG CAA
Ami3	<i>ZmAmi1-2</i> WT- (450 bp) und <i>Mu</i> -Bande (500 bp)	GCC ATC TCA TCC ATG ACG GTC
Ami4	<i>ZmAmi1-1</i> und 1-4 WT-Bande (500 bp)	CAG AGC GAA GTC GAC GAG TTT

Tabelle 2.5: Primer zur Herstellung von Yeast-Two-Hybrid-Konstrukten und zur Sequenzierung von Kandidaten aus dem Screen:

<i>Name des Primers</i>	<i>Verwendung</i>	<i>Sequenz 5'→ 3'</i>
Nit1pBDFor	Klonierung <i>ZmNit1</i> -pBD	CCT GCA GGA ATT CAT GGC CCT GGT
Nit1pCamR	Klonierung <i>ZmNit1</i> -pBD	CGG GCA TGC GTC GAC GAG CTC ATT
VNitmismatchF	Klonierung <i>ZmNit2</i> -pBD	CTA TAT CTT AAG CGA GAG CAC TGG AGC CCG A
VNit2mismatchF2	Klonierung <i>ZmNit2</i> -pBD	GAT ATA GAA TTC GCT CTC GTG ACC TCG GGC T
pAD.GAL.strat.for	pAD-GAL4-2.1	AGG GAT GTT TAA TAC CAC TAC
pAD.GAL.strat.rev	pAD-GAL4-2.1	GCA CAG TTG AAG TGA ACT TGC
pBD.GAL4.for	pBD-GAL4 Cam	CAT TGA GAC AGC ATA GAA TAA G
pBD.GAL4.rev	pBD-GAL4 Cam	GAA TTA GCT TGG CTG CAG T

2.1.7 Pflanzenmaterial und Anzucht

Für die Enzymtests zum IAA-Synthase-Komplex wurde Zuckermais der Sorte Landmark (*Zea mays L.*) verwendet, der 5 Wochen nach der Pollinierung geerntet und bei -70°C aufbewahrt worden war.

Adulte Pflanzen und Keimlinge der Inzuchtlinie B73 von Prof. Dr. P. Schnable (Iowa State University) dienten als Material für physiologische Versuche und Tryptophansynthese-Studien.

Verschiedene Transposon-Insertionsmutanten im B73-Hintergrund wurden von Pioneer Hi-Bred International (USA) zur Verfügung gestellt.

Für die Aufzucht von Pflanzen wurden Körner 30 s in 100% Ethanol und 3 min in 6% Na-Hypochlorid gereinigt, gut nachgewaschen und mindestens zwei Stunden in H_2O dest. eingeweicht. Die Keimlinge wurden bis zu 3 Tage im Dunkeln bei 28°C in feuchtem Keimpapier (Filterpapier Sorte 603/N, 75 g/m^2 , $193 \times 580 \text{ mm}$, Firma Sartorius) vorgezogen, dann in Jiffy Pots mit einem 3:1-Gemisch aus Erde (Frühstorfer Typ LD 80) und Quarzsand (Dorsilit 0,6-1,2 mm) gepflanzt und in Pflanzenkammern (Heraeus HPS

2000, Tag: 16 h Licht bei 28°C, Nacht: 8 h Dunkel bei 18°C, Luftfeuchtigkeit 70%) weiter herangezogen bis sie nach ca. 10 Tagen ins Gewächshaus gebracht und dort später gekreuzt bzw. geselbstet werden konnten. Die Kolben wurden 5 Wochen nach der Kreuzung geerntet und bei 28°C getrocknet.

2.2 Pflanzenphysiologische Methoden

2.2.1 Wachstum in IAA-, IAN- bzw. IAM-haltigem Medium

IAA, IAN oder IAM wurden in Ethanol gelöst und dem Keimungswasser in verschiedenen Endkonzentrationen zugesetzt. Maiskörner wurden in Keimpapier eingerollt und in diesem Wasser bis zum gewünschten Zeitpunkt gezogen; anschließend wurden Primärwurzel- und Koleoptilenlänge vermessen. Als Kontrolle dienten Pflanzen aus Keimungswasser, dem lediglich eine äquivalente Menge Ethanol zugegeben worden war.

2.2.2 Lanolin-Krümmungstest

Lanolin-Krümmungstests wurden nach Haga und Iino (1998) an Maiskoleoptilen durchgeführt. Dazu wurde in einem Eppendorfgefäß eine abgewogene Menge Lanolin mit der entsprechenden Menge IAM, IAN bzw. IAA (gelöst oder als Pulver) im 50°C-Wasserbad unter Rühren mit einer Pasteurpipette geschmolzen. Ein Tröpfchen dieses Lanolin/IAA- bzw. Lanolin/IAN-Gemisches wurde auf eine Seite der Maiskoleoptile aufgetragen. Behandelte Pflanzen wurden im Dunkeln inkubiert, um Krümmungen zum Licht hin zu vermeiden. Als Kontrolle dienten Koleoptilen von Pflanzen, die mit reinem Lanolin behandelt worden waren.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 DNA-Isolierung

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien erfolgte durch alkalische Lyse nach Birnboim und Doly (1979).

Bei Pflanzen wurde zur Gewinnung von genomischer DNA aus Blattmaterial DNAzol® LS Reagent von GibcoBRL® nach Herstellerprotokoll verwendet.

Die Isolierung von DNA aus Phagen erfolgte wie bei Sommer *et al.* (1990) und Frey *et al.* (1990) beschrieben.

2.3.2 RNA-Isolierung

Zur Isolierung von Pflanzen-RNA wurde TRIzol® LS Reagent von GibcoBRL® nach Protokoll des Herstellers verwendet.

2.3.3 PCR-Techniken

PCR-Reaktionen (Sambrook und Russell, 2001) wurden in 20 µl-Ansätzen im Thermoblock UNO (Biometra) durchgeführt und zwar standardmäßig in 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 3% DMSO, mit 0,5 mM dNTPs, 1 µM jedes Primers und 1 Unit Taq DNA Polymerase (Boehringer, Mannheim).

10x Loading Dye: 0,01 g Bromphenolblau
 2,5 ml 0,5 M EDTA (pH 8.0)
 2,5 g Ficoll 400
 ad 10 ml H₂O dest., sterilfiltrieren.

2.3.4 Eluation von DNA-Banden aus Agarosegelen

Zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde der GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit von Amersham Bioscience (GE Healthcare) nach Angaben des Herstellers verwendet.

2.3.5 DNA-Sequenzierung

Sequenzierungen erfolgten nach der Didesoxy-Methode von Sanger *et al.* (1977) und wurden am Lehrstuhl mit einem Kapillarsequenzierer ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) durchgeführt. Sequenzreaktionen wurden nach Herstellerangaben mit dem BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit von Applied Biosystems durchgeführt.

Zu sequenzierende DNA wurde zuvor einer PEG-Fällung (Sambrook und Russell, 2001) unterzogen. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit Hilfe der Software Lasergene von DNASTAR Inc. (USA) und VectorNTI (Invitrogen).

2.3.6 Herstellung chemisch kompetenter *E.coli* Zellen

2.3.6.1 Herstellung chemisch kompetenter *E.coli* XL1 Blue-Zellen

Mit einer 5 ml Übernachtskultur von *E.coli* XL1 Blue (Tetracyclin-Resistenz) wurden 100 ml dYT-Medium angeimpft. Bei einer $OD_{600} < 0,5$ wurde die Kultur für 20 min bei 4500 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 30 ml TBF I gelöst, 20 min auf Eis inkubiert und danach für 5 min bei 4000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 3,6 ml TBF II resuspendiert, aliquotiert (je 100 µl), in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C aufbewahrt.

TBF I: 30 mM KAc, 50 mM MnCl, 100 mM RbCl, 10 mM CaCl₂, 15% Glycerin, pH 5.0 mit Essigsäure eingestellt und sterilfiltriert.

TBF II: 10 mM NaMOPS pH 7.0, 10 mM RbCl, 15 mM CaCl₂, 15% Glycerin, sterilfiltriert.

2.3.6.2 Herstellung chemisch kompetenter *E.coli* BL21 (DE3)-Zellen

Die Herstellung kompetenter *E.coli* BL21-Zellen erfolgte exakt wie die von kompetenten *E.coli* XL1 Blue-Zellen.

2.3.7 Klonierungen

2.3.7.1 Konstrukte für die heterologe Proteinexpression in *E. coli*

Expressionskonstrukte für *ZmNIT1* im Vektor pET28a-His und *ZmNIT2* im Vektor pET3a-His wurden von Dr. Erich Glawischnig hergestellt (Park *et al.*, 2003). Da die cDNA-Sequenz von *ZmNit2* im N-Terminus nur unvollständig vorlag, war der fehlende Teil über einen *Bam*HI-Schnitt aus dem genomischen *ZmNit2*-Klon angefügt worden.

Expressionskonstrukte in pET28a-His für *ZmTSAlike1*, *ZmTSAlike2* und *ZmTSB1* wurden dankenswerterweise von Dr. Monika Frey und Andreas Fießelmann zur Verfügung gestellt.

Das Konstrukt für die Amidase1 (*ZmAmi1*) wurde nach einem cDNA-Bank-Screen mit dem PCR-Produkt von *Ami1* und *Ami4* als Sonde über die Schnittstellen *Nde*I und *Xho*I in einen pET28a-His-Vektor kloniert.

2.3.7.2 Köderplasmide für den Yeast-Two-Hybrid-Screen

Köderkonstrukte von *ZmNit1* und 2 wurden in den Vektor pBD-GAL4 Cam einkloniert. Dazu wurden durch PCR jeweils im Bereich des Startcodons eine *Eco*RI-Schnittstelle und am 3'-Ende eine *Sal*I-Schnittstelle eingeführt. Für den gerichteten Yeast-Two-Hybrid wurde *ZmNit1*-pBD mit *Eco*RI/*Sal*I verdaut, das Insert über Agarosegelelektrophorese aufgereinigt und in den Vektor pAD-GAL4-2.1 ligiert.

2.3.7.3 Konstrukte für die Transformation von *Arabidopsis thaliana*

Für das *ZmNit2*-Überexpressionskonstrukt in *Arabidopsis* wurde das *ZmNit2*-Insert aus dem Hefevektor pBD-GAL4 Cam mit *Sma*I und *Eco*RI herausgeschnitten, die Enden mit T4-Polymerase aufgefüllt und daraufhin mit *Sal*I geschnitten. Das Insert wurde über *Sma*I/*Sal*I in den Vektor pPS 48 einkloniert und danach mit dem 35S-Promoter dieses Vektors über *Xba*I herausgeschnitten und in den Transformationsvektor pCambia 2300 einkloniert.

2.3.8 Durchführung von Yeast-Two-Hybrid-Screens

Die Durchführung des Yeast-Two-Hybrid-Screens erfolgte mit leichten Abänderungen analog den Protokollen des *Yeast Protocols Handbook* (Clontech; #PT3024-1).

2.3.8.1 Hefemedien

Die Anzucht des Wildtypstammes YRG-2 erfolgte im Vollmedium YPDA (20 g/l Bacto-Trypton, 10 g/l Hefeextrakt, 0,003% Adenin-HCl, 2% Glucose, 20 g/l Agar-Agar). Als Selektionsmedium diente SD-Medium (6,7 g/l Difco™ *Yeast Nitrogen Base without amino acids*, 2% Glucose, 20 g/l Agar-Agar), das je nach Selektionsanforderung mit bestimmten Aminosäurezusammensetzungen (0,62 g/l *Dropout Supplement*: -Leu/-His, -Leu/-Trp/-His von Clontech) versetzt wurde.

2.3.8.2 Hefetransformation im kleinen Maßstab

Zur Herstellung von Köderstämmen (YRG-2 mit *ZmNit1*- bzw. *ZmNit2*-pBD) war eine Transformation im kleinen Maßstab ausreichend. Für eine Übernachtskultur wurden Kolonien von Platte für etwa 30 s unter Vortexen in 1 ml H₂O resuspendiert und in 50 ml YPDA-Medium überführt. Die Hefesuspension wurde anschließend 16 bis 18 Stunden bei 30°C und 260 rpm geschüttelt. Danach sollte die Kultur mindestens eine OD₆₀₀=1,5 erreicht haben. Die Hefen wurden auf eine OD₆₀₀ = 0,2 - 0,3 in 300 ml YPDA überführt und für 3 Stunden, also einen Teilungszyklus, weitergeschüttelt. Die Hefekultur wurde in Falcons 5 min mit 1000x g abzentrifugiert. Die Pellets wurden in 50 ml TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5) vereinigt. Es folgten ein weiterer 5 minütiger Zentrifugationsschritt und die Resuspension des Pellets in 1,5 ml TE/LiAc-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 100 mM LiAc, pH 7.5).

Zur Transformation wurden 1 µg Plasmid-DNA (*ZmNit1*- oder *ZmNit2*-pBD) mit 300 µg aufgekochter Träger-DNA (*Salmon Sperm*, Sigma D-9156), 100 µl der kompetenten Hefezellen und 600 µl PEG-Puffer (32% (w/v) PEG 4000 in 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 100 mM LiAc, pH 7.5) für 30 min bei 30°C und 200 rpm geschüttelt. Nach Zusatz von 70 µl DMSO wurde der Ansatz für 15 min zum Hitzeschock ins 42°C-Wasserbad und anschließend 2 min auf Eis gestellt. Nach dem Hitzeschock wurden die Hefezellen abzentrifugiert (1000x g, 5 min), in 500 µl TE resuspendiert und in 20, 50 und 100 µl-Aliquots auf Selektionsplatten (SD^{-Trp}) ausgestrichen, die mit Parafilm umschlossen und für fünf bis sieben Tage bei 30°C inkubiert wurden.

2.3.8.3 Hefetransformation im großen Maßstab

Mit dem verwendeten Protokoll war es möglich hohe Transformationsraten und damit ein Screening von 10^5 bis 10^6 unabhängigen Klonen der cDNA-Bank im Yeast-Two-Hybrid zu erzielen. Die Gewinnung der kompetenten Hefezellen aus Transformanden der Primärtransformation im kleinen Maßstab erfolgte wie unter 2.3.8.2 beschrieben, allerdings immer unter Verwendung von Selektionsmedium (SD^{-Trp}).

Zur Hitzeschock-Transformation wurden 250 µg Plasmid-DNA (cDNAs aus Maiskörnern oder Keimlingen) mit 3 mg Träger-DNA, 1 ml der kompetenten Hefezellen und 6 ml PEG-Puffer (32% (w/v) PEG 4000 in 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 100 mM LiAc, pH 7.5) in einem Falcon-Gefäß gut gemischt und im Schüttler für 30 min bei 200 rpm und 30°C inkubiert. Nach Zugabe von 700 µl DMSO wurde der Ansatz für 15 min zum Hitzeschock ins 42°C-Wasserbad und anschließend 2 min auf Eis gestellt. Der Ansatz wurde daraufhin mit 50 ml SD^{-Trp} -Medium versetzt, für 30 min bei 30°C und 200 rpm geschüttelt, 5 min mit 1000x g abzentrifugiert und in 7 ml TE-Puffer aufgenommen. 500 µl-Aliquots wurden auf Selektionsplatten ($SD^{-Trp/-Leu/-His}+30$ mM 3-AT) ausgebracht, die mit Parafilm umschlossen und für fünf bis sieben Tage bei 30°C inkubiert wurden.

2.3.8.4 β -Galactosidase-Test

Zur Durchführung von β -Galactosidase-Testversuchen wurde eine Hefekolonie in 500 µl H_2O dest. unter Vortexen resuspendiert. Von dieser Suspension wurden 5 µl auf eine Selektionsplatte ($SD^{-Trp/-Leu/-His}+30$ mM 3-AT) gespottet und drei bis vier Tage bei 30°C inkubiert. Die entstehenden Kolonien wurden mit 8 mm dickem Filterpapier (Blotting-Papier GB002, Schleicher & Schuell) von der Platte abgezogen. Der Filter wurde zwei- bis dreimal in flüssigen Stickstoff getaucht und dazwischen wieder aufgetaut. Danach wurde das Filterpapier in einer Petrischale auf ein weiteres Filterpapier gelegt, das in 3 ml Z-Puffer (60 mM Na_2HPO_4 , 46 mM NaH_2PO_4 , 10 mM KCl, 1 mM $MgSO_4$) mit 8 µl β -Mercaptoethanol und 50 µl einer 100 mM X-Gal-Lösung getränkt war. Es folgte eine Inkubation bei 30°C für bis zu 6 Stunden bzw. bis zu einer Blaufärbung der Hefe-Spots.

2.3.8.5 Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefe

Eine Hefekolonie wurde nach Hoffman und Winston (1987) in 2 ml $SD^{-Trp/-Leu/-His}$ -Medium angeimpft und in einem Reagenzglas bei 30°C und 200 rpm für vier Tage geschüttelt. Die Kultur wurde in einem Eppendorfgefäß abzentrifugiert und das Pellet in 200 µl Hefe-Lysis-Puffer (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 1% SDS, 2% Triton X-100)

aufgenommen. Nach Zugabe von 300 mg Glaskügelchen (Sigma #G8772) und 200 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) wurde die Mischung für 2 min gevortext und ausgeschüttelt. Die DNA wurde mit 2,5 Vol Ethanol und 0,1 Vol 3 M NaAc, pH 5.2, nach 20 min auf Eis und Zentrifugation aus der wässrigen Phase gefällt und in 25 µl TE aufgenommen. Davon wurden 5 µl zur Rücktransformation in *E.coli* eingesetzt.

2.3.9 Herstellung transgener *Arabidopsis*-Pflanzen

2.3.9.1 Herstellung elektrokompetenter Agrobakterien

Eine 200 ml YEP (10 g/l Pepton, 5 g Yeast Extrakt, 5 g NaCl, pH 7.0 mit 35 mg/l Rifampicin zur Selektion) -Übernachtkultur wurde in Falcon-Röhrchen bei 4500 rpm und 4°C für 10 min abzentrifugiert. Die Pellets wurden mit je 45 ml 10% eiskaltem Glycerin gewaschen. Dieser Waschschrift wurde zunächst mit 45 ml, dann mit 20 ml 10% Glycerin wiederholt und die Pellets dabei vereinigt. Die Zellen wurden erneut in 4 ml 10% Glycerin gewaschen und anschließend in 2 ml resuspendiert. 100 µl-Aliquots wurden in vorgekühlte Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert.

2.3.9.2 Elektroporation von Agrobakterien

Ein Aliquot elektrokompetenter Agrobakterien wurde auf Eis aufgetaut und mit ca. 1-3 µg Plasmid-DNA versetzt. Nach 2 min auf Eis wurden die Zellen in eine kalte Küvette pipettiert. Die Küvette wurde daraufhin in den Schlitten des Bio-Rad® Gene-Pulsers eingesetzt und der Schlitten bis zum Einrasten eingefahren. Dann wurde die Spannung angelegt (Einstellung des Geräts: 400 Ω; 25 µF; 2,5 kV; capac. extender 125 µF) und 1 ml YEP-Medium (10 g/l Pepton, 5 g Yeast Extrakt, 5 g NaCl, (12 g Agar-Agar) pH 7.0) zum Transformationsansatz pipettiert. Die Zellen wurden in ein Reagenzglas überführt und 2 h bei 28°C in den Roller gestellt. Anschließend wurden 50 µl auf YEP-Medium mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert.

2.3.9.3 Plasmid Mini Prep von Agrobakterien

In einem Reagenzglas wurden 10 ml YEP-Medium mit entsprechenden Antibiotika und Agrobakterien versetzt und im Roller bei 28°C ÜN, bei Animpfen mit einer einzelnen Kolonie für zwei bis drei Tage inkubiert. Die Zellen wurden pelletiert und in 150 µl Lysis-Puffer (50 mM Glucose, 25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA) resuspendiert. Nach

Zugabe von 300 µl Lösung II (0,2 N NaOH, 1% SDS), invertieren und 5 minütiger Inkubation auf Eis wurden 225 µl 7,5 M Ammoniumacetat zupipettiert, erneut durch Invertieren gemischt und für 5 min auf Eis inkubiert. Nach 10 minütiger Zentrifugation bei 14000 rpm und 4°C wurde der Überstand mit 20 µg/ml RNase versetzt und die Proben wurden bei 37°C für 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit je 1 Vol Phenol/Chloroform (1:1) und Chloroform/ Isoamylalkohol (24:1) ausgeschüttelt.

Die DNA aus den wässrigen Phasen wurde mit 800 µl Isopropanol und 15 minütiger Zentrifugation bei 14000 rpm gefällt und mit 70%igem Ethanol gewaschen. Die DNA-Pellets wurden getrocknet und anschließend in 20 µl TE aufgenommen. Zur Analyse der Plasmid-DNA kann diese entweder in einer PCR eingesetzt oder in *E.coli* rücktransformiert werden.

2.3.9.4 Pflanzentransformation

Bei den zu verwendenden Pflanzen wurden die Blütenstängel ca. zwei Wochen vor der Transformation abgeschnitten, um die Bildung von Blüten zu induzieren. Kurz vor der Transformation wurden dann die schon vorhandenen Schoten von den Pflanzen entfernt. 200 ml frisches YEP-Medium wurden mit 10 ml Starterkultur angeimpft und über Nacht bei 28°C und 220 bis 250 rpm inkubiert. Die Zellen wurden bei 3600 rpm für 20 min abzentrifugiert und in 300 ml 10 mM MgCl₂, 5% Saccharose und 0,05% Silwet L-77 resuspendiert. Die Blüten von vier bis sechs Pflanzen wurden nun für 10 s in die Suspension getaucht. Die Pflanzen wurden für zwei bis drei Tage in eine Pflanzenkammer bei 21°C und 12 stündigem Tag-Nacht-Rhythmus gestellt. Nach zwei bis drei Wochen wurden die Pflanzen zum Abreifen der Samen nicht mehr gegossen.

2.4 Proteinbiochemische Techniken

2.4.1 Proteinreinigung aus heterologer Expression in *E.coli*

Zur heterologen Expression von *ZmNit1* und *ZmNit2* wurden die entsprechenden Konstrukte in den *E.coli*-Stamm BL21 (DE3) transformiert. Transformanten wurden in 100 ml dYT-Medium (16 g/l Pepton, 10 g/l Yeast Extract, 5 g/l NaCl, H₂O-VE auf 1 Liter) bis zu einer OD₆₀₀ von 0,2 bis 0,3 angezogen, mit 0,5 mM IPTG induziert und nach 2 bis 12 Stunden bei 37°C geerntet. Das His-getaggte Protein wurde unter nativen Bedingungen durch Affinitätsreinigung über Ni-NTA-Agarose (Qiagen) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt (The QIAexpressionist, 2001).

2.4.2 Gesamtproteinbestimmung nach Bradford

Die Konzentrationsbestimmung wurde mit dem Bio-Rad® Protein Assay nach Bradford (1976) durchgeführt. Bei der Bradfordbestimmung erfolgt der Proteinnachweis durch eine Verschiebung des Absorptionsmaximums des Chromophors Coomassie Brilliantblau von 465 auf 595 nm infolge einer Komplexbildung zwischen dem Farbstoff und den kationischen bzw. hydrophoben Aminosäureseitenketten. Pro Ansatz wurden 1 bis 50 µl Probe in 800 µl H₂O und 200 µl Bio-Rad-Reagenz im Photometer bei 595 nm vermessen und gegen eine Kontrolle ohne Protein abgeglichen. Der Proteingehalt wurde über eine mit BSA erstellte Standarddeichkurve ermittelt.

2.4.3 Produktion von Antikörpern

Heterolog exprimiertes, Ni-NTA-gereinigtes *ZmNIT1*- und *ZmNIT2*-Protein wurde zur Immunisierung von Kaninchen durch die Firma Eurogentec (Belgien) verwendet. Die gelieferten Antikörper (Anti-*ZmNIT1* und Anti-*ZmNIT2*) wurden in Western Blots getestet. In beiden Fällen zeigte sich Kreuzreaktivität, Anti-*ZmNIT1*-Antikörper erwiesen sich für beide Nitrilasen als sensitiver als Anti-*ZmNIT2*-Antikörper.

Sekundäre Anti-IgG-Kaninchen-Antikörper, gekoppelt mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5 und einer alkalischen Phosphatase von der Firma Sigma, wurden von der Firma Amersham bezogen.

2.4.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung denaturierter Proteine nach ihrem Molekulargewicht wurde eine diskontinuierliche Tris-Glycin SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Lämmli, 1970: 10% bzw. 12,5%iges Trenngel, 5%iges Sammelgel) durchgeführt.

	10% Trenngel	12,5% Trenngel	5% Sammelgel
1M Tris, pH 8.8	5,6 ml	7,5 ml	-
1M Tris, pH 6.8	-	-	625 µl
H ₂ O	3,25 ml	2,7	3,1 ml
10% SDS	150 µl	200 µl	50 µl
30% Acrylamid	5,0 ml	8,3 ml	835 µl
1% APS	1,0 ml	1,3 ml	400 µl
TEMED	20 µl	14 µl	4,5 µl

Die obigen Mengenangaben reichen für 4 Gele. Die Polymerisation von Trenn- als auch von Sammelgel benötigt je 45 min. Während der Auspolymerisierung wurde das Trenngel mit 0,1% SDS überschichtet. Die Proteinproben wurden mit 1/5 Volumen 5x Lämmli-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 100 mM DTT, 10% (w/v) SDS, 0,05% (w/v) Bromphenolblau, 50% (w/v) Glycerin) versetzt, ca. 10 min aufgekocht und in die Geltaschen pipettiert.

Zur Elektrophorese wurden „Mighty-Small“ Apparaturen (Bio-Rad®) mit 1x PAGE-Laufpuffer (25 mM Tris-HCl, pH 8.3, 250 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS) bei 20 mA pro Gel und maximaler Spannung benutzt. Die Proteine wurden mit Coomassieblau (Sigma) (1 g/l Coomassie Brilliant Blue R-250, 50% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Eisessig; Entfärbelösung: 100 ml/l Methanol, 100 ml/l Eisessig, 800 ml/l H₂O-VE) oder Silber (Bio-Rad®) wie vom Hersteller angegeben angefärbt.

2.4.5 Western Blots

SDS-Polacrylamidgele wurden nach der Elektrophorese mit einem SemiDry-Blotter (Bio-Rad®) und Western Transfer-Puffer (48 mM Tris, 39 mM Glycin, 20% Methanol, 0,0375% SDS) auf Nitrocellulose-Membranen geblottet. Nach dem Blot wurde die Membran zur Kontrolle des Transfers mit Ponceau Rot (Sigma) gefärbt und photographiert. Die Färbung wurde vorsichtig mit Wasser abgewaschen und die Membran mit Tris/Salt/Tween-Puffer (TST: 6,1 g/l Tris-HCl, 8,8 g/l NaCl, 0,5% (v/v) Tween 20, pH 8.5) für 1 h geblockt.

Anschließend wurde die Membran für 1 h in TST mit primären Antikörpern (1:400) geschüttelt. Nach 3x 15 min Waschen mit TST wurde die Membran für eine weitere Stunde in TST mit dem sekundären Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (1:3000) inkubiert, der mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5 (Amersham) gekoppelt ist. Danach wurde die Membran erneut 3x 5 min mit TST gewaschen und im Red Fluorescence Modus des STORM Phosphoimager (Molecular Dynamics) analysiert.

2.4.6 Bestimmung der enzymatischen Eigenschaften heterologer Proteine

Um die Substratspezifität und die kinetischen Parameter rekombinanter *ZmNIT1*- und *ZmNIT2*-Proteine zu bestimmen, wurde die Nitrilaseaktivität über die Quantifizierung von Ammonium, das bei der Umsetzung von IAN zu IAA und auch von β -Cyanoalanin zu Asparagin/Asparaginsäure freigesetzt wird, mit Hilfe der Berthelot-Reaktion (Bolleter *et al.*, 1961) ermittelt. Dabei wird freies Ammonium in Anwesenheit von Hypochlorid und Phenol durch die Bildung von Indophenolblau nachgewiesen.

Ansatz:
<ul style="list-style-type: none">• 50 mM K-P-Puffer, pH 8.0, soweit nicht anders angegeben• 1 mM IAN oder β-Cyanoalanin, soweit nicht anders angegeben• 1 μg gereinigtes Nitrilaseprotein → Gesamtvolumen 100 μ l

Die Reaktionen wurden für 1 h (Michaelis-Menten-Kinetik, Substratspezifität) bzw. für bis zu 24 h (Zeitkinetik) bei 30°C inkubiert und anschließend in die Berthelot-Reaktion nach Bolleter *et al.* (1961) eingesetzt:

Nach Zugabe von je 1 v (in diesem Fall 50 μ l) 0,33 M Natriumphenolat (x3 H₂O), 0,01% (w/v) Natriumpentacyanonitrosylferrat (III) (=Natriumnitroprussid) und 0,02 M Natriumhypochlorid wurde die Farbreaktion im 90°C-Wasserbad beschleunigt.

Die Absorption bei 640 nm wurde mit einer Ammonium-Eichkurve (H₂O, 30 μ M, 100 μ M, 300 μ M, 500 μ M NH₄Cl) verglichen und die Daten wurden in Bezug auf unspezifische Umsetzungen gegen eine Kontrolle mit gekochtem Enzym (*boiled control*) korrigiert.

2.4.7 Bestimmung der endogenen Nitrilaseaktivität in Korn und Keimling

Endogene Nitrilaseaktivität und damit in diesem Fall die Umsetzung von IAN zu IAA wurde in Proteinextrakten aus Embryo, Endosperm und Aleuron/Perikarp zwei bis fünf Wochen nach Pollinierung getestet. Die Proben enthielten in 250 µl Gesamtvolumen jeweils 40 µg Gesamtprotein und 1 mM IAN als Substrat. Nach 3 stündiger Inkubation bei 30°C und pH 8.0 wurde das Produkt IAA via HPLC mit Fluoreszenzdetektor (Anregung bei 285 nm; Emission bei 360 nm) quantifiziert und gegen unspezifische Umsätze in entsprechenden Negativkontrollen (*boiled control*) abgeglichen.

2.4.8 Nachweis der endogenen β -Cyanoalanin-Aktivität in Maiskörnern

Wildtypische und mutante Maiskörner wurden in 50 mM K-P-Puffer, pH 8.0, gemörsert, abzentrifugiert und die jeweiligen Proteinkonzentrationen bestimmt. 200 µg Proteinextrakt wurden in 50 mM K-P-Puffer, pH 8.0, mit 1 mM β -Cyanoalanin in einem Gesamtvolumen von 50 µl 3 Stunden bei 30°C inkubiert. Danach wurde die Reaktion mit 1 Vol Methanol abgestoppt und auf Silica-Dünnschichtplatten gespottet. Die Dünnschichtchromatographie wurde in einem Laufmittelsystem aus Ethanol und 25% Ammoniak im Verhältnis 7:3 durchgeführt und die Dünnschichtplatte über Nacht getrocknet, um den Färbehintergrund des Ammoniaks aus dem Laufmittel zu reduzieren, und danach mit Ninhydrin (0,6% in Etthanol) entwickelt. Als Standard wurde eine Aspartat-Lösung in 50 mM K-P-Puffer verwendet. Reaktionsansätze ohne das Substrat β -Cyanoalanin dienten als Negativkontrollen.

2.4.9 Proteinreinigung aus Maiskörnern

Für die Aufreinigungsversuche eines IAA-Synthase-Komplexes wurden Körner der Maissorte Landmark 30 Tage nach Pollinierung zermörsert, mit Extraktionspuffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, 5 mM DTE, 1 mM PMSF, 50 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 10% Polyclar, 0,5 mg/l DNaseI) versetzt, 30 min bei 14000 rpm und 4°C abzentrifugiert und der Überstand über Gazine in ein frisches Falcon gegossen.

Nach einer Fraktionierung durch Ammoniumsulfatfällung (35%-50%) wurde die Proteinlösung per Dialyse entsalzt und über Anionentauscher (ResourceQ™ 6ml, Pharmacia) und Hydroxyapatit-Säule (Econo-Pac® CHT-II Cartridges 5ml, Bio-Rad®) weiter aufgereinigt:

ResourceQ (ResourceQ™ 6ml, Pharmacia):

Puffer A: 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, 5 mM DTE, 100 mM NaCl

Puffer B: 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, 5 mM DTE, 1 M NaCl

Linearer Gradient 0→100% Puffer B in 30 ml (5 CV)

Elution bei etwa 400 mM NaCl

G25 Desalting Column (2,5 ml):

Puffer: 10 mM Na-P, pH 7.5

Hydroxyapatit-Säule (Econo-Pac® CHT-II Cartridge 5ml, Bio-Rad®):

Puffer A: 10 mM Na-P, pH 7.5

Puffer B: 300 mM Na-P, pH 7.5

Linearer Gradient 0→100% Puffer B in 30 ml (6 CV)

Elution bei etwa 100 mM Na-P (3 CV)

Zur Bestimmung der Umsätze von Trp zu IAA wurden folgende Reaktionsansätze

IAA-Synthase-Aktivität: Trp→ IAA

- Proteinfraktion
- 1 mM NAD
- 1 mM Trp
- 50 mM K-P, pH 8.0
- Gesamtvolumen 200 µl
- Inkubation 6 h bei 30°C

mit 1 M Natriumcarbonat bis zu einem pH > 9.5 und 400 µl Ethylacetat versetzt. Nach Vortexen und kurzem Abzentrifugieren wurde die untere wässrige Phase aufbewahrt und das Partitioning nach Zugabe von 200 µl MilliQ-H₂O wiederholt. Die gesammelten wässrigen Phasen wurden mit Eisessig unter einen pH-Wert von 2.5 angesäuert. Nach zweimaliger Zugabe von je 400 µl Ethylacetat, Vortexen, Zentrifugieren und Abnehmen der organischen Phase wurden die gesammelten organischen Phasen in der SpeedVac evaporiert, die getrockneten Substanzen in 100% Methanol gelöst und via HPLC (Dionex, Software: Chromeleon) analysiert.

Für Trennungen nach dem „reversed phase“-Prinzip wurde eine LiChroCART RP-18-Säule (250 x 4 mm, analytisch) der Firma Merck benutzt. Bei einer Flussrate von 1 ml/min wurde nach anfänglich 15% Methanol in 10% Eisessig ein 12 minütiger linearer Gradient bis zu 45% Methanol gefahren. Die Elution wurde anhand eines Fluoreszenzdetektors (RF-10A_{XL}, Shimadzu, Japan) verfolgt (Anregung bei 285 nm, Emission bei 360 nm) und gegen unspezifische Umsetzungen in der *boiled control* korrigiert.

2.4.10 Proteinreinigung aus Blattmaterial

Für die Arbeiten an der Tryptophansynthase wurde Blattmaterial des Wildtyp-Mais B73 und den Mutanten *bx1*, *orp1* und *orp2* ca. 14 Tage nach Keimung in flüssigem Stickstoff unter Zugabe von 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, mit 10 mM EDTA, 5 mM DTE, 1 mM PMSF und 10% Polyclar gemörsert, die Suspension 30 min bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand für Säulenchromatographie und Aktivitätstest verwendet.

