

Technische Universität München
Wissenschaftszentrum Weihenstephan
Lehrstuhl für Botanik

Das Biosynthesenetzwerk indolischer Sekundärmetabolite in
Arabidopsis thaliana

Teresa Müller

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: Prof. Dr. Erwin Grill
Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. Erich Glawischnig
2. Prof. Dr. Wilfried Schwab

Die Dissertation wurde am 22.08.2018 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 08.11.2018 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	III
Abbildungsverzeichnis.....	VII
Tabellenverzeichnis.....	X
Abkürzungsverzeichnis.....	XI
Zusammenfassung.....	XIII
Summary.....	XV
1. Einleitung.....	1
1.1. Pflanzensekundärmetabolismus und Biotechnologie.....	1
1.2. Ableitung pflanzlicher Sekundärmetabolite aus dem Primärmetabolismus	3
1.3. Phytoalexine und Phytoanticipine in der Pflanzenabwehr.....	7
Generelle Abwehrstrategien von Pflanzen	7
Phytoalexine und Phytoanticipine	11
Wirkmechanismen von Phytoalexinen gegenüber Pflanzenpathogenen	12
1.4. Die Biosynthese und Regulation von Camalexin und indolischen GSL.....	14
1.5. Cytochrom P450 Enzyme.....	19
1.6. Metabolische Gencluster und Tandemgene	23
1.7. Genome Editing	26
2. Zielsetzung.....	31
3. Material und Methoden	32
3.1. Geräte und Chemikalien.....	32
3.2. Pflanzen und Mikroorganismen	32
3.2.1. Pflanzenanzucht und -handhabung.....	32
Anzucht auf Erde	32
Anzucht auf Agar-Platten (mit/ohne Selektion).....	32
Kreuzung von <i>Arabidopsis thaliana</i>	33
Pflanzentransformation (<i>floral dip</i>)	33
Induktion der Phytoalexinbiosynthese.....	34
3.2.2. <i>Botrytis cinerea</i> – Anzucht und Handhabung	34

Anzucht	34
Herstellung und Verwendung der Sporensuspension	35
3.2.3. Bakterienanzucht und Handhabung (<i>E. coli</i> und Agrobakterien)	36
Herstellung und Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	37
Herstellung und Transformation elektrokompetenter Agrobakterien.....	38
3.3. Molekularbiologische Methoden	38
3.3.1. DNA-Methoden.....	38
Extraktion genomischer DNA aus <i>Arabidopsis</i>	38
Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	39
Quantitative real time-PCR (RT-qPCR).....	40
DNA-Agarosegelelektrophorese	43
Klonierung in pGEMt-Easy.....	43
CRISPR/Cas9 Kloniersystem	44
Plasmidpreparation aus <i>E. coli</i>	45
Reinigung und Aufkonzentration von DNA.....	45
DNA-Konzentrationsbestimmung.....	46
Restriktionsverdau von DNA.....	46
Sequenzierung	46
3.3.2. RNA-Methoden.....	47
Extraktion und Konzentrationsbestimmung.....	47
Reverse Transkription.....	47
3.4. Analytische Methoden	47
Metabolitextraktionen aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	47
Camalexinquantifizierung mittels HPLC/UV und Fluoreszenzdetektor	48
Metabolitanalyse mittels LC/MS.....	49
3.5. Software, Online-Tools und Datenbanken.....	49
4. Ergebnisse	50
4.1. Datenbankstudien zur Expression von <i>CYP71A12</i> , <i>CYP71A13</i> , <i>CYP71A18</i> , <i>CYP71B6</i> , <i>CYP71B15</i> und <i>AAO1</i> ,.....	50
4.1.1. Konstitutives Expressionsmuster in der Pflanze.....	50

4.1.2.	Reaktion auf äußere Reize und Koexpression	51
4.2.	Charakterisierung von CYP71A12 mit Hilfe von <i>cyp71a12/a13</i> -Doppelmutanten ...	54
4.2.1.	Die Einzelmutanten von <i>CYP71A12</i> und <i>CYP71A13</i>	54
4.2.2.	Generierung der <i>cyp71a12/a13</i> -Doppelmutante	56
4.2.3.	Phänotypisierung der <i>cyp71a12/a13</i> -Doppelmutante.....	60
	Der Camalexinphänotyp der Doppelmutante nach abiotischer Stressinduktion.....	60
	Komplementierung der Camalexindefizienz der Doppelmutante	61
	Analyse der IAOx-abhängigen Metabolite	62
4.3.	Der Camalexinphänotyp der Einzelmutante von <i>CYP71A18</i> und Mehrfachmutanten von <i>CYP71A12</i> , <i>CYP71A13</i> und <i>CYP71A18</i>	67
4.4.	Die Anfälligkeit der <i>CYP71A</i> -Mutanten gegenüber dem Pathogen <i>Botrytis cinerea</i>	68
4.4.1.	Der Camalexinphänotyp nach <i>B.c.</i> -Infektion.....	69
4.4.2.	Empfindlichkeit der <i>CYP71A</i> -Mutanten gegenüber <i>B.c.</i>	70
4.5.	Der metabolische Phänotyp von Mehrfachmutanten der Gene <i>CYP71A12</i> , <i>CYP71A13</i> , <i>CYP71B6</i> und <i>AAO1</i>	73
4.5.1.	Zielgerichtete Metabolitanalyse	74
	Absolute Camalexinquantifizierung	74
	Analyse IAOx-abhängiger Metabolite.....	75
4.5.2.	Nicht-zielgerichtete Analyse der <i>AAO1</i> -Mutanten.....	85
4.6.	Das <i>CYP71B</i> -Cluster auf Chromosom 3 von <i>Arabidopsis thaliana</i>	88
4.6.1.	Expression des <i>CYP71B</i> -Clusters	88
4.6.2.	Zielgerichtete Deletion des <i>CYP71B</i> -Clusters mittels Werkzeugen des <i>Genome Editings</i>	90
4.6.3.	Metabolische Untersuchung der Clusterdeletionsmutanten	94
4.6.4.	Auskreuzung des CRISPR/Cas9-Konstruktes mit dem Wildtyp Col-0.....	97
5.	Diskussion	99
5.1.	Die Synthese IAOx-abhängiger Metabolite	99
	Die <i>cyp71a12/a13</i> -Doppelmutante.....	99
	Der metabolische Phänotyp der <i>CYP71B6/AAO1/CYP71A12/13</i> -Mehrfachmutanten .	101
	<i>CYP71A12</i> und <i>CYP71A13</i> als Weichensteller der Metabolitflüsse	107

Das neue Modell des Netzwerks IAOx-abhängiger Metabolite.....	110
Die möglichen Funktionen von IAN, ICHO, ICOOH und HCN in der Pflanzenabwehr .	112
<i>CYP71A</i> -Mehrfachmutanten und ihre Empfindlichkeit gegenüber <i>Botrytis cinerea</i>	116
5.2. Das <i>CYP71B</i> -Cluster in <i>Arabidopsis thaliana</i>	119
Die Generierung von <i>CYP71B</i> -Clustermutanten und ihre metabolische Analyse	119
Die Funktion des <i>CYP71B</i> -Clusters	121
Der Einsatz der CRISPR/Cas9-Technologie in Pflanzen	122
6. Anhang	XXI
7. Literaturverzeichnis.....	XXXVI
8. Danksagung	LII
9. Lebenslauf.....	LIII
10. Publikationen	LIV

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1 Vom Shikimisäureweg abgeleitete Sekundärmetabolite.....	5
Abbildung 1-2 Strukturformeln einiger im Fließtext erwähnter Sekundärmetabolite unterschiedlicher Strukturklassen.....	6
Abbildung 1-3: Zelluläre und physiologische PTI-Mechanismen.....	9
Abbildung 1-4: Zickzack-Modell der co-evolutionären Pflanzenabwehr.....	10
Abbildung 1-5: Schlüsselschritte der Tryptophanbiosynthese und Spektrum IAOx-abhängiger Metabolite in <i>Arabidopsis thaliana</i>	15
Abbildung 1-6 Die Camalexinbiosynthese ausgehend von Tryptophan.....	16
Abbildung 1-7: Myrosinase-abhängige GSL-Abbauprodukte.....	18
Abbildung 1-8 Auf Proteinsequenzhomologien basierender phylogenetischer Baum der CYP-Familien CYP71A, CYP71B, CYP79B, CYP81F, CYP82C, CYP83A und CYP83B.....	20
Abbildung 1-9 Der Cytochrom P450- Redoxzyklus.....	22
Abbildung 1-10: Schematische Darstellung eines TALEN-Paares.....	27
Abbildung 1-11: Vereinfachtes Schema des CRISPR/Cas9-Systems.....	29
Abbildung 3-1 DNA-Größenmarker.....	43
Abbildung 4-1 Relative Expression von <i>CYP71A12</i> (A) und <i>CYP71A13</i> (B) im Wildtyp (Col-0) und den <i>Knock-out</i> -Linien <i>cyp71a13-1</i> (hier: <i>a13</i>) bzw. <i>cyp71a12</i> (hier: <i>a12</i>).....	55
Abbildung 4-2 A: Schema der zielgerichteten Mutagenese mit TALEN-Bindestelle an einer von zwei <i>Bsal</i> -Restriktionssequenzabschnitten in <i>CYP71A12</i> . B: Repräsentativer Agarosegelausschnitt des Amplifikats aus <i>CYP71A12</i> nach Restriktionsverdau mit <i>Bsal</i> einer wildtypischen und einer homozygot mutierten Pflanze.....	56
Abbildung 4-3 Somatische, TALEN-vermittelte Mutationen in <i>CYP71A12</i> in drei Primärtransformanten.....	57
Abbildung 4-4 Exemplarische Sequenzanalysen des <i>CYP71A12</i> -Amplifikates der Linie 3, T2-Generation.....	58
Abbildung 4-5 Sequenzvergleich der <i>cyp71a12 cyp71a13</i> -Mutantenlinien mit dem Wildtyp.....	59
Abbildung 4-6 Absolute Camalexinquantifizierung in Col-0, <i>cyp71a12</i> , <i>cyp71a13-1</i> und den Doppelmutanten <i>cyp71a12a13-1</i> und <i>cyp71a12a13-2</i>	60
Abbildung 4-7 Überexpression von <i>CYP71A12</i> oder <i>CYP71A13</i> in <i>cyp71a12/a13</i> -Doppelmutanten.....	62
Abbildung 4-8 Relative Mediane von in <i>cyp79b2b3</i> detektiertem 6-GlcO-ICOOH, 5-GlcO-ICHO, ICOOGlc, und ICHO im Vergleich zu im Wildtyp Col-0 bestimmten Mengen.....	64
Abbildung 4-9 Metabolitanalyse der <i>cyp71a12/a13</i> -Doppelmutante.....	65
Abbildung 4-10 Camalexinquantifizierung in <i>cyp71a18</i> -Mutanten nach UV- (2+22 h) und Silbernitratinduktion (24 h).....	68

Abbildung 4-11 Camalexinquantifizierung in <i>CYP71A</i> -Mutanten nach Induktion mit <i>Botrytis cinerea</i> (48 h).....	69
Abbildung 4-12 A,B Bonitierungs-system <i>B.c.</i> -infizierter Blätter.....	70
Abbildung 4-13 Läsionsschwere als Anteile der Boniturklassen 1-5 und Krankheitsindices DI verschiedener <i>CYP71A</i> -Mutanten, <i>pad3</i> und <i>cyp79b2b3</i> im Vergleich zum Wildtyp Col-0 nach <i>B.c.</i> -Infektion (72 h).	72
Abbildung 4-14 Absolute Camalexinquantifizierung in Mehrfachmutanten von <i>CYP71A12/A13</i> , <i>CYP71B6</i> und <i>AAO1</i>	74
Abbildung 4-15 Relative Quantifizierung von Camalexin und repräsentativer indolischer GSL (I3M GSL, 4MeO-I3M GSL) in Rosettenblättern des Wildtyps Col-0 und Mutantenlinien	77
Abbildung 4-16 Relative Quantifizierung repräsentativer Indolcarbonsäuren (ICOOH, ICOOMe, ICOOGlc, 6-HO-ICOOGlc) in Rosettenblättern des Wildtyps Col-0 und Mutantenlinien.....	78
Abbildung 4-17 Relative Quantifizierung repräsentativer indolischer Aldehyde (ICHO, 5-GlcO-ICHO, 4-GlcO-ICHO) in Rosettenblättern des Wildtyps Col-0 und Mutantenlinien.....	81
Abbildung 4-18 Korrelationen ausgewählter IAOx-abhängiger Metabolite nach AgNO ₃ - (A-E) und UV-Induktion (F-J).	82
Abbildung 4-19 Hierarchische Clusteranalyse (Heatmap und Dendrogramm) der IAOx-abhängigen Metabolite in Wildtyp und Mutantenlinien	84
Abbildung 4-20 Schnittmenge der in unbehandelten Blättern in zwei <i>aaol</i> -Mutantenlinien reduzierter- (links) beziehungsweise akkumulierter Signale (rechts).....	86
Abbildung 4-21 Schnittmenge der in allen drei Datensätzen AgNO ₃ , Kontrolle und UV in zwei <i>aaol</i> -Mutantenlinien relativ zur Vergleichslinie reduzierter- (A) beziehungsweise akkumulierter Signale (B).	86
Abbildung 4-22 Quantifizierung von 4-Pyridoxinsäure in Wildtyp und Mutantenlinien	87
Abbildung 4-23 Mutationen im <i>CYP71B</i> -Cluster.	91
Abbildung 4-24 Hierarchische Clusteranalyse der nicht-zielgerichteten Metabolitanalyse der <i>CYP71B</i> -Clustermutanten.	95
Abbildung 4-25 Hauptkomponentenanalyse der nicht-zielgerichteten Metabolitanalyse der <i>CYP71B</i> -Clustermutanten.	96
Abbildung 4-26 Analyse einiger <i>CYP71B</i> -Cluster-Mutanten auf eine Clusterinversion.....	97
Abbildung 4-27 PCR-Analyse der homozygoten <i>CYP71B</i> -Cluster-Mutanten AD 20-7-3 x Col-0 -4-89 und AD 20-7-3 x Col-0 -4-93.	98
Abbildung 5-1 3D-Strukturvergleich von 20 <i>in vitro</i> und/oder <i>in vivo</i> bestätigten Aldehydoxidase-Substraten aus verschiedenen Organismen.....	104
Abbildung 5-2 Modell für das Netzwerk IAOx-abhängiger, induzierbarer und konstitutiver Metabolite in <i>Arabidopsis thaliana</i>	111

Abbildung 6-1 Sequenzierung von *CYP71B15* in *cyp71a12 cyp71a13- 1* und *cyp71a12 cyp71a13- 2*.....XXII

Abbildung 6-2 Sequenzierung von *CYP71A18* in *cyp71a12 cyp71a13- 1* und *cyp71a12 cyp71a13- 2*..... XXIV

Abbildung 6-3 CID (*collision-induced dissociation*)-Massenspektrenvergleich XXIX

Abbildung 6-4 Dotierungsexperiment eines Extraktes aus Col-0 (unbehandelt) mit 4-Pyridoxinsäure. XXIX

Abbildung 6-5 Relative Quantifizierung von 4-Pyridoxinsäure in Wildtyp und Mutantenlinien nach Stressorbehandlung..... XXX

Abbildung 6-6 Relative Quantifizierung weiterer IAOx-abhängiger Metabolite in Rosettenblättern des Wildtyps Col-0 und Mutantenlinien nach UV-Behandlung XXXII

Abbildung 6-7 Relative Quantifizierung weiterer IAOx-abhängiger Metabolite in Rosettenblättern des Wildtyps Col-0 und Mutantenlinien nach AgNO₃-Behandlung XXXIII

Abbildung 6-8 Analyse der Primärtansformanten, die beide TALEN-Konstrukte zur Exzision des *CYP71B*-Clusters trugen..... XXXIV

Abbildung 6-9 Der Sequenzvergleich von AD 20-3-8 (PCR Produkt mit den Primern CTCCTCCAAGCCCTCCTAC und CAAGGTCACCCACAATCGTCTT) mit der wildtypischen Sequenz von *Arabidopsis thaliana* (Chromosom 3) XXXIV

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1 Phytoalexine aus verschiedenen Pflanzenfamilien.....	11
Tabelle 3-1 Antibiotika und weitere Substanzen für die selektive Bakterien- und Pflanzenanzucht.....	36
Tabelle 3-2 Zusammensetzung der PCR-Reaktionsansätze für verschiedene Polymerasen	40
Tabelle 3-3 Temperaturprogramme für PCR-Reaktionen mit verschiedenen Polymerasen ..	40
Tabelle 3-4: Reaktionsansatz für die RT-qPCR	40
Tabelle 3-5 Temperaturprogramm für die RT-qPCR mit Schmelzkurvenanalyse	41
Tabelle 3-6 Funktionsbeschreibung, Namen und Sequenzen (5´->3´) verwendeter Primer. .	41
Tabelle 3-7 Zielsequenzen A-D (fett und kursiv hervorgehoben) und Oligonukleotide zur Klonierung der CRISPR/Cas9 Konstrukte.....	44
Tabelle 3-8 Liste der verwendeten Plasmide.	45
Tabelle 3-9 Reaktionsansatz für einen Restriktionsverdau mit zwei Nukleasen.....	46
Tabelle 3-10 Reaktionsansatz für die cDNA-Synthese	47
Tabelle 3-11 Übersicht über Software, Online-Tools und Datenbanken.....	49
Tabelle 4-1 Liste der Top 10 mit <i>CYP71A13</i> koexprimierten CYPs bzw. unter Stressbedingungen koexprimierten Gene.....	52
Tabelle 4-2 Analytische Daten von 20 Indolverbindungen.	63
Tabelle 4-3 Übersicht über die 25 Gene des <i>CYP71B</i> -Genclusters und deren Expressionsmuster in <i>Arabidopsis thaliana</i>	89
Tabelle 4-4 Mutationsraten der mit CRISPR/Cas9 und TALEN generierten <i>CYP71B</i> -Cluster-Exzisionsmutanten in der T2- und T3-Generation.....	93
Tabelle 6-1 Relative Quantifizierung indolischer Verbindungen in den Blättern AgNO ₃ -behandelter Wildtyp und Mutantepflanzen.....	XXV
Tabelle 6-2 Relative Quantifizierung indolischer Verbindungen in den Blättern mit Wasser behandelter Wildtyp und Mutantepflanzen (<i>mock</i>).	XXVI
Tabelle 6-3 Relative Quantifizierung indolischer Verbindungen in den Blättern UV-Licht-behandelter Wildtyp und Mutantepflanzen.....	XXVII
Tabelle 6-4 Relative Quantifizierung indolischer Verbindungen in den Blättern unbehandelter Wildtyp und Mutantepflanzen (Kontrolle).	XXVIII
Tabelle 6-5 Analytische Daten weiterer indolischer Metabolite und 4-Pyridoxinsäure	XXVIII
Tabelle 6-6 Relative Mediane der Peakflächen (bezogen auf Col-0) von 20 IAOx-abhängigen Metaboliten und Trp in Wildtyp und Mutantenlinien	XXXI

Abkürzungsverzeichnis

ABA	Abscisinsäure	G3P	Glycerinaldehyd-3-Phosphat
ACC	1-Aminocyclopropan-1-Carbonsäure	Gent	Gentamycin
ADCS	Aminodeoxychorismatsynthase	GSH	Glutathion
Amp	Ampicillin	GSL	Glucosinolat
ANOVA	<i>analysis of variance</i>	HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
AO	Aldehydoxidase	HR	hypersensitive response
AS	Aminosäure	Hyg	Hygromycin
AS	Anthranilatsynthase	I3C	Indol-3-Carbinol
<i>B.c.</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	I3M	Glucobrassicin
BCTV	beet curly top virus	IAAld	Indol-3-Acetaldehyd
bp	<i>base pair</i>	IAN	Indol-3-Acetonitril
CAPS	<i>cleaved-amplified polymorphic sequence</i>	IAOx	Indol-3-Aldoxim
CAS	Cyanolanilinsynthase	IC ₅₀	halbmaximale inhibitorische Konzentration
cDNA	complementary DNA	ICHO	Indol-3-Carbaldehyd
CDPK	<i>calcium-dependent protein kinases</i> ,	ICOOH	Indol-3-Carbonsäure
CdRP	1-(<i>o</i> -Carboxyphenylamino)-1-desoxyribose-5-phosphat	ICS	Isochorismatsynthase
CID	<i>collision-induced dissociation</i>	IGPS	Indol-3-Glycerolphosphat-Synthase
CM	Chorismatmutase	IPTG	Isopropyl- β -D-thio-galactopyranosid
CoA	Coenzym A	ITC	Isothiocyanat
Cp	<i>Crossing point</i>	JA	Jasmonsäure
CRISPR	<i>clustered regularly interspaced palindromic repeats</i>	Kan	Kanamycin
CYP	Cytochrom P450 Monooxygenase	LB	<i>Left border</i>
DAMP	<i>damage-associated molecular patterns</i>	lncRNA	<i>Long non-coding RNA</i>
DGK	Diacylglycerolkinase	LOQ	<i>Limit of quantification</i>
DHCA	Dihydrocamalexinsäure	<i>M.p.</i>	<i>Myzus persicae</i>
DI	<i>Disease Index</i>	MAMP	<i>microbe-associated molecular patterns</i>
DIBOA	2,4-Dihydroxy-1,4-Benzoxazin-3-on	MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
DIMBOA	2,4-Dihydroxy-7-Methoxy-1,4-Benzoxazin-3-on	MEP	Methylethritolphosphatweg
DNA	Desoxyribonukleinsäure	MIC	<i>minimum inhibitory concentration</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat	MOPS	3-(<i>N</i> -Morpholino)propansulfon-säure
DSB	Doppelstrangbruch	MR	<i>mutual rank</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	mRNA	<i>messenger RNA</i>
EI	Elicitor	MS	Massenspektrometrie
ER	endoplasmatisches Retikulum	MS	Murashige & Skoog
ESI	Elektrosprayionisation	MW	arithmetisches Mittel
ESP	<i>epithiospecifier protein</i>	NADPH	Nicotinamadenindinukleotidphosphat
ET	Ethylen	NCI	National Cancer Institute
ETI	<i>effector-triggered immunity</i>	NEB	New England Biolabs
FG	Frischgewicht	NHEJ	<i>non-homologous end joining</i>
flg22	Flagellin 22	NSP	<i>nitrile-specifier protein</i>
FR	flankierende Region	OD	Optische Dichte

Abkürzungsverzeichnis

ORF	<i>open reading frame</i>	ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
Os	osmotischer Stress	RT-qPCR	quantitative <i>real time</i> Polymerasekettenreaktion
<i>P.i.</i>	<i>Phytophthora infestans</i>	RVD	<i>repeat variable diresidue</i>
<i>P.s.</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>	SA	Salicylsäure
PA	Phosphatidsäure	SD	Standardabweichung
PAL	4-Pyridoxal	sgRNA	single guide RNA
PAM	<i>protospacer adjacent motif</i>	SP	<i>specifier protein</i>
PAMP	<i>pathogen associated molecular patterns</i>	Sz	Salzstress
PD	Plasmodesmata	TALEN	<i>transcription activator-like effector nucleases</i>
PEP	Phosphoenolpyruvat	T-DNA	transferierte DNA
PL	Phospholipase	Tet	Tetracyclin
PLP	Pyridoxal-5-phosphat	TF	Tanskriptionsfaktor
POR	NADPH abhängigen P450 Oxidoreduktase	TFP	<i>thiocyanate-forming protein</i>
PPT	Phosphinotricin	TG	Trockengewicht
PRR	<i>Pattern Recognition Receptors</i>	Tkn	Trockenstress
PTI	<i>PAMP-triggered immunity</i>	UPLC	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i>
Q-TOF	<i>quadropole-time of flight</i>	USA	Vereinigte Staaten von Amerika
R	Pearson Korrelationskoeffizient	USDA	U.S. Department of Agriculture
Rif	Rifampicin	UV	ultraviolett
RLCK	<i>receptor-like cytoplasmic kinases</i>	X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galacto- pyranosid
RLP	<i>receptor-like proteins</i>	ZNF	Zink-Finger Nuklease

Zusammenfassung

Brassicaceae produzieren ausgehend von der Aminosäure Tryptophan eine Reihe an bioaktiven Sekundärmetaboliten. Neben den indolischen Glucosinolaten spielen Phytoalexine, wie beispielsweise Camalexin aus der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana*, eine wichtige Rolle in der pflanzlichen Abwehr. Zudem reichern sich nach Pathogeninfektion weitere Indolverbindungen wie z.B. Indol-3-carbonsäuren (ICOOH) an. Diese Arbeit analysiert das Biosynthesenetzwerk dieser Sekundärmetabolite in *Arabidopsis thaliana* mittels Einzel- und Mehrfachmutanten beteiligter Gene.

Im Fokus stehen insbesondere die Tandemgene *CYP71A12* und *CYP71A13*. Beide Cytochrom P450 Monooxygenasen (CYPs) katalysieren die Bildung der Camalexin-Vorstufe Indol-3-acetonitril (IAN) aus Indol-3-acetaldoxim (IAOx). Mittels TALE-Nukleasen wurden *cyp71a12/a13*-Doppelmutanten generiert. Diese bildeten, im Gegensatz zum Wildtyp, nur noch Spuren an Camalexin und unterschieden sich damit auch signifikant von der nicht vollständig camalexindefizienten *cyp71a13*-Einzelmutante. Für *CYP71A12* konnte neben einer Beteiligung an der Camalexinsynthese zudem ein deutlicher Einfluss auf die Biosynthese der Indolcarbonsäurederivate gezeigt werden. Durch Kreuzung wurden Mehrfachmutanten von *cyp71a12/a13* und den putativen ICOOH-Synthesegenen *CYP71B6* und *Aldehydoxidase 1 (AAO1)* generiert. Die Metabolitanalyse dieser Linien zeigte eine klare Abhängigkeit der Indol-3-carbonsäuren von *CYP71B6*, nicht aber von *AAO1*. Als *in-vivo*-Substrate der *AAO1* wurden der hydroxylierte Indol-3-aldehyd 5-OH-ICHO und auch das B₆-Vitamin Pyridoxal identifiziert. Basierend auf der Analyse der verschiedenen Mehrfachmutanten wurde ein neues Modell des Biosynthesenetzwerks IAOx-abhängiger Metabolite entwickelt.

Des Weiteren wurde die Funktion von *CYP71A18*, das eine hohe Sequenzhomologie zu *CYP71A12* und *CYP71A13* aufweist, mittels *CYP71A*-Doppel- und -Trippelmutanten untersucht. Im Blattgewebe hatte *CYP71A18* keinen Einfluss auf die Camalexinbiosynthese und war für die Abwehrfähigkeit von *Arabidopsis thaliana* gegenüber dem Pathogen *Botrytis cinerea* nicht relevant. Die Mehrfachmutanten stehen nun zur Untersuchung potentiell variierender Funktionen der *CYP71As* in unterschiedlichen Pflanzengewebe wie etwa Blüten oder Wurzeln zur Verfügung.

Um die mögliche Rolle von 18 *CYP71Bs*, die in einem 83 kb großen Gencluster gruppiert sind, im Sekundärmetabolismus von *Arabidopsis thaliana* zu analysieren, wurden mittels der CRISPR/Cas9-Technologie Exzisionsmutanten des gesamten Genomabschnittes generiert. Die im Cluster lokalisierten *CYP71B20*, *CYP71B23* und *CYP71B26* werden aufgrund von *in-vitro*- und *in-silico*-Analysen mit verschiedenen indolischen Abwehrstoffen assoziiert. Erste

Metabolitanalysen ungestresster Pflanzen zeigten überraschender Weise jedoch keine Unterschiede zwischen Cluster-Mutanten und dem Wildtyp.

Summary

Cruciferous plants synthesize a wide range of tryptophan-derived bioactive metabolites. In addition to indole glucosinolates, phytoalexins, such as camalexin of the model plant *Arabidopsis thaliana*, play an important role in plant defence. Furthermore, other indoles like indole-3-carboxylic acids (ICOOH) accumulate in response to pathogen infection. This work analyses the biosynthetic network of these secondary metabolites by phenotyping multiple mutants of genes involved.

Two closely related cytochrome P450 monooxygenases, CYP71A12 and CYP71A13, catalyse the formation of the camalexin-precursor indole-3-acetonitrile (IAN) from indole-3-acetaldoxime (IAOx). Double knockout lines of these tandem genes were created using TALE-nucleases. Unlike the wild type, these mutants synthesized only traces of camalexin, significantly less than the partly camalexin deficient *cyp71a13* mutant. Thus, CYP71A12 contributes to the camalexin biosynthesis in leaf tissue. Mutant analysis also revealed a substantial role of CYP71A12 in the formation of ICOOH derivatives. Multiple knockout mutants of *cyp71a12/a13* and the putative ICOOH-biosynthetic genes *CYP71B6* and *Aldehyde Oxidase 1 (AAO1)* were generated. The phenotyping of those lines showed a clear dependency of ICOOH synthesis on *CYP71B6*, but not on *AAO1*. Instead, the hydroxylated indole-3-aldehyde 5-OH-ICHO and the B₆-vitamer pyridoxal were identified as *in vivo* substrates of *AAO1*. Based on these mutant analyses, a new model of the biosynthetic network of IAOx-dependent metabolites was proposed.

In addition, the function of CYP71A18, which shares high sequence similarity with CYP71A12 and CYP71A13, was investigated using corresponding double and triple mutants. In leaves, CYP71A18 was not involved in camalexin biosynthesis and did not contribute to the defence against the pathogen *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis*. The multiple *CYP71A* mutants can now be used for the analysis of the function of these genes in plant tissues other than leaves, such as flower or root.

18 *CYP71Bs* are localized in a 83 kb gene cluster. To explore their potential role in *Arabidopsis thaliana* secondary metabolism, deletion mutants of the whole DNA segment were created applying CRISPR/Cas9 technology. Based on *in vitro* and *in silico* analyses, the cluster genes *CYP71B20*, *CYP71B23* and *CYP71B26* are associated with several indolic defence molecules. However, a preliminary analysis of untreated rosette leaves surprisingly did not show any metabolic differences between mutant and wild type samples.

1. Einleitung

1.1. Pflanzensekundärmetabolismus und Biotechnologie

Pflanzenteile und Pflanzenextrakte werden bis heute in allen Teilen der Welt aufgrund ihrer leichten Zugänglichkeit oder als Bestandteil des lokalen Brauchtums in der traditionellen Medizin zu therapeutischen Zwecken eingesetzt. Die World Health Organisation schätzte in ihrem Strategiedossier zur traditionellen Medizin zu Beginn der 2000er Jahre den Anteil solcher Medikationen noch auf 80 % aller Behandlungen auf dem afrikanischen Kontinent (World Health Organization, 2002). Pflanzenextrakte oder isolierte Pflanzeninhaltsstoffe spielten oder spielen zudem im konventionellen und ökologischen Pflanzenschutz, insbesondere gegen Fraßfeinde, eine wichtige Rolle. Das Alkaloid Nikotin aus der Tabakpflanze (*Nicotiana tabacum*) wurde bis in die 1970er Jahre kommerziell als Insektizid beispielsweise im Weinbau oder im Zierpflanzenbereich eingesetzt. Extrakte des Neembaums (*Azadiracta indica*) und die darin enthaltenen Azadirachtine sind wirksam gegen Insekten und Pilzkrankungen und kommerziell als Pflanzenschutzmittel erhältlich (Duke et al., 2010; Paul und Sharma, 2002). Die physiologische Wirkung solcher Pflanzenextrakte auf Mensch, Insekt oder Schimmelpilz ist zumeist auf deren sekundäre Inhaltsstoffe zurückzuführen. Sekundärmetabolite wurden lange als Neben- oder gar Abfallprodukte der Pflanzen gedeutet, da sie nicht essentiell für Wachstum und Entwicklung (Primärmetabolismus) sind und scheinbar ohne erkennbare Funktion vom Primärmetabolismus der Pflanze ausgehend synthetisiert werden. Spätestens seit den 1980er und 1990er Jahren setzt sich jedoch die Erkenntnis durch, dass Sekundärmetabolite tragend an der Interaktion der Pflanze mit ihrer Umwelt beteiligt sind und so entscheidend für das Überleben des Organismus sein können. In diesem Kontext erfüllen Sekundärmetabolite verschiedenste Aufgaben. Beispielsweise schützen sie die Zellen vor energiereicher Strahlung, oxidativem Stress oder dienen als Signalstoffe oder als Repellentien gegen Schadorganismen (zusammengefasst in Hartmann, 1996).

Aufgrund ihrer physiologischen Wirkung in Mensch und Tier dienen zahlreiche Sekundärmetabolite als Arzneistoffe oder als Basis für die synthetische Arzneistoffentwicklung. Das gegen Pflanzenpathogene wirksame Diterpenoid Taxol (Struktur siehe Abbildung 1-2) aus der Rinde der pazifischen Eibe (*Taxus brevifolia*) wurde in den 1960er Jahren in einem gemeinsamen Naturstoff-*screening* Projekt des National Cancer Institute (NCI) und des U.S. Department of Agriculture (USDA) als wirksames Zytostatikum identifiziert und wird, wie auch halbsynthetisch gewonnene Taxane (beispielsweise Docetaxel), als Chemotherapeutikum eingesetzt (Unger et al., 2015; Wagner und Flores, 1994; Weaver, 2014). Im Zuge der Entwicklung sogenannter Funktioneller Lebensmittel gerieten auch ernährungsrelevante

sekundäre Naturstoffe in den Fokus biotechnologischer Bemühungen. So gelang es beispielsweise der Gruppe um Cathie Martin, antioxidativ wirksame Anthocyane in physiologisch relevanten Mengen in Tomaten anzureichern, indem sie die Transkriptionsfaktoren der Anthocyaninsynthese unter dem fruchtspezifischen Promotor E8 in der Tomate exprimierten (Butelli et al., 2008).

Doch nicht jeder Versuch, pflanzliche Sekundärmetabolite in lebens- oder futtermittelliefernden Pflanzen anzureichern, ob nun aus Ernährungs- oder Pflanzenschutzgründen, kann so elegant gelöst werden. Besonders aufwendig kann es werden, fremde Biosynthesewege in andere Organismen einzuführen. Als Meilenstein der Biotechnologie galt die Entwicklung des *Golden Rice*, einer transgenen Reissorte, die durch die Einführung einer Phytoensynthase aus der gelben Narzisse (*Narcissus pseudonarcissus*) und einer Carotindesaturase aus dem Bodenbakterium *Erwinia uredovora* Lycopin im Endosperm anreichert, welches dann endogen zu dem Vitamin A Vorläufer β -Carotin umgewandelt wird. Dieser Reis kann, insbesondere bei Mangelernährung, als effektive Vitamin A-Quelle für den Menschen dienen (Tang et al., 2009; Ye et al., 2000). Der erfolgreiche und stofflich ergiebige Transfer eines Biosyntheseweges in einen anderen Organismus (heterologe Expression) ist jedoch oft mit mehreren Fallstricken verbunden und erfordert detaillierte Kenntnis des jeweiligen Syntheseablaufs.

Eine stabile Genexpression, gegebenenfalls nach Codon- oder Promotoroptimierung, die Verwendung eventueller Orthologe, die ausreichende Bereitstellung und Regeneration von Vorstufenmolekülen und Kofaktoren sowie die Kontrolle des gesamten metabolischen Flusses unter Vermeidung von toxischen Intermediaten und der Unterdrückung eventueller Nebensynthesewege sind nur einige der zu nennenden Herausforderungen (Brugliera et al., 2013; Gavira et al., 2013; Goodman et al., 2013; Janocha und Bernhardt, 2013; Lee et al., 2013; Paddon et al., 2013; Tanaka und Brugliera, 2013). Ein reibungsloser metabolischer Fluss war auch die Voraussetzung für die Entwicklung der ökonomisch effektiven semisynthetischen Gewinnung des Malariamedikaments Artemisinin (Struktur siehe Abbildung 1-2). Das zentrale Enzym bei der Synthese des ursprünglich aus dem Einjährigen Beifuß (*Artemisia annua*) isolierten Sesquiterpens ist die multifunktionelle Cytochrom P450 Monooxygenase (CYP) CYP71AV1. Erst durch Herabregulierung konkurrierender Synthesewege sowie der Koexpression einer geeigneten NADPH-abhängigen P450 Oxidoreduktase (POR), von Cytochrom b5 sowie einer Artemisin-Aldehyddehydrogenase und -Alkoholdehydrogenase (alle aus *A. annua*) war die quantitativ zufriedenstellende Darstellung an Artemisininsäure in Hefe möglich. Diese Vorstufe wird dann in einem finalen photochemischen Oxidationsschritt zum Wirkstoff Artemisinin umgesetzt (Paddon et al., 2013).

Um die grundlegenden Prinzipien von kompliziert verzweigten Biosynthesewegen, fein regulierten Metabolitflüssen und Dynamiken des Sekundärmetabolismus zu verstehen, bietet sich die Nutzung von Modellpflanzen wie die etablierte Ackerschmalwand *Arabidopsis thaliana* an. Diese *Brassicaceae* produziert neben zahlreichen Vertretern unterschiedlicher Sekundärmetabolitklassen, welche im nächsten Kapitel näher vorgestellt werden, vor allem auch die für ihre Gattung typischen aliphatischen und indolischen Glucosinolate (GSL) sowie das Phytoalexin Camalexin, das von der Pflanze im Rahmen einer Stressantwort synthetisiert wird. Die Vernetzung der Biosynthesewege dieser und weiterer von der Aminosäure Tryptophan abgeleiteten indolischen Sekundärmetabolite ist das zentrale Thema dieser Arbeit.

1.2. Ableitung pflanzlicher Sekundärmetabolite aus dem Primärmetabolismus

Pflanzen produzieren eine große Bandbreite an sogenannten Sekundärmetaboliten, die chemisch zwar völlig unterschiedlich sein können, sich aber nur von wenigen verschiedenen primären Synthesewegen bzw. Primärmetaboliten ableiten. Der folgende Abschnitt gibt einen Überblick über einige wichtige Strukturklassen pflanzlicher Sekundärstoffe und ihren jeweiligen Ursprung im Primärmetabolismus.

Isoprenoide wie Carotinoide, Mono-, Di- oder Sesquiterpene leiten sich alle vom selben C5-Grundbaustein, dem Isopentenylpyrophosphat, ab. Diese reaktive Verbindung kann in Pflanzen entweder zytosolisch über den Mevalonatweg aus AcetylCoA oder in den Plastiden über den Methylerythritolphosphatweg (MEP) aus den Vorstufen Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-phosphat (G3P) synthetisiert werden (Cheng et al., 2007). AcetylCoA ist ein Intermediat des Citratzyklusses und der Fettsäurebiosynthese, Pyruvat und G3P sind Metabolite der Glykolyse und Grundbausteine für die Biosynthese verschiedener Aminosäuren. Die Abgrenzung zwischen Primär- und Sekundärstoffen ist jedoch nicht immer klar zu ziehen. Gerade unter den Terpenen gibt es einige Verbindungen, die Sekundärstoffwechselwegen entstammen, aber primäre Funktionen erfüllen, also für die Pflanze essentiell für Wachstum und Entwicklung geworden sind. Die Phytohormone Gibberellinsäure (Diterpenoid), Abscicinäure (Sesquiterpenoid) oder die Brassinosteroide (Triterpenoide) sind Beispiele dieser Rekrutierung von Sekundärstoffen in Primärfunktionen (Hartmann, 2007). Die meisten Terpene sind jedoch Sekundärmetabolite im klassischen Sinne. Isopren sowie verschiedene meist volatile Monoterpene wie Pinene, Terpinene, Limonen (Struktur siehe Abbildung 1-2), Linalool oder Myrcen werden in großen Mengen von Pflanzen emittiert (Rasulov et al., 2016). Die Art und Funktion dieser Substanzen variiert hierbei sowohl zwischen verschiedenen Pflanzenfamilien als auch innerhalb der Pflanze anhängig vom jeweiligen Pflanzenorgan. In den Blüten können sie zur Anlockung von pollinierenden Insekten dienen, was der Reproduktion der Pflanzen zuträglich ist. In Blättern und Spross werden sie teilweise konstitutiv, teilweise induzierbar, gebildet und emittiert, aber

auch in Harzkanälen oder Öldrüsen akkumuliert. Bei Beschädigung solcher Speicherkompartimente werden die ätherischen Öle freigesetzt und halten Fraßfeinde ab, beziehungsweise verhindern den Eintritt von Pathogenen in das verletzte Gewebe (Mithofer und Boland, 2012; Schiestl, 2010). Auch in der Rhizosphäre setzt die Pflanze Terpene frei, wie α -Pinen, Linalool oder das Sesquiterpen β -Caryophyllen, die potentiell an der Interaktion der Pflanze mit Fraßfeinden, pathogenen Mikroorganismen oder Symbionten beteiligt sind (Asensio et al., 2012; Rasmann et al., 2005).

Eine weitere große Strukturunterklasse (mehrere tausend Strukturen sind bekannt) der Terpenoide bilden die Iridoide (Struktur des Iridoids Aucubin siehe Abbildung 1-2). Es handelt sich um bityclicke Monoterpene, die von über 50 Pflanzenfamilien, darunter *Apocynaceae*, *Lamiaceae*, *Loganiaceae*, *Rubiaceae* und *Verbenaceae* sowie in einigen Insektenarten, gebildet werden und in der Regel als Glykoside vorliegen. Die jeweiligen Aglukone haben zum Teil antiinflammatorische, aber auch antimikrobielle Eigenschaften. Zudem sind einige Iridoide als Fraßgifte wirksam und so neben ihrer Rolle in der Pathogenabwehr wichtig für die Insektenabwehr der Pflanze (Davini et al., 1986; Dinda et al., 2011; Heffels et al., 2016; Rosa et al., 2008; Viljoen et al., 2012).

Eine weitere, kaum überschaubare Gruppe an Sekundärmetaboliten sind die Phenole. Sie umfassen Substanzen wie Flavonole, Anthocyane (Struktur von Cyanidin siehe Abbildung 1-2), Stilbene, Betalaine, einige cyanogene Glukoside wie Amygdalin, Prunasin oder Dhurrin (Struktur siehe Abbildung 1-2) und die Biopolymere Suberin und Lignin (repräsentative Strukturen siehe Abbildung 1-2). Sie alle leiten sich von den aromatischen Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin ab, welche in Pflanzen, Bakterien und Pilzen über den Shikimisäureweg gebildet werden. Ausgangsstoffe ihrer Biosynthese sind die Primärmetabolite Phosphoenolpyruvat (PEP), ein Stoffwechselzwischenprodukt der Glykolyse, und Erythrose-4-Phosphat, das während des Pentosephosphatwegs entsteht. Über mehrere Zwischenstufen entsteht Shikimat und daraus das Chorismat. Von Chorismat aus leiten sich wiederum die drei aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Phenylalanin und Tyrosin ab. Einen Überblick über die vom Shikimisäureweg abgeleiteten Sekundärmetabolite in Pflanzen gibt Abbildung 1-1.

Auch einige Alkaloide gehen aus dem Shikimisäureweg hervor, wie beispielsweise die Tryptamine (aus Tryptophan) oder der tricyclische Mitosehemmstoff Colchicin (Struktur siehe Abbildung 1-2), der erstmals aus den Samen der Herbstzeitlose (*Colchicum autumnale*) isoliert wurde, und dessen biosynthetische Vorstufen Phenylalanin und Tyrosin sind (Leete, 1963). Auch Opioide wie das Morphin leiten sich vom Shikimisäureweg ab. Hier ist die Vorstufe Tyrosin (Kirby, 1967). Andere Alkaloide, wie z.B. die Steroidalkaloide der Nachtschattengewächse (*Solanaceae*) beruhen wiederum auf der Terpenbiosynthese.

Einleitung

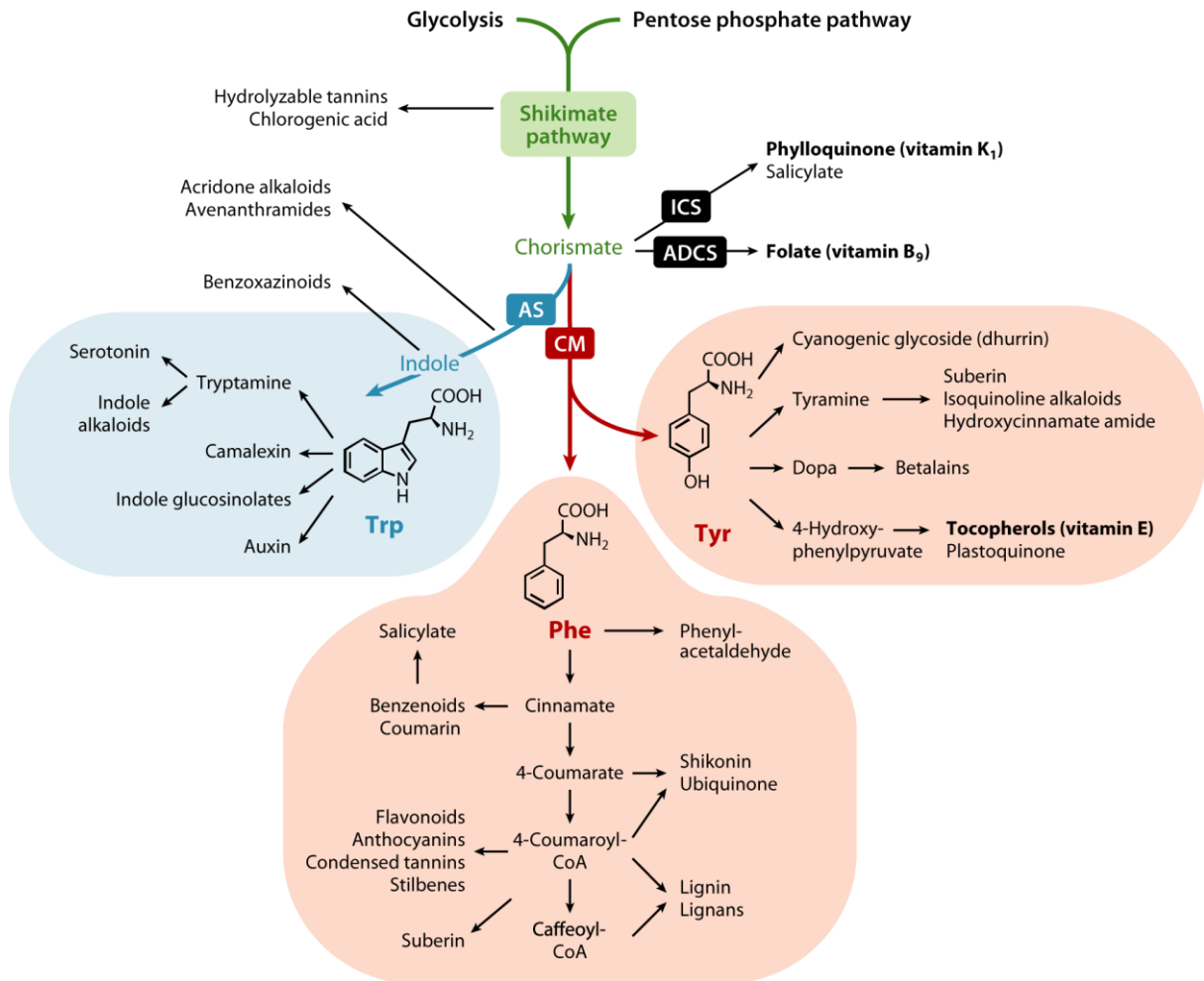


Abbildung 1-1 Vom Shikimisäureweg abgeleitete Sekundärmetabolite. Aus den aromatischen Aminosäuren Tryptophan (blau unterlegt), Tyrosin und Phenylalanin (hellrot unterlegt) leiten sich zahlreiche Sekundärstoffe ab. Die vom Chorismat ausgehenden Synthesewege von Folsäure, Phyllochinon und Salicylsäure sind ebenso dargestellt. Phylochinon, Folsäure und Tocopherol sind für die humane Ernährung essentiell (fett). ADCS: Aminodeoxychorismatsynthase; AS: Anthranilatsynthase; CM, Chorismatmutase; CoA: Coenzym A; ICS: Isochorismatsynthase. Abbildung entnommen aus Maeda und Dudareva (2012).

Indolische Sekundärmetabolite sind Derivate der Aminosäure Tryptophan oder leiten sich von einer seiner indolischen Vorstufen Indol-3-Glycerolphosphat oder Indol ab. Die Biosynthese der Benzoxazinoide beginnt mit der Bildung von Indol aus Indol-3-Glycerolphosphat durch BX1, einer Indol-3-Glycerolphosphatlyase, gefolgt von der Oxidation von Indol zu Indolin-2-on durch CYP71C4 (BX2). Die Endprodukte DIBOA (2,4-Dihydroxy-1,4-Benzoxazin-3-on) und sein C-7-Methoxyderivat DIMBOA (2,4-Dihydroxy-7-Methoxy-1,4-Benzoxazin-3-on, Struktur siehe Abbildung 1-2) liegen in glykosilierter Form in der Vakuole vor (Frey et al., 1997; Frey et al., 2009). Diese Verbindungen werden konstitutiv insbesondere in Süßgräsern (*Poaceae*), darunter die wichtigen Nutzpflanzen Mais (*Zea mays*), Weizen (*Triticum aestivum*), und Roggen (*Secale cereale*), synthetisiert und sind wirksam gegen Fraßfeinde oder Pflanzenpathogene (Guo et al., 2016; Yue et al., 1998).

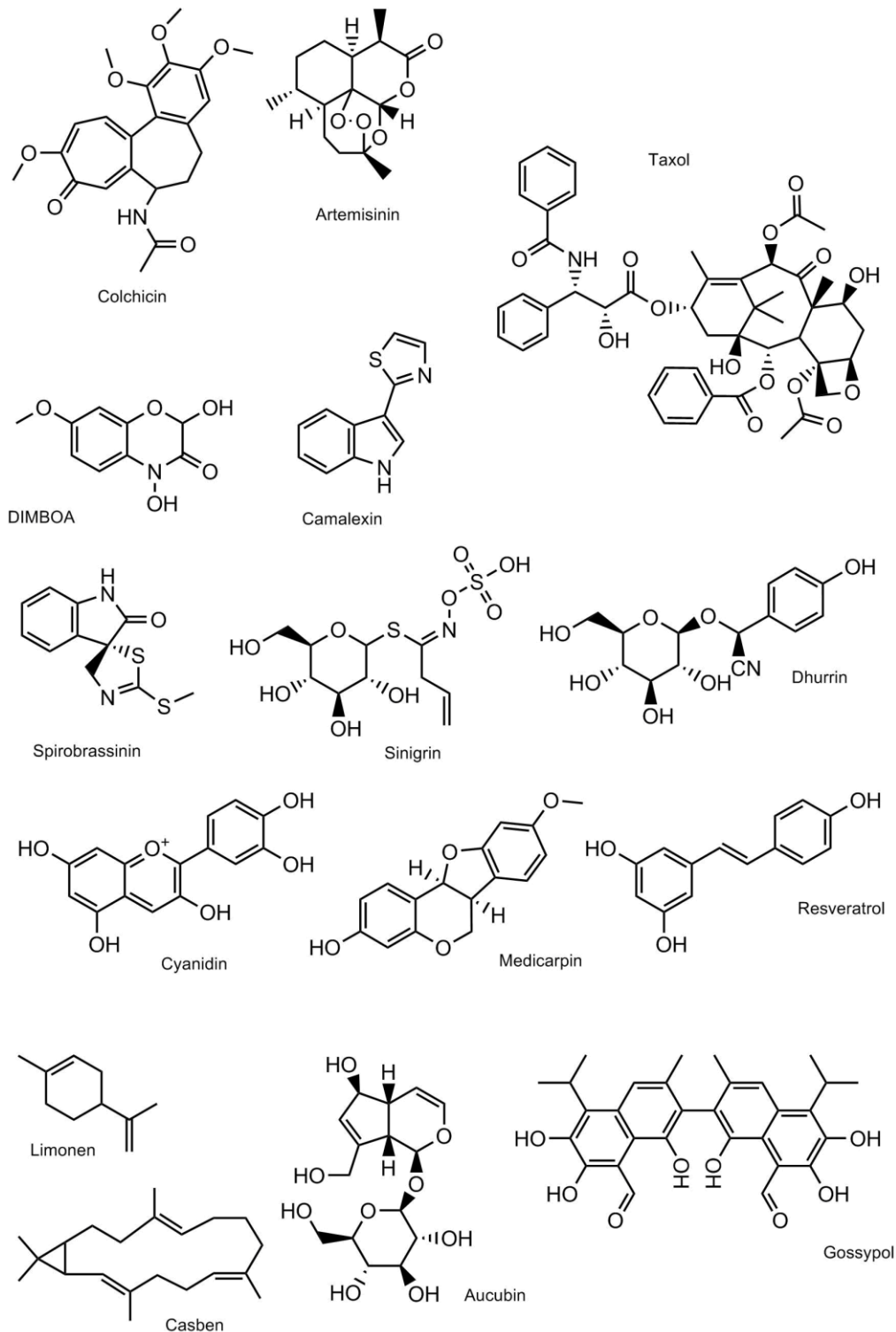


Abbildung 1-2 Strukturformeln einiger im Fließtext erwähnter Sekundärmetabolite unterschiedlicher Strukturklassen.

In der Ordnung der Kreuzblütlerartigen (Brassicales) können ausgehend von Tryptophan indolische GSL gebildet werden. GSL sind β -Thioglucosid-N-Hydroxysulfate und werden auch als Senfölglykoside bezeichnet. Die Derivate ihrer Aglukone sind für den scharfen Geschmack in verschiedenen Kohlgemüsen wie zum Beispiel Meerrettich (*Armoracia rusticana*) verantwortlich und sind oftmals pharmakologisch aktiv. Sie sind zudem

maßgeblich an der Abwehr von Fraßfeinden und Pflanzenpathogenen beteiligt (Bednarek et al., 2009; Schlaeppi et al., 2010; Schlaeppi et al., 2008; Traka und Mithen, 2009). Neben den indolischen GSL leiten sich auch die benzyllischen GSL wie Gluconasturtiin (2-Phenylethylglucosinolat) oder Sinalbin (4-Hydroxybenzylglucosinolat) vom Shikimisäureweg ab. Die große Gruppe der aliphatischen GSL entstammt meist der Aminosäure Methionin, wie beispielsweise Sinigrin (Allylglucosinolat, Struktur siehe Abbildung 1-2) oder Glucoraphanin (4—Methylsulfinylbutyl-glucosinolat). Des Weiteren können aliphatische GSL auch ausgehend von anderen aliphatischen Aminosäuren wie Isoleucin oder Valin synthetisiert werden (Sønderby et al., 2010; Song und Thornalley, 2007).

1.3. Phytoalexine und Phytoanticipine in der Pflanzenabwehr

Generelle Abwehrstrategien von Pflanzen

Einige der beschriebenen Sekundärmetabolite sind durch ihre antimikrobiellen Eigenschaften, ihre Toxizität oder ihren bitteren oder scharfen Geschmack Teil der pflanzlichen Abwehr gegen Pathogene und Herbivore. Die Biosynthese aktiver niedermolekularer Verbindungen ist jedoch nur ein Baustein im komplexen mehrschichtigen Abwehrsystem der Pflanze.