Aufreinigung:

Anionentauscher (MonoQ, 1ml):

Puffer A: 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, 5 mM DTE, 100 mM NaCl

Puffer B: 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, 5 mM DTE, 1 M NaCl

Linearer Gradient 0→100% Puffer B in 20 ml (20 CV)

Elution bei etwa 450 mM NaCl

Gelfiltration (HiLoad™ 16/60 Superdex™ 200 prep grade, Amersham):

Puffer A: 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM KCl

2.4.11 Tryptophansynthase-Aktivitätstests

Ansätze für die jeweiligen Aktivitätstests:

<p>α-Aktivität: Indol-3-Glycerinphosphat → Indol + Glycerinaldehydphosphat</p> <ul style="list-style-type: none"> • 80 μl Pflanzenproteinfraktion bzw. 2 μg heterolog exprimiertes Protein • 100 μM IGP, sofern nicht anders angegeben • 80 mM K-P, pH 8.2 • Gesamtvolumen 100 μl • Inkubation bei 30°C für 3 Stunden für Pflanzenprotein bzw. 5 min für heterolog exprimierte Proteine
--

<p>β-Aktivität: Indol + Serin → Tryptophan + H₂O</p> <ul style="list-style-type: none"> • Proteinfraktion bzw. 2 μg heterolog exprimiertes Protein • 50 μM Indol, sofern nicht anders angegeben • 60 mM L-Serin • 50 μM Pyridoxalphosphat • 80 mM K-P, pH 8.2 • Gesamtvolumen 100 μl • Inkubation bei 30°C für 3 Stunden für Pflanzenprotein bzw. 5 min für heterolog exprimierte Proteine

Gesamtreaktion: Indol-3-Glycerinphosphat + Serin → Tryptophan + H₂O

- 2 µg heterolog exprimiertes Protein
- 100 µM IGP
- 60 mM L-Serin
- 50 µM Pyridoxalphosphat
- 80 mM K-P, pH 8.2
- Gesamtvolumen 100 µl
- Inkubation der heterolog exprimierten Proteine bei 30°C für 5 min

Die Produkte ($\alpha \rightarrow$ Indol; $\beta \rightarrow$ Trp) wurden via HPLC (Dionex) mit PDA-100 und Fluoreszenzdetektor (RF-10A_{XL}, Shimadzu, Japan; Excitation: 285 nm, Emission: 360 nm) nach dem „reversed phase“-Prinzip in einer LiChroCART RP-18-Säule (250 x 4 mm, analytisch) der Firma Merck analysiert und quantifiziert und gegen nicht-enzymatische Umsetzungen in der *boiled control* korrigiert. Dafür wurde bei einer Flussrate von 1 ml/min nach anfänglich 15% Methanol in 0,3% Ameisensäure ein 15 minütiger linearer Gradient bis zu 100% Methanol gefahren.

2.4.12 Isolierung von Indol-3-Glycerinphosphat aus *E.coli trpA2/F' trpA2*-Kulturen

Der *E.coli*-Stamm *trpA2/F' trpA2* besitzt keine Tryptophansynthase- α -Untereinheit und akkumuliert deshalb in Tryptophan-haltigem Medium, das eine Derepression der Tryptophansynthase bewirkt, IGP und Indolglycerin im Kulturmedium. Eine Übernachtskultur des *E.coli*-Stammes *trpA2/F' trpA2* in Vogel-Bonner-Medium (200 mg/l MgSO₄*7H₂O, 2 g/l Zitronensäure, 3,3 g/l K₂HPO₄, 3,5 g/l NaNH₄HPO₄, 4 g/l Glucose, 1 g/l (NH₄)₂SO₄, 100 mg/l *Difco Casamino Acids*) mit 2,5 µg/l Indol wurde bei 4°C pelletiert und das IGP aus 0,5 ml Überstand mit 0,5 ml Eisenchlorid-Reagenz (1 ml 0,5 M FeCl₃, 50 ml H₂O dest., 30 ml konzentrierte H₂SO₄) anhand pinker Färbung nachgewiesen. IGP aus dem Überstand wurde in 10 minütigem Rühren bei 4°C an 12 g/l Aktivkohle-Granulat (*acid- and alkali-washed*) adsorbiert.

Nach Zentrifugation wurde der Überstand, der sich mit FeCl₃ nicht mehr färben sollte, verworfen und das Granulat-Pellet 30 min in 40 ml 100% Ethanol mit 200 µl konzentriertem NH₄OH geschüttelt, gründlich gevortext und abzentrifugiert. Der IGP-haltige Überstand wurde durch Faltenfilter von Aktivkohleresten gesäubert und durch Gefriertrocknung aufkonzentriert. Das Pellet kann für eine vollständigere Ausbeute

nochmals in 100% Ethanol mit 200 μl $\text{NH}_4\text{OH}_{\text{konz}}$ inkubiert und die Überstände vereinigt werden.

Zuletzt wurde IGP über eine DEAE-Sephadex-A-25-Säule (in 3 CV von 0,2 M NH_4HCO_3 auf 0,8 M NH_4HCO_3) aufgereinigt und die IGP-haltigen Fraktionen (FeCl_3 -Nachweis) erneut in der Lyophylle aufkonzentriert. Die End-IGP-Konzentration konnte im Photometer bei 278 nm abgeschätzt werden ($\epsilon_{280}=5,46 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$); [Protokoll modifiziert nach Kirschner *et al.*, 1975].

2.4.13 Enzymatische IGP-Herstellung

Für die Gewinnung von IGP wurde sich der Rückreaktion von Indol zu IGP des Mais-BX1-Enzyms bedient. Der Ansatz zur über Nacht Inkubation setzte sich aus 10 mM Indol mit 2,5 mM GAP und 10 bis 50 μg *ZmBX1*-Enzym zusammen und wurde mit Tris auf einen pH über 8.0 gebracht. Nach mehrfachem Ausschütteln mit Hexan konnten IGP und Indol an der HPLC in einem 12 minütigem Gradienten von 15 auf 100% Methanol in 0,3%iger Ameisensäure aufgetrennt werden. Diese Methode erwies sich als wesentlich effizienter und leichter zu handhaben als die unter 2.4.12 beschriebene.

2.4.14 IAN-Detektion und Quantifizierung via GC-MS

Jeweils 1 g Endosperm-, Embryo-, Aleuron/Perikarp-, Koleoptilen- oder Primärwurzelgewebe wurde in flüssigem Stickstoff gemörsert und mit 5 ml Methanol 1 h bei RT und danach 5 min bei 60°C extrahiert. In der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Weiler (Bochum) wurde das Lösungsmittel in der SpeedVac entfernt und die wässrige Phase mit 500 μl H_2O dest., 500 μl Methanol und 1 ml Chloroform wiederum extrahiert. Die Chloroform-Phase wurde in der SpeedVac getrocknet, in 200 μl 30% (v/v) Methanol resuspendiert, mit Ultraschall behandelt und 20 min bei 100.000 g abzentrifugiert.

Der Überstand wurde mittels Reverser-Phase-HPLC (Luna RP-18-Säule; 250 x 0,4 mm; Phenomenex, Torrance, CA) mit einer Flussrate von 1 ml/min (Gradient: 10 min isokratischer Fluss mit 30% (v/v) Methanol mit 0,01% TFA, linearer Gradient in 10 min auf 100% (v/v) Methanol mit 0,01% TFA) bei 280 nm vermessen. IAN wurde bei einer Retentionszeit von 20,5 ml detektiert und die entsprechende Fraktion wurde mit Ethylacetat extrahiert, getrocknet, in 10 μl Chloroform aufgenommen und via GC-MS nach Müller und Weiler (2000a) analysiert.

2.4.15 IAA-Quantifizierung in Körnern und Keimlingen

Korn- oder Keimlingsgewebe wurde im Mörser homogenisiert und über Nacht in 70% Aceton bei 4°C geschüttelt. Nach 15 minütiger Zentrifugation (14000 rpm, 4°C) wurde der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt und der Extraktionsschritt durch erneute Zugabe von 70% Aceton und Schütteln für 2 h wiederholt. Die beiden Überstände wurden vereinigt, in der SpeedVac eingetrocknet und das Pellet in 400 µl Methanol resuspendiert. 200 µl davon wurden mit Ethylacetat ausgeschüttelt (siehe 2.4.9), eingedampft, in Methanol gelöst und freies IAA via HPLC mit Fluoreszenzdetektion quantifiziert.

Die zweiten 200 µl wurden zur alkalischen Hydrolyse mit 1 M NaOH und über Nacht bei 75°C auf einem Thermoschüttler inkubiert, danach noch für 15 min aufgekocht und zur pH-Einstellung mit 1 µl Bromphenolblau (30%) versetzt. Es folgte eine Titration mit rauchender HCl bis zur Gelbfärbung der Probe und anschließendem Ausschütteln mit Ethylacetat. Die Probe wurde wieder in der SpeedVac getrocknet, in Methanol gelöst und an der HPLC analysiert.

3. Ergebnisse

3.1 Tryptophansynthase in *Zea mays*

3.1.1 Mechanismus und Enzyme

Nach bisherigen Erkenntnissen ist ähnlich den Enterobakterien auch in Pflanzen die Tryptophansynthase aus zwei verschiedenen Untereinheiten (α und β) aufgebaut, die voneinander getrennt werden können, wobei zumindest die β -Aktivität vollständig erhalten bleibt (Delmer und Mills, 1968; Nagao und Moore, 1972). Die Eigenaktivität der pflanzlichen α -Untereinheit wurde bisher nicht schlüssig nachgewiesen. Ebenso wie bei Bakterien geht man davon aus, dass Indol, das von der α -Untereinheit produziert wird, innerhalb des Moleküls durch den Tunnel zum aktiven Zentrum der β -Untereinheit transportiert wird.

Als mögliche Komponenten wurden in Mais *ZmTSAlike1* und *ZmTSAlike2* – als α -Untereinheiten – bzw. *ZmTSB1* und *ZmTSB2* – als β -Untereinheiten – benannt (Tab.3.1).

Tabelle 3.1: Mögliche α - und β -Untereinheiten des Mais-Tryptophansynthase-Komplexes mit Anzahl der Aminosäuren, Proteingröße (kDa, ohne Transitpeptid) und Vorhandensein (+) eines Transitpeptides anhand von Sequenzvergleichen.

Protein	Untereinheit	Aminosäuren	kDa	Transitpeptid
<i>ZmTSAlike1</i>	α	274	29,0	–
<i>ZmTSAlike2</i>	α	274	28,9	+
<i>ZmTSB1 (orp1)</i>	β	389	42,5	+
<i>ZmTSB2 (orp2)</i>	β	408	44,4	+

Die β -Untereinheiten *ZmTSB1* und *ZmTSB2* wurden über die Mutante *orange pericarp* identifiziert (Wright *et al.*, 1991). Bei dieser Mutante liegen Mutationen in den duplizierten ungelinkten Loci *orp1* und *orp2* vor. Solche Doppelmutanten weisen 75% weniger Tryptophan auf als wildtypische Pflanzen, akkumulieren aber aufgrund der Feedback-Regulierung der Tryptophanbiosynthese zwei Tryptophanvorstufen, Anthranilat und Indol, was auf eine Blockade der Tryptophanbiosynthese hindeutet. Fütterungsexperimente und Enzymtests deuten auf einen Defekt in der Tryptophansynthase- β -Aktivität hin. So ist die *orp*-Mutante eine der wenigen in Pflanzen beschriebenen Aminosäure-Auxotropha. Die beiden *orp*-Gene weisen starke Homologien zu Tryptophansynthase- β -Genen anderer Organismen auf. In ihrer Aminosäuresequenz stimmen *ZmTSB1* und *ZmTSB2* zu 91%

überein und codieren beide für ein Transitpeptid. Bei den möglichen α -Untereinheiten codiert *ZmTSAlike2* laut Homologievergleichen mit bakteriellen TSAs für ein Transitpeptid; nicht so *ZmTSAlike1*, was ihre Relevanz für die im Chloroplasten stattfindende Tryptophanbiosynthese in Frage stellt.

In Mais sind neben der Tryptophansynthese weitere IGP spaltende Enzyme beschrieben, die alle unter dem Oberbegriff „Indolglycerinphosphatlyasen“ zusammengefasst werden und von denen zwei an Abwehrmechanismen beteiligt sind: *ZmBX1*, ein Homologes zur Tryptophansynthase α aus Mais, synthetisiert Indol als Ausgangssubstanz zur Bildung von Phytoanticipinen (DIBOA und DIMBOA). *ZmIGL* wird für die Herstellung von freiem Indol – nach Induktion mit Volicitin, das im Speichel des Fraßschädling *Ostrinia nubilalis*, dem Maiszünsler, enthalten ist – benötigt (Frey *et al.*, 1997; 2000). Vergleiche von Sequenz und Exon-Intron-Struktur zwischen *ZmBX1*, *ZmIGL* und den α -Untereinheiten aus Mais, *Arabidopsis* und *E.coli* deuten auf eine evolutionäre Modifikation von *ZmIGL* und *ZmBX1* zur Beteiligung im Sekundärmetabolismus hin (Gierl und Frey, 2001).

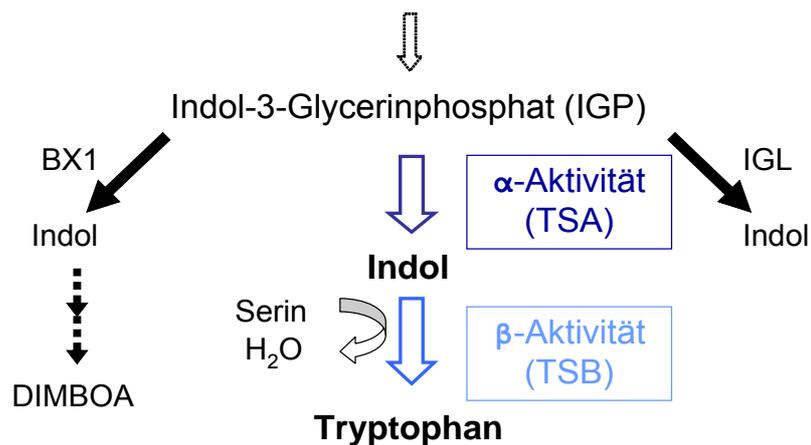


Abbildung 3.1: Übersicht über Tryptophan- und Sekundärmetabolitbiosynthesen ausgehend von Indol-3-Glycerinphosphat (IGP) in *Zea mays*.

3.1.2 α - und β -Aktivitäten in Maisextrakten

Zur Charakterisierung der Teilaktivitäten in Mais wurden Proteine aus Blattmaterial vom Wildtyp-Mais B73 (15 Tage n.K.) und der *bx1*-Mutante (*benzoxazineless*), die eine Mutation im *ZmBx1*-Gen trägt und daher kein DIMBOA bildet (Frey *et al.*, 1997; Melanson *et al.*, 1997), extrahiert. Via Anionenauschromatographie (MonoQ, 1ml) vorgereinigt und nachfolgender Gelfiltration (HiLoad™ 16/60 Superdex™ 200 prep grade, Amersham) nach Größen aufgetrennt, wurden Fraktionen verschiedener Proteingrößen auf α - und β -Aktivität getestet. Für die Messung der α -Reaktion wurden Proteinfraction und IGP zwei Stunden in 200 μ l Gesamtvolumen bei 30°C inkubiert, das entstehende Indol via HPLC quantifiziert und gegen Kontrollen ohne Protein bzw. ohne IGP abgeglichen. Zur Bestimmung von β -Aktivitäten wurde aus Ansätzen mit Protein, den Substraten Indol und Serin und Pyridoxalphosphat als Cofaktor nach analoger Inkubation das gebildete Produkt Tryptophan an der HPLC quantifiziert.

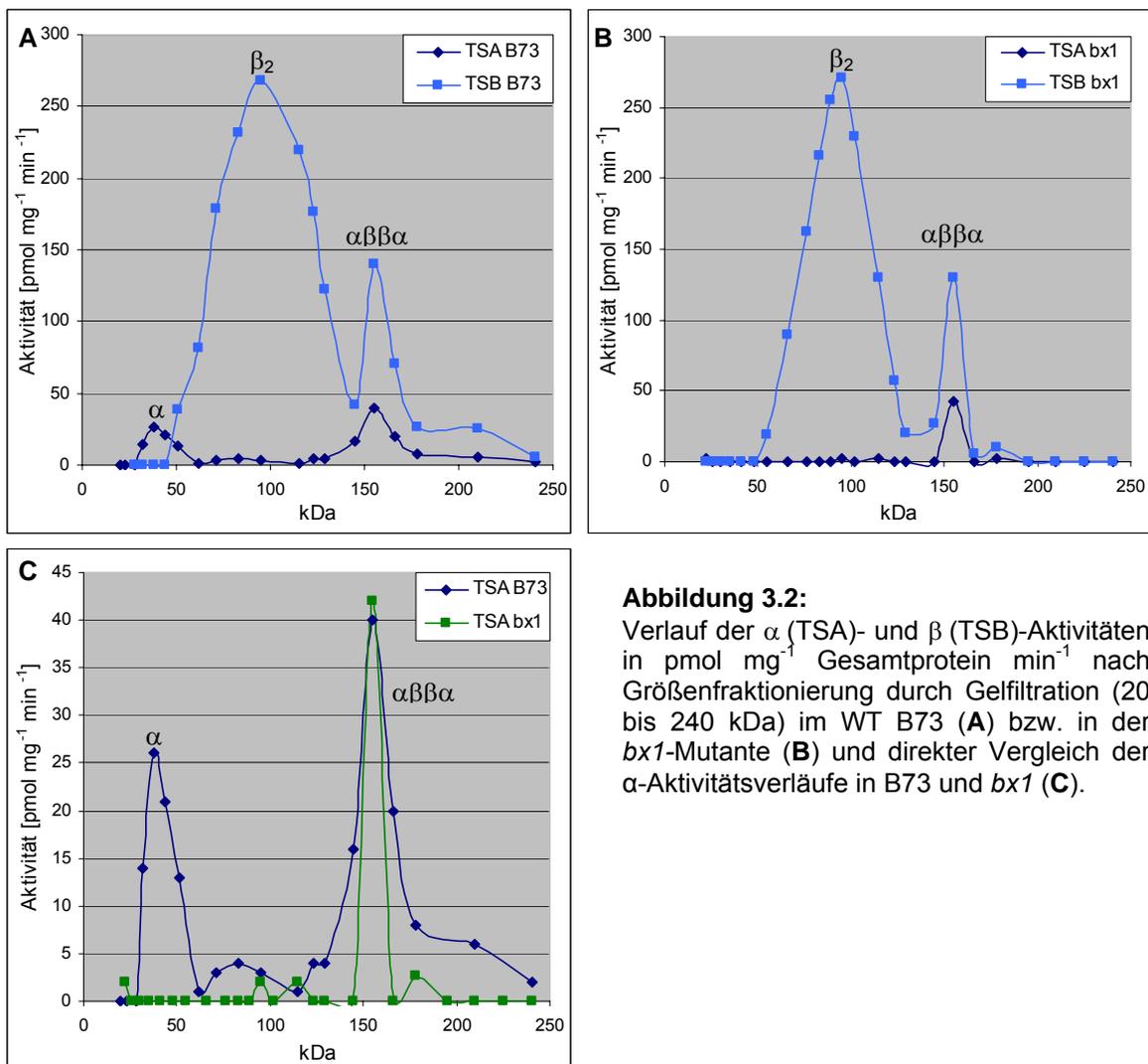


Abbildung 3.2:

Verlauf der α (TSA)- und β (TSB)-Aktivitäten in pmol mg^{-1} Gesamtprotein min^{-1} nach Größenfraktionierung durch Gelfiltration (20 bis 240 kDa) im WT B73 (A) bzw. in der *bx1*-Mutante (B) und direkter Vergleich der α -Aktivitätsverläufe in B73 und *bx1* (C).

Hierbei zeigten sich im Wildtyp B73 für die α -Teilreaktion Aktivitäten von etwa $40 \text{ pmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ bei einem K_M^{IGP} von $47 \text{ }\mu\text{M}$ in einer Fraktion der Proteingröße von etwa 155 kDa – dies entspricht der $\alpha\beta\alpha$ -Komplexgröße – und $25 \text{ pmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ bei ca. 30 kDa – entsprechend eines α -Monomers (Abb.3.2 A, Tab.3.2). Diese monomerische Aktivität war in der *bx1*-Mutante nicht aufzufinden (Abb.3.2 B, Tab.3.2).

β -Aktivitäten waren sowohl im WT als auch in der *bx1*-Mutante im Bereich von 155 kDa mit ca. $130 \text{ pmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ und vor allem bei $\sim 95 \text{ kDa}$ mit $270 \text{ pmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ nachweisbar und könnten somit Umsätze durch den $\alpha\beta\beta\alpha$ -Komplex und durch das β -Dimer darstellen. Bestimmung der kinetischen Parameter ergab für die TSB-Reaktion im Komplex und im Dimer einen K_M^{Indol} von $5 \text{ }\mu\text{M}$ sowohl für B73 als auch die *bx1*-Mutante.

Analoge Untersuchungen an *Zmtsb1 (orp1)*- bzw. *Zmtsb2 (orp2)*-Mutanten ergaben ähnliche Aktivitäten. Es zeigten sich α -Aktivitäten im Komplex von $19 \text{ pmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ in *orp1* und $22 \text{ pmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ in *orp2*. Monomerische α -Aktivitäten beliefen sich auf $18 \text{ pmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (Abb.3.3 A, Tab.3.2). Des Weiteren zeigte *orp1* eine Trp-Syntheserate von $110 \text{ pmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ bei 155 kDa und $170 \text{ pmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ bei 100 kDa ; *orp2* bildete in Komplexgröße $154 \text{ pmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ Tryptophan und im Dimer $175 \text{ pmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (Abb.3.3 B, Tab.3.2). Im Gesamtaufschluss wiesen beide Einzelmutanten eine β -Aktivität von etwa $30 \text{ pmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ auf.

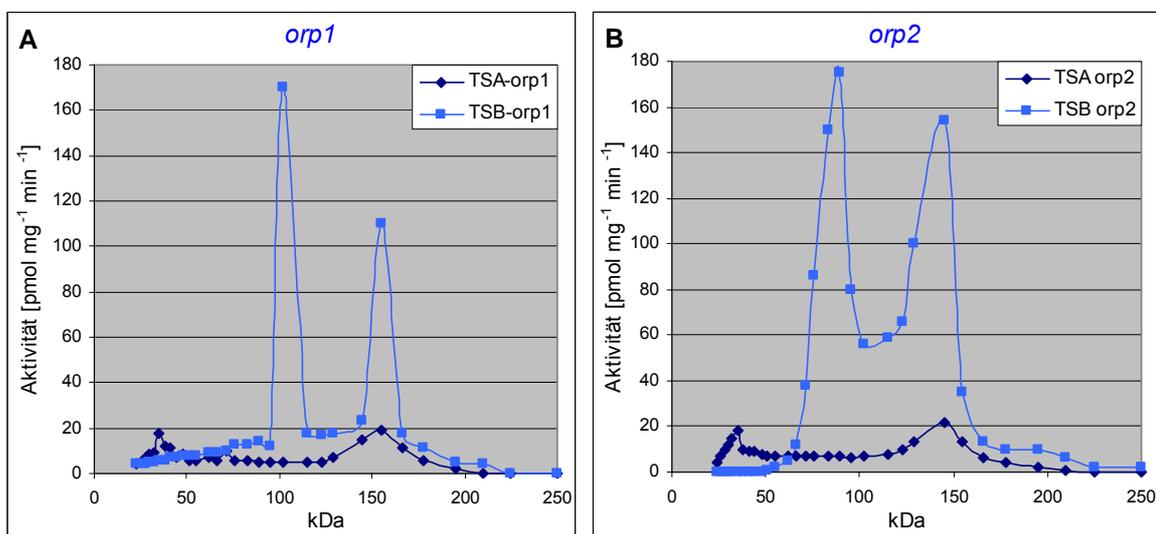


Abbildung 3.3: Verlauf von α (TSA)- und β (TSB)-Aktivitäten in pmol mg^{-1} Protein in der Fraktion min^{-1} nach Gelfiltration (20 bis 240 kDa) in den Maismutanten *orp1* (A) und *orp2* (B).

Tabelle 3.2: Zusammenfassung der α - und β -Aktivitäten in Gelfiltrationsfraktionen (155 kDa, 95 kDa, 30 kDa) aus Wildtyp-Mais B73 und den Mais-Einzelmutanten *bx1*, *orp1* (*tsb1*) und *orp2* (*tsb2*); Umsatzraten in $\text{pmol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$. (– = kein Umsatz nachweisbar).

Pflanze	α -Aktivität in Komplexfraktion (~155 kDa)	β -Aktivität in Komplexfraktion (~155 kDa)	β -Aktivität in Dimerfraktion (~95 kDa)	α -Aktivität in Monomerfraktion (~30 kDa)
B73	40	140	270	26
<i>bx1</i>	42	130	270	–
<i>orp1</i>	19	110	170	18
<i>orp2</i>	22	154	175	18

Neben der erwarteten α - und β -Aktivität in Komplexgröße treten also noch eine freie β -Dimeraktivität und α -Monomeraktivität auf. Das Fehlen dieser komplexungebundenen α -Aktivität in der *bx1*-Mutante gibt erste Hinweise, dass diese durch das *ZmBX1*-Enzym katalysiert sein könnte. Wohingegen die *orp*-Einzelmutanten, die sehr ähnliche Aktivitätsverläufe aufweisen, keine Rückschlüsse zulassen, ob die β -Dimeraktivität auf *ZmTSB1* oder *ZmTSB2* zurückzuführen ist. Lediglich die Doppelmutante *orange pericarp* weist keine β -Aktivität auf und ist Tryptophan-auxotroph (Wright *et al.*, 1992).

3.1.3 Komplexierung heterolog exprimierter α - und β -Untereinheiten

Zur Untersuchung von Komplexierungen zwischen den potentiellen Untereinheiten wurde die analytische Gelfiltration gewählt. Mit deren Hilfe kann das apparente Molekulargewicht von Proteinen und damit, bei bekanntem Molekulargewicht des Monomers, der Oligomerisierungszustand bestimmt werden. Bei globulären Proteinen besteht ein linearer Zusammenhang zwischen dem Logarithmus des Molekulargewichts und dem Elutionsvolumen. Das apparente Molekulargewicht eines Proteins kann daher durch Vergleich des Elutionsvolumens mit den Elutionsvolumina von Standard-Proteinen bestimmt werden. Heterolog exprimierte und über His-Tag aufgereinigte TSA-Homologa (*ZmTSAlike1*, *ZmTSAlike2*, *ZmBX1* und *ZmIGL*) und *ZmTSB1* wurden einzeln oder mit dem möglichen Komplexpartner eine Stunde bei 4°C inkubiert und danach via Gelfiltration (HiLoad™ 16/60 Superdex™ 200 prep grade, Amersham) analysiert. Der Nachweis, ob sich in den jeweiligen Fraktionen wirklich nur ein oder beide Enzyme befanden, erfolgte neben der Größenbestimmung zusätzlich per SDS-PAGE.

Dabei ergab sich im Gemisch zwischen *ZmTSAlike2* und *ZmTSB1* ein Komplex um die 160 kDa (Abb.3.4 C), der in einer SDS-PAGE-Analyse beide Enzyme in 1:1-Stöchiometrie aufwies (Daten nicht gezeigt).

Es ließen sich jedoch keine Komplexierungen zwischen *ZmTSB1* und *ZmTSAlike1* (Abb.3.4 B), *ZmBX1* oder *ZmIGL* zeigen. *ZmTSB1* lag in diesen Ansätzen wie auch alleine als Dimer vor, *ZmTSAlike1*, *ZmBX1* und *ZmIGL* als Monomere. Die Experimente wurden nach einem Thrombinverdau, um den eventuell sterisch störenden His-Tag abzuspalten, wiederholt und erbrachte gleiche Resultate.

ZmTSAlike2 und *ZmTSB1* sind also aufgrund ihrer Fähigkeit zumindest *in vitro* miteinander zu komplexieren mögliche Kandidaten für die beiden Untereinheiten des Tryptophansynthase-Komplexes in *Zea mays*.

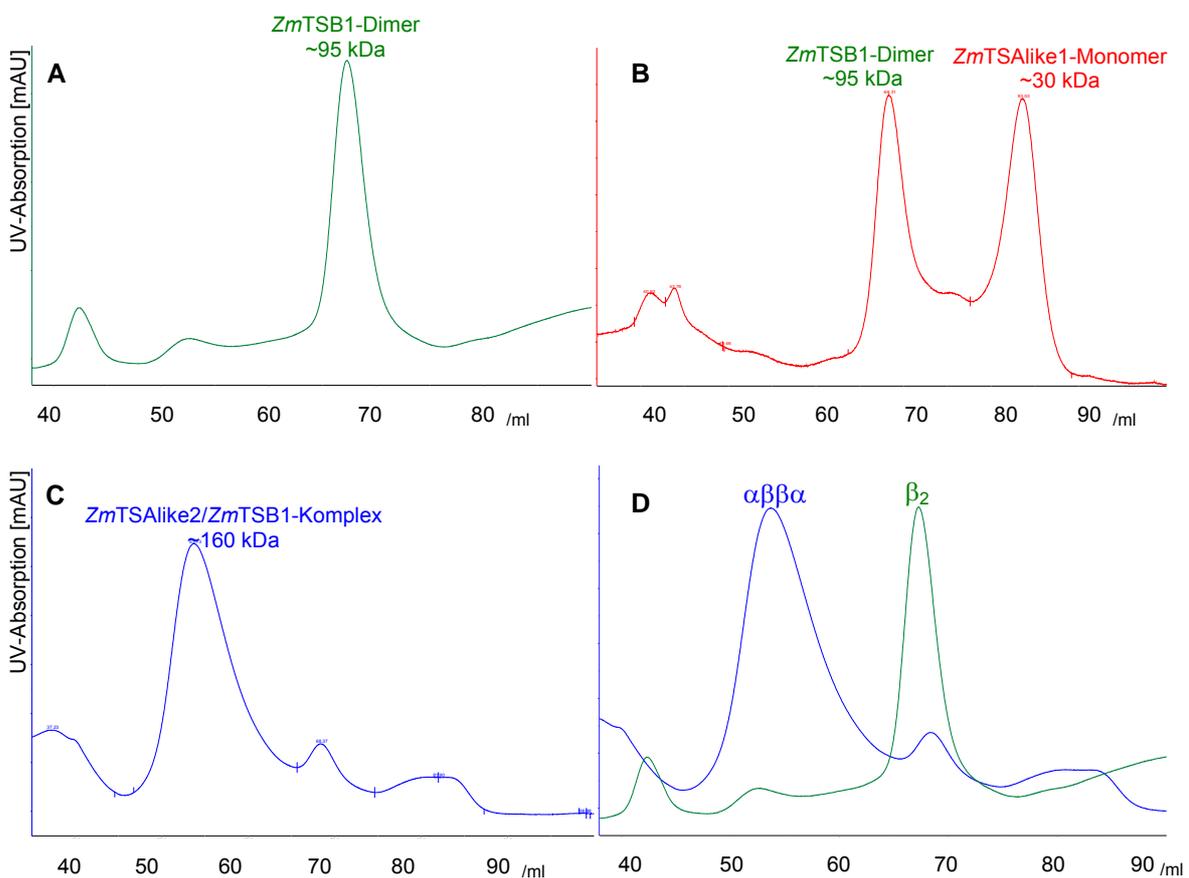


Abbildung 3.4: Gelfiltrationsläufe nach 1 h Inkubation bei 4°C mit *ZmTSB1* (A), *ZmTSAlike1* + *ZmTSB1* (B) und *ZmTSAlike2* + *ZmTSB1* (C); Abbildung D zeigt den Overlay von A und C.

3.1.4 Aktivitäten heterolog exprimierter Proteine

His-Tag gereinigte Proteine wurden in Aktivitätstests, durchgeführt in Ansätzen wie bei Pflanzenextrakten, auf IGP- und Indolumsatz mit Einzelenzymen oder in Gemischen hin überprüft.

ZmTSB1-Enzym zeigte keine Reaktion mit IGP, setzte aber Indol in effizienter Weise mit bis zu $405 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ und einem K_M^{Indol} von $25 \mu\text{M}$ um. Im Gemisch mit *ZmTSAlike2* erhöhte sich V_{max} bei gleichem K_M auf $620 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$; mit *ZmTSAlike1* zeigte sich keine deutliche Veränderung der Parameter. Umsätze von *ZmTSB1* wurden im Bereich von 0 bis 10 mM Substrat vermessen, waren aber ab 1 mM konstant und wurden daher nicht in der Abbildung aufgetragen (Abb.3.5 B; Tab.3.3).

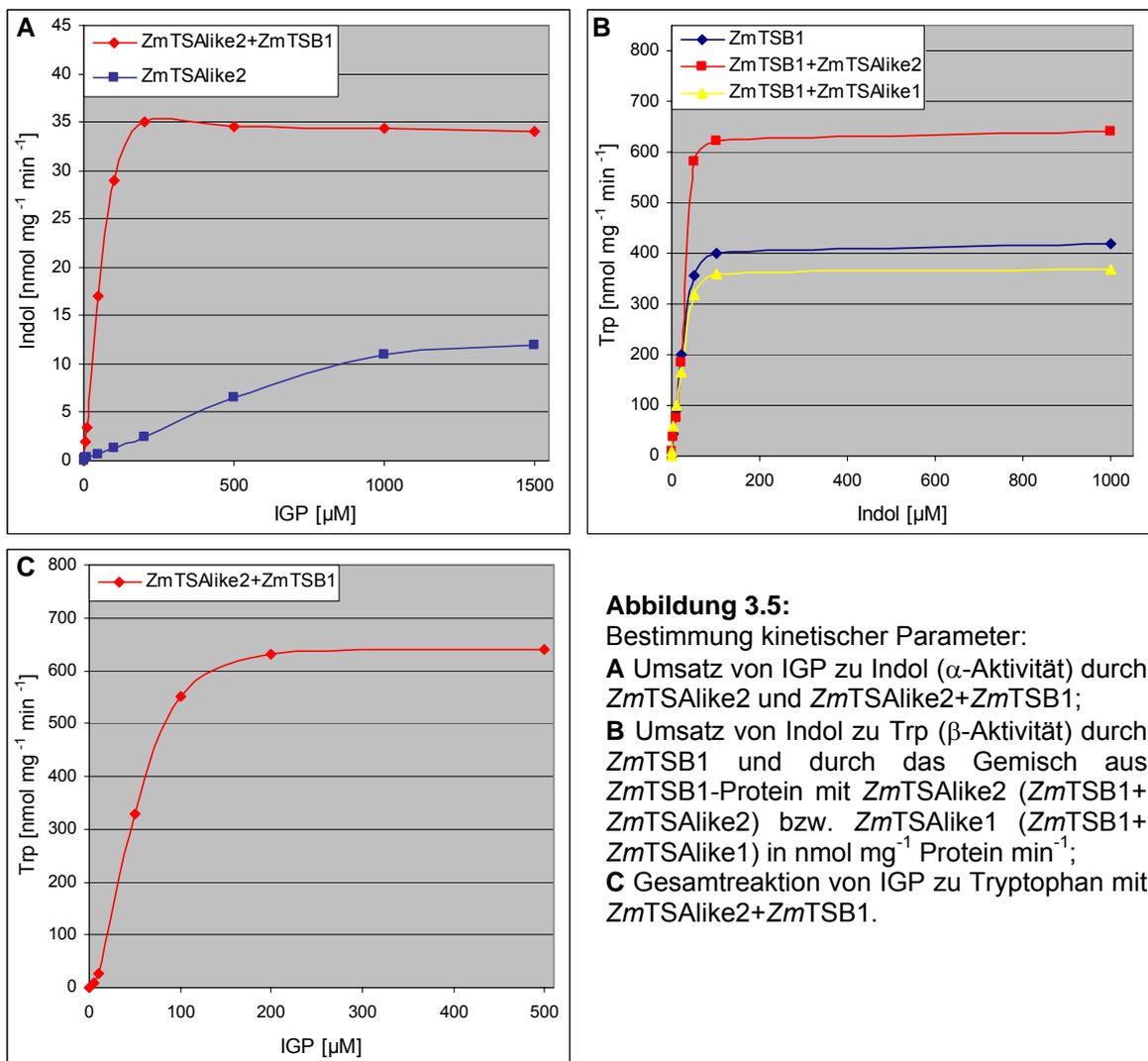


Abbildung 3.5:

Bestimmung kinetischer Parameter:

A Umsatz von IGP zu Indol (α -Aktivität) durch *ZmTSAlike2* und *ZmTSAlike2+ZmTSB1*;
B Umsatz von Indol zu Trp (β -Aktivität) durch *ZmTSB1* und durch das Gemisch aus *ZmTSB1*-Protein mit *ZmTSAlike2* (*ZmTSB1+ZmTSAlike2*) bzw. *ZmTSAlike1* (*ZmTSB1+ZmTSAlike1*) in $\text{nmol mg}^{-1} \text{ Protein min}^{-1}$;
C Gesamtreaktion von IGP zu Tryptophan mit *ZmTSAlike2+ZmTSB1*.