Die meisten Pflanzen sind lokal an ihren Standort gebunden und haben, anders als Tiere, keine Möglichkeit vor dem Schadorganismus zu fliehen. Daher sind mechanische Barrieren auf der Oberfläche und im Inneren der Pflanze besonders entscheidend. Wenn der Schadorganismus diese Barrieren überwinden kann, werden intrazelluläre Abwehrprozesse initiiert. Die Erkennung des Pathogens ist dabei essentiell für die Pflanze. Pflanzenzellen besitzen auf ihren Oberflächen eine Reihe von Rezeptoren, die Bestandteile der Fremdorganismen, sogenannte PAMPs (*pathogen associated molecular patterns*), erkennen und die Signalweiterleitung ins Zellinnere gewährleisten. PAMPs sind pathogentypische Signalstoffe wie beispielsweise bakterielle Proteine wie Flagellin, Lipopolysaccharide oder Zellwandbestandteile aus Bakterien oder Pilzen wie Peptidoglycane oder Chitin (Dow et al., 2000; Felix et al., 1999; Felix et al., 1993; Gust et al., 2007). Es wurden bereits eine Reihe solcher Rezeptoren, sogenannte *pattern recognition receptors* (PRRs), identifiziert. Diese erkennen jeweils spezifisch eine bestimmte Klasse an PAMPs oder auch DAMPS (bei Beschädigung des umliegenden Gewebes freiwerdende eigene Moleküle; *damage-associated molecular patterns*). Sie unterteilen sich in Rezeptorkinasen und rezeptorähnlichen Proteine (*receptor-like proteins*; RLPs). Erstere verfügen neben einer Ektodomäne, an die der Ligand bindet und einer Transmembrandomäne zusätzlich über eine Kinasedomäne, die ins Zellinnere ragt. RLPs besitzen hingegen selbst keine Kinasefunktion, interagieren aber mit membranständigen Kinasen. Über diese intrazellulären Kinasedomänen der PRRs und ihrer Co-Rezeptoren wird bei Ligandenbindung eine Signalweiterleitung über verschiedene Kinasekaskaden initiiert und so die sogenannte

PAMP-triggered immunity (PTI), also eine durch extrazelluläre Signalstoffe ausgelöste Immunantwort, ausgelöst (Boutrot und Zipfel, 2017; Yu et al., 2017b). Diese Resistenzmechanismen werden auch als die basale Resistenz der Pflanzen bezeichnet. Sie umfasst sowohl sehr schnelle Reaktionen (Sekunden bis Minuten) als auch Abwehrprozesse, die erst nach wenigen Stunden bis Tagen ihre maximale Wirksamkeit entfalten. Zu den ersten Effekten nach Weiterleitung des Rezeptorsignals gehört eine drastische Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Ionenkonzentration und der Stickstoffmonoxid(NO)-Konzentration. Es handelt sich um Signalstoffe für weitere Prozesse, die wiederum Teil einer weiteren Signalkette sein können (Jeworutzki et al., 2010; Ranf et al., 2011). So initiiert NO die Akkumulation von Phosphatidsäure (PA) nur wenige Minuten nach Applikation des PAMPs, wodurch weitere Reaktionen, wie etwa mechanisch verstärkende Umformungen des Aktin-Zytoskeletts, vermittelt werden (Testerink und Munnik, 2011; Yu et al., 2017b). Parallel tritt eine Veränderung weiterer Ionenströme ein: Chlorid-, Nitrat- und Kaliumionen strömen nach außen, während es gleichzeitig zu einem Protoneninflux über die Plasmamembran kommt. Dies führt zu einer Alkalisierung des Apoplasten und zu einer Acidifizierung des Zytosols. Zudem kommt es zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Die Anreicherung von Superoxid (O_2^-) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) im Apoplasten wird durch membranständige NADPH-abhängige Oxidasen erreicht (Sagi und Fluhr, 2006). ROS wirken stark antimikrobiell und dienen zudem wiederum zum Teil als Signalstoffe um weitere Signalwege in der Zelle zu aktivieren. Ein solcher sekundär angestoßene Prozess ist die Ablagerung von Callose zur Verstärkung der Zellwand oder zur Abdichtung von Zell-Zell Verbindungen wie Plasmodesmata. Die frühen Signalstoffe NO und ROS regulieren, unter Beteiligung des Pflanzenhormons Ethylen, auch das PAMP-abhängige Schließen der Stomata (Arnaud und Hwang, 2014; Ellinger et al., 2013; Luna et al., 2010; Melotto et al., 2006).

Neben Calciumabhängigen Kinasen werden durch die PRRs auch mehrere MAP-Kinase (*mitogen-activated protein kinase*)-Kaskaden aktiviert (Boudsocq et al., 2010; Meng und Zhang, 2013). Sie bewirken eine Regulierung des Transkriptoms und sind so für die späteren Immunantworten verantwortlich. So aktivierte Abwehrgene codieren für weitere Signalproteine wie Transkriptionsfaktoren oder beispielsweise Gene der Biosynthese abwehrrelevanter Pflanzenhormone wie Salicylsäure (SA), Jasmonat (JA) oder Ethylen (ET; Birkenbihl et al., 2012; Dar et al., 2015; Ferrari et al., 2003; Rowe et al., 2010; Verhage et al., 2010). Abhängig von der Pflanzenfamilie wird über diese Signalwege zudem die Biosynthese spezifischer, toxischer, niedermolekularer Moleküle, der Phytoalexine, aktiviert (Eckardt, 2011). Abbildung 1-3 gibt einen Überblick über die beschriebenen Prozesse der basalen Pflanzenabwehr.

Reaktion der Zelle auf den Eindringling. Es kommt zur sogenannten hypersensitiven Immunantwort (*hypersensitive response*, HR), zum Einleiten von Apoptosevorgängen und zum lokalen Absterben der Zellen. Hierdurch wird dem Pathogen aktiv die Nahrungszufuhr entzogen und oft eine Weiterverbreitung im Zellverbund unterbunden (Tsuda und Katagiri, 2010).

Pflanzen wie Pathogene stehen unter konstantem evolutionären Selektionsdruck. Es kommt über die Zeit zu einer Co-Evolution von Angriffsmechanismen des Pathogens und Abwehrmechanismen der Pflanze. Verändert das Pathogen beispielsweise minimal die Natur des Effektormoleküls, so dass es nicht mehr vom R-Protein der Pflanze erkannt wird, erhöht dies seine Pathogenität immens – bis zu dem Zeitpunkt, an dem die Pflanze „nachrüstet“ und die neuartigen Effektormoleküle ebenfalls unschädlich machen kann.

Dieser Rüstungswettbewerb lässt sich vereinfacht mit dem von Jones und Dangl (2006) dargelegten Zickzack-Modell verdeutlichen (Abbildung 1-4), in dem die jeweilige Abwehrfähigkeit der Pflanze abhängig von der eigenen und gegnerischen Anpassungsfähigkeit ist.

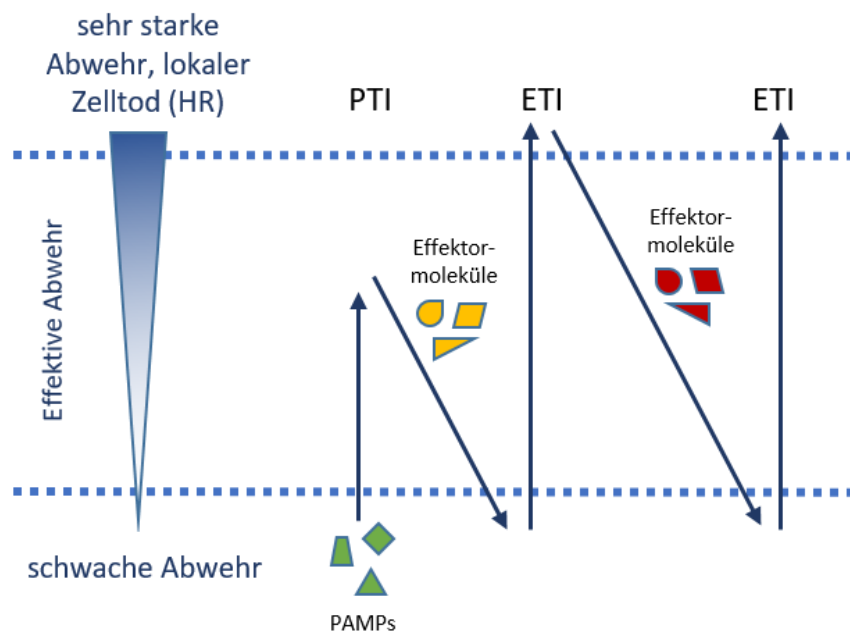


Abbildung 1-4: Zickzack-Modell der co-evolutionären Pflanzenabwehr. Der Grad der Abwehrfähigkeit der Wirtspflanzen (links) gegen besiedelnde Pathogene ist abhängig von den jeweilig ausgeprägten Abwehr- und Angriffsstrategien.

Die Pflanzenabwehr ist also generell ein mehrschichtiges System, das ständiger evolutionärer Anpassung unterliegt. Dieser Anpassungsdruck erklärt auch die Vielzahl der chemisch höchst unterschiedlichen Sekundärmetabolite, die aufgrund ihrer Toxizität gegenüber Mikroorganismen oder Fraßfeinden Teil der pflanzlichen Abwehrstrategie sind und von denen einige bereits im vorigen Kapitel erwähnt wurden.

Phytoalexine und Phytoanticipine

Gegen Schadorganismen aktive Sekundärmetabolite lassen sich in zwei funktionelle Klassen einteilen: sogenannte Phytoanticipine und Phytoalexine (VanEtten et al., 1994). Bereits vorweg sei gesagt, dass die Grenze dieser Einteilung bei einigen Metaboliten fließend sein kann, obwohl ihr zwei grundsätzlich verschiedene Abwehrstrategien zugrunde liegen. Phytoanticipine werden bereits vor dem Angriff durch den Schadorganismus von der Pflanze bereitgestellt. Diese Stoffe antizipieren buchstäblich ihren Einsatz. Phytoalexine hingegen liegen nicht konstitutiv vor, sondern werden erst im Bedarfsfall *de novo* synthetisiert und lokal akkumuliert.

Phytoanticipine liegen oft in einem deaktivierten Zustand vor, sind beispielsweise als Glykoside in der Vakuole der Zellen gespeichert. Sie können in speziellen Zellen oder Kompartimenten wie Idioblasten oder Drüsenhaaren akkumuliert vorliegen und werden im Falle eines Eindringens von außen durch Zerstörung der Kompartimentierung und anschließender enzymatischer Aktivierung (in der Regel durch Abspaltung des Zuckerrestes) freigesetzt. Zu dieser Metabolitkategorie gehören beispielsweise die Iridoidglykoside, glykosilierte Benzoxazinoide oder aliphatische und indolische GSL (Kissen et al., 2009; Pedras und Yaya, 2015). Letztere werden im nächsten Kapitel noch genauer beschrieben. Zwar sind auch die Phytoanticipine in der Regel nicht gleichmäßig in allen Teilen der Pflanze gleich konzentriert, sie unterscheiden sich in ihrer Lokalisation dennoch entscheidend von den Phytoalexinen. Diese werden als Reaktion durch den äußeren Reiz, ausgelöst durch PAMP-vermittelte Signalkaskaden oder auch abiotisch bedingte Signale wie ROS-Bildung, lokal am Ort des Reizes *de novo* synthetisiert (Meng und Zhang, 2013; Pedras et al., 2008). Seit der Entdeckung und Definition der Phytoalexine durch Müller und Börger (1940) in den frühen 1940er Jahren nach Studien an mit *Phytophthora infestans* infizierten Kartoffeln und der ersten Isolierung aus Erbse (*Pisum sativum*) durch Cruickshank und Perrin (1960), wurden noch zahlreiche weitere Substanzen aus verschiedensten Pflanzenfamilien als Phytoalexine charakterisiert. Diese können trotz oft ähnlicher Funktion in der Pflanzenabwehr völlig unterschiedlichen Strukturfamilien angehören (Tabelle 1-1)

Tabelle 1-1 Phytoalexine aus verschiedenen Pflanzenfamilien.

Pflanzenfamilie	Strukturelle Klasse der Phytoalexine mit Beispielen	Referenz
Amaryllisgewächse Amaryllidaceae	Hydroxyflavane	Coxon et al. (1980)
Kreuzblütler Brassicaceae	Indolische, zum Teil schwefelhaltige Alkaloide: Camalexin (Abbildung 1-2), Wasalexin, Brassilexin, Spirobrassinin (Abbildung 1-2)	Browne et al. (1991); Pedras et al. (2011b)
Gänsefußgewächse Chenopodiaceae	Flavanone: Betagarin Isoflavones: Betavulgarin	Geigert et al. (1973)

Windengewächse Convolvulaceae	Furanosesquiterpene: Ipomeamaron	Uritani et al. (1960)
Wolfsmilchgewächse Euphorbiaceae	Diterpene: Casben (Abbildung 1-2)	Sitton und West (1975)
Hülsenfrüchtler Fabaceae	Isoflavone: Hydroxyphaseollin, Genistein, Daidzein, Cajanin Pterocarpene: Medicarpin (Abbildung 1-2)	Hargreaves et al. (1976); Ingham John (1976); Keen et al. (1972)
Leingewächse Linaceae	Phenylpropanoide: Coniferylalkoholderivate	Keen und Littlefield (1979)
Malvengewächse Malvaceae	Terpenoide, Naphtaldehyde: Gossypol (Abbildung 1-2)	Sunilkumar et al. (2006)
Orchideengewächse Orchidaceae	Dihydrophenanthrene: Loroglossol, Orchinol	Fisch et al. (1973)
Süßgräser Poaceae	Diterpenoide: Momilactone, Oryzalexine; Zealexine; Phytocassane, Kauralexine Deoxyanthocyanidine: Luteolinidin Phenylamide	Cho und Lee (2015); Lo et al. (1999); Otomo et al. (2004); Park et al. (2013); Poloni und Schirawski (2014); Schmelz et al. (2014)
Rosengewächse Rosaceae	Dibenzofurane: Cotonefurane	Kokubun und Harborne (1995)
Rautengewächse Rutaceae	Methylierte Phenolie: Xanthoxylin	Hartmann und Nienhaus (1974)
Nachtschattengewächse Solanaceae	Phenylpropanoide: Chlorogensäure Steroidglycoalkaloide: α -Solanine, α -Chaconine Coumarin: Scopoletin Terpenoide: Rishitin	Kuc (1957); Kuc (1984); Lyon und Bayliss (1975); Reuveni und Cohen (1978)
Doldengewächse Umbelliferae	Polyacetylene: Falcarinol Phenole: Xanthotoxin	Harding und Heale (1981); Johnson et al. (1973)
Weinrebengewächse Vitaceae	Stilbene: Resveratrol (Abbildung 1-2), Viniferine	Langcake und Pryce (1976)

Wirkmechanismen von Phytoalexinen gegenüber Pflanzenpathogenen

Die antimikrobielle Wirksamkeit ist ein Definitionscharakteristikum von Phytoalexinen und wurde dementsprechend für alle als Phytoalexine bezeichneten Substanzen zumindest in Wachstumsinhibierungsassays gezeigt. Dennoch ist für die meisten Phytoalexine der molekulare Wirkmechanismus noch nicht bekannt oder nicht abschließend beschrieben. Viele Phytoalexine hemmen die Fähigkeit des bakteriellen Zellwachstums bzw. der Keimung der Sporen oder des Myzelwachstums von Pilzen (zusammengefasst in Ahuja et al., 2012, siehe auch in Tabelle 1-1 aufgeführte Referenzen). Phytoalexine sind in der Regel gegenüber verschiedenen Schadorganismen wirksam, auch wenn der Grad dieser Wirksamkeit von Pathogen zu Pathogen stark unterschiedlich sein kann. Ein Grund dafür ist, dass einige Mikroorganismen das entsprechende Pflanzentoxin besser oder schlechter zu Entgiften vermögen. Der Detoxifizierungsmechanismus von *Alternaria brassicicola* ist beispielsweise für Camalexin weniger effektiv als der für Brassinin, ein anderes *Brassica*-Phytoalexin (Pedras et al., 2014). Die speziesübergreifende Wirksamkeit von Phytoalexinen legt trotz der strukturellen Unterschiede ähnliche generelle zelluläre Ziele und

Wirkmechanismen nahe. Häufige Effekte von Phytoalexinapplikationen gegenüber Bakterien, Pilzen und Oomyceten sind zellmorphologische Veränderungen, Zellwandschäden und/oder Membranschäden, die bis zur Lyse führen können. Aus diesen Beobachtungen resultierend werden als potenzielle *targets* verschiedener Phytoalexine zumeist Membranen, Membranproteine (auch mitochondriale) oder das Zytoskelett postuliert (Adrian und Jeandet, 2012; Adrian et al., 1997; Harris und Dennis, 1977; Pezet und Pont, 1990). Auch für Camalexin, das Phytoalexin aus *Arabidopsis thaliana*, wurde die Disruption von Membranen als Grund für die Resistenz gegenüber dem Bakterium *Pseudomonas syringae* vorgeschlagen (Rogers et al., 1996). Der nekrotrophe Pilz *Botrytis cinerea* ist ebenso empfindlich gegenüber Camalexin. *In-vivo*-Experimente zeigen für die Camalexinmutante *pad3* deutlich stärkere Infektionssymptome als der *Arabidopsis*-Wildtyp (Ferrari et al., 2007; Kliebenstein et al., 2005). *Botrytis cinerea* ist ein wichtiges Pflanzenpathogen. Die Interaktion mit der Camalexin-bildenden *Arabidopsis thaliana* hat sich als wichtiges Modellsystem für das Studium der Wirkungen von Phytoalexinen auf pathogene, nekrotrophe Pilze etabliert (van Kan, 2006). Shlezinger et al. (2011) zeigten so eine mögliche Rolle des Camalexins als Induktor des programmierten Zelltods des Pilzes. Dieser potentielle Wirkmechanismus des Camalexins wird durch Studien zum antikanzerogenen Potenzial des Phytoalexins unterstützt. Auch die Zytotoxizität gegenüber verschiedenen humanen Zelllinien scheint auf die Induktion von Apoptosemechanismen und camalexinbedingte Anreicherung von ROS zurückzuführen zu sein (Mezencev et al., 2011; Smith et al., 2014; Smith et al., 2013; Tischlerova et al., 2017).

1.4. Die Biosynthese und Regulation von Camalexin und indolischen GSL

Camalexin ist das primäre Phytoalexin in *Arabidopsis thaliana* (Tsuji et al., 1992). Seine Biosynthese wird durch eine Vielzahl von Stressoren angeregt, darunter die Pflanzenpathogene *Pseudomonas syringae* (Tsuji et al., 1992), *Alternaria brassicicola* (Thomma et al., 1999), *Alternaria alternata* (Schuhegger et al., 2007), *Botrytis cinerea* (Birkenbihl et al., 2012), *Colletotrichum higginsianum* (Narusaka et al., 2004), *Plasmodiophora brassicae* (Siemens et al., 2008), *Plectosphaerella cucumerina* (Frerigmann et al., 2016) oder die Blattlaus *Myzus persicae* (Kettles et al., 2013). Aber auch isolierte PAMPs wie Flagellin 22 (flg22, Millet et al., 2010) oder Peptidoglykan (Gust et al., 2007) und eine Reihe abiotische Stressoren wie Schwermetallionen (Pedras und Adio, 2008; Schuhegger et al., 2006), UV-Licht (Müller et al., 2015) oder das Herbizid Acifluorfen (Saga et al., 2012) induzieren die Camalexinantwort in *Arabidopsis thaliana*.

Das Phytoalexin Camalexin und die als Phytoanticipine charakterisierten indolischen GSL sind per Definition unterschiedlichen pflanzlichen Abwehrstrategien zuzuordnen. Ihre Biosynthesen unterliegen entsprechend unterschiedlichen Regulationswegen. Dennoch sind ihre Biosynthesewege sehr eng verknüpft. Beide gehen aus der Aminosäure Tryptophan hervor, die sich, wie bereits beschrieben, aus dem Shikimisäureweg ableitet.

Die pflanzliche Tryptophanbiosynthese findet im Chloroplasten statt (Zhao und Last, 1995) und wird durch die Anthranilatsynthase eingeleitet. Diese setzt das aus dem Shikimisäureweg hervorgehende Chorismat zu Anthranilat um. Die Transkription der Anthranilatsynthase *ASA1* ist dabei pathogen- und verwundungsinduzierbar. Das Enzym wird zudem durch das Endprodukt des Syntheseweges Tryptophan inhibiert (Bernasconi et al., 1994; Niyogi et al., 1993). An das Anthranilat erfolgt anschließend die Addition eines Phosphoribosylrestes durch die Anthranilat-Phosphoribosyltransferase unter Abspaltung von Pyrophosphat. Nach einem Isomerisierungsschritt durch die Phosphoribosylanthranilat-Isomerase entsteht 1-(*o*-Carboxyphenylamino)-1-desoxyribulose-5-phosphat (CdRP). Das vierte Enzym der Tryptophanbiosynthese, die Indol-3-Glycerolphosphat-Synthase (IGPS), katalysiert schließlich die Bildung des Indolrings und es entsteht Indol-3-Glycerolphosphat. Die letzten beiden Syntheseschritte werden durch die Tryptophansynthase katalysiert, die als ein heterotetramerer Enzymkomplex aus zwei alpha-Untereinheiten (TSA) und zwei beta-Untereinheiten (TSB) vorliegt. TSA spaltet Indol-3-Glycerolphosphat in Glycerinaldehyd-3-Phosphat und Indol. Letzteres kondensiert mit Serin zu Tryptophan, katalysiert durch die TSB (zusammengefasst in Tzin und Galili, 2010). Um Tryptophan in die Camalexinbiosynthese einzuschleusen, ist die Oxidation zum Indol-3-acetaldoxim (IAOx) entscheidend. Diese Reaktion wird durch die CYPs CYP79B2 und CYP79B3 katalysiert. IAOx ist ebenfalls Ausgangsprodukt der indolischen Glucosinolate und anderer indolischer Verbindungen wie Indol-3-Carbonsäure (ICOOH, Abbildung 1-5). Die *cyp79b2b3*-Doppelmutante ist

dementsprechend auch unter induzierten Bedingungen frei von Camalexin und kann auch keine der anderen IAOx-abhängigen Substanzen synthetisieren, was in der Pflanze zu einer drastisch erhöhten Anfälligkeit gegenüber verschiedenen Pathogenen führt (Böttcher et al., 2014; Glawischnig et al., 2004; Mikkelsen et al., 2000; Zhao et al., 2002).

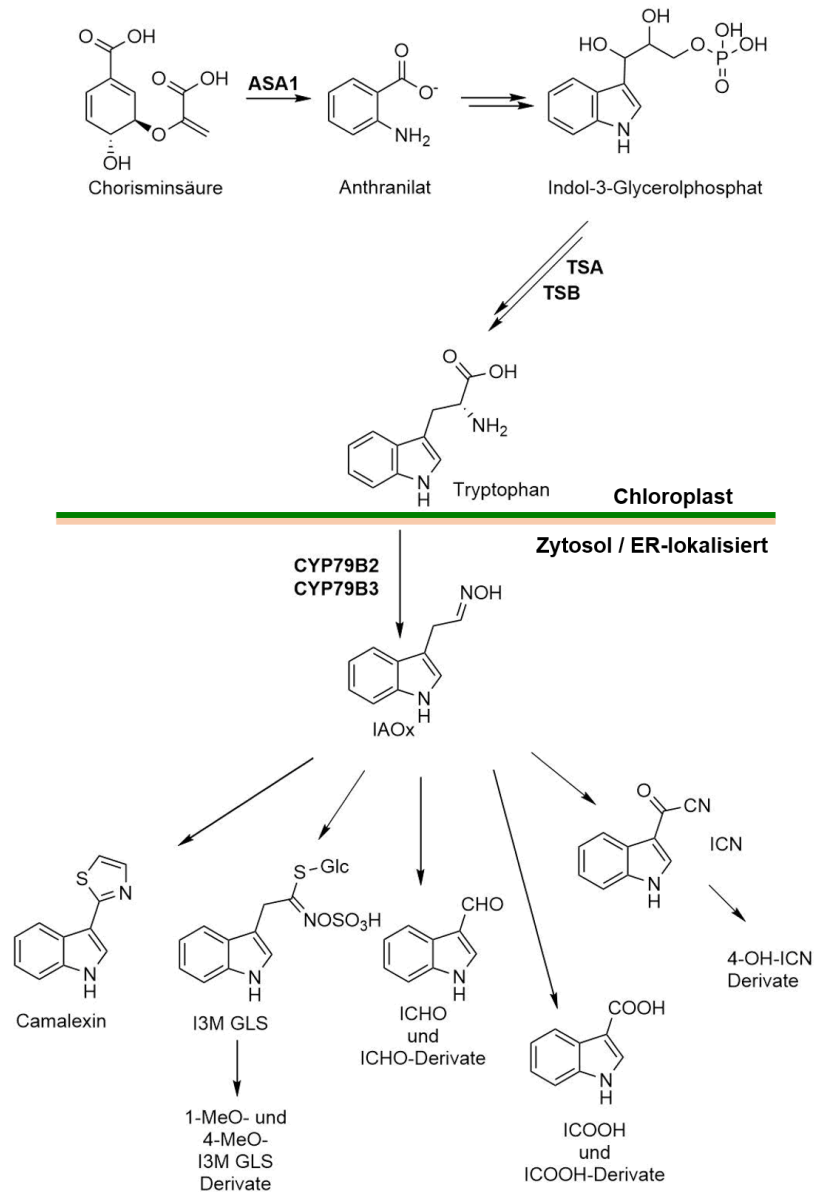


Abbildung 1-5: Schlüsselschritte der Tryptophanbiosynthese und Spektrum IAOx-abhängiger Metabolite in *Arabidopsis thaliana*. Das aus Tryptophan durch CYP79B2 und CYP71B3 gebildete Aldoxim IAOx ist Vorstufe für zahlreiche weitere indolische Sekundärmetabolite wie Camalexin, indolische GSL oder ICOOH-Derivate. ICHO: Indol-3-aldehyd, ICN: Indol-3-carbonitril.

Im Zuge der Camalexinbiosynthese (Abbildung 1-6) wird IAOx durch CYP71A12 (vorwiegend in Wurzeln) und vor allem CYP71A13 dehydratisiert. In *in-vitro*-Studien kann das Intermediat Indol-3-acetonitril (IAN) detektiert werden (Klein et al., 2013; Millet et al., 2010; Müller et al., 2015; Nafisi et al., 2007). Dieses Intermediat wird anschließend, höchstwahrscheinlich unter

Einfluss einer Glutathiontransferase (GST), glutathioniert (Su et al., 2011). Aus diesem Glutathion-Konjugat (GS-IAN) entsteht schließlich durch Abspaltung des γ -Glutamyl- und Glycinrestes, katalysiert durch die γ -Glutamyl-Peptidasen 1 und 3 (GGP1/3) und einer unbekannte Carboxypeptidase (Geu-Flores et al., 2011), das Cystein-Konjugat Cys-IAN. Alternativ wurde durch Su et al. (2011) eine Beteiligung der Phytochelatinsynthasen 1 und 2 (PCS1/2) vorgeschlagen, die in der Lage sind, Glycin von GS-IAN abzuspalten. Cys-IAN ist das Substrat von CYP71B15, einem bifunktionären CYP, das die letzten beiden Teilreaktionen der Camalexinbiosynthese katalysiert. Unter Reaktion der Aminogruppe des Cysteinrestes mit der Nitrilgruppe entsteht zunächst der Ringschluss. Die Dihydrocamalexinsäure (DHCA) wird anschließend oxidativ zu Camalexin (3-Thiazol-2'-yl-Indol) decarboxyliert (Böttcher et al., 2009; Schuegger et al., 2006; Zhou et al., 1999).

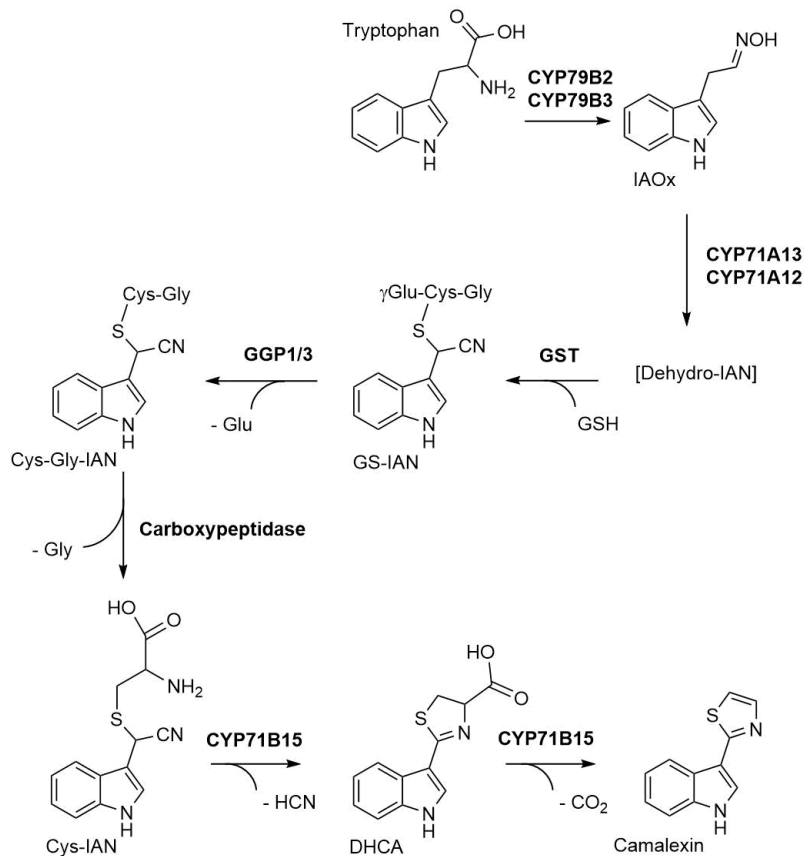


Abbildung 1-6 Die Camalexinbiosynthese ausgehend von Tryptophan. Die ausführliche Beschreibung der einzelnen Syntheseschritte sind dem Fließtext zu entnehmen. Die Bildung von Cys-IAN entspricht dem von Geu-Flores et al. (2011) postulierte Syntheseweg unter der Beteiligung von GGP1/3. Dehydro-IAN entspricht dem von Klein et al. (2013) postulierten IAN-ähnlichen Intermediat.

CYP71A12, CYP713 und CYP71B15 sind die Schlüsselenzyme der Camalexinbiosynthese. Sie werden bei Abwesenheit eines Stressors kaum exprimiert. Induziert durch Pathogene, PAMPs oder AgNO₃ akkumuliert das Transkript dieser CYPs jedoch binnen weniger Stunden. Der über die MPK3/MPK6-Signalkaskade aktivierte Transkriptionsfaktor WRKY33

bindet hierfür in der Promotorregion von *CYP71B15* und aktiviert auch die Transkription von *CYP71A13* (Mao et al., 2011; Petersen et al., 2008). Der Camalexingehalt ist in der *wrky33 Knock-out*-Mutante nach Induktion im Vergleich zum Wildtyp zunächst deutlich reduziert. Später, nach mehr als 24 Stunden, kommt es zu einem von diesem Transkriptionsfaktor unabhängigen Anstieg der Camalexinkonzentration, der mit einer ebenfalls leicht verzögerten Expression von *CYP71A13* und *CYP71B15* in *wrky33* einhergeht (Birkenbihl et al., 2012). Die Transkription von *CYP71A12*, *CYP71A13* und *CYP71B15* wird zudem durch den Transkriptionsfaktor ANAC042 stimuliert (Saga et al., 2012). Die MYB-Faktoren MYB51 und MYB122 sind ebenfalls durch Camalexin-relevante Stressoren induzierbar. Sie sind positive Regulatoren der frühen Phase der Camalexinbiosynthese bis zur Bildung von IAOX, haben aber keinen direkten regulatorischen Einfluss auf die Expression von *CYP71A13* und *CYP71B15* (Frerigmann et al., 2015). Das Zusammenspiel dieser die Camalexinsynthese regulierenden Transkriptionsfaktoren ist noch nicht abschließend beschrieben. Die Rolle der MYB-Faktoren MYB34, MYB51 und MYB122 in der Biosynthese von Tryptophan und der indolischen GSL wurde in den letzten Jahren durch Frerigmann et al. gezeigt. Sie steuern die Transkription von ASA1, TSB1 und mehrerer Schlüsselenzyme der Indolglucosinolatbiosynthese, darunter CYP79B2 und CYP79B3, deren Expression auch essentiell für die für die Camalexinbiosynthese ist. Zudem beeinflussen sie die Regulation von CYP83B1 (aktiviert IAOx, wahrscheinlich zu einer Nitroverbindung), die C-S Lyase (auch *SUPERROOT1*; SUR1), SOT16 (*Cytosolic sulfotransferase 16*) und CYP81F4, das Glucobrassicin (I3M) an Position 1 hydroxyliert (hier liegt eine negative Regulation vor). Darüber hinaus werden die Transkripte der Myrosinase *Penetration2* (PEN2), ein Enzym des Glucosinolat-Abbaus, in der *myb34/51/122* Dreifachmutante nicht detektiert (Frerigmann und Gigolashvili, 2014; Frerigmann et al., 2016).

Myrosinasen (β -Thioglucosidasen) leiten den GSL-Abbau und damit ihre Aktivierung ein. Durch Spaltung der S-glykosidischen Bindung entsteht ein hochreaktives Aglukon, das sich zum Isothiocyanat (ITC) umlagert, welches toxisch für eine Reihe von Pathogenen und Fraßfeinden ist. Um einen permanenten Abbau der GSL durch Myrosinasen zu unterbinden, werden diese beiden Abwehrkomponenten in der Pflanze räumlich getrennt. Diese Trennung wird bei Zellschädigung beispielsweise durch Fraß aufgehoben. GSL werden in der Vakuole gespeichert und in bestimmten Zellen, den sogenannten S-Zellen akkumuliert (zusammengefasst in Kissin et al., 2009). Myrosinasen lassen sich anhand ihrer Aminosäuresequenz im aktiven Zentrum in QE-Myrosinasen (darunter TGGs, β -*thioglucoside hydrolases*) und EE-Myrosinasen wie PEN2 und PYK10 unterteilen (Nakano et al., 2017). TGG1 und TGG2 sind in adulten oberirdischen Geweben in Myrosinzellen hoch konzentriert. Sie liegen dort in Membrankompartimenten wie Idioblasten, Stomata oder der Vakuole gespeichert vor (Li und Sack, 2014; Shirakawa et al., 2016). Im Gegensatz dazu ist

PEN2 zytosolisch gerichtet an den Peroxisomen und Mitochondrien lokalisiert beziehungsweise verankert (Fuchs et al., 2016; Lipka et al., 2005). Die EE-Myrosinase PYK10 wird in vom endoplasmatischen Retikulum (ER) ausgehenden Membrankörpern, sogenannten ER-*bodies* gespeichert. ER-*bodies* sind der Wurzel und im Keimling häufig, finden sich aber auch an Blatträndern und nahe der Leitgewebe, also an potentiellen Fraßstellen (Nakano et al., 2017).

Sogenannte *Specifier*-Proteine (SP) erweitern zusätzlich das Spektrum der GSL-Abbauprodukte. *Epithiospecifier* Proteine (ESPs), *thiocyanate-forming* Proteine (TFPs) und *nitrile-specifier* Proteine (NSPs) formen das jeweilige Aglukon zum Epithionitril, Thiocyanat und einfachen Nitril um (Abbildung 1-7; Burow und Wittstock, 2009; Kissen und Bones, 2009).

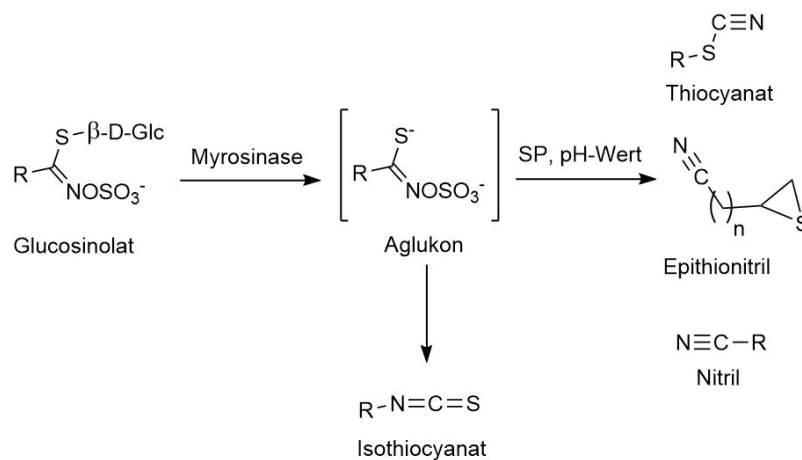


Abbildung 1-7: Myrosinase-abhängige GSL-Abbauprodukte. Nach Abspaltung der D-Glucose durch eine Myrosinase bildet sich aus dem instabilen Aglukon das jeweilige Isothiocyanat. Unter Einfluss von *Specifier*-Proteinen (SP) bilden sich Thiocyanate und Nitrilverbindungen. Besonders die Bildung einfacher Nitrile ist durch einen sauren pH-Wert begünstigt (Latxague et al., 1991). R= aliphatischer Rest, indolischer Rest oder Benzylgruppe.

Die Expression dieser Enzyme ist zum Teil pathogeninduzierbar, wie beispielsweise für NSP1 in *Arabidopsis* gezeigt. I3M kann so in Blättern unter Einfluss von Myrosinasen und SP zu IAN degradiert werden (Burow et al., 2009; Burow et al., 2008; De Vos et al., 2008). Dieser Abbauweg stellt eine IAN-Quelle unabhängig von CYP71A12 und CYP71A13 dar. IAN kann unter Abspaltung von Cyanid durch CYP71B6 zu Indol-3-Carbaldehyd (I3C) und ICOOH oxidiert werden (Böttcher et al., 2014). I3C, ICOOH und deren Derivate werden nach Pathogeninduktion vermehrt IAOx-abhängig synthetisiert (Böttcher et al., 2014; Frerigmann et al., 2016; Müller et al., 2015). I3C kann zudem durch CYP71A12 und in geringerem Maße auch von CYP71A13 aus IAOx gebildet und durch die *Arabidopsis Aldehydoxidase1 (AAO1)* in die Carbonsäure überführt werden (Böttcher et al., 2014; Klein et al., 2013; Müller et al., 2015). Diese liegt zum Teil als Carbonsäureester an die Zellwand assoziiert vor und wird zudem im Wurzelexudat von *Arabidopsis thaliana* detektiert (Bednarek et al., 2005; Forcat et al., 2010). In *Brassica rapa* werden ICOOH und I3C als

Abbauprodukte von ^{14}C markiertem I3M gefunden (Pedras et al., 2002). Ihre mögliche Funktion im Netzwerk abwehrrelevanter Indole ist jedoch nicht geklärt.

Rajniak et al. (2015) zeigten zudem die CYP71A12-abhängige Synthese von 4-Hydroxyindol-3-Carbonylnitrilen als eine weitere Gruppe indolischer bioaktiver Metabolite. Dies addiert, inmitten induzierbaren und konstitutiven indolischen Abwehrsubstanzen wie Camalexin und GSL, eine zusätzliche Ebene an Komplexität zu dem Biosynthesenetzwerk um IAN. Die spezifische *in-vivo*-Funktion IAN-produzierender und umsetzender Enzyme wie CYP71A12, CYP71A13 und CYP71B6 in diesem Netzwerk ist zentraler Bestandteil dieser Arbeit.

1.5. Cytochrom P450 Enzyme

Bei den zuvor beschriebenen Biosynthesewegen bioaktiver Indole wie z.B. Camalexin sind zahlreiche CYPs beteiligt. Sie katalysieren entscheidende und oft geschwindigkeitsbestimmende Teilschritte dieser und vieler anderer Biosynthesewege in Pflanzen, Tieren und allen anderen Reichen des Lebens. Ihre Substrate sind chemisch sehr variabel und können für den metabolisierenden Organismus endogener oder exogener Natur sein. In der menschlichen Leber sind CYPs als sogenannte Phase-I-Enzyme maßgeblich an der Entgiftung von meist lipophilen Xenobiotika beteiligt. Während im Menschen nur 57 wahrscheinlich funktionelle CYP-Gene (und weitere 58 Pseudogene) detektiert wurden (Nelson et al., 2004b), finden sich insbesondere in Pflanzengenomen oft mehrere Hundert Vertreter dieser Enzym-Superfamilie, was CYPs zur einer der häufigsten aller Enzymklassen werden lässt. In *Arabidopsis thaliana* sind beispielsweise 246 CYP-Gene und weitere 26 Pseudogene beschrieben, wobei die Mehrheit (153 Gene und 19 Pseudogene) dem A-Typ oder auch CYP71-Klan zuzuordnen sind. Diese Gruppe zeichnet sich durch das hochkonservierte Intron M aus, das in den Nukleotidsequenzen von nicht-A-Typ CYP-Familien fehlt (Bak et al., 2011; Nelson et al., 2004a; Nelson et al., 2004b). Sämtliche CYPs der Camalexinbiosynthese und die der Synthese der indolischen GSL, CYP71B6 sowie CYP82C2, welches an der 4-OH-ICN-Synthese beteiligt ist, sind CYPs des Typs A. Die CYP71B Familie, der auch CYP71B15 und CYP71B6 angehören, umfasst insgesamt 37 CYPs, von denen 18 auf Chromosom 3 geclustert vorliegen. Die biologische Bedeutung dieser 18 CYPs ist nicht bekannt. In Vorarbeiten (Fellermeier, 2011 und unveröffentlichte Arbeiten) konnte jedoch gezeigt werden, dass einige von ihnen *in vitro* indolische Substrate wie IAN umsetzen. Abbildung 1-8 zeigt einen anhand von Proteinsequenzhomologien erstellten phylogenetischen Baum der in diesem Manuskript thematisierten CYP-Familien CYP71A (17, davon 3 Pseudogene), CYP71B (37, davon 5 Pseudogene), CYP79B (3, davon 1 Pseudogen), CYP81F (4), CYP82C (3), CYP83A (1), und CYP83B (1). Diese Darstellung verdeutlicht die strukturelle Ähnlichkeit von CYP71A12 zu CYP71A13 und zu einem weiteren Homolog, CYP71A18, für das im Rahmen einer Bachelorarbeit ebenfalls eine *in-vitro*-

Aktivität gegenüber IAOx gezeigt wurde (Götz, 2012), dessen biologische Funktion jedoch noch nicht geklärt ist.

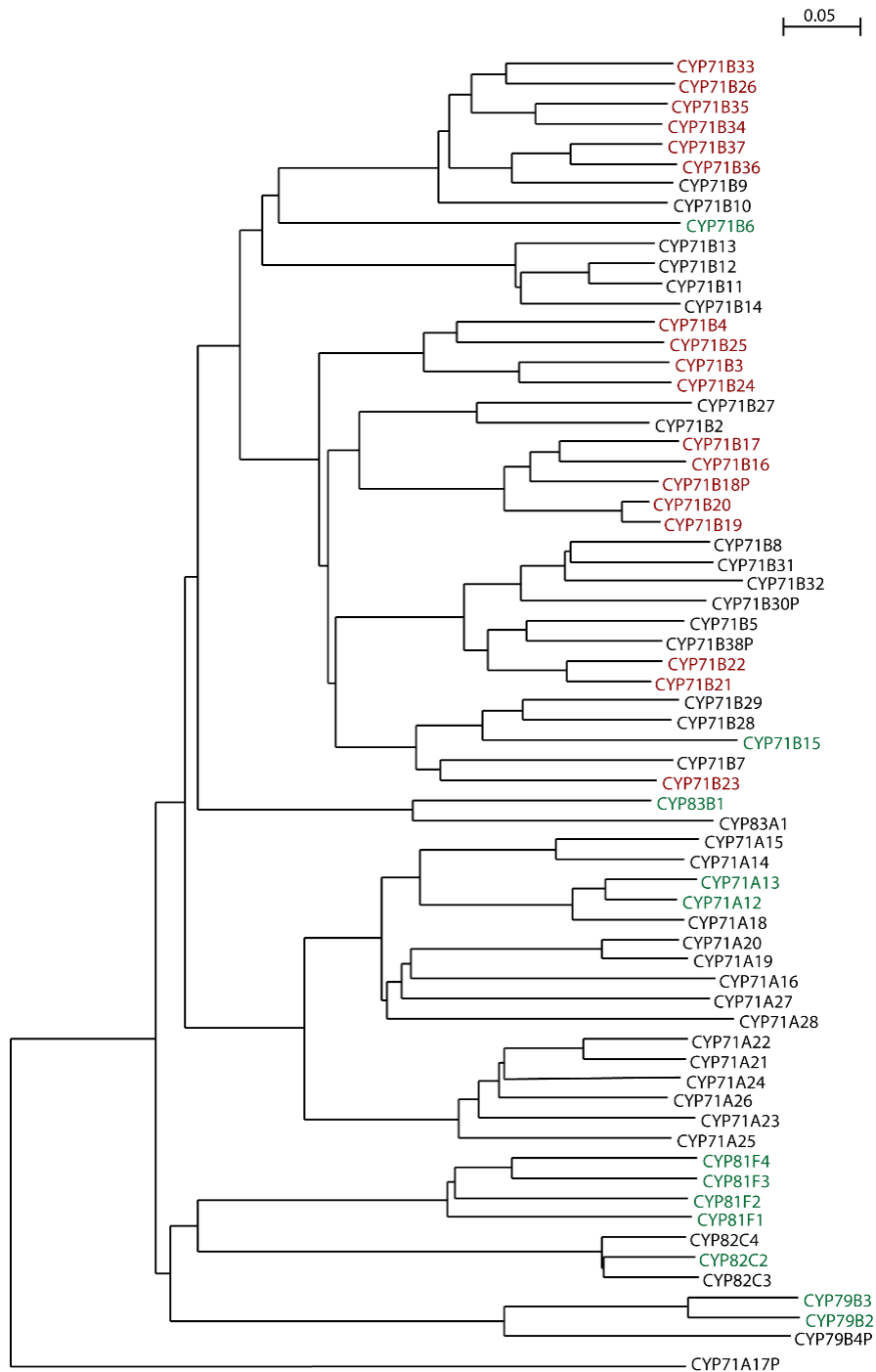
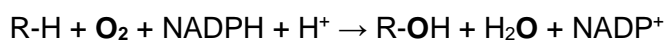


Abbildung 1-8 Auf Proteinsequenzhomologien basierender phylogenetischer Baum der CYP-Familien CYP71A, CYP71B, CYP79B, CYP81F, CYP82C, CYP83A und CYP83B. Grün: CYPs mit Bezug zur Biosynthese von Camalexin, indolischen GSL, ICOOH, ICHO und 4-OH-ICN (Referenzen siehe Abschnitt 1.4). Rot: 18 CYP71Bs, die auf Chromosom 3 in Form eines 83 kb großen Genclusters vorliegen (Bak et al., 2011). Proteinsequenzen erhalten von http://www.p450.kvl.dk/At_cyps/family.shtml, bioinformatische Verarbeitung mit CLUSTAL 2.1 (*Multiple Sequence Alignment*) und dem *Simple Phylogeny-tool* (Erstellung des *tree-files* im Newick-Format), beide zugänglich über die Website des *European Bioinformatics Institute* EMBL-EBI (<https://www.ebi.ac.uk/>). Darstellung der *tree-Datei* mit der *njplot-Software* der Universität Lyon (<http://pbil.univ-lyon1.fr/software/unrooted.html>). Der Abstandswert zeigt die Anzahl der Substitutionen proportional zur Länge des *Alignments*.

Während es sich bei bakteriellen CYPs um lösliche Proteine handelt, sind die beschriebenen eukariotischen CYPs Membranproteine. Mit Ausnahme mitochondrialer und plastidiärer Formen sind CYPs N-terminal und zytosolisch gerichtet im ER verankert (Williams et al., 2000). Sie haben in ihrem aktiven Zentrum je ein Häm-Molekül gebunden. In dessen Zentrum ist ein dreiwertiges Eisen koordiniert. Als Monooxygenasen katalysieren CYPs Oxidationsreaktionen, für die die Anwesenheit eines Redoxpartners wie POR oder Cytochrom b₅ obligatorisch ist. Diese sind ebenfalls in der ER-Membran verankert, liegen aber geringer konzentriert vor. Das Verhältnis von NADPH-POR zu der Gesamtmenge an CYPs in der ER Membran in tierischem Gewebe (nach Induktion der CYP-Bildung durch Xenobiotika) wird auf etwa 1:15 geschätzt (Jensen und Møller, 2010; Shephard et al., 1983). Die klassische, von einem CYP katalysierte Reaktion lässt sich wie folgt darstellen:



Die Summelformel dieser Monooxygenierung einer C-H, S-H oder N-H Verbindung (zusammengefasst als R-H) zeigt die Spaltung von elementarem Sauerstoff, wobei ein Atom in das Substrat eingebaut und das zweite in Form von Wasser abgegeben wird. Die Reaktion erfordert den Übergang von zwei Elektronen, die von NADPH + H⁺ bereitgestellt werden. Dieses wird entsprechend zu NADP⁺ oxidiert (Meunier et al., 2004). Das Reaktionsspektrum von CYPs beschränkt sich jedoch nicht nur auf Hydroxylierungen von C- und Heteroatomen, sondern umfasst ebenso Epoxidierungen, oxidative Dealkylierungsreaktionen, Decarboxylierungsreaktionen oder die Oxidationen von Alkoholen zu Aldehyden und Carbonsäuren. Außergewöhnlich sind CYP-katalysierte oxidative C-C und C-O Kopplungen, beispielsweise im Zuge der Morphinbiosynthese durch CYP719B1 und CYP80A1. Auch die letzten beiden Schritte der Camalexinbiosynthese, katalysiert durch CYP71B15, bei denen es zum Ringschluss und schließlich zur oxidativen Dearboxylierung unter Bildung des Thiazolringes kommt, sind keine klassischen CYP-Reaktionen (Guengerich, 2001; Mizutani und Sato, 2011). Die genauen Mechanismen gerade solcher CYP-Reaktionen sind nur selten genau beschrieben, insbesondere dem Mangel an Kristallstrukturen pflanzlicher CYPs geschuldet. Allgemein kann es jedoch während des Oxidationsprozesses zur Bildung instabiler Intermediate des Substrates kommen, zum Teil radikalischer Natur. Umlagerungen und Ringschlüsse, also eine völlige Neustrukturierung des Substratmoleküls, sind mögliche Konsequenzen. CYP-abhängige Reaktionsabläufe sind oft von einer vergleichsweise schnellen Kinetik geprägt und zudem meist chemisch irreversibel. Es handelt sich bei CYP-vermittelten Reaktionen innerhalb von mehrstufigen Reaktionswegen daher oft um sogenannte Schrittmacherreaktionen (zusammengefasst in Guengerich, 2001; Mizutani und Sato, 2011; Ortiz de Montellano und Nelson, 2011). Entsprechend der vielen Reaktionsvarianten gibt es auch bei der Beschreibung des allgemeinen Reaktionsmechanismus der CYPs leichte Variabilität. Im Zentrum der Reaktion

steht stets das Häm-Eisen, das im Zuge der Reaktion sowohl den elementaren Sauerstoff als auch das Substrat bindet. Der Reaktionszyklus für eine klassische Hydroxylierungsreaktion ist in Abbildung 1-9 gezeigt.

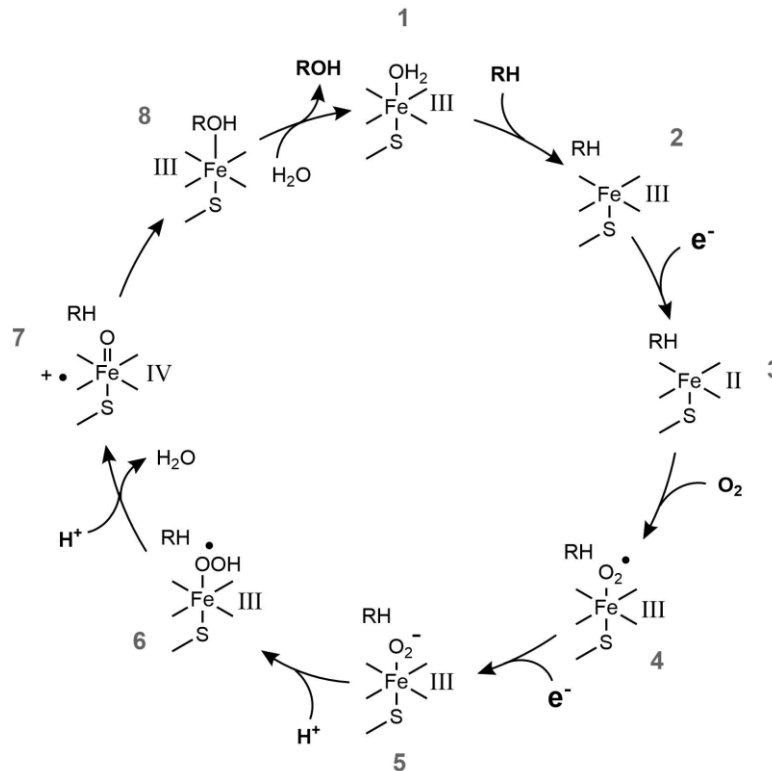


Abbildung 1-9 Der Cytochrom P450- Redoxzyklus. RH= Substrat, ROH= Hydroxyliertes Substrat. Römische Zahlen: Oxidationsstufe des Häm-Eisens. 1: Ruhezustand ohne Substrat 2: Zustand nach Bindung des Substrats 3: erste Elektronenaufnahme bedingt die Reduktion zu Eisen II 4: Bindung von elementarem Sauerstoff und Oxidation zu Eisen III 5: zweite Elektronenaufnahme führt zu einem Peroxo-Intermediat 6: Erste Protonenaufnahme, Hydroperoxy-Intermediat 7: zweite Protonenaufnahme, Wasserabspaltung und Bildung einer vierwertigen Eisen-Oxoverbindung (Compound I) 8: Oxidation und Abgabe des Substrats (Denisov et al., 2005; Kiss et al., 2015).

Das zentrale, dreiwertige Eisen ist als Thiolat eines Cysteinrestes zusätzlich an die Proteinstruktur des CYPs gebunden und bei Abwesenheit des Substrates zudem als 6. Ligand an ein Wassermolekül koordiniert (Abbildung 1-9: 1). Die Substratbindung erfolgt in räumlicher Nähe zur Hämgruppe. Die Anwesenheit des Substrates führt zu einer Änderung des *spin*-Zustands der Valenzelektronen des Eisenatoms vom 6-fach koordinierten *low-spin* Zustand zum 5-fach koordinierten *high-spin* Zustand und dadurch zum Verlust des Wassermoleküls. Dies initiiert den Elektronentransfer (Abbildung 1-9: 2,3)(Conner et al., 2011). Eine NADPH-abhängige POR dient als Elektronendonator, die zunächst ein einzelnes Elektron von NADPH auf die Hämgruppe des CYPs überträgt (Denisov et al., 2005; Jensen und Møller, 2010). Beim artifizialen Abstoppen dieser CYP-Reaktion durch einleiten von Kohlenmonoxid kommt es zur Bindung von CO an das reduzierte, substratgebundene Häm. Dies führt im CO-Differenzspektrum zu einem spezifischen Maximum bei 450 nm. Diese spektroskopische Eigenschaft ist charakteristisch und namensgebend für CYPs (Omura und

Sato, 1964). Im Zuge der Substratmonooxygenierung bindet das Eisen II stattdessen an das Co-Substrat molekularen Sauerstoff (O_2), wodurch das Häm-Eisen wiederum in den oxidierten dreiwertigen Zustand zurückkehrt (Abbildung 1-9: 4). Ein zweiter Elektronentransfer, unter Beteiligung einer POR oder aber Cytochrom b_5 , erneut unter Verbrauch eines Redoxäquivalents, reduziert den gebundenen Sauerstoff. Das entstehende Peroxo-Intermediat (Abbildung 1-9: 5) wird anschließend zwei Mal protoniert. Es kommt zur Abspaltung eines Wassermoleküls unter dem Bruch der kovalenten O-O Bindung und der Bildung der hochreaktiven *Compound I*, einer Eisen(IV)-oxo-Verbindung, bei gleichzeitig radikalisiertem Porphyrinringsystem (Abbildung 1-9: 7). Das verbliebene Sauerstoffatom wird nun oxidativ auf das Substrat übertragen und der ursprüngliche Zustand des CYPs wiederhergestellt (Denisov et al., 2005; Jensen und Møller, 2010; Kiss et al., 2015).

Der allgemeine Reaktionsmechanismus der CYPs unterscheidet sich dabei substantiell von anderen oxidierenden Enzymen, beispielsweise Aldehydoxidasen (AOs), die zu der Gruppe der Molybdänhydroxylasen gehören und einige mit den CYPs überlappende Reaktionen katalysieren. AOs hydroxylieren N-Heterozyklen und oxidieren zahlreiche Aldehyde zur jeweiligen Säure. Dabei verwenden AOs für den Einbau eines Sauerstoffatoms Wasser statt O_2 als Sauerstoffquelle, zudem kommt es durch AOs zur Bildung- statt dem CYP-gekoppeltem Verbrauch- eines jeweiligen Reduktionsäquivalents (Hille, 2005). Anders als CYPs sind Aldehydoxidasen lösliche Enzyme. Sie liegen im Zytosol als Homo- oder Heterodimere vor (Akaba et al., 1999; Zdunek-Zastocka et al., 2004). Die Zusammensetzung der Dimere ist dabei entscheidend für ihre Aktivität und Substratspezifität (Coelho et al., 2012; Itoh et al., 2007; Koiwai et al., 2000). AOs sind wie CYPs in Tieren und Pflanzen weit verbreitet, wobei der AO1 im Menschen eine Rolle im Fremdstoffmetabolismus zugeschrieben wird. In *Arabidopsis*-Samen katalysiert eine Aldehydoxidase, AAO4, die Reaktion von Benzaldehyd zu Benzoesäure (Ibdah et al., 2009). Die AAO1 überführt ICHO in ICOOH (Böttcher et al., 2014), die AAO3 katalysiert den finalen Oxidationsschritt in der Biosynthese des Pflanzenhormons Abscisinsäure (ABA) (Koiwai et al., 2004; Seo et al., 2004). Darüber hinaus sind zwar zahlreiche *in-vitro*-Substrate insbesondere von AAO1, AAO2 und AAO4 bekannt, darunter Geranial, Acrolein, Naphtaldehyd, oder auch das Aldehyd der Indol-3-Essigsäure (Auxin; Akaba et al., 1999; Koiwai et al., 2000; Srivastava et al., 2017). Ob die AAOs jedoch auch im biologischen Kontext am Umsatz der jeweiligen Aldehyde oder N-Heterozyklen beteiligt sind, ist noch nicht geklärt.