Tabelle 3.3: Kinetische Parameter der heterolog exprimierten *Zea mays*-Proteine *ZmTSAlike1*, *ZmTSAlike2* und *ZmTSB1* mit IGP bzw. Indol als Substrat. Die Reaktionen wurden bei pH 8.2 und 30°C durchgeführt. (– = kein Umsatz nachweisbar);

Heterologes Protein	Reaktion	K_M (μM)	V_{\max} ($\text{nmol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M ($\text{mM}^{-1} \text{s}^{-1}$)
<i>ZmTSAlike2</i>	IGP \rightarrow Indol	500	11	0,006	0,012
<i>ZmTSAlike2+ZmTSB1</i>	IGP \rightarrow Indol	50	35	0,019	0,38
<i>ZmTSB1</i>	Indol \rightarrow Trp	25	405	0,29	11,6
<i>ZmTSAlike2+ZmTSB1</i>	Indol \rightarrow Trp	25	620	0,44	17,6
<i>ZmTSAlike1</i>	IGP \rightarrow Indol	–	–	–	–
<i>ZmTSAlike1+ZmTSB1</i>	IGP \rightarrow Indol	–	–	–	–
<i>ZmTSAlike1+ZmTSB1</i>	Indol \rightarrow Trp	30	400	0,28	9,3
<i>ZmTSAlike2+ZmTSB1</i>	IGP \rightarrow Trp	50	640	0,45	9,0

ZmTSAlike2 wies bei einem K_M^{IGP} von 500 μM einen IGP-Umsatz von 11 $\text{nmol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ auf, der sich nach Inkubation mit *ZmTSB1*-Enzym bei K_M^{IGP} von 50 μM auf 35 $\text{nmol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ erhöhte (Abb.3.5 A; Tab.3.3). Die Rückreaktion von Indol zu IGP wurde von *ZmTSAlike2* mit 45 $\text{pmol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ katalysiert. Mit *ZmTSAlike1* konnte weder IGP-Umsatz noch die Rückreaktion von Indol zu IGP nachgewiesen werden. Die Gesamtreaktion von *ZmTSAlike2* und *ZmTSB1* mit IGP, Serin und Pyridoxalphosphat resultierte in einer Umsatzrate analog zur β -Reaktion (640 $\text{nmol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$) und einem K_M^{IGP} -Wert von 50 μM , der dem der α -Reaktion im Gemisch von *ZmTSAlike2* und *ZmTSB1* entspricht (Abb.3.5.C; Tab.3.3). Auch hier wurden die Versuchsreihen mit gleichem Resultat ebenso mit Proteinen ohne His-Tag durchgeführt.

So weisen auch die Aktivitäten der heterologen Proteine, insbesondere die bereits bei *E.coli* beschriebene Steigerung der katalytischen Effizienz bei Komplexierung (Miles, 1979), *ZmTSAlike2* und *ZmTSB1* als mögliche Kandidatengene der Tryptophansynthese aus.

3.2 Kandidatengene der Auxinbiosynthese: Amidase

Durch retrobiosynthetische NMR-Analyse (Bacher *et al.*, 1999) mit [U-¹³C₆]Glucose und [1,2-¹³C₂]Acetat als unspezifische Vorstufen und durch spezifische Markierung mit Tryptophan und Indol konnte gezeigt werden, dass im Maiskorn IAA quantitativ aus Tryptophan synthetisiert wird, wobei die chemische Bindung zwischen Indolring und Seitenkette erhalten bleibt (Glawischnig *et al.*, 2000). Es wurde kein Hinweis auf eine Beteiligung eines Tryptophan-unabhängigen Weges gefunden. Daraufhin wurde mit der Isolierung von Kandidatengen der Tryptophan-abhängigen Biosynthese begonnen.

3.2.1 Isolierung der cDNA von *ZmAmi1*

Pollmann *et al.* (2003) beschreiben eine Amidase aus *Arabidopsis thaliana* (*AtAmi1*), die in der Lage ist Indol-3-Acetamid (IAM) zu IAA umzusetzen. Des Weiteren wurde IAM als Metabolit in *Arabidopsis* identifiziert (Pollmann *et al.*, 2002) und zwar nicht als Artefakt resultierend aus unsterilen Wachstumsbedingungen; viele der Bakterien, bei denen IAM als Zwischenprodukt in der IAA-Biosynthese auftritt, leben nämlich in engem Kontakt mit Pflanzen (Takahashi *et al.*, 1975; Saotome *et al.*, 1993). Bisher konnten allerdings keine homologen Gene zu den bakteriellen Tryptophan-2-Monooxygenasen, die dort den Umsatz von Tryptophan zu IAM katalysieren, in Pflanzen gefunden werden.

Auch aus Mais sollte eine homologe Amidase isoliert und deren Enzymaktivität analysiert werden. Laut einer EST-Datenbanksuche basierend auf der Amidasesequenz aus *Arabidopsis* (*AtAmi1*) existieren verschiedenste ESTs aus der ganzen Pflanze, aus Endosperm und Spross. Mit Hilfe spezifischer Primer (*Ami1* und *Ami4*) wurde aus einer λ -Phagen-cDNA-Bank von zwei bis drei Tage alten Maiskeimlingen ein PCR-Fragment von 302 bp gewonnen und als Sonde für einen Screen derselben cDNA-Bank verwendet. Aus der isolierten Phagen-DNA wurde via PCR (*AmidF* und *AmidR*) ein 1327 bp großes cDNA-Fragment mit terminalen *NdeI* und *BamHI*-Schnittstellen gewonnen, *blunt end* in einen *SmaI*-geschnittenen pBluescript KS⁺-Vektor einkloniert und sequenziert. Da die Sequenz interne *BamHI*-Schnitte aufwies, wurde das Amidasegen zur Proteinexpression über *NdeI*- und *XhoI*-Schnittstellen in einen pET28a-Vektor mit aminoterminalen 6x His-Tag umklontiert (Meding, 2004). Allerdings konnte das 45 kDa-Amidaseprotein nicht aus *E.coli* gewonnen werden, da transformierte Bakterienzellen entweder gar nicht erst anwachsen oder das Protein, wenn überhaupt, nur degradiert vorlag. Auch konnte im Bakterienrohextrakt mittels Western Blot mit Anti-*AtAMI1*-Antikörpern, die in der Lage sind

AtAMI1-Protein bis zu 1 ng zu detektieren, keine Maisamidase nachgewiesen werden, was allerdings auch an Unterschieden in der Proteinsequenz liegen mag.

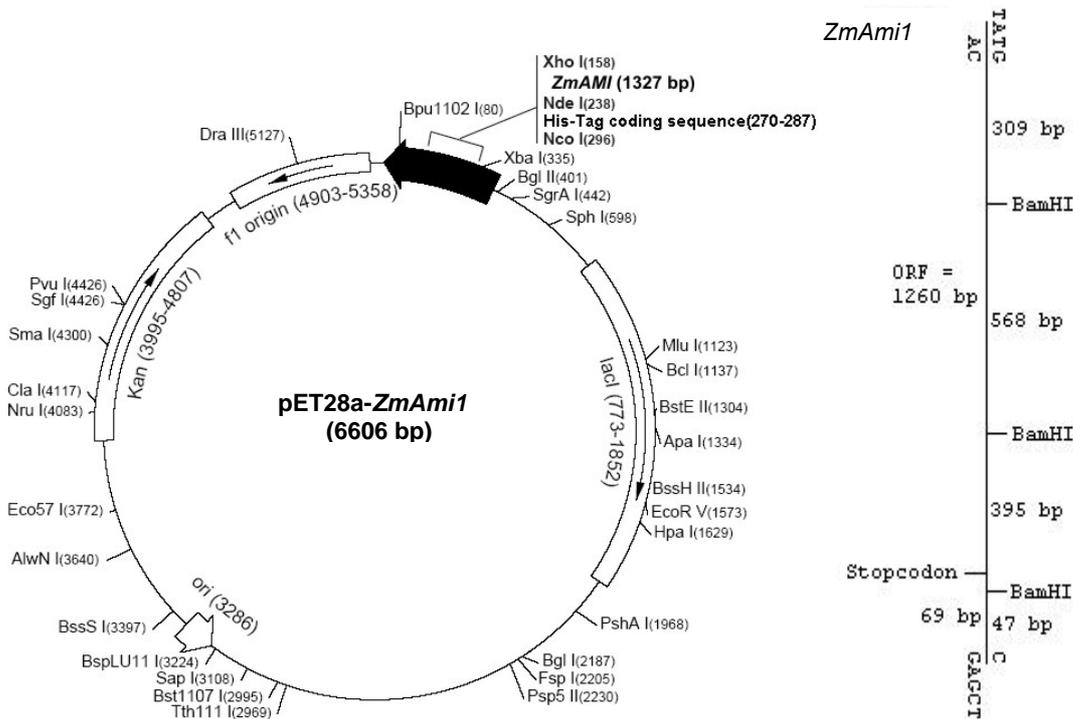


Abbildung 3.6: Expressionskonstrukt für *ZmAMI1* in pET28a; Bild: Meding, 2004.

3.2.2 IAM-Effekte auf Koleoptile und Primärwurzel von Maiskeimlingen

Parallel dazu sollte überprüft werden, ob IAM eine ähnliche Wirkung wie IAA auf das Wachstum von Maiskeimlingen hat, was ein Indiz dafür wäre, dass IAM in den Keimlingen zu IAA umgesetzt wird und *ZmAmi1* ein funktionelles Protein codiert.

Dazu wurde in zwei voneinander unabhängigen Experimenten der Effekt von verschiedenen IAM-Konzentrationen auf das Primärwurzelwachstum überprüft. Jedes Experiment bestand aus 75 Maiskeimlingen, wobei jeweils 15 Maiskeimlinge mit einer bestimmten IAM-Konzentration (0 μ M, 1 μ M; 10 μ M; 100 μ M; 1 mM) im Wasser angezogen und die Primärwurzellängen nach vier Tage vermessen wurden. Ab 10 μ M IAM konnte eine signifikante Verkürzung des Primärwurzelwachstums festgestellt werden (81% \pm 5%). Bei 1 mM IAM betrug die Wurzellänge nur noch 9% der Kontrolllänge. Ein signifikanter Effekt auf das Koleoptilenwachstum wurde sowohl in diesem Experiment als auch beim Auftragen IAM-haltiger Lanolinpaste auf eine Seite der Koleoptile (wie das bei IAA der Fall ist; vgl. Abb.3.13) nicht beobachtet. Im Vergleich dazu bewirkt IAA bereits bei einer Konzentration von 0,1 μ M eine deutliche Wachstumshemmung (Kobayashi *et al.*, 1993)

und während Primärwurzeln bei 10 μM IAM eine Verkürzung um etwa 20% aufweisen, resultieren 10 μM IAA im Keimungsmedium bereits in etwa 85% kürzeren Wurzeln.

Wenngleich auch erst in höheren Konzentrationen, bewirkt IAM also zumindest in der Primärwurzel Auxin-ähnliche Effekte, was für IAM als mögliche IAA-Vorstufe und damit für eine *in vivo* funktionelle Amidase in Mais sprechen könnte.

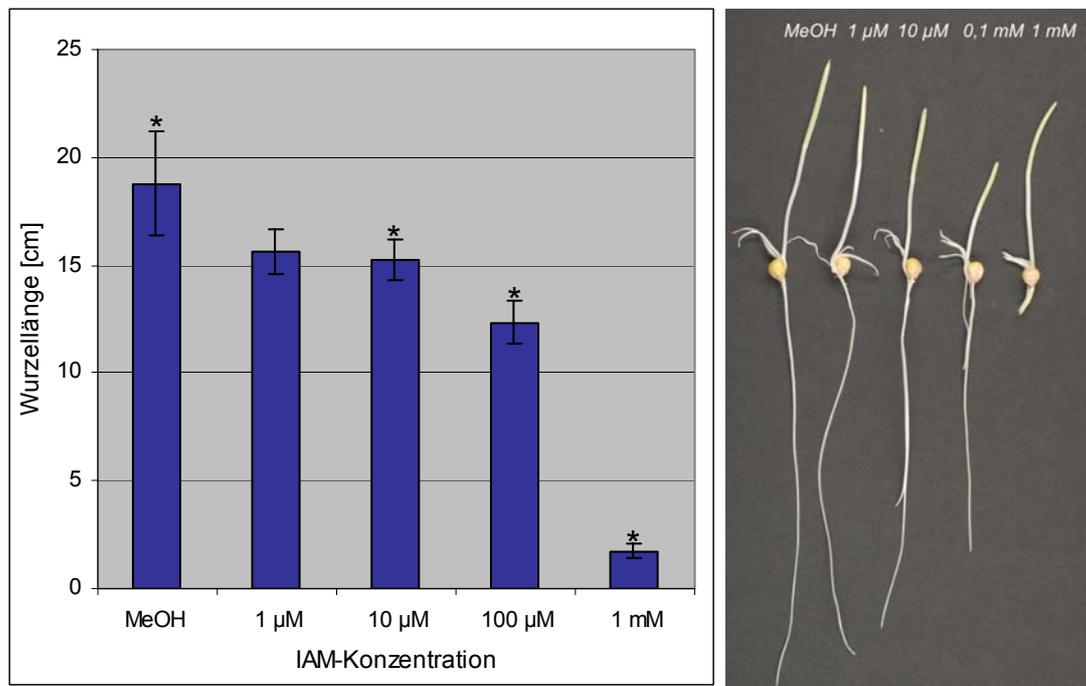


Abbildung 3.7: Durchschnittliche Primärwurzellängen aus zwei unabhängigen Experimenten mit je 15 Keimlingen pro IAM-Konzentration (1 μM , 10 μM , 100 μM , 1 mM, MeOH-Kontrolle); * = Unterschiede sind laut *t*-Test ($P < 0,05$) signifikant.

3.3 Kandidatengene der Auxinbiosynthese: Nitrilasen

Weitere Kandidatengene, die Nitrilasen (EC 3.5.5.1), sind zum Teil in der Lage IAN durch Addition zweier Wassermoleküle an die Nitrilgruppe zu IAA umzusetzen und stellen damit Kandidatengene der IAA-Biosynthese dar.

Aufgrund von EST-Sequenzinformation wurden zwei für Nitrilasen codierende Gene aus *Zea mays* isoliert: *ZmNit1* (GenBank Nr. AY156979) und *ZmNit2* (GenBank Nr. AY156978). *ZmNit1* wurde auf Chromosom 5L zwischen *uaz164A* und *umc126A*, *ZmNit2* auf Chromosom 4L nahe *umc156A* (Burr und Burr, 1991), beide in der Nähe des Zentromers, kartiert. *ZmNit1* und *ZmNit2* codieren für Proteine aus 351 bzw. 361 Aminosäuren und stimmen in ihrer Aminosäuresequenz zu 72,9% überein (Tab.3.4). In beiden Nitrilasen findet sich ein essentieller Cysteinrest (Kobayashi *et al.*, 1993) im aktiven Zentrum (Abb.3.8).

```

NIT2 MALVTSGSGA DQVIAEVAMN GGADPSATTV RATVVQASTI FHDTPATLDK
NIT1 MALVPSRSDS EALIPEVEMN AGADQTATTA RVTVVQASSV FYDTPATLDK

NIT2 AERLIAEAAG YGSQLVVFPE AFIGGYPRGS TFGFGISISI INPKDKGKEA 100
NIT1 AEKLVAEAAG YGSQLVLFPE VVGGYPHGS TFGLVVGVRT AKGKEDFOK-

NIT2 FRRYHASAID VPGPEVTRLA AMAAKYKVFL VMGVIEREGY TLYCSVLFFD 150
NIT1 ---YHASAID VPGPEVSRLS ALAGKYKVFL VIGVVERAGY TLYNTVLSFD

NIT2 PLGRYLKKHR KLMPTALERI IWGFEGDSTI PVYDTPLGKI GALTWENKM 200
NIT1 PLGKYLKKHR KVMPALERV FWGFEGDSTI PVYDTPIGKM GALTWENRM

NIT2 PLLRTALYGK GIEIYCAPTA DSRPVWQASM THIALEGGCF VLSANQFCRR 250
NIT1 PLLRTAMYAK GIEIYCAPTV DCMPWLSSM THIALEGGCF VLSACQFCRR

NIT2 KDYPPPEYE FAGLGEEPSA DTVVCPGGSV IISPSGEVLA GPNYEGEALI 300
NIT1 KNYPPPEYT FCGLEEEESP ESVVCSSGSV IISPLGTVLA GPNYESEALL

NIT2 TADLDLGEIV RAKFDFDVVG HYSRPEVLRV VVNDQPQLPV SFTSAAERTP 350
NIT1 TADLDLGEIV RAKFDFDVVG HYSRPEVLSL VVKSDEKPAV SFISAAGRDD

NIT2 AAKSDIDTKS Y (361)
NIT1 DYVQT (351)

```

Abbildung 3.8: Alignment der Aminosäuresequenz von *ZmNIT2* und *ZmNIT1*; Übereinstimmungen in grün, Cysteinrest im aktiven Zentrum in gelber Markierung.

Die Maisnitrilasen weisen etwa 60% Übereinstimmung mit *Arabidopsis thaliana* *AtNIT1*, *AtNIT2* und *AtNIT3* auf, die *in vitro*-Umsatz von IAN zu IAA zeigen und eng geclustert vorliegen (Bartel und Fink, 1994; Bartling *et al.*, 1992; 1994), und 69% mit *AtNIT4*, der eine Rolle in der Cyanid-Detoxifikation zugeschrieben wird (Piotrowski *et al.*, 2001; Tab.3.4). Eine zu beinahe 90% identische Aminosäuresequenz von *ZmNIT2* und der Nitrilase 2 in Reis könnte auch eine ähnliche Funktion der beiden implizieren.

Tabelle 3.4: Vergleich der Aminosäuresequenzen zwischen den Nitrilasen aus *Zea mays* (Zm), *Arabidopsis thaliana* (At), *Nicotiana tabacum* L. (Nt), *Oryza sativa* (Os) und *Lupinus angustifolius* (La). Die Übereinstimmungen sind in % angegeben (VectorNTI, Invitrogen); siehe auch Abb.4.2.

	ZmNIT1	ZmNIT2
ZmNIT1 (Mais)		72,9
ZmNIT2	72,9	
AtNIT1 (<i>Arabidopsis</i>)	59,0	58,4
AtNIT2	59,0	59,3
AtNIT3	59,0	59,6
AtNIT4	68,0	67,3
NtNIT4A (Tabak)	70,7	74,6
NtNIT4B	71,2	75,4
OsNIT1 (Reis)	79,8	73,8
OsNIT2	73,5	90,1
LaNIT4A	70,9	74,0
LaNIT4B	69,5	71,7

3.3.1 Nitrilaselokalisation und -quantifizierung

Anhand von Western Blots und *in situ*-Analysen mit Anti-ZmNIT1-Antikörpern, die sowohl ZmNIT1 als auch ZmNIT2 detektieren, konnte Nitrilaseexpression in den ersten 10 mm der Primärwurzelspitze vier Tage alter B73-Maispflanzen (200 ng mg⁻¹ Gesamtprotein) gezeigt werden; in den darüber liegenden zweiten 10 mm ließ sich diese nicht nachweisen (Abb.3.9).

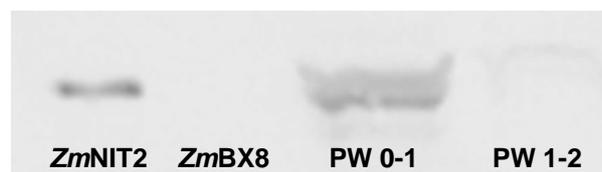


Abbildung 3.9: Western Blot mit je 100 µg Gesamtprotein aus den ersten (PW 0-1) und den zweiten (PW 1-2) 10 mm von Primärwurzelspitzen drei Tage alter Pflanzen und Anti-ZmNIT1-Antikörper (1:400). Positivkontrolle: ZmNIT2 (30 ng), Negativkontrolle: ZmBX8 (30 ng, DIMBOA-Glycosyltransferase).

Die Nitrilasekonzentration in der Primärwurzelspitze nahm vom 2. bis zum 5. Tag beständig ab und war bei 6 Tage alten Keimlingen nicht mehr nachzuweisen. Ebenso ließ sich in Extrakten aus Primärwurzeln, Keimwurzeln, Seitenwurzeln und Kronwurzeln von bereits 10 Tage alten Pflanzen keine Nitrilase detektieren (Abb.3.10).

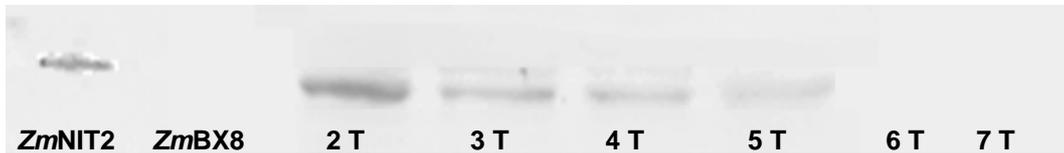


Abbildung 3.10: Western Blot mit je 100 µg Gesamtprotein aus den ersten 10 mm von Primärwurzelspitzen 2, 3, 4, 5, 6 und 7 Tage (T) alter Pflanzen und Anti-*ZmNIT1*-Antikörper (1:400). *ZmNIT2* (30 ng):Positiv-Kontrolle, *ZmBX8* (30 ng) Negativ-Kontrolle (DIMBOA-Glycosyltransferase).

Auch in den Koleoptilen ergab sich in einem entsprechenden Versuch zwischen 3 und 7 Tagen nach Keimung eine stetige Abnahme der Nitrilaseexpression (Daten nicht gezeigt).

In Immunoblot-Analysen mit *Tissue Prints* von Maiskörnern detektierten Anti-*ZmNIT1*-Antikörper starke Signale in Aleuron und Perikarp ($143 \pm 2 \text{ ng mg}^{-1}$ Gesamtprotein) und in Embryogewebe ($114 \pm 14 \text{ ng mg}^{-1}$), schwächere Signale dagegen im Endosperm ($51 \pm 16 \text{ ng mg}^{-1}$) (Abb.3.11).

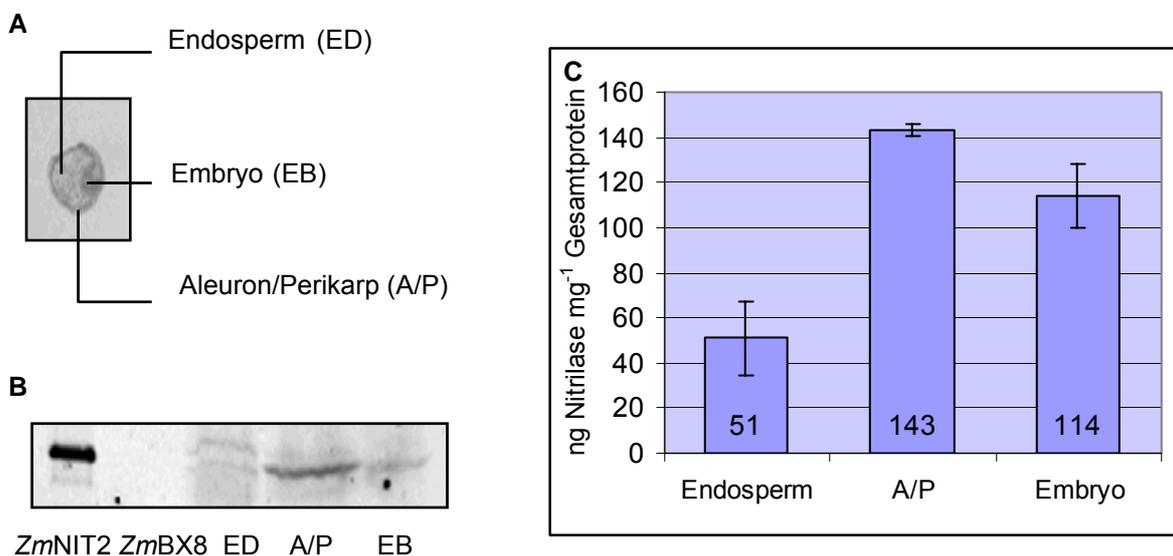


Abbildung 3.11: A) *Tissue Print* von halbiertem Maiskorn (5 Wochen n.P.) immunomarkiert mit Anti-*ZmNIT1*-Antikörpern (1:400).

B) Western Blot mit je 80 µg Gesamtprotein aus Endosperm (ED), Aleuron/Perikarp (AP) und Embryo (EB) 3 Wochen n.P. und Anti-*ZmNIT1*-Antikörpern (1:400). *ZmNIT2* (30 ng) als Positivkontrolle, *ZmBX8* (30 ng) als Negativkontrolle (DIMBOA-Glycosyltransferase).

C) Nitrilaseprotein in ng mg^{-1} Gesamtprotein isoliert aus Embryo, Aleuron/Perikarp und Endosperm 3 Wochen n.P. Durchschnittswerte aus 4 Experimenten.

3.3.2 Physiologische Versuche: Wachstum in IAN-Medium

Dem Keimungswasser wurde IAN in verschiedenen Endkonzentrationen (1 μM , 10 μM , 100 μM und 1 mM) zugesetzt. Nach einer Wachstumszeit von fünf Tagen wurden Primärwurzeln und Koleoptilen vermessen. Eine Anzucht von Keimlingen unter solchen Bedingungen ergab gegenüber der Kontrolle bereits bei Zugabe von 1 μM IAN eine signifikante Hemmung des Wurzelwachstums und zeigte damit typische Auxineffekte *in planta*, wohingegen die Koleoptilen- bzw. Sprosslänge nicht beeinflusst wurde. Derartige Resultate ergaben sich allerdings nur, wenn das IAN dem Wachstumsmedium von Anfang an zugegeben worden war. Erst nach einigen Tagen zugesetztes IAN erzielte keinerlei Wirkung. Die Durchschnittswerte aus zwei unabhängigen Versuchsreihen mit je zehn Maiskörnern wurden in der folgenden Grafik dargestellt (Abb.3.12).

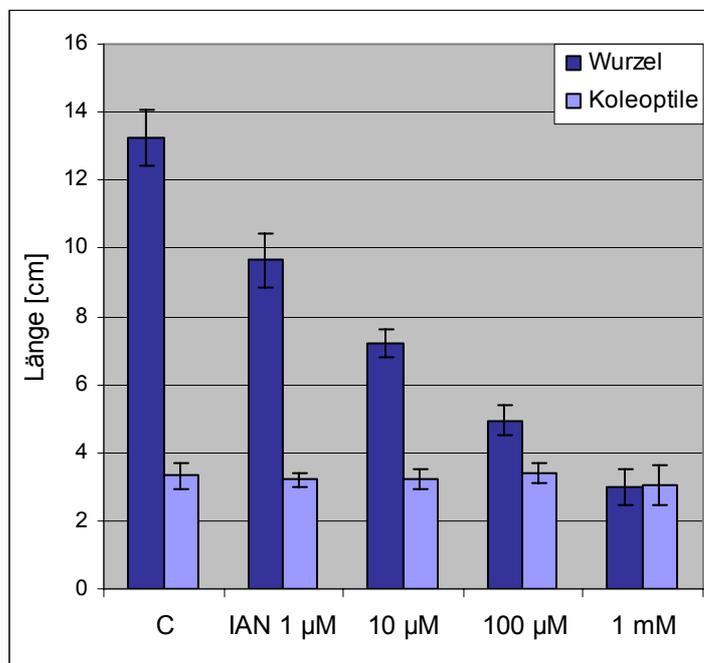


Abbildung 3.12: Wurzel- und Koleoptilenlängen 5 Tage alter Pflanzen mit IAN in verschiedenen Konzentrationen (1 μM , 10 μM , 100 μM , 1 mM) im Wachstumsmedium. Kontrolle (C) ohne IAN; n=20.

3.3.3 Physiologische Versuche: Lanolin-Krümmungstests

Ferner wurden Lanolin-Krümmungstests („*Avena curvature test*“, Haga und Iino, 1998) an Maiskoleoptilen durchgeführt. Dazu wurde ein Tröpfchen Lanolin/IAA- bzw. Lanolin/IAN-Gemisch auf eine Seite der Maiskoleoptile aufgetragen. IAN-Konzentrationen von 100 μM bis hin zu 1 mM zeigten – wie auch schon bei IAM beobachtet; vgl. 3.2.2. – keinen Effekt auf die Maiskoleoptilen (2, 3 und 4 Tage n.K.); wohingegen IAA-haltiges Lanolin als Positivkontrolle auf eine Seite der Koleoptile aufgetragen in den selben Konzentrationen

und Altersstadien innerhalb von wenigen Minuten eine Krümmung weg von der mit IAA-bestrichenen Seite bewirkte (Abb.3.13).

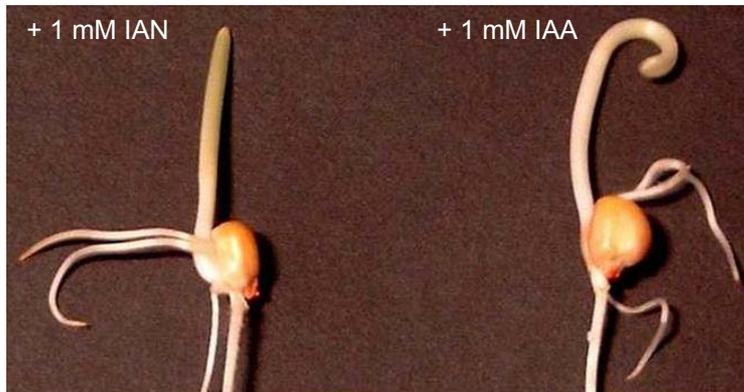


Abbildung 3.13: Maiskeimlingen 3 Tage n.K. nach 15 minütiger Inkubation mit 1 mM IAN bzw. IAA in Lanolinpaste.

3.3.4 IAN-Detektion und -Quantifizierung via GC-MS

Ein *in vivo*-Umsatz von IAN zu IAA durch die Nitrilasen setzt ein Vorhandensein des Substrats in der Pflanze voraus. Daher wurden verschiedene Maiskorngewebe und Keimlinge via GC-MS auf Retentionszeit, Molekularmasse und Fragmentierungsmuster von IAN hin analysiert (Müller und Weiler, 2000a). IAN konnte in Extrakten aus Kornfraktionen (4 und 5 Wochen nach Pollinierung) in Aleuron/Perikarp (11 ng g^{-1}), Endosperm (4 ng g^{-1}) und vor allem in Embryogewebe ($16 - 53 \text{ ng g}^{-1}$) nachgewiesen werden. Koleoptilen von vier Tage alten Keimlingen enthielten etwa 16 ng IAN pro g Frischgewicht und Primärwurzeln circa 9 ng g^{-1} (Tab.3.5).

Tabelle 3.5: GC-MS-Messungen der IAN-Konzentrationen in verschiedenen Maiskorn und Keimlingsgeweben (W.n.P. = Wochen nach Pollinierung; T.n.K.= Tage nach Keimung).

Gewebe	Alter	IAN-Konzentration ($\mu\text{mol g}^{-1}$ Frischgewicht)
Endosperm	4 W.n.P.	24 ± 3
Aleuron/Perikarp	4 W.n.P.	71 ± 10
Embryo	4 W.n.P.	99^a
Endosperm	5 W.n.P.	24 ± 7
Aleuron/Perikarp	5 W.n.P.	73 ± 27
Embryo	5 W.n.P.	347 ± 46
Koleoptile	4 T.n.K.	100^a
Primärwurzel	4 T.n.K.	60 ± 21^b

$n = 3.$ $^a n = 1.$ $^b n = 2.$

3.3.5 Charakterisierung von *in vitro* Enzymaktivitäten und Substratspezifitäten heterolog exprimierter Nitrilasen

Mit Hilfe der Berthelot-Reaktion (Bolleter *et al.*, 1961) wurden die Proteine ZmNIT1 und ZmNIT2 sowohl aus bakteriellem Rohextrakt als auch über His-Tag aufgereinigt gegenüber 18 verschiedenen Nitrilverbindungen getestet, die bereits früher an *Arabidopsis*-Nitrilasen erprobt worden waren (Piotrowski *et al.*, 2001; Vorwerk *et al.*, 2001) oder als Nitrilasesubstrate vorgeschlagen worden waren (Thimann und Mahadevan, 1964).

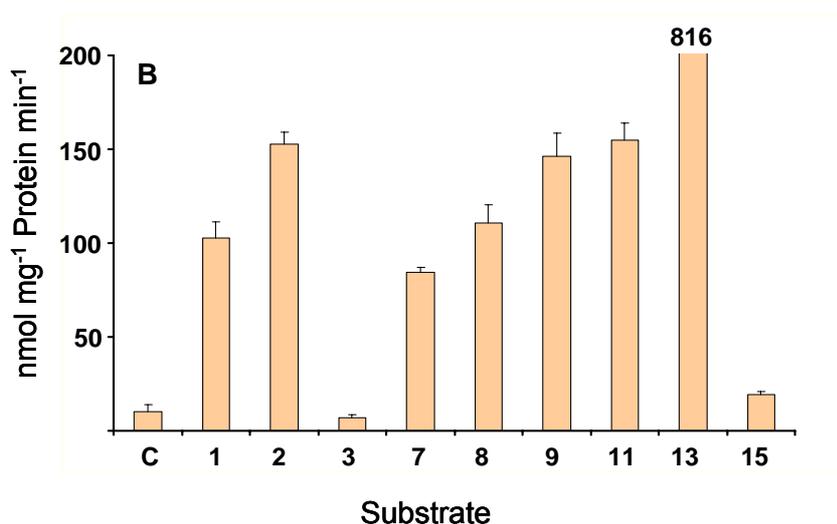
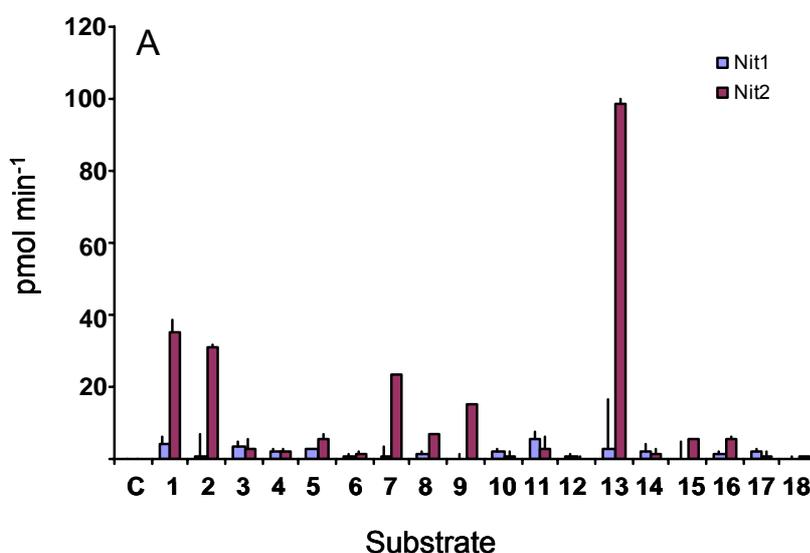


Abbildung 3.14: A) Nitrilaseaktivität von bakteriellem Rohextrakt mit heterolog exprimierter ZmNIT1 und ZmNIT2 (50 µg Protein) gegenüber verschiedenen Substraten.

B) Nitrilaseaktivität von gereinigter ZmNIT2 gegenüber verschiedenen Substraten:

C: Kontrolle ohne Substrat; S1: IAN; S2: 3-Phenylpropionitril; S3: β-Cyanoalanin; S4: 2-Cyanopyridin; S5: 3-Cyanopyridin; S6: 4-Cyanopyridin; S7: Allylcyanid; S8: Phenylthioacetoneitril; S9: Methylthioacetoneitril; S10: 3-Hydroxypropionitril; S11: 3-Aminopropionitril; S12: Indol-3-Carbonitril; S13: 4-Phenylbutyronitril; S14: 2-Chloracetamid; S15: Cyanoacetamid; S16: Cyclopropancarbonitril; S17: Benznitril; S18: Propionitril.

Während *ZmNIT1* kaum Aktivität gegenüber allen getesteten Substraten aufwies, setzte *ZmNIT2* sowohl im Rohextrakt (Abb.3.14 A) als auch über Ni-NTA gereinigt (Abb.3.14 B) IAN und einige andere Verbindungen, wie beispielsweise 3-Phenylpropionitril, Allylcyanid, Methylthioacetoneitril und vor allem 4-Phenylbutyronitril effizient um. Trotz der Homologie zwischen den Maisnitrilasen und *Arabidopsis AtNIT4* (Tab.3.4), akzeptierten *ZmNIT1* und *ZmNIT2* das *AtNIT4*-Substrat β -Cyanoalanin nicht.

Heterolog exprimierte *ZmNIT2* wurde gereinigt und die kinetischen Parameter mit den Substraten 3-Phenylpropionitril, 4-Phenylbutyronitril und IAN bestimmt (Tab.3.6). Die Messungen wurden unter Einsatz von 0,5 mM bis 5 mM Substrat durchgeführt, wobei mit IAN bei 5 mM eine Sättigung der Substratlöslichkeit zu beobachten war. Eine Substratinhibierung bei IAN-Konzentrationen höher als 3 mM wie sie bei *Arabidopsis* auftritt (Vorwerk *et al.*, 2001) konnte bei *ZmNIT2* nicht beobachtet werden.

Bei einem apparenten K_M^{IAN} -Wert von 0,9 mM betrug die maximale Umsatzrate (V_{max}) von IAN 200 nmol mg⁻¹ min⁻¹. Einen höheren K_M -Wert (4,0 mM) mit ähnlichem Umsatz erhielt man für 3-Phenylpropionitril ($V_{max} = 325$ nmol mg⁻¹ min⁻¹), während 4-Phenylbutyronitril einen wesentlich höheren K_M -Wert (13,1 mM) und ebenso eine höhere Umsatzrate von 2000 nmol mg⁻¹ min⁻¹ aufwies. Unter den drei getesteten Substraten zeigte *ZmNIT2* die beste katalytische Effizienz mit IAN ($k_{cat}/K_M = 0,14$ mM⁻¹ s⁻¹), die damit auch um zwei Größenordnungen höher ist als von allen bisher untersuchten pflanzlichen Nitrilasen, einschließlich der vier Nitrilasen aus *Arabidopsis* (Tab.3.6).

Tabelle 3.6: Kinetische Parameter von *Zea mays ZmNIT2* und *Arabidopsis thaliana AtNIT1*, *AtNIT2* und *AtNIT3* (Vorwerk *et al.*, 2001) gegenüber verschiedenen Substraten. Die Reaktionen wurden bei pH 8.0 und 30°C durchgeführt.

Nitrilase	Substrat	K_M (mM)	V_{max} (nmol mg ⁻¹ min ⁻¹)	k_{cat}/K_M (mM ⁻¹ s ⁻¹)
<i>ZmNIT2</i>	IAN	0,9	200	0,14
<i>ZmNIT2</i>	3-Phenylpropionitril	4,0	325	0,053
<i>ZmNIT2</i>	4-Phenylbutyronitril	13,1	2000	0,099
<i>AtNIT1</i>	IAN	11,1	38	0,0022
<i>AtNIT2</i>	IAN	7,4	18	0,0015
<i>AtNIT3</i>	IAN	30,1	15	0,0003

3.3.6 pH- und Temperatur-Optima

Die Aktivität von *ZmNIT2* gegenüber IAN und den beiden besten weiteren Substraten 3-Phenylpropionitril und 4-Phenylbutyronitril erwies sich zwischen pH 6.0 und pH 9.0 als relativ konstant mit einem leichten Maximum zwischen pH 7.5 und 8.0.

In Bezug auf die Temperatur ließ sich für IAN wie auch für 3-Phenylpropionitril ein Optimum um die 37°C beobachten, wohingegen gegenüber 4-Phenylbutyronitril maximale Aktivität um die 26°C bestand.

Enzymatische Assays wurden aber weiterhin bei 30°C durchgeführt, um einen Vergleich mit Enzymdaten anderer Nitrilasen beispielsweise aus *Arabidopsis thaliana* zu erlauben.

3.3.7 Enzymaktivitäten im Heteromer aus beiden Nitrilasen

Überraschenderweise ergab sich in Aktivitätstests mit Proteingemischen aus beiden Maisnitrilasen neben dem bereits mit *ZmNIT2* beobachteten IAN-Umsatz auch Aktivität mit dem Substrat β -Cyanoalanin, einem Intermediat der Cyanid-Detoxifikation, das beispielsweise in *Arabidopsis* durch *AtNIT4* (Piotrowski *et al.*, 2001) zu Asparagin und Asparaginsäure umgesetzt wird. In weiteren Aktivitätstests via Ammoniumfreisetzung in der Berthelot-Farbreaktion und HPLC-Analyse zur Produktverifizierung wurden die IAN- bzw. β -Cyanoalanin-Umsätze der beiden Nitrilaseenzyme einzeln und im Proteingemisch verglichen.

Tabelle 3.7: Kinetische Parameter für *ZmNIT1* und *ZmNIT2* alleine und für das Gemisch aus beiden Nitrilasen (*ZmNIT1/2*). Coexpression der beiden Enzyme ergab analoge Parameter. Die Reaktionen wurden bei pH 8.0 und 30°C durchgeführt. Die Angaben erfolgen in $K_M = \text{mM}$, $V_{\max} = \text{nmol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ und $k_{\text{cat}}/K_M = \text{mM}^{-1} \text{s}^{-1}$; Berechnung bei Heteromeren pro katalytischem Zentrum; (– = kein Umsatz nachweisbar).

Nitrilase	Substrat	K_M (mM)	V_{\max} (nmol mg ⁻¹ min ⁻¹)	k_{cat}/K_M (mM ⁻¹ s ⁻¹)
<i>ZmNIT1</i>	IAN	–	–	–
<i>ZmNIT1</i>	β -Cyanoalanin	1,8	2	0,0007
<i>ZmNIT2</i>	IAN	0,9	200	0,14
<i>ZmNIT2</i>	β -Cyanoalanin	–	–	–
<i>ZmNIT1/2</i>	IAN	0,5	75	0,18
<i>ZmNIT1/2</i>	β -Cyanoalanin	0,3	63	0,26

ZmNIT2 alleine weist wie bereits gezeigt Aktivität mit IAN auf ($V_{\max} = 200 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$; $K_M^{\text{IAN}} = 0,9 \text{ mM}$), während sich mit reinem *ZmNIT1*-Enzym eine geringfügige Aktivität mit β -Cyanoalanin nachweisen ließ ($V_{\max} = 2 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$; $K_M^{\beta\text{-Cy}} = 1,8 \text{ mM}$) (Abb.3.15), deren katalytische Effizienz allerdings 200mal niedriger ist als in der Kombination *ZmNIT2* und IAN. Sowohl Coexpression beider Enzyme als auch ein Gemisch aus beiden resultierte in Aktivitäten mit IAN und β -Cyanoalanin unter Verringerung der K_M -Werte für beide Substrate. Für das Substrat IAN ging dabei die maximale Umsatzrate um etwa 60% zurück, bei Berechnung mit einem katalytischem Zentrum je Heterodimer erhöhte sich jedoch die katalytische Effizienz um 22% (Tab.3.7).

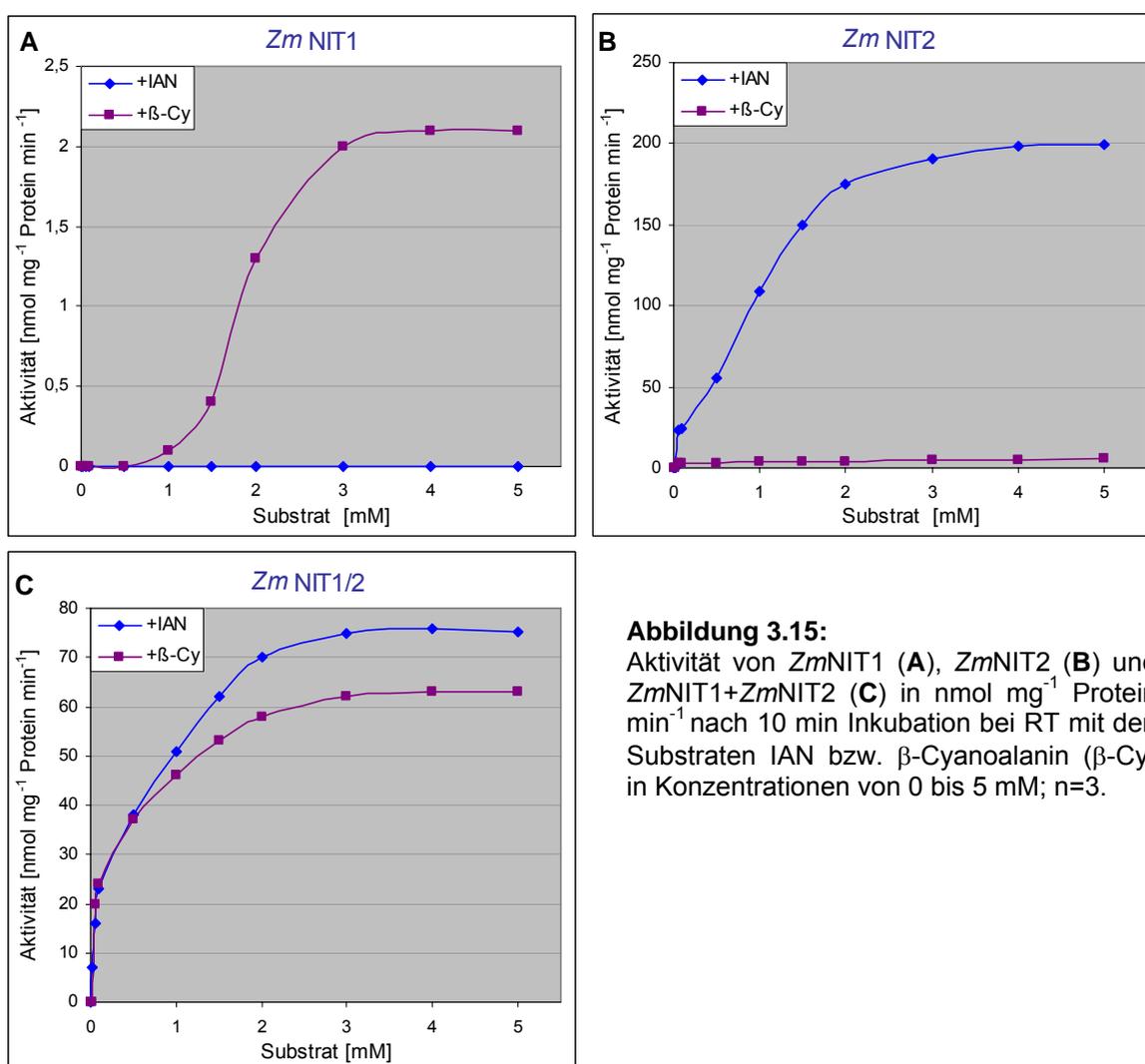


Abbildung 3.15:

Aktivität von *ZmNIT1* (A), *ZmNIT2* (B) und *ZmNIT1+ZmNIT2* (C) in $\text{nmol mg}^{-1} \text{ Protein min}^{-1}$ nach 10 min Inkubation bei RT mit den Substraten IAN bzw. β -Cyanoalanin (β -Cy) in Konzentrationen von 0 bis 5 mM; n=3.

Gelfiltration mit *ZmNIT2*-Protein und dem Gemisch aus den Nitrilasen 1 und 2 nach 10 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur resultierte in beiden Fällen in Proteinkomplexen, die bei ca. 44 ml eluierten (Abb.3.16). Derselbe Diagrammverlauf ergab sich auch für *ZmNIT1*. Dieses Elutionsvolumen entspricht dem „void volume“ V_0 der Säule. Die

Moleküle dringen also nicht in die Dextran-Agarose-Matrix ein und eluieren wie auch Blue Dextran (2000 kDa) selbst mit Puffergeschwindigkeit; daher lässt sich keine genaue Angabe zur Aggregatgröße machen, diese sollte nach Extrapolation der Standardproteine jedoch mindestens 250 kDa betragen.

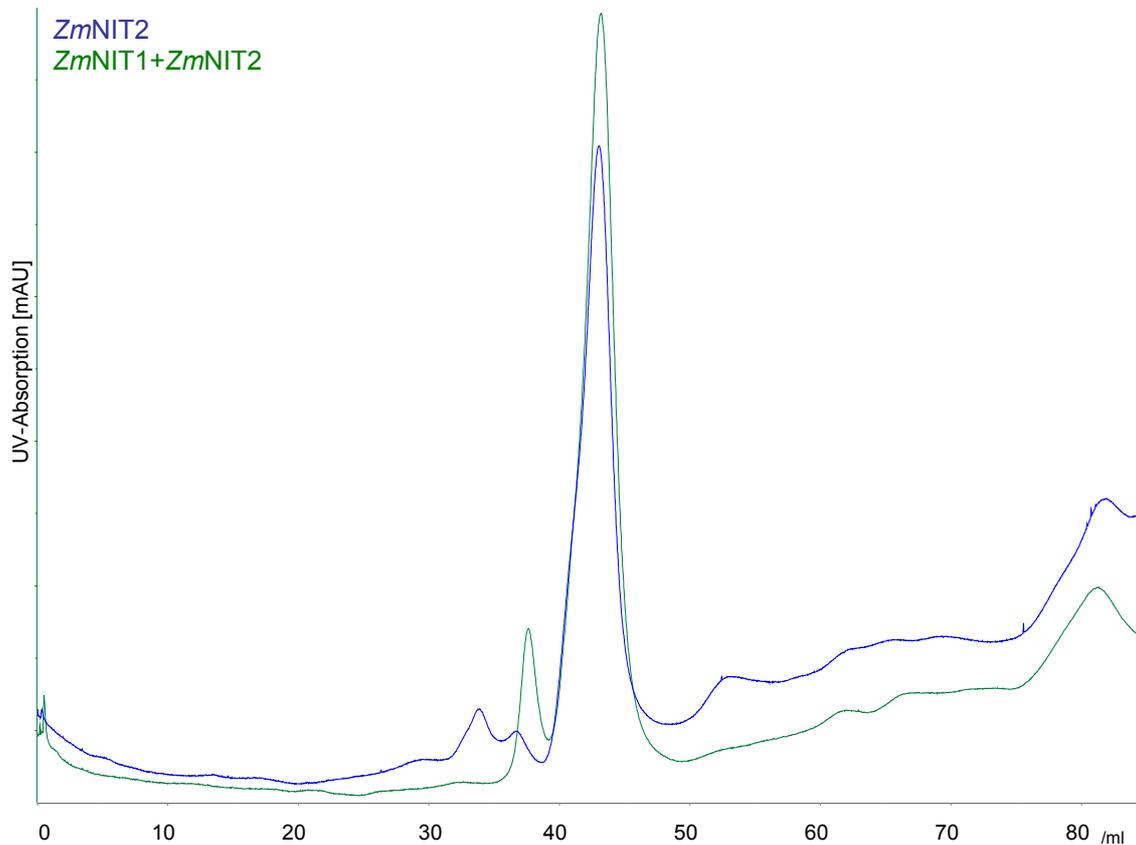


Abbildung 3.16: Gelfiltrationslauf mit *ZmNIT1*- und *ZmNIT2*-Proteingemisch nach 10 minütiger Inkubation bei RT (grün) bzw. *ZmNIT2*-Protein (blau); Elution bei 44 ml; n=2.

Dass die beiden Nitrilaseproteine zumindest *in vitro* in der Lage sind zu interagieren, konnte auch im nachfolgend unter Punkt 3.3.12.3 beschriebenen gerichteten Yeast-Two-Hybrid gezeigt werden.

3.3.8 β -Cyanoalanin-Umsatz in wildtypischen und mutanten Körnern

Proteinextrakte aus wildtypischen und für *ZmNit1*- bzw. *ZmNit2*-mutanten Körnern (zu Mutanten siehe auch 3.3.13) wurden auf Enzymaktivität mit β -Cyanoalanin hin überprüft. Reaktionsansätze aus Protein, mit und ohne Substrat in K-P-Puffer wurden nach 3 stündiger Inkubation via Dünnschichtchromatographie analysiert. Eine deutliche Aspartat-Bande (R_f -Wert = 0,24) zeigte sich lediglich bei Protein aus wildtypischen Körnern, schwache Banden wie in den beiden Einzelmutanten traten auch in Negativkontrollen ohne Substrat auf. Dies weist, wie auch die *in vitro* Aktivität, darauf hin, dass für den

Umsatz von β -Cyanoalanin (Rf-Wert = 0,62) wahrscheinlich beide Nitrilasen benötigt werden.

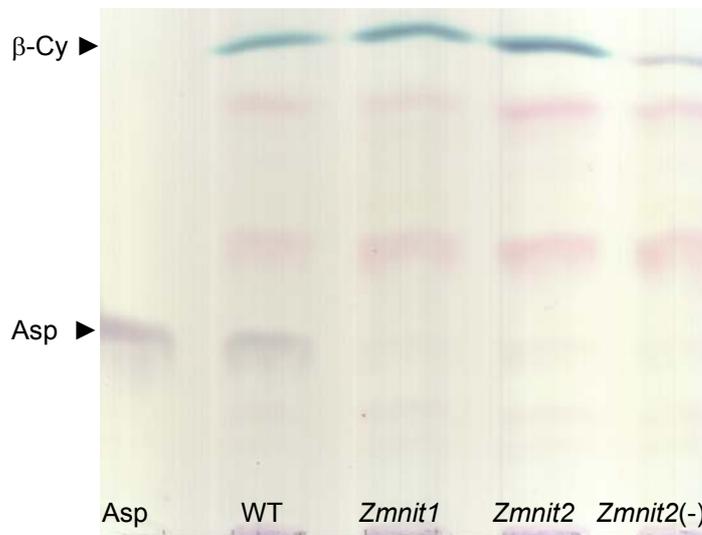


Abbildung 3.17:

Dünnschichtchromatographie mit β -Cyanoalanin-Umsatz in Proteinextrakt aus wildtypischen (WT) und für *ZmNit1* (*Zmnit1*) oder *ZmNit2* (*Zmnit2*) mutanten Körnern. *Zmnit2*-Proteinextrakt ohne Substrat (*Zmnit2*(-)) als Negativkontrolle; Standard 10 nmol Aspartat (Asp); n=3.

3.3.9 Bestimmung endogener Nitrilaseaktivität in Korn und Keimling

Endogene Nitrilaseaktivität und damit hier die Umsetzung von IAN zu IAA wurde in Proteinextrakten aus Embryo, Endosperm und Aleuron/Perikarp zwei bis fünf Wochen nach Pollinierung getestet und konnte in allen Geweben und zu allen Zeitpunkten nachgewiesen werden. Vier Wochen nach Pollinierung wurden in Embryo ($1,62 \pm 0,45$ pmol mg^{-1} Protein min^{-1} , Abb.3.18 A) und Aleuron/Perikarp ($1,74 \pm 0,70$ pmol mg^{-1} Protein min^{-1} , Abb.3.18 C) höhere Nitrilaseaktivitäten beobachtet als im Endosperm ($0,77 \pm 0,30$ pmol mg^{-1} Protein min^{-1} , Abb.3.18 B). Die Aktivität im Embryo verfünffachte sich von der dritten zur fünften Woche nach Pollinierung signifikant (*t*-Test). Alle Werte wurden gegen die in den „boiled controls“ detektierten IAA-Rückstände abgeglichen, die aus unspezifischem IAN-Umsatz (Ilic *et al.*, 1996) oder Hydrolyse von IAA-Protein-Konjugaten während der Hitzedenaturierung (Walz *et al.*, 2002) resultieren können.

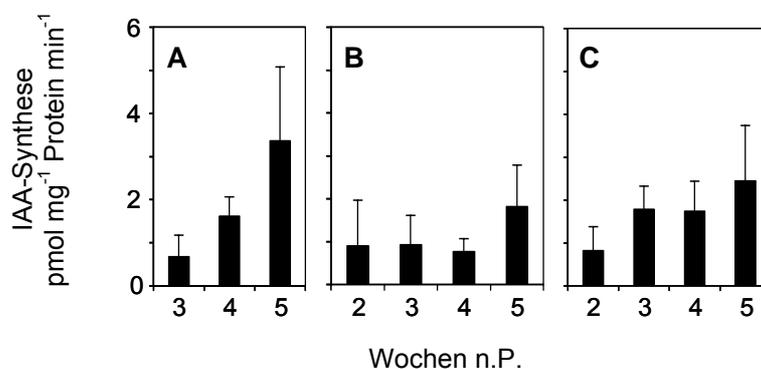


Abbildung 3.18: Nitrilaseaktivität (Umsatz von IAN zu IAA in pmol mg^{-1} Protein min^{-1}) in Proteinextrakten aus Embryo- (A), Endosperm- (B) und Aleuron/Perikarp-Gewebe (C) 2 bzw. 3 bis 5 Wochen n.P.; n=4.

Die kinetischen Parameter der endogenen Aktivität entsprechen den *in vitro*-Umsätzen. In Ammoniumsulfat-gefällten Proteinextrakten aus Maiskörnern (5 W.n.P.) ließ sich durch Messungen mit 0,2 mM bis 3 mM Substrat bei pH 8.0 und 30°C für IAN ein apparenter K_M^{IAN} -Wert von 0,9 mM, in Keimlingen (3 Tage n.K.) von 1,5 mM bestimmen.

3.3.10 Expression der Nitrilasen unter hormonellen und mechanischen Einwirkungen

Die Expression der Maisnitrilasen in Primärwurzelspitzen und Koleoptilen wurde nach 1, 4, und 24 stündiger Inkubation nach Verwundung (W) durch Quetschen mit einer Pinzette an der Wurzel- bzw. Koleoptilenspitze, nach Zugabe von Methyljasmonat (MeJa), IAN, IAA, β -Cyanoalanin (β -Cy), 1-Aminocyclopropan-1-Carboxylsäure (ACC) ins Keimungswasser oder im Licht mit einer unbehandelten Kontrolle verglichen (Abb.3.19). Dabei zeigten sich in den Koleoptilen zu keinem Zeitpunkt Unterschiede.

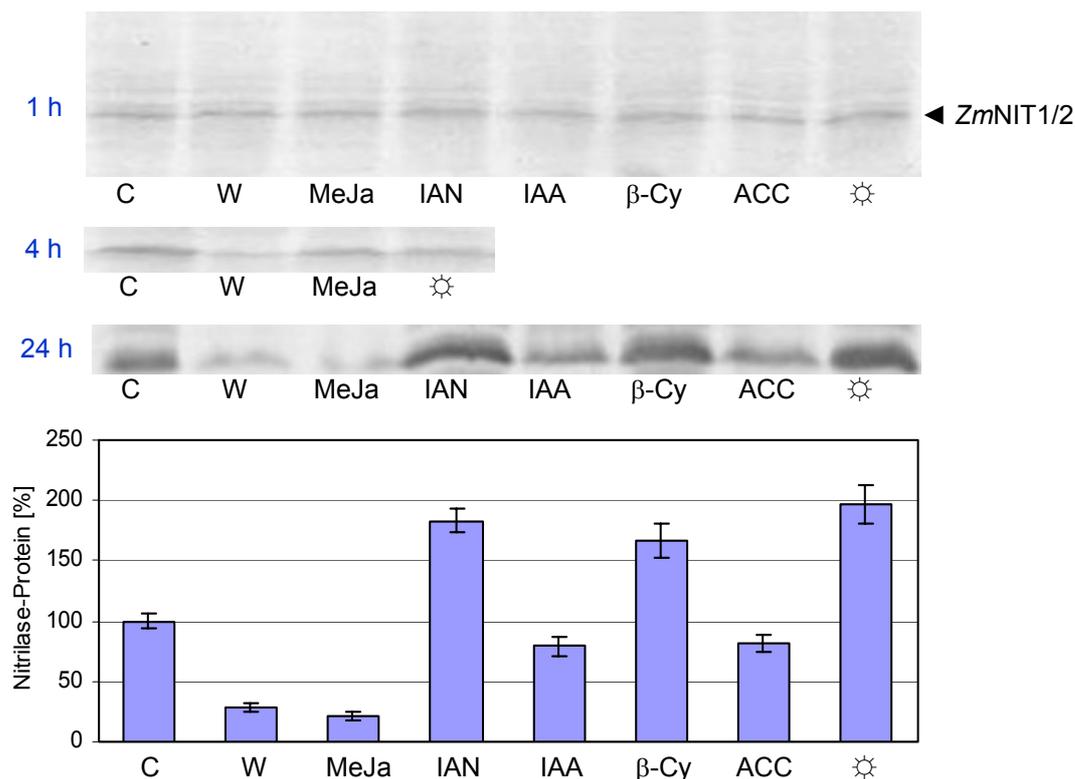


Abbildung 3.19: Western Blots mit je 100 μ g Gesamtprotein aus Primärwurzeln 3 Tage n.K. und Anti-ZmNIT1-Antikörpern (1:400) inkubiert für 1 h, 4 h oder 24 h nach Verwundung durch Quetschen (W), mit 100 μ M Methyljasmonat (MeJa), 100 μ M Indol-3-Acetonitril (IAN), 100 μ M Indol-3-Essigsäure (IAA), 100 μ M β -Cyanoalanin (β -Cy), 100 μ M 1-Aminocyclopropan-1-Carboxylsäure (ACC) bzw. in Licht (\odot) im Vergleich zur Kontrolle (C); n=3; Balken repräsentieren prozentuale Verteilung bei 24 h; Unterschiede zwischen Kontrolle und den jeweiligen behandelten Proben sind laut *t*-Test ($P < 0,05$) signifikant.

Auch in den Primärwurzeln ergaben sich nach einer Stunde noch keine signifikanten Veränderungen im Proteinlevel, nach 4 Stunden wiesen Pflanzen, die verwundet oder mit Methyljasmonat behandelt worden waren, leicht reduzierte Nitrilasemengen auf, nach 24 Stunden enthielten diese Proben deutlich weniger Nitrilaseprotein ($25\% \pm 4\%$). IAA und ACC – ein Vorläufermolekül in der Ethylenbiosynthese – verminderten die Proteinlevel nach 24 Stunden auf etwa $80\% \pm 8\%$. Mit den Substraten IAN, β -Cyanoalanin sowie durch Licht wurde die Nitrilaseexpression um $83\% \pm 10\%$ (IAN), $66\% \pm 14\%$ (β -Cy) und $97\% \pm 16\%$ (☀) induziert.

Unter Zugabe von verschiedenen Pflanzenhormonen

50 μ M Naphtylessigsäure (NAA, künstliches Auxin)

50 μ M Giberellinsäure

50 μ M Kinetin

50 μ M Abscisinsäure oder

50 μ M epi-Brassinosteroid

aufgezogene, 3 Tage alte Keimlinge wiesen in Western Blots nach 24 Stunden Inkubation weder in Primärwurzel noch in Koleoptile Veränderungen in der Nitrilaseexpression auf.

3.3.11 IAA-Synthase-Komplex

Da aus *Arabidopsis* bereits in Ansätzen ein löslicher 160-180 kDa IAA-Synthase-Komplex isoliert und teilgereinigt werden konnte (Müller und Weiler, 2000b), wurde auch für Mais der Versuch unternommen diesen möglichen Komplex nativ aufzureinigen, um seine enzymatischen Einzelkomponenten zu identifizieren. In *Arabidopsis* ist die Synthese von IAA durch diesen Komplex strikt abhängig von Sauerstoff. Untersuchungen mit Inhibitoren und Cofaktoren belegen dabei weder die Beteiligung einer Flavin-abhängigen Monooxygenase noch eines Cytochrom P450-Enzyms.

In Mais stellen unreife Körner als das hauptsächlich IAA-produzierende Gewebe und mit großen Mengen an gespeicherten IAA-Estern (Epstein *et al.*, 1980) ein besonders geeignetes Modellsystem für die biochemische Analyse dar. Tatsächlich ist Proteinextrakt aus Maisendosperm in der Lage ^{14}C -markiertes Tryptophan zu IAA umzusetzen (Östin *et al.*, 1999). Proteinextrakte aus *Sweetcorn* (Zuckermais) der Sorte „Landmark“ (30 Tage nach Pollinierung) setzen Tryptophan mit einer Rate von $0,5 \text{ pmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ zu IAA um. Die Möglichkeit IAA-Synthase-Aktivität, also den Umsatz von Tryptophan zu IAA, auch nach Reinigung des Maisrohextrakts über Säulenchromatographie wie Anionentauscher oder Gelfiltration nachzuweisen, erschien als erster Hinweis der Beteiligung eines derartigen Komplexes in Maiskörnern. Laut Gelfiltration (HiLoad™ 16/60 Superdex™ 200

prep grade, Amersham) beruht der Umsatz auf einem etwa 170 kDa-Proteinkomplex. Unter verschiedensten Reinigungsschritten und Säulenkombinationen konnte die beste Aktivitätsanreicherung über eine fraktionierte Ammoniumsulfatfällung (35% - 50%), gefolgt von Anionenaustauscher-Chromatographie (Resource[®] Q 6 ml, Pharmacia) und einer Hydroxyapatit-Säule (Econo-Pac[®] CHT-II Cartridge 5 ml, Bio-Rad) erreicht werden.

Die Anionenaustauscher-Chromatographie beruht auf der elektrostatischen Wechselwirkung von Proteinen mit einer positiv geladenen Säulenmatrix. Die Elution erfolgt durch Verdrängung der gebundenen Proteine durch eine steigende Konzentration an im Laufpuffer gelösten Salzionen. In einem Tris-Puffersystem (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, 5 mM DTE) von 0 bis 1 M KCl in 5 Säulenvolumina (30 ml) erfolgte die Elution der aktiven Fraktion bei etwa 400 mM Salz. Hydroxyapatit, das Säulenmaterial der zweiten Säule, ist eine kristalline Form von Calciumphosphat, an dessen Oberfläche Proteine über ihre Amino- und Carboxygruppen binden. Die positiv geladenen Aminogruppen treten in eine unspezifische elektrostatische Wechselwirkung mit den überwiegend negativ geladenen Phosphatgruppen, während die negativ geladenen Carboxygruppen einerseits elektrostatisch abgestoßen werden, andererseits von den Calciumatomen komplexiert werden (Lottspeich und Zorbas, 1998). In Natrium-Phosphat-Puffer, pH 7.5, von 10 auf 300 mM Na-P in 30 ml (6 CV) konnte IAA-Synthase-Aktivität bei etwa 100 mM Na-P (2 CV) detektiert werden.

Insgesamt ergab sich unter Zugabe von 1 mM NAD⁺ wie auch NADP als Cofaktor eine spezifische Aktivität von 32 pmol mg⁻¹ min⁻¹, was eine 64fache Anreicherung und 0,4% Proteinausbeute im Vergleich zu Kornrohextrakten bedeutet (Tab.3.8).

Tabelle 3.8: Reinigungsschema des IAA-Synthase-Komplexes aus *Zea mays*. AS (35% - 50%) = Fällung zwischen 35% und 50% Ammoniumsulfat.

	Proteinmenge		Aktivität	Anreicherung
	(g)	(%)	(pmol mg ⁻¹ min ⁻¹)	
Kornextrakt	1	100	0,5	1x
AS (35% - 50%)	0,6	60	1,5	3x
Resource [®] Q	0,1	10	11,8	23x
Hydroxyapatit-Säule	0,004	0,4	32,3	64x

Andere Säulen wie eine Tryptophan-Affinitätssäule (HiTrap NHS-activated HP 5ml), eine HiTrap Blue-Säule oder Säulen zur hydrophoben Interaktion (Resource[™] ETH, ISO, PHE) zeigten entweder keine adäquate Trennung oder erst gar keine Bindung. Es konnte keine

Aktivitätssteigerung mit NADH (1 mM) oder Oxoglutarat (10 mM) beobachtet werden. Immunoblotting mit Anti-ZmNIT1-, Mais Aldehydoxidase- und *Arabidopsis* Amidase1-Antikörpern ergaben keine Hinweise auf eine Beteiligung einer Nitrilase, Aldehydoxidase oder Amidase.

Weitere Aufreinigungsversuche scheiterten an der schnellen Abnahme oder am totalen Verlust der Enzymaktivität bereits nach einem Tag oder durch Einfrieren, was darauf hinweisen könnte, dass es sich bei diesem aktiven Proteinaggregat nicht notwendigerweise um einen *in vivo* stabilen Komplex handelt. Da bei der Tryptophanumsetzung auch keine möglichen Intermediate nachgewiesen werden konnten, war es nicht möglich an der IAA-Synthese beteiligte Enzyme auf diese Weise aufzureinigen und zu identifizieren.

3.3.12 Yeast-Two-Hybrid

Für die Suche nach Bindungspartnern der Maisnitrilasen, die im gleichen Gewebe exprimiert werden, und damit einer physiologischen Rolle dieser Enzyme – insbesondere in Bezug auf einen eventuellen IAA-Synthase-Komplex – wurde als Methode der Yeast-Two-Hybrid-Screen gewählt.

3.3.12.1 Durchführung von Yeast-Two-Hybrid-Screens

Erstmals beschrieben wurde der Yeast-Two-Hybrid-Screen von Fields und Song (1989). Es handelt sich dabei um eine Methode, mit deren Hilfe *in vivo* Protein-Protein-Interaktionen studiert und Interaktionspartner eines bereits bekannten Proteins identifiziert werden können. Die Interaktion zwischen der jeweiligen Nitrilase und einem der in der cDNA-Bank codierten Proteine ermöglicht es der entsprechenden Hefekolonie auf Aminosäureselektionsmedien zu wachsen und das *lacZ*-Gen zu exprimieren (Abb.3.20).

Zur Herstellung eines Hefeköderstammes wurden die cDNAs von *ZmNit1* und *ZmNit2* im Vektor pBD-GAL4 Cam an die GAL4 DNA-Bindedomäne (GAL4 BD) fusioniert und in den Hefestamm YRG-2 (Stratagene) transformiert. Im β -Galactosidase-Test zeigte keiner der beiden Köderstämme eine Autoaktivierung, also eine Blaufärbung und damit Aktivierung des *lacZ*-Reportergens ohne Transformation mit der GAL4 AD-cDNA-Bank. Für den Yeast-Two-Hybrid-Screen wurde der Köderstamm mit GAL4 AD-cDNA-Banken aus zwei Tage alten Maiskeimlingen bzw. aus reifen Körnern (CI31A) transformiert.

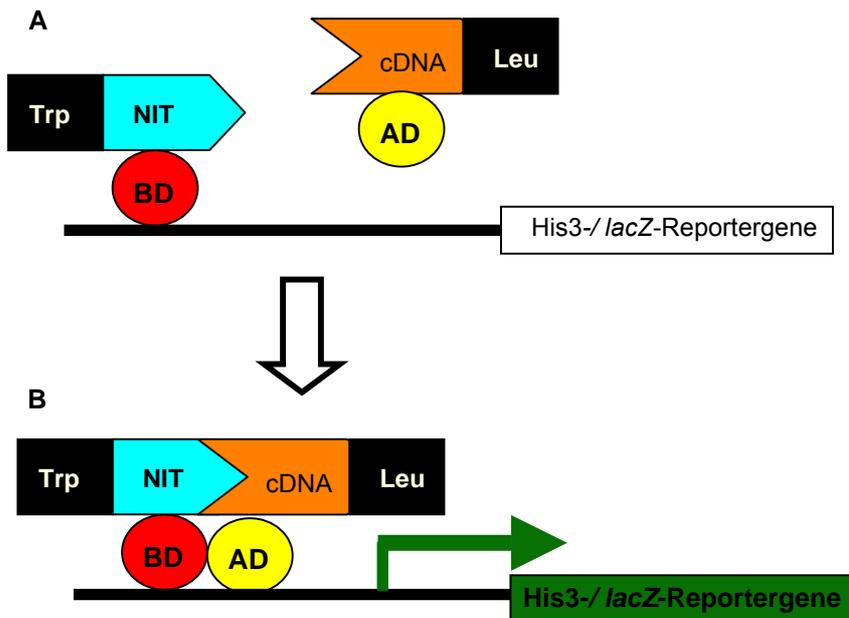


Abbildung 3.20: Strategie des Yeast-Two-Hybrid-Screens. **(A):** Das Fusionsprotein GAL4 BD-*ZmNit* bindet über die GAL4 Bindedomäne (BD) an deren Zielsequenz im Promotorbereich, der den Reportergenen *HIS3* und *lacZ* vorgeschaltet ist. GAL4 BD-*ZmNit* ist jedoch alleine nicht in der Lage die Reportergene zu aktivieren. **(B):** Ein Fusionsprotein zur GAL4 Transaktivierungsdomäne (AD) bindet spezifisch an GAL4 BD-*ZmNit*. Dadurch werden GAL4 AD und GAL4 BD in direkte Nähe zueinander gebracht und wirken als funktionelle Einheit, die die Expression der Reportergene (*His3* und *lacZ*) initiiert. Hefekolonien mit interagierenden Proteinen können somit auf -Trp/-Leu/-His-Selektionsmedium wachsen und entwickeln aufgrund der *lacZ*-Expression eine Blaufärbung mit X-Gal-Lösung im β -Galactosidase-Test.