1.6. Metabolische Gencluster und Tandemgene

Während Operons im Genom von Prokaryoten geläufig sind, sind funktionelle, metabolische Gencluster in Pflanzen weit weniger beschrieben. Mit zunehmender Aufklärung zahlreicher Genome häufen sich jedoch die Berichte über die Existenz metabolischer Cluster in Pflanzen (zusammengefasst in Nützmann et al., 2016). Solche metabolischen Cluster codieren auch

für die Biosynthese abwehrrelevanter Stoffe, wie das Cluster für die Avenacinbiosynthese in Hafer (*Avena* spp.). Avenacine werden vorwiegend in der Wurzel gebildet und sind gegen Schadpilze wie *Gaeumannomyces graminis* aktiv. Das Gencluster umspannt etwa 192 kb und enthält die Gene Saponin-deficient (*Sad*) 1, 2, 7, 9 und 10. Sie kodieren für die β -Amyrinsynthase (*Sad1*), ein CYP (*Sad2*, *CYP51H10*), eine Glykosyltransferase (*Sad10*, *UGT74H5*), eine Methyltransferase (*Sad9*, *MT1*), und eine Serin-Carboxypeptidase-like (SCPL)-Acyltransferase (*Sad7*, *SCPL1*) (Mugford et al., 2013; Osbourn et al., 1994). Ein diesem sehr ähnliches Gencluster zur Triterpensynthese befindet sich auch in *Arabidopsis thaliana* (Field und Osbourn, 2008). Ein weiteres Beispiel ist das Bx-Cluster in Mais, das für die Biosynthese der Benzoxazinoide codiert. Das Cluster enthält sieben Gene für die DI(M)BOA-Synthese (*Bx1-Bx6* und *Bx8*), darunter vier CYPs der CYP71C Familie (*Bx2-5*). Die Koexpression dieser Gene ist Voraussetzung für eine effektive Bildung der Phytoanticipine unter Vermeidung toxischer Intermediate. Die nachbarschaftliche Anordnung dieser Gene könnte Einfluss auf eine koordinierte Expression der Benzoxazinoïdbiosynthesegene haben (Frey et al., 1997; Frey et al., 2009; Jonczyk et al., 2008). Grundsätzlich ist Gen-Clustering jedoch keine Bedingung für eine koordinierte Synthese. Auch ist die Idee eines metabolischen Clusters in Pflanzen nicht strikt definiert. In der Regel ist jedoch das Gen für das erste Enzym eines Biosyntheseweges sowie mindestens ein weiteres beteiligtes Gen Bestandteil eines designierten Clusters, auch wenn einzelne Synthesegene außerhalb oder auf anderen Chromosomen lokalisiert sein können (Nützmann et al., 2016).

Ogleich es Gemeinsamkeiten zwischen bakteriellen Operons und pflanzlichen metabolischen Genclustern gibt, ist doch die Entstehung solcher Strukturen höchst unterschiedlich. Während in Bakterien der horizontale Gentransfer zur Verbreitung funktioneller Genomabschnitte führt, kommt es im Pflanzengenom vorwiegend bedingt durch Genduplikationen, Neufunktionalisierungen und Genomumstrukturierungen zur Bildung solcher gekoppelten Gengruppen (Field und Osbourn, 2008). Durch die Duplikation einzelner Gene oder kleinerer Genomabschnitte entstehen zahlreiche Tandemkopien. Im Menschen sind beinahe 11 % des gesamten Genoms Duplikate, die im Tandem, also in direkter Nachbarschaft zueinander, lokalisiert sind. In *Arabidopsis thaliana* sind es 17 % (Pan und Zhang, 2008; The Arabidopsis Genome, 2000). Mehrere Duplikationsereignisse haben auch im *Arabidopsis*-CYP71-Klan zu dessen Expansion geführt. Viele der Unterfamilien dieser CYP-Klasse enthalten im Tandem organisierte Duplikate, darunter die CYP71A-, CYP71B- und CYP81-Familie (Bak et al., 2011). Auch *CYP71A12* und *CYP71A13* sind Tandemkopien, ähnlich wie die im bereits erwähnten 83 kb CYP-Cluster auf Chromosom 3 verorteten Tandempaare *CYP71B16/17*, *CYP71B19/20*, *CYP71B21/22*, *CYP71B3/24*, *CYP71B4/25*, *CYP71B26/33*, *CYP71B34/35* sowie *CYP71B36/37*. Die durch Tandemkopien codierten

Enzympaare zeichnen sich generell durch große strukturelle Ähnlichkeit aus. Sie sind oft redundant in ihren Substratspezifitäten und Produktspektren. Doch können durch marginale Sequenzunterschiede bedingte Veränderungen im Duplikat zu einer Erweiterung der Substrat- und Produktpalette führen und so die Tür zu neuen Syntheseprodukten öffnen. Genduplikationen und Clusterformationen ähnlicher Gene führen damit zu einer erhöhten Diversifikation und bieten der Pflanze evolutionären Entfaltungsspielraum (zusammengefasst in Ober, 2005). Die Anwesenheit einer redundanten Kopie erschwert die Untersuchung der einzelnen Funktionen solcher Geschwistergene, da die Einzelmutante oft keinen vollständigen Verlust des jeweiligen Phänotyps zeigt. Dies gilt beispielsweise für die Myrosinasen *TGG1* und *TGG2*. Sie sind im Abstand von etwa 250 kb gekoppelt und katalysieren beide den enzymatischen Abbau von GSL in oberirdischen Geweben. Sie verfügen zudem über sehr ähnliche physikalisch-chemische Eigenschaften, wie eine ähnlich breite pH-Stabilität von etwa pH 5-10 (Zhou et al., 2012). Für die Generierung einer *tgg1 tgg2*-Doppelmutante erforderte es enormen *screening*-Aufwand, um aus der Kreuzung der beiden Einzelmutanten (T-DNA Insertionslinien für je *TGG1* und *TGG2*) die seltene meiotische Rekombination der gekoppelten T-DNA-Insertion zu erhalten (Barth und Jander, 2006). Die Tandemgene *CYP71A12* und *CYP71A13* sind in direkter Nachbarschaft auf Chromosom 2 lokalisiert. Die Beschreibungen ihrer überlappenden bzw. divergierenden Eigenschaften beruhen primär auf *in-vitro*-Daten (Klein et al., 2013). Erst mit dem vollständigen *Knock-out* des Tandems durch gezieltes *genome editing* kann die Funktion der einzelnen Gene gezielt *in vivo* untersucht werden. Die Generierung und phänotypische Beschreibung dieser *cyp71a12/13*-Doppelmutante ist Teil dieser Dissertationsschrift und wurde in der Zeitschrift *Plant Physiology* publiziert (Müller et al., 2015).

1.7. Genome Editing

Methoden, die es ermöglichen, zielgerichtet in das Genom einzugreifen, sind neben sich ebenfalls rasant entwickelnden Möglichkeiten der Sequenzierung weitere Meilensteine der Molekularbiologie der letzten zehn Jahre. Das sogenannte *genome editing* basiert dabei generell auf der Entwicklung von Nukleasen, die spezifisch und zielgerichtet an eine frei wählbare DNA-Sequenz binden. Eine solche DNA-bindende Domäne wird mit einer unspezifisch schneidenden Endonuklease fusioniert (Gaj et al., 2013).

Solche Nukleasen generieren am Ort ihrer DNA-Bindung Doppelstrangbrüche (DSBs), die wiederum das Ziel zelleigener Reparaturmechanismen sind. Durch *non-homologous end joining* (NHEJ) können die geschnittenen Stränge wieder zusammengefügt werden. Dieser Prozess ist jedoch teilweise fehleranfällig und geht daher oft mit in der Regel kleineren Basendeletionen oder –insertionen einher (Joung und Sander, 2013; zusammengefasst in Rodgers und McVey, 2016). DSBs können jedoch auch größere Chromosomenumstrukturierungen- und Translokationen verursachen (Ferguson und Alt, 2001). Mehrere Strangbrüche können auch zum Verlust eines ganzen DNA-Abschnittes führen. So sind zwei durch zielgerichtete Nukleasen verursachte DSBs eine Möglichkeit, um die innerhalb dieser Schnitte gelegenen Sequenzbereiche vollständig aus dem Genom zu deletieren (Ordon et al., 2017; Xiao et al., 2013). Neben einer Deletion ist auch ein Einbau einer beliebigen DNA-Sequenz an den Locus der Schnittstelle möglich. Bei paralleler Bereitstellung einer Donorsequenz mit flankierenden, mit dem Zielort überlappenden Sequenzabschnitten, kann die entsprechende Sequenz über homologe Rekombination auch in Pflanzengenome stabil eingebaut werden (Schiml und Puchta, 2016).

Die Idee der Genschere, die an beliebig gewählten Stellen im Genom Schnitte setzt, wurde zunächst durch Zink-Finger-Nukleasen umgesetzt. Der DNA-bindende Teil dieser Fusionsproteine besteht aus drei oder vier sogenannten Zinkfingern, Proteinschleifen, die über Cystein- und Histidinreste je ein Zinkion koordinativ gebunden haben. Die Primärsequenz innerhalb der Schleife ist für die Spezifität der Bindung an ein bestimmtes Basentriplet jeweils in der großen Furche der DNA verantwortlich. Zinkfinger motive sind als Bestandteil verschiedener DNA-bindender Proteine wie Transkriptionsfaktoren bekannt. Durch die Kopplung der Zinkfingerdomänen an eine Nuklease, in der Regel die Endonuklease *FokI*, entsteht das Restriktionsprotein, das zielgerichtet die DNA schneidet. Da *FokI* nur als Dimer aktiv ist, benötigt es zwei im richtigen Abstand zueinander bindende ZFNs, um einen Doppelstrangbruch herbeizuführen (Bitinaite et al., 1998; Townsend et al., 2009). Obwohl mit dieser Technologie Erfolge in verschiedensten Organismen erzielt wurden (Doyon et al., 2008; Kandavelou und Chandrasegaran, 2009; Lloyd et al., 2005), sind ZFNs insbesondere aufgrund des verhältnismäßig schwierigen Proteindesigns und dem damit einhergehenden schwer einzuschätzendem *off-target*-Potential, also dem Risiko, an

unbeabsichtigten Stellen im Genom Schnitte zu setzen, mittlerweile nicht mehr Mittel der Wahl.

Ein weiteres molekulares Werkzeug zur gezielten Erzeugung von DSBs sind TALENs (*transcription activator-like effector nucleases*). TALENs sind Fusionsproteine aus TAL-Effektoren und einer Endonuklease, erneut bevorzugter Weise *FokI* oder auch Nickasen. TAL-Effektoren wurden in einigen pflanzenpathogenen *Xanthomonas* spp. entdeckt. Es handelt sich Transkriptionsfaktoren, die über das Typ-III-Sekretionssystem in die Wirtszelle eingeschleust werden und dort direkt an die DNA binden. Sie bestehen aus mehreren repetitiven 33–35 Aminosäure großen Einheiten, wobei je eine Einheit für die spezifische Erkennung je einer DNA-Base sorgt (Bogdanove et al., 2010). Hierfür sind jeweils die variablen 12. und 13. Aminosäuren der repetitiven Einheit, die sogenannten *repeat-variable di-residues* (RVDs), entscheidend. Welche Aminosäurekombination welche DNA-Base erkennt, der sogenannte TALE-Code, wurde 2009 parallel von zwei Forschergruppen publiziert (Boch et al., 2009; Moscou und Bogdanove, 2009). Der modulare Aufbau der TALE-Proteine und das relativ einfache Codierungsschema für die DNA-Bindung erleichtern das *Design* von maßgeschneiderten TALE-Nukleasen verglichen mit ZFNs. TALENs, die Fusionsproteine aus einer TALE-Domäne und der *FokI*-Endonuklease, fungieren wie ZFNs aufgrund der Natur der *FokI* als Dimer (Abbildung 1-10). Ein TALEN-Monomer erkennt in der Regel 12-21 aufeinander folgende Nukleotide (Cermak et al., 2011).

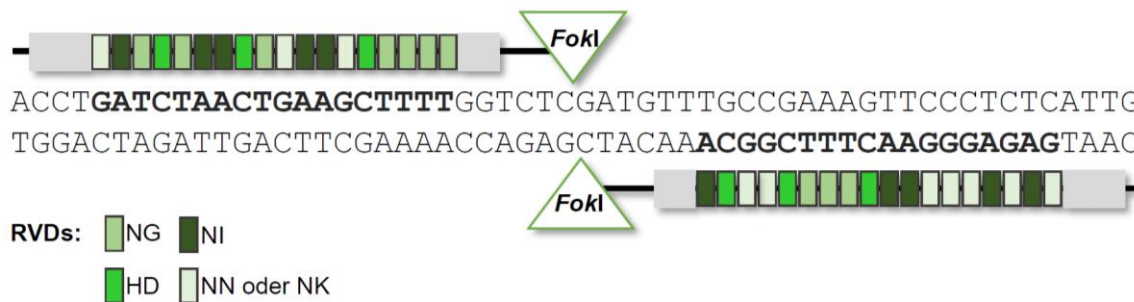


Abbildung 1-10: Schematische Darstellung eines TALEN-Paares. Die Bindung von zwei TALENs an beiden DNA-Strängen ermöglicht die Dimerisierung der *FokI*-Nukleasedomänen und so die Einführung eines DSBs. Der TALEN-Code beschreibt die RVD-vermittelte spezifische Bindung an die DNA-Basen: HD bindet C, NG bindet T, NN oder NK bindet G, NI bindet A.

Wie ZNFs fand auch die TALEN-Technologie in den letzten Jahren vielfältige Anwendung in der Genommanipulation. Die durch TALEN-Paare in verschiedenste Organismen wie Wirbeltiere, Insekten und Pflanzen eingeführten DSBs induzierten auf diese Weise unter anderem Genausschaltungen, Genreparaturen, Genadditionen und die Deletion ganzer DNA-Abschnitte einer Größe von mehreren Kilobasen (Gaj et al., 2013; Xiao et al., 2013).

In Pflanzen wurden TALENs beispielsweise angewandt, um das Fettsäuremuster von Sojaöl hin zu weniger mehrfach ungesättigten Fettsäuren zu verändern. Durch die Aktivität zweier

Fettsäuredesaturasen (FAD2-1A und FAD2-1B) enthält das Öl der Sojabohne (*Glycine max*) etwa 50 % Linolensäure, was technologisch nachteilig ist. Aufgrund der Homologie der beiden Gene konnte mit einem TALEN-Paar, das auf einen konservierten Sequenzabschnitt beider Gene abzielte, gleichzeitig in beiden Genen ein DSB erzeugt werden. Diese resultierten in Mutationen in beiden Desaturasen. In dem aus Sojabohnen der Folgegeneration gewonnenen Öl ist der Linolensäureanteil drastisch reduziert, bei gleichzeitiger Erhöhung des Ölsäureanteils, dem FAD2-Substrat (Haun et al., 2014). Auch im Rahmen dieser Arbeit wurde ein TALEN-Paar genutzt, um die homologen Tandemgene *CYP71A12* und *CYP71A13* in *Arabidopsis thaliana* auszuschalten (siehe 4.2).

Die neueste Technologie des *genome editing* funktioniert anders als ZFNs und TALENs nicht über das spezifische Erkennen eines DNA-Abschnittes über ein maßgeschneidertes Protein, sondern über eine RNA-gelenkte DNA-Erkennung. Das CRISPR-System (*clustered regularly interspaced palindromic repeats*) wurde als adaptives Immunsystem von Bakterien und Archaeen identifiziert (Horvath und Barrangou, 2010; Mojica et al., 2005).

Ein RNA-Abschnitt (CRISPR-RNA, crRNA) bindet dabei komplementär an die Ziel-DNA, beispielsweise Phagen-DNA. In Kombination mit der Endonuklease Cas9 (*CRISPR-associated 9*), die einen weiteren assoziierten RNA-Abschnitt (*trans-activating crRNA*, tracrRNA) bindet und die Ziel-DNA schneidet, wird die Fremd-DNA zerstört. Dieser Resistenzmechanismus kann zur Genom-Editierung genutzt werden, da der variable 20 Basen lange DNA-bindende Abschnitt der crRNA sich entsprechend jeder beliebigen Zielsequenz codieren lässt. Einzige Voraussetzung ist das Vorhandensein eines direkt angrenzenden *protospacer adjacent motif* (PAM), das für die Bindung der Cas-Endonuklease essentiell ist. Für die häufig verwendete Cas9 aus *Streptococcus pyogenes* lautet die benötigte PAM-Sequenz 5'-NGG-3'. Da dieses PAM jedoch sehr häufig ist, im Humangenom kommt es etwa alle 8-12 bp vor, stellt dies kaum eine Einschränkung dar (Anders et al., 2014; Cong et al., 2013). Zudem können crRNA und tracrRNA zu einer chimären *single-guide* RNA (sgRNA, Abbildung 1-11) fusioniert werden. Hierdurch, sowie durch die Wahl einer geeigneten, zum Teil codonoptimierten, Cas9, wurde das prokaryotische System auch für eukaryotische Organismen adaptierbar (Cong et al., 2013; Jinek et al., 2012).

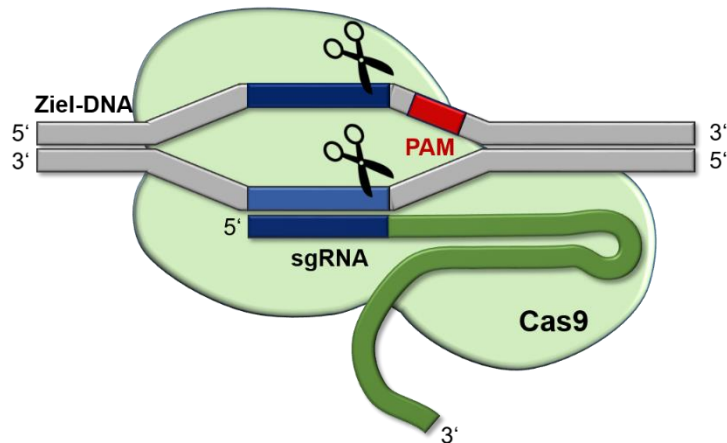


Abbildung 1-11: Vereinfachtes Schema des CRISPR/Cas9-Systems. Der 5'-Abschnitt der chimären sgRNA bindet komplementär an die Ziel-DNA (blau) und die Sekundärstruktur des 3'-Abschnitts (grün) vermittelt die Bindung an die Cas9-Nuklease. Der DSB wird durch die Endonuklease wenige DNA-Basen *upstream* des PAM eingeführt (Scherensymbol).

Die Erkennung der DNA-Zielsequenz über komplementäre RNA-Basen erleichtert das Design dieser molekularen Scheren. Zahlreiche Online-Tools wie E-CRISP (<http://www.e-crisp.org/E-CRISP/index.html>, Heigwer et al., 2014) ermöglichen ein schnelles Auffinden geeigneter Zielsequenzen unter bestmöglicher Vermeidung potentieller *off-targets*. Das CRISPR/Cas9 System hat sich daher als Standardlabormethode weltweit etabliert. Auch in Pflanzen, von Modellpflanzen wie *Arabidopsis thaliana* oder *Nicotiana benthamiana*, wichtigen Kulturpflanzen wie Reis (*Oryza sativa*), Mais oder Soja, bis hin zu Orange (*Citrus sinensis*) und Weinrebe (zusammengefasst in Liu et al., 2017), wird diese Technik angewendet. Meist werden Gene durch fehlerhaftes NHEJ der geschnittenen DNA-Stränge ausgeschaltet, aber auch eine nach CRISPR/Cas9-Schnitt über homologe Rekombination eingebrachte Geninsertion in *Arabidopsis thaliana* wurde gezeigt (Schiml et al., 2014).

Alle drei beschriebenen Genschere haben den Vorteil, dass es mit ihnen möglich ist, genetisch modifizierte, jedoch nicht-transgene Pflanzen zu erzeugen. Selbst wenn das jeweilige Konstrukt zunächst stabil in das Genom der Pflanze integriert wird, so segregiert es meist unabhängig von der durch sein Transkript herbeigeführten Mutation und kann so in den Folgegenerationen entfernt werden. Dies eröffnet neue Möglichkeiten auch für das *metabolic engineering* von Nutzpflanzen, da die transgene Natur von genetisch modifizierten Pflanzen bis dato einen wichtigen Punkt der Gentechnik-Kontroverse darstellt. Bei der Erforschung einer bestimmten Genfunktion kann hierdurch außerdem sichergestellt werden, dass ein veränderter Phänotyp tatsächlich durch die eingeführte Mutation und nicht etwa durch die zuvor ins Genom eingebrachte CRISPR- oder TALEN-DNA mitsamt Promotoren, Terminatoren und Resistenzgenen bedingt ist. Durch die Möglichkeit, mehrere Mutationen einzuführen bzw. ganze Genomabschnitte zu deletieren, eignen sich die Methoden des

genome editings zudem in besonderem Maße dazu, die in Abschnitt 1.6 beschriebenen Hindernisse bei der Erforschung redundanter Gene oder Gencluster zu adressieren.

2. Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist, ein erweitertes Verständnis des Synthesenetzwerks IAOx-abhängiger Metabolite zu erhalten. Diese sekundären Metabolite werden ausgehend von der Aminosäure Tryptophan teils konstitutiv, teils nach Induktion durch verschiedene Stressoren, gebildet. Hierbei ist insbesondere die mögliche Verknüpfung dieser beiden Synthesysteme interessant.

Im Zentrum steht dabei zunächst die *in-vivo*-Charakterisierung der IAOx-Dehydratasen CYP71A12 und CYP71A13. Die beiden Schlüsselenzyme der Camalexinbiosynthese unterscheiden sich in ihren Produktspektren. Welche Bedeutung diese Unterschiede in der Pflanze haben, ist noch unklar. Es soll eine Doppelmutante der beiden Gene, die im Tandem auf Chromosom 2 des *Arabidopsis thaliana*-Genoms lokalisiert sind, generiert werden. Hierfür werden TALE-Nukleasen verwendet, die in den *cyp71a13*-Hintergrund eingebracht und über die eine Mutation in *CYP71A12* erwirkt werden soll. Die Doppelmutanten sollen auf ihren metabolischen Phänotyp, insbesondere auf Camalexin und seine Vorstufen, untersucht werden. Ein Pathogenexperiment mit dem Camalexin-sensitiven Pilz *Botrytis cinerea* soll außerdem Aufschluss auf die Rolle der *CYP71A12* bzw. *CYP71A13*-abhängigen Metabolite in der Pflanzenabwehr geben. Parallel soll auch CYP71A18, eine weitere, möglicherweise redundante IAOx-Dehydratase, auf seine Abwehrrelevanz in *Arabidopsis* untersucht werden. Hierfür sollen durch Kreuzung *CYP71A*-Mehrfachmutanten generiert werden. Zudem bietet die Kreuzung der *cyp71a12/a13*-Doppelmutante mit den putativen Synthesegenen der ICHO- und ICOOH- Derivate, *CYP71B6* und *AAO1*, die Möglichkeit, detailliertere Einblicke in die Synthesewege dieser induzierbaren Indole zu gewinnen.

Mit modernen Methoden des *genome editing* ist es möglich, große DNA-Abschnitte aus dem Pflanzengenom zu deletieren. Diese Technologie soll genutzt werden, um ein 83 kb großes Gencluster mit 18 *CYP71Bs* auf Chromosom 3 zu entfernen. Die CYPs unbekannter Funktion könnten eine Rolle im (indolischen) Sekundärmetabolismus von *Arabidopsis thaliana* spielen. Ihre Analyse mit Hilfe von Einzelmutanten wäre wahrscheinlich jedoch aufgrund möglicher Redundanzen schwierig. Die Clustermutanten sollen anschließend auf ihren metabolischen Phänotyp analysiert werden und so Hinweise darauf geben, welche Biosynthesewege durch die Deletion der *CYP71Bs* betroffen sind.

3. Material und Methoden

3.1. Geräte und Chemikalien

Alle verwendeten Standardchemikalien sowie die verwendeten Antibiotika und Analytikstandards wurden, wenn nicht anders angegeben, von Bio-Rad Laboratories GmbH (München), Carl Roth GmbH & Co KG (Karlsruhe), Merck KGaA (Darmstadt), Serva (Heidelberg) oder Sigma-Aldrich GmbH (USA, Lokalstandort München) bezogen. Methanol und Acetonitril in HPLC-Qualität stammen von J.T. Baker Chemicals (Avantor Performance Material, Center Valley, USA). Gereinigtes Wasser für wurde über die hauseigene Bidestillationsanlage generiert. Hersteller von Enzymen, verwendete Kits sowie verwendete Geräte werden im Methodentext an entsprechender Stelle aufgeführt.

3.2. Pflanzen und Mikroorganismen

3.2.1. Pflanzenanzucht und -handhabung

Anzucht auf Erde

Arabidopsis Samen wurden auf ein 3:1 Erde/Sand Gemisch (Einheitserde Typ *CL T*) ausgebracht und 2 Tage bei 4 °C stratifiziert. Die Aufzucht erfolgte in einer Pflanzenkammer mit 12 h/12 h Tag/Nacht Zyklus bei einer Lichtintensität von 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ und einer relativen Luftfeuchte von 50 % und einer Temperatur von 22 °C. Nach 6-10 Tagen konnten die Keimlinge vereinzelt werden.

Basta®-Selektion auf Erde

Genetisch modifizierte Linien, die das Resistenzmarkergen *bar* gegen das Herbizid Phosphinothricin (PPT, auch Glufosinat, Markenname Basta®) exprimieren, konnten von wildtypischen Pflanzen durch tägliches Besprühen mit verdünnter Basta®-Lösung (Bayer CropScience AG; verdünnt auf 200 mg/L Glufosinat-Ammonium) der Keimlinge über etwa 5 Tage selektioniert werden.

Anzucht auf Agar-Platten (mit/ohne Selektion)

Für die Anzucht auf Agarplatten wurden die Samen zunächst oberflächensterilisiert. Dafür wurden sie mit 80 %-igem Ethanol (Volumenprozent, Vol.) gewaschen und anschließend mit Hypochlorit (4 % Vol.)/ Triton X100 (0,05% Vol.) für 15 min inkubiert. Die Samen wurden 4-mal mit sterilem H₂O bidest. gewaschen und auf die festen ½ Murashige & Skoog (MS) Mediumplatte ausgebracht, für 2 Tage bei 4 °C stratifiziert und im Lichtschrank unter Dauerlicht angezogen. Nach etwa 7 Tagen konnten die Keimlinge auf Erde umgesetzt werden.

½ MS Medium (fest)

- Murashige & Skoog basal salt mixture (Duchefa, Haarlem, Niederlande) 2,2 g
- Saccharose 20 g
- Agar 9 g

Auffüllen auf 1 Liter mit vollentsalztem Wasser. Der pH-Wert wurde auf 5,6- 5,8 mit Natronlauge eingestellt. Die Suspension wurde autoklaviert (121 °C, 20 min), bei Raumtemperatur gelagert und bei Bedarf in der Mikrowelle aufgeschmolzen. Die Zugabe von Antibiotika für Selektionsexperimente erfolgte zu dem auf etwa 60 °C abgekühlten Medium.

Kreuzung von *Arabidopsis thaliana*

Vor der Kreuzung wurden an der Mutterpflanze alle bereits gebildeten Schoten und nicht verwendete Seitentriebe entfernt. Es wurden nur gerade noch geschlossene Blüten verwendet, in denen noch keine Selbstung stattgefunden hat. Die Blüten wurden unter dem Binokular (Stemi 2000, Zeiss) mit einer Pinzette geöffnet und die Stamina entfernt. Auch alle nicht bearbeiteten Blüten wurden abgeschnitten. Nach 24 h Ruhezeit wurde die Bestäubung der freigelegten Narbe mit dem Pollen der Vaterpflanze durchgeführt, ebenfalls unter dem Binokular. Danach wurden die gekreuzten Pflanzen in der Pflanzenkammer bis zur Ernte der Kreuzungs-Schoten weitergezogen (2-3 Wochen).

Pflanzentransformation (*floral dip*)

Um stabil transformierte *Arabidopsis thaliana*-Linien zu generieren, wurde das *floral dip*-Verfahren von Clough und Bent (1998) angewandt. Für den DNA-Transfer mittels *A. tumefaciens* wurde zunächst eine 200 ml Kultur von Agrobakterien, welche das entsprechende Konstrukt enthielten, angezogen (28 °C, 200 rpm). Die Zellen wurden abzentrifugiert (JA10, Beckman Coulter Avanti J-26 XP, 3000 rpm, 4 °C, 15 min; Beckman Coulter, Brea, USA/ München) und in 250 ml Transformationspuffer resuspendiert. Die blühenden *Arabidopsis* wurden dann für 1 min in der Bakteriensuspension geschwenkt. Die Pflanzen wurden anschließend über Nacht mit Folie eingefasst, um eine erhöhte Luftfeuchte zu gewährleisten. Nach 5-7 Tagen wurde der Vorgang wiederholt. Abgereifte Samen wurden bei der Keimung mittels konstruktsspezifischen Antibiotika selektiert (siehe Tabelle 3-1).

Pflanzentransformationspuffer

- 10 mM MgCl₂
- 50 g/L Saccharose
- 0,01 % (Vol.) Silwet L-77

Induktion der Phytoalexinbiosynthese

Die Induktion erfolgte sowohl mit biotischen als auch abiotischen Stressoren. Als Material wurden die Rosettenblätter Nummer 8-11 (Farmer et al., 2013) von 6 Wochen alten Pflanzen verwendet.

Abiotische Phytoalexininduktion

Zur abiotischen Induktion der Camalexinbiosynthese wurden zwei unterschiedliche Stressoren verwendet, UV-C Strahlung und Silberionen. Abgeschnittene Rosettenblätter wurden in eine offene Petrischale auf ein feuchtes Filterpapier gelegt. Zur UV-Behandlung wurden sie 2 h mit UV-Licht bestrahlt (Lampe: Desaga UVVIS, $\lambda = 254$ nm, 8 W, Abstand 20 cm). Danach wurde die Platte mit dehnbare Verschlussfolie (Parafilm, Pechiney Plastic Packaging, USA) verschlossen und in der Anzuchtammer für 22 h inkubiert.

Für die Silberinduktion wurden die Blätter mit Hilfe eines Pumpzerstäubers dicht mit einer 5 mM AgNO_3 -Lösung besprüht und anschließend 24 h in der Anzuchtammer inkubiert. Nach der jeweiligen Behandlung wurden die Blätter gewogen (Frischgewicht) und in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Bis zur Metabolitextraktion wurden die Blätter bei -80 °C gelagert.

Biotische Phytoalexininduktion

Für die biotische Phytoalexininduktion wurde eine *Botrytis cinerea*- Sporensuspension mit der Konzentration 10^5 Konidien/ml verwendet. Die genaue Vorgehensweise ist im nächsten Abschnitt beschrieben (siehe 3.2.2). Nach der Behandlung wurden die Blätter gewogen (Frischgewicht) und in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Bis zur Metabolitextraktion wurden die Blätter bei -80 °C gelagert.

3.2.2. *Botrytis cinerea* – Anzucht und Handhabung

Die Kultur (Stamm B05.10, Staats und van Kan, 2012) wurde als Ausstrich eines Sporenglycerolstocks vom Lehrstuhl für Phytopathologie am Wissenschaftszentrum Weihenstephan der TU München erhalten und weitergezogen.

Anzucht

Für die Heranzucht der Sporen aus dem Glycerolstock wurden mit einer sterilen Impföse einige Sporen auf eine Platte Erdbeermedium ausgestrichen. Die Platte wurde im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 3-5 Tagen wurde die Platte mit Parafilm verschlossen. Nach 8-10 Tagen verfärbte sich die Pilzkultur dunkel, nach ca. 14 Tagen waren die Sporen reif. Alle 6-8 Wochen bzw. 14 Tage vor einem Experiment wurden die Sporen auf eine frische Gamborg B5 Platte umgeimpft und analog angezogen. Zur Erhaltung der Pathogenität des Pilzes wurde die Kultur alle paar Monate auf Erdbeermedium gezogen.

Herstellung und Verwendung der Sporensuspension

Die Sporenlösung wurde von einer dicht bewachsenen, reifen, etwa 14- 21 Tage alten Gamborg B5 Platte gewonnen. Das mit Sporen besetzte Pilzgeflecht wurde in flüssigem Gamborg B5 Medium suspendiert. Das Pilzgeflecht wurde durch eine mit Glaswolle gestopfte Pipettenspitze abfiltriert und die Konzentration der Sporensuspension mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Die Suspension konnte bis Gebrauch einige Stunden im Kühlschrank aufbewahrt werden.

Glycerolstock

Zur Erstellung eines Glycerolstocks wurde die frische Sporensuspension 1+1 mit sterilem 50 %-igen (Vol.) Glycerol versetzt und bei -80 °C gelagert.

Arbeitslösung

Die Sporenlösung wurde mit flüssigem Gamborg B5 Medium auf eine Konzentration von $1-2 \times 10^5$ Konidien/ml eingestellt und innerhalb weniger Stunden verwendet.

Camalexininduktion und Bestimmung der Lesionsstärke

Die Infektion von *Arabidopsis*-Blättern mit der Konidien suspension wurde stets zwischen 13 und 14 Uhr durchgeführt, da der Zeitpunkt der Infektion Einfluss auf die Infektionsstärke hat (Hevia et al., 2015). Die Sporenarbeitslösung wurde zur Camalexininduktion in ein Glasfläschchen mit Pumpaufsatz überführt und gleichmäßig auf die abgeschnittenen Rosettenblätter gesprüht. Die Blätter inkubierten in mit Verschlussfolie umfassten Petrischalen auf feuchtem Filterpapier in der Pflanzenanzuchtkammer. Die Phytoalexinextraktion aus den Blättern erfolgt nach 48 Stunden.

Für die Bestimmung der Infektionsstärke wurden die abgeschnittenen Rosettenblätter von 6 Wochen alten *Arabidopsis* auf 0,8 % Wasser-Agar Platten gelegt und mit 5 µl Sporensuspensionstropfen versehen. Die Platten wurden mit dehnbare Verschlussfolie verschlossen und in der Pflanzenanzuchtkammer inkubiert. Nach 72 Stunden wurden die Läsionen unter dem Mikroskop fotografiert (Zeiss Stemi SV11 Diskussionsmikroskop mit angeschlossener Kamera Nikon D80) und die Läsionsgröße mit Hilfe des Programms ImageJ2 bestimmt. Die Läsion wurde hierzu zwei Mal im rechten Winkel zueinander vermessen. Der Durchschnitt aus Länge und Breite der Läsion ergab die Läsionsgröße.

Erdbeermedium, fest

Nach (Zhang et al., 1994).

- 200 g Tiefkühlerdbeeren (ungesüßt), im Mörser zermahlen
- 25 g Agar

Auffüllen auf 1 Liter mit vollentsalztem Wasser. Der pH-Wert wurde mit Natronlauge auf 5,0 eingestellt. Die Suspension wurde autoklaviert (121 °C, 20 min), bei Raumtemperatur gelagert und bei Bedarf in der Mikrowelle aufgeschmolzen.

Gamborg B5 Medium mit Glukose, flüssig/fest:

Dieses Flüssigmedium wurde für die Herstellung der Sporensuspension und für das Anlegen von Glycerolstocks verwendet. Das feste Medium diente zur Anzucht des Pilzes.

- Gamborg B5 Medium mit Vitaminen (Duchefa, Haarlem, Niederlande) 1,58 g
- Glukose 10 g
- KH₂PO₄ 0,69 g (entspricht 10 mM)

Auffüllen auf 1 Liter mit vollentsalztem Wasser. Der pH-Wert wurde mit Natronlauge auf 5,5 eingestellt. Die Lösung wurde steril filtriert (Spritzenvorsatzfilter 0,20 µM), in 50 ml Aliquote aufgeteilt und bei -20 °C bis zum Gebrauch aufbewahrt. Festes Medium enthielt zusätzlich 15 g Agar/l, wurde autoklaviert (121 °C, 20 min), lichtgeschützt bei Raumtemperatur gelagert und bei Bedarf in der Mikrowelle aufgeschmolzen.

3.2.3. Bakterienanzucht und Handhabung (*E. coli* und Agrobakterien)

E. coli und Agrobakterien wurden auf dYT-Medium angezogen. *E. coli* wurden bei 37°C etwa 12- 18 Stunden (über Nacht), Agrobakterien bei 28°C über in der Regel für 48 Stunden inkubiert.

dYT-Medium, flüssig/fest (Sambrook et al., 1989)

- 16 g Pepton
- 10 g Hefeextrakt
- 5 g NaCl
- 15 g Agar (für festes Medium)

Auffüllen auf 1 Liter mit vollentsalztem Wasser. Die Suspension wurde autoklaviert (121 °C, 20 min), bei Raumtemperatur gelagert. Festes Medium wurde bei Bedarf in der Mikrowelle aufgeschmolzen. Die Zugabe von Antibiotika für Selektionsexperimente erfolgte zu dem auf etwa 60 °C abgekühlten Medium. In dieser Arbeit verwendete Selektionssubstanzen sind in Tabelle 3-1 aufgeführt.

Tabelle 3-1 Antibiotika und weitere Substanzen für die selektive Bakterien- und Pflanzenanzucht

Substanz	Konzentration	Stocklösung	Medium	Verwendung/Vektor
Ampicillin (Amp)	100 µg/ml	100 mg/ml	dYT	pGEMt-Easy
Gentamycin (Gent)	25 µg/ml	25 mg/ml	dYT	Agrobakterium GV3101 MP90
Hygromycin (Hyg);Keimlinge	30 µg/ml	30 mg/ml	½ MS	CRISPR/Cas9 Plasmide
Isopropyl-β-D-thio-galactopyranosid	200 µM	100 mM	dYT	Blau-weiß Selektion pGEMt-Easy

(IPTG)				
Kanamycin (Kan); Bakterien	50 µg/ml	50 mg/ml	dYT	TALEN- und CRISPR/Cas9 Plasmide
Kan; Keimlinge	50 µg/ml	50 mg/ml	½ MS	TALEN- Plasmide
Phosphinotricin; Bakterien	25 µg/ml	25 mg/ml	dYT	TALEN- Plasmide
Phosphinotricin; Keimlinge	25 µg/ml	25 mg/ml	½ MS	TALEN- und CRISPR/Cas9 Plasmide
Rifampicin (Rif))	50 µg/ml	50 mg/ml	dYT	Agrobakterium GV3101 MP90
Tetracyclin (Tet)	10 µg/ml	10 mg/ml	dYT	<i>E. coli</i> XL1 Blue
5-Brom-4-chlor-3- indoxyl-β-D-galac- topyranosid (X-Gal)	40 µg/ml	20 mg/ml (in DMSO)	dYT	Blau-weiß Selektion pGEMt-Easy

Herstellung und Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Eine Einzelkolonie *E. coli* XL 1 Blue wurde in 3 ml dYT-Flüssigmedium mit 10 µg/ml Tet angeimpft und über Nacht bei 37 °C im Rollinkubator angezogen. Am Folgetag wurden 100 ml (2 x 50 ml) dYT Flüssigkultur damit beimpft ($OD_{550nm} < 0,1$) und bis zu $OD_{550nm} = 0,4-0,5$ gezogen. Die Zellen wurden pelletiert (Beckman Coulter Allegra X-22R, 4500 rpm, 4 °C, 10 min), der Überstand verworfen, und mit je 15 ml eiskalten TBFI gewaschen. Die Bakterien wurden erneut zentrifugiert (4500 rpm, 4 °C, 5 min) und die Pellets in je 1,8 ml TBFI resuspendiert. Die Suspension wird zu 100 µl aliquotiert und bis zur Verwendung bei -80 °C eingefroren und gelagert.

TBFI

- 30 mM K-Acetat
- 50 mM MnCl₂
- 100 mM RbCl
- 10 nM CaCl₂
- 15 % Vol. Glycerin

Einstellen auf pH Wert = 5,0, sterilfiltrieren.

TBFII

- 10 mM NaMOPS (3-(N-Morpholino)propansulfonsäure); pH 7,0
- 10 mM RbCl
- 15 mM CaCl₂
- 15 % Vol. Glycerin

Sterilfiltrieren.

Zur Transformation wurde ein Aliquot kompetenter *E. coli* XL 1 Blue-Zellen auf Eis aufgetaut. Die Plasmid-DNA (50-100 ng) oder ein Ligationsansatz wurde zugegeben und für 10 min auf

Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien für den Hitzeschock für 2 min in ein 42 °C warmes Wasserbad gegeben und danach wieder auf Eis gestellt. Es wurden 300 µl dYT-Medium zugegeben und 45 min bei 37 °C im Rollinkubator vorinkubiert. Die Kultur wurde auf eine dYT-Agarplatte (ggf. mit Antibiotika) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Herstellung und Transformation elektrokompeter Agrobakterien

5 ml einer Agrobakterien-Vorkultur (*Agrobacterium tumefaciens* MP90 GV3101) wurden in 200 ml dYT-Flüssigmedium (Rif 50 µg/ml, Gent 25 µg/ml) überführt. Die Kultur wurde über Nacht bei 28 °C und 200 rpm inkubiert, in 4x 50 ml aufgeteilt und die Zellen anschließend pelletiert (Beckman Coulter Allegra X-22R, 4500 rpm, 4 °C, 12 min). Die Pellets wurden mit je 45 ml 10 %-iger eiskalter, steriler Glycerinlösung gewaschen und erneut zentrifugiert. Anschließend werden je 2 Pellets in insgesamt je 45 ml eiskalter Glycerinlösung gewaschen. Nach Zentrifugation folgten zwei weitere Waschschrirte mit einmal insgesamt 20 ml (erneute Vereinigung zweier Pellets) und einmal 4 ml Glycerinlösung. Die Bakterien wurden schließlich in 2 ml Glycerinlösung resuspendiert, zu 100 µl aliquotiert und bis zur Verwendung bei -80°C eingefroren und gelagert.

Zur Transformation wurde ein Aliquot kompetenter *Agrobacterium tumefaciens* MP90 GV3101 auf Eis aufgetaut und nach Zugabe der Plasmid-DNA (ca. 100 ng) in Elektroporationsküvetten (2 mm Spaltbreite; VWR, Radnor, Pennsylvania, USA) überführt. Die Elektroporation erfolgte mittels dem Gene-Transfection-Pulser System (Biorad, Hercules, California, U.S.A.) unter den Parametern: 2,5 kV, 25 µF und 400 Ω. Im Anschluss wurden 1 ml dYT- Flüssigmedium zugegeben, der Ansatz in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt und anschließend bei 28 °C für 2 h inkubiert (Rollinkubator). Die Zellen wurden anschließend auf einer dYT-Agarplatte, zur Selektion versetzt mit entsprechenden Antibiotika, ausgebracht und bei 28 °C für 2 Tage gezogen.

3.3. Molekularbiologische Methoden

3.3.1. DNA-Methoden

Extraktion genomischer DNA aus *Arabidopsis*

20-80 mg Blatt- oder Sprossmaterial wurden in flüssigem Stickstoff homogenisiert und mit 800 µl DNA-Extraktionspuffer (vorgewärmt auf 65 °C), versetzt. Die Suspension wurde bei 65 °C im Thermoschüttler (HLC ThermoMixer, DITABIS, Pforzheim) inkubiert. Danach wurden 500 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zugegeben, durch Invertieren gemischt und zentrifugiert (Beckman Coulter GS-15R, 14000 rpm, 2 min). Die obere Phase wurde abgenommen und die enthaltene RNA mit RNase verdaut (30 µg/ml, 37 °C, 30 min). Durch Zugabe von 550 µl Isopropanol wurde die DNA ausgefällt. Nach der Zentrifugation (Beckman Coulter GS-15R, 14000 rpm, 15 min) wurde das Pellet mit 800 µl Ethanol (70 % Vol.)

gewaschen und anschließend an der Luft getrocknet. Die Resuspension erfolgte in 50- 100 µl T 0,1xE- Puffer (TE Puffer mit verringertem EDTA-Anteil).

DNA-Extraktionspuffer

- 100 mM Tris-HCl (Stocklösung 1 M, pH 8)
- 500 mM NaCl
- 50 mM EDTA (Stocklösung 0,5 M, pH 8)
- 10 mM β-Mercaptoethanol (frisch zugeben)

T 0,1xE Puffer

- 100 mM Tris-HCl (Stocklösung 1 M, pH 8)
- 50 µM EDTA (Stocklösung 0,5 M, pH 8)

Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Zweckgemäß wurden verschiedene Polymerasen für verschiedene Anwendungen eingesetzt. Für eine Standard-PCR mit genomischer- oder Plasmid-DNA als Templat sowie für die Überprüfungen einer Bakterien-Flüssigkultur (Kolonie-PCR) wurde die Go Taq® Polymerase (Promega, Madison, Wisconsin, USA) verwendet. Da diese Polymerase 3'-Adenin-Überhänge generiert, wurde sie auch verwendet, wenn das Produkt in den pGEM®-T Easy-Vektor kloniert werden sollte. Für sonstige Klonierungen und für die Amplifikation längerer DNA-Abschnitte (etwa ab 1,5 kb) wurde die Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs; Ipswich, Massachusetts, USA; NEB) eingesetzt. Die Phire Hot Start II DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) diente für größere Pflanzen-Screens, bei denen als Templat Blattmaterial verwendet wurde, das direkt in den PCR-Mix gegeben wurde (*Leafdisc*-PCR). Das Blatt wurde hierfür mit einer 0,5-20 µL Pitettenspitze ausgestanzt (Ø 0,5 mm, Precision tip DL10, Gilson, Middleton, Wisconsin, USA). Die Zusammensetzung der jeweiligen Reaktionsansätze ist in Tabelle 3-2 zusammengefasst. Alle PCRs werden in T1 Thermocyclern von Biometra (Teil von Analytik Jena, Jena) nach den in Tabelle 3-3 aufgeführten Temperaturprogrammen durchgeführt.

Tabelle 3-2 Zusammensetzung der PCR-Reaktionsansätze für verschiedene Polymerasen

	Go Taq® Polymerase	Phire II Polymerase	Q5 Polymerase
Templat	1 ng DNA	Blattstanze (Ø 0,5 mm)	1 ng DNA
5x Green Go Taq® Puffer	4 µl	-	-
2x Phire Plant PCR Buffer (inkl. dNTPs)	-	10 µl	-
5x Q5 Reaktions-Puffer	-	-	4 µl
dNTPs (10 mM)	2 µl	-	2 µl
Primer <i>forward</i> (10 µM)	1 µl	1 µl	1 µl
Primer <i>reverse</i> (10 µM)	1 µl	1 µl	1 µl
Polymerase	0,2µl	0,2 µl	0,2 µl
H ₂ O bidest.		auf 20 µl auffüllen	

Tabelle 3-3 Temperaturprogramme für PCR-Reaktionen mit verschiedenen Polymerasen

	Go Taq® Polymerase		Phire II Polymerase	Q5 Polymerase
	Standard-PCR	Kolonie-PCR		
Initiale Denaturierung	95 °C/ 2 min	95 °C/ 5 min	98 °C/ 5 min	98 °C/ 2 min
Zyklus:				
Denaturierung	95 °C/ 30 s	95 °C/ 30 s	98 °C/ 15 s	98 °C/ 15 s
Primer-Anlagerung	x °C/ 20 s	x °C/ 20 s	x °C/ 15 s	x °C/ 20 s
Elongation	72 °C/ 45s/kb	72 °C/ 45s/kb	72 °C/ 20s	72 °C/ 30s/kb
Abschluss- Elongation	72 °C/ 2 min	72 °C/ 2 min	72 °C/ 1 min	72 °C/ 2 min
Kühlen	4 °C/ 1 min	4 °C/ 1 min	4 °C/ 1 min	4 °C/ 1 min
Anzahl Zyklen:	20-30 x	35 x	40 x	25-35 x

Quantitative real time-PCR (RT-qPCR)

Die RT-qPCR-Reaktionen wurden mit dem LightCycler® 480 (Roche Life Science, Basel, Schweiz) durchgeführt. Die cDNA wurde gemäß 3.3.2 erhalten. Die PCR wurde im 10 µl Ansatz nach folgendem Schema zusammengesetzt (Tabelle 3-4):

Tabelle 3-4: Reaktionsansatz für die RT-qPCR

Komponente	Volumen [µl]
cDNA (1+1 verdünnt)	2
2x SensiFAST SYBR® No-ROX Mix (Bioline)	5
Primer-Mix (je 5 µM)	1
H ₂ O bidest.	2

Es wurde ein 3-Schritt-Temperaturprogramm mit anschließender Schmelzkurvenanalyse des PCR-Produktes gemäß Tabelle 3-5 gefahren.

Tabelle 3-5 Temperaturprogramm für die RT-qPCR mit Schmelzkurvenanalyse

	Temperatur/ Zeit
Initiale Denaturierung	95 °C/ 5 min
Zyklus (45 mal):	
Denaturierung	95 °C/ 10 s
Primer-Anlagerung	x °C/ 10 s
Elongation	72 °C/ 30 s pro kb
Kühlen	4 °C/ 1 min
Schmelzkurve	60 °C- 95 °C
Signaldetektion während der Zyklen	78 °C (GAPC1: 82 °C)

Die Auswertung erfolgte mit der LightCycler® 480 Software: absolute Quantifizierung mit Hilfe einer externen Kalibrierung (3 Punkte), Bestimmung des Cp-Wertes (*crossing point*) als Maximum der 2. Ableitung. Weitere Auswertungsschritte wurden mit Microsoft® Excel® 2007 oder 2016 durchgeführt.

Liste verwendeter Primer

Tabelle 3-6 gibt eine Übersicht über die für PCR und RT-qPCR verwendeten Primer mit Ausnahme der für die Klonierung der CRISPR/Cas9-Konstrukte eingesetzten Oligonukleotide (siehe Tabelle 3-7).

Tabelle 3-6 Funktionsbeschreibung, Namen und Sequenzen (5'→3') verwendeter Primer. Primernamen gemäß der Primerliste der Arbeitsgruppe apl. Prof. E. Glawischnig. FR: flankierende Region, LB: *left border*.

Funktion	Primernamen	Sequenz (5'→3')
qPCR <i>CYP71A12</i> (Fragment)	71A12-r	TTAAATAACGGAAGATGGAAATG
	71A12-RT-f	CATGATATTGGATATGTTTATAGG
qPCR <i>CYP71A13</i> (Fragment)	A13-RT-F	TATGATCTTGGATATGTTTATCGGAGG
	A13-RT-R	ATTGATTATCACCTCTGTCCCTG
qPCR <i>Aktin 1</i> (Fragment)	Aktin fw Tom RT-PCR	TGGAACTGGAATGGTTAAGGCTGG
	Aktin rev Tom RT PCR	TCTCCAGAGTCGAGCACAAATACCG
qPCR <i>GAPC1</i> (Fragment)	GAPDHFw	GCACCTTTCCGACAGCCTTG
	GAPDHREV	ATTAGGATCGGAATCAACGG
Hygromycin B-Resistenzgen (Fragment)	hygroB fw	AGACCTGCCTGAAACCGAAC
	hygroB rev	GATGCCTCCGCTCGAAGTAG
PPT-Resistenzgen (Fragment)	<i>bar</i> bar fw	GAAGTCCAGCTGCCAGAAAC
	bar rev	GCACCATCGTCAACCACTAC
Kan-Resistenzgen (Fragment)	<i>nptII</i> nptII fw	AGAGGCTATTCGGCTATGACTG
	nptII rev	ACTCGTCAAGAAGGCGATAGAA
Sequenzierung pGEMt-Easy	T7 Promotor	TAATACGACTCACTATAGGG
	SP6 Promotor	ATTTAGGTGACACTATAG
Detektion TALEN-Konstrukt	FokI-f	GTGAAATCTGAATTGGAAGAG
	FokI-r	TATCTCACCGTTATTAATTTCC
LB-Primer Gabi-Kat	Gabi-Kat	CCCATTTGGACGTGAATGTAGACAC
LB-Primer Lba1	Lba1	ATGGTTCACGTAGTGGGCCATCG
LB-Primer p745	CYP71A18_FR_f	AACGTCCGCAATGTGTTATTAAGTTGTC
Genotypisierung <i>cyp71a12</i> (GK-127H03); FR-PCR mit Gabi-Kat	71A12-r	TTAAATAACGGAAGATGGAAATG

Material und Methoden

Genotypisierung <i>cyp71a12</i> ; WT-PCR mit CYP71A12 Talen rev	CYP71A12 WT f	GCACCCACACATGAACTAAC
Genotypisierung <i>cyp71a13-1</i> ; FR-PCR mit Lba1	a13-1-FR	CTCTGTCCCTGCGGCTATG
Genotypisierung <i>cyp71a13-1</i> ; WT-PCR	a13-1-WT 71A13-r	GGCGAGTAACGATAAAGCG TTACACAACCGAAGATGGAAA
Genotypisierung <i>cyp71a18</i> (WiscDsLox297300_18A); FR-PCR mit CYP71A18_FR_f	CYP71A18_WT/FR_r	CTTTATGTTGCCCCGCTCT
Genotypisierung <i>cyp71a18</i> ; WT- PCR mit CYP71A18_WT/FR_r	CYP71A18_WT_f	AGGTATGGCCCACTGATGCT
Genotypisierung <i>cyp71b6</i> ; WT-PCR mit CYP71B6-rt-f	71b6wt	GCCATTGTCCAATCCAAAGT
Genotypisierung <i>cyp71b6</i> ; FR-PCR mit Gabi-Kat	CYP71B6-rt-f	GTGATCGGAAAATTCGCGGC
Genotypisierung <i>aao1</i> ; FR-PCR mit Lba1	FR-AAOx1.3	CCGCACAATGAGTGACTTCTTCT
Genotypisierung <i>aao1</i> ; WT-PCR mit FR-AAOx1.3	WT-AAOx1.3	CCCGGGTATAGATCAAGCTTGGC
CYP71A12 Fragment mit TALEN- Schnittstelle	CYP71A12 Talen fw CYP71A12 Talen rev	AAGCCGTGATTAAGAGGTG AAATTGTAGGATATGCTTATTTTCT
CYP71B-Cluster CYP71B16 Schnittstelle TALEN 1, 2	Talen1+2 f Talen 1+2 r	CTTCCTCCAAGCCCTCCTAC TAGTTCGGGGTTTCTTGCGA
CYP71B-Cluster CYP71B16 Schnittstelle TALEN 3	Talen 3 f Talen 3 r	TCGCAAGAAACCCCGAACTA ACTGGGACAAGTTTGAGAGGT
CYP71B-Cluster CYP71B37 Schnittstelle TALEN 10	Talen 10 f Talen 10 fw #2	GAATCTCCTGGACTCAATGCC GCTACACGATTCCAGCCAAG
Potentielles TALEN <i>off-Target</i> . Sequenzierung CYP71B15	xba71B15-f	TCTAGAATGTCGGTTTTCTCTGTT TC
	xho71B15-r	CTCGAGTCAGTGGTGAAGAAGTTG AAAGAA
	B15-3'UTR rev	GCTGACTCCAAGTGGATCATC
	B15 Promoter	GCTACAGCGGATAGTAGTACTAG TGAC
Potentielles TALEN <i>off-Target</i> . Sequenzierung CYP71A18	71A18fu	GGATTAA5AATGGAAATGACATTGA TGGTTTCTC
	CYP71A18 3'UTRr	CCAAGTGGTAAGTTTTGTTGTG
	71a18ru	GGGTTAA5TCATGCAACTGAAGATG GAAATGC
	A18 5'UTR	ACACTTTCATTTTCATACATGAGC
	qPCR-CYP71A18f	AACATTTAGAGGCGGGCGAA
	qPCR-CYP71A18r	CTGCATCCGGTCCCATATC
CYP71B-Cluster PCR über Cluster („cut“)	Cluster B37R #2	CAAGGTCACCCACAATCGTCTT
	Cluster B16F #1	GCTCCTGTGTCTATCCCTGC
CYP71B-Cluster PCR innerhalb des Clusters, zwischen CYP71B16 und CYP71B17	Talen 4 f	TAAGCACATCACTCACACCG
	Talen 4 r	TCCAAGCTTTGAAGATGTTTGA
CYP71B-Cluster PCR innerhalb des Clusters, CYP71B36	Talen 9 f	TATTGGGGGCATAGGCACTT
	Talen 9 r	TACTTCAGAGGAACAAGTACAAGC
CYP71B-Cluster PCR innerhalb des Clusters, CYP71B25	CYP71B25-f	GCCTTGGGGCATAACAGTGAT
	CYP71B25-r	AGGGAGCCGACGATATCAGA
CYP71B-Cluster PCR außerhalb, <i>upstream</i> von CYP71B16	outsideB16f	GAACATGATCCTGCTTTGCTATGA
	outsideB16r	GCCGCGTCGATCTCTTTTCC
CRISPR/Cas9 Konstrukt	U6-26p-F	TGTCCCAGGATTAGAATGATTAGGC
	U6-29p-R	AGCCCTCTTCTTTTCGATCCATCAAC

DNA-Agarosegelelektrophorese

Agarosepulver (LE Agarose, Biozym, Oldendorf) wurde mit 1 x TAE Puffer in der Mikrowelle aufgeschmolzen. Die Konzentration betrug standardmäßig 1 % Agarose. Zur Auftrennung kleinerer DNA-Fragmente (< 500 bp) wurde die Agarosekonzentration auf bis zu 2 % erhöht. Zur Detektion von DNA-Banden unter UV-Licht wurde der geschmolzenen Agaroselösung vor der Verwendung Ethidiumbromid (Konzentration 0,5 mg/mL; Stocklösung 10 mg/mL) zugesetzt. Die DNA-Auftrennung erfolgte in Elektrophoresekammern der Linie Compact von Biometra (aufgefüllt mit 1 x TAE Puffer), angetrieben mit dem Biometra Standard Power Pack P25 (5-7 V/cm). Standardmäßig wurden als DNA-Größenmarker die GeneRuler™ 1 kb Plus DNA-Ladder (Thermo Fisher Scientific) oder die Quick-Load® Purple 100 bp DNA Ladder (NEB) aufgetragen (Abbildung 3-1).