3.3.12.2 Yeast-Two-Hybrid-Screens mit *ZmNit2* und *ZmNit1* gegen cDNA-Banken

In zwei Yeast-Two-Hybrid-Screens mit *ZmNit2* und einer cDNA-Bank aus zwei Tage altem Keimlingsgewebe zeigten von je 5×10^5 Transformanten insgesamt zehn Hefekolonien eine sehr gute Wachstumsfähigkeit auf Selektionsmedium (Test bis zu 60 mM 3-AT) sowie eine deutliche Blaufärbung im β -Galactosidase-Test und damit eine signifikante Aktivierung beider Reportergene. Diese Kolonien enthielten folgende Mais-cDNAs:

- Allenoxidsynthase (*ZmAOS*) [Accession: AY488135]
- unbekanntes Protein mit Cyclotid-Domäne
- homolog zu *Oryza sativa* "light stress induced gene" (2mal) [BAD52885]
- ADP-Ribosylierungsfaktor (3mal) [CAA56351]
- β -5-Tubulin [CAA52720]
- homolog zu *Oryza sativa* "putative pollen specific protein C13 precursor" [NP921099]
- homolog zu *Oryza sativa* "putative B12D protein" [XP477421]

Ein Screen mit *ZmNit2* und einer Maiskorn-cDNA-Bank erbrachte zwei Kandidaten:

- unbekanntes Protein mit Circulin B- oder Cycloviolacin-Domäne
- unbekanntes Protein

Für *ZmNit1* konnten trotz ausreichend hoher Transformationsraten und damit Absättigung der cDNA-Banken in keiner der beiden Banken Interaktionskandidaten gefischt werden.

3.3.12.3 Gerichteter Yeast-Two-Hybrid

Da die alternative Aktivität mit β -Cyanoalanin im Gemisch der Nitrilaseproteine eine Interaktion der beiden Proteine impliziert, wurde ein gerichteter Yeast-Two-Hybrid durchgeführt. Denn die Tatsache, dass beide Nitrilasen nur sehr schwach exprimiert sind, könnte eine Unterrepräsentation in den cDNA-Banken zur Folge haben und dazu geführt haben, dass in den ungerichteten Yeast-Two-Hybrid-Screens mit keiner der beiden Nitrilasen die jeweils andere aus cDNA-Banken gefischt werden konnte. Für den gerichteten Yeast-Two-Hybrid wurden *ZmNit2*-Primärtransformanden (*ZmNit2*-pBD) mit *ZmNit1*-pAD transformiert. Von etwa 100 Hefezellen auf Selektionsmedium wurden acht auf Blaufärbung im β -Galactosidase-Test getestet und das Vorhandensein beider Konstrukte in den Blau-positiven Klonen (#2, #3, #4, #5, #7, #8; Abb.3.21) durch Rücktransformation in *E.coli* mit Selektion auf Chloramphenicol (für *ZmNit2*-pBD) und Kanamycin (für *ZmNit1*-pAD) und Sequenzierung beider Konstrukte nachgewiesen. Die nicht gefärbten Kolonien # 1 und # 6 enthielten nur das Konstrukt *ZmNit2*-pBD.

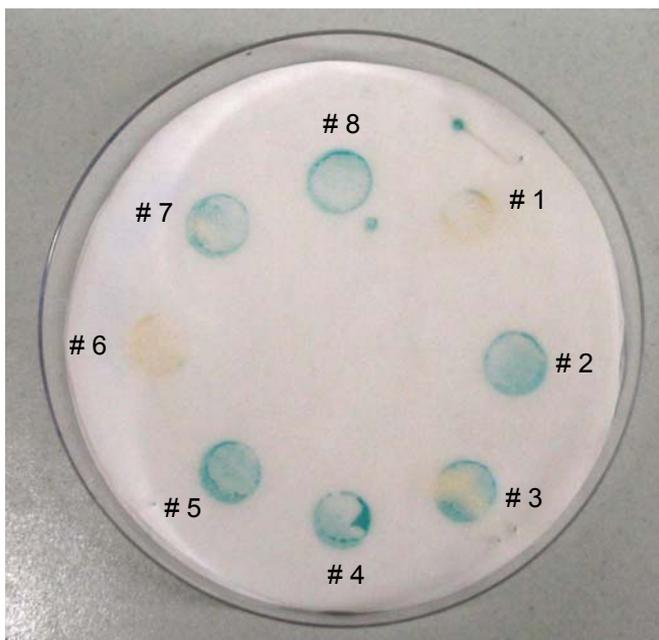


Abbildung 3.21:

β -Galactosidase-Färbung für 8 Kolonien aus dem gerichteten Yeast-Two-Hybrid-Screen (*ZmNit2* \leftrightarrow *ZmNit1*) nach 20 min Inkubation bei 30°C.

3.3.13 Isolierung von *Mu*-getaggtten Nitrilasemutanten

Mais als Modellsystem bietet neben dem Vorteil, dass Auxin in hoher Konzentration im Korn gespeichert vorliegt, auch die Nutzbarkeit revers genetischer Verfahren. Ob Nitrilasen wirklich signifikant zum IAA-Pool beitragen, sollte durch Analysen an knock-out-Mutanten geklärt werden. Für beide Nitrilasegene konnten bei Pioneer Hi-Bred *Mu*-Insertionsallele mit der Transposoninsertion im codierenden Bereich isoliert werden. Die genomische Struktur der Nitrilasegene ist größtenteils bekannt. Beide Gene besitzen wahrscheinlich fünf Exons. Es wurden Insertionsmutanten des Transposons *Mu* jeweils im vierten Exon beider Nitrilasen analysiert (Abb.3.22).

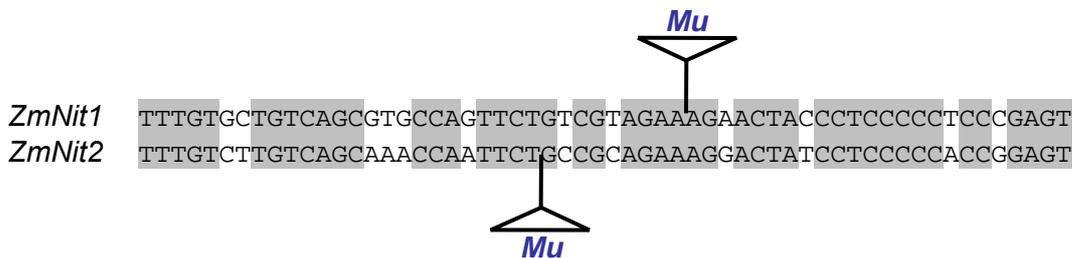


Abbildung 3.22: Alignment-Ausschnitt (VectorNTI) der genomischen Sequenz der Nitrilasen mit *Mu*-Insertion.

Transposons – bewegliche genetische Elemente („*mobile genetic elements*“) – sind eine häufige Ursache für spontane Mutationen. Endet der Sprung eines Transposons in einem offenen Leserahmen, führt das in der Regel zur völligen Zerstörung der Genfunktion („*gene disruption*“) (Seyffert, 1998).

Aufgrund der hohen Kopienzahl von *Mu* treten neben den Mutationen in den Nitrilasegenen weitere Mutationen auf, die zu unerwünschten Phänotypen wie z.B. Albinismus oder verminderter Fertilität führen können. Deshalb war es notwendig, den genetischen Hintergrund der *ZmNit1*- und *ZmNit2*-Transposon-Linien durch dreifache Rückkreuzung mit der Inzuchtlinie B73 zu stabilisieren – wie in der Abbildung 3.23 für *ZmNit2* dargestellt – bevor der Phänotyp der Nitrilasemutanten detaillierter untersucht werden konnte. Phänotypisierungen wurden allerdings dennoch auch in segregierenden Linien durchgeführt, da der *Mu*-Hintergrund im Vergleich mit Wildtyp-B73-Pflanzen das Wachstum und das Erscheinungsbild noch immer beeinflusste.

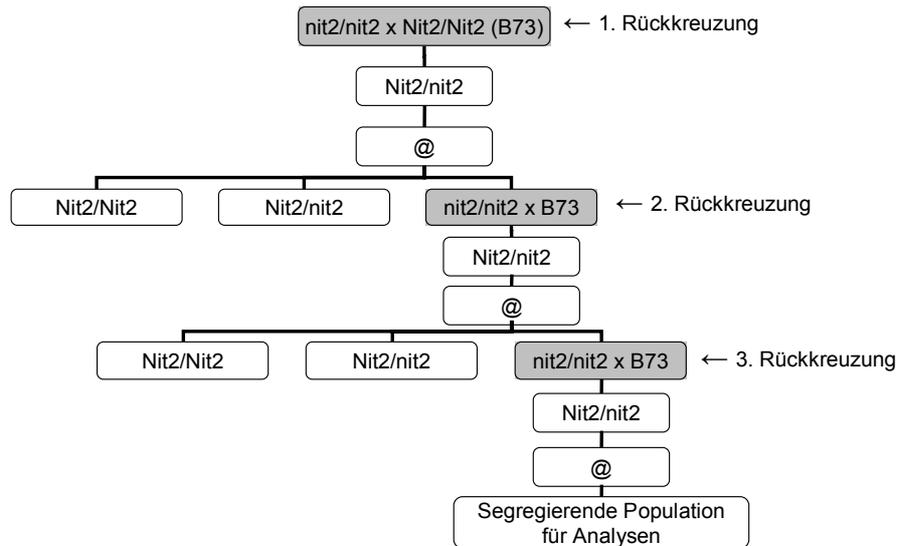


Abbildung 3.23: Kreuzungsschema der *ZmNit2*-Mutanten; @ = Selbstung.

In Linien segregierend für eine Mutation in *ZmNit1* oder in *ZmNit2* wurden homozygote und wildtypische Pflanzen zwischen zwei Wochen nach Keimung und adulten Pflanzen in Bezug auf Pflanzenhöhe, Stammdicke, Blattanzahl, Blattbreite, Internodienlänge, Rispenverzweigungen, Pollenmenge und Kolbenanzahl verglichen. Weder für *ZmNit1*- noch für *ZmNit2*-Mutanten wurde dabei ein deutlicher Unterschied zwischen Mutante und Wildtyp festgestellt.

Aufgrund der Nitrilaseexpression in den ersten fünf Tagen nach Keimung wurden Pflanzen in diesem Alter in Bezug auf einen Phänotyp hin untersucht. Als sich für im Dunkeln gezogene Keimlinge keine deutlichen Unterschiede zwischen Mutanten und Wildtypen ergab, wurden aufgrund der im Western Blot festgestellten starken Lichtinduktion der Nitrilasen im Licht gezogene Keimlinge experimentell auf verschiedene Faktoren getestet:

3.3.14 IAN-Sensitivität in Nitrilasemutanten

Da IAN die Primärwurzellänge beeinflusst und damit *in planta* typische Auxineffekte bewirkt, wurden die Wurzellängen von wildtypischen und *ZmNit1*- bzw. *ZmNit2*-mutanten Keimlingen verglichen, die in IAN-haltigem Wasser gezogen worden waren. Da sich in nicht-segregierenden Linien bei wildtypischen und *ZmNit2*-Mutanten Unterschiede in der Wurzelhemmung und damit der Sensitivität gegenüber IAN zeigten (Abb. 3.24), wurden daraufhin *ZmNit1*- bzw. *ZmNit2*-segregierende Linien ohne und mit 10 μM bzw. 100 μM IAN im Wasser vier Tage nach Keimung vermessen. Während IAN hierbei in *ZmNit2* wildtypischen Pflanzen in einer Konzentration von 10 μM im Durchschnitt eine Verkürzung

um 25%, bei 100 μM um 69% bewirkte, wiesen *Zmnit2*-Mutanten bei 10 μM überhaupt keinen Effekt und bei 100 μM lediglich eine Verkürzung um 40% auf (Abb.3.25). In einer für *ZmNit1* segregierenden Linie ergaben sich keine Unterschiede zwischen Wildtypen und Mutanten.

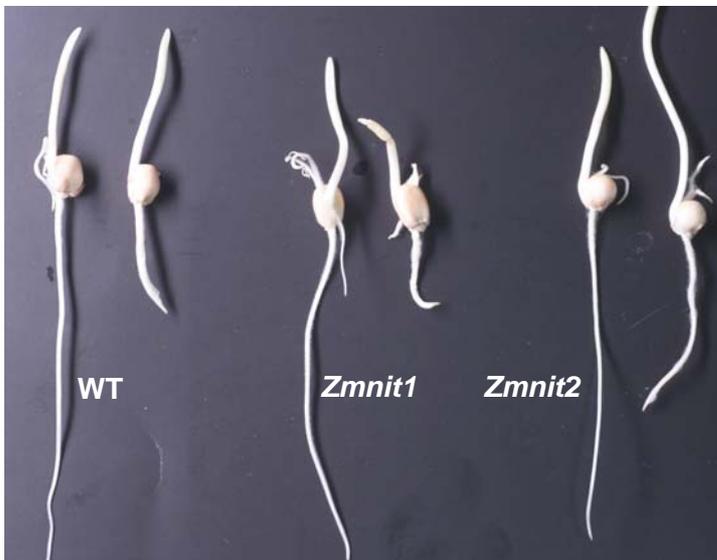


Abbildung 3.24:

Wildtypische, *Zmnit1*- und *Zmnit2*-mutante Maiskeimlinge 3 Tage n.K. ohne (jeweils linker Keimling) und mit (jeweils rechter Keimling) 100 μM IAN im Wachstumsmedium.

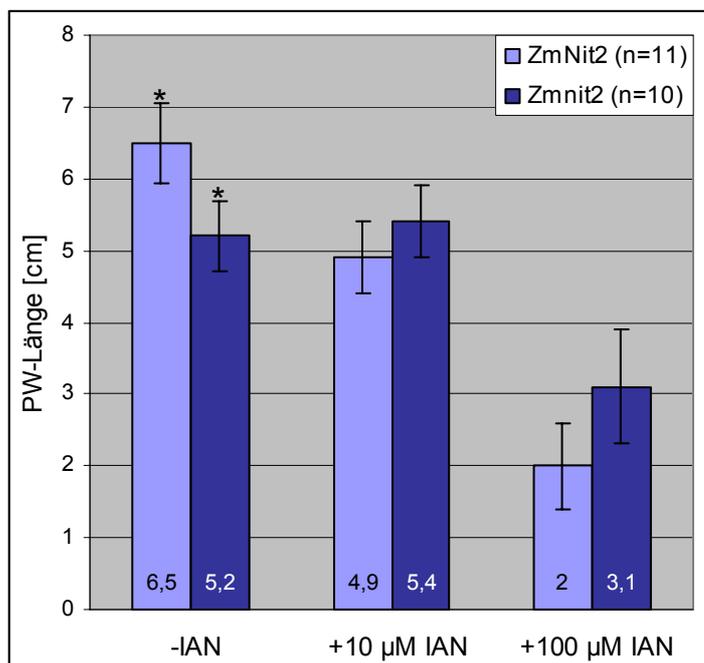


Abbildung 3.25:

Vergleich der Primärwurzellängen von WT (*ZmNit2*, n=11) und mutanten (*Zmnit2*, n=10) Keimlingen aus einer für *ZmNit2* segregierenden Linie, 4 Tage n.K. ohne IAN und nach Zugabe von 10 bzw. 100 μM IAN zum Wachstumsmedium. * = Unterschied laut *t*-Test (P < 0,05) signifikant.

Zmnit2-Mutanten erwiesen sich also besonders in niedrigen IAN-Konzentrationen als signifikant weniger sensitiv in Bezug auf IAN, was andeutet, dass *ZmNIT2* ein *in vivo* durchaus funktionelles Protein darstellt.

Des Weiteren fiel auf, dass *Zmnit2*-Mutanten unter Lichtbedingungen bereits in der Kontrolle ohne IAN eine Tendenz zu kürzeren Primärwurzeln im Vergleich zum Wildtyp aufzuzeigen scheinen. Weitere Messungen bestätigten dies:

3.3.15 Primärwurzelwachstum in *ZmNit2*-Mutanten

Im Vergleich von wildtypischen und mutanten Pflanzen aus einer für *ZmNit2* segregierenden Linie wiesen Mutanten nach zwei Tagen Wachstum im Durchschnitt lediglich 18%, nach 2,5 Tagen 27% und nach fünf Tagen bereits 73% der Länge von wildtypischen Primärwurzeln auf (Abb.3.26). Danach traten keine signifikanten Unterschiede mehr auf. Diese Wachstumsverzögerung in der jungen Primärwurzel bezieht sich lediglich auf *ZmNit2*-Mutanten und ließ sich für *ZmNit1*-Mutanten nicht zeigen.

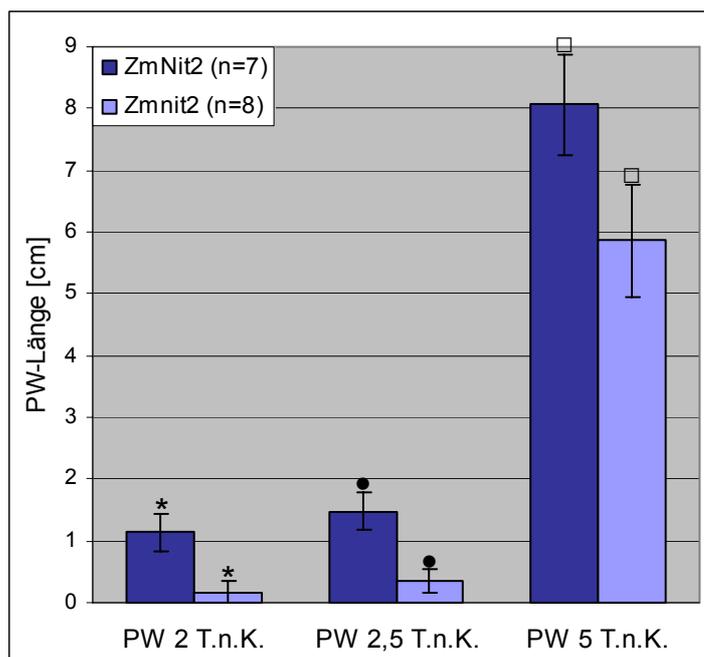


Abbildung 3.26:

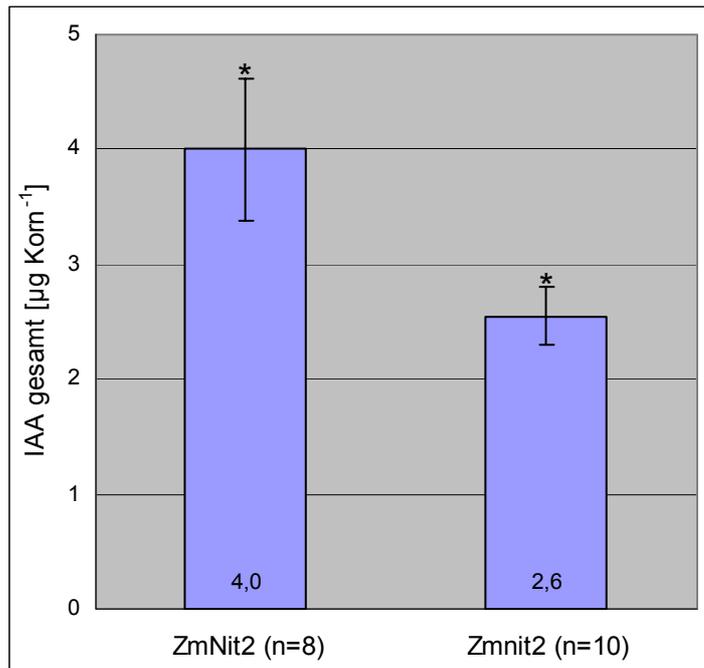
Vergleich von Primärwurzellängen von WT (*ZmNit2*, n=7) und mutanten (*ZmNit2*, n=8) Keimlingen aus einer für *ZmNit2* segregierenden Linie, 2, 2,5 und 5 Tage n.K.

*, •, □; Unterschiede zwischen WT und Mutante laut *t*-Test ($P < 0,05$) signifikant.

3.3.16 IAA-Quantifizierung in Primärwurzel und Korn

Daraufhin stellte sich die Frage, ob der morphologische Phänotyp sich auch auf Metabolitebene – also in IAA-Konzentrationen – manifestiert und Mutanten auch hier Unterschiede zum Wildtyp aufweisen. Hierzu wurden freies IAA und Gesamt-IAA nach alkalischer Hydrolyse der IAA-Konjugate via HPLC mit Fluoreszenzdetektion in Primärwurzeln (3 Tage n.K.) und Körnern quantifiziert. Körner wurden für diese Analyse bis zum Erreichen von 2 bis 3 mm Primärwurzel vorgekeimt, da es nicht gelungen war ohne größere Verluste gleichzeitig DNA und IAA aus dem Korngewebe zu extrahieren und daher das Wurzelgewebe als Material für DNA-Extraktion und Genotypisierung durch PCR diente.

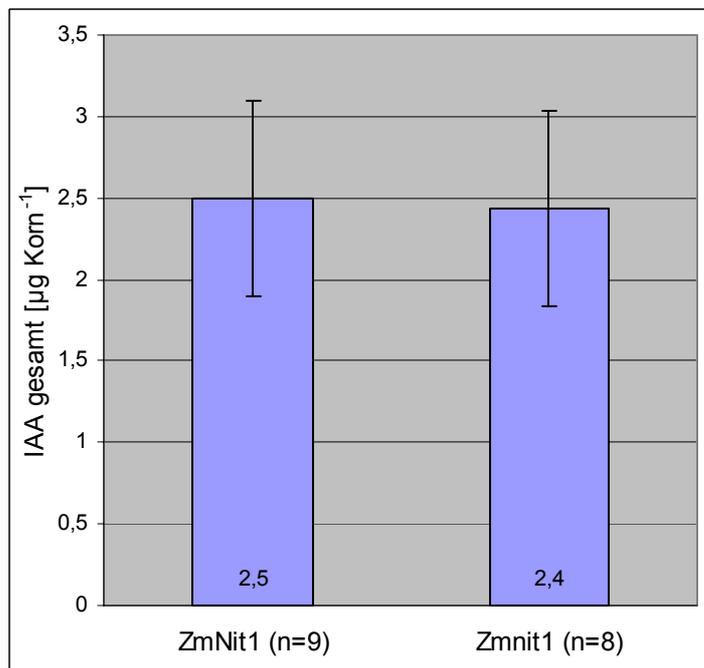
Die Messungen im Korn ergaben, dass *ZmNit2*-Mutanten im Durchschnitt etwa 35% weniger Gesamt-IAA aufwiesen als wildtypische Körner (Abb.3.27).

**Abbildung 3.27:**

Quantifizierung von Gesamt-IAA (freies und konjugiertes) aus Körnern von wildtypischen (*ZmNit2*) und *Zmnit2*-mutanten Pflanzen (*Zmnit2*) aus einer für *ZmNit2*-segregierenden *Mu*-Linie;

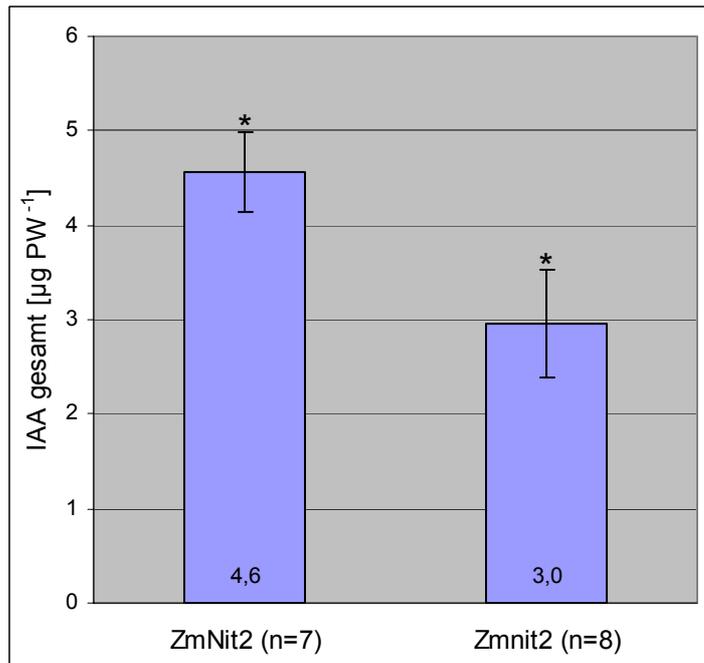
* = Unterschied zwischen WT und Mutante laut *t*-Test ($P < 0,05$) signifikant.

Für *Zmnit1*-Mutanten ergaben sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Gesamt-IAA-Gehaltes wie in Abb.3.28 beispielhaft für Messungen im Korn dargestellt:

**Abbildung 3.28:**

Quantifizierung von Gesamt-IAA (freies und konjugiertes) aus Körnern von wildtypischen (*ZmNit1*) und *Zmnit1*-mutanten Pflanzen (*Zmnit1*) aus einer für *ZmNit1*-segregierenden *Mu*-Linie.

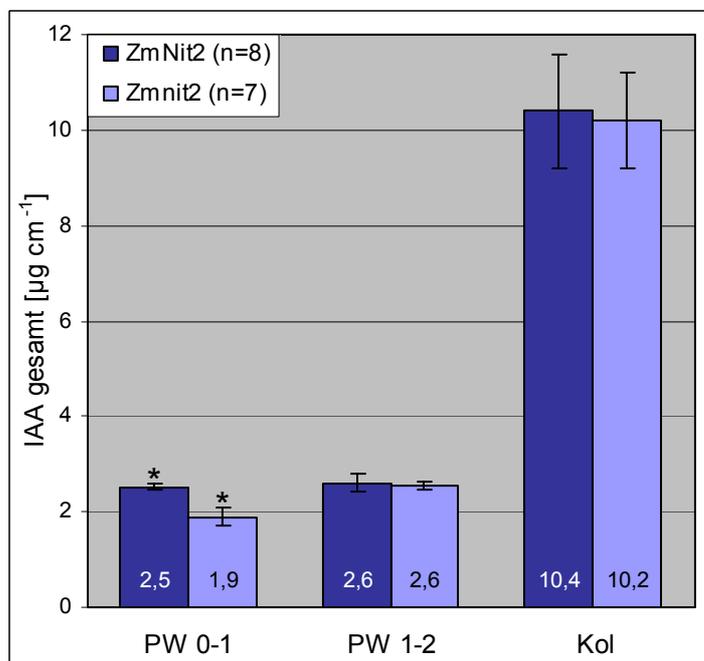
Bei *Zmnit2*-mutanten Pflanzen wies auch die junge Primärwurzel etwa 35% weniger Gesamt-IAA auf (Abb.3.29).

**Abbildung 3.29:**

Quantifizierung von Gesamt-IAA (freies und konjugiertes) aus Primärwurzeln (PW) von wildtypischen (*ZmNit2*) und *Zmnit2*-mutanten Pflanzen aus einer *Mu*-Linie segregierend für *ZmNit2* 3 Tage n.K.

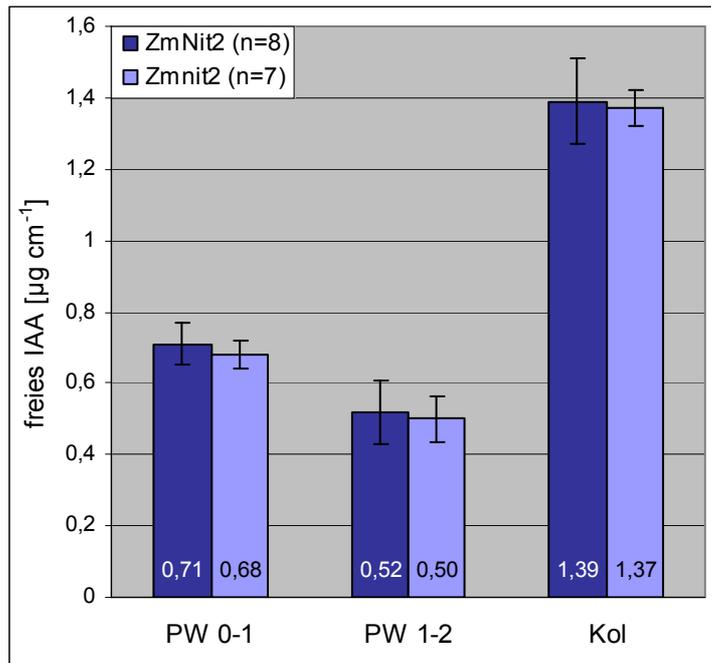
* = Unterschied zwischen WT und Mutante laut *t*-Test ($P < 0,05$) signifikant.

Bei weiterer Unterteilung der Keimlingsgewebe in die ersten (PW 0-1) und zweiten 10 mm (PW 1-2) der Primärwurzelspitze war lediglich im ersten Zentimeter ein Unterschied in der Gesamt-IAA-Menge von 24% nachzuweisen (Abb.3.30). Keine signifikante Differenz zeigte sich im basaleren Teil der Primärwurzel und in der Koleoptilenspitze.

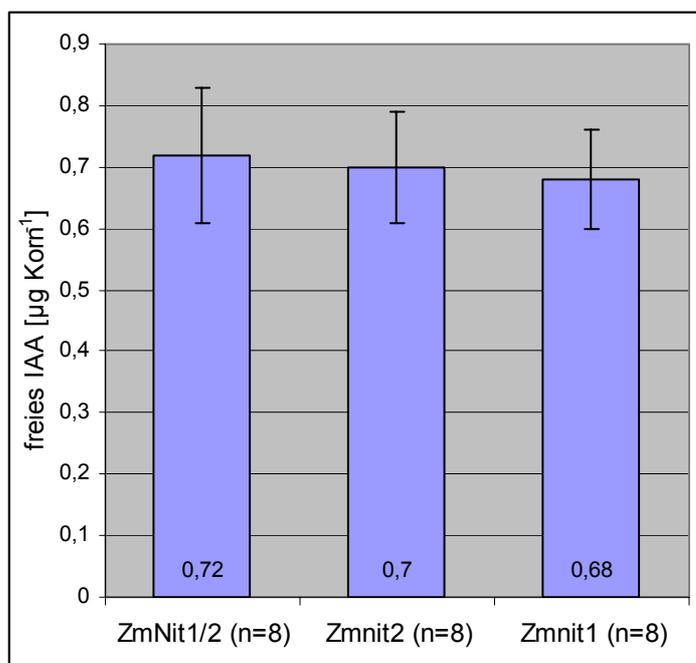
**Abbildung 3.30:**

Quantifizierung von Gesamt-IAA aus den ersten (PW 0-1) und zweiten 10 mm der Primärwurzelspitze (PW 1-2) und den ersten 10 mm der Koleoptilenspitze (Kol) von WT (*ZmNit2*) und *Zmnit2*-mutanten Pflanzen 3 Tage n.K. aus einer für *ZmNit2*-segregierenden *Mu*-Linie. * = Unterschied laut *t*-Test ($P < 0,05$) signifikant.

Auf Ebene des freien IAA ergaben sich weder in Primärwurzeln (Abb.3.31) noch im Korn (Abb.3.32) signifikante Unterschiede zwischen wildtypischen und mutanten Pflanzen.

**Abbildung 3.31:**

Quantifizierung von freiem IAA aus den ersten (PW 0-1) und den zweiten 10 mm der Primärwurzelspitze (PW 1-2) und den ersten 10 mm der Koleoptile (Kol) wildtypischer (*ZmNit2*) und *Zmnit2*-mutanter Pflanzen 3 Tage n.K. aus einer für *ZmNit2*-segregierenden *Mu*-Linie.

**Abbildung 3.32:**

Quantifizierung von freiem IAA aus wildtypischen (*ZmNit1/2*), *Zmnit2*- und *Zmnit1*-mutanten Körnern.

Im Gegensatz zu *Zmnit1*-Mutanten zeigen *Zmnit2*-Mutanten also neben einem Sensitivitätsverlust gegenüber IAN auch Auxin-typische phänotypische Effekte wie weniger Gesamt-IAA in Korn und jungen Primärwurzelspitzen einhergehend mit verkürztem oder langsamerem Primärwurzelwachstum in sehr jungen Keimlingen. Dies deutet daraufhin, dass *ZmNIT2* ein *in vivo* funktionelles Enzym darstellt und zumindest auch an der Auxinbiosynthese in Körnern und jungen Primärwurzeln beteiligt sein mag.

4. Diskussion

4.1 Tryptophansynthase

Fütterungsexperimente in Maiskörnern und Koleoptilen zeigen Einbau von Indol und Serin in Tryptophan und stärken die Hypothese, dass die Tryptophansynthase in Mais analog zu anderen höheren Pflanzen und Mikroorganismen verläuft (Gupta *et al.*, 1982). Nach bisherigen Erkenntnissen ist die Tryptophansynthase in Pflanzen, wie auch in Bakterien (Crawford und Yanofsky, 1958), aus zwei verschiedenen Untereinheiten aufgebaut: so kann teilgereinigte Tryptophansynthase-Aktivität aus Erbsen (Nagao und Moore, 1972) und Tabak (Delmer und Mills, 1968) in zwei Komponenten unterteilt werden, die den prokaryotischen α - und β -Aktivitäten entsprechen und beide für die volle Aktivität der Gesamtreaktion benötigt werden. Auch konnte die Komplexierung von α - und β -Untereinheiten in *Arabidopsis*-Blattextrakten durch Cochromatographie in einer Immunoaffinitätsreinigung gezeigt werden (Radwanski *et al.*, 1995). Die Tryptophansynthase katalysiert im Primärstoffwechsel einen zweistufigen Prozess in der *de novo* Biosynthese von L-Tryptophan:

α -Reaktion: Indol-3-Glycerinphosphat (IGP) \leftrightarrow Indol + Glycerinaldehyd-3-phosphat

β -Reaktion: Indol + L-Serin \rightarrow L-Tryptophan

Gesamtreaktion: IGP + L-Serin \rightarrow L-Tryptophan + Glycerinaldehyd-3-phosphat

4.1.1 α - und β -Aktivitäten in Maisextrakten

Neben der erwarteten α - und β -Aktivität in Komplexgröße ist nach Gelfiltration mit Maisextrakten ferner eine hohe β -Aktivität bei etwa 95 kDa – also in β_2 -Größe – (Abb.3.2) messbar, die in ihrem K_M^{Indol} -Wert (5 μM) dem Komplexparameter entspricht, aber bezogen auf die Gesamtproteinmenge beinahe den doppelten Indolumsatz aufweist (Tab.3.2). Wright *et al.* wiesen bereits 1992 nach, dass Maiskeimlingsextrakte in der Lage sind nach Zugabe von Indol Tryptophan herzustellen, wobei es unwahrscheinlich erschien, dass Indol erst zu IGP umgeformt wird, welches dann als Substrat verwendet werden kann. Daraus schloss man, dass die Tryptophansynthase unabhängig vom Channeling im Komplex, das in *E.coli* extrem effektiv funktioniert (Lane und Kirschner, 1991), auch freies Indol verwerten kann. Auf der Basis dieses Experiments konnten auch die in die beiden Einzelreaktionen aufgeteilten Aktivitätstests in Extrakten der Maislinie B73 (WT) und der *bx1*-Mutante durchgeführt werden; hier wurde ebenso Indol als Substrat angeboten und Umsatz auch in Gelfiltrationsfraktionen von Komplexgröße beobachtet.

Diese Reaktion von Indol und Serin zu Tryptophan könnte aber auch durch die nach der Gelfiltration nachgewiesene freie β_2 -Aktivität erklärt werden. Nishio *et al.* (2005) konnten zeigen, dass der *E.coli* $\alpha\beta\alpha$ -Komplex sich in einem schnellen Gleichgewicht mit freien, allerdings relativ unstabilen Untereinheiten befindet. Wie isolierte *E.coli* TrpB-Untereinheiten laut Dichtegradientenzentrifugation als Homodimere vorliegen (Creighton und Yanofsky, 1966), formt auch heterolog exprimierte ZmTSB1 in Gelfiltrationsexperimenten Komplexe in Dimergröße (Abb.3.4). Die Dimeraktivität könnte folglich auf solchen ungebundenen β -Untereinheiten basieren.

Auch besteht die Möglichkeit eines speziellen biologischen Hintergrunds dieser freien β_2 -Aktivität. Gut untersucht ist bereits die Funktion von freiem Indol, das von Mais als Lockstoff produziert wird. Nach Induktion des *Igl*-Genes durch Volicitin, das im Speichel des Maisfraßfeindes *Spodoptera exigua*, dem „beet armyworm“, enthalten ist, lockt das nachfolgend synthetisierte Indol zusammen mit einem Gemisch verschiedener Terpenoide Schlupfwespen (*Cortesia marginiventris*) an, die den Herbivoren durch Eiablage in seine Raupen schädigen (Frey *et al.*, 2000). Auch für *E.coli* wurde die Wirkung von Indol als extrazellulärem Signalstoff bereits gezeigt. In diesem Fall erlaubt der Metabolit den Bakterienzellen spezifische Zielgene in Reaktion auf veränderte Umweltbedingungen zu regulieren (Wang *et al.*, 2001). Indol als Signalstoff ist nicht auf *E.coli* begrenzt, im Myxobakterium *Stigmatella aurantiaca* induziert Indol z.B. die Sporenbildung (Gerth *et al.*, 1993). Die hohe vom Komplex unabhängige β_2 -Aktivität könnte also dazu dienen, den Signalstoff Indol zu metabolisieren und so das Signal aus den Zellen zu entfernen bzw. zu regulieren.

In diesem Rahmen soll kurz erwähnt werden, dass kürzlich im hyperthermophilen Bakterium *Thermotoga maritima* zusätzlich zu dem aus TrpA und TrpB1 – beide Gene dafür liegen im *trp*-Operon – bestehenden Komplex ein weiteres Gen mit TSB-Aktivität (*trpB2*) kloniert wurde, das als Homodimer vorliegt aber nicht mit TrpA komplexieren kann. Eine potentielle Funktion könnte im Abfangen des „teuren“ Metaboliten Indol liegen (Hettwer und Sterner, 2002). Es wird angenommen, dass bei den hohen Wachstumstemperaturen von Hyperthermophilen das hydrophobe Indol teilweise aus dem $\alpha\beta\alpha$ -Komplex entweicht, durch die Cytoplasmamembran diffundiert und der Zelle damit verloren geht. Im Cytoplasma vorhandenes TrpB2 könnte aus dem Kanal freigesetztes Indol binden und zu Tryptophan umsetzen (Hettwer und Sterner, 2002). Solche alternativen TSB-Gene wurden auch bereits für Mais und *Arabidopsis* identifiziert. Das in Mais bis dato TSBlke genannte Enzym weist 61% Aminosäureübereinstimmung zu TrpB2 aus *Thermotoga* auf und lediglich 19,8% bzw. 20,4% zu ZmTSB1 und ZmTSB2 und

könnte natürlich ebenso teilweise oder vollständig für die 95 kDa-Aktivität im Maisextrakt verantwortlich zeichnen.

Da die monomerische α -Aktivität zwar im Wildtyp B73 aber nicht in der *bx1*-Mutante aufzufinden ist (Abb.3.2 C), wäre sie daher wohl eher dem *ZmBX1*-Enzym als freien α -Untereinheiten zuzuschreiben. Die Substrataffinität von *ZmBX1* in B73-Keimlingen und als heterologes Protein beträgt 13 μ M (Frey *et al.*, 1997) und zeigt, dass *ZmBX1* effektiv mit dem Tryptophansynthase-Komplex um das Substrat IGP konkurrieren kann (Frey *et al.*, 2000).

4.1.2 Enzyme des Tryptophansynthase-Komplexes in *Zea mays*

4.1.2.1 Mögliche α -Untereinheiten

In Mais sind vier TSA-artige homologe Gene beschrieben, drei der Genprodukte (*ZmTSAlike2*, *ZmBX1* und *ZmIGL*) sind in der Lage IGP zu spalten. Zwei davon weisen eine spezifische Funktion in Abwehrmechanismen auf: *ZmBX1* synthetisiert Indol als Ausgangssubstanz zur Bildung von Phytoanticipinen (DIBOA und DIMBOA). *ZmIGL* wird für die Herstellung von freiem Indol – nach Induktion mit Volicitin, das im Speichel des Fraßschädlings *Ostrinia nubilalis*, dem Maiszünsler, enthalten ist – benötigt. Maismutanten in diesen Genen sind lebensfähig, zeigen also keine Defekte in der Tryptophanbiosynthese (Frey *et al.*, 1997; 2000). Dagegen werden *ZmTSAlike1* und insbesondere *ZmTSAlike2*, die im Gegensatz zu *ZmTSAlike1* für ein Transitpeptid codiert, im Rahmen der Tryptophansynthese diskutiert.

Die Proteinsequenzen aller klonierten Tryptophan-biosynthetischen Gene aus *Arabidopsis* weisen am Aminoende potentielle Transitpeptide für den Chloroplastenimport auf (Zhao und Last, 1995), wo auch 98% der Tryptophansynthase- β -Aktivität nachgewiesen werden konnten (Last *et al.*, 1991). Da Tryptophan sowohl im Cytosol als auch in Mitochondrien und Plastiden für die Proteinsynthese verwendet wird, setzt die Lokalisierung der Tryptophansynthese in Chloroplasten ein effizientes Transportsystem durch die Chloroplastenmembranen voraus. Dafür spricht, dass circa 90% des in isolierten Chloroplasten hergestellten Tryptophan, nach Abzentrifugation und damit Fraktionierung in Chloroplasten und Mediumüberstand, nicht in den Chloroplasten sondern frei im Medium detektiert wurde (Bickel *et al.*, 1978). Das fehlende Transitpeptid in der Sequenz der Mais-*TSAlike1* ließ ihre Funktion im Tryptophansynthase-Komplex bereits im Vorfeld fragwürdig erscheinen. Dazu passt auch, dass *ZmTSAlike1* weder Aktivität mit IGP aufweist noch mit *ZmTSB1* komplexiert, sondern als Monomer vorliegt (Abb.3.4 B). Erste

ZmTsalike1-Mutantenversuche erbrachten keinen augenscheinlichen Phänotyp. Dagegen weist die für ein Transitpeptid codierende *ZmTSAlike2* sowohl Komplexierung mit *ZmTSB1* als auch Aktivität mit IGP auf (Abb.3.4 C, Tab.3.3) und bietet sich damit eher als α -Untereinheit im Komplex an.

Wie bei *E.coli* (Miles, 1979) sind diese beiden Untereinheiten in der Lage unabhängig voneinander die von ihnen katalysierte Reaktion durchzuführen. In *E.coli* erhöht die Proteininteraktion im Tryptophansynthase-Komplex die Substratspezifität und die katalytische Effizienz der α -Untereinheit. Dies beruht auf einer Konformationsänderung am α L6-Loop, die das aktive Zentrum der TSA in einen geschlossenen hoch aktiven Zustand versetzt (Schneider *et al.*, 1998). Die *E.coli* α -Untereinheit alleine weist so einen K_M^{IGP} von nahe 500 μ M auf, im Komplex dagegen nur noch 30 μ M (Faktor 16,7); die katalytische Effizienz (k_{cat}/K_M^{IGP}) erhöht sich sogar um das 160fache von 0,003 auf 0,48 $mM^{-1} s^{-1}$ (Weischet und Kirschner, 1976; Kirschner *et al.*, 1991). Experimente mit der heterologen Mais-TSAlike2 ergaben ebenfalls eine K_M^{IGP} -Wert-Erniedrigung von 500 auf 50 μ M (Faktor 10) bei Zugabe von *ZmTSB1*-Enzym. Letzterer Wert findet sich auch bei Messungen mit B73-Extrakt in Komplexgröße; die heterologen Proteine arbeiten also so effizient wie die nativen Pflanzenproteine und es scheinen keine weiteren Faktoren benötigt. Die katalytische Effizienz erhöht sich bei dieser Komplexierung der heterologen Proteine um den Faktor 32 von 0,012 auf 0,38 $mM^{-1} s^{-1}$ (Tab.3.3).

Anderson *et al.* (1991) konnten zeigen, dass die Aktivität der bakteriellen Tryptophansynthase α durch die Reaktion von Serin und Pyridoxalphosphat am aktiven Zentrum der Tryptophansynthase β stark stimuliert wird. In Sedimentationsexperimenten erhöhte Vorinkubation mit Pyridoxalphosphat und Serin die Bindung der Untereinheiten signifikant (Creighton und Yanofsky, 1966). Auch waren für die Aufreinigung des $\alpha_2\beta_2$ -Komplexes aus *Proteus mirabilis* Puffersysteme mit Serin, NaCl und Pyridoxalphosphat von Nöten, ohne die das Aggregat schnell in seine instabilen Untereinheiten dissoziieren würde (Riverin und Drapeau, 1976). Die Zugabe von Serin und Pyridoxalphosphat zur Reaktion sollte also die Komplexbindung stabilisieren und die α -Aktivität noch stärker stimulieren. Die in einem solchen Reaktionsansatz durchgeführte Gesamtreaktion, weist mit 640 $nmol\ mg^{-1}\ min^{-1}$ eine maximale Umsatzrate ähnlich der der β -Teilreaktion ($V_{max} = 620\ nmol\ mg^{-1}\ min^{-1}$) auf. Die Gesamtreaktion verläuft also wesentlich schneller als die α -Reaktion bei Komplexierung von *ZmTSAlike2* und *ZmTSB1* ohne Cosubstrat und Cofaktor. Dies kann nun auf Stimulierung durch die Bindung von Serin und Pyridoxalphosphat oder eventuell auch auf die sofortige Weiterverarbeitung des entstehenden Indols zurückgeführt werden. So ist *ZmBX1* in der Lage die Rückreaktion von Indol zu IGP mit 730 $nmol\ mg^{-1}\ min^{-1}$ durchzuführen, die Hinreaktion erreicht dagegen nur eine Umsatzrate

von $540 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Bei *ZmTSAlike2* erfolgt die Rückreaktion mit einer ca. 240mal geringeren Umsatzgeschwindigkeit ($45 \text{ pmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$) als die Hinreaktion mit $11 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Dieser Unterschied in der Rückreaktion könnte zum Beispiel in unterschiedlichen K_M -Werten der beiden Enzyme für Indol oder auch GAP begründet sein. *ZmTSAlike2* hätte demzufolge einen relativ hohen Wert, würde also Indol nicht gut binden, was das Channeling zur β -Untereinheit bzw. die folgende Reaktion erleichtern würde. Dagegen würde im Falle von *ZmBX1* ein niedrigerer K_M für Indol zwar die Umsetzung von IGP beschleunigen aber auch die Rückreaktion erleichtern. Der K_M^{IGP} der Gesamtreaktion, der mit $50 \text{ }\mu\text{M}$ dem der α -Reaktion entspricht deutet an, dass auch hier wie in Bakterien (Lane und Kirschner, 1991) die IGP-Spaltung und nicht der Indol-Transfer oder die β -Reaktion den limitierenden Schritt darstellt.

Alle Versuchsansätze wurden ebenfalls mit Thrombin-geschnittenen Enzymen, also ohne N-terminalen His-Tag, durchgeführt. Da sich die Interaktionsflächen zur Bindung mit den α -Untereinheiten – zumindest bei bakteriellen Enzymen – eher aminoterminal befinden (bei *Thermotoga maritima* TrpB1 etwa von Aminosäure 97 bis 185 von insgesamt 389 Aminosäuren), hätte der His-Tag eventuell sterisch Bindungen und Interaktionen erschweren können. Da diese Enzymtests aber in analogen Parametern resultierten, deutet nichts auf eine Inhibierung durch His-Tags hin.

Zur endgültigen Klärung, ob eine essentielle Beteiligung der diskutierten Proteine am Tryptophansynthase-Komplex vorliegt, wird hier sicherlich die Analyse der verschiedenen knock-out-Mutanten einzeln und in Kombinationen aufschlussreich und bedeutungsvoll. In *Arabidopsis* akkumuliert beispielsweise die *trp3-1*-Einzelmutante aufgrund eines Defekts in der für ein Transitpeptid codierenden *AtTSA1* gegenüber *Arabidopsis*-Wildtyp-Pflanzen 250fach erhöhte Mengen an IGP, zeigt nur minimal Protein der Tryptophansynthase α (Zhao und Last, 1995) und ist so lichtabhängig konditional Tryptophan-auxotroph (Radwanski *et al.*, 1996).

4.1.2.2 Duplikation der TSA-Gene

Die Duplikation von DNA-Abschnitten ist ein wichtiger evolutiver Faktor beim Erwerb neuer Funktionen (Hancock, 2005). Nach einem solchen Ereignis kann eines der („paralogen“) Tochtergene funktionslos werden und zum Pseudogen degenerieren, da aufgrund fehlender Selektion Mutationen angehäuft werden. Beide Kopien können aber auch ihre Funktion behalten und so einen erhöhten Bedarf an Genprodukt decken oder eine der beiden Kopien kann eine bisher nicht vorhandene Funktion übernehmen. Eine solche Duplikation liegt wohl auch im Fall der beiden *TSAlike*-Gene, *ZmBx1* und *ZmIgl* vor.

Die vier Proteine weisen untereinander 59% bis 74% Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz auf, bei Analyse von Ähnlichkeit in Bezug auf austauschbare Aminosäuren sogar 73% bis 85% (Tab.4.1).

Tabelle 4.1: Übereinstimmung (links unten, schwarz) und Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz (rechts oben, grau). Angaben in %.

Protein	ZmTSAlike1	ZmTSAlike2	ZmBX1	ZmIGL
ZmTSAlike1	-	85,4	73,7	74,5
ZmTSAlike2	72,3	-	73,4	76,3
ZmBX1	60,0	59,6	-	80,4
ZmIGL	61,5	62,6	74,1	-

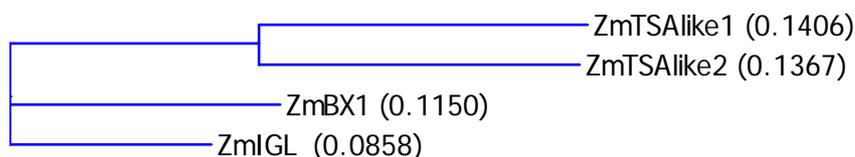


Abbildung 4.1: Phylogenetischer Baum der Mais-Indolglycerinphosphatlyasen (VectorNTI, Invitrogen) basierend auf den in Klammern angegebenen „Abständen“ aller verglichenen Sequenzpaare, die dem Divergenzgrad zwischen den Sequenzen entsprechen.

Ein Aminosäuresequenzvergleich der TSA-Konsensussequenzen zeigt des Weiteren bei ZmIGL und ZmBX1 Modifikationen in zwei Domänen auf, die basierend auf der Kristallstruktur des Tryptophansynthase-Komplexes aus *S.typhimurium* (Weyand und Schlichting, 1999) an der Interaktion zwischen den α - und β -Untereinheiten beteiligt sind (Frey *et al.*, 2000). ZmTSAlike1 und 2 dagegen weisen derartiges nicht auf. ZmBx1 und ZmIgl sind also wahrscheinlich durch Genduplikation aus einer TSA entstanden und wurden im Laufe der Evolution für eine Funktion im Sekundärmetabolismus modifiziert. Dafür spricht auch, dass beispielsweise ZmIgl und ZmTSAlike1 im Maisgenom nur 1,6 kb voneinander entfernt liegen. Beide Enzyme komplexieren nicht mit ZmTSB1 und katalysieren ihre Reaktion als Monomere. ZmBX1 arbeitet z.B. mit einem K_M^{IGP} -Wert von 13 μM und einer katalytischen Effizienz von 215 $\text{mM}^{-1} \text{s}^{-1}$ (Frey *et al.*, 2000) mehr als 560mal effizienter als die komplexierte ZmTSAlike2 mit 0,38 $\text{mM}^{-1} \text{s}^{-1}$. Diese Aktivitätssteigerung wurde auf die Stabilisierung der aktiven Konformation, die bei TSAs nur durch Komplexbildung erreicht wird, zurückgeführt (Kulik *et al.*, 2005).

4.1.2.3 Mögliche β -Untereinheiten

Als mögliche β -Untereinheiten der Tryptophansynthase in Mais wurden *ZmTSB1* und *ZmTSB2* benannt, die über die Mutante *orange pericarp* identifiziert wurden (Wright *et al.*, 1991). Diese Mutante weist Mutationen in den duplizierten ungelinkten Loci *orp1* und *orp2* auf, besitzt keine nachweisbare Tryptophansynthase- β -Aktivität und ist im Keimlingsalter – genauer gesagt nach Bildung von vier oder fünf Blättern (Wright *et al.*, 1991) – letal. Aufgrund der Feedback-Regulierung der Tryptophanbiosynthese akkumuliert sie große Mengen an den Tryptophanvorstufen Anthranilat und Indol, das aus dem Endosperm ins Perikarp diffundiert und dieses orange färbt (Wright *et al.*, 1992). Beide Mais-TSB-Gene codieren für ein Transitpeptid.

Wie für Pflanzen bereits 1972 von Nagao und Moore gezeigt, können β -Untereinheiten auch ohne Komplex mit einer α -Untereinheit als vollständig aktiv agieren. Heterolog exprimiert und bei Aktivitätstests im Pflanzenextrakt weist *ZmTSB1* im Homodimer und im Komplex identische K_M^{Indol} -Werte auf (heterolog: $K_M^{\text{Indol}} = 25 \mu\text{M}$; Extrakt: $5 \mu\text{M}$). Allerdings ist die maximale Umsatzrate und damit auch die katalytische Effizienz der β -Reaktion im heterologen System bei Komplexbildung um das 1,5fache erhöht. *In planta* könnte ferner durch Channeling in einem solchen Komplex, das in *E.coli* sehr effizient funktioniert (Lane und Kirschner, 1991), der „teure“ Metabolit Indol sofort ohne Diffusionsverluste zu Tryptophan weiterverarbeitet werden.

4.1.2.4 Duplikation der β -Untereinheiten

Getestet wurde bis dato nur das *ZmTSB1*-Enzym, da bereits die hochkonservierte Gensequenz (91% auf Aminosäureebene) der beiden Mais-TSB-Gene Genduplikation aufgrund von erhöhtem Bedarf an Genprodukt vermuten ließ (Wright *et al.*, 1991). Auch der letale Phänotyp der *orange pericarp*-Doppelmutante und das wildtypische Aussehen der Einzelmutanten, die auch in ihren α - und β -Aktivitätsverläufen im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen unverändert erscheinen, könnte auf eine eventuelle Redundanz der beiden Gene hindeuten. Ferner zeigen bis auf die Kolben-Seidenhaare alle untersuchten Gewebe ähnliche Transkript-Level für beide Gene (Wright *et al.*, 1991), was für duplizierte „house-keeping“-Enzyme bezeichnend wäre (Radwanski *et al.*, 1995). TSB-Redundanz wurde bereits für *Arabidopsis* beschrieben (Last *et al.*, 1991). Allerdings ist hier eines der beiden Gene (*Trp2-1*) 10mal höher exprimiert als das andere, zeigt im Gegensatz zu Mais bereits in der Einfachmutante einen Trp-Mangelphänotyp und ist bei Wachstum unter starkem Licht letal.

Überraschend war der Befund, dass solche doppelmutanten Maiskeimlinge trotz 75% weniger Tryptophan 50mal höhere IAA-Konzentrationen aufweisen. Dies warf auch die Diskussion um eine Tryptophan-unabhängige IAA-Biosynthese auf (Wright *et al.*, 1991). Die entsprechenden Enzymreaktionen und der Ursprung der Essigsäure-Seitengruppe konnten allerdings nicht identifiziert werden. Da die *Arabidopsis trp3-1*-Mutante, die einen Defekt in der α -Untereinheit der Tryptophansynthase (TSA) aufweist, darüber hinaus gegenüber *Arabidopsis*-Wildtyp-Pflanzen 250fach erhöhte Konzentrationen an IGP akkumuliert, welches aufgrund seiner Instabilität auch nicht-enzymatisch zu IAA umgesetzt wird, wurde die Aussage dieser Mutantenexperimente angezweifelt (Müller und Weiler, 2000a). Des Weiteren konnten nach Zugabe der allgemeinen Vorstufen [$^{13}\text{C}_6$]Glucose und [1,2- $^{13}\text{C}_2$]Acetat zu Körnerkulturen und Messungen zur metabolischen Herkunft von IAA via retrobiosynthetischer NMR-Analyse keine Hinweise auf eine Tryptophan-unabhängige Biosynthese gefunden werden (Glawischnig *et al.*, 2000).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass aufgrund von Aktivitätsmessungen und Proteininteraktion *ZmTSAlike2* und *ZmTSB1* – beziehungsweise aufgrund des *orp*-Mutantenphänotyps auch *ZmTSB2* – Kandidatengene für einen Tryptophansynthase-Komplex in Mais darstellen könnten.

4.2 IAA-Synthase

Der Hauptteil der IAA-Biosynthese findet bei Mais in reifenden Körnern statt, große Mengen an IAA-Estern werden dabei im Endosperm gelagert (Epstein *et al.*, 1980), was das Maissystem für biochemische Analysen zur Charakterisierung der beteiligten Reaktionen und Enzyme in dieser Richtung als besonders geeignet erscheinen lässt.

Trotz der Diskussion um Trp-unabhängige Synthesewege, die auf der Charakterisierung von Trp-auxotrophen Mutanten und Schwerisotop-Labeling-Experimenten in Mais (Wright *et al.*, 1991; Östin *et al.*, 1999) und *Arabidopsis* (Normanly *et al.*, 1993) basieren und die innerhalb der Pflanze auch in Kombinationen auftreten können (Michalczuk *et al.*, 1992), wurde durch Markierungsexperimente und enzymatische Analyse für das Maiskorn IAA-Synthese aus Tryptophan gezeigt (Glawischnig *et al.*, 2000).

Die Umsetzung von Tryptophan zu IAA in Korn-Proteinextrakten erfolgte mit einer Rate von $0,5 \text{ pmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ und konnte durch HPLC mit Fluoreszenzdetektion und GC-MS nachgewiesen werden. Für die Teilreinigung der Enzymaktivität wurde Protein aus Körnern der Zuckermaissorte „Landmark“ isoliert. Da die IAA-synthetische Aktivität auch nach Ammoniumsulfatfällung und Säulenchromatographie erhalten bleibt, erschien es möglich, dass es sich, wie für *Arabidopsis* vorgeschlagen (Müller und Weiler, 2000b), um einen hochmolekularen Enzymkomplex handeln könnte. Die Bildung von Multienzymkomplexen, in denen die katalytischen Aktivitäten der beteiligten Enzyme optimal koordiniert und Intermediate direkt zwischen den assoziierten aktiven Zentren transferiert werden können, stellt eine besonders effiziente Möglichkeit zur Koordination enzymatischer Reaktionen innerhalb eines Stoffwechselweges dar. Oft ist die Bildung von nicht-kovalenten Komplexen zwischen Enzymen von dauerhafter Natur (Jones und Thornton, 1996), während in anderen Fällen auch Interaktionen innerhalb eines Multienzymkomplexes transient erfolgen (Nooren und Thornton, 2003).

Durch fraktionierte Ammoniumsulfatfällung und Säulenchromatographie unter Zugabe von 1 mM NAD^+ wie auch NADP als Cofaktoren – im Gegensatz zum Komplex aus *Arabidopsis*, der außer Sauerstoff keiner Cofaktoren bedarf – ließ sich eine spezifische Aktivität von $32 \text{ pmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ und damit eine 64fache Anreicherung mit 0,3% Proteinausbeute im Vergleich zu Kornrohextrakten erreichen. Anders als im *Arabidopsis*-Komplex (Müller und Weiler, 2000b) ergab sich kein immunologischer Hinweis auf eine Nitrilasebeteiligung. Auch Mais Aldehydoxidase- und *Arabidopsis* Amidase-Antikörper zeigten keine Bande, freilich muss aber eine eventuell beteiligte Maisamidase mit den *Arabidopsis*-Antikörpern – trotz ca. 50% Übereinstimmung in den Aminosäuresequenzen – nicht unbedingt detektiert werden. Der schnelle Verlust der Enzymaktivität wirft die Frage auf, ob es sich bei der IAA-Synthase nicht um einen stabilen Komplex, sondern um

ein Proteinaggregat handelt. Auch könnte dies der Regulierung der IAA-Synthase-Aktivität und damit des IAA-Levels dienen. Neben Konjugation, Dekonjugation, Transport und Abbau könnte auch diese Eigenschaft eine Möglichkeit der Einflussnahme auf die lokale IAA-Konzentration darstellen. Aufgrund des Aktivitätsverlustes und, da bei der Tryptophanumsetzung auch keine möglichen Intermediate nachgewiesen werden konnten, war es nicht möglich an der IAA-Synthese beteiligte Enzyme auf diese Weise aufzureinigen.

4.3 Nitrilasen

Bei der Untersuchung Tryptophan-abhängiger Auxinbiosynthesewege lag das Hauptaugenmerk auf einer Nitrilase-Reaktion, die Indol-3-Acetonitril (IAN) zu Indol-3-Essigsäure (IAA) umsetzt.

4.3.1 Funktion der Nitrilasen in der Auxinbiosynthese

Mais exprimiert im Korn und jungen Keimlingen zwei Nitrilasen – *ZmNIT1* (351 Aminosäuren) und *ZmNIT2* (361 Aminosäuren). Nitrilaseprotein wurde in Western Blots bzw. *Tissue Prints* mit polyklonalen Antikörpern sowohl im Embryo als auch vor allem in der Aleuron/Perikarp-Fraktion nachgewiesen (Abb.3.11). Auch Nitrilaseaktivität in Maiskornextrakten wurde vermehrt in Embryo- und Aleuron/Perikarp-Proteinfraktionen festgestellt (Abb.3.18). Wie für die Nitrilase-Transkriptmenge so ist auch für die endogene Aktivität ein Anstieg im Embryo von 3 bis 5 Wochen nach Pollinierung zu beobachten.

Obwohl IAA im Endosperm akkumuliert (Epstein *et al.*, 1980), berechneten Jensen und Bandurski (1994) eine IAA-Biosyntheserate für ganze Maiskörner von $0,19 \mu\text{g IAA g}^{-1} \text{h}^{-1}$ und lediglich $0,0086 \mu\text{g IAA g}^{-1} \text{h}^{-1}$ für isoliertes Endosperm (20 bis 30 Tage nach Pollinierung). Der Großteil der IAA-Synthese erfolgt also nicht im Endosperm sondern in Embryo- oder Aleuron/Perikarp-Fraktionen, wo auch die höchste Nitrilaseexpression und -aktivität und IAN-Konzentration vorliegt. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass IAA zum Teil in Embryo und Aleuron gebildet wird und von dort ins Endosperm transportiert wird. Die Konstanz der relativ hohen endogenen Nitrilaseaktivität in Aleuron und Perikarp zwischen 2 und 5 Wochen nach der Pollinierung (Abb.3.18) weist darauf hin, dass Nitrilasen in Aleuron/Perikarp eine Rolle in der frühen Kornentwicklung spielen. Dafür spricht auch die um circa 35% verringerte Menge an Gesamt-IAA in *Zmnit2*-mutanten Körnern (Abb.3.27).

Der IAA-Gehalt wurde ferner in 3 Tage alten Keimlingen bestimmt. Dieses Alter wurde aufgrund der in Immunoblots bestimmten Nitrilaseexpression von 2 bis 7 Tagen nach Keimung gewählt (Abb.3.10). Die gemessenen IAA-Konzentrationen von Meristem-/Wachstumsgewebe (PW 0-1) und Differenzierungszone (PW 1-2) unterscheiden sich kaum (Abb.3.30), was erstaunlich erschienen mag. Generell lässt sich aufgrund verschiedener Gewebe und verschiedenen IAA-Funktionen in diesen die IAA-Verteilung nicht direkt mit der Lokalisation von Wachstum entlang der Wurzel korrelieren. Tatsächlich ist es so, dass IAA-Mengen bezogen auf das Trockengewicht über Meristem, Wachstums- und Differenzierungszone zur Basis hin bis zu 30% zunehmen, nicht aber gemessen pro Frischgewicht, was auf den verschiedenen Wassergehalt zurückzuführen ist (Saugy *et al.*,

1986). Dies kann auch erklären, dass sich bei den hier durchgeführten Messungen pro cm frische Wurzel kein IAA-Gradient zwischen Wurzelspitze und Differenzierungszone ergab.

Die ersten 10 mm der Primärwurzel von *Zmnit2*-Mutanten wiesen signifikant weniger Gesamt-IAA auf (Abb.3.30), während sich für die darüber liegenden 10 mm keine Unterschiede im IAA-Gehalt ergaben; dies steht auch im Einklang mit der Beobachtung, dass Nitrilaseprotein in Immunoblots nur im Wurzelspitzenbereich – der in etwa Meristem und Wachstumszone entspricht – zu detektieren war (Abb.3.9). Obwohl Nitrilasen in diesem Altersstadium auch in den Koleoptilen exprimiert sind, zeigte sich dort kein Unterschied im Gesamt-IAA-Gehalt zwischen WT und *Zmnit2*-Mutanten und auch exogen zugegebenes IAN rief keinerlei Auxineffekt hervor.

Allerdings wurde auch in Frage gestellt, ob die *de novo*-Biosynthese in Keimlingen wirklich von Relevanz ist oder ob IAA vielmehr aus dem Korn importiert wird, da in Fütterungsexperimenten in frühen Keimungsstadien auf in Konjugatform gespeichertes IAA zurückgegriffen wird, obwohl die Enzyme für die IAA-Synthese vorhanden wären (Jensen und Bandurski, 1996). Falls sich die *de novo*-Synthese auf die Wurzelspitze konzentriert, könnte sie bei Fütterungsexperimenten an der ganzen Pflanze aufgrund des hohen Imports von IAA aus dem Korn quantitativ kaum in Erscheinung treten. Auch wird in dieser Veröffentlichung von Jensen und Bandurski (1996) zwar in den Ergebnissen vom Keimling („*seedling*“) gesprochen, im Methodikteil wird dagegen aber nur der Spross („*shoot*“) aufgeführt. In diesem Fall wären die Wurzel und ihre Syntheseleistung überhaupt nicht vermessen worden. Für *Arabidopsis* wurde kürzlich gezeigt, dass die Wurzel vor allem im apikalen Bereich in der Lage ist *de novo* IAA zu synthetisieren, wenn auch für die Gradientenbildung in der Wurzel IAA-Transport aus dem Spross von Nöten ist (Ljung *et al.*, 2005). Allerdings könnte auch der bereits im Maiskorn verringerte Gesamt-IAA-Gehalt (Abb.3.27) für Effekte im Keimling verantwortlich zeichnen.

4.3.2 IAN als Substrat

In *Arabidopsis* wird IAN als direktes Produkt aus Indol-3-Acetaldoxim (IAOx) in der Auxinsynthese in Frage gestellt, da die Überproduktion von Auxin in der *Arabidopsis cyp83b1*-Mutante im Hintergrund einer *Atnit1*-Mutation nicht unterdrückt wird (Bak *et al.*, 2001) und da IAN bei Zufuhr von isotopenmarkiertem Tryptophan in *Arabidopsis*-Wurzel und –spross eine geringere Isotopenanreicherung aufweist als IAA (Normanly *et al.*, 1993; Müller *et al.*, 1998).

Das Nitrilasesubstrat IAN wurde als endogener Bestandteil von Maiskorn und -keimling nachgewiesen (Tab.3.5) und zeigt bereits im micromolaren Bereich Auxineffekte auf die

Primärwurzel und somit auch physiologische Relevanz (Abb.3.12). IAA selbst wirkt ab Konzentrationen unter 0,1 μM (Kobayashi *et al.*, 1993), also in einer Größenordnung weniger als das potentielle Vorläufermolekül IAN.

In *Zmnit2*-Mutanten zeigte sich gegenüber exogen zugegebenem IAN ein Sensitivitätsverlust in niedrigerer (10 μM) bzw. Sensitivitätsreduzierung in höherer Konzentration (100 μM) (Abb.3.25). Dieser Effekt konnte nur in der Primärwurzel beobachtet werden, da exogen zugegebenes IAN – sei es via Wachstumsmedium oder Lanolinpaste – in der Koleoptile von Wildtyp-Keimlingen keine Auxinwirkung zur Folge hatte, obwohl auch hier Nitrilaseprotein und IAN nachgewiesen werden konnten. Es stellt sich die Frage, ob im Gegensatz zu IAA die IAN-Aufnahme bzw. der Transport dorthin in diesen Versuchssystemen nicht funktioniert. Allerdings treten auch die WT-Wurzeffekte nur auf, wenn IAN dem Wachstumsmedium von Beginn an zugegeben wird, was auf eine Bedeutung der Nitrilasen während der frühen Keimungsphase und nicht unbedingt für die Koleptilenentwicklung hinweist. Dafür spricht auch die stärkere Wachstumsinhibierung der *Zmnit2*-Mutante in den ersten Keimungstagen (82% am 2. Tag n.K.), die im Laufe der Entwicklung nachlässt (27% am 5.Tag n.K.) und danach einschließlich der adulten Pflanze nicht mehr aufzufinden ist.

Die beständige Konzentrationsabnahme bis zu Tag 7 n.K. von Nitrilaseprotein in der Wurzel legt des Weiteren eine primäre Bedeutung der Nitrilasen während der Kornentwicklung und frühen Keimungsphase nahe, was auch erklären würde, warum Auxineffekte – sprich verkürzte Primärwurzeln – nur zu beobachten waren, wenn IAN dem Wachstumsmedium von Anfang an zugesetzt wurde, während erst nach ein paar Tagen zugegebenes IAN keine derartige Wirkung mehr erzielte.

Höhere IAN-Konzentrationen in Embryo- und Aleuron/Perikarp-Gewebe und der 3fache Anstieg der IAN-Konzentration im Embryo von der 4. zur 5. Woche n.P. (Tab.3.5) entsprechen dem Expressionsmuster der Nitrilase aus Immunoblot-Experimenten (Abb.3.11), den Aktivitätsmessungen (Abb.3.18) und IAA-Biosyntheseraten (Jensen und Bandurski, 1994). Ferner konnte in Western Blot-Analysen nach Zugabe des Substrats IAN zum Wachstumsmedium eine Induktion der Nitrilaseexpression um etwa 70% beobachtet werden (Abb.3.19). Da Mais keine Glucosinolate bildet und IAN bei Mais somit nicht wie bei *Arabidopsis* als Abbauprodukt von Indolglucosinolaten auftritt, unterstreicht dies die mögliche Rolle von IAN als IAA-Vorstufe.

Wie IAN gebildet wird ist nicht bekannt, zumal in Mais bisher kein CYP79B-Homologes zur Oxidation von Tryptophan zu Indol-3-Acetaldoxim (IAOx; Mikkelsen *et al.*, 2000) gefunden wurde. *In vitro* Plasmamembranfraktionen aus Mais-Hypocotylen setzen

Tryptophan zu IAOx um (Ludwig-Müller und Hilgenberg, 1988) und in Mesocotyl-Präparationen wurden IAN und IAAld aus IAOx gebildet (Helminger *et al.*, 1985).

4.3.3 Regulation der Nitrilaseaktivität?

Licht

Da die beschriebenen Auxinphänotypen lediglich bei Maiskeimlingen auftraten, die unter Licht gezogen wurden und in Immunoblots mit solchen Pflanzen auch eine um beinahe 100% verstärkte Nitrilaseexpression nachgewiesen werden konnte (Abb.3.19), stellte sich die Frage nach möglichen weiteren Regulationsfaktoren und Bindungspartnern für die Nitrilasen – auch im Hinblick auf einen putativen IAA-Synthase-Komplex. In Yeast-Two-Hybrid-Screens gegen Körner- und Keimling-cDNA-Banken konnten verschiedene mögliche *ZmNIT2*-Interaktionspartner „gefischt“ und sequenziert werden, die allerdings noch beispielsweise durch Immunopräzipitation oder *in vitro* Proteininteraktion bestätigt werden müssten, da in solchen Screens auch Falschpositive auftreten.