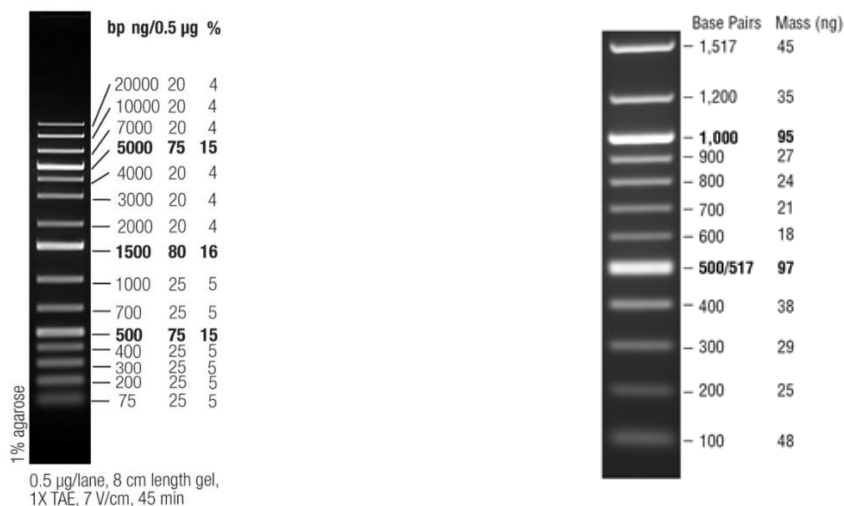


Abbildung 3-1 DNA-Größenmarker. GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (links) und Quick-Load® Purple 100 bp DNA Ladder (rechts).

TAE-Puffer (50x)

- 242 g Tris-Base
- 18,6 g EDTA

Lösen in ca. 800 ml mit vollentsalztem Wasser.

- ca. 51,1 ml Essigsäure 100 %

Der pH-Wert wurde auf 8,5 eingestellt. Auffüllen auf 1 L mit vollentsalztem Wasser. Lagerung bei Raumtemperatur. Gebrauchslösung: Verdünnung 1:50 mit vollentsalztem Wasser.

Klonierung in pGEMt-Easy

Die Klonierung von PCR-Produkten mit 3'-Adenin-Überhang in das pGEM®-T Easy-Vektor-System von Promega erfolgte gemäß den Herstellerangaben. Für die Ligation wurden jedoch stets 0,3 µl (etwa 17 ng) des vorbereiteten Vektors verwendet. Die Menge des Inserts wurde entsprechend angepasst, so dass das molare Verhältnis Vektor:Insert etwa 1:3-5 betrug.

Nach einstündiger Inkubation des Ligationsansatzes (unter Verwendung der T4 DNA Ligase mit zugehörigem Puffer, NEB) bei Raumtemperatur erfolgte die Transformation in kompetente *E. coli* XL 1 Blue- Zellen (siehe 3.2.3). Die Zellen wurden auf dYT-Platten mit 100 µg/ml Ampicillin sowie 200 µM IPTG und 40 µg/ml X-Gal zur Blau-Weiß-Selektion über Nacht bei 37 °C inkubiert. Ungefärbte Kolonien wurden zur weiteren Kultur im Flüssigmedium (dyT-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin) ausgewählt.

CRISPR/Cas9 Kloniersystem

Die CRISPR/Cas9 Konstrukte für *Arabidopsis thaliana* sind nach dem von Wang et al. (2015) konzipierten System zusammengesetzt, welches den *Egg cell specific promoter* EC1.2p als Promotor für die Cas9-Nuklease verwendet und auf dem Golden Gate-Kloniersystem basiert. Das Design der Konstrukte und die Durchführung sind den Angaben des *Additional file 3* der Vorgängerpublikation (Xing et al., 2014) entnommen. Je zwei geeigneten Zielsequenzen in *CYP71B16* (A, B) und *CYP71B37* (C, D) wurden mit dem Online-Programm CRISPR-PLANT (<https://www.genome.arizona.edu/crispr/>) ermittelt. Sie sind in Tabelle 3-7 gelistet. Als Zielvektor wurde der Vektor pHEE401 von Addgene verwendet (<https://www.addgene.org/71286/>).

Tabelle 3-7 Zielsequenzen A-D (fett und kursiv hervorgehoben) und Oligonukleotide zur Klonierung der CRISPR/Cas9 Konstrukte. Das Design entspricht den Angaben für Dikotyledonen gemäß Xing et al. (2014).

Zielgen	20 bp-Zielsequenz (5'-3'-Richtung)	Locus der Zielsequenz	Name Oligonukleotid	Sequenz Oligonukleotid
AT3G26150 (CYP71B16)	Zielsequenz A: T CCAGTCAGCGA GCCATCCA	Chr3:9566515-9566535	DT1-BsF B16-A	ATATATGGTCTCGATT GCCAGTCAGCGAGC CATCCAGTT
			DT1-F0 B16-A	TGCCAGTCAGCGAGC CATCCAGTTTTAGAG CTAGAAATAGC
AT3G26150 (CYP71B16)	Zielsequenz B: C GACCCGACAAG TTTAGGCC	Chr3:9566903-9566923	DT1-BsF B16-B	ATATATGGTCTCGATT GGACCCGACAAGTTT AGGCCGTT
			DT1-F0 B16-B	TGGACCCGACAAGTT TAGGCCGTTTTAGAG CTAGAAATAGC
AT3G26330 (CYP71B37)	Zielsequenz C: ATTGTAGGATTA TAATACCT	Chr3:9647512-9647532	DT2-R0 B37-C	AACATTGTAGGATTAT AATACCCAATCTCTTA GTCGACTCTAC
			DT2-BsR B37-C	ATTATTGGTCTCGAAA CATTGTAGGATTATA ATACCCAA
AT3G26330 (CYP71B37)	Zielsequenz D: CTTTAAGACTCA AGAAGCGG	Chr3:9648461-9648481	DT2-R0 B37-D	AACCTTTAAGACTCA AGAAGCGCAATCTCT TAGTCGACTCTAC
			DT2-BsR B37-D	ATTATTGGTCTCGAAA CCTTTAAGACTCAAG AAGCGCAA

Plasmidpreparation aus *E. coli*

Für die Extraktion von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde das Quantum Prep Plasmid Miniprep Kit von Biorad gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Die Elution der DNA von der Bindematrix erfolgte mit 100 µl H₂O bidest. oder TE Puffer (für Lagerung).

Liste verwendeter Plasmide

Tabelle 3-8 gibt eine Übersicht über die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Plasmide. Die TALEN-Plasmide wurden von Dr. Robert Morbitzer (damals LMU München) entworfen und kloniert, die Klonierungen in die pEarlyGate Vektoren wurden von Dr. S. Mucha durchgeführt. Das Fragment *GAPC1* in pGEM®-T Easy wurde von Dr. Monika Frey (damals Lehrstuhl für Genetik, TU München) zur Verfügung gestellt.

Tabelle 3-8 Liste der verwendeten Plasmide. CDS: *coding sequence*.

Plasmid	Vektor	Resistenz Bakterium/Pflanze
35S:: <i>CYP71A12</i>	pEarlyGate101	Kan/Kan
35S:: <i>CYP71A13</i>	pEarlyGate201	Kan/Kan
TALEN 197/198 für <i>CYP71B16</i> (TALEN 1)	pICH50505	Kan/Kan
TALEN 199/200 für <i>CYP71B16</i> (TALEN 2)	pICH50505	Kan/Kan
TALEN 201/202 für <i>CYP71B16</i> (TALEN 3)	pICH50505	Kan/Kan
TALEN 209/210 für <i>CYP71B37</i> (TALEN 10)	pICH50505	Kan/Basta
TALEN 211/212 für <i>CYP71A12</i>	pICH50505	Kan/Kan
CRISPR/Cas9 Cluster AC	pHEE401	Kan/Hyg
CRISPR/Cas9 Cluster AD	pHEE401	Kan/Hyg
CRISPR/Cas9 Cluster BD	pHEE401	Kan/Hyg
<i>CYP71A12</i> , CDS	pGEM®-T Easy	Amp/ -
<i>CYP71A13</i> , Fragment	pGEM®-T Easy	Amp/ -
<i>Aktin1</i> , Fragment	pGEM®-T Easy	Amp/ -
<i>GAPC1</i> , Fragment	pGEM®-T Easy	Amp/ -
<i>CYP71B</i> -Cluster <i>CYP71B16/B37</i> TALEN 39-1	pGEM®-T Easy	Amp/ -
<i>CYP71B</i> -Cluster <i>CYP71B16/B37</i> „cut“	pGEM®-T Easy	Amp/ -
<i>CYP71B</i> -Cluster <i>CYP71B16/B17</i> „innen“	pGEM®-T Easy	Amp/ -
<i>CYP71B</i> -Cluster <i>CYP71B16</i> „außen“	pGEM®-T Easy	Amp/ -

Reinigung und Aufkonzentration von DNA

Die Aufreinigung von DNA aus einem PCR-Mix oder Agarose-Gel erfolgte mit dem NucleoSpin® Gel und PCR Clean-up Kit (Machery & Nagel, Düren) gemäß den Herstellerangaben.

Falls notwendig wurde insbesondere aus Pflanzen oder Bakterien extrahierte DNA durch erneute Fällungs- und Waschschriffe gereinigt: nach Zugabe von 1 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zur DNA-Lösung wurde die organische Phase in der Tischzentrifuge (Beckman Coulter Microfuge 16) abzentrifugiert und abgenommen. Die wässrige Lösung wurde mit 0,1 Volumen Natriumacetatlösung (3 M, pH 4,8) versetzt, anschließend erfolgte die alkoholische Fällung mit 0,7 Volumen Isopropanol. Nach der Zentrifugation (Beckman Coulter GS-15R, 14000 rpm, 15 min) wurde das Pellet mit Ethanol

(70 % Vol.) gewaschen und anschließend an der Luft getrocknet. Die Resuspension erfolgte in H₂O bidest. oder T 0,1xE- Puffer. Zum Zwecke einer Aufkonzentration wurde die DNA in einem entsprechend kleineren Volumen aufgenommen.

DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Quantifizierung von genomischer DNA, PCR-Produkten oder auch Plasmiden nach Restriktionsverdau erfolgte über das Auftragen auf einem Agarosegel und Vergleich mit einem DNA-Größenstandard in definierter Menge. Auf diese Weise konnte auch stark fragmentierte DNA als solche erkannt werden. Alternativ dazu wurde insbesondere Plasmid-DNA als RT-qPCR-Standard oder für die Sequenzierung photometrisch quantifiziert sowie mögliche Verunreinigung durch Proteine und aromatische Substanzen abgeschätzt. Die Absorptionsmessungen bei 230 nm, 260 nm und 280 nm sowie die Konzentrationsbestimmung der DNA über die Berechnung der Verhältnisse wurden mit Hilfe des Nanodrop NanoPhotometers™ (Implen GmbH, München) automatisch durchgeführt.

Restriktionsverdau von DNA

Für den Restriktionsverdau von Plasmid-DNA oder PCR-Produkten zu Überprüfungs- oder Klonierungszwecken wurden Nukleasen und Reaktionspuffer von NEB verwendet. Bei der Zusammensetzung des Restriktionsansatzes wurde den jeweiligen spezifischen Anforderungen der verwendeten Enzyme Rechnung getragen. Ein typischer 10 µl-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen (Tabelle 3-9):

Komponente	Volumen [µl]
DNA (100 ng- 1 µg)	x
10x CutSmart Reaktionspuffer	1
Restriktionsenzym 1 (10 Units/µl)	0,5
Restriktionsenzym 2 (10 Units/µl)	0,5
RNase (30 µg/µl)	1
H ₂ O bidest.	auf 10 µl auffüllen

Nach einstündiger Inkubation bei 37 °C wurde der Verdau mittels Agarosegelelektrophorese analysiert.

Sequenzierung

Zur Sequenzierung von Plasmiden oder DNA-Fragmenten wurde das Mix2Seq-Kit von MWG Eurofins (Ebersberg) verwendet. Hierfür wurden ca. 500 ng – 1000 ng DNA (maximal in 15 µl) zusammen mit 2 µl Primerlösung (10 mM) in das mit einem Barcode versehene Tube pipettiert und versendet. Die Sequenz konnte in der Regel am nächsten Morgen online als FASTA-file und als Chromatogramm (AB1-Datei) aufgerufen und gespeichert werden.

3.3.2. RNA-Methoden

Extraktion und Konzentrationsbestimmung

Zur RNA-Isolation aus *Arabidopsis thaliana* wurde das NucleoSpin® RNA II Kit (Machery und Nagel) gemäß dem Protokoll des Herstellers (inklusive DNA-Verdau) verwendet. Es wurden mindestens 30 mg Pflanzenmaterial je Extraktion eingesetzt. Die Elution erfolgte in 60 µl RNase-freiem Wasser. Die Konzentrationsmessung erfolgte photometrisch mit Hilfe des Nanodrop NanoPhotometers™ (Implen GmbH). 1 µg RNA wurden direkt nach der Extraktion zu cDNA umgeschrieben. Zur Aufbewahrung wurde die restliche RNA anschließend in 2 Volumen 100 %-igem Ethanol und 0,1 Volumen Natriumacetat (3M, pH 4,8) gefällt und bei -80 °C gelagert.

Reverse Transkription

Für die cDNA-Synthese wurde das TaqMan™ Reverse Transcription Reagents Kit (vertrieben durch Thermo Fisher Scientific) verwendet. Ein 20 µl-Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen (Tabelle 3-10):

Tabelle 3-10 Reaktionsansatz für die cDNA-Synthese

Komponente	Volumen [µl]
RNA (1 µg)	x
10x RT-Reaktionspuffer	2
Random Hexamers (50 µM)	1
dNTPs (10 µM)	4
MgCl ₂ (25 mM)	4,4
RNAse Inhibitor (20 U/µl)	0,4
MultiScribe® Reverse Transkriptase (50 U/µl)	0,5
H ₂ O bidest.	auf 20 µl auffüllen

Die cDNA-Synthese erfolgte im T1 Thermocycler von Biometra. Es wurde folgendes Temperaturprogramm angewandt: 25 °C/10 min; 48 °C/ 45 min; 94 °C/ 5 min; 4 °C/ 5 min.

3.4. Analytische Methoden

Metabolitextraktionen aus *Arabidopsis thaliana*

Camalexinextraktion aus Blättern

Nach Induktion der Phytoalexinsynthese wurden die behandelten Blätter (siehe Abschnitt 3.2.1, Induktion der Phytoalexinbiosynthese) mit 400 µl Methanol 80 % Vol. für eine Stunde bei 65 °C extrahiert (Thermoschüttler). Danach wurde das Blatt entfernt, Blattreste sowie Schwebstoffe abzentrifugiert (Beckman Coulter GS-15R, 14000 rpm, 10 min) und der klare Überstand in ein HPLC-Gefäß überführt.

Metabolitextraktion für die LC/MS-Analyse

Für die Metabolitextraktion unter Vermeidung von Myrosinaseaktivität wurden die behandelten oder unbehandelten Rosettenblätter 6 Wochen alter Pflanzen nach dem Wiegen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend mit Stahlkugeln (3 mm) in einer Kugelmühle homogenisiert. Nach Zugabe von 400 µl vorgekühltem (-70 °C) Methanol 80 % Vol. wurden die Proben sofort gevortext, um das Pflanzenpulver noch gefroren vollständig mit dem alkoholischen Extraktionsmittel zu versetzen. Bei Raumtemperatur erfolgte die Zugabe von 400 pmol Biochanin A (Sigma-Aldrich; 20 µM gelöst in MeOH 50 % Vol.) je 100 mg Frischgewicht als interner Standard und die Proben wurden für 1 h bei Raumtemperatur extrahiert (Thermoschüttler). Nach Zentrifugation (Beckman Coulter GS-15R, 14000 rpm, 10 min) wurde der Rückstand erneut mit 400 µl Methanol 80 % Vol. extrahiert. Nach 1-stündiger Extraktion und erneuter Zentrifugation wurden die Überstände vereinigt und bis zur Trockne in einer Vakuumzentrifuge evaporiert (30 °C, < 2 mbar). Die Proben wurden in 200 µl MeOH 50 % Vol. pro 100 mg Frischgewicht vollständig rückgelöst und zentrifugiert. Der klare Überstand wurde in ein HPLC-Gefäß überführt.

Extraktion aus gefriergetrocknetem Material zur Pyridoxinsäurequantifizierung

Für die quantitative Pyridoxinsäurebestimmung wurde je eine ganze Rosette 5 Wochen alter *Arabidopsis*-Pflanzen am Hypokotyl abgeschnitten, gefriergetrocknet und homogenisiert. 20 g Pflanzenmaterial wurden nach Zugabe von 20 µl Biochanin A als Extraktionsstandard (20 µM in MeOH 50% Vol.) 2-mal mit je 500 µl MeOH 80 % Vol. für 15 min im Ultraschallbad extrahiert und abzentrifugiert (Beckman Coulter GS-15R, 14000 rpm, 10 min). Die vereinigten Überstände wurden in der Vakuumzentrifuge (30 °C, < 2 mbar) zur Trockne eingedampft. Die Proben wurden anschließend in MeOH 50 % Vol. vollständig rückgelöst und zentrifugiert. Der klare Überstand wurde in ein HPLC-Gefäß überführt.

Camalexinquantifizierung mittels HPLC/UV und Fluoreszenzdetektor

100 µl des Camalexinextraktes wurden mittels Umkehrphasen-HPLC analysiert. Die HPLC-Anlage bestand aus einer P680 HPLC Pumpe (Dionex), einem ASI-100 Probeninjektor (Dionex), einem PDA-100 Photodioden Array Detektor (Dionex) und einem RF-10AXL Fluoreszenzdetektor (Shimadzu). Als Trennsäule wurde das Modell MultoHigh 100 RP18 (250 x 5 mm, 5 µm) von Göhler Analytik verwendet. Die Trennung erfolgte bei 1 ml/ min Flussrate, die Fließmittel waren 0,3 % Vol. Ameisensäure in Wasser (A) und Acetonitril (B) unter folgendem Gradienten: 0 bis 1 min isokratisch bei 20 % B; 1 bis 7 min linearer Gradient von 20 % bis 80 % B; 7 bis 7,5 min linearer Gradient von 80 % bis 100 % B; 7,5 bis 9 min isokratisch bei 100 % B. Camalexin (Retentionszeit 8,4 min) wurde über das Fluoreszenzsignal (318 nm Anregung, 370 nm Emission) mittels externer Kalibrierung mit authentischem Standard (Sigma-Aldrich) quantifiziert.

Metabolitanalyse mittels LC/MS

Die Metabolitanalysen, die *CYP71A-knockout*-Mutanten involvieren, wurden von Dr. Christoph Böttcher vom Julius Kühn-Institut, Standort Berlin, auf einem Agilent Infinity1290 UHPLC System mit einer Zorbax RRHD Eclipse Plus C18 Säule (100 x 2,1 mm, 1,8 µm; Agilent) und Agilent 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS-Detektionssystem durchgeführt. Weitere Details und Geräteeinstellungen sind in Müller et al. (2015) dokumentiert. Die Quantifizierung von 4-Pyridoxinsäure wurde ebenfalls durch Dr. Christoph Böttcher mittels externer Kalibrierung mit authentischem Standard (Sigma-Aldrich) durchgeführt.

Die Analyse der *CYP71B*-Clustermutanten erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Karin Kleigrewe und Dr. Jürgen Behr vom Bayerischen Zentrum für Biomolekulare Massenspektrometrie (BayBioMS).

3.5. Software, Online-Tools und Datenbanken

Die für die Recherche, Datenanalyse oder anderweitig für die Erstellung dieser Arbeit verwendeten Softwareapplikationen (inklusive Online-Tools) und Datenbanken sind im Folgenden aufgeführt (Tabelle 3-11).

Tabelle 3-11 Übersicht über Software, Online-Tools und Datenbanken. Online-Quellen zuletzt aufgerufen am 16.05.2018.

Anwendung	Software
Graphiken und Statistik	Origin Pro 2017G mit Applikation „heatmap with dendrogram“
Datensatzorganisation und mathematische Transformationen	Microsoft Excel 2007 und Excel 2016
Messen der Läsionsgrößen:	ImageJ2
Vektorgraphiken	Adobe Illustrator CS2
Pathways und Strukturformeln	ChemDraw Professional 16.0
Sequenzdarstellung (Fasta- und AP1- Dateien) und -verarbeitung	ApE- A plasmid Editor v2.0.53
Darstellung von <i>tree</i> -Dateien	njplot (http://pbil.univ-lyon1.fr/software/unrooted.html)
HPLC- Software	Chromeleon Version 6.80
RT-qPCR- Software	LightCycler® 480 Software Version 1.5
Online-Tools und Datenbanken	Quelle
Primer3Plus	http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi
ATTED-II, Version 8.0	http://atted.jp/
ePlant	http://bar.utoronto.ca/eplant/
TAIR - The Arabidopsis Information Resource (TAIR 10)	https://www.arabidopsis.org/
Phytozome	https://phytozome.jgi.doe.gov/ (Goodstein et al., 2012)
UniProt	http://www.uniprot.org/
CYPedia-Cytochrome P450 Expression Database	http://www-ibmp.u-strasbg.fr/~CYPedia/
NCBI - National Center for Biotechnology Information	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
CLUSTAL 2.1 und Simple Phylogeny-tool	https://www.ebi.ac.uk/ (Goujon et al., 2010; Larkin et al., 2007)
CRISPR-PLANT	https://www.genome.arizona.edu/crispr/
PubChem Chemical Structure Clustering Tool	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/assay/assay.cgi?p=clustering

4. Ergebnisse

4.1. Datenbankstudien zur Expression von *CYP71A12*, *CYP71A13*, *CYP71A18*, *CYP71B6*, *CYP71B15* und *AAO1*,

Um die möglichen Zusammenhänge der in dieser Arbeit thematisierten *CYP71*-Gene und der *AAO1* innerhalb des Biosynthesenetzwerks indolischer Abwehrstoffe abzuschätzen, wurde zunächst ein vergleichender Überblick über ihre Expressionscharakteristika erstellt. Dabei lag besonderer Fokus auf die jeweilige spezifische Stressinduzierbarkeit der Genexpressionen. Zum Vergleich der Expressionsmuster und der Koexpressionen wurden die online Datenbanken ePlant und ATTED-II (Version 8.0, Aoki et al., 2016) und der Stressdatensatz der Cytochrome P450 Plattform CYPedia (Ehltling et al., 2008) herangezogen. Letzterer Datensatz betrachtet die Expressions- und Koexpressionsmuster in *Arabidopsis thaliana* für 239 biotische und abiotische Stressbehandlungen, während die ATTED-II Datenbank einen globalen Einblick in das Koexpressionsspektrum der Zielgene zulässt. Die „CoExSearch“- Funktion von ATTED-II listet in der Standardeinstellung die ersten 300 am engsten zum Zielgen koregulierten Gene, wobei es keine Mindesthöhe für den Korrelationskoeffizienten (*cut-off*) setzt. Die aktuelle ePlant Plattform (<https://bar.utoronto.ca/eplant/>, zuletzt aufgerufen am 15.06.2018) ist eine Fortsetzung von Fucile et al. (2011) und enthält die aktuelle Version des eFP Browsers der Universität von Toronto (Winter et al., 2007), der eine detaillierte graphische Übersicht über den Expressionsort der betrachteten Gene bietet (gewebespezifisch und intrazellulär).

4.1.1. Konstitutives Expressionsmuster in der Pflanze

Im nicht gestressten Zustand unterscheiden sich die sechs Gene zunächst in ihrer Expressionsstärke. Hierbei werden insbesondere *CYP71A12* und *CYP71A18* weit weniger abgelesen als *CYP71B6*, das von den hier betrachteten Genen am stärksten konstitutiv exprimiert wird. Auch zeigen sich verschiedene gewebespezifische Muster. *CYP71B15* wird vor allem in Rosettenblättern und den Sepalen exprimiert. In der Wurzel ist die Expression auf das Prokambium beschränkt, mit einem starken Maximum in der Reifungszone und abnehmend hin zur Wurzelspitze. *CYP71A13* ist oberirdisch in Lokalisation und Stärke der Expression vergleichbar mit *CYP71B15*. In der Wurzel begrenzt sich die Expression auf das Prokambium, mit einem lokalen Maximum in der Streckungszone. *CYP71A12* ist in Abwesenheit von Stressoren noch schwächer exprimiert als *CYP71B15* und *CYP71A13*. Das Transkript findet sich primär in seneszenten Rosetten- und in Kelchblättern. In der Wurzel konzentriert sich die eher schwache Expression vorwiegend in der Reifungszone, allerdings ohne herausstechende Maxima in einzelnen Zellschichten. *CYP71A18* ist von den hier beschriebenen Genen am schwächsten exprimiert. Das Transkript findet sich kaum in

Blättern, jedoch in den Stamina und im reifen Pollen. In der Wurzel gibt es ein Expressionsmaximum im Prokambium der Streckungszone, ähnlich wie für *CYP71A13*. Das Transkript von *CYP71B6* ist beinahe in der gesamten Pflanze zu finden, insbesondere in den älteren bis seneszenten Rosettenblättern, Spross- und Blütenblättern. In der Wurzel finden sich Expressionsmaxima in der Reifungszone besonders im Prokambium, der Endodermis und den Nicht-Haarzellen der Rhizodermis sowie in der Columella.

Im Gegensatz zu den membranständigen CYPs ist *AAO1* ein zytosolisches Protein, dessen Transkript ubiquitär schwach in allen oberirdischen Pflanzenteilen, nennenswert angereichert jedoch nur im trockenen Samen, zu finden ist. Außerdem wird *AAO1* im Cortex, der Endodermis und im vaskulären System der gesamten Wurzel, nicht jedoch im Prokambium exprimiert.

Zusammenfassend ähneln sich in den oberirdischen Pflanzenteilen die Expressionsmuster von *CYP71B15*, *CYP71A13* und *CYP71A12*. *CYP71B6* fällt durch eine breite, konstitutive Expression auf während *AAO1* und *CYP71A18* sehr definierte Maxima und allgemein schwächere Expression zeigen. In der Wurzel überlappt die Reifungszone als Ort des lokalen Expressionsmaximums für *CYP71B6* und *CYP71B15*, während *CYP71A13* und *CYP71A18* im Prokambium der Streckungszone koexprimiert werden. *AAO1* ist in der Wurzel durchgängig stark in den meisten Zelltypen exprimiert, während das Transkript von *CYP71A12* ebenfalls in der Mehrheit der Zelltypen, allerdings in geringerer Menge vorliegt.

4.1.2. Reaktion auf äußere Reize und Koexpression

Die als Gene der Camalexinbiosynthese bekannten CYPs *CYP71B15* und *CYP71A13* sind durch abiotische Reize wie UV-Strahlung und Schwermetalle sowie durch Pathogene, wie beispielsweise *Alternaria brassicola* oder *Pseudomonas syringae* DC3000, stark induzierbar (Nafisi et al., 2007; Schuegger et al., 2006). Diese zeitgleiche Expression ermöglicht eine stringente Synthese des Phytoalexins in *Arabidopsis*-Blättern. Im Gegensatz dazu wird in der Wurzel neben *CYP71B15* nach flg22-Zugabe die Transkription von *CYP71A12* massiv angeregt, lokal limitiert auf die Reifungszone der Wurzel (Millet et al., 2010). Auch in Blättern ist *CYP71A12* durch verschiedene abiotische und biotische Stressoren induzierbar, jedoch nicht so stark wie *CYP71A13* (siehe auch 4.2).

Die gemeinsame Induzierbarkeit der Camalexinbiosynthesegene spiegelt sich in ihren Koexpressionskoeffizienten (Pearson's Korrelation; R) wieder. *CYP71B15* ist das am engsten mit *CYP71A13* regulierte Gen und *vice versa* (ATTED-II Datensatz, gemeinsamer Rang = 1; Tabelle 4-1). In Korrelation mit *CYP71A13* stehen unter den CYPs weiterhin das Paralog *CYP71A12*, trotz seines in Wurzeln abweichende Expressionsmusters, sowie das im Camalexinbiosyntheseweg vorgeschaltete *CYP79B2* und die zu Nebenwegen gehörenden *CYP71B6* (Indolcarbonsäurederivate, Böttcher et al., 2014) und *CYP82C2* (4-Hydroxyindol-3-Carbonylnitril, Rajniak et al., 2015). Zudem sind die beiden im *CYP71B*-Gencluster

enthaltenen *CYP71B22* und *CYP71B23* (siehe 4.6) sowie *CYP71A18* schwach mit *CYP71A13* koexprimiert.

Bei gezielter Betrachtung der Koexpression unter Stressbedingungen erhöht sich der Koeffizient für die *CYP71A13- CYP71B15* Koregulation auf 0,86, für *CYP71A13- CYP71B6* auf 0,72. Unter Stressbedingungen ist *CYP71B6* damit das am viertstärksten mit *CYP71A13* koregulierte Gen (Tabelle 4-1). Auch die Expression von *AAO1* weist unter diesen Bedingungen eine erhöhte Korrelation mit *CYP71A13* und *CYP71B15* auf (R= 0,65 bzw. 0,66), da parallel zu den beiden CYPs auch die Transkriptmenge von *AAO1* bei Inokulation mit insbesondere den Pathogenen *Botrytis cinerea* in Blättern und *Phytophthora infestans* im Keimling ansteigt (CYPedia). Die Glutathion-Transferase *GSTU4* ist unter Stressbedingungen die höchst koregulierte GST mit *CYP71A13* (R=0,71) und *CYP71B15* (R=0,82), wobei dieser GST noch keine eindeutige Funktion im Camalexinbiosyntheseweg zugeordnet werden konnte (Mucha, 2017).

Tabelle 4-1 Liste der Top 10 mit *CYP71A13* koexprimierten CYPs bzw. unter Stressbedingungen koexprimierten Gene. Links: Globale Koexpression generiert mit ATTED II, absteigend sortiert nach dem durchschnittlichen Pearson's Koeffizienten. Rechts: Koexpression unter Stressbedingungen; Auszug aus dem Stressdatensatz der CYPedia Plattform (Ehltling et al., 2008). MR: gemeinsamer Rang (*mutual rank*), geordnet nach dem geometrischen Mittel der Korrelationen beider Gene (A und B) zueinander: $MR(AB) = ((Rang(A \rightarrow B) \times Rang(B \rightarrow A))^{0,5}$; R= Pearson Korrelationskoeffizient.

TOP 10 Globale Koexpression; nur CYPs			TOP 10 Koexpression unter Stressbedingungen; allgemein	
gemeinsamer Rang (MR)	R	Gen	R	Gen
0	1	<i>CYP71A13</i>	1	<i>CYP71A13</i>
1	0,67	<i>CYP71B15</i>	0,86	<i>PAD3, CYP71B15</i>
33	0,47	<i>CYP71A12</i>	0,74	<i>TSA1</i>
109	0,36	<i>CYP71B6</i>	0,74	<i>FOX1</i>
63	0,35	<i>CYP79B2</i>	0,72	<i>CYP71B6</i>
195	0,35	<i>CYP71B23</i>	0,71	<i>At3g22600, lipid transfer protein family protein</i>
76	0,34	<i>CYP82C2</i>	0,71	<i>ATGSTU4</i>
85	0,34	<i>CYP81G1</i>	0,70	<i>At4g26910, Dihydrolipoamide succinyltransferase</i>
158	0,34	<i>CYP710A1</i>	0,70	<i>At1g68620, α/β-Hydrolases superfamily protein</i>
240	0,33	<i>CYP81D8</i>	0,70	<i>IGPS</i>
176	0,32	<i>CYP71A18</i>	0,70	<i>At1g33030, O-Methyltransferase</i>

CYP71A12 ist, global betrachtet, am engsten mit den *FOX* (*FAD-LINKED OXIDOREDUCTASE*) Genen *FOX1* (R= 0,77), *FOX2*, *FOX4* und *FOX5* koreguliert. Für *FOX1* und *CYP82C2* (R= 0,6) wurde zusammen mit *CYP71A12* eine Rolle im Biosyntheseweg von 4-Hydroxyindol-3-Carbonylnitrilen als Seitenweg der Camalexinbiosynthese ausgehend von der Vorstufe IAox beschrieben (Rajniak et al., 2015). Weitere assoziierte CYPs sind (in absteigender Reihenfolge des Korrelationskoeffizienten) das die 4-Hydroxylierung von I3M-GSL katalysierende *CYP81F2* (R= 0,56), *CYP71B15* (R= 0,53), *CYP71B6* (R= 0,49), *CYP71A13* (R= 0,47) und mit größerem Abstand *CYP71B23*

($R=0,38$), *CYP79B2* ($R=0,35$), *CYP82C3* ($R=0,31$) und *CYP71A18* ($R=0,28$). Der Transkriptionsfaktor *ANAC042* koreguliert ebenfalls mit *CYP71A12* ($R=0,66$). Er wird als Regulator für *CYP71A12*, *CYP71A13* und *CYP71B15* beschrieben (Saga et al., 2012). Bei isolierter Betrachtung des Stressdatensatzes ist *CYP71B6* das höchstkorrelierte CYP ($R=0,66$), gefolgt von *CYP71A13* ($R=0,62$), ähnlich stark ist die Korrelation mit *FOX1* ($R=0,63$). Für *CYP71A18* ist in geringem Maße mit den beiden Sequenzhomologen *CYP71A12* und *CYP71A13* koreguliert ($R=0,31$ und $0,32$). Die drei weiteren CYPs unter den ersten 300 gelisteten Genen sind *CYP71B21* ($R=0,3$), *CYP82C2* und *CYP82C3* (beide $R=0,28$). Eine nur sehr schwache Korrelation mit den CYPs der Camalexin- und GSL-Biosynthese, sowie die Zuordnung von einem Drittel der ersten 300 gelisteten Genen zu der GO (*Gene Ontology*)-Kategorie *pollen tube growth* 0009860 (86 Gene) und *pollen tube development* 0048868 (21 Gene) deuten in Kombination mit dem Expressionsmuster in der Pflanze trotz der engen Sequenzhomologie zu *CYP71A12* und *CYP71A13* eher auf eine alternative Funktion von *CYP71A18* in der Blüte oder Wurzel hin. Unter Stressbedingungen kommt es jedoch zu einer leichten Induktion beispielsweise durch *P. syringae* DC3000 avrRpm1 und *Botrytis cinerea* in Blättern, durch *Phytophthora infestans* im Keimling oder UV-Behandlung der Wurzel. Nur sieben Gene sind unter Stressbedingungen mit *CYP71A18* mit $R>0,5$ koreguliert, darunter *CYP71A12* ($R=0,51$), dessen Expression ebenfalls von den drei aufgeführten Stressoren induziert wird.

CYP71B6 ist wie *CYP71A12* mit *ANAC042* koreguliert ($R=0,5$), anders als für *CYP71A12* ist eine eventuelle Regulation von *CYP71B6* durch den Transkriptionsfaktor noch nicht untersucht. *CYP71A12* ist zudem das am engsten koregulierte CYP ($R=0,49$). Weiterhin sind *CYP71B15* ($R=0,43$), *CYP71B23* ($R=0,43$) und weitere 13 CYPs unter den ersten 300 höchstkorrelierten Genen, alle mit $R<0,4$, darunter *CYP71A13*, *CYP81F2*, *CYP82C2*, *CYP79B2* und *CYP71B3* (siehe 4.6), nicht aber *CYP71A18*. Unter den ersten gelisteten Genen sind zudem drei FAD-bindende Oxidoreduktasen: At4g38540 ($R=0,49$), *FOX5* ($R=0,48$) und *FOX1* ($R=0,46$). Unter Stressbedingungen (CYPedia Stressdatensatz) ist *CYP71B6* am engsten mit der IGPS korreliert ($R=0,74$). Zudem sind weitere acht Gene der Tryptophan-Biosynthese oder des Shikimisäurewegs unter den ersten 16 am stärksten koregulierten Genen von *CYP71B6*, beispielsweise *TSA1* (Tryptophansynthase, alpha Untereinheit 1; $R=0,73$), *TRP1* (*Tryptophan biosynthesis protein 1*; $R=0,69$) oder *ASA1* ($R=0,69$). Die Koregulation mit Tryptophan-Biosynthesegenen unter Stressbedingungen ist auch für *CYP71B15*, *CYP71A13* und *CYP71A12* dokumentiert. Für die Tandemgene *CYP71A13* und *CYP71A12* werden unter Stressbedingungen Korrelationskoeffizienten mit *CYP71B6* von $0,72$ und $0,66$ erreicht, $0,67$ für *FOX1* mit *CYP71B6*.

Das *Arabidopsis*-Genom codiert für vier Aldehydoxidasen, *AAO1*-*AAO4*, deren Expressionen nicht untereinander koreguliert sind. Vielmehr ist für die verschiedenen

Aldehydoxidasen eine starke Gewebe- bzw. Entwicklungsstadiumsspezifität festzustellen. *AAO1* wird neben einer geringen konstitutiven Expression in allen Geweben insbesondere im trockenen Samen, Wurzeln und Keimlingen exprimiert, während *AAO3* unter Trockenstressbedingungen in den Rosettenblättern den finalen Schritt der ABA-Biosynthese katalysiert und *AAO4* sein Expressionsmaximum in den Samenschoten zeigt (Koiwai et al., 2004; Seo et al., 2004; Seo et al., 2000; Srivastava et al., 2017). Das allgemeine Koexpressionsprofil der Datenbank ATTED II listet für *AAO1* nur wenige CYPs. Darunter am stärksten koreguliert ist *CYP72A14* mit einem Koeffizienten von 0,42, das primär im entwickelten Samen exprimiert wird und dessen Funktion noch nicht beschrieben ist. Aus dem Camalexin- und GSL-Kontext werden unter den ersten 300 Treffern nur *CYP71B6*, *CYP71B15* und *CYP79B2* (Korrelationskoeffizienten 0,36, 0,32, 0,27) geführt. Unter expliziter Betrachtung des biotischen Stressoreinfluss wird indes eine starke Koregulation mit der Camalexinbiosynthese und *CYP71B6* deutlich (Böttcher et al., 2014, ATTED II, Datensatz biotischer Stress), unter gezielt abiotischen Stressbedingungen hingegen sind diese Transkripte nicht vertreten. Auf dem ersten gemeinsamen Rang steht hier das CYP *CYP71B23* (ATTED II, Datensatz abiotischer Stress). Die Induzierbarkeit in adulten Blättern und die geringe konstitutive Expression in beinahe der gesamten Pflanze lässt eine oder mehrere mögliche Funktionen von *AAO1* über die frühen pflanzlichen Entwicklungsstadien hinaus zu, wie die bereits beschriebene Rolle von *AAO1* in der *in-vivo*-Umsetzung von Indol-3-aldehyden zur entsprechenden Säure (Böttcher et al., 2014).

4.2. Charakterisierung von CYP71A12 mit Hilfe von *cyp71a12/a13*-Doppelmutanten

Um funktional zwischen den Tandemgenen *CYP71A12* und *CYP71A13* differenzieren zu können, wurden *cyp71a12/a13* Doppelmutanten generiert und zusammen mit den beiden Einzelmutanten auf ihren metabolischen Phänotyp analysiert.

4.2.1. Die Einzelmutanten von CYP71A12 und CYP71A13

Sowohl für *CYP71A12* als auch für *CYP71A13* sind Einzel-*Knock-out*-Linien erhältlich, die bereits beschrieben wurden (Millet et al., 2010; Nafisi et al., 2007). Während *cyp71a12* in Rosettenblättern keinen Camalexinphänotyp zeigte, ist die *cyp71a13-1* Mutante nach Induktion deutlich, aber nicht vollständig, camalexindefizient. Diese partielle Camalexindefizienz in *cyp71a13-1* führte zur Identifikation von *CYP71A13* als wesentliches IAox-umsetzendes Enzym im Zuge der Camalexinbiosynthese (Nafisi et al., 2007).

Um zu überprüfen, ob der *Knock-out* eines der *CYP71As* die Transkription des jeweiligen Homologes beeinflusst, wurde eine RT-qPCR Analyse für *CYP71A12* und *CYP71A13* im Wildtyp und dem jeweils korrespondierenden Mutantenhintergrund durchgeführt.

Beide Gene wurden nach UV-Licht und AgNO₃-Behandlung deutlich verstärkt exprimiert. Das Ausschalten des jeweiligen Homologes hatte dabei keinen quantitativen Einfluss auf die Expression von *CYP71A12* oder *CYP71A13* (Abbildung 4-1).

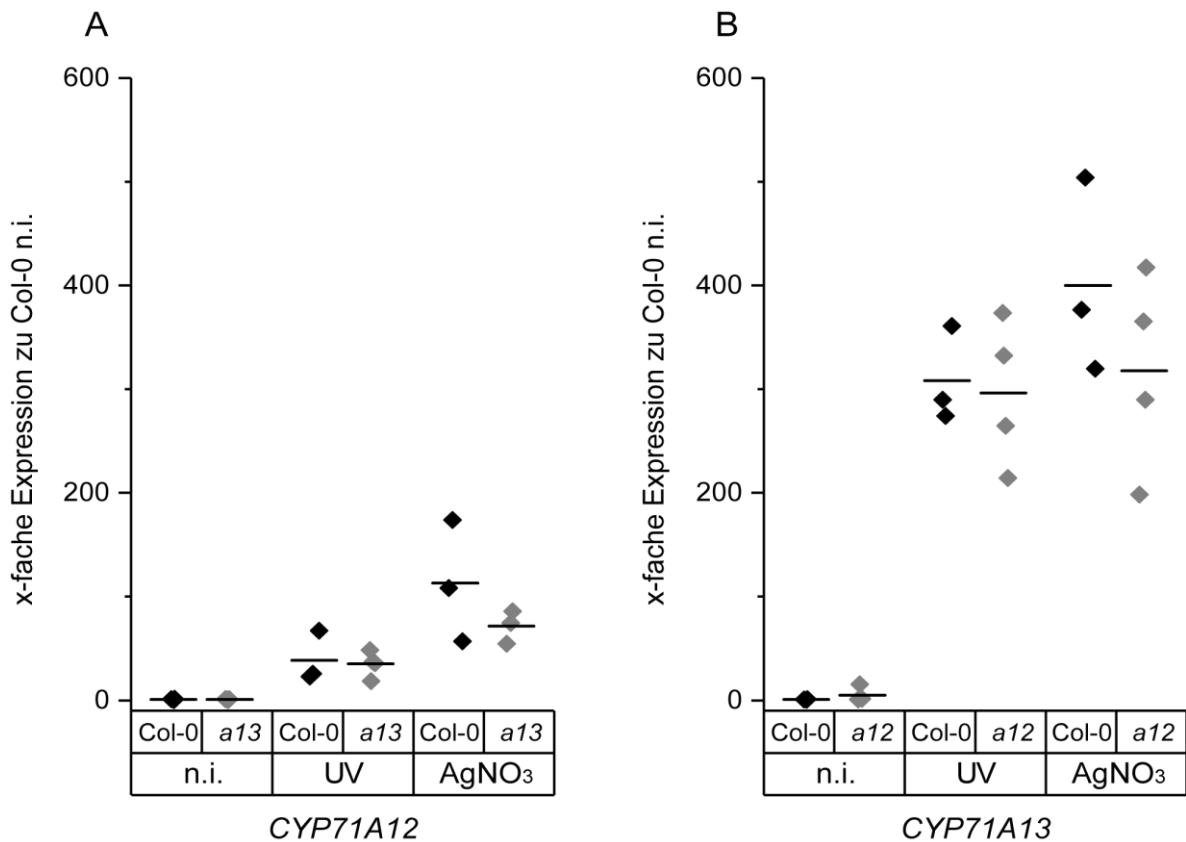


Abbildung 4-1 Relative Expression von *CYP71A12* (A) und *CYP71A13* (B) im Wildtyp (Col-0) und den *Knock-out*-Linien *cyp71a13-1* (hier: *a13*) bzw. *cyp71a12* (hier: *a12*). Die Rosettenblätter wurden vor der RNA-Extraktion nicht behandelt (n.i.), 8h mit UV-Licht (UV) oder 8 h mit 5mM AgNO₃-Lösung (Ag) induziert. Die gemittelte Expression im nicht induzierten Wildtyp ist jeweils der Bezugswert. Referenzgen: *Aktin1*; n= 3-4. Der Bezug auf das Referenzgen *GAPC1* lieferte vergleichbare Ergebnisse (nicht gezeigt).

Relativ zum nicht behandelten Wildtyp war die Transkriptmenge von *CYP71A12* (Abbildung 4-1 A) nach UV-Induktion im Wildtyp im Mittel 39-fach, in der *cyp71a13-1* Mutante 35-fach erhöht. Die AgNO₃-Behandlung bedingte entsprechend eine ca. 113-fache (Wildtyp) bzw. 72-fache (*cyp71a13-1*) Erhöhung. Für das *CYP71A13*-Transkript war der Induktionseffekt noch stärker: im Wildtyp und der *cyp71a12*-Mutante (GK-127H03) war die *CYP71A13*-Expression nach UV- bzw. AgNO₃-Behandlung je etwa 300 bis 400-fach erhöht, verglichen mit dem Transkriptlevel in unbehandelten Rosettenblättern (Abbildung 4-1 B). Die hier beschriebene mehrhundertfache Induktion des *CYP71A13*-Gens ähnelt den Induktionsstärken anderer, biotischen Stressoren (Nafisi et al., 2007; Wang et al., 2012).

Die Expressionen von *CYP71A12* oder *CYP71A13* im Wildtyp und dem *Knock-out* des jeweiligen Homologes waren nicht zu unterscheiden. Die beiden CYPs scheinen sich demnach in ihrer Expression gegenseitig nicht zu beeinflussen (Abbildung 4-1 A und B).

4.2.2. Generierung der *cyp71a12/a13*-Doppelmutante

Aufgrund ihrer teilweisen Koexpression und ihrem überlappenden Substrat- und Produktspektrum *in vitro* (Klein et al., 2013; Müller et al., 2015), ist von einer partiellen Redundanz der beiden Tandemgene auszugehen. Um die einzelnen Enzymfunktionen *in vivo* zu unterscheiden, bedurfte es daher einer *CYP71A12*- und *CYP71A13*- Doppelmutante als Vergleichslinie zu den jeweiligen Einzelmutanten. Diese Mutante wurde durch zielgerichtetes *Genome Editing* mittels TALENs generiert.

Die *Knock-out*-Linie *cyp71a13-1* wurde stabil mit einem Pflanzenexpressionsvektor transformiert, welcher für zwei *CYP71A12*-bindende TALEN-Proteine codiert. Die Festlegung der Zielsequenzen und die Klonierung der Vektoren erfolgte durch Dr. R.. Morbitzer aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. T. Lahaye, derzeit am Zentrum für Molekularbiologie der Pflanzen der Universität Tübingen. Die TALENs bestehen jeweils aus einer für eine 18 bp langen Zielsequenz spezifischen DNA-Bindedomäne und einer *FokI*-Nuklease. Beide TALENs binden gegenüber voneinander auf beiden komplementären Strängen des Zielgens im Abstand von 12 bp (dem sogenannten *Spacer*). In der *Spacer*-Region des Nukleasenpaares in *CYP71A12* befindet sich eine Erkennungssequenz der DNA-Endonuklease *Bsal* (Basenabfolge GGTCTC). Dies erlaubt das *screening* auf Mutationen am gewünschten Locus mittels einer *Bsal*-basierten *cleaved-amplified polymorphic sequence* (CAPS)-Markeranalyse. Durch Mutagenese dieses Sequenzabschnitts verändert sich das Restriktionsmuster eines den TALEN-Bindebereich umspannenden PCR-Amplifikats nach Inkubation mit *Bsal* im Vergleich zur wildtypischen Sequenz (Wildtyp: 253 bp, 255 bp und 157 bp, Mutante: 255 bp und 410 bp; Abbildung 4-2 A und B).

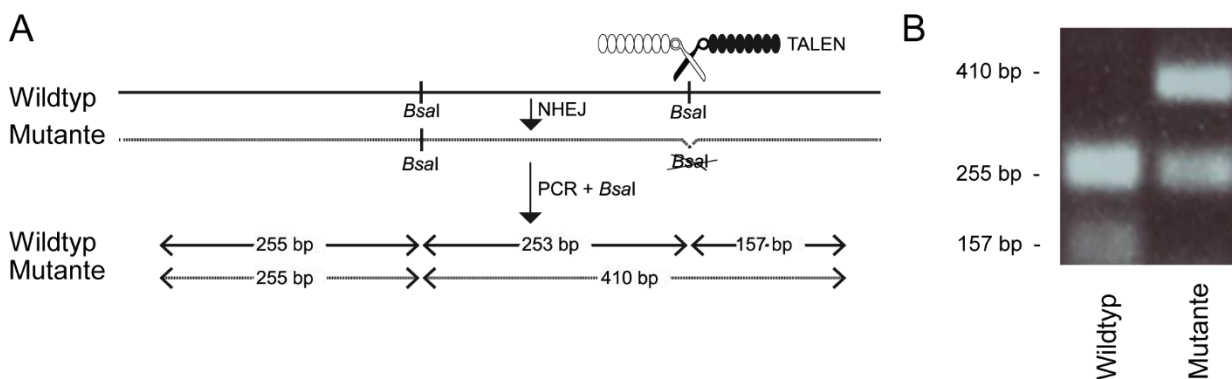


Abbildung 4-2 A: Schema der zielgerichteten Mutagenese mit TALEN-Bindestelle an einer von zwei *Bsal*-Restriktionssequenzabschnitten in *CYP71A12*. B: Repräsentativer Agarosegelausschnitt des Amplifikats aus *CYP71A12* nach Restriktionsverdau mit *Bsal* einer wildtypischen und einer homozygot mutierten Pflanze. bp: Basenpaare.

Die Anwesenheit des TALEN-Konstrukts konnte im Genom von sieben Primärtransformanten durch PCR mit *FokI*-spezifischen Primern bestätigt werden. Die beschriebene *Bsal*-basierte

CAPS-Markeranalyse zeigte für drei dieser Pflanzen (Primärtransformante 1–3) ein zum Wildtyp unterschiedliches Restriktionsmuster und deutete so auf eine Mutation in der Zielsequenz hin. Der Schnitt einer 2. *Bsal*-Schnittstelle im untersuchten Bereich diente hierbei als Kontrolle der Vollständigkeit des Restriktionsverdau (Abbildung 4-2 A und B). Die PCR-Produkte wurden in den Vektor pGEM™ T- Easy kloniert und jeweils zehn Klone durch *Bsal*-Restriktionsverdau analysiert und sequenziert. 50 % der Klone ausgehend von Primärtransformante 1, sowie 80 % und 100 % der Klone der Primärtransformanten 2 und 3 zeigten eine Mutation. Insbesondere für die Primärtransformante 3 bestätigte dies eine effiziente Aktivität des TALEN-Paares für *CYP71A12*. Die Sequenzierung der Klone und der Vergleich mit der wildtypischen *CYP71A12*-Sequenz offenbarte zwölf verschiedene Mutationsereignisse, die im Genom der 3 Linien stattgefunden haben (Abbildung 4-3 A). Diese Vielzahl von Deletionen, Insertionen und kombinierten Mutationen, die gleichzeitig, und im Falle der Primärtransformanten 1 und 2 parallel zur wildtypischen Sequenz in einer Pflanze vorlagen, deutete auf ein Mosaik an auf unterschiedliche Weise mutierten und nicht mutierten Einzelzellen hin. Die Aktivität der TALENs hat somit somatisch, in einem vielzelligen Entwicklungsstadium der Pflanze, eingesetzt.

Wildtyp	<i>ACCTGATCTAACTGAAGCTTTGGTCTC</i>	GATGTTTGCCGAAAGTTC CCTCTCATTG	
Primärtransf. 1	ACCTGATCTAACTGAAGCTTTGGTCTC	TTTGCCGAAAGTTC CCTCTCATTG -6 +1	
	ACCTGATCTAACTGAAGCTTTGGTCTC	TTTGCCGAAAGTTC CCTCTCATTG -6	
Primärtransf. 2	ACCTGATCTAACTGAAGCTTTGGTCTC	TGCCGAAAGTTC CCTCTCATTG -8	
	ACCTGATCTAACTGAAGCTTTGGTCTC	TTTGCCGAAAGTTC CCTCTCATTG -7	
	ACCTGATCTAACTGAAGCTTTGGTCTC	AAAGTTC CCTCTCATTG -12	
	ACCTGATCTAACTGAAGCTTTGGTCTC	TTTGCCGAAAGTTC CCTCTCATTG -5 +1	
	ACCTGATCTAACTGAAGCTTTGGTCTC	TTTGCCGAAAGTTC CCTCTCATTG -7	
	ACCTGATCTAACTGAAGCTTTGGTCTC	TTTGCCGAAAGTTC CCTCTCATTG -4 +26	
 -82 *	
Primärtransf. 3	ACCTGATCTAACTGAAGCTTTGGTCTC	GTTTGCCGAAAGTTC CCTCTCATTG -4	
	ACCTGATCTAACTGAAGC	TCCCTCTCATTG -26	
	ACCTGATCTAACTGAAGCTTTGGTCTC	CTTGCCGAAAGTTC CCTCTCATTG -7	
	ACCTGATCTAACTGAAGCTTTGGTCTC	... -40	
	ACCTGATCTAACTGAAGCTTTGGTCTC	TGTTTGCCGAAAGTTC CCTCTCATTG -3	
	ACCTGATCTAACTGAAGCTTTGGTCTC	TTTGCCGAAAGTTC CCTCTCATTG -6	

Abbildung 4-3 Somatische, TALEN-vermittelte Mutationen in *CYP71A12* in drei Primärtransformanten. Die TALEN-bindende Sequenz ist kursiv und die *Bsal*-Erkennungssequenz fett dargestellt, Leerstriche symbolisieren Basendeletionen, Kleinbuchstaben Insertionen. Primärtransf.: Primärtransformante, Asteriskus: nur 56 der 82 fehlenden Basen sind dargestellt.

Je 150 Nachkommen der Primärtransformanten 1 - 3 wurden analog durch Restriktionsverdau von PCR-Fragmenten auf vorhandene Mutationsereignisse in *CYP71A12* untersucht. Die PCR-Produkte wurden exemplarisch sequenziert (Abbildung 4-4). Das Restriktionsmuster in den Linien 1 und 2 war ausschließlich wildtypisch. Hier fand somit keine Vererbung der Mutation statt. In Linie 3 zeigten 60 % der T2-Pflanzen ein wildtypisches Restriktionsmuster. 19 % haben augenscheinlich eine *Bsal*-Schnittstelle durch TALEN-vermittelte Mutation vollständig verloren, zeigten somit eine homozygot oder transheterozygot vorliegende Mutation an (Abbildung 4-4 C, D). Bei den verbleibenden 21 %

war zusätzlich zur 255 bp- und 410 bp- auch die 157 bp-Bande nach dem Verdau der Amplifikate auf dem Agarosegel sichtbar. Die Schnittstelle ist noch in Anteilen intakt, was entweder eine heterozygote Mutation oder ein Mosaik aus mutierten und wildtypischen Zellen anzeigt. Die Sequenzierung eines solchen PCR-Produktes wies dementsprechend eine abrupte Verschlechterung der Sequenzqualität ab der designierten Schnittstelle auf (Abbildung 4-4 B).

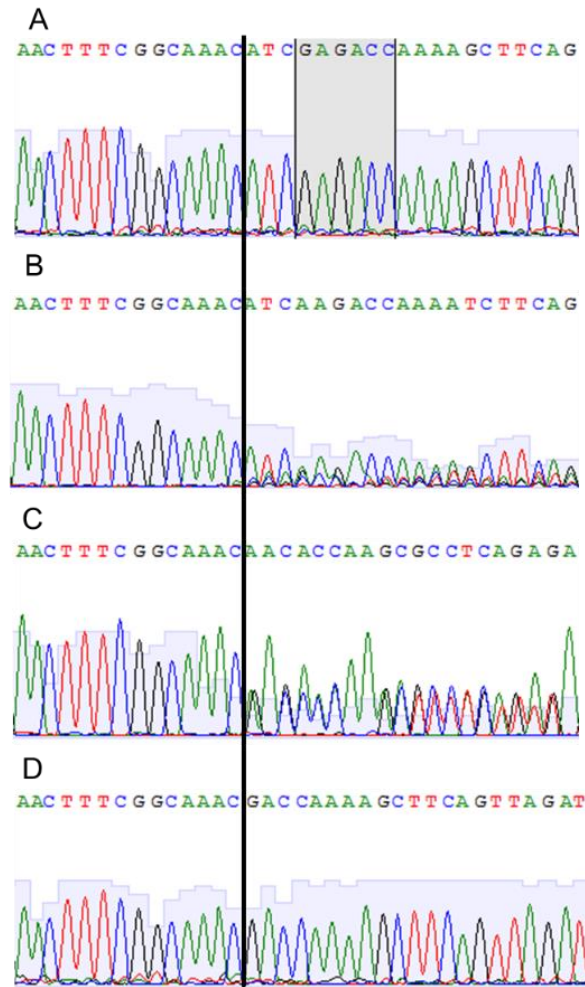


Abbildung 4-4 Exemplarische Sequenzanalysen des *CYP71A12*-Amplifikates der Linie 3, T2-Generation. Beispielsequenzen für A: homozygot wildtypisch, B: Mosaik; gestörte Sequenz ab dem Schnittbereich (schwarze Linie). C: Doppelsequenz transheterozygot (Δ 3 bp, Δ 5 bp). D Homozygot (Δ 5 bp). Grau hinterlegt: *Bsal* Schnittstelle.

Die Sequenzanalyse zeigte für die homo- oder transheterozygoten Pflanzen zwei Mutantenallele, eine 5 bp- und eine 3 bp-Deletion (Δ 5 bp, Δ 3 bp). Eine der T2-Pflanzen war homozygot auf erstere Mutation und trug zudem kein TALEN-Konstrukt (Linie *cyp71a12 cyp71a13-1*; Abbildung 4-5 A). In der T3-Generation konnte eine nicht transgene Pflanze mit homozygoter 3 bp-Deletion identifiziert werden (Linie *cyp71a12 cyp71a13-2*; Abbildung 4-5 A). Letztere verursacht auf Proteinebene den Verlust von Asp 488. Die 5 bp-Deletion führt zu einem *frameshift* und Verlängerung des *open reading frames* (ORF) um 36 bp bzw. 13

Aminosäuren (Abbildung 4-5 B). Der Genotyp der beiden Linien wurde in der jeweiligen Folgegeneration bestätigt. Diese wurden für phänotypische Analysen verwendet.

A

```
CYP71A12 cyp71a13 ACCTGATCTAACTGAAGCTTTGGTCTCGATGTTTGGCGAAAGTTCCCTCTCATTG
cyp71a12 cyp71a13 -1 ACCTGATCTAACTGAAGCTTTGGTCTGTTTGGCGAAAGTTCCCTCTCATTG -5
cyp71a12 cyp71a13 -2 ACCTGATCTAACTGAAGCTTTGGTCTGTTTGGCGAAAGTTCCCTCTCATTG -3
```

B

CYP71A12	1	MSNIQEMEMILMVSLCLTTLITLFLKQFLKRTANKVNLPPSPWRLPLIGNLHQLSLHPH	60
CYP71A12 L487fs	1	MSNIQEMEMILMVSLCLTTLITLFLKQFLKRTANKVNLPPSPWRLPLIGNLHQLSLHPH	60
CYP71A12 D488del	1	MSNIQEMEMILMVSLCLTTLITLFLKQFLKRTANKVNLPPSPWRLPLIGNLHQLSLHPH	60
CYP71A12	61	RSLHLSLRLYGPLMLLHFGRVPILVVSSGEAAQEVKTHDLKFNANRPRSKAVHGLMNGGR	120
CYP71A12 L487fs	61	RSLHLSLRLYGPLMLLHFGRVPILVVSSGEAAQEVKTHDLKFNANRPRSKAVHGLMNGGR	120
CYP71A12 D488del	61	RSLHLSLRLYGPLMLLHFGRVPILVVSSGEAAQEVKTHDLKFNANRPRSKAVHGLMNGGR	120
CYP71A12	121	DVVFGPYGEYWRQMKSVCIINLLTNKMWASFEKIREEELNEMIKKLEKASSSSSENSE	180
CYP71A12 L487fs	121	DVVFGPYGEYWRQMKSVCIINLLTNKMWASFEKIREEELNEMIKKLEKASSSSSENSE	180
CYP71A12 D488del	121	DVVFGPYGEYWRQMKSVCIINLLTNKMWASFEKIREEELNEMIKKLEKASSSSSENSE	180
CYP71A12	181	LFVTLPSDVTSRIALGRKHSEDETARDLKKRVRQIMELLGEPFIGDYVPALAWIDRINGF	240
CYP71A12 L487fs	181	LFVTLPSDVTSRIALGRKHSEDETARDLKKRVRQIMELLGEPFIGDYVPALAWIDRINGF	240
CYP71A12 D488del	181	LFVTLPSDVTSRIALGRKHSEDETARDLKKRVRQIMELLGEPFIGDYVPALAWIDRINGF	240
CYP71A12	241	NARIKEVSQGFSDLMDKVVQEHLEAGNHKEDFVDILLSIESEKISIGFQAQRDDIKFMILD	300
CYP71A12 L487fs	241	NARIKEVSQGFSDLMDKVVQEHLEAGNHKEDFVDILLSIESEKISIGFQAQRDDIKFMILD	300
CYP71A12 D488del	241	NARIKEVSQGFSDLMDKVVQEHLEAGNHKEDFVDILLSIESEKISIGFQAQRDDIKFMILD	300
CYP71A12	301	MFIGGTSTSSLLEWIMTELIRPNVMKKLQDEIRSTIRPHGSYIKEKDVENMKYLKAVI	360
CYP71A12 L487fs	301	MFIGGTSTSSLLEWIMTELIRPNVMKKLQDEIRSTIRPHGSYIKEKDVENMKYLKAVI	360
CYP71A12 D488del	301	MFIGGTSTSSLLEWIMTELIRPNVMKKLQDEIRSTIRPHGSYIKEKDVENMKYLKAVI	360
CYP71A12	361	KEVFRVHPPPLPLILPRLLEDVVKVGYNIAAGTEVIINAWAIQRDPAIWGPDAEEFKPER	420
CYP71A12 L487fs	361	KEVFRVHPPPLPLILPRLLEDVVKVGYNIAAGTEVIINAWAIQRDPAIWGPDAEEFKPER	420
CYP71A12 D488del	361	KEVFRVHPPPLPLILPRLLEDVVKVGYNIAAGTEVIINAWAIQRDPAIWGPDAEEFKPER	420
CYP71A12	421	HLDSTLDYHGKDLNFIPFGSGRRICPGINLALGLVEVTVANLVGRFDWRAEAGPNGDQPD	480
CYP71A12 L487fs	421	HLDSTLDYHGKDLNFIPFGSGRRICPGINLALGLVEVTVANLVGRFDWRAEAGPNGDQPD	480
CYP71A12 D488del	420	HLDSTLDYHGKDLNFIPFGSGRRICPGINLALGLVEVTVANLVGRFDWRAEAGPNGDQPD	480
CYP71A12	481	LTEAFGLDVCCKFPLIAFPSSVI	503
CYP71A12 L487fs	481	LTEAFGLPKVPSHCISIFRYLKCFSFYLLPCYALN	516
CYP71A12 D488del	481	LTEAFGLVCRCKFPLIAFPSSVI	502

Abbildung 4-5 Sequenzvergleich der *cyp71a12 cyp71a13*-Mutantenlinien mit dem Wildtyp. A: Ausschnitt der DNA Basenabfolge des wildtypischen *CYP71A12* Gens, *cyp71a12 cyp71a13-1* (Δ 5 bp, Deletion der Basen TCGAT) und *cyp71a12 cyp71a13-2* (Δ 3 bp, Deletion der Basen CGA). Kursiv: TALEN-bindender Sequenzbereich, fett: *Bsa*I-Schnittstelle. B: Vergleich der aus der Mutation resultierenden Proteinsequenzen mit dem wildtypischen Protein. Die Mutation in *cyp71a12 cyp71a13-1* führt zu einem *frameshift* ab Lysin 487 und in *cyp71a12 cyp71a13-2* zu einer Deletion von Asparaginsäure 488 im Vergleich mit *CYP71A12*. Anmerkung: Die 503 AS lange Referenzsequenz ist der Online Datenbank Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/>) entnommen. Die Website UniProt (<http://www.uniprot.org/>) verzeichnet eine alternative 497 bp lange Sequenz für *CYP71A12*. Das um 6 AS N-Terminal verkürzte Peptid ergibt sich aus der Transkription eines alternativen ORFs, die Nomenklatur der eingeführten Mutationen verschiebt sich für dieses Protein um 6 Positionen (Mutationen *CYP71A12* L481fs bzw. *CYP71A12* D 482del), Websites Stand 25.05.2018.

Linie 3 wurde in der T1-T3 auf die Anwesenheit des Transgens mittels PCR mit *Fok*I-spezifischen Primern untersucht. Das TALEN-Konstrukt segregierte in der T2-Generation im Verhältnis 44:4 und in der T3-Generation mit 9:1 (Transgen zu Wildtyp).

Um TALEN-vermittelte Mutationen außerhalb *CYP71A12* auszuschließen, wurden die potentiellen *Off-Targets* *CYP71A18* (91 %-ige Sequenzhomologie zu *CYP71A12*) und *CYP71B15* (eine Mutation zeigt einen potentiell vergleichbaren Camalexin-Phänotyp) in

cyp71a12 cyp71a13-1 und *cyp71a12 cyp71a13-2* vollständig sequenziert (Introns und Exons). Es wurde keine Sequenzveränderung festgestellt (Anhang, Abbildung 6-1 und Abbildung 6-2).

4.2.3. Phänotypisierung der *cyp71a12/a13*-Doppelmutante

Der Camalexinphänotyp der Doppelmutante nach abiotischer Stressinduktion

Die Camalexinkonzentrationen der Linien *cyp71a12 cyp71a13-1* und *cyp71a12 cyp71a13-2* (im Folgenden bezeichnet als *cyp71a12a13-1* bzw. *cyp71a12a13-2*) sowie der Einzelmутanten *cyp71a12* und *cyp71a13-1* und des Wildtyps Col-0 wurde nach abiotischer Induktion bestimmt (Abbildung 4-6). Blätter adulter Pflanzen wurden hierzu mit UV-Licht bestrahlt oder mit Silbernitratlösung besprüht (siehe 3.2.1). Beide Stressoren induzieren neben *CYP71A12* und *CYP71A13* auch *CYP71B15* und *CYP79B2* als weitere Gene der Camalexinbiosynthese.

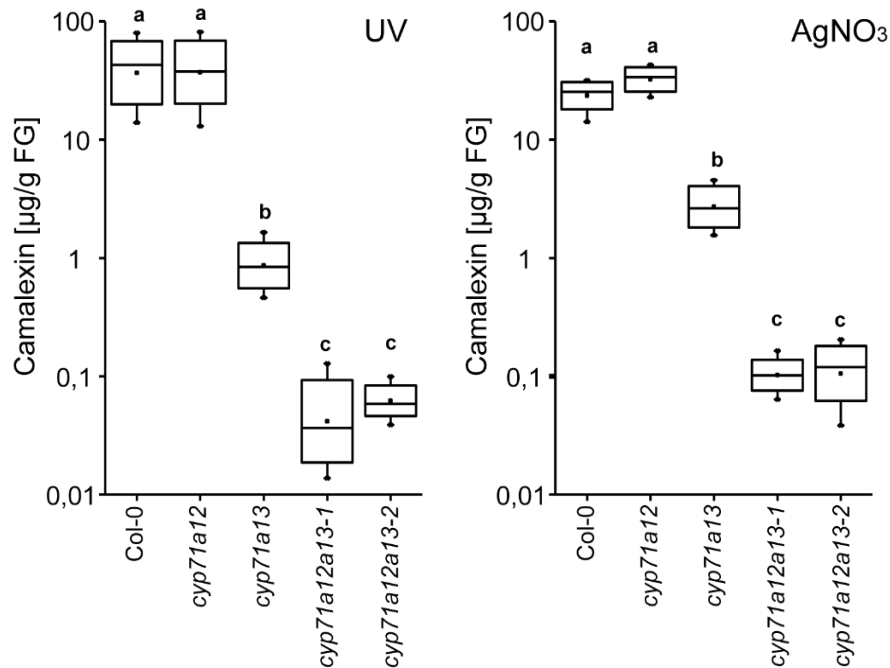


Abbildung 4-6 Absolute Camalexinquantifizierung in Col-0, *cyp71a12*, *cyp71a13-1* und den Doppelmutanten *cyp71a12a13-1* und *cyp71a12a13-2* nach Behandlung mit UV-Licht (links) und AgNO₃ (rechts). Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede der Mittelwerte an (bezogen auf log₁₀ transformierte Daten; ANOVA; post-hoc: Scheffé-test; $P < 0.05$; $n = 10$)

In Übereinstimmung mit eigenen Messungen und Nafisi et al. (2007) war der Camalexingehalt in *cyp71a13-1* signifikant reduziert. Nach AgNO₃-Behandlung wurden noch ca. 12,0 % und nach UV-Behandlung ca. 2,2 % des wildtypischen Camalexinlevels detektiert. *Cyp71a12* zeigte in seinem Camalexingehalt bei beiden Induktionsarten keine signifikante Abweichung zum Wildtyp. Beide Doppelmutantenlinien waren dagegen stark camalexindefizient: nach AgNO₃-Induktion wurden noch 0,5 %, nach UV-Behandlung noch etwa 0,15 % im Vergleich zum Wildtyp detektiert. Diese Camalexinmengen in *cyp71a12a13-1* und *cyp71a12a13-2* lagen (bei verwendeter Extraktions- und Nachweißmethode) nur wenig

über dem *limit of quantification* (LOQ; 5 pmol Camalexin, bestimmt als 9-faches des Rauschens) und waren signifikant geringer als in der *cyp71a13-1* Linie. Der Vergleich zwischen der partiell Camalexin-defizienten *cyp71a13-1* und den *cyp71a12/a13*-Doppelmutanten, in denen Camalexin nur noch in Spuren detektiert wurde, demonstriert eine anteilige Funktion von CYP71A12 in der Camalexinbiosynthese in Blättern.

Komplementierung der Camalexindefizienz der Doppelmutante

Um den kausalen Zusammenhang der TALEN-vermittelten Mutationen in *CYP71A12* mit der fast vollständigen Camalexindefizienz in den Doppelmutanten zu untermauern, wurden beide Doppelmutanten mit einem *CYP71A12*-Konstrukt unter der Kontrolle des konstitutiven Promotors CaMV 35S komplementiert. Unter diesem Promoter wurde das Transkript von *CYP71A12* bis zu 4000-mal stärker exprimiert als im Wildtyp Col-0 (nicht induzierte Bedingungen; Abbildung 4-7 A). Nach abiotischer Induktion dieser Linien wurden in den Komplementationslinien *p35S::A12 in cyp71a12a13-1* und *p35S::A12 in cyp71a12a13-2* Camalexinmengen im Bereich der *CYP71A13*-Einzelmutante detektiert. Höhere Werte im Bereich des Wildtyps und *cyp71a12* wurden durch Transformation der Doppelmutante mit konstitutiv exprimiertem *CYP71A13* erreicht (Linie *p35S::A13 in cyp71a12a13-1*, Abbildung 4-7 B). Somit komplementieren beide Gene den camalexindefizienten Phänotyp der Doppelmutante.

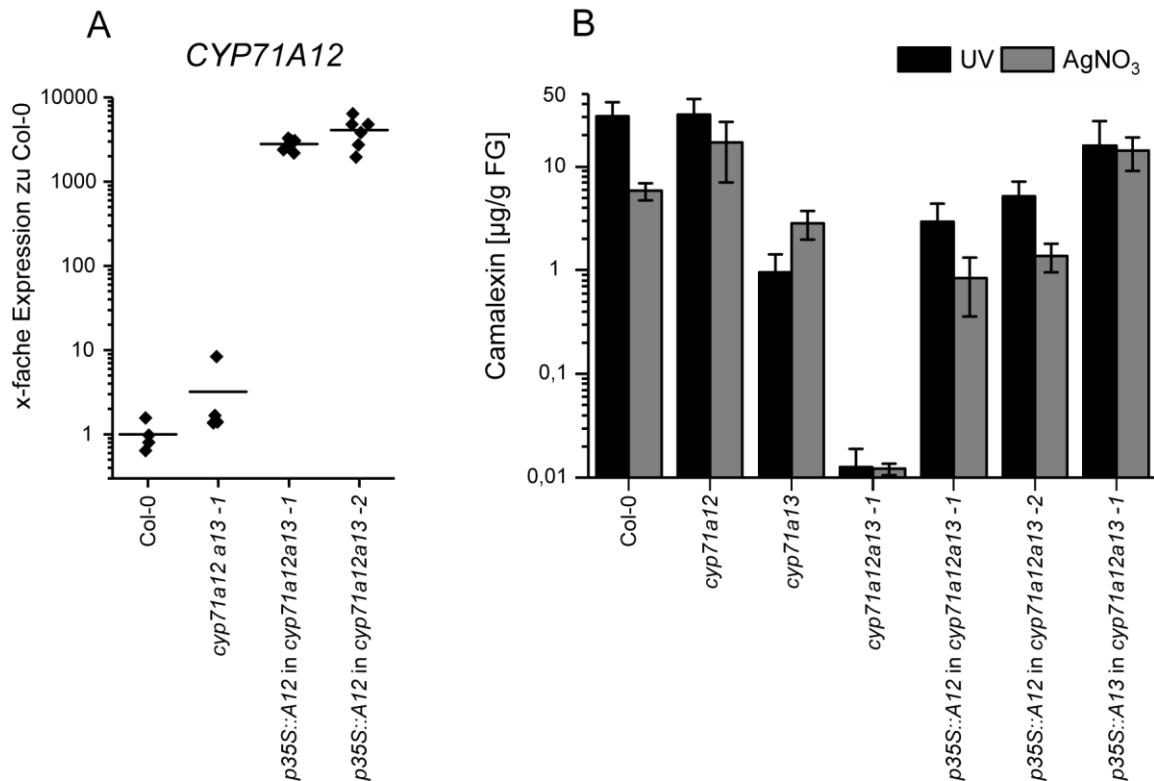


Abbildung 4-7 Überexpression von *CYP71A12* oder *CYP71A13* in *cyp71a12/a13*-Doppelmutanten. A: Relative Expression von *CYP71A12* im Wildtyp (Col-0), *cyp71a12a13-1* und zwei konstitutiven *CYP71A12*-Überexpresmierer-Linien im Doppelmutanten-Hintergrund. Die gemittelte Expression im nicht induzierten Wildtyp ist der Bezugswert. Referenzgen: *Aktin1*; n=4-6. Ein analoges Experiment mit *GAPC1* als Referenzgen zeigte vergleichbare Werte (nicht dargestellt). B: Absolute Camalexin-Quantifizierung nach UV- (2+22h) und AgNO₃-Behandlung (24h) im Wildtyp, *cyp71a12* und *cyp71a13*-Mutanten (Einzel- und Doppelmutanten) und Komplementationslinien. n=6.

Analyse der IAOx-abhängigen Metabolite

In der *cyp71a12/a13*-Doppelmutante war der Camalexinbiosyntheseweg beinahe vollständig blockiert. Um den Einfluss dieser Mutationen auf andere Tryptophan-abhängige Metabolite zu untersuchen, wurden die Metabolitprofile der Linien Col-0, *cyp79b2b3*, *cyp71a12*, *cyp71a13-1* und *cyp71a12a13-1* mittels UHPLC/ESI-QTOFMS analysiert (in Kooperation mit Dr. C. Böttcher, siehe 3.4). Dabei wurden gezielt die Metabolite betrachtet, die von Tryptophan ausgehend über CYP79B2/B3 synthetisiert werden und somit in der *cyp79b2b3* Mutante im Vergleich zum Wildtyp signifikant reduziert waren bzw. nicht detektiert werden konnten. Um induzierbare und konstitutiv gebildete Metabolite zu unterscheiden, wurden vier verschiedene Behandlungen der Blätter untersucht: UV-Licht (2 h bestrahlt und für 22 h inkubiert), keine Induktion (Kontrolle), Silbernitratsspray (5 mM, 24 h inkubiert) und mit doppelt destilliertem Wasser besprühte Blätter (24 h inkubiert; *mock*). Behandlungsübergreifend wurden 20 von IAOx abgeleitete indolische Verbindungen identifiziert, wobei zur Annotation die Böttcher et al. (2009 und 2014) zugrundeliegenden Datensätze herangezogen wurden (Tabelle 4-2).

Ergebnisse

Tabelle 4-2 Analytische Daten von 20 Indolverbindungen. U: unbekannte Verbindung. Die Identifizierung der Analyten erfolgte im Abgleich mit den analytischen Daten aus ¹Böttcher et al. (2009) und ²Böttcher et al. (2014).

Verbindung	Elementzusammensetzung	Retentionszeit [min]	Quantifier Ion	
			Typ	m/z
Tryptophan (Trp)	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	2.19	[M-H] ⁻	203.083
Glutathion-IAN ¹ (GS-IAN)	C ₂₀ H ₂₃ N ₅ O ₆ S	4.13	[M+H] ⁺	462.144
Dihydrocamalexinsäure ¹ (DHCA)	C ₁₂ H ₁₀ N ₂ O ₂ S	3.45	[M+H] ⁺	247.054
Camalexin ¹	C ₁₁ H ₈ N ₂ S	7.02	[M+H] ⁺	201.048
Hydroxycamalexin-Malonylhexosid ¹ (HC MalonylHex #2)	C ₂₀ H ₂₀ N ₂ O ₉ S	5.10	[M-H] ⁻	199.034
ICOOH ²	C ₉ H ₇ NO ₂	4.65	[M+H] ⁺	465.096
ICOOMe ²	C ₁₀ H ₉ NO ₂	4.65	[M-H] ⁻	160.040
ICOOGlc ²	C ₁₅ H ₁₇ NO ₇	7.07	[M-H] ⁻	174.056
6-HO-ICOOGlc ²	C ₁₅ H ₁₇ NO ₈	3.44	[M-H] ⁻	322.093
6-GlcO-ICOOH ²	C ₁₅ H ₁₇ NO ₈	1.74	[M-H] ⁻	338.088
6-GlcO-ICOOGlc ²	C ₁₅ H ₁₇ NO ₈	1.59	[M-H] ⁻	338.088
ICHO ²	C ₂₁ H ₂₇ NO ₁₃	1.10	[M-H] ⁻	500.141
5-GlcO-ICHO ²	C ₉ H ₇ NO	4.77	[M-H] ⁻	144.045
4-GlcO-ICHO ²	C ₁₅ H ₁₇ NO ₇	1.71	[M-H] ⁻	322.093
Dihydroascorbigenhexosid ²	C ₁₅ H ₁₇ NO ₇	2.08	[M-H] ⁻	322.093
U15 ² (Hexosid von C ₉ H ₇ NO ₃)	C ₂₁ H ₂₇ NO ₁₁	3.01	[M-H] ⁻	468.151
U16 ² (Hexosid von C ₉ H ₇ NO ₃)	C ₁₅ H ₁₇ NO ₈	1.99	[M-H] ⁻	338.088
U17 ² (Hexosid von C ₉ H ₇ NO ₃)	C ₁₅ H ₁₇ NO ₈	2.35	[M-H] ⁻	338.088
U19 ²	C ₁₅ H ₁₇ NO ₈	3.10	[M-H] ⁻	338.088
	C ₁₂ H ₁₂ N ₂ O ₄	2.55	[M-H] ⁻	247.072

Wie schon in Böttcher et al. (2014); Glawischig et al. (2004); und Zhao et al. (2002) gezeigt, enthielten die Blätter von *cyp79b2b3* auch nach abiotischer Induktion weder Camalexin noch indolische GSL. Zusätzlich waren die Indolcarbonsäure ICOOH und der Indolaldehyd ICHO sowie deren Derivate abwesend oder drastisch reduziert. 6-GlcO-ICOOH, 5-GlcO-ICHO, ICOOGlc, ICHO, 4-GlcO-ICHO, 4-HO-ICHO, 6-HO-ICOOGlc, ICOOH, U15, U16, U17 und U19 konnten auch in der IAOx-defizienten *cyp79b2b3*-Doppelmutante nachgewiesen werden, jedoch nur 6-GlcO-ICOOH, 5-GlcO-ICHO, ICOOGlc, und ICHO über alle Behandlungen hinweg (Abbildung 4-8).

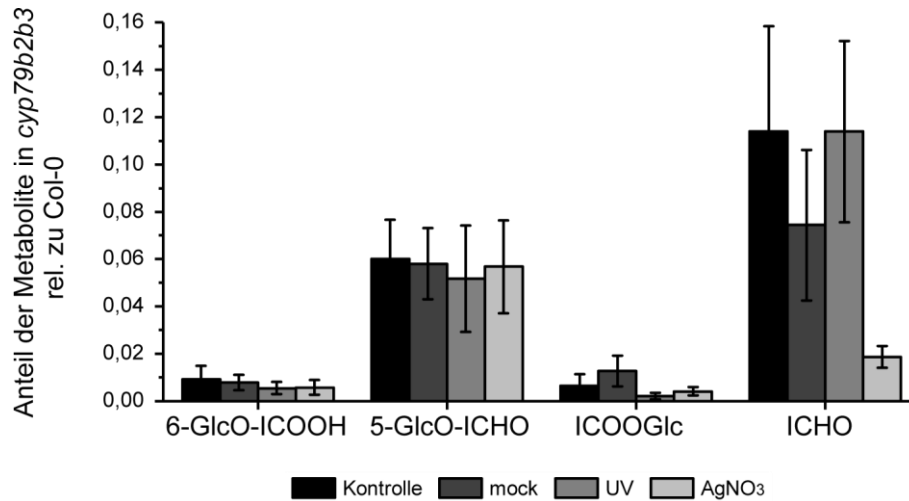


Abbildung 4-8 Relative Mediane von in *cyp79b2b3* detektiertem 6-GlcO-ICOOH, 5-GlcO-ICHO, ICOOGlc, und ICHO im Vergleich zu im Wildtyp Col-0 bestimmten Mengen. n=4-11.

Während die Säurederivate sowie die an Position vier substituierten Aldehyde in *cyp79b2b3* nur zwischen ca. 0,2 bis 2 % der Wildtypmenge ausmachten (unabhängig von der Behandlung), ist die Bildung von 5-GlcO-ICHO und dem unsubstituierten ICHO zu etwa 5-12 % unabhängig vom durch CYP79B2/B3 gebildetem IAOx.

Anders als die aus IAOx hervorgehenden Metabolite, akkumuliert die Vorstufe Tryptophan, das Substrat von CYP79B2 und CYP79B3, in der Doppelmutante in Relation zum Wildtyp Col-0. Dies ist über beide Kontroll- und die beiden Induktionsdatensätze hinweg konsistent. Im Vergleich der Mittelwerte (log₂-transformiert) ist diese Akkumulation hoch signifikant (Abbildung 4-9 E) und verdeutlicht die Umwandlung des Tryptophans durch die beiden CYP79Bs als wichtiges metabolisches *sink* der Aminosäure.

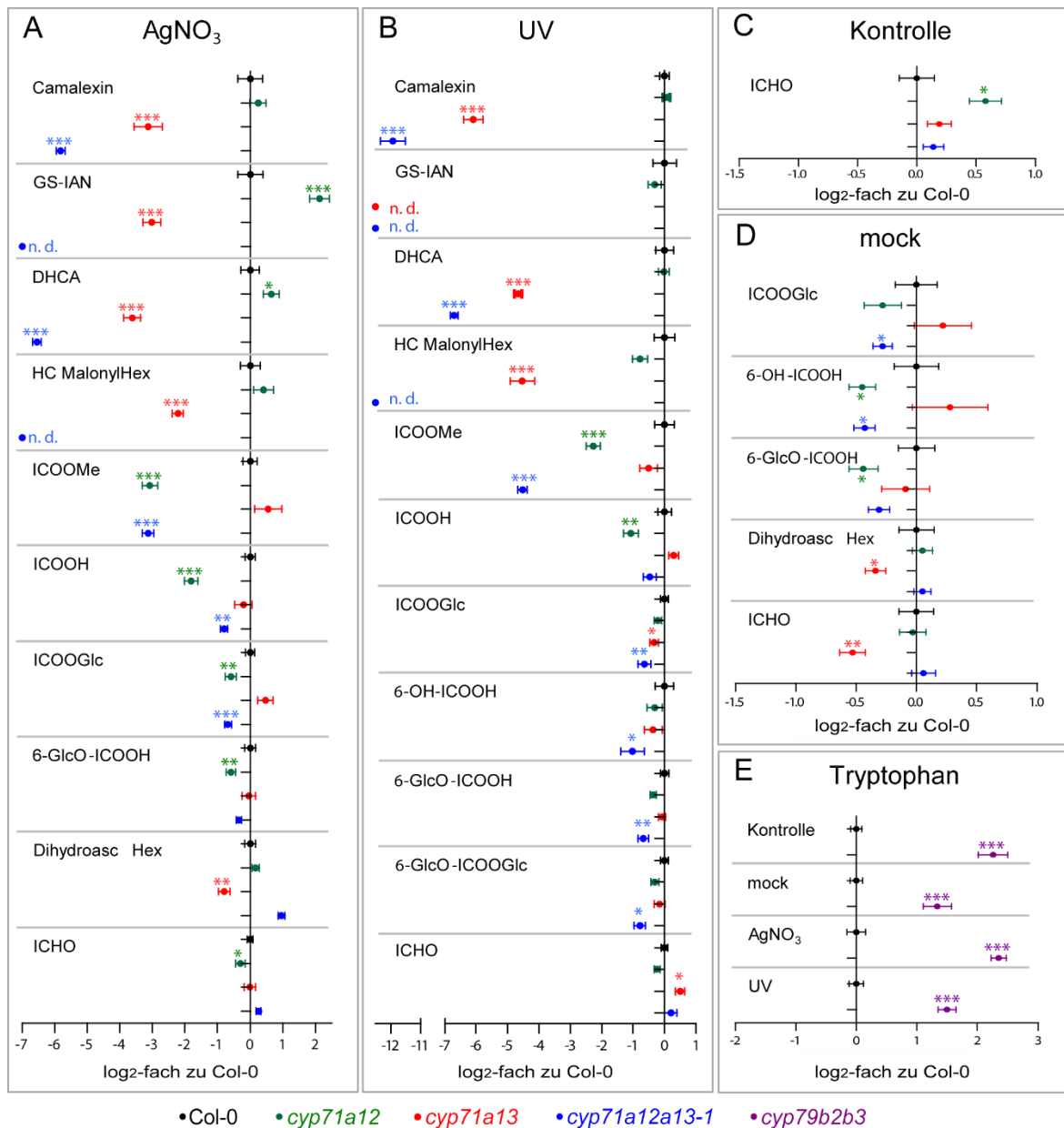


Abbildung 4-9 Metabolitanalyse der *cyp71a12/a13*-Doppelmutante. A-D: IAOx-abhängige Metabolite in Rosettenblättern des Wildtyps (Col-0, schwarz) und der Linien *cyp71a12* (grün), *cyp71a13* (rot) und *cyp71a12a13-1* (blau) A: 24 h nach Besprühen mit AgNO₃-Lösung, B: 22 h nach 2-stündiger UV-Bestrahlung, C: unbehandelt, D: 24 h nach Besprühen mit Wasser (*mock*). Es sind nur Metabolite gezeigt, für die signifikante Abweichungen in *cyp71a12*, *cyp71a13* oder *cyp71a12a13-1* bezüglich des Wildtyps Col-0 festgestellt wurden. E: Relative Quantifizierung von Trp in *cyp79b2b3* (violett) zu Col-0 (schwarz). A-E: Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwertes (n=9-11, n=20 für *cyp71a12a13-1* in A und D); Vergleich der Mittelwerte der log₂-transformierten Peakflächen zwischen Col-0 und Mutantenlinien mittels zweiseitigem *t*-test (* *P* ≤ 0.05, ** *P* ≤ 0.01, *** *P* ≤ 0.001). Der gesamte Datensatz aller relativ quantifizierter Metabolite ist im Anhang aufgeführt (Tabelle 6-1 bis Tabelle 6-4).

Abbildung 4-9 A-D zeigt alle Metabolite, bei dem sich in mindestens einem Genotyp signifikante Unterschiede (Student's *t*-test, *p* ≤ 0,05) zum Wildtyp detektieren ließen. Bei den mit Wasser besprühten Proben zeigten sich maximal Abnahmen von etwa -0,58-facher Änderung (log₂-fold-change) und keine signifikanten Anreicherungen. In der Kontrollbehandlung wurden zwar 12 der IAOx-abhängigen Metabolite detektiert, nur ICHO

wich signifikant von Wildtyp ab: in der *cyp71a12*-Linie war der Aldehyd um $0,58 \pm 0,43 \log_2$ -*fold-change* erhöht. Unter nicht-induzierten Bedingungen unterschieden sich die Mutanten somit kaum vom Wildtyp. Im Gegensatz dazu wurden nach Induktion mit Silberionen oder UV-Strahlung deutliche Unterschiede zwischen den Genotypen ersichtlich. Camalexin war bei beiden Induktionsarten in *cyp71a13-1* deutlich reduziert, in der *cyp71a12a13-1* Linie nur noch in Spuren vorhanden. Diese Beobachtung deckte sich mit den absoluten Quantifizierungen (Abbildung 4-6) und konnte hier auch für die direkten Camalexinvorstufen GS-IAN, DHCA sowie den designierten Hauptmetaboliten von Camalexin, Hydrocamalexin-Malonylhexosid (Böttcher et al., 2009) gezeigt werden (Abbildung 4-9 A, B). Der Camalexinbiosyntheseweg ist somit hauptsächlich von CYP71A13 unter Beteiligung von CYP71A12 abhängig. Auch ICOOH sowie deren Methylester ICOOMe waren in *cyp71a12a13-1* im Vergleich zum Wildtyp reduziert, ebenso im vergleichbaren Maße in der *cyp71a12* Mutante, nicht aber in *cyp71a13-1*. In *cyp71a12a13-1* war die unmodifizierte Säure nach UV-Behandlung auf $72 \% \pm 46 \%$ und nach AgNO_3 -Induktion auf $76 \% \pm 32 \%$ reduziert. In der *cyp71a12*-Einzelmutante konnten nur noch $48 \% \pm 40 \%$ (UV-Datensatz) bzw. $29 \% \pm 15 \%$ (Silberbehandlung) der wildtypischen Mengen an ICOOH detektiert werden. Für den Methylester war diese Reduktion in CYP71A12-Mutanten noch drastischer und unabhängig vom Stressor statistisch signifikant. Nach UV-Behandlung fiel der ICOOMe-Gehalt in der *cyp71a12a13-1* Linie auf anteilig auf $4 \% \pm 3 \%$ ($p = 5,2\text{E-}5$) des Wildtyps, nach Silberbehandlung auf $18 \% \pm 14\%$ ($p = 1,8\text{E-}9$). In *cyp71a12* war die Reduktion vergleichbar, nach UV- bzw. AgNO_3 -Induktion wurden $21 \% \pm 16 \%$ ($p = 3,6\text{E-}4$) und $12 \% \pm 12 \%$ ($p = 2,3\text{E-}5$) des Wildtyps an ICOOMe detektiert. Die gleiche Tendenz galt auch für die anderen ICOOH-Derivate, ICOOGlc, 6-HO-ICOOGlc, 6-GlcO-ICOOH und 6-GlcO-ICOOGlc. Jedoch waren die Unterschiede zum Wildtyp deutlich geringer und zudem nach UV-Induktion weniger konsistent als nach AgNO_3 -Behandlung. Die Unterschiede zwischen Mutantenlinien und Wildtyp waren für den Aldehyd ICHO und seine detektierten Derivate 4-HO-ICHO, 4-GlcO-ICHO und 5-GlcO-ICHO unabhängig von der Behandlung jeweils nur minimal. Die Biosynthese dieser Metabolite war somit nicht von den Mutationen in CYP71A12 und CYP71A13 beeinflusst, obwohl die Synthese von ICHO als überwiegend IAN-abhängig beschrieben ist (Böttcher et al., 2014).

Die IAOx abhängigen Derivate des Tryptophans ließen sich so in drei metabolische Gruppen kategorisieren: die Gruppe der vorwiegend CYP71A13-abhängigen Metabolite (Camalexingruppe), CYP71A12-abhängige Metabolite (Indolcarbonsäuren) und die Metabolite, deren Biosyntheseweg weder über CYP71A12 noch über CYP71A13 abläuft (Indolaldehyde).

4.3. Der Camalexinphänotyp der Einzelmutante von *CYP71A18* und Mehrfachmutanten von *CYP71A12*, *CYP71A13* und *CYP71A18*

CYP71A18 ist sequenziell am nächsten verwandt zu den Tandemgenen *CYP71A12* und *CYP71A13*. Es ist jedoch, anders als die beiden anderen, auf Chromosom 1 lokalisiert. Seine biologische Funktion ist unbekannt. Das Expressionsmuster ähnelt *CYP71A12* (siehe 4.1.). Aufgrund der anzunehmenden strukturellen Ähnlichkeit zu *CYP71A12* und *CYP71A13* wurden die Enzymeigenschaften von *CYP71A18* im Rahmen der Bachelorarbeit von Cornelia Götz (2012) untersucht. Das methodische Vorgehen war analog zu der in Müller et al. (2015) beschriebenen Analyse von heterolog exprimierten *CYP71A12*. Das *CYP71A18*-Transkript AT1G11610.1 (497 Basenpaare) wurde von Dr. Carole Gavira (Universität Staßburg, Gavira, 2013) mittels USER-Methode (Geu-Flores et al., 2007) in den Vektor pYeDP60u2 kloniert und von Cornelia Götz heterolog in Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*, Stamm WAT11) exprimiert. Sie konnte zeigen, dass *CYP71A18* über ein mit *CYP71A12* überlappendes Reaktionsspektrum verfügt, welches sich von dem von *CYP71A13* unterscheidet. *CYP71A12* und *CYP71A18* setzen IAOx NADPH-abhängig zu IAN und ICHO (unter Cyanidabspaltung) um. Im Gegensatz dazu entsteht bei der Katalyse durch *CYP71A13* primär IAN, ICHO dagegen nur in Spuren. In Anwesenheit von GSH setzt *CYP71A13* IAOx direkt zu GS-IAN um (anteilig bis zu 22 % der Gesamtprodukte). Diese Reaktion wird von *CYP71A12* kaum (GS-IAN entspricht unter 2 % Anteil am Gesamtprodukt) und von *CYP71A18* wohl gar nicht (kein GS-IAN detektiert) katalysiert (Götz, 2012; Klein et al., 2013; Müller et al., 2015). Analog zu *CYP71A12* kann *CYP71A18* zudem die Synthese von ICHO aus IAN katalysieren. IAOx stellt jedoch im Vergleich zu IAN das stark bevorzugte Substrat der beiden Enzyme dar (Götz, 2012).

Die biologische Funktion von *CYP71A12* bei der Umsetzung von IAOx in *Arabidopsis thaliana* wurde bereits beschrieben (Millet et al., 2010; Müller et al., 2015; Rajniak et al., 2015). Die nahezu analogen Enzymeigenschaften von *CYP71A18* suggerieren auch für dieses *CYP71A* eine Rolle beim Umsatz von IAOx. Ob eine Redundanz drei Enzyme *CYP71A12*, *CYP71A13* und *CYP71A18* *in planta* vorliegt, wurde mittels *Knock-out*-Mutantenlinien untersucht. Neben der *cyp71a18*-Einzelmutante (WiscDsLox297300_18A) wurden hierzu auch die Doppelmutanten *cyp71a12 x cyp71a18*, *cyp71a13 x cyp71a18* sowie die Dreifachmutante *cyp71a12a13-1 x cyp71a18* (kurz: *cyp71a12a13a18*) phänotypisiert. Letztere wurde über die Kreuzung von *cyp71a12a13-1* mit *cyp71a18* generiert.

Diese Kreuzung wurde mit *cyp71a18* als Donor und *cyp71a12a13-1* als Akzeptor sowie reziprok mit der Doppelmutante als Pollenspender durchgeführt. In der dritten Generation (F3) konnten Pflanzen, die homozygot beide T-DNA-Insertionen in *CYP71A13* und *CYP71A18* trugen sowie die TALEN-induzierte Mutation in *CYP71A12* zeigten, mittels PCR bzw. PCR und anschließendem *Bsal*-Verdau bestätigt werden. Zudem konnten homozygote

Doppelmutantenlinien *cyp71a12 x cyp71a18* (kurz: *cyp71a12a18*) und *cyp71a13 x cyp71a18* (kurz: *cyp71a13a18*) generiert werden. Diese Linien wurden auf ihren Camalexinphänotyp hin untersucht und mit den jeweiligen Einzelmutanten, dem Wildtyp und *cyp71a12a13-1* verglichen. Die Camalexinquantifizierung in adulten Blättern nach abiotischer Induktion zeigte für die *cyp71a18* Mutante sowie für die 2- und 3-fach Mutanten mit *cyp71a12*, *cyp71a13* oder *cyp71a12a13-1* keine Unterschiede zu Col-0 bzw. den entsprechenden Mutanten oder Mutantenkombinationen mit intakten *CYP71A18* Gen (Abbildung 4-10).

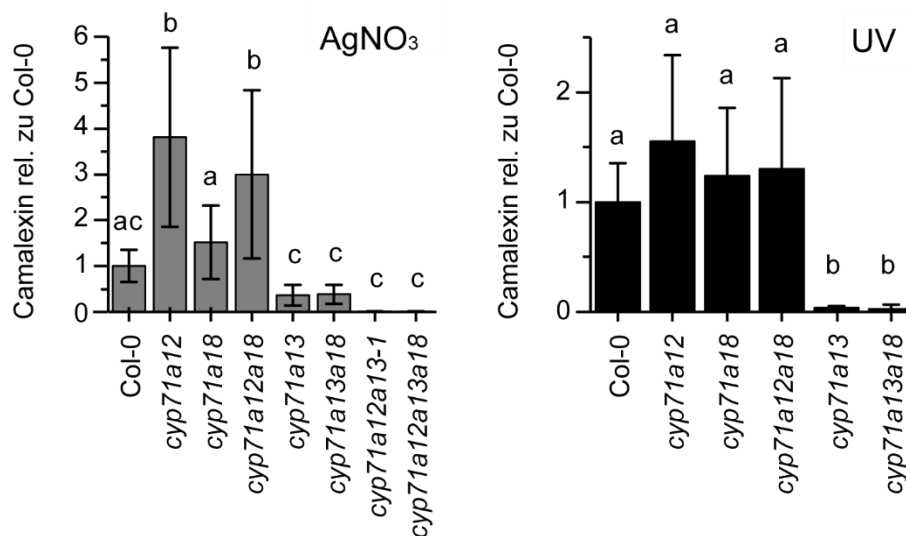


Abbildung 4-10 Camalexinquantifizierung in *cyp71a18*-Mutanten nach UV- (2+22 h) und Silbernitratinduktion (24 h). Die Daten wurden aus mehreren Experimenten zusammengefasst und sind relativ zum gemittelten Wildtyp dargestellt. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede der Mittelwerte an; ANOVA, post-hoc: Scheffé-test; $P < 0.05$; $n=9-25$ für AgNO_3 -Induktion; $n= 12-18$ für UV-Induktion.

Trotz der *in-vitro*-Kapazität von *CYP71A18* zur Umsetzung von IAOx scheint der Ausfall des *CYP71A18*-Gens keinen Einfluss auf die IAOx-abhängige Synthese von Camalexin in Rosettenblättern zu haben.

4.4. Die Anfälligkeit der *CYP71A*-Mutanten gegenüber dem Pathogen *Botrytis cinerea*

Der nekrotrophe Pilz *Botrytis cinerea* (*B.c.*) gehört zu den bedeutendsten Pflanzenpathogenen. Durch sein breites Spektrum von über 200 verschiedenen Wirtspflanzen verursacht er immensen wirtschaftlichen Schaden sowohl vor als auch nach der Ernte (Dean et al., 2012; Droby und Lichter, 2007). Er dient zudem als Modellpathogen bei der Untersuchung der Anfälligkeit verschiedener Nutz- und Modellpflanzen. Der Durchmesser der Infektion (Läsionsgröße) nach einer festgelegten Inkubationszeit ist eine etablierte Messgröße für die schwere des Befalls von Pflanzen mit *B.c.* wie auch anderer Pflanzenpathogene, z.B. *Alternaria brassicola* (Liu et al., 2014; Stefanato et al., 2009; Thomma et al., 1998).

In *Arabidopsis thaliana* führt die Infektion mit *B.c.*-Sporen zu einer Akkumulation des Phytoalexins Camalexin. Wildtyppflanzen sind deutlich resistenter gegenüber dem Pathogen als die Mutante des Camalexinbiosynthesewegs *pad3* oder der Mutante des Transkriptionsfaktors *WRKY33*, die eine verzögerte Camalexinantwort zeigt (Birkenbihl et al., 2012; Ferrari et al., 2003). Die Infektion der beschriebenen Mutanten mit *B.c.* eignet sich somit gut für die Untersuchung des Einflusses der unterschiedlichen *CYP71A*-Gene auf die Pathogenempfindlichkeit von *Arabidopsis thaliana*.

4.4.1. Der Camalexinphänotyp nach *B.c.*-Infektion

Der durch *B.c.* induzierte Camalexingehalt wurde in den Mutanten *cyp71a12*, *cyp71a13*, *cyp71a18*, *cyp71a12a13*, *cyp71a12a13a18* sowie *pad3* und *cyp79b2b3* bestimmt und war jeweils vergleichbar mit der Induktion durch abiotischen Stressoren (Abbildung 4-11).

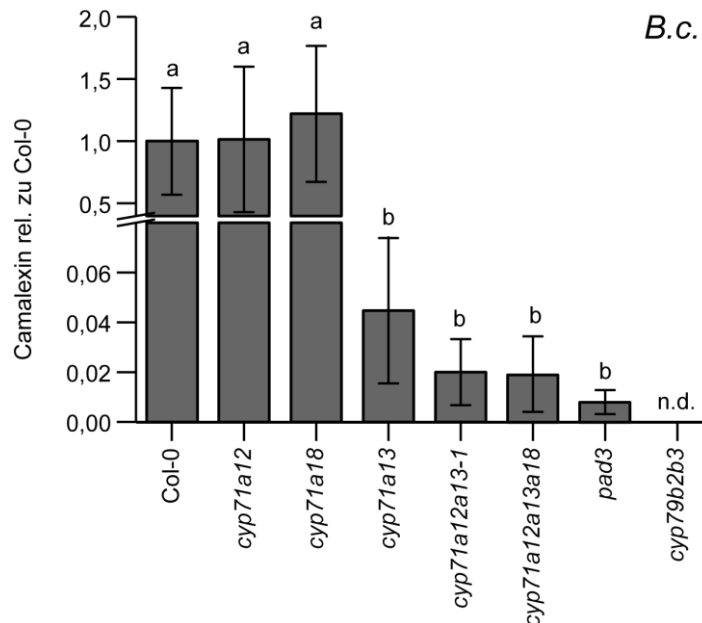


Abbildung 4-11 Camalexinquantifizierung in *CYP71A*-Mutanten nach Induktion mit *Botrytis cinerea* (48 h). Die Daten sind relativ zum gemittelten Wildtyp dargestellt. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede der Mittelwerte an. ANOVA, post-hoc: Scheffé-test; $P < 0.05$, $n=6-21$. Die Daten wurden aus mehreren Experimenten zusammengefasst, darunter auch Ergebnisse von Maximilian Otto, die bereits in seiner Bachelorarbeit gezeigt wurden (Otto, 2015).

Die beiden Einzelmutanten *cyp71a12* und *cyp71a18* erreichten nach Induktion wildtypische Camalexinkonzentrationen. In *cyp71a13* wurde hingegen weniger als 1 % Camalexin im Vergleich zum Wildtyp detektiert. In den Mehrfachmutanten *cyp71a12a13-1*, *cyp71a12a13a18* sowie in *pad3* war noch weniger Camalexin enthalten, der Unterschied zu *cyp71a13* war jedoch nicht statistisch signifikant. In der IAOx-defizienten Linie *cyp79b2b3* war kein Camalexin nachweisbar. Generell ähnelte das Camalexinmuster beim Vergleich zwischen Wildtyp und den verschiedenen Mutanten nach *B.c.*-Infektion der durch die abiotischen Stressoren hervorgerufenen Camalexinantwort. Auch lag der absolute

Camalexingehalt nach *B.c.*-Infektion (48 h) mit $19,1 \pm 11,6$ in einer Größenordnung mit den durch UV-Licht bzw. Silberionen induzierten Camalexinmengen (siehe Abbildung 4-6). Damit kann von einer ähnlichen, universellen Camalexinantwort der generierten *CYP71A*-Mutanten unabhängig von der Art des Stressors ausgegangen werden.

4.4.2. Empfindlichkeit der *CYP71A*-Mutanten gegenüber *B.c.*

Um zu beleuchten, inwieweit die Camalexinantwort der *CYP71A*-Mutanten mit deren Pathogensuszeptibilität korreliert, wurde der Läsionsdurchmesser der Infektion nach Betropfung mit *B.c.*-Sporensuspension ($1-2 \times 10^5$ Konidien/ml) bestimmt. Als Vergleichsgruppen dienten der Wildtyp Col-0 sowie die Linien *pad3* und *cyp79b2b3*.

Vorversuche (ohne Abbildung) zeigten, dass der durchschnittliche Läsionsdurchmesser insbesondere bei Werten zwischen etwa 3,5 mm - 5 mm für eine Abschätzung der Infektionsschwere nur minder geeignet war. Die Stärke der Chlorose variierte bei gleichem Läsionsdurchmesser deutlich. Dabei ist eine stärkere Chlorose bzw. Gelbfärbung der infizierten Zone im Vergleich zu einer flächenmäßig gleich großen, aber noch deutlich grüneren Läsion, als schwerere Infektion zu deuten. Um diesem Umstand gerecht zu werden, wurden die Schweregrade der Botrytisinfektion in fünf Boniturklassen eingeteilt (Abbildung 4-12 A): Boniturklasse 1 - keine Läsion, nekrotisierte Fläche hat die Größe des Sporentropfens, Boniturklasse 2 - kleine, schwache, nur wenig chlorotische Läsion, Boniturklasse 3 - kleine Läsion, starke Verfärbung, Boniturklasse 4 - mittelgroße Läsion, starke Verfärbung, Boniturklasse 5 - große, flächige Läsion, starke Verfärbung.

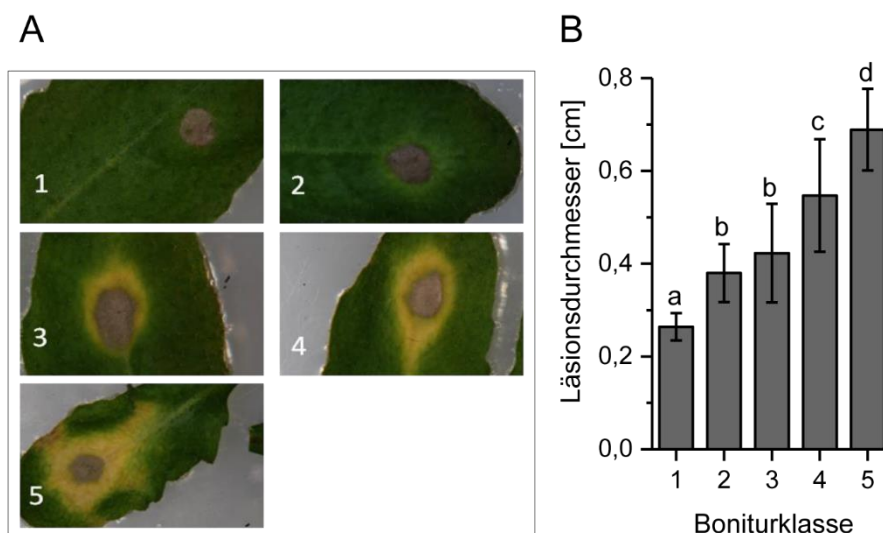


Abbildung 4-12 A,B Bonitierungs-system *B.c.*-infizierter Blätter. A: Einteilung der Boniturklassen 1-5. 1: keine Läsion, nekrotisierte Fläche hat die Größe des Sporentropfens, 2: kleine, schwache Läsion, 3: kleine Läsion, starke Verfärbung, 4: mittelgroße Läsion, starke Verfärbung, 5 große Läsion, starke Verfärbung. B: Zusammenhang zwischen Läsionsgröße und Boniturklasse. ANOVA; Scheffé-Test, gleiche Buchstaben bedeuten keine signifikanten Unterschiede der Mittelwerte ($\alpha = 0,05$), $n = 20-54$. Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

Der Zusammenhang zwischen Boniturklassen und Läsionsdurchmesser (Abbildung 4-12 B) zeigte eine gute Korrelation. Mit Ausnahme der Boniturklassen 2 und 3, die aufgrund ihres ähnlichen Durchmessers zusammenfallen, waren die einzelnen Klassen auch über ihre Größe signifikant unterscheidbar. Die Klassifizierung der Symptome lässt somit im Vergleich zur alleinigen Betrachtung des Läsionsdurchmessers eine genauere Bewertung der Infektionsschwere zu.

Die Linien Col-0, *cyp71a12*, *cyp71a13*, *cyp71a12a13*, *cyp71a12a13a18*, *pad3* und *cyp79b2b3* wurden mit Sporensuspension betropft und die Krankheitssymptome nach 3 dpi anhand der festgelegten Boniturklassen kategorisiert. Zur Interpretation der Daten wurde der Krankheitsindex (*disease index*, DI) herangezogen, der nach der Formel $DI = (1n_2 + 2n_3 + 3n_4 + 4n_5) \times 100 / 4N_{\text{gesamt}}$ berechnet wird. Die Variablen n_2 bis n_5 bedeuten die Anzahl der Proben aus der angezeigten Boniturklasse und N_{gesamt} steht für Gesamtprobenanzahl (Klewer et al., 2001). Der DI kann Werte von 0 bis 100 erreichen, ein höherer DI spiegelt eine stärkere Infektion wider. Neben dem DI diente der Median als Vergleichsgröße der Genotypen.