Unter den möglichen Interaktionspartnern fand sich in beiden Yeast-Two-Hybrid-Screens gegen eine Keimling-cDNA-Bank auch ein Homologes zu *Oryza sativa* „*light stress induced gene*“. Die Expression dieser mit Antenna-Proteinen des Photosystems verwandten Proteine ist lichtinduzierbar und -intensitätsabhängig (Andersson *et al.*, 2003). Unter einer Vielzahl von Beispielen für die Interaktion von Licht und Auxin deutet auch das Auxin- und lichtinduzierbare Cytochrom P450 CYP87A3 aus Reis einen Cross-Talk zwischen Lichtsignalwegen und Auxin-induziertem Längenwachstum an (Chaban *et al.*, 2003).

Pathogenabwehr

In diesen Yeast-Two-Hybrid-Screens ließen sich auch einige mit Abwehr in Verbindung zu bringende Kandidaten nachweisen, wie Proteine mit Cyclotid-, Circulin B- oder Cycloviolacin- Domänen oder auch die *Zea mays* Allenoxidsynthase (AOS, CYP74A), ein Enzym der Jasmonatbiosynthese.

Pflanzen-Cyclotide sind Peptide von etwa 30 Aminosäuren, die unter anderem aufgrund ihrer starken Expression (1 g kg⁻¹ Blattmaterial) und ihrer Defensin-ähnlichen Struktur als Abwehrmoleküle diskutiert werden. Cycloviolacine aus *Viola odorata* weisen z.B. hämolytische Wirkung auf und bewirken die Lyse von Erythrocyten und Kalata B1 aus *Oldenlandina affinis* zeigt antibakterielle Aktivität (Craik *et al.*, 1999). Diverse Fälle von Cross-Talk zwischen Auxinbiosynthese bzw. auch Nitrilaseexpression und Abwehrmechanismen bzw. Jasmonatbiosynthese sind bereits beschrieben. So konnten Ueda *et*

al. (1994) zeigen, dass Auxin-induziertes Koleoptilenwachstum, genauer gesagt die Zellwandsynthese, durch exogen zugegebenes Jasmonat inhibiert werden kann. Des Weiteren wird Jasmonat als Regulator der Auxinantwort im Gravitropismus diskutiert (Gutjahr *et al.*, 2005).

Ferner gibt es Hinweise, dass IAA wahrscheinlich über Induktion der Ethylenbiosynthese, genauer, gesagt über die Enzyme ACC-Synthase und ACC-Oxidase (Raghavan *et al.*, 2006), in die pathogeninduzierte Expression von Abwehrgenen involviert ist (Hughes und Dickerson, 1991). In Tabak bindet ein Nitrilase-like-Protein ein „*Ethylene-responsive element-binding*“-Protein (EREBP). Erst ein Pathogensignal erlaubt die Dissoziation der beiden Proteine und damit den EREBP-Transport in den Nukleus, wo es die Transkription von Abwehrgenen induziert (Xu *et al.*, 1998). Die Nitrilaseexpression in Maiskeimlingen wird durch Methyljasmonat und Verwundung stark gehemmt (Abb.3.19), wobei anzumerken ist, dass die Antwort auf Verwundung und Pathogene in einigen Komponenten ihrer Signalkette übereinstimmt (Maleck und Dietrich, 1999). Im Gegensatz zu Maisdaten wird von *Brassica rapa* (Grsic *et al.*, 1999) und *Arabidopsis* (Bennett *et al.*, 2005) Nitrilaseinduktion durch Jasmonat berichtet. Methyljasmonat induziert die Transkription von *AtNit3*, die unter schwefelarmen Bedingungen aus Glucosinolatabbau entstehendes IAN zu IAA umsetzen könnte und für vermehrte Seitenwurzelentwicklung sorgt (Kutz *et al.*, 2002). Microarray-Analysen mit *Arabidopsis*-mRNA deuten an, dass die IAA-Aminosäure-Hydrolasen ILR1, ILR5 und ILR6 durch eine 24 stündige Behandlung mit 30 μ M Methyljasmonat induziert werden (Inzé *et al.*, 2004). Verschiedene andere Auxin-induzierbare Transkripte werden durch Methyljasmonat allerdings supprimiert (Zimmermann *et al.*, 2004).

Ebenso könnte die im Yeast-Two-Hybrid gefischte *ZmAOS* ein Zusammenspiel von Nitrilasen und Jasmonatbiosynthese andeuten. Allerdings liegt *ZmAOS* plastidär vor, während für die Nitrilasen kein eindeutiges Transitpeptid identifiziert werden konnte. *ZmAOS*-Transkriptlevel können neben Verwundung auch durch Licht erhöht werden (He *et al.*, 2005) und die Reismutante *hebiba* (Riemann *et al.*, 2003) weist neben fehlender Photoinhibition auch keine Jasmonatbiosynthese auf, was die Hypothese einer Lichtinduktion der Jasmonatsynthese stützt.

Verwundung

Etwa 8% der *Arabidopsis*-Gene verändern sich nach Verwundung in ihren *steady-state* mRNA-Mengen (Cheong *et al.*, 2002). Wie auch die Maisnitrilasen (Abb.3.19) werden viele Gene, die positiv auf Auxinsignalwege reagieren, im Gegensatz zu Genen der Ethylen-, Jasmonat- und Abscisinsäurebiosynthese durch Verwundung negativ reguliert. Dies impliziert eine neue Ebene von Interaktion zwischen Verwundung und Auxinantwort.

Diese Regulation kann über mindestens zwei Wege geschehen: zum einen durch eine verminderte Herstellung von endogenem IAA, zum anderen durch einen negativen Cross-Talk der Signalwege. Durch Verwundung wird die Expression von *AtNit1* reprimiert, zwei Gene für IAA-Glycosyltransferasen, die IAA-Zucker-Konjugate bilden können, hingegen stark induziert, was eventuell einen Mechanismus für wundinduzierte IAA-Konjugation und damit eine Verringerung des freien aktiven IAA andeutet (Cheong *et al.*, 2002). Sztein *et al.* (2002) konnten allerdings in Bohnensamen eine dominierende Trp-abhängige IAA-Synthese im Gewebe um eine Verwundung nachweisen. Auch wurde nach mechanischer Verwundung Aggregation von AtNIT1-Protein beobachtet und mit einer frühen Phase von wundinduziertem Zelltod in Verbindung gebracht (Cutler und Somerville, 2005). Des Weiteren konnten in Kreuzungen zwischen *ZmNIT2*-Überexpressions- und DR5:Gus-Pflanzen in verwundetem Gewebe erhöhte Auxinkonzentrationen beobachtet werden (Lange, 2005), wurden aber auf die aufgrund der Verletzung zersetzten Indolglucosinolate und daraus resultierender IAN-Bildung zurückgeführt.

Interaktionen, übereinstimmende Komponenten und gegenseitige Regulation zwischen verschiedensten Hormonsynthesewegen und Signalkaskaden lassen die Komplexität von Homöostase und Adaption wohl nur in Ansätzen erkennen, erweitern aber das Interesse von der isolierten Aufklärung einzelner Biosynthesen auf Untersuchung der mannigfaltigen regulatorischen Verknüpfungen. Das Zusammenspiel zwischen Auxin und Cytokinin bzw. die Hemmung der Cytokininsynthese durch Auxin wird ja bereits bei *in vitro*-Kulturen zur Regulation von Wurzel- und Sprosswachstum angewendet (Skoog und Miller, 1957).

4.3.4 Nitrilasen und ihre enzymatische Aktivität

Heterolog exprimierte *ZmNIT1* und *ZmNIT2* wurde gereinigt und die kinetischen Parameter mit verschiedenen Substraten, u.a. IAN, bestimmt. Generell ist zu vermerken, dass heterolog exprimierte Nitrilasen schnell an Aktivität verlieren. Instabilität und rasche Proteolyse in Lösung wurde auch schon bei bakteriellen Nitrilasen und teilgereinigter Nitrilase aus *Brassica campestris* var. *campestris* beschrieben und wird als Enzymeigenschaft zur Kontrolle von IAA-Konzentrationen durch Verhinderung von Nitrilase-Restaktivitäten diskutiert (Kobayashi *et al.*, 1993).

Im Falle von *ZmNIT2* beträgt die IAN-Umsatzrate V_{\max} 200 nmol mg⁻¹ min⁻¹ mit einem apparenten K_M^{IAN} -Wert von 0,9 mM. Damit ist die Aktivität von *ZmNIT2* gegenüber IAN um eine Größenordnung höher als von allen bisher untersuchten pflanzlichen Nitrilasen, einschließlich der vier Nitrilasen aus *Arabidopsis*, im Vergleich zu denen der Wert von

$k_{\text{cat}}/K_M^{\text{IAN}}$ und damit die katalytische Effizienz des Enzyms 64 (gegenüber AtNIT1) bis 460 mal (AtNIT3) erhöht ist. Bei einem Vergleich unterschiedlicher Substratkandidaten zeigte sich, dass die Umsatzrate von IAN bei *Arabidopsis* überhaupt nur 1,4% bis 2,7% der Rate des bevorzugten Substrats 3-Phenylpropionitril entspricht (Vorwerk *et al.*, 2001). Ebenso in Bezug auf die apparente Michaelis-Menten-Konstante (K_M) und die maximale Umsetzungsgeschwindigkeit (V_{max}) erwies sich IAN als eines der schwächsten Substrate. Obschon also den *Arabidopsis*-Nitrilasen AtNIT1, AtNIT2 und AtNIT3 eine Rolle in der IAA-Biosynthese zugeschrieben wurde, könnten diese auch hauptsächlich am Glucosinolatmetabolismus beteiligt sein (Glawischnig *et al.*, 2003).

Auch für die Maisnitrilasen wurden 18 verschiedene Nitrilverbindungen als Substrate getestet. Dabei wurde bei ZmNIT2 lediglich für 4-Phenylbutyronitril eine deutlich höhere Umsatzrate festgestellt als für IAN, wobei allerdings für dieses Substrat gleichzeitig ein hoher K_M -Wert von 13,1 mM bestimmt wurde und so der k_{cat}/K_M -Wert von $0,099 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ lediglich 70% der katalytischen Effizienz des Enzyms für IAN ($k_{\text{cat}}/K_M^{\text{IAN}} = 0,14$) beträgt (Tab.3.6). Der effiziente Umsatz von IAN durch ZmNIT2 sowie dessen Expression im Maiskorn lassen eine Beteiligung an der Auxinbiosynthese möglich erscheinen.

Soll ZmNIT2 allerdings eine tragende Rolle in der IAA-Maschinerie spielen, müssen Proteinmodifikation und/oder effektives Substrat-Channeling in Betracht gezogen werden. Diese Hypothese wird auch durch den niedrigen K_M^{IAN} teilgereinigter Nitrilase aus Gerstenblättern gestützt (51 μM ; Thimann und Mahadevan, 1964). Laut Jensen und Bandurski (1994) wird IAA im ganzen Maiskorn mit $0,19 \mu\text{g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ und $0,0086 \mu\text{g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ in isoliertem Endosperm (20 bis 30 Tage n.P.) produziert. Unter IAN-Sättigung wurde vier Wochen nach Pollinierung eine endogene Nitrilaseaktivität von $1 \text{ pmol mg}^{-1} \text{ Protein min}^{-1}$ bestimmt. In der Annahme eines IAN-Channelings könnte eine solche Aktivität im ganzen Korn bis zu $0,2 \mu\text{g IAA g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ergeben. Aus diesem Grunde könnten Nitrilasen durchaus einen essentiellen Beitrag zum Gesamt-IAA-Pool leisten. Allerdings ergaben sich auch für endogene Nitrilaseaktivitäten in Maiskörnern (5 Wochen n.P.) und Keimlingen (3 Tage n.K.) apparente K_M^{IAN} -Werte im millimolaren Bereich (Korn: 0,9 mM; Keimling: 1,5 mM). Es stellt sich die Frage, ob dies beispielsweise auf Verluste von Komponenten beim Aufschluss oder ein nicht optimales Milieu zurückgeführt werden kann. Außerdem bleibt zu beachten, dass Nitrilaseexpression und -aktivität in Korn und Keimling vor allem in Embryo und Aleuron/Perikarp bzw. Primärwurzel- und Koleoptilenspitze lokalisiert sind und somit gewebespezifische Aktivitäten ohne weitere Fraktionierung durch den größeren Volumenanteil Endosperm bzw. Keimling verwässert werden können.

4.3.5 Nitrilase-Heteromere mit dualer Enzymaktivität

Besonders interessant ist die neuartige duale Enzymaktivität im Heteromer der beiden homologen Nitrilasen. Wie bereits diskutiert ist *ZmNIT2* alleine in der Lage ein breiteres Spektrum von Nitrilen und vor allem IAN umzusetzen. Im Proteingemisch mit *ZmNIT1* wird auch β -Cyanoalanin als Substrat akzeptiert. β -Cyano-L-Alanin ist ein in höheren Pflanzen weit verbreitetes Nitril, das enzymatisch durch die Cyanoalanin-Synthase aus Cyanid und Cystein hergestellt wird. Cyanid ist ein Nebenprodukt der Synthese von Ethylen – einem Phytohormon, das u.a. Samenkeimung, das Austreiben von Knospen, Blütenbildung, Fruchtreife, Wurzelbildung und Wachstumsvorgänge beeinflusst – und wird durch Umbau zu β -Cyanoalanin und schließlich Asparagin entgiftet (Blumenthal *et al.*, 1968).

Die Maisnitrilasen weisen in ihrer Aminosäuresequenz über 69% Übereinstimmung mit *AtNIT4* auf, während diese zu den anderen drei *Arabidopsis*-Nitrilasen lediglich etwa 60% beträgt (Tab.3.4). Dies scheint im Gegensatz zu den mit *AtNIT4* und *ZmNIT1* und 2 verbundenen Substratspezifitäten zu stehen: während *AtNIT4* IAN nicht umsetzt, aber hohe Aktivität gegenüber β -Cyanoalanin aufweist und damit wahrscheinlich an der Cyanid-Detoxifikation beteiligt ist (Piotrowski *et al.*, 2001), besitzt *ZmNIT2* eine hohe Umsatzrate gegenüber IAN und *ZmNIT1* zeigt lediglich Hintergrundaktivität mit β -Cyanoalanin (Abb.3.15). NIT4-Homologa wurden neben *Arabidopsis* auch in *Brassica campestris*, *Brassica oleracea*, *Oryza sativa*, *Lotus japonicus* und *Nicotiana tabacum* gefunden. Phylogenetische Analysen deuten an, dass die NIT4-Enzyme Orthologa sind und daher auch dieselbe Reaktion zu katalysieren vermögen.

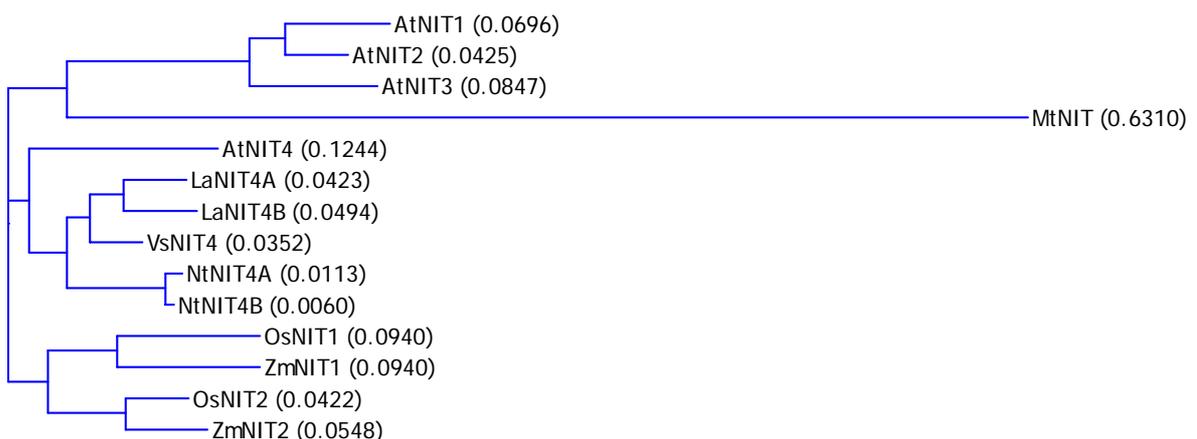


Abbildung 4.2: Phylogenetischer Baum (VectorNTI, Invitrogen) von Nitrilasen aus *Arabidopsis thaliana* (*At*), *Medicago truncatula* (*Mt*), *Lupinus angustifolius* (*La*), *Vicia sativa* (*Vs*), *Nicotiana tabacum* (*Nt*), *Oryza sativa* (*Os*) und *Zea mays* (*Zm*).

NIT4 aus *Arabidopsis*, Tabak und *Lupinus angustifolius* setzt β -Cyanoalanin im Gegensatz zu IAN effektiv um (Piotrowski *et al.*, 2001). Das Nitrilaseenzym aus *Medicago*

truncatula, das sich laut phylogenetischer Analyse (Abb.4.2) wohl am meisten von den anderen Nitrilasen unterscheidet, weist drei Domänen auf von denen die N-terminale, die sich in anderen Nitrilasen nicht auffinden lässt, eine Apolipoprotein-N-Acyltransferase darstellen soll; die anderen beiden könnten Nitrilase- bzw. Cyanid-Hydrataseaktivität aufweisen. Interessant auch die enge Verwandtschaft zwischen *ZmNIT2* und *OsNIT2* bzw. *ZmNIT1* und *OsNIT1* (Abb.4.2), die auch eine ähnliche Funktion dieser Enzyme implizieren könnte. Für beide Reinsnitrilasen wird anhand der Sequenz eine Funktion als CN-Hydrolase vorhergesagt (NCBI).

Während in Mais das *ZmNIT2*-Homomer Aktivität mit IAN aufweist, zeigt der hochmolekulare Heteromer-Komplex aus *ZmNIT1* und *ZmNIT2* gleichzeitig effizienten Umsatz von IAN und auch β -Cyanoalanin und indiziert damit eine mögliche Funktion in der Auxinbiosynthese und in der Cyanid-Detoxifikation. Im Heteromer erhöht sich die katalytische Effizienz für IAN im Gegensatz zu *ZmNIT2*-Protein alleine um etwa 22%, gegenüber β -Cyanoalanin im Vergleich von Nitrilasegemisch und *ZmNIT1*-Protein allein um das 370fache (Tab.3.7). Aus diesen Aktivitäten begründet sich auch das Fehlen eines *Zmnit1*-Mutantenphänotyps bezüglich IAN-Sensitivität oder Auxingehalt. Hier zeigt sich hingegen – wie auch für *Zmnit2*-Mutanten – ein Phänotyp im Rahmen des β -Cyanoalanin-Umsatzes (Abb.3.17). Wie auch die *in vitro*-Aktivität im Proteingemisch (Abb.3.16) spricht auch der in beiden Einzelmutanten fehlende oder zumindest stark reduzierte Umsatz von β -Cyanoalanin zu Aspartat dafür, dass beide Nitrilasen für diese Reaktion benötigt werden. Genauere Aussagen über den Reaktionsmechanismus würden aber detaillierter Analysen des Komplexaufbaues bedürfen. Gezielte Aminosäureaustausche, die zu Inaktivierung unter Erhalt der Bindungsfähigkeit je einer der beiden Nitrilasen führen, könnten aufklären, ob die Reaktion vom aktiven Zentrum einer Nitrilase katalysiert wird, das durch Interaktion mit der zweiten Nitrilase aktiviert wird, oder ob im Heteromer eine veränderte Konformation mit einer neuen aktiven Bindestellen geschaffen wird.

Der gerichtete Yeast-Two-Hybrid zeigt, dass eine Interaktion zwischen den beiden Nitrilaseproteinen stattfinden kann. Die Tatsache, dass in Yeast-Two-Hybrid-Screens gegen cDNA-Banken mit keiner der beiden Nitrilasen die jeweils andere gefischt werden konnte, könnte in den niedrigen Expressionsmengen der Nitrilasen und damit deren Unterrepräsentationen in den cDNA-Banken begründet liegen. Auch induziert das Substrat β -Cyanoalanin im Wachstumsmedium die Nitrilaseexpression in den Western Blot-Analysen (Abb.3.19). Das Vorläufermolekül 1-Aminocyclopropan-1-Carboxylsäure (ACC) übt hingegen im selben Versuch kaum direkten Einfluss aus. Auxin induziert die Enzyme ACC-Synthase und ACC-Oxidase, die die letzten beiden Schritte der Ethylenbiosynthese – den Umsatz von SAM zu ACC bzw. von ACC zu Ethylen unter Cyanidbildung – katalysieren (Raghavan *et al.*, 2006). Eine Verknüpfung von Auxin- und

Ethylenbiosynthese auch in Abstimmung von Enzymaktivitäten durch Homo- und Heteromultimerisierung ist also durchaus denkbar.

Duplikationsereignisse – wie bereits für die Mais-TSBs diskutiert – können neben Pseudogenen oder bloßer Erhöhung des Genprodukts auch zu völlig neuen Funktionen führen (Hancock, 2005), so können Cluster von homologen Genen entstehen, wie es z.B. für Immunoglobuline (Eason *et al.*, 2004) der Fall ist. In diesem Rahmen beschreibt die neuere Terminologie der „Subfunktionalisierung“ (Lynch und Force, 2000), dass nach Duplikation nicht eine Kopie die Originalfunktion und die zweite Kopie eine völlig neue Funktion übernimmt, sondern dass sich beispielsweise aus einem Enzym mit breiter Substratspezifität zwei Tochterenzyme mit engerer Substratspezifität unter Beibehaltung des Reaktionsmechanismus entwickeln. In Fall der Maisnitrilasen vermag *ZmNIT2* ein breiteres Spektrum an Nitrilverbindungen umzusetzen. Dabei werden mit aliphatischen und aromatischen Nitrilen und mit Phenylacetonitrilderivaten hauptsächlich die entsprechenden Säuren gebildet, während bei der Hydrolyse von β -Hydroxynitrilen vor allem Amide freigesetzt werden (Mukherjee *et al.*, 2006). Aber nur die Interaktion der beiden Enzyme ermöglicht offensichtlich eine Funktion im Rahmen der Cyanid-Detoxifikation (Miller und Conn, 1980), während in *Arabidopsis* eines der vier Nitrilase-Enzyme (*AtNIT4*) diesen Part übernimmt (Piotrowski *et al.*, 2001).

Die hochmolekularen Komplexe, die laut Gelfiltration sowohl mit nur einer der beiden Nitrilasen als auch im Gemisch aus beiden auftreten, sind typisch für die Nitrilasefamilie, die aus Monomeren zwischen 32 und 45 kDa bevorzugt aktive Enzyme mit 6 bis 26 Untereinheiten bildet (O'Reilly und Turner, 2003). Dabei kann die Anzahl der Untereinheiten auch ohne Aktivitätsverlust variieren. So weist z.B. die Nitrilase aus *F.oxysporum* f.sp. *melonis* in nativer PAGE Banden zwischen 170 und 880 kDa auf, die alle Aktivität zeigen solange die 4 bis 26 Untereinheiten paarweise addiert werden (Goldlust und Bohak, 1989). Komplexe aus *ZmNIT1* und *ZmNIT2* müssen also nicht zwangsweise aus mehr Untereinheiten als die Einzelproteine bestehen, um zusätzlich die Hydrolyse von β -Cyanoalanin zu katalysieren.

Einige Nitrilasen aggregieren nach Aktivierung durch das Substrat, wie für das Enzym aus *Nocardia* (*Rhodococcus*) NCIB 11216 (Harper, 1977b) beschrieben, das ohne Substrat monomerisch, mit Substrat als Multimer vorliegt. Die Nitrilasen von *Rhodococcus* ATCC39484 und *Alcaligenes faecalis* ATCC8750 zeigen auch substratabhängige Aktivierung (Stevenson *et al.*, 1992; Yamamoto *et al.*, 1992). Abhängig vom Substrat könnten so auch die Maisnitrilasen *in vivo* verstärkt als Homo- oder Heteromultimer vorliegen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass *ZmNIT2* zum einen aufgrund von Expression, Enzymparametern und Mutantenphänotyp Bedeutung in der Auxinbiosynthese der Korn- und frühen Primärwurzelentwicklung beizumessen ist und zum anderen in Interaktion mit *ZmNIT1* eine bisher nicht näher untersuchte Rolle in der Cyanid-Detoxifikation spielen mag. Zur Diskussion steht allerdings immer noch die Signifikanz ihres Beitrags zum IAA-Pool im Rahmen der Gesamtentwicklung der Pflanze, da aufgrund des nur relativ kurzzeitigen Phänotyps, der auf spätere Stadien keinerlei Auswirkungen mehr zu haben scheint, weitere Synthesewege und/oder erhöhte Bedeutung von Regulation via Konjugation und Dekonjugation postuliert werden müssen. Hierfür ist sicher die Analyse von Mehrfachmutanten – wie Nitrilase- mit Amidase- und Aldehyddehydrogenase-Mutanten (*Rf2A*), die derzeit auch generiert werden – wichtig und aufschlussreich. Des Weiteren ergaben sich zahlreiche Hinweise auf weitergehende Verknüpfungen zwischen verschiedenen Hormonsynthese- und auch Signalwegen, die auf weitaus komplexere Regulationsgefüge als bisher angenommen schließen lassen.

5. Zusammenfassung

In Pflanzen ist die Aminosäure Tryptophan zusätzlich zu ihrer Rolle in der Proteinbiosynthese Ausgangspunkt für die Synthese zahlreicher Phytohormone und Sekundärmetabolite. Potentielle Kandidatengene wurden auf eine Beteiligung am Tryptophansynthase-Komplex in Mais hin untersucht. Dieser Komplex katalysiert die Bildung von Indol aus Indol-3-Glycerinphosphat (α -Reaktion) und die Kondensation von Indol und Serin zu Tryptophan (β -Reaktion) und ist aus den Untereinheiten $\alpha\beta\beta\alpha$ aufgebaut. Der Tryptophansynthase-Komplex wurde in Blattextrakten aus Wildtyp-Mais durch Größenausschlusschromatographie untersucht. Ein ~155 kDa-Komplex mit Tryptophansynthase-Aktivität und ein ~95 kDa-Komplex mit β -Aktivität ließen sich nachweisen. α -Aktivität ist im Komplex, aber auch in einer monomeren Fraktion (~30 kDa) messbar. Diese Aktivität tritt in der *Zmbx1*-Mutante nicht auf und ist daher wohl eher *ZmBX1*-Enzymen als freien α -Untereinheiten zuzuschreiben. Die Genprodukte von *ZmTSAlike2* und *ZmTSB1* bilden *in vitro* einen Tryptophansynthase-Komplex. Typischerweise wird in diesem Komplex die katalytische Effizienz der α -Reaktion im Vergleich zu freiem α stark gesteigert.

Ein wichtiges Tryptophanderivat im Pflanzenreich ist das am häufigsten vorkommende Auxin Indol-3-Essigsäure (IAA). IAA ist an zahlreichen Prozessen wie Apikaldominanz, Seitenwurzelbildung, Embryonalentwicklung und Tropismen beteiligt. Maiskornextrakte setzten Tryptophan mit einer Rate von $0,5 \text{ pmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ zu IAA um. Durch Gelfiltration wurde ein 180 kDa großer, putativer IAA-Synthase-Komplex nachgewiesen. Diese IAA-Synthase-Aktivität in Mais konnte lediglich 64fach angereichert werden. Weitere Aufreinigungsversuche scheiterten am schnellen Aktivitätsverlust, so dass keine Aussagen über die Zusammensetzung des Komplexes möglich waren.

Als Kandidatengene der Auxinbiosynthese in Mais (*Zea mays*) wurden neben einer Amidase (*ZmAmi1*) auch zwei Nitrilasegene (*ZmNit1* und *ZmNit2*) isoliert, die untereinander 73% Übereinstimmung in ihrer Aminosäuresequenz aufweisen. Heterolog exprimiertes *ZmNIT2* ist in der Lage verschiedene Nitrile umzusetzen, wobei das Enzym für den Umsatz von Indol-3-Acetonitril (IAN) in IAA die beste katalytische Effizienz zeigt. Nitrilaseprotein und endogene Nitrilaseaktivität, wie auch das Substrat IAN sind in Maiskörnern und in Primärwurzel- und Koleoptilenspitzen junger Keimlinge nachweisbar. In IAN-haltigem Wasser gezogene Maiskeimlinge haben eine erhöhte Nitrilaseexpression und zeigen Auxin-typische Effekte wie verkürzte Wurzeln.

Um die Bedeutung der Hydrolyse von IAN zu IAA durch *ZmNIT2* *in vivo* nachzuweisen, wurden *Zmnit2*-knock-out-Mutanten untersucht. Diese sind weniger sensitiv gegenüber

exogen zugegebenem IAN und weisen deutlich verkürzte Primärwurzeln und signifikant weniger Gesamt-IAA in Korn und jungen Primärwurzelspitzen auf als der Wildtyp. Expression von *ZmNIT2*, Enzymparameter und Mutantenphänotyp machen eine Beteiligung dieser Nitrilase an der Auxinbiosynthese im Korn und jungen Primärwurzeln wahrscheinlich. *ZmNIT1* zeigt *in vitro* mit verschiedenen getesteten Nitrilverbindungen keine Aktivität und die Mutante weist keinen Auxinphänotyp auf. *In vitro* bilden *ZmNIT1* und *ZmNIT2* hochmolekulare heteromere Komplexe, die neben IAN auch β -Cyanoalanin, das als Intermediat der Cyanid-Detoxifikation diskutiert wird, hydrolysieren.

Summary

In addition to its role in protein synthesis tryptophan is a precursor in the synthesis of a large variety of phytohormones and plant secondary metabolites. Potential candidate genes were tested for involvement in a tryptophan synthase complex in maize. This complex catalyses the formation of indole from indole-3-glycerol phosphate (α -reaction) and the condensation of indole and serine to tryptophan (β -reaction) and is formed out of $\alpha\beta\alpha$ subunits. The tryptophan synthase complex was investigated in wildtype maize leaf extracts via size exclusion chromatography. A ~155 kDa complex with tryptophan synthase activity and a ~95 kDa complex with β -activity were detected. α -activity is measurable in the complex as well as in a monomeric fraction. As this activity is not present in the *Zmbx1* mutant this conversion should be rather due to the *ZmBX1* enzyme than to free α -subunits. *In vitro* the gene products of *ZmTSAlike2* and *ZmTSB1* form a tryptophan synthase complex. In this complex the catalytic efficiency of α -activity is typically strongly increased in comparison to free α .

An important tryptophan derivative in the plant kingdom is the most abundant auxin indole-3-acetic acid (IAA). IAA is involved in numerous plant processes including apical dominance, lateral root formation, embryo development, and tropisms. Protein preparations of maize kernels are capable of converting tryptophan to IAA at a rate of 0.5 pmol mg⁻¹ min⁻¹. Gel filtration purification suggests that this turnover is due to an app. 180 kDa protein complex. This IAA synthase activity could only be enriched 64-fold. As further purification attempts failed due to a severe loss in enzyme activity, no information about complex composition could be obtained.

As candidate genes for auxin biosynthesis in maize (*Zea mays*) we isolated an amidase (*ZmAmi1*) as well as two nitrilase genes, *ZmNit1* and *ZmNit2*, that both share 73%

sequence identity on the amino acid level. Heterologously expressed *ZmNIT2* hydrolyzes various nitrile compounds showing particularly high catalytic efficiency for the conversion of indole-3-acetonitrile (IAN) to IAA. Nitrilase protein and endogenous nitrilase activity are present in maize kernels and the tips of primary root and coleoptile of young seedlings together with the substrate IAN. Maize seedlings grown in water containing IAN showed increased nitrilase expression and typical auxin-like effects, e.g. decreased root length.

To provide evidence for the hydrolysis of IAN to IAA by *ZmNIT2* *in vivo* *Zmnit2* knock-out mutants were analyzed. These mutants came out to be less sensitive towards exogenous applied IAN and showed significantly decreased primary root length as well as total IAA amount in kernel and young primary root tips compared to the wildtype. Because of *ZmNIT2* expression, enzymatic parameters, and mutant phenotype a role of this nitrilase in auxin biosynthesis in kernel and early primary root development is likely. *ZmNIT1* shows no *in vitro* activity with several tested nitrile compounds and the corresponding mutant no auxin phenotype. *In vitro* *ZmNIT1* and *ZmNIT2* form a high-molecular-weight heteromeric complex that is able to hydrolyze IAN and β -cyanoalanine, which is discussed as an intermediate in cyanide detoxification.

6. Literatur

Anderson, K.S., Miles, E.W., Johnson, K.A. (1991) Serine modulates substrate channeling in tryptophan synthase. *J Biol Chem* 266: 8020-8033.

Andersson, U., Heddad, M., Adamska, I. (2003) Light stress-induced one-helix protein of the chlorophyll *a/b*-binding family associated with photosystem I. *Plant Physiol* 132: 811-820.

Bacher, A., Rieder, C., Eichinger, D., Arigoni, D., Fuchs, G., Eisenreich, W. (1999) Elucidation of novel biosynthetic pathways and metabolite flux patterns by retrobiosynthetic analysis. *FEMS Microbiol Rev* 22: 567-589.

Bak, S., Tax, F.E., Feldmann, K.A., Galbraith, D.W., Feyereisen, R. (2001) CYP83B1, a cytochrome P450 at the metabolic branch point in auxin and indole glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13: 101-111.

Bar, T., Okon, Y. (1993) Tryptophan conversion to indole-3-acetic acid via indole-3-acetamide in *Azospirillum brasilense* Sp 7. *Can J Microbiol* 39: 81-86.

Bartel, B., Fink, G.R. (1994) Differential regulation of an auxin-producing nitrilase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 6649-6653.

Bartel, B., Fink, G.R. (1995) ILR1, an amidohydrolase that releases active indole-3-acetic acid from conjugates. *Science* 268: 1745-1748.

Bartel, B., LeClere, S., Magidin, M., Zolman, B.K. (2001) Inputs to the active indole-3-acetic acid pool: *de novo* synthesis, conjugate hydrolysis, and indole-3-butyric acid β -oxidation. *J Plant Growth Regul* 20: 198-216.

Bartling, D., Seedorf, M., Mithofer, A., Weiler, E.W. (1992) Cloning and expression of an *Arabidopsis* nitrilase which can convert indole-3-acetonitrile to the plant hormone indole-3-acetic acid. *Eur J Biochem* 205: 417-424.

Bartling, D., Seedorf, M., Schmidt, R.C., Weiler, E.W. (1994) Molecular characterization of two cloned nitrilases from *Arabidopsis thaliana*: key enzymes in biosynthesis of the plant hormone indole-3-acetic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 6021-6025.

Bennett, R.N., Wenke, T., Freudenberg, B., Mellon, F.A., Ludwig-Müller, J. (2005) The *tu8* mutation of *Arabidopsis thaliana* encoding a heterochromatin protein 1 homolog causes defects in the induction of secondary metabolite biosynthesis. *J Plant Biol* 7: 348-357.

Bentley, R. (1990) The shikimate pathway – a metabolic tree with many branches. *CRC Crit Rev Biochem Mol Biol* 25: 307-384.

Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L. (2002) *Biochemistry* published by W.H. Freeman & Co., New York.

Bickel, H., Palme, L., Schultz, G. (1978) Incorporation of shikimate and other precursors into aromatic amino acids and prenylquinones of isolated spinach chloroplasts. *Phytochemistry* 17: 119-124.