Es wurden zwei Experimentreihen durchgeführt, da die *cyp71a12a13a18*-Mutante erst zu einem späteren Zeitpunkt zugänglich war. Ergebnisse dieser beiden Reihen konnten nicht zusammengefasst werden, da die *B.c.*-Kultur, obwohl es sich um denselben Stamm handelte, in der zweiten Experimentreihe eine deutlich stärkere Pathogenität aufwies.

Die erste Versuchsreihe mit den Linien Col-0, *cyp71a12*, *cyp71a13*, *cyp71a12a13*, *pad3* und *cyp79b2b3* (Abbildung 4-13 A) umfasste vier Einzelexperimente mit in der Summe je etwa 100 Proben pro Linie.

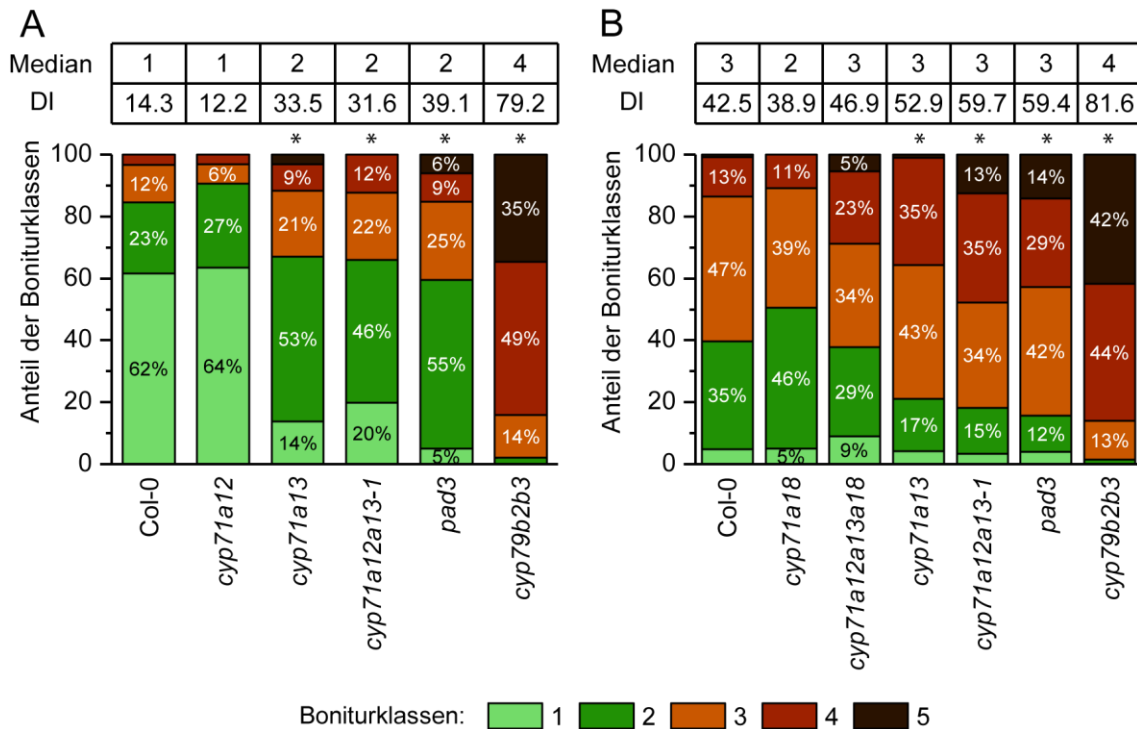


Abbildung 4-13 Läsionsschwere als Anteile der Boniturklassen 1-5 und Krankheitsindices DI verschiedener *CYP71A*-Mutanten, *pad3* und *cyp79b2b3* im Vergleich zum Wildtyp Col-0 nach *B.c.*-Infektion (72 h). Versuchsreihe A: Zusammengefasst aus vier Experimenten, $n_{\text{gesamt}}=92$ (Col-0) - 106 (*cyp71a12a13*). Versuchsreihe B: Zusammengefasst aus drei Experimenten, $n_{\text{gesamt}}=72$ (*cyp79b2b3*) - 170 (*cyp71a12a13a18*). DI berechnet nach Klewer et al. (2001). Asteriskus: signifikante Unterschiede zu Col-0 (Mann-Witney-U Test, Signifikanzniveau $\leq 0,05$).

Der Wildtyp zeigte in 62 % aller Proben keine erfolgreiche *B.c.*-Infektion, einen Median von 1 und einen geringen DI von 14,3 (Abbildung 4-13 A). Gegensätzlich dazu fielen auf die *cyp79b2b3*-Mutante, bei der alle IAOx-abhängigen Metabolite fehlen, 84 % in die beiden schwersten Krankheitskategorien 4 und 5. Der DI von 79,2 verdeutlichte die große Empfindlichkeit dieser Mutante gegenüber dem nekrotrophen Pathogen. Ebenfalls stark von der Infektion betroffen waren die Linien *cyp71a13*, *cyp71a12a13-1* und *pad3*. Hier zeigen je 12-15% aller Proben mittelschwere bis schwere Krankheitsanzeichen. Der DI liegt bei diesen drei Linien zwischen 32 und 39. Ihre Suszeptibilität gegenüber *B.c.* ist gegenüber Col-0 signifikant erhöht (Mann-Witney-U Test, $P \leq 0,05$). Die *cyp71a12*-Einzelmutante unterschied sich in ihrer Empfindlichkeit jedoch nicht vom Wildtyp, sie schien in dieser Experimentreihe mit einem DI von 12,2 sogar minimal resistenter als Col-0.

Für die 2. Experimentreihe (Abbildung 4-13 B) mit den Linien Col-0, *cyp71a18*, *cyp71a13*, *cyp71a12a13-1*, *cyp71a12a13a18*, *pad3* und *cyp79b2b3* wurden ebenfalls etwa 100 Proben je Genotyp aufgeteilt auf drei Einzelerperimente bonitiert (Abbildung 4-13 B). Auffällig zeigte sich das hohe Infektionslevel bereits beim Wildtyp, der Median lag hier bei 3, der DI bei 42,5. Zwar zeigte die besonders empfindliche *cyp79b2b3*-Mutante mit einem Median von 4 und einem DI von 81,6 noch deutlich stärkere Symptome, dennoch erschwerte die hohe Pathogenität des Pilzes das Erkennen von Unterschieden in der Empfindlichkeit der

einzelnen Genotypen. Eine Kruskal-Wallis-Varianzanalyse erkannte grundsätzliche signifikante Unterschiede zwischen den sieben untersuchten Genotypen, jedoch keinen Unterschied zwischen *cyp71a13*, *cyp71a12a13*, und *pad3* ($\alpha \leq 0,05$). Der DI dieser drei Linien rangiert zwischen 53 und 60. Im direkten Vergleich mit dem Wildtypen ergaben sich signifikante Unterschiede ($\alpha \leq 0,05$) zu *cyp79b2b3*, *pad3*, *cyp71a13*, *cyp71a12a13*. Im Gegensatz dazu grenzte der Mann-Whitney-U Test die Einzelmutante *cyp71a18* nicht vom Wildtyp Col-0 ab. Die Mehrfachmutante *cyp71a12a13a18* lag von ihrem DI-Wert von 47 zwischen Col-0 und *cyp71a13*. Sie unterschied sich in dieser Experimentreihe nicht signifikant vom Wildtyp, obwohl *cyp71a12a13a18* mit 28 % mehr als doppelt so viel Proben mit schweren Symptomen (Boniturklassen 4 und 5) aufwies als Col-0 (13 %) oder *cyp71a18* (11 %).

In grober Näherung konnte die Empfindlichkeit der betrachteten Linien gegenüber *B.c.* als indirekt proportional mit den induzierten Camalexinmengen gesehen werden. Col-0, *cyp71a12* und *cyp71a18* zeigten etwa gleich hohe Camalexinakkumulationen (Abbildung 4-11) und zugleich die geringste Anfälligkeit gegenüber dem Pathogen. Die camalexindefizienten Linien *cyp71a13*, *cyp71a12a13*, *cyp71a12a13a18* und *pad3* sind deutlich weniger resistent. Die Kontrolllinie *cyp79b2b3*, die keine IAOx-abhängigen Metabolite, also beispielsweise weder Camalexin noch die indolischen GSL bilden kann, zeigte erwartungsgemäß in allen Telexperimenten die schwersten Krankheitssymptome. Bezüglich des Einflusses anderer, spezifisch *CYP71A12*- oder *CYP71A18*-abhängiger Metaboliten lässt sich kein additiver Effekt auf die Abwehrfähigkeit gegenüber *B.c.* feststellen.

4.5. Der metabolische Phänotyp von Mehrfachmutanten der Gene *CYP71A12*, *CYP71A13*, *CYP71B6* und *AAO1*

CYP71B6 und *AAO1* sind unter Stressbedingungen mit der Camalexinbiosynthese koreguliert und katalysieren die Oxidationsreaktionen bei der Synthese von Indol-3-carbaldehyden und Indol-3-carbonsäurederivaten aus IAN. *CYP71B6* hat eine vergleichsweise hohe Affinität zu seinem Substrat IAN, das bevorzugt zu ICHO unter Abspaltung von Cyanid umgesetzt wird. *AAO1* kann *in vitro* die Oxidation von ICHO zur Säure ICOOH katalysieren (Böttcher et al., 2014). IAN ist ebenfalls ein Intermediat der Camalexinbiosynthese. Um die Querverknüpfungen des Biosynthesenetzwerks aus Camalexin, GSL, ICHO- und ICOOH- Derivaten zu beleuchten, wurden die Linien *cyp71a12a13-1*, *ao1* (SALK_069221) und *cyp71b6* (GABI305A04) miteinander gekreuzt. Die Mehrfachmutanten *cyp71b6/cyp71a12a13*, *ao1/cyp71a12a13*, *cyp71b6/ao1/cyp71a12a13*, *cyp71b6/ao1*, *cyp71a12a13-1* sowie die Einzelmutanten *cyp71b6* und *ao1* wurden auf ihren metabolischen Phänotyp unter Stressbedingungen untersucht. Über die Kombination mit den *Knock-out*-Linien *cyp71b6* und *ao1* sollte ein

differenzierter Zugang zu den ICHO- und ICOOH-Derivaten erhalten werden, um die Rolle dieser Verbindungen, beispielsweise in der Pathogenabwehr, untersuchen zu können.

4.5.1. Zielgerichtete Metabolitanalyse

Absolute Camalexinquantifizierung

Die absolute Bestimmung des Camalexingehalts nach UV- oder Silbernitratbehandlung ist in Abbildung 4-14 dargestellt. In der *aao1*-Mutante und in der Doppelmutante *cyp71b6/aao1* war der Anteil an Camalexin in den Blättern leicht, aber zum Teil signifikant reduziert, was auf eine Interaktion der verschiedenen Parallelsynthesen hindeutet.

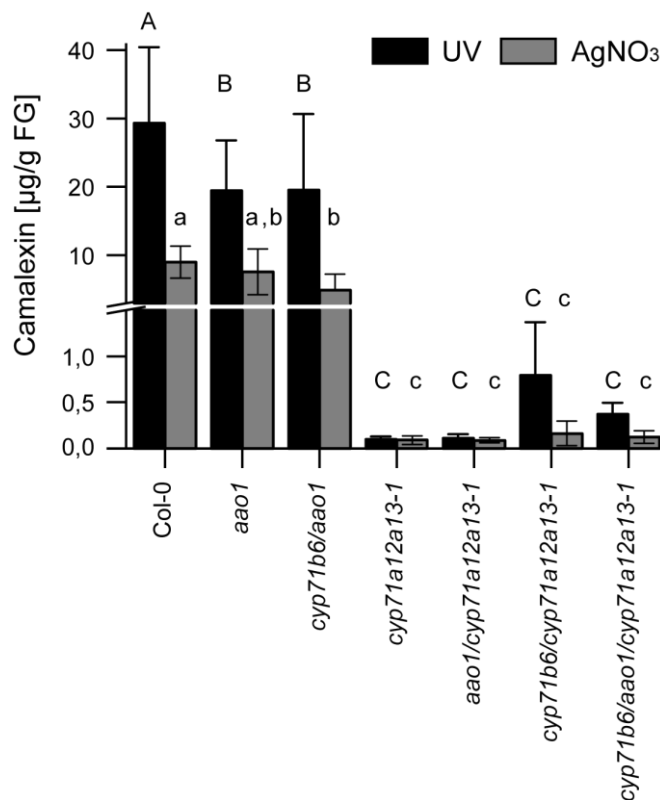


Abbildung 4-14 Absolute Camalexinquantifizierung in Mehrfachmutanten von *CYP71A12/A13*, *CYP71B6* und *AAO1* nach UV- (2+22 h; schwarz) und Silbernitratinduktion (24 h, grau). Gleiche Buchstaben bedeuten keine signifikanten Unterschiede der Mittelwerte (ANOVA Tukey HSD-Test, alpha = 0,05). n= 10 (außer *aao1* UV & Col-0 AgNO₃: n=9).

In allen Mutanten ohne intakte *CYP71A12* und *CYP71A13*-Gene war Camalexin drastisch reduziert. In den Kreuzungen mit *cyp71b6* war der Camalexingehalt im Vergleich dazu erhöht. Die Dreifachmutante *cyp71b6/cyp71a12a13* synthetisierte nach UV-Induktion durchschnittlich etwa 8x so viel Camalexin wie *cyp71a12a13*. Dieser Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant.

Analyse IAOx-abhängiger Metabolite

Die genauere Untersuchung der Metabolitmuster wurde mittels UPLC/MS-Analyse durchgeführt. Die Linien *cyp71b6/cyp71a12a13*, *aa01/cyp71a12a13*, *cyp71a12a13*, *cyp71b6/aa01/cyp71a12a13*, *cyp71b6/aa01*, *cyp71b6*, *aa01*, Col-0 und *cyp79b2b3* wurden in drei Experimenten analysiert: unbehandelte Blätter (Kontrolle) und UV- und Silbernitratbehandlung. Auf einen biotischen Stressor wurde verzichtet, um dessen Stoffwechselmetabolite zu vermeiden.

Der Fokus wurde auf die IAOx-abhängigen Metabolite gelegt, die von der Umwandlung von Trp in IAOx durch *CYP79B2* oder *CYP79B3* ausgehen. Der Gehalt dieser Metabolite war in der *cyp71b2b3*-Mutante signifikant reduziert oder der Metabolit war nicht nachweisbar. In den drei Probensätzen wurden bis zu 21 Indolverbindungen (inklusive Trp) identifiziert und jeweils relativ zum Wildtyp quantifiziert (Folgeabbildungen und Anhang, Tabelle 6-6, Abbildung 6-6, Abbildung 6-7).

Diese Metabolite deckten sich mit früheren Metabolitanalysen (Böttcher et al., 2014; Müller et al., 2015). Über Vergleiche mit diesen Massenspektren oder mit authentischen Standards erfolgte die Qualifizierung. Die analytischen Daten sind in Tabelle 4-2 und Tabelle 6-5 (Anhang) zusammengefasst.

Für die IAOx-abhängigen Metabolite waren die Ergebnisse der beiden Stresssets UV und Silber gut vergleichbar. 90 % der in beiden Analysen quantifizierten Metabolite zeigten in beiden Datensätzen jeweils dieselbe Tendenz relativ zum Wildtyp. Da nicht absolut quantifiziert wurde, konnten die Mengenunterschiede zwischen den drei Datensätzen jedoch nicht direkt verglichen werden. Im Kontrolldatensatz wurden kein GS-IAN und kein Camalexin detektiert, was den ungestressten Zustand der Pflanzen zum Zeitpunkt des Experiments bestätigt. Im unbehandelten Wildtyp konnte ein konstitutives Level an indolischen GSL, einiger Indolcarbonsäuren und -aldehyde gefunden werden. Trp akkumulierte in der IAOx-Mutante *cyp79b2b3* im Vergleich zu Col-0 (wie bereits im vorigen Experiment, vergleiche Abbildung 4-9 E) nach UV-Behandlung etwa 7-fach, nach AgNO₃-Behandlung mehr als 13-fach (Vergleich der Mediane).

Camalexin

Camalexin war durch die gewählten abiotischen Stressoren stark induzierbar (Abbildung 4-15). Im Wildtyp wurden die höchsten Mengen gefunden. Nach Silberinduktion war der Camalexingehalt in den Linien *aa01*, *cyp71b6* und *cyp71b6/aa01* leicht, aber statistisch signifikant reduziert, analog zu den Beobachtungen bei der absoluten Quantifizierung (Abbildung 4-14). Im UV-Datensatz konnte jedoch kein Unterschied zwischen Wildtyp und diesen Mutanten festgestellt werden. Bei allen Mutanten mit Mutationen in *CYP71A12* und *CYP71A13* kam es bei beiden Induktionen zu stark verringerten Camalexinmengen, im Silberexperiment wurde in diesen Linien kein Camalexin detektiert (der log₂-Wert wurde

pauschal auf -9,00 festgesetzt). Im UV-Datensatz fiel die Camalexindefizienz der *cyp71a12a13*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp jedoch weniger drastisch aus, wenn zusätzlich *cyp71b6* eingekreuzt war. *Cyp71b6/cyp71a12a13* und *cyp71b6/ao1/cyp71a12a13* enthielten etwa 39- und 30-mal so viel Camalexin wie *cyp71a12a13* beziehungsweise *ao1/cyp71a12a13*. Dieselbe Tendenz wurde bereits bei der absoluten Quantifizierung beobachtet.

Indolische GSL

Die Messwerte für die indolischen GSL wiesen relativ große Schwankungen auf, insbesondere im Wildtyp (Abbildung 4-15). Dennoch waren die Mediane dieser Metabolitgruppe tendenziell in *cyp71b6*- und *cyp71a12a13*-Mutanten, also Mutanten des IAN-Stoffwechsels, erhöht. Die indolischen GSL und die Camalexinbiosynthese haben mit IAOx denselben Ausgangsmetaboliten. Daher ist diese Tendenz bei Wegfall der IAOx/IAN metabolisierenden Enzyme als Anzeichen für eine Umleitung des Metabolitstroms des Camalexinwegs hin zur GSL-Biosynthese deutbar.

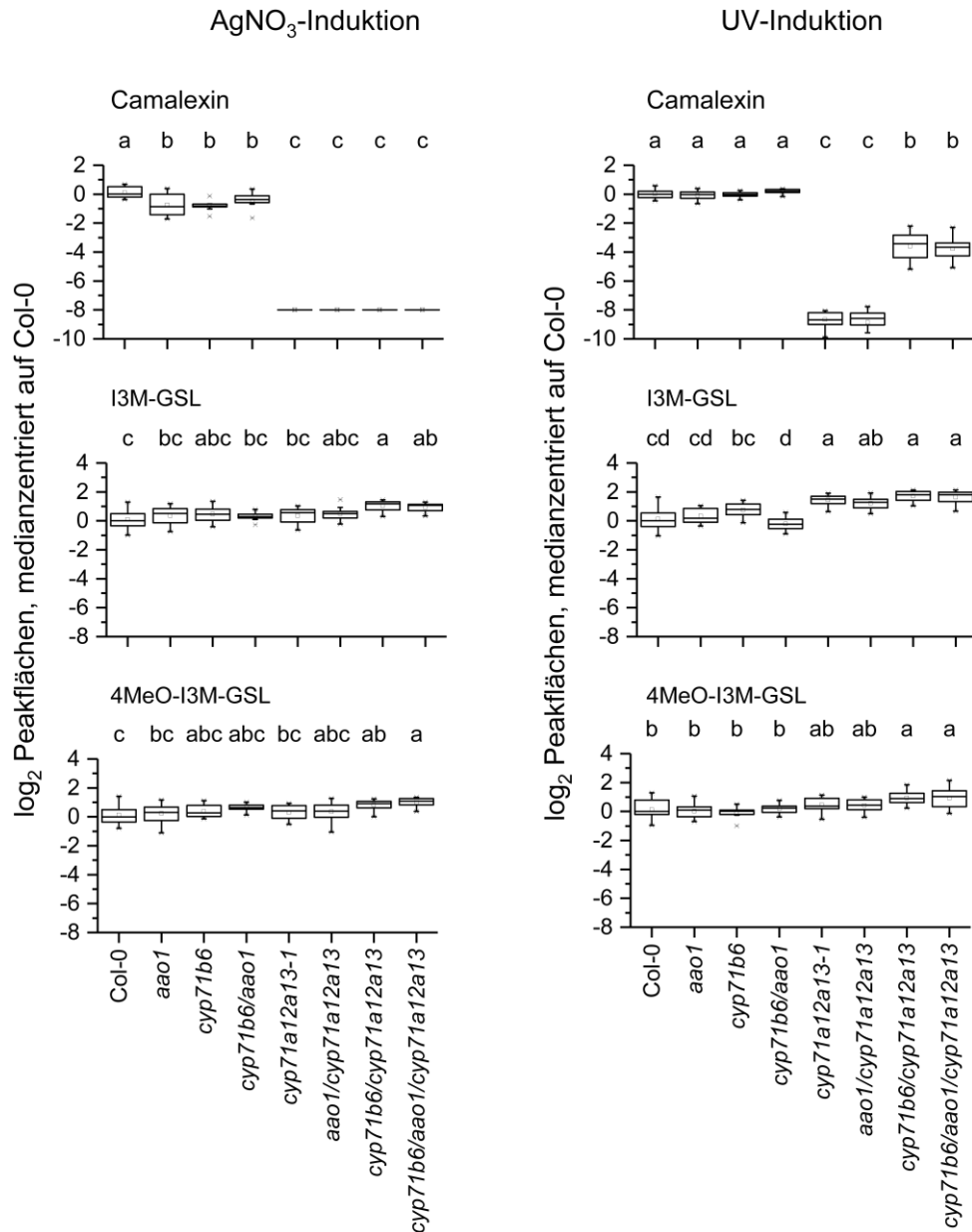


Abbildung 4-15 Relative Quantifizierung von Camalexin und repräsentativer indolischer GSL (I3M-GSL, 4MeO-I3M-GSL) in Rosettenblättern des Wildtyps Col-0 und Mutantenlinien nach AgNO₃- (links) und UV-Behandlung (rechts). Peakflächen wurden log₂-transformiert und Col-0-medianzentriert. Gleiche Buchstaben bedeuten keine signifikanten Unterschiede der Mittelwerte (Tukey HSD-Test, p ≤ 0,05, n=11-12)

Indolcarbonsäuren

Folgende Indolcarbonsäuren wurden in beiden Stressdatensätzen qualifiziert: ICOOH, ICOOGlc, 6-GlcO-ICOOGlc, 6-GlcO-ICOOH, 6-HO-ICOOGlc und ICOOMe. Innerhalb der Säuren war das Metabolitmuster bezüglich der verschiedenen Genotypen sehr homogen (repräsentative Metabolite sind in Abbildung 4-16 gezeigt) und auch die beiden Stresssets weisen eine gute Überschneidung auf. Beim Vergleich der UV- und AgNO₃-Behandlung zeigten die Säuren relativ zum Wildtyp in 96 % der Untersuchungen die gleiche Tendenz.

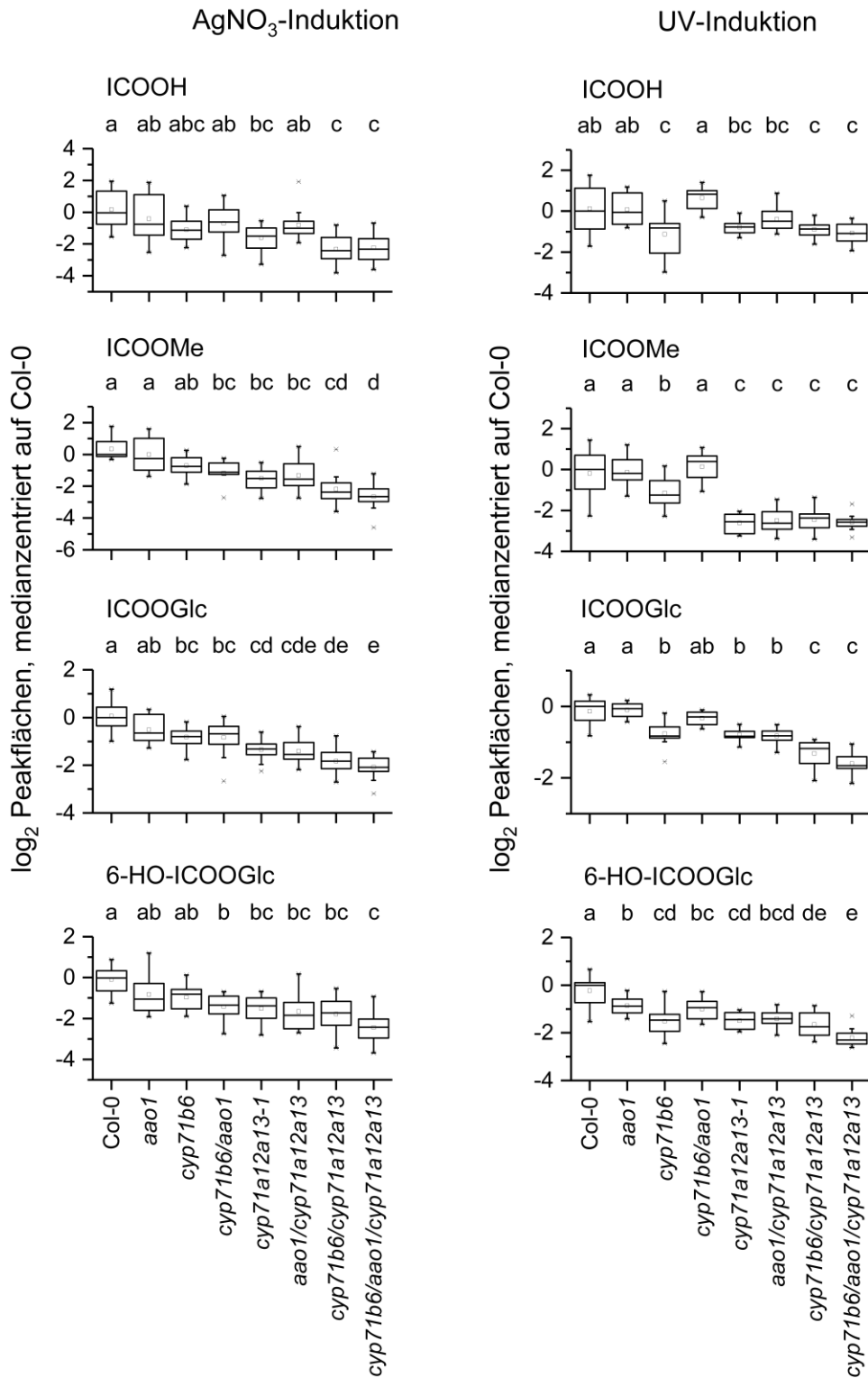


Abbildung 4-16 Relative Quantifizierung repräsentativer Indolcarbonsäuren (ICOOH, ICOOMe, ICOOGlc, 6-HO-ICOOGlc) in Rosettenblättern des Wildtyps Col-0 und Mutantenlinien nach AgNO₃- (links) und UV-Behandlung (rechts). Peakflächen wurden log₂-transformiert und Col-0-medianzentriert. Gleiche Buchstaben bedeuten keine signifikanten Unterschiede der Mittelwerte (Tukey HSD-Test, p ≤ 0,05, n=11-12).

CYP71B16 und AAO1 sind an der Biosynthese der ICHO- und ICOOH-Derivate beteiligt. CYP71B6 katalysiert die Umwandlung von IAN zu ICHO, das wiederum postulierte Substrat der AAO1 ist (Böttcher et al., 2014). Zur Biosynthese der Indolcarbonsäuren sind daher beide Enzyme nötig. Die Synthese dieser Verbindungen war dementsprechend in allen Mutanten und Mehrfachmutanten relativ zum Wildtyp mehr oder weniger stark reduziert, jedoch nicht vollständig blockiert. In den Doppelmутanten *cyp71a12a13* und *cyp71b6/aa01* waren je noch etwa die Hälfte der Säuren detektierbar (48 % und 53 %), in der Quadrupelmутante *cyp71b6/aa01/cyp71a12a13* waren es noch durchschnittlich 27 % (Prozentangaben jeweils Silberdatensatz). Die Synthese der Säuren aus IA0x kann also nicht ausschließlich von diesen vier Enzymen abhängig sein.

In der *cyp71a12a13*-Mutante war die Säurereduktion im Vergleich zum Wildtyp bei nahezu jedem Metaboliten signifikant und verstärkte sich bei zusätzlichem Ausfall des CYP71B6-Genproduktes (Abbildung 4-16). Der Einfluss von CYP71B6 und CYP71A12/A13 auf die ICOOH-Derivatsynthese scheint daher kumulativ zu sein. Dahingegen waren die Indolcarbonsäuren in der AAO1 Mutante, obwohl generell leicht reduziert, in den meisten Betrachtungen statistisch nicht vom Wildtyp unterscheidbar. Zudem konnte kein statistischer Unterschied im Säuregehalt relativ zum Wildtyp zwischen den Linien *cyp71b6/aa01* und *cyp71b6*, zwischen *aa01/cyp71a12a13* und *cyp71a12a13* oder zwischen *cyp71b6/aa01/cyp71a12a13* und *cyp71b6/cyp71a12a13* festgestellt werden (Tukey HSD-Test, $p \leq 0,05$). Die AAO1 hat somit nur schwachen oder keinen Einfluss auf die Synthese von ICOOH, deren Säureestern und den 6-Hydroxyderivaten.

Indolaldehyde

Die indolischen Aldehyde ICHO, 5-GlcO-ICHO, 4-GlcO-ICHO und 4-HO-ICHO wurden in allen drei Datensätzen als IAOx-abhängige Metabolite qualifiziert, wobei analog zu dem unter 4.2.3 beschriebenen Experiment auch in der *cyp79b2b3*-Mutante geringe Mengen an ICHO und 5-GlcO-ICHO (hier bis zu etwa 10 % bzw. 3 % des Wildtyplevels) detektiert werden konnten.

Im Gegensatz zu den Säuren konnte aus den Metabolitmustern der Aldehyde kein homogenes Muster für die Substanzklasse abgeleitet werden.

Beim Vergleich zwischen der UV- und AgNO₃-Behandlung zeigten die einzelnen Aldehyde relativ zum jeweiligen Wildtyplevel in 86 % der Untersuchungen die gleiche Tendenz. Der Einfluss der beiden Stressoren war damit für diese Metabolitgruppe weniger konsistent als für die Indolcarbonsäuren. Nach AgNO₃-Induktion unterschied sich der unmodifizierte Aldehyd ICHO in der *cyp71a12a13*-Mutante wie im vorherigen Experiment (Abschnitt 4.2.3) nicht statistisch signifikant vom Wildtyp. Auch in den anderen untersuchten Mutanten konnte kein solcher Unterschied gefunden werden (Abbildung 4-17). In den Mutantenkombinationen mit der eingekreuzten *aaol*-Linie konnte jedoch eine tendenzielle ICHO-Anreicherung festgestellt werden. Nach UV-Induktion war ICHO in allen Mutantenlinien im Vergleich zum Wildtyp akkumuliert. Das ICHO-Glykosid 5-GlcO-ICHO war in beiden Stressdatensätzen in allen *aaol*-Mutanten, also in *aaol*, *cyp71b6/aaol* und *cyp71b6/aaol/cyp71a12a13* relativ zum Wildtyp signifikant angereichert. In *cyp71b6*, *cyp71a12a13* und *cyp71b6/cyp71a12a13* war das Level an 5-GlcO-ICHO hingegen relativ zum Wildtyp reduziert, wobei dieser Effekt in Kombination mit der *aaol*-Linie stets überlagert wurde. Das Metabolitmuster des 4-O-Glykosids 4-GlcO-ICHO war hingegen tendenziell ähnlich zu den Indolcarbonsäuren. 4-GlcO-ICHO war in allen Mutanten reduziert, in *cyp71b6/cyp71a12a13* und *aaol/cyp71a12a13* war diese Reduktion nach UV-Induktion statistisch signifikant (Abbildung 4-17). Die unglykosilierte Form 4-HO-ICHO unterschied sich in den verschiedenen Mutanten kaum vom Wildtyp. Nur in *cyp71b6* (UV-Induktion) wurde eine signifikante Reduktion festgestellt (Tukey HSD-Test, $p \leq 0,05$; keine Abbildung).

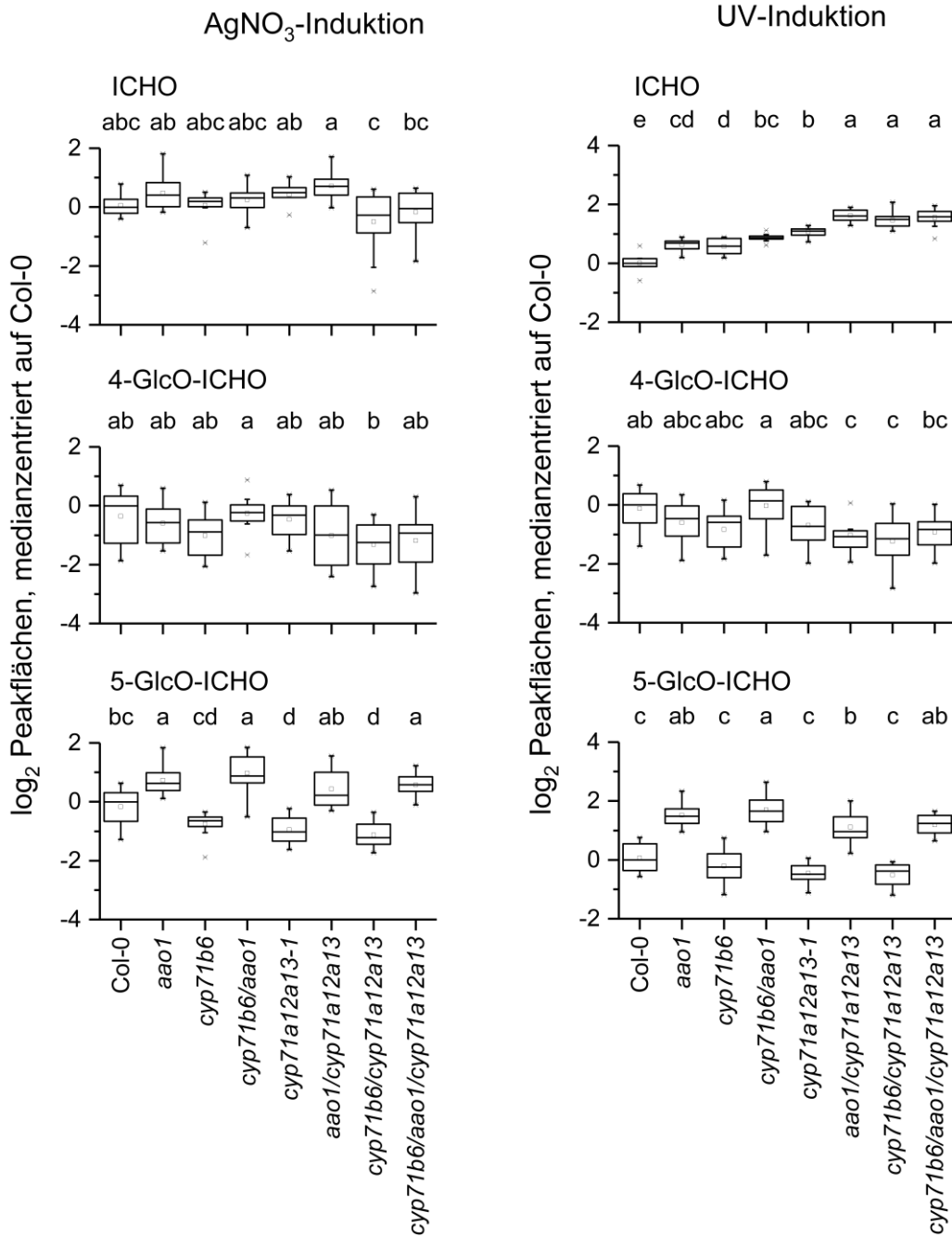


Abbildung 4-17 Relative Quantifizierung repräsentativer indolischer Aldehyde (ICHO, 5-GlcO-ICHO, 4-GlcO-ICHO) in Rosettenblättern des Wildtyps Col-0 und Mutantenlinien nach AgNO₃- (links) und UV-Behandlung (rechts). Peakflächen wurden log₂-transformiert und Col-0-medianzentriert. Gleiche Buchstaben bedeuten keine signifikanten Unterschiede der Mittelwerte (Tukey HSD-Test, $p \leq 0,05$, $n=11-12$)

Korrelationsstudien

Die positive Korrelation zweier Metabolite zeigt das gleichzeitige Auftreten zweier Metabolite, eine negative zeigt, dass die Synthese einer Verbindung mit der Abwesenheit einer anderen zusammenfällt. Von Metaboliten aus demselben Syntheseweg wird daher eine positive Korrelation erwartet, sind die Synthesewege völlig unabhängig voneinander oder schließen sich sogar aus, kann mit keiner oder einer negativen (Korrelationskoeffizient <0) gerechnet

werden. Einige der beschriebenen Metabolite wurden miteinander korreliert, um mögliche Zusammenhänge ihrer Biosynthesewege aufzuzeigen (Abbildung 4-18).

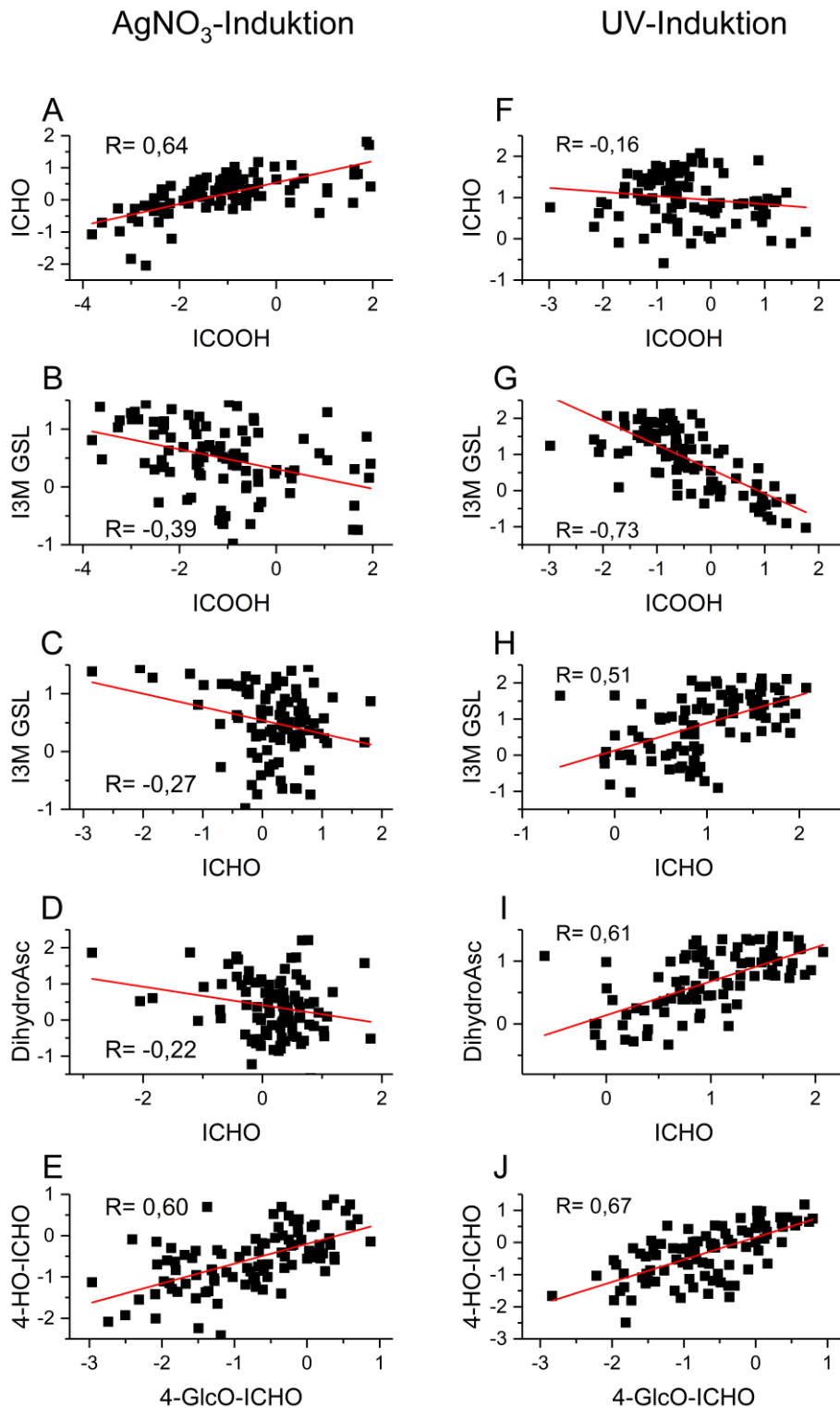


Abbildung 4-18 Korrelationen ausgewählter IAOx-abhängiger Metabolite nach AgNO₃- (A-E) und UV-Induktion (F-J). Daten wurden log₂-transformiert und auf Col-0 medianzentriert. ANOVA: Steigung für alle Diagramme (außer F) signifikant unterschiedlich von Null ($\alpha = 0,05$). R= Pearson's Korrelationskoeffizient.

Logisch zusammenhängende Metabolitpaare wie 4-HO-ICHO und 4-GlcO-ICHO, die sich nur durch Glykosylierung an der 4-Hydroxygruppe unterscheiden, waren erwartungsgemäß positiv korreliert (Abbildung 4-18 E; R= 0,60 und J; R= 0,67). Obwohl auch zwischen ICHO und ICOOH ebenfalls ein naheliegender chemischer Zusammenhang besteht, konnte dieser aus der Korrelation nicht konsistent bestätigt werden. Die Werte der Silberbehandlung zeigten diese zwar (Abbildung 4-18 A; R= 0,64), für die UV-Daten unterschied sich die Steigung der linearen Regression bei einem Korrelationskoeffizienten von -0,16 jedoch nicht signifikant von Null (ANOVA, $\alpha= 0,05$). Im UV-Datensatz korrelierte der Aldehyd ICHO positiv mit I3M GSL, im Silberdatensatz konnte erneut keine klare Korrelation zugewiesen werden (Abbildung 4-18 C, H). Die reduzierte Form des Ascorbigens, Dihydroascorbigen, wurde ebenfalls detektiert. Ascorbigen stammt wie Indol-3-Carbinol aus dem Myrosinaseprodukt von I3M, dem hoch reaktiven Indol-3-yl-Methylisothiocyanat, bzw. kann auch aus der (langsameren) Reaktion von Indol-3-Carbinol und Ascorbinsäure entstehen (Aleksandrova et al., 1992; Gmelin und Virtanen, 1961; Kiss und Neukom, 1966; Wagner und Rimbach, 2009). Nach UV-Induktion korrelierte Dihydroascorbigen deutlich mit ICHO (Abbildung 4-18 I). Unter Silberstress war dieser Zusammenhang nicht zu sehen, die lineare Regression zeigte hier eine schwach negative Steigung (Abbildung 4-18 D). Konsistent zwischen beiden Datensätzen war jedoch die negative Korrelation zwischen den Indolcarbonsäuren und den indolischen Glucosinolaten, repräsentiert durch ICOOH und I3M (Abbildung 4-18 B,G). Diese beiden Substanzgruppen schienen einander in ihrer Biosynthese gegenseitig auszuschließen, was metabolisch oder regulatorisch begründet sein könnte.

Zur weiteren Aufklärung metabolischer Zusammenhänge über die verschiedenen Mutanten hinweg wurde eine hierarchische Clusteranalyse mit beiden Stressdatensätzen durchgeführt. Aus Abbildung 4-19 A und B ist ersichtlich, dass sich die Genotypen aufgrund ihres Metabolitspektrums zunächst in *cyp71a12a13*-Mutanten und solche mit intakten *CYP71A12* und *CYP71A13* gliederten. Innerhalb der *cyp71a12a13*-Mehrfachmutanten gruppieren die *cyp71b6*-Mutanten getrennt von *cyp71a12a13* und *aaol/cyp71a12a13*. Auch im Cluster mit Col-0, *aaol*, *cyp71b6* und *cyp71b6/aaol* war Distanz von Col-0 zu *aaol* ist stets geringer als zu *cyp71b6/aaol*. *CYP71B6* hatte nach *CYP71A12/A13* also den stärksten Einfluss auf das Metabolitspektrum.

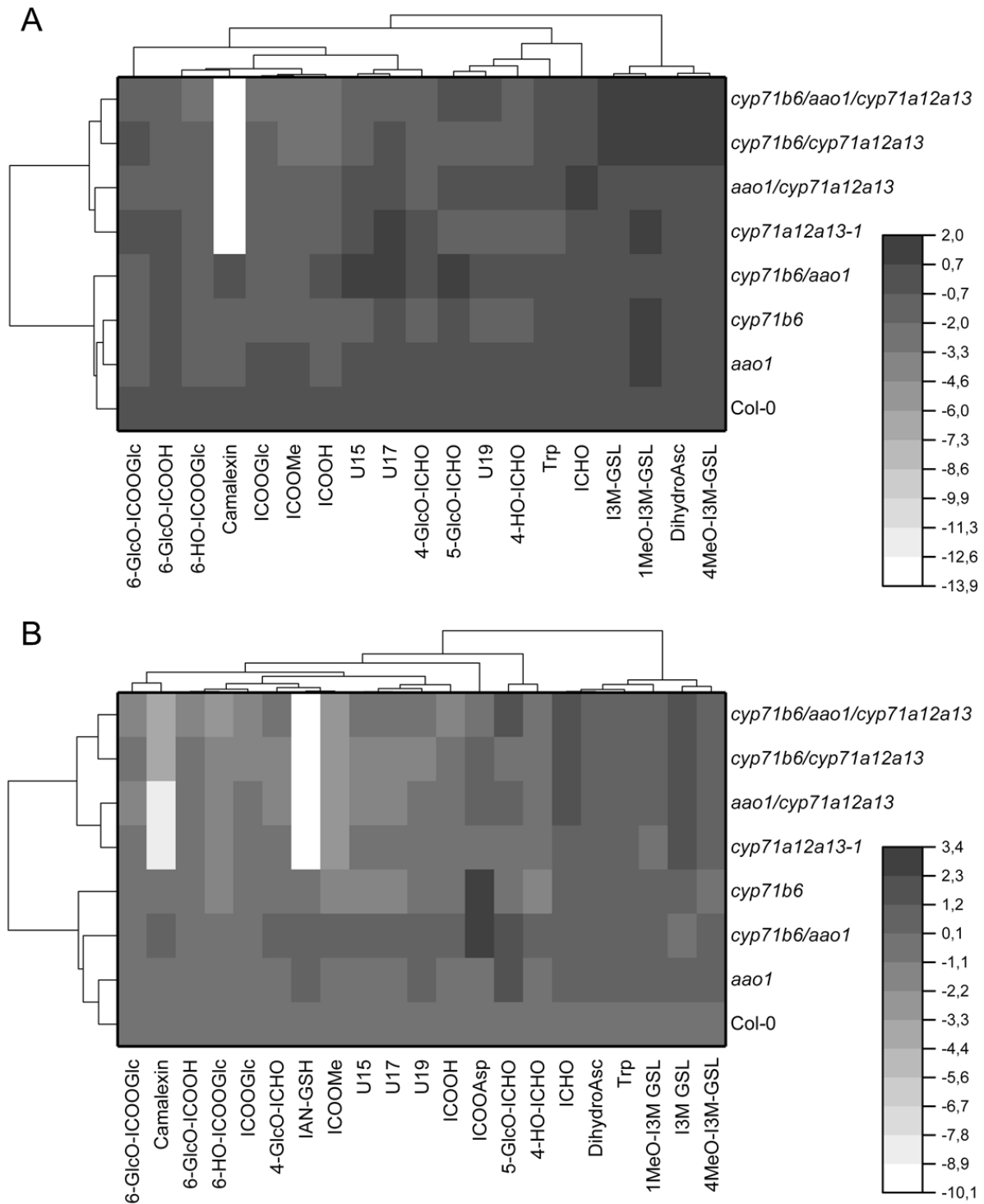


Abbildung 4-19 Hierarchische Clusteranalyse (Heatmap und Dendrogramm) der IAox-abhängigen Metabolite in Wildtyp und Mutantenlinien nach AgNO₃- (A) und UV-Behandlung (B). Daten wurden log₂-transformiert und auf den jeweiligen Wildtyp medianzentriert. Die Distanzmatrix für die Metabolite (Spalten) basiert auf ihrer Pearson-Korrelation; für die Genotypen (Reihen) wurden die euklidischen Distanzen kalkuliert. *Clustering*-Methode: *complete linkage*-Verfahren (entferntester Nachbar; dieser Algorithmus fordert für die Clusterbildung eine hohe Homogenität). Skalen: Distanzwerte.

Innerhalb der Metabolite bildeten die GSL die am besten von den anderen Metaboliten trennbare Gruppe. Auch die Indolcarbonsäuren clusterten untereinander und waren eng mit Camalexin und/oder GS-IAN assoziiert. Auch die unbekannt Metabolite U15 und U17,

beides nach ihrer Masse Hexoside von $C_9H_7NO_3$, clusterten mit den Säuren und Säureglykosiden. Der Aldehyd 4-GlcO-ICHO zeigte stets größerer Nähe zu den Indolcarbonsäuren als zu anderen Aldehyden. Der unmodifizierte Aldehyd ICHO hingegen clusterte unter beiden Stressbedingungen mit dem Vorläufermolekül Trp. In keinem Fall clusterte ICHO mit den Indolcarbonsäuren, nach UV-Bestrahlung konnte hingegen eine Assoziation mit den indolischen GSL festgestellt werden. Die Aldehyde nehmen im Netzwerk aus Camalexin, GSL und Säurederivaten somit eine Sonderrolle ein, die größtenteils unabhängig von den untersuchten Genen *CYP71A12*, *CYP71A13*, *CYP71B6* und *AAO1* zu sein scheint.

4.5.2. Nicht-zielgerichtete Analyse der *AAO1*-Mutanten

Die zielgerichtete (engl. *targeted*) Analyse mit dem Fokus auf die IAOx-abhängigen Metabolite ergab für die indolischen Säuren, dass deren Synthese nicht in Abhängigkeit von der *AAO1* stand. Als einziger klar *AAO1*-abhängiger Metabolit wurde das Glykosid des 5-OH-ICHO gefunden, das in Abwesenheit von *AAO1* akkumulierte. *AAO1* ist nach Pathogeninfektion eng mit den Camalexinbiosynthesegenen koreguliert, zusätzlich aber auch konstitutiv schwach in verschiedenen Pflanzengewebe exprimiert (siehe 4.1). Um weitere mögliche Substrate der *AAO1* zu identifizieren, wurde mit den Gesamtdatensätzen der beiden Genotypen-Paare Col-0 und *aaO1* sowie *cyp71b6* und *cyp71b6/aaO1* eine Vergleichsanalyse durchgeführt. Die Mediane der \log_2 -transformierten Intensitätswerte aller charakterisierter Metabolite und unbekannter Signale (*Features*) aus Kontrolle, $AgNO_3$ - und UV-Behandlung wurden paarweise zwischen den Genotypen verglichen. Die Differenz zweier Mediane repräsentierte den \log_2 -*fold-change*, zur Überprüfung der Signifikanz wurde der t-Test verwendet. Als Signifikanzkriterien für differentielle Metabolite wurden ein \log_2 -*fold-change* $\geq 1,0$ und P (t-Test) $\leq 0,05$ festgesetzt.

Entsprechend dieser Kriterien waren im Kontrolldatensatz im Vergleich von Col-0 mit *aaO1* 225 Signale im Wildtypen angereichert, 79 reduziert (Abbildung 4-20). Diese Signale wurden mit den jeweils in *cyp71b6* von *cyp71b6/aaO1* unterschiedlichen Signalen verglichen. Die Schnittmenge dieser Signale repräsentierte die *aaO1*-abhängig reduzierten (59 Signale) oder akkumulierten Metabolite (8 Signale). Nach Silberinduktion waren jeweils 15 Metabolitsignale *aaO1*-abhängig an- oder abgereichert, nach UV-Bestrahlung waren 42 Signale akkumuliert und 28 Signale *aaO1*-abhängig reduziert (nicht dargestellt).

Col-0 > *aao1* *cyp71b6* > *cyp71b6/aao1* Col-0 < *aao1* *cyp71b6* < *cyp71b6/aao1*

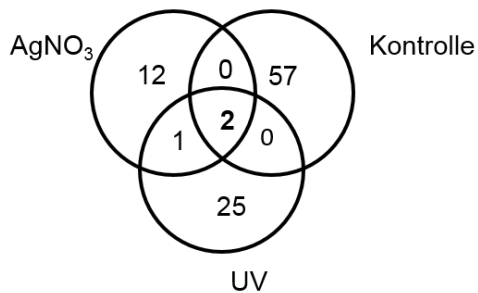


Abbildung 4-20 Schnittmenge der in unbehandelten Blättern in zwei *aao1*-Mutantenlinien reduzierter- (links) beziehungsweise akkumulierter Signale (rechts). Die Mediane der \log_2 -transformierten Peakintensitäten wurden paarweise zwischen den Genotypen *aao1* und Col-0 sowie *cyp71b6* und *cyp71b6/aao1* verglichen (\log_2 -fold-change ≥ 1.0 , P (t-Test) ≤ 0.05).

Bei Betrachtung der Schnittmenge der in *aao1*-Linien angereicherten Signale aus den drei Datensätzen Kontrolle, UV und Silber überlappten drei Signale, die sich alle der bereits charakterisierten Substanz 5-GlcO-ICHO zuordnen ließen (Abbildung 4-21 B). Zwei unbekannte Signale waren behandlungsübergreifend den *aao1*-Linien signifikant reduziert (Abbildung 4-21 A).

A

Col-0 > *aao1* und *cyp71b6* > *cyp71b6/aao1*



B

Col-0 < *aao1* und *cyp71b6* < *cyp71b6/aao1*

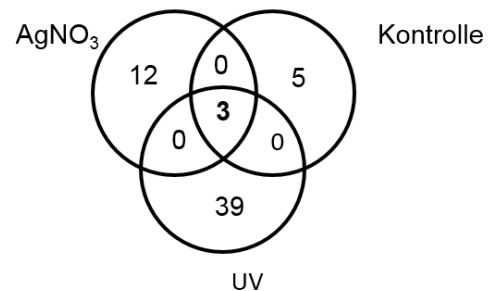


Abbildung 4-21 Schnittmenge der in allen drei Datensätzen AgNO₃, Kontrolle und UV in zwei *aao1*-Mutantenlinien relativ zur Vergleichslinie reduzierter- (A) beziehungsweise akkumulierter Signale (B). Die Mediane der \log_2 -transformierten Peakintensitäten wurden paarweise zwischen den Genotypen *aao1* und Col-0 sowie *cyp71b6* und *cyp71b6/aao1* verglichen (\log_2 -fold-change ≥ 1.0 , P (t-Test) ≤ 0.05).

Diese zwei Signale der Summenformel C₈H₉NO₄ (Molekülpeak C₈H₈NO₄⁻ $m/z= 182,04$, neg. Modus, RT 1,08 min) entsprachen der 4-Pyridoxinsäure. Die Identifizierung gelang durch den Vergleich des CID (*collision-induced dissociation*)-Massenspektrums und der Retentionszeit der mit dem authentischen, kommerziell erhältlichen Standard (Sigma-Aldrich) und durch Dotierung der Probenlösung mit diesem Standard (Anhang, Abbildung 6-3 und Abbildung 6-4).

Die gezielte Betrachtung der 4-Pyridoxinsäure in allen untersuchten Genotypen bestätigte das Ergebnis der *untargeted* Analyse. In allen drei Datensätzen ist der Metabolit des Vitamin B₆-Stoffwechsels signifikant *aao1*-abhängig reduziert (Abbildung 4-22 A und Anhang, Abbildung 6-5). Eine absolute Quantifizierung in unbehandelten Rosettenblättern mit Hilfe

einer externen Kalibrierung mit einem authentischen Standard bestätigte die hochsignifikante Reduktion (zweiseitiger t-Test, $p = 9,2E-15$) der Pyridoxinsäure um etwa 2/3 im Vergleich zum Wildtyp auf nunmehr etwa 400 pmol/g Trockengewicht (Abbildung 4-22 B).

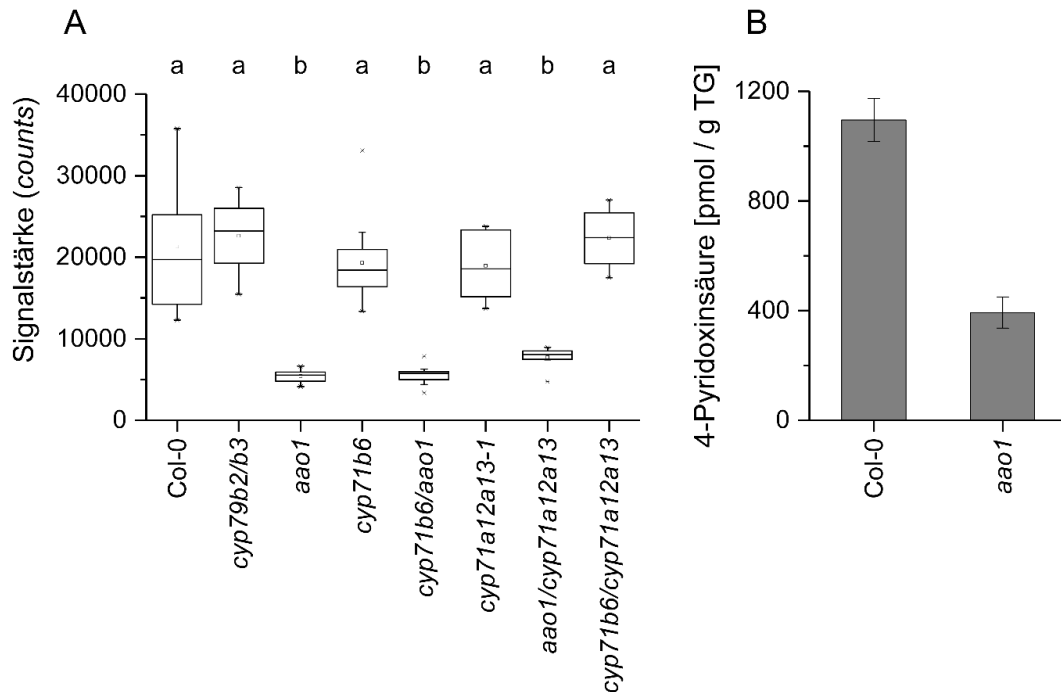


Abbildung 4-22 Quantifizierung von 4-Pyridoxinsäure in Wildtyp und Mutantenlinien A: Signalstärke der 4-Pyridoxinsäure in Wildtyp und Mutantenlinien in unbehandelten Rosettenblättern. Gleiche Buchstaben bedeuten keine Unterschiede beim Vergleich der Mittelwerte (Tukey HSD-Test, $p \leq 0,05$, $n=11-12$). Stressorbehandelte (UV und Silbernitrat) Pflanzen zeigen dieselben Tendenzen (Anhang, Abbildung 6-5). B: Absolute Quantifizierung von 4-Pyridoxinsäure in unbehandelten Blättern der Linien Col-0 und *aao1*. Bestimmung der Konzentrationen über eine externe Kalibrierung (nicht gezeigt, $R^2 > 0,99$) mit authentischem Standard, *Quantifier*-Ion $m/z = 138,06$ (neg. Modus). Die beiden Mittelwerte unterscheiden sich hochsignifikant (zweiseitiger *t*-Test, $p = 9,2E-15$, $n=10$). Fehlerbalken: Standardabweichung.

4-Pyridoxinsäure ist die oxidierte Form von 4-Pyridoxal (PAL). Dieser Aldehyd könnte enzymatisch durch AAO1 zur Carbonsäure oxidiert werden. In den *aao1*-Mutantenlinien käme es so zur Abreicherung der Säure. PAL und 4-Pyridoxinsäure sind Vertreter der Vitamin B₆-Molekülfamilie, das an Position fünf phosphorierte PAL, Pyridoxal-5-phosphat (PLP), ist die aktive Form des Kofaktors. Die nicht-zielgerichtete Analyse der Mehrfachmutantenlinien präsentiert PAL als neues potentiell *in-vivo*-Substrat der pflanzlichen AAO1. Zuvor waren indolische Aldehyde die einzigen *in vivo* beschriebenen AAO1-abhängigen Metabolite in *Arabidopsis thaliana* (Böttcher et al., 2014).

4.6. Das *CYP71B*-Cluster auf Chromosom 3 von *Arabidopsis thaliana*

4.6.1. Expression des *CYP71B*-Clusters

Auf Chromosom 3 des *Arabidopsis thaliana*-Genoms befindet sich ein 83 kb großes Gencluster (Chr3: 9.565.627 – 9.648.658), das 25 Gene enthält, die unter Tabelle 4-3 gelistet sind und deren Funktion noch nicht bekannt ist. 20 der Genabschnitte sind codierend, vier gelten als Pseudogene und bei *AT3G05005* handelt sich um eine lncRNA (*long non-coding RNA*). Darunter sind 18 CYPs der *CYP71B*-Familie. Außer den CYPs sind bisher nur zwei Proteine, *AT3G26240* und *AT3G26250*, als *Cys/His-rich C1 domain family*-Proteine konnotiert. Das Cluster enthält *CYP71B23*, das schwach mit den Genen der Camalexinbiosynthese koreguliert ist und *in vitro* IAN NADPH-abhängig zum ICHO oxidieren kann (Fellermeier, 2011). In Spuren entsteht außerdem unter Anwesenheit von GSH zusätzlich GS-IAN. Auch *CYP71B20* kann IAN umsetzen, zu etwa gleichen Teilen zu ICHO und GS-IAN. Die beiden Enzyme ähneln also in ihrem *in-vitro*-Substrat- und -Produktspektrum *CYP71A12*, *CYP71A13* und *CYP71B6*. *CYP71B20* und *CYP71B19* sind zu 95 % identisch (Proteinebene) und zeigen ein identisches Expressionsmuster, sowohl bezüglich ihrer konstitutiven Expression wie auch ihrer Induzierbarkeit. Insgesamt besteht jedoch große Variabilität in der Expressionsstruktur der Clustergene (Tabelle 4-3). *CYP71B16*, *CYP71B17*, *CYP71B21*, *CYP71B22*, *CYP71B24*, *CYP71B25*, *CYP71B34*, *CYP71B35* und *CYP71B36* sind nicht oder nur schwach konstitutiv exprimiert. Zudem werden sie nicht oder kaum durch abiotische Stressoren wie Kälte, Trockenheit, UV-Strahlung, Salz- oder osmotischer Stress oder biotische Stressoren wie das Bakterium *Pseudomonas syringae*, B.c., die grüne Pfirsichblattlaus (*Myzus persicae*) oder verschiedene Pathogenelicatoren wie flg22 induziert. Sechs CYPs, *CYP71B19*, *CYP71B20*, *CYP71B23*, *CYP71B3*, *CYP71B4* und *CYP71B26*, werden hingegen konstitutiv in Blättern transkribiert. *CYP71B19*, *CYP71B20*, *CYP71B23*, *CYP71B4* und *CYP71B26* sind im Zuge einer Antwort auf verschiedene der genannten Stressoren induzierbar. *CYP71B19*, *CYP71B20*, *CYP71B23*, *CYP71B26* werden zudem in Blüten exprimiert. Auch sind einige Transkripte des Clusters Schoten- bzw. Samen-spezifisch. *CYP71B19*, *CYP71B20*, *CYP71B26* werden in Schoten und jungen Samenstadien exprimiert, *CYP71B37* im reiferen und trockenen Samen und *AT3G26240*, *AT3G26250* und *CYP71B3* im trockenen Samen. Auch in der Wurzel überlappen einige Expressionsorte, *CYP71B34* und *CYP71B26* sind im Cortex exprimiert, *CYP71B23* und *CYP71B3* in der Wurzelspitze. Die Transkription von *AT3G26240* und *AT3G26250* ist in der Wurzel lokal auf die Columella beschränkt und *CYP71B37* wird spezifisch im Wurzelphloem exprimiert (ePlant).

Ergebnisse

Tabelle 4-3 Übersicht über die 25 Gene des *CYP71B*-Genclusters und deren Expressionsmuster in *Arabidopsis thaliana*. Leserichtung des ORF →: Vorwärtsstrang (*forward strand*), ←: reverser Strang (*reverse strand*), * zwei mögliche Transkripte, ** Transkripte von *AT3G26237* und *AT3G26240* überlappen. Abiotische Stressoren: Os Osmotischer Stress, UV UV-Strahlung, Tkn Trockenstress, Sz Salzstress. Biotische Stressoren: *B.c. Botrytis cinerea*, *P.s. Pseudomonas syringae*, *P.i. Phytophthora infestans*, *M.p. Myzus persicae*, Ei pathogene Elicitoren. Quelle: ePlant-Plattform (<https://bar.utoronto.ca/eplant/>, zuletzt aufgerufen am 01.06.2018). Stufen der Samenreife nach Bowman (1994).

Gen	Gentyp	Protein	Konstitutive Expression	Induzierbarkeit
AT3G26150 ←	Protein codierend	CYP71B16	Spross kaum, Wurzel schwach.	Nicht induzierbar
AT3G26160 ←	Protein codierend	CYP71B17	Wie CYP71B16	Nicht induzierbar
AT3G26165 ←	Pseudogen	CYP71B18	Keine Daten	Keine Daten
AT3G26170 ←	Protein codierend	CYP71B19	Keimling, Rosettenblätter, Sproßblätter, gesamte Blüte, insb. Kelchblätter und Kronblätter, Schoten, Samen Stufe 3,4	abiotisch (insb. Os, UV, Tkn) biotisch (<i>M.p.</i> , <i>B.c.</i> , <i>P.s.</i> , <i>P.i.</i> , Ei)
AT3G26180 ← *	Protein codierend	CYP71B20	Wie CYP71B19	Wie CYP71B19
AT3G05005 →	ncRNA		Keine Daten	Keine Daten
AT3G26190 ←	Protein codierend	CYP71B21	Spross kaum, Wurzel schwach.	Nicht induzierbar
AT3G26200 →	Protein codierend	CYP71B22	Spross schwach, Wurzel schwach	schwach biotisch (<i>B.c.</i> , <i>P.i.</i>)
AT3G26210 ←	Protein codierend	Cyp71B23	Keimling, Sprossblätter, seneszenzente Blätter, Kelchblätter, Wurzelspitze	abiotisch (insb. Os, UV) schwach biotisch (<i>P.s.</i> , <i>B.c.</i> , Ei)
AT3G26220 ←	Protein codierend	CYP71B3	Samen (trocken), Sprossblätter, seneszenzente Blätter, Wurzelspitze	Nicht induzierbar
AT3G26230 ←	Protein codierend	CYP71B24	Spross schwach, Wurzel kaum	schwach abiotisch
AT3G26235 →	Protein codierend	Hypothet. Protein	Keine Daten	Keine Daten
AT3G26237 → **	Protein codierend	Hypothet. Protein	Keine Daten	Keine Daten
AT3G26240 ← **	Protein codierend	<i>Cys/His-rich C1 domain family protein</i>	Samen (trocken), Wurzel: Columella,	nicht induzierbar
AT3G26250 ←	Protein codierend	<i>Cys/His-rich C1 domain family protein</i>	Wie AT3G26240	nicht induzierbar
AT3G26260 →	Pseudogen	Hypothet. Protein	Transkript kaum vorhanden	nicht induzierbar
AT3G26265 ←	Pseudogen	Hypothet. Protein	Keine Daten	Keine Daten
AT3G26270 ←	Protein codierend	CYP71B25	Kaum in Wurzel und Spross,	nicht induzierbar,
AT3G26280 ← *	Protein codierend	CYP71B4	Keimling, Rosettenblätter, seneszenzente Blätter,	abiotisch (insb Os) schwach biotisch (<i>P.s.</i>)
AT3G26290 ←	Protein	CYP71B26	Keimling, Blätter, Blüten,	abiotisch (insb Os)

Ergebnisse

*	codierend		Schoten, Samen Stufe 4-7, Wurzel: Cortex	Sz, Tkn) biotisch (P.s., EI)
AT3G26295 ←	Pseudo- gen	CYP71B33	Keine Daten	Keine Daten
AT3G26300 ←	Protein codierend	CYP71B34	Schwach in oberirdischen Gewebe, Wurzel: Cortex	schwach abiotisch
AT3G26310 ←	Protein codierend	CYP71B35	Spross kaum, Wurzel schwach.	Nicht induzierbar
AT3G26320 ←	Protein coding	CYP71B36	Spross kaum, Wurzel schwach	Nicht induzierbar
AT3G26330 ←	Protein coding	CYP71B37	Samen (trocken), Samen Stufe 8-10, Wurzelphloem	Nicht induzierbar

4.6.2. Zielgerichtete Deletion des *CYP71B*-Clusters mittels Werkzeugen des *Genome Editings*

Das Gencluster enthält mehrere CYPs, die, wie für Gene der Pathogenabwehr häufig, durch eine Vielzahl an Stressoren induzierbar sind. Zudem sind einige *CYP71Bs* funktionell mit indolischen Sekundärmetaboliten assoziiert. Um die *in-vivo*-Funktion des Genclusters zu beleuchten, sollte eine *Knock-out*-Mutante für das gesamte Gencluster erzeugt werden. Hierzu wurde der 83 kb große Bereich mittels gezieltem *Genome Editing* herausgeschnitten. Es wurde die TALEN und die CRISPR/Cas9 Technologie angewandt.

Zur Exzision des Genclusters wurden zunächst mehrere TALEN-Paare für beide Seiten des Clusters konstruiert (in *CYP71B16*, Konstrukt TALEN 1,2,3 und in *CYP71B37*, Konstrukt TALEN 10, siehe Liste verwendeter Plasmide, Tabelle 3-8), die miteinander kombiniert wurden. Die Festlegung der Zielsequenzen und die Klonierung der Vektoren erfolgten durch Dr. Robert Morbitzer. Als Promotor für die TALENs enthielten alle Vektoren den verkürzten 35S-Promotor. Die Pflanzentransformationsvektoren für *CYP71B16* trugen zudem das Resistenzgen *nptII* (Kanamycinresistenz), das für *CYP71B37* trug das *bar*-Gen (PPT-Resistenz). Die beiden Pflanzenvektoren wurden simultan durch *floral dip* in Col-0 Wildtypen eingebracht und gegen beide Resistenzen selektiert, so dass nur Primärtransformanten, die beide Konstrukte trugen, überlebten. Für die Kombination TALEN 2/10 konnte in den Primärtransformanten #38 und #39 eine Deletion des Clusters durch mehrere clusterübergreifende PCRs bestätigt werden (Anhang, Abbildung 6-8). Die Sequenzierung der Fragmente nach Klonierung in den Vektor pGEM™ T- Easy bestätigte die Exzision von 80,2 kb an der erwarteten Stelle (Abbildung 4-23). Bei Vergleich mit dem *Arabidopsis thaliana*-Genom mit der BLASTn Online-Software (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch) wurde der Anfang der Sequenz *CYP71B16* zugeordnet, das Ende der Sequenz deckte sich mit *CYP71B37* als jeweils besten Treffer mit der höchsten Übereinstimmung. Für # 39 wurden mehrere verschiedene Reperaturvarianten gefunden (39-1, 39-2, 39-3, Abbildung 4-23).

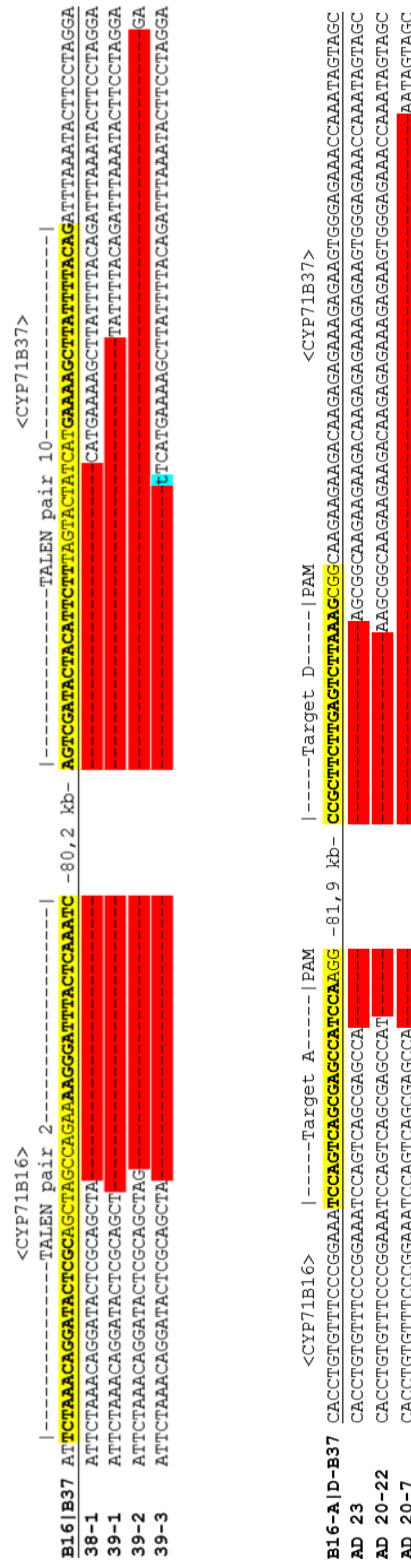


Abbildung 4-23 Mutationen im *CYP71B*-Cluster. Sequenzierungsergebnisse clusterüberspannender PCR-Fragmente im Vergleich mit der Wildtypsequenz. Rechts: TALEN-generierte Mutationen, Linien #38 und #39, T1-Generation. Links: CRISPR/Cas9 generierte Mutationen, T1 (Linie AD 23) bzw. T2-Generation (Linie AD 20). Rot: Deletion, türkise: Insertion. Referenzsequenzen von *CYP71B16* und *CYP71B37*: TAIR 10 (<https://www.arabidopsis.org/>). Fett: TALEN-bindende bzw. sgRNA-bindende Sequenzabschnitte.

In der T2-Generation konnte die Mutation nur noch in der Linie #39 nachgewiesen werden. Die somatische Mutationsfrequenz (Deletionsrate; berechnet als Quotient aus der Menge des clusterüberspannenden Amplifikats und der Menge eines PCR Amplifikats außerhalb der Clustersequenz) in diesen Pflanzen betrug etwa 1 % (Tabelle 4-4). Weitere Generationen wurden untersucht, jedoch konnte stets nur ein schwaches somatisches Mutationsevent nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Das gewünschte Deletionsevent trat zwar auf, jedoch in zu geringer Häufigkeit, um stabil vererbt zu werden.

Mit Fortschreiten der CRISPR/Cas9-Technologie erfolgte der Umstieg auf dieses System. Die Zielsequenzen, zwei in *CYP71B16* (Target A, Target B) und zwei in *CYP71B37* (Target C und Target D), werden mit Hilfe des Online Programms CRISPR-PLANT (<https://www.genome.arizona.edu/crispr/>) festgelegt und in das Vektorsystem nach Wang et al. (2015) und Xing et al. (2014) kloniert (siehe 3.3.1, CRISPR/Cas9 Kloniersystem). Die Expression der Cas9-Nuklease unterlag dem *Egg cell specific promoter* EC1.2p, dessen Verwendung homozygote Mutationen in der T1 Generation ermöglichen sollte. Die sgRNAs für beide Targets waren auf einem Transformationsvektor kodiert, wobei folgende Targetkombinationen erfolgreich kloniert und in den Wildtyp Col-0 transformiert werden konnten: AC, AD, und BD. Es konnten 117 Primärtransformanten gegen das Antibiotikum Hygromycin selektiert und mittels PCR auf die Anwesenheit der transformierten Konstrukts bestätigt werden. Die clusterübergreifende PCR ergab für vier dieser Pflanzen, AD 11, AD 20, AD 23 und AD 52, reproduzierbar eine schwache Bande der berechneten Größe (nicht gezeigt). Für die Linie AD 23 konnte das Deletionsevent bereits in der T1 durch Sequenzierung des Amplifikats bestätigt werden (Abbildung 4-23). In der 2. Generation konnte dieses Event nur noch in einzelnen Nachkommen der Linien AD 20 (drei positive PCR-Ergebnisse für das Deletionsevent bei 24 untersuchten T2 Pflanzen) und AD 23 (ebenfalls 3/24) detektiert werden. In den Linien AD 11 (0/24) und AD 52 (0/24) schien die Mutation verloren gegangen zu sein. Die Sequenzierung der clusterumspannenden Amplifikate von AD 20-7 und AD 20-3 bestätigte auch für die Linie AD 20 die Echtheit der Clusterdeletion (Abbildung 4-23). Bis wenige Basen vor der PAM Sequenz des Targets A deckt sich die erhaltene Sequenz fehlerfrei mit der Referenzsequenz von *CYP71B16*, fortan stimmt die Sequenz mit der im Wildtyp fast 82 kb entfernten Sequenz des *CYP71B37*-Gens überein.

Für die Genome der Linien AD 20-3, AD 20-7, AD 20-22, AD 23-2, AD 23-10 und AD 23-24 wurde die Deletionsrate sowie der Anteil der im Genom verbliebenen Clustergene (Quotient Cluster/Gesamt, Tabelle 4-4) bestimmt. AD 20-3, AD 20-7, AD 20-22, AD 23-2 und AD 23-10 zeigten ein anteiliges Auftreten des Deletionsevents in über 50 % der genomischen DNA. Gleichzeitig war der Anteil der Gene innerhalb des Clusters (Cluster/Gesamt) in AD 20-7, AD 20-22, AD 23-2 und AD 23-10 auf ≤ 50 % reduziert. Eine solche Kombination von 50 %

Deletionsevent zu 50 % noch vorhandene Cluster-Gene wäre bei einer heterozygoten Clusterdeletion zu erwarten. In AD 20-3 betrug die Deletionsrate fast 80 %, gleichzeitig war der Anteil der DNA innerhalb des Clusters nur um etwa 20 % reduziert. Die Anwesenheit der Cluster-Gene bei gleichzeitiger hoher Deletionsrate könnte durch einen teilweisen Wiedereinbau des 83 kb großen DNA-Stücks an anderer Stelle des Genoms zu erklären sein. Es ist bekannt, dass DNA-Doppelstrangbrüche, wie sie gezielt durch CRISPR/Cas9 erwirkt werden, im Zuge des Reparaturvorgangs in der Zelle zu chromosomalen Translokationen führen können (Pacher et al., 2007; Torres et al., 2014).

AD 23-24 zeigte mit etwa 25 % die geringste Deletionsrate und zudem einen wildtypisch hohen Anteil der Cluster-Gene. Diese Linie wurde nicht weiter vermehrt. Allgemein sind die durch das pU6-29::CRISPR/pEC1.2::Cas9-System induzierte Mutationsraten deutlich höher als in den mit dem p35S::TALEN-System transformierten Pflanzen der gleichen Generation.

Tabelle 4-4 Mutationsraten der mit CRISPR/Cas9 und TALEN generierten *CYP71B*-Cluster-Exzisionsmutanten in der T2- und T3-Generation, Auswahl. Quotienten basieren auf der absoluten Quantifikation von DNA-Abschnitten außerhalb und innerhalb des *CYP71B*-Clusters mittels qPCR. Deletion/Gesamt = Deletionsrate, berechnet als Quotient aus der Menge des clusterüberspannenden Amplifikats und der Menge eines PCR-Amplifikats außerhalb der Clustersequenz. Cluster/Gesamt: Quotient aus der Menge des clusterinternen Amplifikats und der Menge eines PCR-Amplifikats außerhalb der Clustersequenz. Wildtyp: arithmetisches Mittel aus 3 biologischen Replikaten, Mutanten: je ein biologisches Replikat.

	Konstrukt- typ	Genotyp	Quotient DNA Mengen		Mutationstyp	
			Cluster/Gesamt	Deletion/Gesamt		
2. Generation	p35S:: TALEN	TALEN 2/10 39-24	0.87	0.01	nicht- homozygote Deletion	
		TALEN 2/10 39-30	1.03	0.01		
		TALEN 2/10 39-44	0.64	4.E-03		
		TALEN 2/10 39-47	0.81	0.01		
		Col-0	0.81	1.E-06		Wildtyp
	pU6-29::CRISPR/ pEC1.2::Cas9	AD 20-3	0.78	0.79	nicht- homozygote Deletion	
		AD 20-7	0.37	0.53		
		AD 20-22	0.44	0.53		
		AD 23-2	0.40	0.68		
		AD 23-10	0.50	0.85		
		AD 23-24	1.09	0.25		
		Col-0	1.01	0.02		Wildtyp
	3. Generation	pU6-29::CRISPR/pEC1.2::Cas9	AD 20-3-5	2E-03	0.79	homozygote Deletion
			AD 20-7-3	3E-03	0.97	
AD 20-7-10			4E-03	0.99		
AD 23-10-2			3E-03	1.06		
AD 23-10-5			3E-03	1.51		
AD 23-2-2			2E-03	1.14		
AD 20-7-2			0.50	0.63	nicht- homozygote Deletion	
AD 20-22-1			0.47	0.55		
AD 23-10-4			0.45	0.50		
AD 23-2-1			0.42	0.46		
AD 20-7-5			0.92	0.06	wildtypisch	
AD 20-3-11			1.67	0.05		
AD 23-10-3			1.37	0.03		
Col-0			0.97	0.06		Wildtyp

Die Einzelpflanzen AD 20-3, AD 20-7, AD 20-22, AD 23-2 und AD 23-10 wurden geselbstet. In der dritten Generation trugen alle Nachkommen der beiden Linien AD 20 (34/34 Pflanzen) und AD 23 (23/23 Pflanzen) das CRISPR/Cas9 Konstrukt stabil im Genom integriert. Gemäß der Mendelschen Vererbungslehre muss so von einer auf die Fremd-DNA homozygote Vorgeneration T2 ausgegangen werden. Bei 70 % der Pflanzen der T3-Generation war die clusterüberspannende PCR positiv. 24 dieser 40 Pflanzen enthielten zusätzlich die Gene des Clusters, es muss also von einer partiellen, nicht homozygoten Deletion des Clusters (heterozygot oder in Form eines genomischen Mosaiks) ausgegangen werden. Im Gegensatz dazu konnten im Genom der verbleibenden 16 Pflanzen die Clusterinterne Gene durch PCR nicht mehr nachgewiesen werden. Zwei bis drei unabhängige PCR-Reaktionen mit Primerkombinationen an den inneren Rändern (in *CYP71B16* und *CYP71B36*) sowie in der Mitte des Clusters (*CYP71B25*) zeigten jeweils kein Amplifikat (nicht gezeigt). In der qPCR Analyse betrug die Cluster/Gesamt-Ratio dieser Pflanzen $\ll 0,01$ (Tabelle 4-4). Bei diesen Pflanzen handelt es sich also im Rahmen der angewandten Nachweiskraft um homozygot clusterdeletierte Pflanzen.

4.6.3. Metabolische Untersuchung der Clusterdeletionsmutanten

Die homozygoten *CYP71B*-Cluster-Mutanten der T3-Generation wurden auf ihren metabolischen Phänotyp hin analysiert. Als Vergleichsgruppe diente der Wildtyp Col-0. Als zusätzliche Kontrolle wurden zudem eine analoge Anzahl wildtypähnlicher Geschwisterpflanzen wie zB. AD 20-7-5 (Tabelle 4-4), die kein Deletionsevent zeigten, aber wie die anderen T3-Pflanzen das CRISPR/Cas9-Konstrukt im Genom trugen, in das Experiment integriert. Durch den Vergleich mit dieser Kontrollgruppe konnten Effekte, die auf den Verlust des Genclusters beruhen von solchen, die durch den Insertionsort der Fremd-DNA bedingt waren, unterschieden werden. Die Analyse der ungestressten (keine Induktion), adulten Rosettenblätter zeigte jedoch keine durch die Anwesenheit des Clusters betroffenen Metabolite. Bei einer statistischen Grenze von 0,05 war kein *Feature* (unterscheidbares Signal) der Clustermutanten entsprechend unterschiedlich zu Col-0 oder der Kontrollgruppe ohne Clustermutation. Die hierarchische Clusteranalyse der sowohl im negativen (325 *Features*) als auch des im positiven Modus (62 *Features*) aufgenommenen Datensätze zeigte hingegen makroskopische metabolische Unterschiede zwischen Col-0 und den beiden transgenen Gruppen (Abbildung 4-24). Eine Hauptkomponentenanalyse wies selbigen Überlapp der beiden transgenen Probenotypen im Unterschied zu Col-0 auf (Abbildung 4-25). Der Einfluss auf das Metabolitspektrum durch das CRISPR/Cas9-Konstrukt im Genom, sei es hervorgerufen durch den Insertionsort oder etwa das Hygromycinresistenzgen, war also entsprechend größer als der eventuelle Effekt durch den Verlust des 82 kb-Genclusters und der 16 enthaltenen *CYP71Bs*.

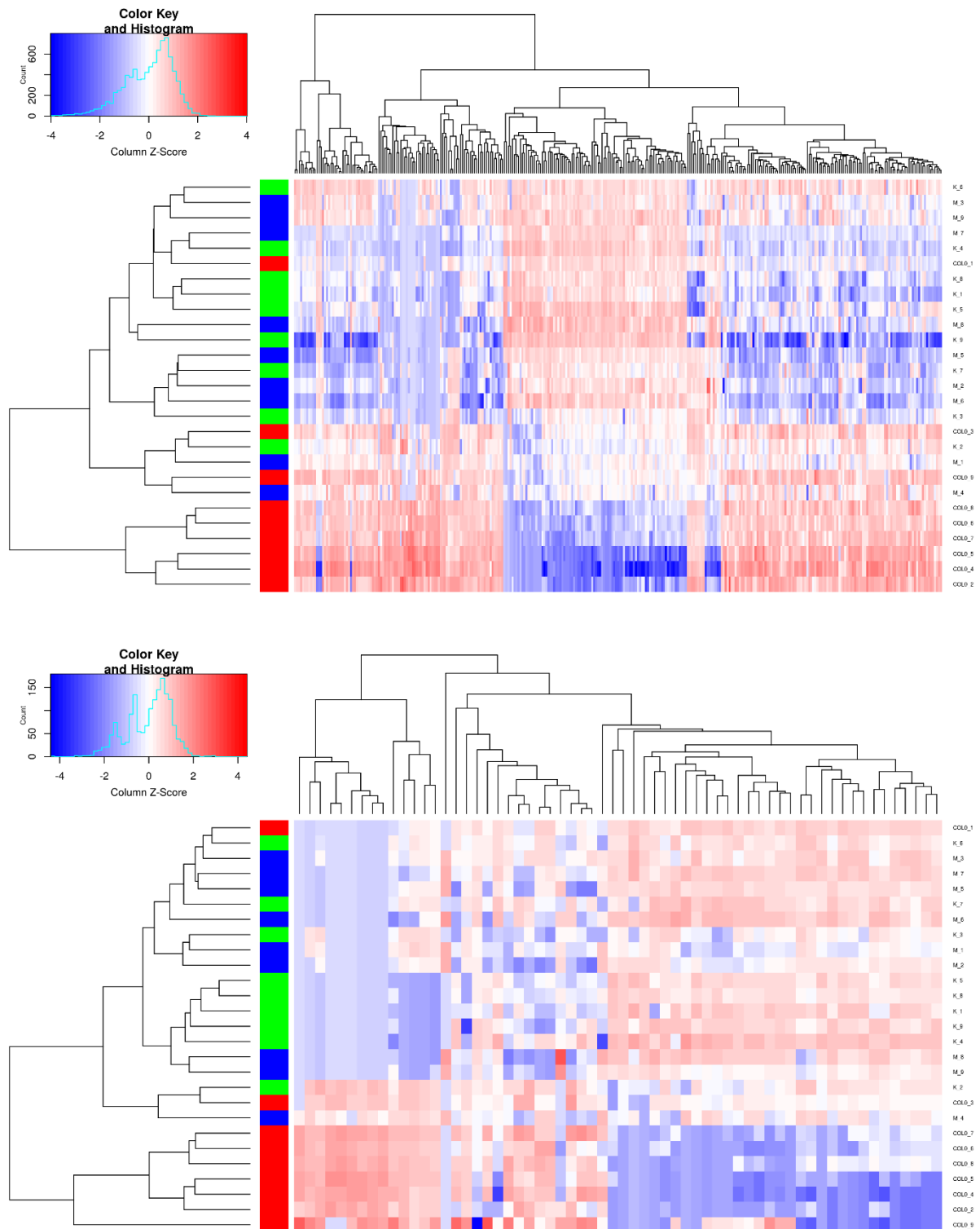


Abbildung 4-24 Hierarchische Clusteranalyse der nicht-zielgerichteten Metabolitanalyse der *CYP71B*-Clustermutanten. Dendrogramme (Zeilen: Genotypen, Spalten: *Features*) und Heatmap aller *Features*. Daten wurden z-transformiert. Oben: negativer Ionisationsmodus, unten: positiver Ionisationsmodus. Rot: Col-0, grün: Kontrollgruppe mit *CYP71B*-Cluster und CRISPR/Cas9-Konstrukt, blau: homozygote Clustermutanten mit CRISPR/Cas9-Konstrukt. n=9. Abbildung zur Verfügung gestellt von Dr. J. Behr (BayBioMS, TU München).

Ergebnisse

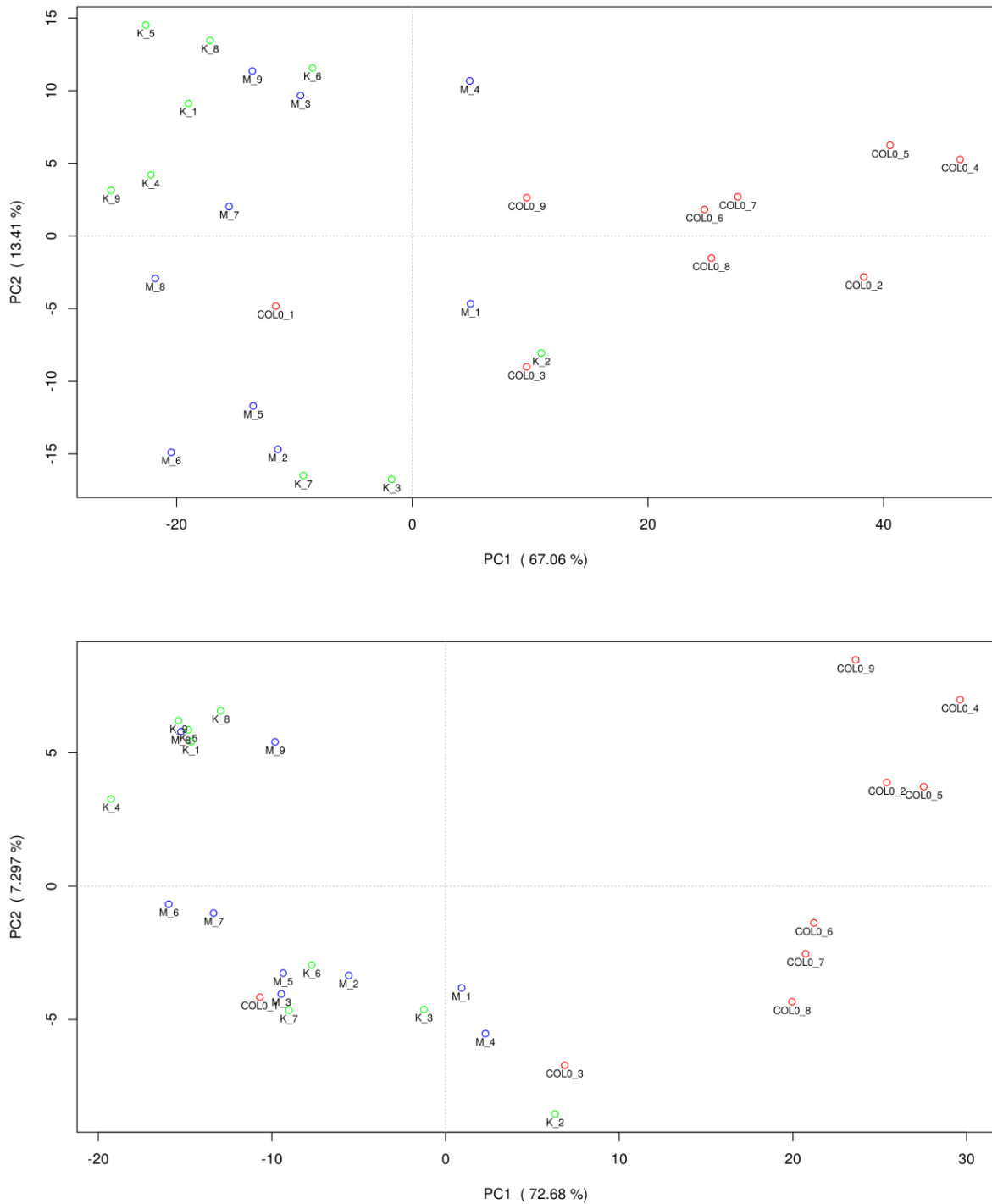


Abbildung 4-25 Hauptkomponentenanalyse der nicht-zielgerichteten Metabolitanalyse der *CYP71B*-Clustermutanten. Oben: negativer Ionisationsmodus, unten: positiver Ionisationsmodus. Rot: Col-0, grün (K): Kontrollgruppe mit *CYP71B*-Cluster und CRISPR/Cas9-Konstrukt, blau (M): homozygote Clustermutanten mit CRISPR/Cas9-Konstrukt. n=9. Abbildung zur Verfügung gestellt von Dr. J. Behr (BayBioMS, TU München).

Durch anschließende genauere Analyse der Kontrollgruppe wurden zwei Pflanzen detektiert, in deren Genom das 82 kb-Gencluster invertiert vorlag, das heißt in umgekehrter

Orientierung an selber Stelle wieder eingebaut wurde. Die PCR mit zwei *forward*-Primern für *CYP71B16* und *CYP71B37* war für AD 20-3-8 und AD 20-3-11 positiv (Abbildung 4-26).

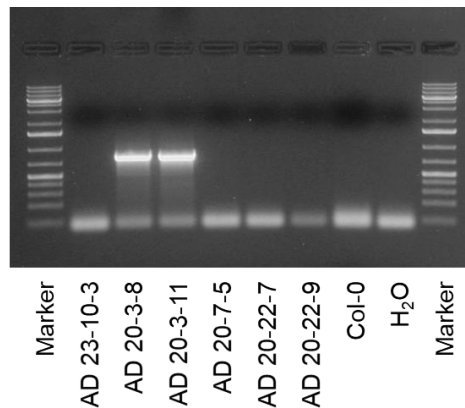


Abbildung 4-26 Analyse einiger *CYP71B*-Cluster-Mutanten auf eine Clusterinversion. PCR mit den Primern CTCCTCCAAGCCCTCCTAC (*CYP71B16*) und CAAGGTCACCCACAATCGTCTT (*CYP71B37*). Theoretische, berechnete Länge des PCR Produktes bei Inversion: ca. 800 bp. H₂O: Kontrollreaktion ohne Templat, Marker: GeneRuler™ 1 kb Plus DNA-Ladder (vergleiche Abbildung 3-1).

Die Inversion wurde durch Sequenzierung der PCR-Produkte bestätigt (gezeigt für AD 20-3-8, Anhang, Abbildung 6-9). In diesen beiden Pflanzen ist entsprechend von einem Funktionsverlust von zumindest den beiden Cluster-flankierenden Gene *CYP71B16* und *CYP71B37* auszugehen. Beide Linien zeigten allerdings bei der ungerichteten Metabolitanalyse keine besonderen Auffälligkeiten. Die Hauptkomponentenanalyse verortet beide Proben ununterscheidbar zwischen den transgenen und wildtypischen Proben (AD 20-3-8 entspricht Probe K_3, AD 20-3-11 entspricht Probe K_2, Abbildung 4-25).

4.6.4. Auskreuzung des CRISPR/Cas9-Konstruktes mit dem Wildtyp Col-0

Die Tatsache, dass das im Genom enthaltene CRISPR/Cas9-Konstrukt das Metabolitspektrum beeinflusst, verdeutlicht den Bedarf nach einer nicht-transgenen Clusterdeletionslinie. Entsprechend wurde die Rückkreuzung mit dem Wildtyp Col-0 durchgeführt. Für die Linie AD 20 gelang die Kreuzung in beide Richtungen (AD 20-3-5 und AD 20-7-3 dienten sowohl als Pollendonoren als auch als Pollenakzeptoren), für die Linie AD 23 (Pflanze AD 23-10-5) war nur die Kreuzung mit Col-0 als Mutterpflanze erfolgreich.

In der F₂-Generation wurden die Pflanzen AD 20-7-3 x Col-0 -4-89 und AD 20-7-3 x Col-0 -4-93 als homozygot *CYP71B*-Cluster-deletiert und wildtypisch bezüglich des CRISPR/Cas9-Konstruktes identifiziert (Abbildung 4-27). Für die Kreuzung der Linie AD 23 mit Col-0 wurden in dieser Generation bei 48 untersuchten Nachkommen 11 homozygote Clustermutanten gefunden, jedoch enthielten alle das CRISPR/Cas9-Konstrukt (beispielsweise Col-0 x AD 23-10-5 -1-1, Col-0 x AD 23-10-5 -2-26 und Col-0 x AD 23-10-5 -1-8). Es ist jedoch zu erwarten, dass durch die weitere Popagation dieser Linien in den

Folgenerationen eine zweite unabhängige Line transgenfreier *CYP71B*-Clustermutanten gewonnen werden kann.

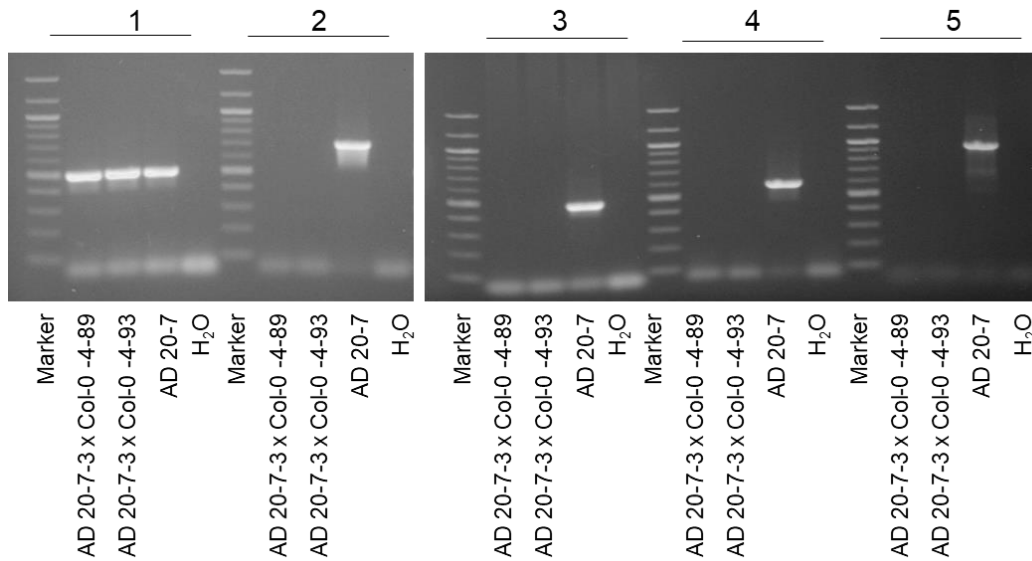


Abbildung 4-27 PCR-Analyse der homozygoten *CYP71B*-Cluster-Mutanten AD 20-7-3 x Col-0 -4-89 und AD 20-7-3 x Col-0 -4-93. PCR 1: Clusterumspannende PCR, Primer: GTCCTGTGTCTATCCCTGC (*CYP71B16*) und CAAGGTCACCCACAATCGTCTT (*CYP71B37*). Soll-Länge des PCR Produktes: 550 bp. PCR 2: PCR auf das CRISPR/Cas9-Konstrukt mit den Primern TGTCCCAGGATTAGAATGATTAGGC und AGCCCTCTTCTTTTCGATCCATCAAC; Länge 726 bp. PCR 3-5: PCRs auf clusterinterne DNA-Abschnitte. Primer PCR 3 (etwa mittig, in *CYP71B25*): GCCTTGGGGCATACAGTGAT und AGGGAGCCGACGATATCAGA, Länge 478 bp. Primer PCR 4 (Nähe *CYP71B37*): TATTGGGGGCATAGGCACTT und TACTTCAGAGGAACAAGTACAAGC, Länge 594 bp. Primer PCR 5 (Nähe *CYP71B16*): TAAGCACATCACTCACACCG und TCCAAGCTTTGAA GATGTTTGA, Länge 964 bp. H₂O: Kontrollreaktion ohne Templat, Kontrolllinie AD 20-7 zeigt eine nicht homozygote Clusterdeletion und dient daher in allen PCR-Reaktionen als Positivkontrolle. Marker: Quick-Load® Purple 100 bp DNA Ladder (NEB, vergleiche Abbildung 3-1).

5. Diskussion

5.1. Die Synthese IAOx-abhängiger Metabolite

Durch die Analyse mehrerer *Knock-out*-Mutanten konnten einige neue biosynthetischen Zusammenhänge für die indolischen Sekundärmetabolite in *Arabidopsis thaliana* aufgezeigt werden. Diese werden im Folgenden in den wissenschaftlichen Kontext eingebettet und in einem neuen Modell zum Synthese-Netzwerk zusammengefasst.

Die *cyp71a12/a13*-Doppelmutante

Im Zuge der Synthese indolischer Abwehrstoffe in *Arabidopsis thaliana* dehydratisieren CYP71A12 und CYP71A13 das Aldoxim IAOx. Die beiden Tandemgene sind durch abiotische und biotische Reize induzierbar. Die Expressionsanalyse der T-DNA-Insertionslinien von *CYP71A12* und *CYP71A13* im gestressten und ungestressten Zustand zeigte, dass der Ausfall des einen Homologes die Expressionsstärke des jeweils anderen Homologes nicht beeinflusst. Um eine *cyp71a12/a13*-Doppelmutante zu generieren, wurde ein TALEN-Paar, das in *CYP71A12* bindet, in die *cyp71a13-1* Mutante eingebracht. Im Blattgewebe konnten schon in den Primärtransformanten transheterozygote Mutationen in *CYP71A12* nachgewiesen werden. In den Primärtransformanten wurden insgesamt 12 unterschiedliche Mutationen nachgewiesen, bei neun handelte es sich um Deletionen zwischen drei und 82 Basen, die drei weiteren waren Kombinationen aus Deletionen und Insertionen. Deletionen gehören zu den häufigsten durch NHEJ eingeführten Mutationstypen (Rodgers und McVey, 2016). In einer Primärtransformante konnte kein für *CYP71A12* wildtypisches Allel detektiert werden. Dies war die einzige Linie, in der in der Folge eine stabile Vererbung eines mutierten Allels beobachtet wurde. Eine effiziente somale TALEN-Aktivität kann als Bedingung für die Generation stabiler Mutationslinien abgeleitet werden. Die meisten somatischen Mutationen wurden nicht in die Nachfolgenergeneration weitervererbt. Diese Problematik ergab sich auch bei anderen Versuchen, mit TALENs stabile Mutanten zu erzeugen (Christian et al., 2013). Die verwendeten TALENs, die unter dem 35S Promotor exprimiert wurden, schienen nicht in der Keimbahn aktiv zu sein. In der Tat konnte im *Arabidopsis thaliana*-Pollen keine Aktivität dieses als konstitutiv geltenden Promotors nachgewiesen werden (Wilkinson et al., 1997). Aufgrund einer besonders hohen somatischen Mutationsrate in einem frühen Entwicklungsstadium konnte für *CYP71A12* dennoch eine TALEN-vermittelte Mutation stabil vererbt werden. Eine so in die T2-Generation übertragene Mutation vererbte sich anschließend entsprechend den Mendelschen Vererbungsgesetzen, wie für die Primärtransformante 3 gezeigt (siehe 4.2.). Die veränderten *CYP71A12*-Allele segregierten zudem unabhängig vom TALEN-Transgen,

so dass in den Folgegenerationen zwei homozygote *cyp71a12a13*-Linien ohne das TALEN-Konstrukt erhalten wurden.

Die *cyp71a12a13*-Doppelmutanten synthetisierten nach Induktion mit UV-Licht oder AgNO₃ nur noch Spuren von Camalexin. Die Dehydratisierung von IAOx durch CYP71A12 und CYP71A13 ist also essentiell für die Synthese der Camalexin-Vorstufen. In der *cyp71a13-1* Mutante kann Stressor-abhängig von deutlich unter 10 % bis über 30 % der wildtypischen Camalexinmenge gebildet werden (Müller et al., 2015; Nafisi et al., 2007; Wang et al., 2012, diese Arbeit). Die Camalexindefizienz in der Doppelmutante zeigt die *in vivo*-Beteiligung von CYP71A12 an der Camalexinbiosynthese, wenn auch anteilig in einer untergeordneten Rolle. Da der Ausfall von *CYP71A13* die Expression von *CYP71A12* nicht zu beeinflussen schien, kann der in *cyp71a13-1* verbliebende Camalexinanteil daher als der durch CYP71A12 synthetisierte Anteil gewertet werden.

Der beinahe camalexinfreie Phänotyp wurde für das 5 bp-Deletionsallel (*cyp71a12a13-1*) und für ein 3 bp-Deletionsallel (*cyp71a12a13-2*) beschrieben (Abbildung 4-6). Die 3 bp-Deletion resultierte in dem Verlust der Asparaginsäure 488 im CYP71A12-Enzym. Asp 488 ist über die CYP71A12/13/18-Gruppe konserviert und scheint entweder für die Enzymfunktion dieser drei Enzyme entscheidend zu sein oder seine Deletion zerstört die native Struktur des Proteins, so dass es nicht mehr funktionsfähig ist. In beiden Doppelmutanten konnte der Phänotyp durch die Überexpression von CYP71A12 oder CYP71A13, wenn auch nicht vollständig, gerettet werden. Trotz starker Expression von CYP71A12 unter dem CaMV 35S-Promotor wurden keine dem Wildtyp entsprechenden Camalexinmengen erreicht (Abbildung 4-7 A und B). Eventuell ist CYP71A12 *in vivo* deutlich weniger effizient für die Camalexinvorstufen-Synthese als CYP71A13, obgleich die *in vitro* bestimmten Enzymparameter beider CYPs für das Substrat IAOx durchaus vergleichbar sind (Müller et al., 2015). Der Vergleich unterschiedlicher Enzyme über ihre Michaelis-Menten-Parameter ist jedoch generell nur eingeschränkt möglich (Eisenthal et al., 2007). Wahrscheinlich wird das überexprimierte CYP71A12 in der Pflanze nicht ausschließlich zur Camalexinsynthese, sondern zusätzlich zu weiteren Funktionen, herangezogen. Fütterungsexperimente in Hefe zeigen, dass CYP71A12 nicht nur Cys-IAN (in Anwesenheit von Cystein) aus IAOx generiert, also die für CYP71A13 typische Katalyse, sondern ebenso als Hauptprodukt den Aldehyd ICHO bildet, der wiederum zu ICN-Derivaten umgesetzt werden kann (Klein et al., 2013; Müller et al., 2015; Rajniak et al., 2015). Auch ein unvollständiger *Rescue* der Camalexinsynthese durch CYP71A12 validiert jedoch den Zusammenhang der TALEN-vermittelten Mutationen in CYP71A12 mit dem Camalexinphänotyp in der Doppelmutante.

Die *cyp71a12a13-1* -Linie wurde vergleichend zu den CYP71-Einzelmutanten und dem Wildtyp auf ihren metabolischen Phänotyp untersucht. Die Bildung einiger Metabolite ist

deutlich von CYP71A13 abhängig, nämlich die von Camalexin, der Camalexinvorstufen DHCA und GS-IAN sowie dem Camalexinderivat HC MalonylHex (Abbildung 4-9). Dies ist in guter Übereinstimmung mit den *in-vitro*-Daten, die CYP71A13 als vorwiegenden Produzenten des GS- bzw. Cystein-Derivates von IAN zeigen (Klein et al., 2013; Müller et al., 2015). In *cyp71a12* hingegen war besonders der Indolcarbonsäuremethylester ICOOMe stark reduziert. In der Doppelmutante konnte keine weitere Reduktion detektiert werden. Die Bildung dieses Metaboliten geschieht also CYP71A12-abhängig. Ebenfalls stark beeinflusst vom CYP71A12-*Knock-out* sind die Indolcarbonsäure ICOOH, ICOOGlc und die 6-Hydroxyindol-3-Carbonsäure-Derivate. Rajniak et al. (2015) zeigten aber, dass der Methylester vielmehr das Methanolysprodukt von ICN ist, welches in seiner hohen Konzentration der methanolischen Extraktion geschuldet ist. Der Großteil des in dieser Analyse gefundenen ICOOMe muss daher stellvertretend als die von Rajniak et al. (2015) beschriebenen CYP71A12-abhängigen ICN-Derivate betrachtet werden. Ebenso ist es wahrscheinlich, dass der CYP71A12-abhängige Anteil der weiteren Carbonsäurederivate über die ICN-Hydrolyse zu ICOOH entstanden sind. Die Indolcarbonsäuren sind jedoch in CYP71A12-Mutanten (*cyp71a12* bzw. *cyp71a12a13-1*) niemals vollständig, sondern nur um etwa Hälfte (genauer Anteil schwankt stark zwischen den jeweils betrachteten ICOOH-Derivaten) reduziert. Die indolischen Aldehyde ICHO und seine Derivate sind vom *cyp71a12/a13*-Doppel-*Knock-out* gar nicht betroffen, hier wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede zum Wildtyp beobachtet. Die Bildung der Säuremetabolite ist somit zwar anteilig abhängig von CYP71A12/13, geschieht aber zusätzlich über alternative Synthesewege. Die von IAOx-abgeleiteten Aldehyde hingegen werden nicht über einen CYP71A12/A13-abhängigen Syntheseweg gebildet.

Der metabolische Phänotyp der CYP71B6/AAO1/CYP71A12/13-Mehrfachmutanten

In einer zweiten Versuchsreihe mit weiteren Mutantenkombinationen (Kapitel 4.5) konnten die obig beschriebenen Aussagen und Tendenzen bezüglich der *cyp71a12a13-1* Mutante bestätigt werden. Zudem wurden Mehrfachmutanten mit *Knock-out*-Kombinationen der Gene CYP71A12/A13, CYP71B6 und AAO1 metabolisch phänotypisiert. Eine hierarchische Clusteranalyse über die gesamten *Metabolomics*-Daten zeigte, dass die Mutationen in CYP71A12/A13 übergeordneten Einfluss auf das Metabolitprofil haben. Nach Böttcher et al. (2014) sind CYP71B6 und die Aldehydoxidase AAO1 für die Bildung von ICHO und ICOOH aus IAN verantwortlich. Deren Doppel-*knock-out* *cyp71b6/aao1* sowie die Dreifach- und +⁺Quadrupel-*knock-out*-Kombinationen *cyp71b6/aao1/cyp71a12a13*, *cyp71b6/cyp71a12a13*, und *aao1/cyp71a12a13* zeigten nach Induktion jedoch keine vollständige Reduktion dieser Substanzen. Der Verlust von CYP71B6 hatte keinen Einfluss auf die Synthese der Indolaldehyde, führte jedoch zu einer Reduktion der Indolcarbonsäuren. Diese waren in der

CYP71B6-Einzelmutante beziehungsweise in den *CYP71B6/AAO1/CYP71A12/13*-Mehrfachmutanten im Vergleich zum Wildtyp bzw. der jeweiligen Mutantenkombination mit funktionalem *CYP71B6* stets weiter reduziert. So besteht zusätzlich zur obig beschriebenen Rolle von *CYP71A12* eine klare Abhängigkeit der Indolcarbonsäuresynthese von *CYP71B6*. Zwischen *aao1* bzw. den *aao1*-Mehrfachmutanten und Col-0 bzw. den jeweiligen *AAO1*-wildtypischen Genotypen waren keine statistisch signifikanten Unterschiede für die Indolcarbonsäuren vorhanden (Abbildung 4-16). Für die *AAO1*, die in *in-vitro*-Versuchen ICHO zu ICOOH umsetzt, konnte somit in der metabolischen Mutantenanalyse kein Zusammenhang zur Säuresynthese nachgewiesen werden. In *cyp71b6/aao1/cyp71a12a13* waren die Indolcarbonsäuren am stärksten verringert, durchschnittlich wurden noch 27 % (AgNO₃-Induktion) bzw. 35 % (UV-Induktion) der Säuren relativ zu den Konzentrationen in Col-0 detektiert. Die vier Gene, die in dieser Mutante keine Funktionalität mehr besitzen, scheinen also nicht exklusiv für die Indolcarbonsäuresynthese aus IAOx zu sein.