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

- Blumenthal, S.G., Hendrickson, H.R., Abrol, Y.P., Conn, E.E. (1968) Cyanide metabolism in higher plants. 3. The biosynthesis of β -cyanoalanine. *J Bio Chem* 243: 5202-5307.
- Bolleter, W.T., Bushman, C.J., Tidwell, P.W. (1961) Spectrophotometric determination of ammonia as indophenol. *Anal Chem* 33: 592-594.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Bullock, W.O., Fernandez, F.M., Short, J.M. (1987) XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming rec A *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques* 5: 376-379.
- Burr, B., Burr, F.A. (1991) Recombinant inbreds for molecular mapping in maize: theoretical and practical considerations. *Trends Genet* 7: 55-60.
- Chaban, C., Waller, F., Furuya, M., Nick, P. (2003) Auxin responsiveness of a novel cytochrome P450 in rice coleoptiles. *Plant Physiol* 133: 2000-2009.
- Chavadej, S., Brisson, N., McNeil, J.N., De Luca, V. (1994) Redirection of tryptophan leads to production of low indole glucosinolate canola. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 2166-2170.
- Cheng, Y., Dai, X., Zhao, Y. (2006) Auxin biosynthesis by the YUCCA flavin monooxygenases controls the formation of floral organs and vascular tissues in *Arabidopsis*. *Genes & Dev* 20: 1790-1799.
- Cheong, Y.H., Chang, H.S., Gupta, R., Wang, X., Zhu, T., Luan, S. (2002) Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen, abiotic stress, and hormonal responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 129: 661-677.
- Cooke, T.J., Poli, D.B., Sztein, A.E., Cohen, J.D. (2002) Evolutionary patterns in auxin action. *Plant Mol Biol* 49: 319-338.
- Cooney, T.P., Nonhebel, H.M. (1989) The measurement and mass spectral identification of indole-3-pyruvate from tomato shoots. *Biochem Biophys Res Commun* 31: 761-766.
- Cooney, T.P., Nonhebel, H.M. (1991) Biosynthesis of indole-3-acetic acid in tomato shoots: measurement, mass-spectral identification and incorporation of ^2H from $^2\text{H}_2\text{O}$ into indole-3-acetic acid, D- and L-tryptophan, indole-3-pyruvate and tryptamine. *Planta* 184: 368-376.
- Craik, D.J., Daly, N.L., Bond, T., Waine, C. (1999) Plant cyclotides: A unique family of cyclic and knotted proteins that defines the cyclic cystine knot structural motif. *J Mol Biol* 294: 1327-1336.
- Crawford, I.P., Yanofsky, C. (1958) On the separation of the tryptophan synthetase of *Escherichia coli* into two protein components. *Proc Natl Acad Sci* 44: 1161-1170.
- Crawford, I.P. (1989). Evolution of a biosynthetic pathway: The tryptophan paradigm. *Annu Rev Microbiol* 43: 567-600.
- Creighton, T.E., Yanofsky, C. (1966) Association of the alpha and beta-2 subunits of the tryptophan synthetase of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 241: 980-990.

- Cutler, S.R., Somerville, C.R. (2005) Imaging plant cell death: GFP-Nit1 aggregation marks an early step of wound and herbicide induced cell death. *BMC Plant Biol* 5: 4.
- Deblaere, R., Bytebier, B., De Greve, H., Deboeck, F., Schell, J., Van Montagu, M., Leemans, J. (1985) Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants. *Nucleic Acids Res* 13: 4777-4788.
- Delmer, D.P., Mills, S.E. (1968) Tryptophan synthase from *Nicotiana tabacum*. *Biochim Biophys Acta* 167: 431-443.
- Dettwiler, M., Kirschner, K. (1979) Tryptophan synthase from *Saccharomyces cerevisiae* is a dimer of two polypeptide chains of M_r 76000 each. *Eur J Biochem* 102: 159-165.
- Dunn, M.F., Aguilar, V., Brzovic, P., Drewe Jr, W.F., Houben, K.F., Leja, C.A., Roy, M. (1990) The tryptophan synthase holoenzyme complex transfers indole between the α and β -sites via a 25-30 Å long tunnel. *Biochemistry* 29: 8598-8607.
- Eason, D.D., Cannon, J.P., Haire, R.N., Rast, J.P., Ostrov, D.A., Litman, G.W. (2004) Mechanisms of antigen receptor evolution. *Semin Immunol* 16: 215-226.
- Eilert, U., De Luca, V., Constabel, F., Kurz, W.G. (1987) Elicitor-mediated induction of tryptophan decarboxylase and strictosidine synthase activities in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. *Arch Biochem Biophys* 254: 491-497.
- Epstein, E., Cohen, J.D., Bandurski, R.S. (1980) Concentration and metabolic turnover of indoles in germinating kernels of *Zea mays* L. *Plant Physiol* 65: 415-421.
- Facchini, P.J. (2001) Alkaloid biosynthesis in plants: Biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering applications. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 52: 29-66.
- Fields, S., Song, O. (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340: 245-246.
- Fields, S. (1993) The two-hybrid system to detect protein-protein interactions. *Methods: A Companion to Methods Enzymol* 5: 116-124.
- Frey, M., Reinike, J., Grant, S., Saedler, H., Gierl, A. (1990) Excision of the *En/Spm* transposable element of *Zea mays* requires two element-encoded proteins. *EMBO J* 9: 4937-4944.
- Frey, M., Chomet, P., Glawischnig, E., Stettner, C., Grün, S., Winkelmayr, A., Eisenreich, W., Bacher, A., Meeley, R.B., Briggs, S.P., Simcox, K., Gierl, A. (1997) Analysis of a chemical plant defense mechanism in grasses. *Science* 277: 696-699.
- Frey, M., Stettner, C., Pare, P.W., Schmelz, E.A., Tumlinson, J.H., Gierl, A. (2000) An herbivore elicitor activates the gene for indole emission in maize. *PNAS* 97: 14801-14806.
- Gerth, K., Metzger, R., Reichenbach, H. (1993) Induction of myxospores in *Stigmatella aurantiaca* (myxobacteria): inducers and inhibitors of myxospore formation and mutants with a changed sporulation behavior. *J Gen Microbiol* 139: 865-871.
- Gierl, A., Frey, M. (2001) Evolution of benzoxazinone biosynthesis and indole production in maize. *Planta* 213: 493-498.

- Glawischnig, E., Tomas, A., Eisenreich, W., Spiteller, P., Bacher, A., Gierl, A. (2000) Auxin biosynthesis in maize kernels. *Plant Physiol* 123: 1109-1119.
- Glawischnig, E., Mikkelsen, M.D., Halkier, B.A. (2003) Glucosinolate biosynthesis and metabolism. In Y Abrol, A Ahmad eds, *Sulphur in plants*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands: 145-162.
- Glawischnig, E., Hansen, B.G., Olsen, C.E., Halkier, B.A. (2004) Camalexin is synthesized from indole-3-acetaldoxime, a key branching point between primary and secondary metabolism in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 8245-8250.
- Goldlust, A., Bohak, Z. (1989) Induction, purification, and characterization of the nitrilase of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 11: 581-601.
- Grsic, S., Sauerteig, S., Neuhaus, K., Albrecht, M., Rossiter, J., Ludwig-Müller, J. (1999) Auxin biosynthesis in clubroot diseased Chinese cabbage plants and induction by jasmonic acid. *Physiologia Plantarum* 105: 521-531.
- Grsic-Rausch, S., Kobelt, P., Siemens, J.M., Bischoff, M., Ludwig-Müller, J. (2000) Expression and localization of nitrilase during symptom development of the clubroot disease in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 122: 369-378.
- Gupta, P.R.L., Ratore, V.S., Saradhi, S.V., Garg, G.K. (1982) Tryptophan synthase in maize (*Zea mays* L.): I. *In vivo* & *in vitro* demonstration of enzyme activity. *Biochem Biophys Res Com* 109: 121-129.
- Gutjahr, C., Riemann, M., Müller, A., Düchting, P., Weiler, E.W., Nick, P. (2005) Cholodny-Went revisited: A role for jasmonate in gravitropism of rice coleoptiles. *Planta* 222: 575-585.
- Haga, K., Iino, M. (1998) Auxin-growth relationships in maize coleoptiles and pea internodes and control by auxin of the tissue sensitivity to auxin. *Plant Physiol* 117: 1473-1486.
- Hancock, J.M. (2005) Gene factories, microfunctionalization and the evolution of gene families. *Trends Genet* 21: 591-595.
- Harper, D.B. (1977b) Microbial metabolism of aromatic nitriles. *Biochemical Journal* 165: 309-319.
- He, G., Tarui, Y., Iino, M. (2005) A novel receptor kinase involved in jasmonate-mediated wound and phytochrome signaling in maize coleoptiles. *Plant Cell Physiol* 46: 870-883.
- Helminger, J., Rausch, T., Hilgenberg, W. (1985) Metabolism of ¹⁴C-indole-3-acetaldoxime by hypocotyls of Chinese cabbage. *Phytochemistry* 24: 2497-2502.
- Hettwer, S., Sterner, R. (2002) A novel tryptophan synthase beta-subunit from the hyperthermophile *Thermotoga maritima*. Quaternary structure, steady-state kinetics, and putative physiological role. *J Biol Chem* 277: 8194-8201.
- Hoffman, C.S., Winston, F. (1987) A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* 57: 267-272.

- Hogge, L.R., Reed, D.W., Underhill, E.W., Haughn, G.W. (1988) HPLC separation of glucosinolates from leaves and seeds of *Arabidopsis thaliana* and their identification using thermospray liquid chromatography/mass spectrometry. *J Chromatogr Sci* 26: 551-556.
- Hughes, R.K., Dickerson, A.G. (1991) Modulation of elicitor-induced chitinase and β -1,3-glucanase activity by hormones in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Cell Physiol* 32: 853-861.
- Hull, A.K., Vij, R., Celenza, J.L. (2000) Arabidopsis cytochrome P450s that catalyze the first step of tryptophan-dependent indole-3-acetic acid biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 2379-2384.
- Hyde, C.C., Ahmed, S.A., Padlan, E.A., Miles, E.W., Davies, D.R. (1988) Three-dimensional structure of the tryptophan synthase $\alpha_2\beta_2$ multienzyme complex from *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem* 263: 17857-17871.
- Ilic, N., Normanly, J., Cohen, J.D. (1996) Quantification of free plus conjugated indole-acetic acid in *Arabidopsis* requires correction for the nonenzymatic conversion of indolic nitriles. *Plant Physiol* 111: 781-788.
- Inzé, D., van Onckelen, H., Melzer, S., Perilleux, C., Verbruggen, N., Gerats, T. (2004) Growth and development of higher plants. Progress Report.
- Jackson, R.G., Lim, E.K., Li, Y., Kowalczyk, M., Sandberg, G., Hoggett, J., Ashford, D.A., Bowles, D.J. (2001) Identification and biochemical characterization of an *Arabidopsis* indole-3-acetic acid glucosyltransferase. *J Biol Chem* 276: 4350-4356.
- Jensen, P.J., Bandurski, R.S. (1994) Metabolism and synthesis of indole-3-acetic acid (IAA) in *Zea mays* (Levels of IAA during kernel development and the use of *in vitro* endosperm systems for studying IAA biosynthesis. *Plant Physiol* 106: 343-351.
- Jensen, P.J., Bandurski, R.S. (1996) Incorporation of deuterium into indole-3-acetic acid and tryptophan in *Zea mays* seedlings grown on 30% deuterium oxide. *J Plant Physiol* 147: 697-702.
- Jones, S., Thornton, J.M. (1996) Principles of protein-protein interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 13-20.
- Kirschner, K., Wiskocil, R.L., Foehn, M., Rezeau, L. (1975) The tryptophan synthase from *Escherichia coli*. An improved purification procedure for the alpha-subunit and binding studies with substrate analogues. *Eur J Biochem* 60: 513-523.
- Kirschner, K., Lane, A.N., Strasser, A.W. (1991) Reciprocal communication between the lyase and synthase active sites of the tryptophan synthase bienzyme complex. *Biochemistry* 30: 472-478.
- Kobayashi, M., Izui, H., Nagasawa, T., Yamada, H. (1993) Nitrilase in biosynthesis of the plant hormone indole-3-acetic acid from indole-3-acetonitrile: Cloning of the *Alcaligenes* gene and site-directed mutagenesis of cysteine residues. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 247-251.
- Koshiba, T., Kamiya, Y., Iino, M. (1995) Biosynthesis of indole-3-acetic acid from L-tryptophan in coleoptile tips of maize (*Zea mays* L.). *Plant Cell Physiol* 36: 1503-1510.
- Koshiba, T., Saito, E., Ono, N., Yamamoto, N., Sato, M. (1996) Purification and properties of flavin- and molybdenum-containing aldehyde oxidase from coleoptiles of maize. *Plant Physiol* 110: 781-789.

- Kulik, V., Hartmann, E., Weyand, M., Frey, M., Gierl, A., Niks, D., Dunn, M.F., Schlichting, I. (2005) On the structural basis of the catalytic mechanism and the regulation of the alpha subunit of tryptophan synthase from *Salmonella typhimurium* and BX1 from maize, two evolutionarily related enzymes. *J Mol Biol* 352: 608-620.
- Kutz, A., Müller, A., Peter, H., Kaiser, W.M., Piotrowski, M., Weiler, E.M. (2002) A role for nitrilase 3 in the regulation of root morphology in sulfur starving *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 30: 95-106.
- Lämmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lane, A.N., Kirschner, K. (1991) Mechanism of the physiological reaction catalyzed by tryptophan synthase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 30: 479-484.
- Lange, K. (2005) Diplomarbeit: Indol- und Camalexinstoffwechsel transgener *Arabidopsis*-Pflanzen. TU München, Lehrstuhl für Genetik.
- Last, R.L., Bissinger, P.H., Mahoney, D.J., Radwanski, E.R., Fink, G.R. (1991) Tryptophan mutants in *Arabidopsis*: the consequences of duplicated tryptophan synthase beta genes. *Plant Cell* 3: 345-358.
- Ljung, K., Hull, A.K., Kowalczyk, M., Marchant, A., Celenza, J., Cohen J.D., Sandberg, G. (2002) Biosynthesis, conjugation, catabolism, and homeostasis of indole-3-acetic acid in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 50: 309-332.
- Ljung, K., Hull, A.K., Celenza, J., Yamada, M., Estelle, M., Normanly, J., Sandberg, G. (2005) Sites and regulation of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* roots. *Plant Cell* 17: 1090-1104.
- Lottspeich, F., Zorbas, H. (1998) Bioanalytik; Spektrum Akademischer Verlag GmbH.
- Luckwill, L.C. (1952) Application of paper chromatography to the separation and identification of auxins and growth inhibitors. *Nature* 169: 375.
- Ludwig-Müller, J., Hilgenberg, W. (1988) A plasma membrane-bound enzyme oxidizes L-tryptophan to indole-3-acetaldoxime. *Physiol Plant* 74: 240-250.
- Lynch, M., Force, A. (2000) The probability of duplicate gene preservation by subfunctionalization. *Genetics* 154: 459-473.
- Magie, A.R., Wilson, E.E., Kosuge, T. (1963) Indoleacetamide as an intermediate in the synthesis of indole acetic acid in *Pseudomonas savastanoi*. *Science* 141: 1281-1282.
- Maleck, K., Dietrich, R.A. (1999) Defense on multiple fronts: How do plants cope with diverse enemies? *Trends Plant Sci* 4: 215-219.
- Mann, M., Hendrickson, R.C., Pandey, A. (2001) Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Ann Rev Biochem* 70: 437-473.
- Manulis, S., Shafir, H., Epstein, E., Lichter, A., Barash, I. (1994) Biosynthesis of indole-3-acetic acid via the indole-3-acetamide pathway in *Streptomyces* spp. *Microbiology* 140: 1045-1050.
- Matchett, W.H., DeMoss, J.A. (1975) The subunit structure of tryptophan synthase from *Neurospora crassa*. *J Biol Chem* 250: 2941-2946.

- Meding, S. (2004) Bachelorarbeit: Klonierung und Expression einer Indol-3-Acetamid Hydrolase aus *Zea mays*. TU München, Lehrstuhl für Genetik.
- Michalczuk, L., Ribnicky, D.M., Cooke, T.J., Cohen, J.D. (1992) Regulation of indole-3-acetic acid biosynthesis pathways in carrot cell cultures. *Plant Physiol* 100: 1346-1353.
- Mikkelsen, M.D., Hansen, C.H., Wittstock, U., Halkier, B.A. (2000) Cytochrome P450 CYP79B2 from *Arabidopsis* catalyzes the conversion of tryptophan to indole-3-acetaldoxime, a precursor of indole glucosinolates and indole-3-acetic acid. *J Biol Chem* 275: 33712-33717.
- Miles, E.W. (1979) Tryptophan synthase: structure, function, and subunit interaction. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 49: 127-186.
- Miles, E.W. (1991) Structural basis for catalysis by tryptophan synthase. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 64: 93-172.
- Miller, J.M., Conn, E.E. (1980) Metabolism of hydrogen cyanide by higher plants. *Physiologia Plantarum* 65: 1199–1202.
- Müller, A., Hillebrand, H., Weiler, E.W. (1998) Indole-3-acetic acid is synthesized from L-tryptophan in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 206: 362-369.
- Müller, A., Weiler, E.W. (2000a) Indolic constituents and indole-3-acetic acid biosynthesis in the wild-type and a tryptophan auxotroph mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 211: 855–863.
- Müller, A., Weiler, E.W. (2000b) IAA-synthase, an enzyme complex from *Arabidopsis thaliana* catalyzing the formation of indole-3-acetic acid from (S)-tryptophan. *Biol Chem* 381: 679-686.
- Mukherjee, C., Zhu, D., Biehl, E.R., Parmar, R.R., Hua, L. (2006) Enzymatic nitrile hydrolysis catalyzed by nitrilase *ZmNIT2* from maize. An unprecedented β -hydroxy functionality enhanced amide formation. *Tetrahedron* 62: 6150-6154.
- Nagao, R.T., Moore, T.C. (1972) Partial purification and properties of tryptophan synthase of pea plants. *Arch Biochem Biophys* 149: 402-413.
- Neuhoff, V. (1985) Clear background and highly sensitive protein staining with Coomassie Blue dyes in polyacrylamide gels: a systemic analysis. *Electrophoresis* 6: 427-448.
- Nishio, K., Morimoto, Y., Ishizuka, M., Ogasahara, K., Tsukihara, T., Yutani, K. (2005) Conformational changes in the α -subunit coupled to the binding of the β_2 -subunit of tryptophan synthase from *Escherichia coli*: crystal structure of the tryptophan synthase α -subunit alone. *Biochemistry* 44: 1184-1192.
- Nooren, I.M., Thornton, J.M. (2003) Structural characterisation and functional significance of transient protein-protein interactions. *J Mol Biol* 325: 991-1018.
- Normanly, J., Cohen, J., Fink, G.R. (1993) *Arabidopsis thaliana* auxotrophs reveal a tryptophan-independent biosynthetic pathway for indole-3-acetic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 10355-10359.
- Normanly, J., Grisafi, P., Fink, G.R., Bartel, B. (1997) *Arabidopsis* mutants resistant to the auxin effects of indole-3-acetonitrile are defective in the nitrilase encoded by the *Nit1* gene. *Plant Cell* 9: 1781–1790.

- Normanly, J., Bartel, B. (1999) Redundancy as a way of life – IAA metabolism. *Curr Opin Plant Biol* 2: 207-213.
- O'Reilly, C., Turner, P.D. (2003) The nitrilase family of CN hydrolysing enzymes - a comparative study. *Journal of Applied Microbiology* 95: 1161-1174.
- Östin, A., Ilic, N., Cohen, J.D. (1999) An *in vitro* system from maize seedlings for tryptophan-independent indole-3-acetic acid biosynthesis. *Plant Physiol* 119: 173-178.
- Pace, H.C., Brenner, C. (2001) The nitrilase superfamily: classification, structure and function. *Genome Biol* 2: REVIEWS0001.
- Pan, P., Woehl, E., Dunn, M.F. (1997) Protein architecture, dynamics and allostery in tryptophan synthase channeling. *TIBS* 22: 22-27.
- Park, W.J., Kriechbaumer, V., Müller, A., Piotrowski, M., Meeley, R.B., Gierl, A., Glawischnig, E. (2003) The nitrilase *ZmNIT2* converts indole-3-acetonitrile to indole-3-acetic acid. *Plant Physiol* 133: 794-802.
- Pasquali, G., Goddijn, O.J., de Waal, A., Verpoorte, R., Schilperoort, R.A., Hoge, J.H., Memelink, J. (1992) Coordinated regulation of two indole alkaloid biosynthetic genes from *Catharanthus roseus* by auxin and elicitors. *Plant Mol Biol* 18: 1121-1131.
- Pedras, M.S.C., Okanga, F.I., Zaharia, I.L., Khan, A.Q. (2000) Phytoalexins from crucifers: synthesis, biosynthesis, and biotransformation. *Phytochemistry* 53: 161-176.
- Piotrowski, M., Schönfelder, S., Weiler, E.W. (2001) The *Arabidopsis thaliana* NIT4 and its orthologs in tobacco β -cyano-L-alanine hydratase/nitrilase. *J Biol Chem* 276: 2616-2621.
- Pollmann, S., Müller, A., Piotrowski, M., Weiler, E.W. (2002) Occurrence and formation of indole-3-acetamide in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 216: 155-161.
- Pollmann, S., Neu, D., Weiler, E.W. (2003) Molecular cloning and characterization of an amidase from *Arabidopsis thaliana* capable of converting indole-3-acetamide into the plant growth hormone, indole-3-acetic acid. *Phytochemistry* 62: 293-300.
- Radwanski, E.R., Zhao, J., Last, R.L. (1995) *Arabidopsis thaliana* tryptophan synthase alpha: gene cloning, expression, and subunit interaction. *Mol Gen Genet* 248: 657-667.
- Radwanski, E.R., Barkzak, A.J., Last, R.L. (1996) Characterization of tryptophan synthase alpha subunit mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet* 253: 353-361.
- Raghavan, C., Ong, E.K., Dalling, M.J., Stevenson, T.W. (2006) Regulation of genes associated with auxin, ethylene and ABA pathways by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in *Arabidopsis*. *Funct Integr Genomics* 6: 60-70.
- Ribnicky, D.M., Ilic, N., Cohen, J.D., Cooke, T.J. (1996) The effects of exogenous auxins on endogenous indole-3-acetic acid metabolism (The implications for carrot somatic embryogenesis). *Plant Physiol* 112: 549-558.
- Riemann, M., Müller, A., Korte, A., Furuya, M., Weiler, E.W., Nick, P. (2003) Impaired induction of the jasmonate pathway in the rice mutant *hebiba*. *Plant Physiol* 133: 1820-1830.
- Riverin, M., Drapeau, G.R. (1976) Purification and properties of the $\alpha_2\beta_2$ complex of tryptophan synthetase of *Proteus mirabilis*. *J Biol Chem* 251: 3875-3880.

- Rosenberg, A.H., Lade, B.N., Chui, D., Lin, S.-W., Dunn, J.J., Studier, F.W. (1987) Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase. *Gene* 56: 125-135.
- Sambrook, J., Russell, D.W. (2001) *Molecular Cloning. A laboratory manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanger, F., Nicklein, S., Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *PNAS* 74: 5463-5467.
- Saotome, M., Shirahata, K., Nishimura, R., Yakaba, M., Kawaguchi, M., Syono, K., Kitsuwa, T., Ishii, Y., Nakamura, T. (1993) The identification of indole-3-acetic acid and indole-3-acetamide in the hypocotyls of Japanese cherry. *Plant Cell Physiol* 34: 157-159.
- Saugy, M., Pilet, P.-E. (1987) Changes in the level of free and ester indol-3-yl-acetic acid in growing maize roots. *Plant Physiol* 85: 42-45.
- Schneider, T.R., Gerhardt, E., Lee, M., Liang, P.H., Anderson, K.S., Schlichting, I. (1998) Loop closure and intersubunit communication in tryptophan synthase. *Biochemistry* 37: 5394-5406.
- Sekimoto, H., Seo, M., Dohmae, N., Takio, K., Kamiya, Y., Koshihara, T. (1997) Cloning and molecular characterization of plant aldehyde oxidase. *J Biol Chem* 272: 15280-15285.
- Seyffert, W., Gassen, H.G., Hess, O., Jäckle, H., Fischbach, K.-F. (1998) *Lehrbuch der Genetik*. Gustav Fischer Verlag.
- Skoog, F., Miller, C.O. (1957) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. *Symposia of the Society for Experimental Biology* 11: 118-131.
- Sommer, H., Beltan, J.-P., Hujser, P., Pape, H., Lönning, W.-E., Saedler, H., Schwarz-Sommer, Z. (1990) *Deficiens*, a homeotic gene involved in the control of flower morphogenesis in *Antirrhinum majus*, the protein shows homology to transcription factors. *EMBO J* 9: 605-613.
- Staswick, P.E., Serban, B., Rowe, M., Tiryaki, I., Maldonado, M.T., Maldonado, M.C., Suza, W. (2005) Characterization of an *Arabidopsis* enzyme family that conjugates amino acids to indole-3-acetic acid. *Plant Cell* 17: 616-627.
- Stevenson, D.E., Feng, R., Dumas, F., Groleau, D., Mihoc, A., Storer, A.C. (1992) Mechanistic and structural studies on *Rhodococcus* ATCC 39484 nitrilase. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 15: 283-302.
- Studier, F.W., Moffatt, B.A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* 189: 113-130.
- Szerszen, J.B., Szczyglowski, K., Bandurski, R.S. (1994) *iaglu*, a gene from *Zea mays* involved in conjugation of growth hormone indole-3-acetic acid. *Science* 265: 1699-701.
- Sztein, A.E., Ilic, N., Cohen, J.D., Cooke, T.J. (2002) Indole-3-acetic acid biosynthesis in isolated axes from germinating bean seeds: The effect of wounding on the biosynthetic pathway. *Plant Growth Regul* 36: 201-207.
- Taiz, L., Zeiger, E. (2002) *Physiologie der Pflanzen*; Heidelberg/Berlin; Spektrum Akademischer Verlag.

- Takahashi, N., Yamaguchi, I., Kono, T., Igoshi, M., Hirose, K., Suzuki, K. (1975) Characterization of plant growth substances in *Citrus unshiu* and their change in fruit development. *Plant Cell Physiol* 16: 1101-1111.
- The *Arabidopsis* genome initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 796-814.
- Thimann, K.V., Mahadevan, S. (1964) Nitrilase. I. Occurrence, preparation and general mode of action. *Arch Biochem Biophys* 105: 133-141.
- Ueda, J., Miyamoto, K., Aoki, M. (1994) Jasmonic acid inhibits the IAA-induced elongation of oat coleoptile segments: a possible mechanism involving the metabolism of cell wall polysaccharides. *Plant Cell Physiol* 35: 1065-1070.
- Vogel, G. (2006) Auxin begins to give up its secrets. *Science* 313: 1230-1231.
- Vorwerk, S., Biernacki, S., Hillebrand, H., Janzik, I., Müller, A., Weiler, E.W., Piotrowski, M. (2001) Enzymatic characterization of the recombinant *Arabidopsis thaliana* nitrilase subfamily encoded by the NIT2/NIT1/NIT3-gene cluster. *Planta* 212: 508-516.
- Walz, A., Park, S., Slovin, J.P., Ludwig-Müller, J., Momonoki, Y.S., Cohen J.D. (2002) A gene encoding a protein modified by the phytohormone indole acetic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 1718-1723.
- Wang, D., Ding, X., Rather, P.N. (2001) Indole can act as an extracellular signal in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 183: 4210-4216.
- Weiler, E.W., Schröder, J. (1987) Hormone genes and the crown gall disease. *TIBS* 12: 271-275.
- Weischet, W.O., Kirschner, K. (1976) Steady-state kinetic studies of the synthesis of indoleglycerol phosphate catalyzed by the alpha subunit of tryptophan synthase from *Escherichia coli*. Comparison with the alpha2 beta2-complex. *Eur J Biochem* 65: 365-373.
- Weyand, M., Schlichting, I. (1999) Crystal structure of wild-type tryptophan synthase complexed with the natural substrate indole-3-glycerol phosphate. *Biochemistry* 38: 16469-16480.
- Woodward, A.W., Bartel, B. (2005) Auxin: Regulation, action, and interaction. *Annals of Botany* 95: 707-735.
- Wright, A.D., Sampson, M.B., Neuffer, M.G., Michalczuk, L., Slovin, J.P., Cohen, J.D. (1991) Indole-3-acetic acid biosynthesis in the mutant maize *orange pericarp*, a tryptophan auxotroph. *Science* 254: 998-1000.
- Wright, A.D., Moehlenkamp, C.A., Perrot, G.H., Neuffer, M.G., Cone, K.C. (1992) The maize auxotrophic mutant *orange pericarp* is defective in duplicate genes for tryptophan synthase β . *Plant Cell* 4: 711-719.
- Xu, P., Narasimhan, M.L., Samson, T., Coca, M.A., Huh, G.-H., Zhou, J., Martin, G.B., Hasegawa, P.M., Bressan, R.A. (1998) A nitrilase-like protein interacts with GCC box DNA-binding proteins involved in ethylene and defense responses. *Plant Physiol* 118: 867-874.

Yamamoto, K., Fujimatsu, I., Komatsu, K. (1992) Purification and characterization of the nitrilase from *Alcaligenes faecalis* ATCC8750 responsible for enantioselective hydrolysis of mandelonitrile. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 73: 425-430.

Yanofsky, C., Crawford, I.P. (1987). The tryptophan operon in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology, Vol. 2, F.C. Neidhardt, J.L. Ingraham, K.B. Low, E. Magasanik, M. Schaechter, H.E. Umbarger, eds (Washington, DC: American Society for Microbiology): 1453-1472.

Zhao, J., Last, R.L. (1995) Immunological characterization and chloroplast localization of the tryptophan biosynthetic enzymes of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 270: 6081-6087.

Zhao, Y., Christensen, S.K., Fankhauser, C., Cashman, J.R., Cohen, J.D., Weigel, D., Chory, J. (2001) A role for flavin monooxygenase-like enzymes in auxin biosynthesis. *Science* 291: 306-309.

Zimmermann, P., Hirsch-Hoffmann, M., Hennig, L., Gruissem, W. (2004) GENEVESTIGATOR. *Arabidopsis* microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiol* 136: 2621-2632.

Zook, M. (1998) Biosynthesis of camalexin from tryptophan pathway intermediates in cell-suspension cultures of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 118: 1389-1393.

Teile dieser Dissertation wurden veröffentlicht:

Park, W.J., Kriechbaumer, V., Müller, A., Piotrowski, M., Meeley, R.B., Gierl, A., Glawischnig, E. (2003) The Nitrilase *ZmNIT2* converts indole-3-acetonitrile to indole-3-acetic acid. *Plant Physiol* 133: 794-802.

Kriechbaumer, V., Glawischnig, E. (2005) Auxin biosynthesis within the network of tryptophan metabolism. *JNBT* 2: 55-58.

Kriechbaumer, V., Glawischnig, E. (2006) Auxin biosynthesis in maize. *Plant Biol* 8: 334-339.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Alfons Gierl für die Möglichkeit bedanken, diese Arbeit an seinem Lehrstuhl selbstständig bearbeiten zu dürfen, und für seine fachliche Unterstützung.

Ebenso möchte ich meinem Betreuer Dr. Erich Glawischnig für Hilfestellung in Wort und Tat, das Aufstellen von Korrekturrekorden und die Möglichkeit danken jederzeit die Arbeit zu diskutieren.

Dank auch an den Rest der Chefetage: Dr. Ulrich Genschel, Dr. Monika Frey und Dr. Ramon Torres Ruiz für Fachwissen, konstruktive Diskussionen, Hilfsbereitschaft und Ideen. Ein spezielles Dankeschön an Prof. Dr. Woong June Park, der mich als Praktikantin auf den rechten Auxin-Weg zu führen wusste, für seine Arbeiten und sein beständiges Interesse am Nitrilaseprojekt.

Großer Dank gilt allen übrigen Kolleginnen und Kollegen im Labor für zahlreiche tolle Urlaube, Pullinger Weiher-Ausflüge, unvergessliche Franklin's, El Corazon-, Bowling- und WM-Abende, rettende und Lebensgeister-weckende Kaffeepausen, „Social-Lunch“, Eisschlachten, Humor, Hilfsbereitschaft, Psychotherapien etc. etc. und nicht zuletzt auch für arbeitstechnisch-produktive Diskussionen, eine in jeglicher Hinsicht besondere Arbeitsatmosphäre und für einige ganz besondere Freundschaften, die ich nicht mehr missen möchte:

Rafał Jończyk, Silvia Ronconi, Katrin Schullehner, Thomas Rauhut und Andreas Fießelmann (die für erfrischenden Zynismus und Unterhaltung auf dem Weg zur Arbeit zu sorgen wussten, meinem „Unterdoktoranden“ auch für 5 oder 7 PCRs), Dr. Gerti Spielbauer (der besten Gesellschaft im HPLC-Labor und beim Maschinen-Schimpfen), Dr. Holger Schmidt, Ruohe Yin, Birgit Treml, Zheng Yu, Dr. Regina Stefanek, Dr. Regina Schuhegger, Anne Osterrieder, Katharina Lange (besonders für ihre Arbeit an den *Nit2*-Überexpressionspflanzen), Peter Dobos (für außergewöhnliche Lebensweisheiten und den „grünen Daumen“ im Kampf gegen die Insektenwelt), Peggy Müller, Miriam Vogg, Regina Hüttl, Heidi Miller-Mommerskamp, Stefanie Dommel, sowie der wechselnden Sekretariatsbesetzung Hedi Kellner, Carolin Ziegler und Petra Wick, die bei viel Papierkram immer einen ruhigen Kopf bewahrten.

Den „Ehemaligen“ Dr. Karolin Schmäzlin, Dr. Sebastian Grün, Dr. Christine Schäfer und Dr. Oksana Kortas, die die Entscheidung zur Diplom- bzw. Doktorarbeit wieder bei den „Genetikern“ aufzutauchen erleichtert haben, und besonders Dr. Annette Martin, die nicht nur bei cDNA-Banken und Yeast-Two-Hybrid-Screens sehr hilfreich war.

Meinen Praktikanten – Andrea Renner und Moritz Gegg – und „Bacheloranden“ – Stephan Meding und Bernd Anselment – danke ich für die Mitarbeit an verschiedenen Projektteilen.

Ein Dankeschön auch an Linda Weigang, Sylvia Grosse und Dr. Thomas Letzel vom Lehrstuhl der Chemie der Biopolymere für LC-MS-Messungen und Unterricht im Auswerten, an Titus Franzmann vom Biochemielehrstuhl von Prof. Dr. Johannes Buchner für Nacht- und Wochenendarbeit bei der Komplexaufreinigung, an Herrn Schattauer vom Lehrstuhl für Pflanzenpathologie für Unterstützung bei der Gewächshausarbeit und an Dr. Markus Piotrowski, Dr. Axel Müller und Dr. Stephan Pollmann (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Elmar Weiler, Bochum) für die Idee zur Nitrilasekomplexierung, GC-MS-Messungen bzw. Amidase-Antikörper.

Last but not least...ein großer Dank an meine Familie, die mir vieles ermöglicht und mich immer auf jede erdenkliche Art und Weise unterstützt hat.

Lindwurmstrasse 98 • 80337 München
Telefon 089-76704035
E-Mail verena.kriechbaumer@wzw.tum.de

Curriculum Vitae

Verena Kriechbaumer

Persönliche Informationen

- Nationalität: deutsch
- Geburtsdatum: 20. Dezember 1978
- Geburtsort: Bad Reichenhall
- Familienstand: ledig
- Eltern: Helga und Robert Kriechbaumer

Ausbildung

- Sept. 1985 – Juli 1989 Grundschule Feldkirchen
- Sept. 1989 – Juni 1998 Karls gymnasium Bad Reichenhall
Abitur in Biologie, Latein, Mathematik und Religionslehre
Zeugnis der Allgemeinen Hochschulreife
- Okt. 1998 – Jan. 2003 Studium der Biologie an der TU München
Hauptfach: Genetik; Nebenfächer: Virologie und Zoologie
Diplomarbeit: „Auxinbiosynthese in *Zea mays*“ am Lehrstuhl
für Genetik der Technischen Universität München
Diplom in Biologie (Dipl.-Biol.Univ.)
- Feb. 2003 – Okt. 2006 Experimentelle Arbeiten zur vorliegenden Dissertation