Die Einzelmutante *aao1* wurde schon in Böttcher et al. (2014) auf ihren metabolischen Phänotyp hin analysiert. Analog zum vorliegenden Datensatz wurde auch dort keine statistisch signifikante Akkumulation des postulierten Substrats ICHO festgestellt werden. Stattdessen hatte der *knock-out* von *AAO1* massiven Einfluss auf das Level des ICHO-Derivats 5-GlcO-ICHO. Auch in den *AAO1*-Mehrfachmutanten waren die 5-GlcO-ICHO-Mengen stets signifikant erhöht (Abbildung 4-17). Die Postulierung von ICHO als Substrat der *AAO1* in Böttcher et al. (2014) fußt hauptsächlich auf biochemische Daten und die Analyse von *AAO1*-Überexpressierern, die einen klaren Anstieg der ICOOH-Konzentration zeigen. Die artifizielle Expression der *AAO1* unter dem sehr starken CaMV 35S-Promotor stellt möglicherweise keine hinreichende Abbildung der Realität dar. Es ist denkbar, dass die *AAO1 in vitro* ICHO zu ICOOH umsetzt, jedoch 5-HO-ICHO das eigentliche endogene Substrat ist. ICHO und 5-HO-ICHO sind sich strukturell sehr ähnlich, beide ähneln zudem dem ebenso *in vitro* als *AAO1*-Substrat bestätigten Indol-3-Acetaldehyd (IAAld, Akaba et al., 1999). Die Oxidation von IAAld zu Auxin durch Aldehydoxidasen wurde als möglicher Auxinbiosyntheseweg postuliert (Koshiba et al., 1996), jedoch konnte eine biologische Relevanz hierfür nicht bestätigt werden.

Aldehydoxidasen sind promiske Enzyme, für die oft mehrere Aldehyde, die mitunter strukturell stark unterschiedlich sind, als *in-vitro*-Substrate beschrieben sind (Abbildung 5-1). So setzt die *AAO1* neben den erwähnten indolischen Substraten auch den aliphatischen Aldehyd Heptanal, das Monoterpen Geranial, den Zimtaldehyd (ein Phenylpropanoid) sowie Benzaldehyd zur entsprechenden Carbonsäure um (Koiwai et al., 2000). Im Menschen gibt es nur eine Kopie, *AO1*, für die eine Reihe vorwiegend exogene Substrate bekannt sind, so dass ihr eine Rolle in der Detoxifikation zugeschrieben wird. Ein Substrat der humanen Aldehydoxidase, welches schon sehr früh als solches identifiziert wurde, ist B₆-Vitamin PAL

(Johns, 1967). Die nicht-zielgerichtete Analyse des *AAO1/CYP71B6/CYP71A12/13*-Mehrfachmutantenexperiments ergab für die *ao1* und alle *ao1*-Mutantenkombinationen eine statistisch signifikante Reduktion einer Substanz der Summenformel $C_8H_9NO_4$ im Vergleich zum Wildtyp. Diese Substanz wurde als 4-Pyridoxinsäure identifiziert. Rosettenblätter von *ao1* enthielten ca. 400 pmol 4-Pyridoxinsäure pro Gramm Trockengewicht, das sind nur 36 % der im Wildtyp detektierten Menge (Abbildung 4-22). Pyridoxal, das sich strukturell deutlich von 5-HO-ICHO unterscheidet, ist sehr wahrscheinlich ein weiteres endogenes Substrat der AAO1.

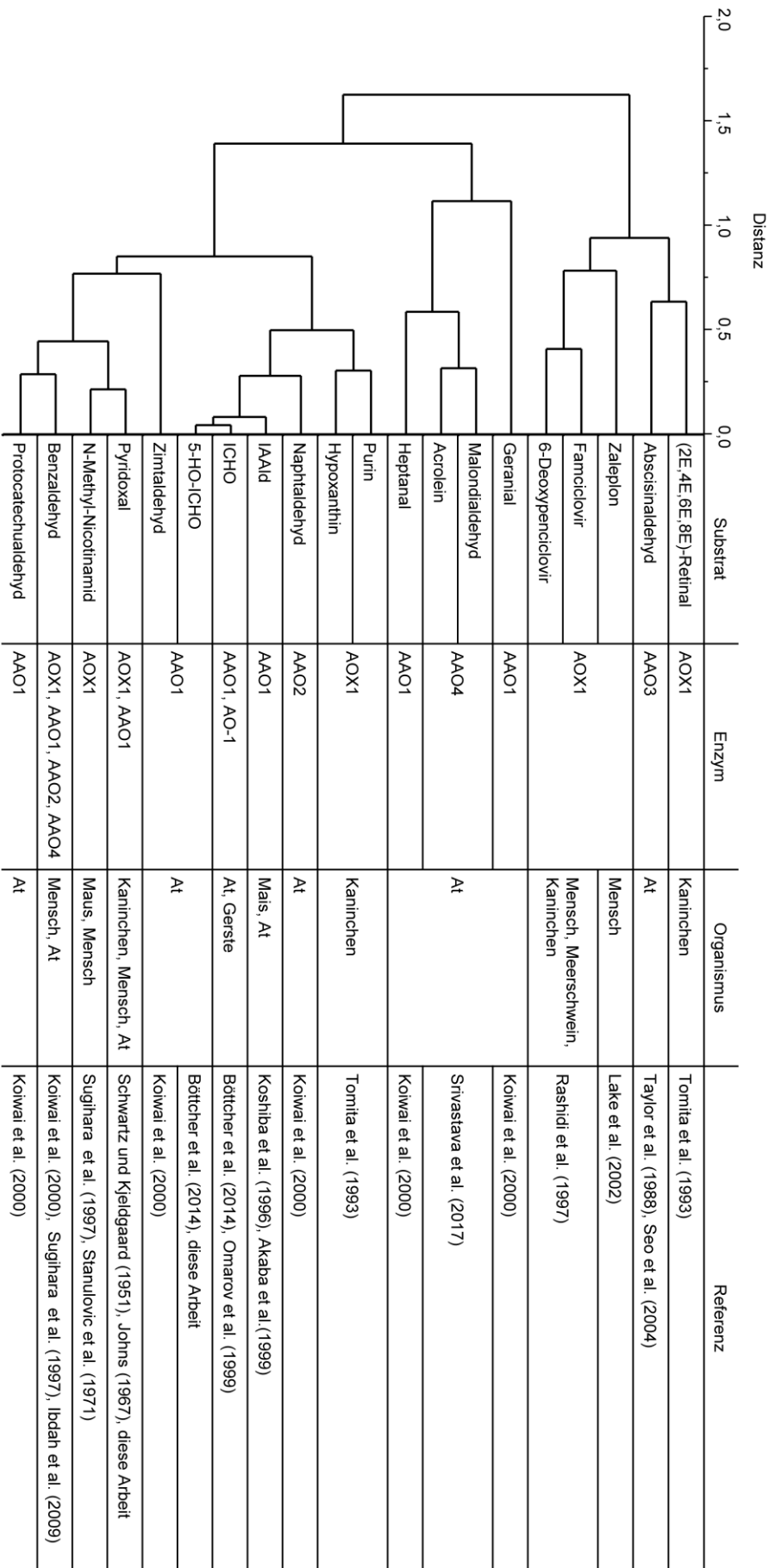


Abbildung 5-1 3D-Strukturvergleich von 20 *in vitro* und/oder *in vivo* bestätigten Aldehydoxidase-Substraten aus verschiedenen Organismen. At: *Arabidopsis thaliana*. Distanzmatrix und Dendrogramm erstellt mit dem Pubchem *Structure Clustering-Online tool* (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/assay/assay.cgi?p=clustering>; zuletzt aufgerufen am 21.06.2018), Parameter: 3D Tanimoto Similarity (Feature+Shape; Feature-optimized), Clustering-Methode: *complete linkage*-Verfahren.

Die Oxidation von PAL zur 4-Pyridoxinsäure ist in Wirbeltieren der Hauptabbauweg des Vitamins B₆. In Leber und Urin stellt sie den größten Anteil der Vitamin B₆-Formen dar. Auch in Pflanzen gilt 4-Pyridoxinsäure als Endprodukt des Vitamin B₆-Metabolismus, das nicht mehr in die aktive Form PLP zurück überführt werden kann. In Pflanzen liegt in der Regel nur unter 1 % der Gesamt-B₆-Vitameren als 4-Pyridoxinsäure vor, in *Brassicaceae* ist der Anteil generell wohl etwas höher (Ollilainen, 1999; Sampson et al., 1995; Sarett, 1951; Ubbink et al., 1986). Die AAO1 scheint, wie viele tierische Aldehydoxidasen, ein eher promiskues Enzym zu sein, das einerseits sehr spezifische Substrate des indolischen Sekundärmetabolismus umsetzt und andererseits den weit verbreiteten Kofaktor PLP bzw. seine dephosphorierte Form Pyridoxal durch Oxidation aus dem Gleichgewicht der verschiedenen Vitaminformen entzieht. PLP ist essentiell für zahlreiche Biosynthesewege in Pro- und Eukaryoten. Es ist beispielsweise auch der Kofaktor der TSB und der C-S Lyase (SUR1) in der Synthese der indolischen GSL (Christen und Mehta, 2001; Mikkelsen et al., 2004). In wie weit der lokale Entzug von PLP durch AAO1 einen Einfluss auf das GSL-Camalexin-Netzwerk hat, lässt sich anhand der vorhandenen Daten jedoch nicht feststellen. Das ICHO-Derivat 5-GlcO-ICHO reichert sich in *aaO1*-Mutanten an. Die unglykosilierte Form, 5-HO-ICHO, ist daher ein wahrscheinliches *in vivo*-Substrat der AAO1, die im Falle des *AAO1-Knock-outs* akkumuliert und anschließend an der Hydroxygruppe mit dem Zuckeraldehyd glykosidisch verknüpft werden kann. Das vermeintliche Oxidationsprodukt der AAO1, die Säure 5-HO-ICOOH, wurde in den beiden durchgeführten Metabolomanalysen jedoch nicht detektiert, ebenso wenig ihr theoretisches Dimer, der Diester aus den jeweiligen Hydroxy- und Säuregruppen (MW=318,29). Zwar handelt es sich bei U15 und U17, die nicht näher charakterisierte Hexoside von C₉H₇NO₃ sind (Böttcher et al., 2014), sehr wahrscheinlich um glykosilierte Indolcarbonsäuren, keine der Substanzen weist jedoch eine Abhängigkeit von AAO1 auf. Über den Verbleib der durch die AAO1 generierten Säure 5-HO-ICOOH lässt sich nur spekulieren. Nach Pathogeninduktion liegt ein Teil der unsubstituierten ICOOH zellwandassoziiert vor (Forcat et al., 2010; Hagemeyer et al., 2001). Für die 5-HO-ICOOH ist dies ebenso denkbar. Die Veresterung an Zellwandstrukturen nach Stressinduktion könnte eine generelle Eigenschaft der Hydroxyindolcarbonsäuren sein. Es ist erwähnenswert, dass diese Indole strukturelle Ähnlichkeit zu den phenolischen Säuren Ferulasäure und Sinapinsäure aufweisen, die ebenfalls an die Zellwand assoziiert vorliegen (Forcat et al., 2010; Schreiber et al., 1999).

Der Aldehyd ICHO wird nach Stressinduktion vermehrt aus IAOx gebildet. Seine Synthese ist jedoch vom Funktionsverlust keiner der beschriebenen Gene (*CYP71A12*, *CYP71A13*, *AAO1*, *CYP71B6*) beeinträchtigt und scheint damit unabhängig von *CYP71A12/13* und *CYP71B6* gebildet zu werden. Zudem ist er *in vivo* nicht das primäre Substrat der AAO1. So ist ICHO wahrscheinlich vorrangig ein GSL-Degradationsprodukt, das über das Indol-3-

Carbinol (I3C, Agerbirk et al., 2008) oder aber aus IAN, unter Mitwirkung von SPs, aus dem Aglukon gebildet werden kann (Burow et al., 2008; De Vos et al., 2008). Damit übereinstimmend gruppiert die hierarchische Clusteranalyse den Aldehyd ICHO ebenso nicht zusammen mit den Indolcarbonsäuren, sondern verknüpft ihn mit Tryptophan (Abbildung 4-19). Die Konzentration der Aminosäure war in den untersuchten Einzel- und Mehrfachmutanten von *CYP71A12*, *CYP71A13*, *AAO1* und *CYP71B6* im Vergleich mit dem Wildtyp ebenfalls nicht signifikant verändert. Damit wären ICHO und seine Derivate eine eigene Produktklasse in diesem Netzwerk und nicht etwa reine Intermediate der Indolcarbonsäuresynthese. Tatsächlich korreliert ICHO direkt positiv mit I3M und auch mit Dihydroascorbigen (UV-Datensatz). Dihydroascorbigen ist eine oxidierte Form des Ascorbigens, welches leicht aus dem reaktiven I3C entsteht (wohl nicht-enzymatisch, zusammengefasst in Wagner und Rimbach, 2009). Eine Korrelation muss zwar nicht zwingend einen kausalen oder biosynthetisch verknüpften Zusammenhang darstellen, jedoch zeigt sie ein paralleles Auftreten der jeweiligen Metabolite. Die Ergebnisse der verschiedenen Stressor-Behandlungen (hier: UV-Licht und AgNO_3) sind weitgehend vergleichbar, insbesondere bezüglich ICHO und seiner Derivate gibt es jedoch teilweise gegensätzliche Tendenzen. So ist die erwähnte positive Korrelation zwischen ICHO und I3M unter Ag^{2+} -Induktion nicht nachweisbar bzw. für die Paarung ICHO-Dihydroascorbigen negativ. Dies könnte ein Hinweis auf durch unterschiedliche Stressoren abgewandelte Metabolitflüsse sein. Neben möglichen regulatorischen Unterschieden spielen wahrscheinlich auch physikalisch-chemische Parameter und der Grad der Zellschädigung, der insbesondere durch die Schwermetallbehandlung deutlich stärker ist, eine Rolle.

Unter Schwermetalleinfluss kommt es über eine erhöhten ROS-Konzentration zu einer Absenkung pH-Wertes im Zytoplasma (He et al., 1998; Mathieu et al., 1996). Zudem weisen die besprühten Blätter zum Untersuchungszeitpunkt der Proben, 24 h nach der AgNO_3 -Behandlung, eine sichtbare mechanische Schädigung auf. Bei teilweiser Zellschädigung kann eine graduelle Mischung des Apoplasten (pH 5-6, Felle et al., 2000; Husted und Schoerring, 1995) und des Vakuoleninhalts (pH 5-6, Mathieu et al., 1989) mit dem Cytoplasma (pH ca. 7.2-7.5, Felle und Bertl, 1986; Gout et al., 2001) zu einem angesäuerten Milieu führen. Die mechanische Zellschädigung setzt außerdem die GSL-Degradation durch Myrosinasen in Gang, es entsteht ITC. Die Anwesenheit von Schwermetall-Ionen und der saure pH-Wert steuern die Weiterreaktion des ITCs bevorzugt über NSP hin zum Nitril, in diesem Fall IAN (Aleksandrova et al., 1992; Latxague et al., 1991). Diese Bedingungen könnten daher die beobachtete verringerte ICHO-Bildung im Vergleich zur UV-Behandlung begründen. Unter Schwermetalleinfluss wäre so eine Verschiebung der Metabolite von der I3C- und ICHO-Synthese hin zur *CYP71B6*-abhängigen ICOOH-Bildung über IAN eine mögliche Konsequenz. Aus I3M generiertes freies IAN könnte zum Aldehyd oder zur Säure

oxidiert werden, wobei nur für die Indolcarbonsäuren eine klare Abhängigkeit von CYP71B6 gezeigt werden konnte.

CYP71A12 und CYP71A13 als Weichensteller der Metabolitflüsse

Sehr wahrscheinlich wird IAOx zur Camalexinsynthese über CYP71A13 und CYP71A12 direkt in die Camalexinbiosynthese geschleust. *In vitro* macht GS-IAN nur einen geringen Produktanteil nach IAOx-Umsatz durch CYP71A13 aus, das primäre Produkt ist IAN (Klein et al., 2013). *In planta* ist jedoch von einer spezifischen Interaktion von CYP71A13 mit den beteiligten Folgeenzymen, einer Glutathiontransferase, GGP1 und CYP71B15, auszugehen. Mucha (2017) zeigte, dass es zur physischen Interaktion dieser Enzyme kommt, wobei CYP71A12, ebenso wie sein Homolog, mit in einen solchen Camalexinsynthesekomplex integrieren kann. Die Interaktion führt mutmaßlich zur Bildung eines sogenannten Metabolons, welches durch die beteiligten CYPs in der ER Membran verankert ist.

Solche Metabolons sind in den letzten Jahren zunehmend für die Biosynthese pflanzlicher Sekundärstoffe beschrieben, beispielsweise für die Dhurrin- oder Isoflavonbiosynthese (Jensen et al., 2011; Nielsen et al., 2008; Waki et al., 2016). Zunehmend wird diese Form von Synthesemaschinerie als ein Mechanismus der Pflanze verstanden, effiziente Metabolitflüsse zu generieren. Ein derart kontrollierter Metabolitstrom ermöglicht so wahrscheinlich erst die zügige Akkumulation von Camalexin am Ort des Pathogenbefalls. Die Bildung einer zwar dynamischen, aber dennoch geschlossenen Syntheseinheit vermittelt nicht nur eine effiziente Synthese, der physische Kontakt der beteiligten Enzyme verhindert wahrscheinlich auch das Austreten von potentiell hoch reaktiven Intermediaten. Fütterungsexperimente zeigen zwar, dass die Zugaben von externem IAN zu mit AgNO₃-behandelten Blättern der *cyp71a13-1* Mutante die Camalexinsynthese zum Teil retten kann (Nafisi et al., 2007), unter biologischen Bedingungen scheinen die IAN-Pools in der Zelle jedoch strenger getrennt zu sein. Über die I3M-Degradation gebildetes IAN konnte in den *cyp71a12a13*-Mutanten ein völliges Einbrechen der Camalexinkonzentration nicht ausgleichen, obwohl die anderen Enzyme der Camalexinsynthese vorhanden waren. Solches „freies“ IANs bildet somit einen unabhängigen, getrennten IAN-*Pool* innerhalb der Zelle, der nicht mit dem intermediären IAN der Camalexinbiosynthese austauschbar ist (Müller et al., 2015). Stattdessen wird freies IAN mutmaßlich sofort vom für dieses Substrat hochaffinen CYP71B6 aufgegriffen und zur Säure ICOOH oxidiert (Böttcher et al., 2014). Hiermit konsistent ist die Tatsache, dass IAN weder nach AgNO₃-Behandlung, UV-Licht oder *Phytophthora spp.* Infektion in Arabidopsisblättern nachweisbar akkumuliert (Böttcher et al., 2014; Böttcher et al., 2009, diese Arbeit). Effektives *Channeling* in IAN-abgeleitete Abwehrstoffsynthesen und die Aktivität von CYP71B6 verhindern somit die Freisetzung eines relativ reaktiven Nitrils ins Zytosol. Da IAN auch als Auxinvorstufe fungieren kann (Bartling et al., 1992; Kriechbaumer et al., 2007; Normanly et al., 1997), wird so auch ein Einfluss auf die

Auxinkonzentration, der negative Effekte auf die eingeleiteten Abwehrmechanismen mit sich bringen könnte, unterbunden.

CYP71A12 ist sowohl an der Camalexinbiosynthese als auch an der Synthese der 4-OH-ICN-Derivate beteiligt. Analog zum Camalexin-Metabolon lässt sich für die Biosynthese der ICNs auf eine ähnliche Enzymmaschinerie unter der Beteiligung von CYP71A12 und den koexprimierten FOX1 und CYP82C2 spekulieren. Für physische Interaktionen zwischen den genannten Proteinen liegen zum aktuellen Zeitpunkt keinerlei experimentellen Hinweise vor, es bestehen für diesen Syntheseweg jedoch Parallelen zur Dhurrin-Synthese in Sorghum, für welche eine Metabolonformation bestätigt ist (Nielsen et al., 2008; Rajniak et al., 2015). Die Homologe CYP71A12 und CYP71A13 wären somit in der dynamischen Interaktion mit den jeweiligen Synthesepartnern die Weichensteller zwischen den beiden IAox-abhängigen Synthesewegen. CYP71A12 kann variabel den Platz von CYP71A13 im Camalexinmetabolon übernehmen. Dieses Metabolon scheint für die Camalexinbildung zumindest in Blättern jedoch weniger effektiv zu funktionieren, denn auch mit einem konstitutiv überexprimierten CYP71A12 (bis zu ca. 40-fach stärker als durch UV- oder Silbernitrat-Induktion bedingt) konnte kein vollständiger *Rescue* des camalexindefizienten *cyp71a12a13*-Phänotyps erreicht werden (siehe 4.2). Der von Rajniak et al. (2015) beschriebene Biosyntheseweg der 4-OH-ICN-Derivate scheint jedoch ausschließlich von CYP71A12, nicht aber von CYP71A13, abhängig zu sein.

Das Duplikationsevent, durch welches das *CYP71A12/A13*-Tandem entstanden ist, hat hier also zu einer Diversifizierung von Biosynthesewegen geführt. In Pflanzen sind Genkopien besonders häufig, 65 % aller annotierten Pflanzengene liegen als Duplikate vor (Panchy et al., 2016). Duplikationen von Synthesegenen führen, wenn beide Kopien funktional bleiben, oft zur Entstehung neuer, verzweigter Synthesewege, wie beispielsweise bei den GSL-Synthesegenen *AOP2* (*2-oxoglutarate-dependent dioxygenase 2*) und *AOP3*, deren variierende Expressionsstärke in verschiedenen *Arabidopsis*-Ökotypen zum Vorkommen von entweder Alkenyl- oder Hydroxyalkyl-GSL führt (Kliebenstein et al., 2001; Lynch und Force, 2000). Das Tandem *CYP79F1* und *CYP79F2* ist ein weiteres Beispiel für differentiell exprimierte GSL-Synthesegene mit ähnlicher, aber nicht identischer Enzymfunktion (Chen et al., 2003). Sie katalysieren die Bildung des jeweiligen Aldoxim-Intermediats für die Synthese aller aliphatischer GSL (*CYP79F1*) bzw. nur langkettiger aliphatischer GSL (*CYP79F2*). Bei *CYP71A12* und *CYP71A13* liegt ebenfalls eine Neufunktionalisierung von Tandemkopien vor. Obwohl *CYP71A13* biochemisch besser für die Camalexinbiosynthese geeignet (Klein et al., 2013; Müller et al., 2015) und in Blättern das Hauptenzym für die Camalexinbiosynthese ist, ist es im Wurzelgewebe kaum relevant. Stattdessen führt der *Knock-out* von *CYP71A12* in der Wurzel zum beinahe vollständigen Ausfall der

Camalexinsynthese (Millet et al., 2010). *CYP71A12* weist eine höhere Sequenzähnlichkeit zu dem auf Chromosom 1 lokalisierten *CYP71A18* auf als zu *CYP71A13*. Es ist also möglich, dass *CYP71A12* ursprünglich in der gesamten Pflanze Teil des Camalexinsynthesekomplexes war. In oberirdischen Gewebeteilen wurde diese Rolle größtenteils von *CYP71A13* übernommen, dessen Expression hier zudem besonders stark mit *CYP71B15* korreliert (Nafisi et al., 2007).

ICHO und IAN sind Produkte der IAOx-Umsetzung durch heterolog in *Saccharomyces cerevisiae* oder *Nicotiana benthamiana* exprimierte *CYP71A12* und *CYP71A13* (Klein et al., 2013). Die in dieser Arbeit beschriebenen Mutantenversuche zeigen jedoch eine klare Unabhängigkeit der ICHO-Bildung von *CYP71A12*. Tatsächlich wurde *in planta* bisher nur in *fox1*-Mutanten ein Anstieg der ICHO-Konzentration beschrieben. Der Metabolitfluss hin zu den ICN-Derivaten ist in dieser Mutante unterbrochen, folglich wird das von *CYP71A12* gebildete Intermediat Indol-3-Cyanhydrin frei. Diese reaktive Zwischenstufe wird anschließend als ICHO oder aber in Form eines indolischen cyanogenen Glykosids, welches im Wildtyp von *Arabidopsis thaliana* ansonsten nicht gefunden wird, im Zellextrakt detektiert (Rajniak et al., 2015). Bei Anwesenheit aller beteiligten Enzyme verhindern funktionierende Metabolons sowohl der Camalexin- als auch potentiell der ICN-Synthese jedoch weitgehend ein Austreten der einzelnen Intermediate. Es ist daher nicht anzunehmen, dass, wie noch durch Klein et al. (2013) oder Müller et al. (2015) postuliert, auch *in vivo* freies IAN oder ICHO durch *CYP71A13* bzw. *CYP71A12* gebildet werden. Im intakten, wildtypischen System scheint ICHO daher ausschließlich über den GSL-Abbau zu entstehen.

Die Bildung von ICHO und seinen Derivaten aus I3C bzw. über aus I3M-GSL gebildetem IAN impliziert die Beteiligung weiterer, noch unbekannter Enzyme im beschriebenen Netzwerk, beispielsweise für die Oxidation von I3C zu ICHO oder aber für den Cyanid-generierenden Schritt vom IAN zu ICHO. Dieser Schritt könnte nach *in-vitro*-Daten nach Böttcher et al. (2014) von *CYP71B6* katalysiert werden. Heterolog exprimiertes *CYP71B6* setzt IAN sehr effektiv zu ICHO und direkt zu ICOOH um, die Fütterung mit dem Aldehyd ICHO ergibt jedoch keinen Umsatz zur Säure und in den *CYP71B6*-Mutantenlinien konnte kein signifikanter Einfluss auf das Level der Aldehyde festgestellt werden. Ebenso scheint die AAO1 für diesen Schritt keine biologisch signifikante Bedeutung zu haben, so dass die direkte Oxidation des Aldehyds zur Säure durch *CYP71B6* oder AAO1 in der Pflanze eventuell nicht relevant ist.

Die Bedeutung von *CYP71B6*, die sich aus der Umsetzung freien IANs aus dem I3M-GSL-Abbau ergibt, wird bei genauer Betrachtung der veränderten Metabolitströme in Camalexinmutanten deutlich. In der *cyp71a12a13*-Mutante kommt es zu keiner Akkumulation des Substrates IAOx, sondern zu einer schwachen, nicht signifikanten, Anreicherung der indolischen GSL. Der Metabolitrückstau scheint sich auf mehrere Syntheseweige

aufzuteilen. Der Ausfall von CYP71A12 und CYP71A13, also eine Blockade der Camalexinsynthese, und zugleich von CYP71B6 bedingt allerdings eine signifikant erhöhte Konzentration von I3M-GSL, 1-MeO-I3M-GSL und 4-MeO-I3M-GSL. Interessanter Weise zeigt die quantitative GSL-Analyse der *ggp1 ggp3*-Mutante (die ebenfalls kaum noch Camalexin synthetisiert) durch Geu-Flores et al. (2011), dass der Rückstau der GSL nach Blockade in der Camalexinbiosynthese spezifisch zur Erhöhung von I3M-GSL, nicht aber von 1- oder 4-MeO-I3M-GSL führt. Angehäuftes I3M-GSL scheint also bei Anwesenheit von CYP71B6 myrosinaseabhängig über IAN hin zu ICOOH-Derivaten beziehungsweise über I3C abgebaut zu werden. Der CYP71B6-Weg konkurriert damit mit der Methoxylierung von I3M-GSL. Die möglichen myrosinaseabhängigen I3M-GSL-Abbauprodukte wurden in der *ggp1 ggp3* Mutanten durch Geu-Flores et al. (2011) jedoch nicht bestimmt.

Das neue Modell des Netzwerks IAOx-abhängiger Metabolite

Die Metabolitanalyse der *cyp71a12a13*-Mutante wurden in Müller et al. (2015) publiziert und davon ausgehend ein Modell zum IAN-Netzwerk in *Arabidopsis thaliana* entwickelt. Um den hier beschriebenen Ergebnissen der Analyse von *CYP71A12/13*-, *CYP71B6*- und *AAO1*-Mehrfachmutanten sowie den Ergebnissen von Rajniak et al. (2015), die die *CYP71A12*-abhängige Synthese der ICN-Derivate beschreiben, Rechnung zu tragen, muss dieses Modell jedoch modifiziert werden. Folgendes neue Modell für das Netzwerk IAOx-abhängiger induzierbarer und konstitutiver Metabolite in *Arabidopsis thaliana* (Abbildung 5-2) vereint zusammenfassend die obig beschriebenen Aussagen der eigenen Datensätze insbesondere mit den Ergebnissen von Böttcher et al. (2014), Klein et al. (2013), Müller et al. (2015) und Rajniak et al. (2015):

nicht dargestellt) die Synthese der konstitutiven, nur teilweise induzierbaren Indolglucosinolate ein (Hansen et al., 2001), über deren Abbau wiederum die ICHO-Derivate und ein Großteil der Indolcarbonsäuren gebildet werden.

Dieses Modell berücksichtigt im Unterschied zu Müller et al. (2015) noch deutlicher eine Trennung von Aldehyd- und Säurebiosynthese sowie die divergierenden Eigenschaften von CYP71A12 und CYP71A13, die in Kombination mit den jeweiligen Folgeenzymen die Synthese von entweder Camalexin oder der ICN-Derivate einleiten. Die CYP71A12-abhängige Bildung der Säure als Hydrolyseprodukt von ICN, sowie die Bildung von ICOOMe als Nebenprodukt des Extraktionsverfahrens werden ebenso gekennzeichnet. Außerdem werden Wege der IAN- und ICHO-Bildung über CYP71A13 bzw. CYP71A12 (Abbildung 5-2, grau hinterlegt) unter der Prämisse berücksichtigt, dass sie *in vitro* bestätigt sind, jedoch höchstwahrscheinlich *in vivo* nicht relevant bzw. nur im Falle eines unterbrochenen oder fehlregulierten Metabolitflusses tatsächlich an dieser Stelle ablaufen.

Die möglichen Funktionen von IAN, ICHO, ICOOH und HCN in der Pflanzenabwehr

ICOOH kann zwar auch durch Hydrolyse aus Zwischenprodukten der 4-HO-ICN-Derivatsynthese entstehen, dennoch sind die Indolcarbonsäuren wie auch die Indolaldehyde in *Arabidopsis thaliana* vermutlich vorwiegend Produkte des GSL-Abbaus und somit weitgehend unabhängig von CYP71A12 und CYP71A13 (Abbildung 5-2). ICHO und ICOOH sind auch in der Speiserübe (*Brassica rapa*) als die primären *in-vivo*-Abbauprodukte von isotopenmarkiertem I3M identifiziert worden (Pedras et al., 2002). Hier, wie auch in Böttcher et al. (2014), werden der Aldehyd und die Säure als chemisch verknüpft postuliert, mit ICOOH als oxidiertes ICHO. In *Arabidopsis* scheinen jedoch weitgehend zwei unabhängige Wege zur Bildung dieser Metabolite aus I3M-GSL zu führen, nämlich über IAN und CYP71B6 zur Säure, und über I3C zum Aldehyd. In *Arabidopsis thaliana* überlappen die Gene der indolischen GSL in ihrer Expression mit CYP71B6, ein gemeinsames Expressionsmaxima befindet sich im Wurzelgewebe, insbesondere in der Columella (Moussaieff et al., 2013). IAN wirkt in einigen *Brassica*-Arten selbst als Abwehrstoff. Seine induzierbare Synthese und antifugale Wirkung wurde für *Brassica juncea* gezeigt (Pedras et al., 2002). Ob IAN als dem I3M-GSL Abbau in anderen *Brassicaceae*n wie *Arabidopsis thaliana* eine ähnliche Funktion hat, ist jedoch fraglich, da die Anwesenheit des hoch IAN-affinen CYP71B6 eher annehmen lässt, dass dieses Nitril kaum frei vorliegt.

Die ICOOH- und die ICHO-Derivate stellen eine Verknüpfung der induzierbaren und konstitutiven IAOx-abhängigen Abwehrsysteme dar. Für beide Substanzklassen konnte bislang keine direkte anti-pathogene Wirkung gezeigt werden. Ihre Funktion ist daher auch nach Erweiterung der Datenlage zu ihrer Synthese nicht direkt zu erschließen. Es könnte sich bei den ICHO- und ICOOH-Derivaten schlichtweg um Abbauprodukte handeln, aber

auch eine direkte oder indirekte Rolle in der Signalvermittlung wäre denkbar. Die postulierte Vorstufe der Indolaldehyde, der I3C, steht aufgrund seines anticarcinogenen Potentials seit Jahren im Fokus (Fuentes et al., 2015; Megna et al., 2016) und wurde jüngst zudem als Signalstoff in antagonistischer Wechselwirkung mit Auxin diskutiert (Katz et al., 2015). Das ICHO-Derivat 5-OH-ICHO ist als Substrat der AAO1, einer insbesondere durch biotischen Stress induzierbare Oxidase. Auch hier könnte entweder das entstehende Molekül selbst oder der Oxidationsprozess an sich regulationsrelevant sein. Neben einer metabolischen Funktion gibt es für die Aldehydoxidasen sowohl in Tieren als auch in Pflanzen zunehmend Evidenzen, dass sie durch die Oxidation reaktiver Aldehyde und der parallelen Produktion von Superoxidanionen die ROS-Konzentration anheben und so den oxidativen Status der Zelle steuernd beeinflussen (Kundu et al., 2007; Srivastava et al., 2017; Yesbergenova et al., 2005; Zarepour et al., 2012). ICOOH wird als Mediator der β -Aminobuttersäure-vermittelten Resistenz diskutiert. Im Zuge des *Primings* durch die nicht-proteinogene Aminosäure akkumuliert ICOOH nach Pathogeninfektion in der Zellwand. Neben einer möglichen stabilisierenden Funktion bei der Ausbildung von Papillenstrukturen könnte ICOOH an der Initiation weiterer Abwehrmaßnahmen der Pflanze beteiligt sein (Forcat et al., 2010; Gamir et al., 2012).

Interessant ist das Freiwerden von HCN, das mit der Synthese von ICHO und ICOOH einhergeht: Bei der Oxidation von freiem IAN zu ICHO oder ICOOH, bei der Hydrolyse von ICN (wahrscheinlich nicht-enzymatisch) und bei einem theoretischen Metabolon-*Leak* nach CYP71A12 oder CYP71A13 über freiwerdendes IAN oder ICHO. Zudem entsteht auch bei der ersten Teilreaktion von CYP71B15, dem Ringschluss, HCN. Cyanid wird also möglicherweise zum Teil nicht enzymatisch, aber auch kontrolliert, über CYP71B6 und CYP71B15, an bis zu vier Stellen des Netzwerks generiert (Abbildung 5-2).

Endogenes Cyanid wird in der Pflanze beispielsweise im Zuge der Etylensynthese freigesetzt. Auch durch den Abbau cyanogener Glykoside, die in vielen Pflanzenfamilien gebildet werden, entsteht dieses Zellgift. Es hemmt verschiedene Metalloproteine wie z. B. Katalasen, Häm- Peroxidasen (Asada, 1999) oder die RuBisCO (Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase, Wishnick und Lane, 1969) und blockiert durch Bindung an das Häm-Eisen des Cytochrom c die Atmungskette in den Mitochondrien. Eine Autotoxizität gegenüber CYPs, in diesem Fall CYP71B6 und CYP71B15, ist jedoch kaum zu erwarten, da die Chelatierung ionischer Liganden wie CN^- an das CYP-Häm aufgrund der lipophilen Natur des aktiven Zentrums der CYPs nicht bevorzugt wird (Correia und Ortiz de Montellano, 2005).

In höheren Pflanzen wird endogenes Cyanid hauptsächlich über den β -CAS-Weg entgiftet. Das Cyanid wird durch die β -Cyanolalaninsynthase (CAS) mit Cystein zu β -Cyanolamin umgesetzt und in einem zweiten Schritt anschließend durch eine bifunktionale

Nitrilase/Nitrilhydratase über das Intermediat Asparagin zu Aspartat und Ammonium umgesetzt. Während die Nitrilase/Nitrilhydratase als zytosolisch beschrieben wird, ist die β -CAS in den Mitochondrien lokalisiert, wahrscheinlich um dort lokal die Atmungskette zu schützen (zusammengefasst in Machingura et al., 2016). Zudem zeigt die zytosolische O-Acetyl-Sulphydrolase, ein Enzym der Cysteinsynthese, in geringem Maße β -CAS-Aktivität (Hasegawa et al., 1995; Liang und Li, 2001).

Entsprechend dem Modell in Abbildung 5-2 entsteht zu jedem aus IAox gebildeten ICOOH-Derivat je ein Molekül Cyanid. Die Zusammenschau der Daten aus Böttcher et al. (2014) zu zwei *CYP71B6*-Mutanten (T-DNA-Insertionslinien) und den Daten dieser Studie (der Silbernitrat-Datensatz wurde mit analoger Methodik generiert), zeigen, dass diese Säuren (ICOOH, ihr Methylester ICOOMe und die 6-HO-ICOOH-Derivate) zu etwa 13- 55 % *cyp71b6*-abhängig entstehen. Der restliche Anteil könnte beispielsweise durch Hydrolyse bzw. Methanolyse von Camalexin- oder ICN-Intermediaten nicht-enzymatisch mitunter während der Probenaufarbeitung entstehen (Rajniak et al., 2015). Böttcher et al. (2014) zeigt eine absolute Quantifizierung von Camalexin und der verschiedenen Säurederivate in zusammengefasster Form ihrer Agluka. Über diese quantitativen Daten und unter Berücksichtigung des potentiellen *CYP71B6*-abhängigen Anteils der Säuren lässt sich eine *CYP71B6*-abhängig freigesetzte Cyanidmenge von etwa 20 nmol/g FG abschätzen. Mit dem durch *CYP71B15* synthetisierten Camalexin werden zusätzlich etwa 56 nmol/g FG Cyanid frei. Die Summe von 76 nmol/g FG HCN stellt eine Momentaufnahme 24 h nach der Stressorapplikation dar. Der physiologische Cyanidspiegel beträgt bei aktiven Entgiftungsenzymen weit unter 1 nmol/g FG. Eine Hemmung HCN-sensitiver Enzyme ist ab etwa 5 nmol/g FG zu erwarten (Grossmann, 1996; Yip und Yang, 1988). Der für die Toxizität des Cyanids entscheidende erste Entgiftungsschritt erfolgt überwiegend durch die β -CAS in den Mitochondrien. Es ist also nicht auszuschließen, dass sich im Zuge der beschriebenen Synthesewege auch bei funktionellem Entgiftungsapparat zwischenzeitliche physiologisch wirksame CN⁻-Mengen im Zytosol anreichern können.

Über die toxische Wirkung hinaus werden dem Cyanid in den letzten Jahren weitere zelluläre Funktionen zugeschrieben. CN⁻ spielt eine Rolle in Wurzelentwicklung und der Beendigung der Dormanz bei der Keimung (García et al., 2010; Siegień und Bogatek, 2006). Zudem wird zunehmend eine Funktion als Signalmolekül, speziell im Zusammenhang mit Abwehrfunktionen diskutiert. Das Cyanidmolekül bringt ideale chemische Voraussetzungen für eine Signalvermittlung im Pflanzengewebe mit. Im Zytosol liegt es fast vollständig als HCN vor, ist membrangängig und diffundiert in wenigen Sekunden durch das ganze Blatt (Lieberei et al., 1989). Es entsteht in Pflanzen vornehmlich aus der 1-Aminocyclopropan-1-Carbonsäure (ACC) im Zuge der Ethylenbiosynthese. Ethylen ist in Wachstums- und Entwicklungsprozesse der Pflanzen involviert, seine Bildung erhöht sich jedoch

insbesondere auch durch die Einwirkung biotischer und abiotischer Stressoren (Machingura et al., 2016; Wang et al., 2002) Durch die Infektion mit *B.c.* kommt es beispielsweise ab etwa 24 h nach der Inokulation zu einem starken Konzentrationsanstieg auf über 1000 nI/g FG dieses volatilen Pflanzenhormons (Han et al., 2010). Die parallele Cyanidbildung stimuliert zudem die ACC-Synthase, wodurch es zu einer positiven *Feedback*-Regulation der Ethylensynthese kommt (zusammengefasst in Grossmann, 2003).

García et al. (2013) konnten zeigen, dass eine Akkumulation von HCN (bedingt durch den Verlust der β -CAS CYS-C1) in *Arabidopsis thaliana* insbesondere die Transkription abwehrrelevanter Gene beeinflusst. 54 % der durch Cyanid regulierten Gene reagieren in gleicher Weise auf Stressoren wie einige fungale Pathogene, *Pseudomonas syringae* oder verschiedene Elicitoren. Beispielsweise werden der ERF6 (ein *ethylene response transcription factor*), CYP81F2 (indolische GSL-Synthase) und der Transkriptionsfaktor *WRKY33* als Folge der Cyanidakkumulation induziert. Auch in anderen Pflanzen wurde eine Cyanid-abhängige Regulation der Pflanzenabwehr gezeigt. In Reis verringert eine Cyanidakkumulation in nicht-letal Menge die Anfälligkeit gegen das biotrophe Bakterium *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000, das virale Pflanzenpathogen *beet curly top virus* (BCTV) und gegen den hemibiotrophen Pilz *Magnaporthe oryzae*, der den sogenannten *rice blast* (Reisbrenner) verursacht (Seo et al., 2011). Im Gegensatz dazu wird bei einem Befall durch den necrotrophen Pilz *B.c.* die Empfindlichkeit der infizierten Pflanze durch eine Cyanidakkumulation weiter erhöht (García et al., 2013). Generell lösen biotrophe Pathogene eine salicylsäureabhängige Signalkaskade aus, während necrotrophe Pathogene eher Signalwege auslösen, die von den Pflanzenhormonen Ethylen und Jasmonsäure abhängig sind (Pieterse et al., 2009). Garcia et al. postulieren auf Basis ihrer Pathogenexperimente eine HCN-vermittelte Stimulation der Salicylsäure-abhängigen Immunreaktion, wahrscheinlich über die Anregung von ROS-Bildung (García et al., 2010; García et al., 2014; García et al., 2013). Diese neue Rolle des hochtoxischen Pseudohalogens etabliert sich zunehmend als genereller, speziesübergreifender Mechanismus, denn auch im Tierreich wird die Rolle HCNs als neuronaler Signalstoff seit einigen Jahren diskutiert (Cipollone und Visca, 2007; Gunasekar et al., 2000; Gunasekar et al., 2004).

Im Bezug auf das Netzwerk IAOx-abhängiger Metabolite ist insbesondere die cyanidvermittelte Aktivierung von *WRKY33*, einem positiven Regulator von *CYP71A13* und *CYP71B15*, interessant, da sich so eine positive *Feedback*-Regulation für die Camalexinsynthese ergibt. HCN könnte zudem zu einer Feinregulation der Metabolitströme im Synthesenetzwerk indolischer Abwehrstoffe beitragen. Die Freisetzung von Cyanid ist, abgesehen von der CYP71B15-Katalyse, eine Folge der Umsetzung von Indol-3-Cyanhydrin, IAN oder ICN, also freier Intermediate der CYP71A13 vermittelten Camalexinbiosynthese und der durch CYP71A12 eingeleiteten ICN-Synthese (Abbildung 5-2). Der Austritt dieser

Intermediate ins Zytosol (*Leakage*) geschieht an Synthesepassagen, die einen Übergang zwischen einem membranverankerten CYP und mindestens einem löslichen Protein erfordern. In der Camalexinbiosynthese folgt auf CYP71A13 eine GST und die GGP1, für die 4-OH-ICN-Synthese wird das Cyanhydrin-Intermediat von CYP71A12 an das lösliche FOX1 und anschließend wieder an das membrangebundene CYP82C2 transferiert. Eine gelungene Rekrutierung dieser zytosolischen Partner an die ER-gebundenen CYPs ist daher für den effektiven Metabolitfluss unter Vermeidung freiwerdender reaktiver Intermediate besonders kritisch. Eine Cyanid-Freisetzung aus diesen Intermediaten indiziert so indirekt einen solchen Metabolon-*Leakage*. HCN, das bei der ICOOH-Synthese aus I3M (über IAN) freigesetzt wird, zeigt zudem eine gesteigerte Myrosinase- und Specifierproteinaktivität an. Beide cyanidgenerierenden Momente könnten Symptome von Membranschädigungen sein: eine Disruption des ER könnte die Ausbildung des jeweiligen Metabolons negativ beeinflussen und die strenge Kompartimentierung von Myrosinasen würde durch Zellschädigung aufgehoben. Eine Verletzung des Gewebes könnte somit zur Generierung von Cyanid und möglicherweise auch der ICOOH-Derivate als potentielle Signalstoffe führen, die ebendiese Schädigung anzeigen.

Obwohl *Arabidopsis thaliana* nicht als Produzent cyanogener Glykoside bekannt ist, könnte Cyanid auf regulatorischem Weg dennoch ein Teil der Abwehrstrategie dieser Gattung sein. Die potentiellen regulatorischen Funktionen einiger IAOx-abgeleiteter Metabolite zeigen, dass der Begriff des bioaktiven Abwehrstoffes über den direkten Effekt auf Pathogene hinausgeht. Auch vermeintliche Abbaumetabolite dieser Stoffe oder relativ unbeachtete Seitenwege könnten großen regulatorischen Einfluss auf derartige Synthesenetzwerke haben. Diese Aspekte werden jedoch beispielsweise im Zuge von *metabolic engineering*-Projekten meist außer Acht gelassen.

CYP71A-Mehrfachmutanten und ihre Empfindlichkeit gegenüber *Botrytis cinerea*

Im Zuge der *in-vivo*-Charakterisierung von CYP71A12 und CYP71A13 wurde auch das Paralog CYP71A18 betrachtet. Aus der Bachelorarbeit von C. Götz (2012) geht hervor, dass CYP71A18 bei heterologer Expression mit CYP71A12 vergleichbare Enzymeigenschaften zeigt. Auch CYP71A18 setzt IAOx zu IAN und ICHO um, GS-IAN konnte nicht detektiert werden (bei Anwesenheit von GSH). Für CYP71A18 liegt daher eine zu CYP71A12 redundante Funktion nahe. In ersten Versuchen wurde die Einzelmutante (T-DNA-Insertionslinie) *cyp71a18* sowie durch Kreuzung generierten Mehrfach-*knock-out*-Linien mit *cyp71a12*, *cyp71a13* bzw. *cyp71a12a13* auf ihren Camalexin-Phänotyp analysiert. Bei keinem der gewählten Stressoren UV-Licht, AgNO₃ und *B.c.*-Inokulation konnte ein durch CYP71A18 vermittelter Einfluss auf die Camalexinbiosynthese in Blättern festgestellt werden (siehe Kapitel 4.3.). Die Expressionsanalyse zeigte für CYP71A18 jedoch generell nur eine

geringe Expression in Blättern und auch die Koexpression mit *CYP71B15*, welches ein essentieller Partner für die Camalexinbiosynthese wäre, war kaum gegeben. Eine schwache Koregulation besteht jedoch mit *CYP71A12*, insbesondere unter Stressbedingungen. Nicht geklärt ist zu diesem Zeitpunkt eine mögliche Redundanz von *CYP71A12* und *CYP71A18* bezüglich der rein *CYP71A12*-abhängigen Synthesewege, da die ICN-Derivate mit dem verwendeten Analyseverfahren nicht erfasst wurden. Aufgrund seines Expressionsmusters (siehe 4.1.) könnte *CYP71A18* zudem in anderen Geweben, beispielsweise in der Blüte, eine Rolle spielen. Die Blüte ist auch der Ort, an dem volatile Monoterpene exudiert werden. Gavira (2013) konnte zeigen, dass *CYP71A18* *in vitro* verschiedene Monoterpene oxidiert. Ob diese Funktion biologisch relevant ist, oder ob doch eine indolische Verbindung das endogene Substrat von *CYP71A18* ist, ist noch zu untersuchen.

Die *cyp71a12*- und die *cyp71a12a18*-Mutante wiesen im Vergleich zu Col-0 nach AgNO_3 -Induktion statistisch signifikant höhere Camalexingehalte auf (Abbildung 4-10). Diese Tendenz wurde für *cyp71a12* in anderen Experimenten ebenso beobachtet und auch in der Bachelorarbeit von Machata (2016) für die Schwermetalle Kupfer und Cadmium als alternative Camalexininduktoren bestätigt. Die relative Quantifizierung der IAOx-abhängigen Metabolite zeigte für die *cyp71a12*-Linie einen erhöhten Camalexinwert und statistisch signifikant erhöhte Mengen der Camalexinvorstufen GS-IAN und DHCA nach AgNO_3 -Induktion (Abbildung 4-9). In UV- und *B.c.*- Datensätzen ist dieser Trend nicht zu erkennen, jedoch nach Induktion durch Pathogene wie *Alternaria brassicicola* und *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. Für Letzteres wurde eine Erhöhung der Camalexinkonzentration relativ zum Wildtyp nicht nur für *cyp71a12* sondern ebenso für *fox1* beschrieben, beides Gene der ICN-Synthese (Rajniak et al., 2015). Trotz Ausfalls des *CYP71A12*-abhängigen Anteils der Camalexinbiosynthese kommt es so unter Umständen in der Mutante *cyp71a12* durch die Blockade anderer *CYP71A12*-abhängiger Synthesewege zu einer Umleitung der Metabolitströme und damit zu einer zum Teil deutlichen Erhöhung der Camalexinkonzentration (bis zu fast vierfacher Menge, Abbildung 4-10) in dieser Linie. Dies sollte bei der Deutung von Pathogenexperimenten mit *cyp71a12*-Mutanten beachtet werden. Um den Einfluss der einzelnen *CYP71As* auf die Pathogenanfälligkeit von *Arabidopsis thaliana* zu untersuchen, wurden die Einzel- und Mehrfachmutanten mit Sporensuspension des nekrotrophen Pilzes *B.c.* inokuliert und die Infektionsschwere quantifiziert. Die Kontrolllinie *cyp79b2b3*, in der alle IAOx-abgeleiteten Stoffe inklusive den indolischen GSL fehlen, zeigte die schwersten Symptome. Auch die Linien *cyp71a13*, *cyp71a12a13* und *pad3*, die nur vermindert Camalexin produzieren können, unterschieden sich in der Schwere ihrer Infektion signifikant vom Wildtyp Col-0. Grundsätzlich kann von einem direkten Zusammenhang zwischen der Stärke der Camalexindefizienz eines Genotyps und der Anfälligkeit gegenüber *B.c.* gesprochen werden. Ferrari et al. (2003) und Pedras et al.

(2011a) berichten übereinstimmend eine dosisabhängige, graduell verstärkte Wachstumsinhibition von *B.c.* in mit Camalexin-versetztem Agar. Eine vollständige Hemmung wird bei 40-50 µg/ml Camalexin erreicht, bei 10 µg/ml liegt die Wachstumsinhibition bei etwa 30 % im Vergleich mit dem camalexinfreien Kontrollmedium. Im infizierten Blatt des *Arabidopsis thaliana*-Wildtyps Col-0 werden nach 48-stündiger *B.c.*-Induktion etwa 10-35 µg/g FG Camalexin gefunden (Birkenbihl et al., 2012, diese Arbeit). Die Mengenangaben zwischen Agar und Blatt sind wohl näherungsweise vergleichbar, wobei anzunehmen ist, dass die Konzentration in den einzelnen, akut infizierten Zellen höher ist als die Analyse des gesamten Blattes durchschnittlich anzeigt. In Col-0 dürften daher ausreichende Camalexinmengen produziert werden, um eine vollständige Wachstumshemmung zu bewirken. Die Camalexinsynthese ist so auch *in vivo* ein essentieller Abwehrmechanismus von *Arabidopsis thaliana* gegenüber *B.c.*. Zwischen *cyp71a13* und den beinahe vollständig camalexindefizienten Linien *cyp71a12a13* und *pad3* konnten keine unterscheidbaren Empfindlichkeiten festgestellt werden. In *cyp71a13* wurden nach *B.c.*-Induktion noch etwa 5 % Camalexin der wildtypischen Menge CYP71A12-abhängig synthetisiert (Abbildung 4-11). Rogers et al. (1996) hat die Hemmwirkung des Camalexins auf verschiedene Pathogene, darunter das Bakterium *Xanthomonas campestris* oder den Pilz *Fusarium oxysporum*, allerdings nicht auf *B.c.*, beschrieben und minimale Hemmkonzentrationen (*minimum inhibitory concentration*, MIC) für diese definiert. Pilze und Gram-positive Bakterien scheinen dabei besonders Camalexin-empfindlich zu sein (MIC 20-50 µg/ml). Der allein von CYP71A12 generierte Camalexinanteil liegt offenbar unterhalb der MIC für Camalexin gegenüber dem Pilz *B.c.* und hat daher keinen signifikanten Einfluss auf die Abwehrfähigkeit der Pflanze.

Die beiden Einzelmutanten *cyp71a12* und *cyp71a18* unterschieden sich in ihrer Anfälligkeit gegenüber *B.c.* nicht signifikant vom Wildtyp (Abbildung 4-13). Substanzen, die durch CYP71A12 und möglicherweise auch durch CYP71A18 generiert werden, zeigen also keine messbare Wirkung auf *B.c.* oder ihr Verlust wird in den Mutanten durch eine zum Teil erhöhte Camalexinsynthese kompensiert. Es liegt keine additive Hemmwirkung durch die von den einzelnen CYP71A-abhängig synthetisierten Metaboliten vor. Auch Rajniak et al. (2015) konnten keine signifikanten Veränderungen der Empfindlichkeit von *cyp71a12* gegenüber den nekrotrophen Pilzen *Alternaria brassicicola* oder *B.c.* in Relation zu Col-0 zeigen, obwohl sie in einem *in-vitro*-Wachstums-Assay eine anti-pathogene Wirkung für die CYP71A12-abhängigen Metabolite ICN und 4-OH-ICN demonstrierten. *Cyp82c2*, in der sich ICN und seine Hydrolyseprodukte ICOOH und HCN anhäufen, zeigte eine ähnlich erhöhte Empfindlichkeit gegenüber *Alternaria brassicicola* und *B.c.* wie die camalexindefiziente *cyp71a13*. Überraschender Weise zeigte die *cyp82c2*-Mutante ebenfalls verringerte Camalexinkonzentrationen nach *Alternaria*-Induktion, so dass ihre hohe Anfälligkeit sich

auch durch Camalexindefizienz erklären lässt. Ob und wenn ja in welcher Form ICN, ICOOH oder HCN eine negative Regulation auf die Camalexinbiosynthese in der *cyp82c2*-Mutante bedingen, und somit eine mögliche weitere Quervernetzung der CYP71A-abhängigen Synthesewege bilden, bleibt zukünftig zu untersuchen. Grundsätzlich scheinen die anti-pathogenen Wirkungen der ICN-Derivate verglichen mit Camalexin *in planta* von untergeordneter Bedeutung, ihre Funktion im Netzwerk der IAOx-abhängigen Metabolite ist mit den ersten Ergebnissen aus Rajniak et al. (2015) mitnichten zufriedenstellend geklärt.

Auch die *in-vivo*-Funktion von CYP71A18 bleibt nach den beschriebenen Mutantenuntersuchungen unklar. Auch wenn CYP71A18 in Blättern keine Rolle bei der Camalexinbiosynthese spielt, ist eine Redundanz der Enzyme in anderen Geweben nicht auszuschließen. Ein Funktionstausch von CYP71A12 und CYP71A13 für die Camalexinbiosynthese in Wurzel- und Blattgewebe wurde bereits gezeigt (Millet et al., 2010). Die im Rahmen dieser Arbeit generierten Doppel- und Dreifachmutanten der drei CYP71A-Homologe sind wertvolle Werkzeuge für die Aufklärung ihrer Funktionen in der gesamten Pflanze.

5.2. Das CYP71B-Cluster in *Arabidopsis thaliana*

Auf Chromosom 3 des *Arabidopsis thaliana*-Genoms sind 18 CYP71Bs jeweils unbekannter Funktion in einem über 83 kb großen Gencluster lokalisiert. Das Cluster besitzt zwar in anderen *Brassicaceae*n direkte Homologe, jedoch beispielsweise nicht in der genetisch entfernten Kulturpflanze Reis (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>, Nelson et al., 2004a). Es ist daher eher unwahrscheinlich, dass dieser Abschnitt des *Arabidopsis thaliana*-Genoms vitale Funktionen der Pflanze erfüllt. Stattdessen könnte das CYP71B-Cluster eine Rolle im Metabolismus verschiedener Sekundärstoffe spielen.

Verglichen mit anderen Enzymfamilien ist die CYP71-Familie besonders durch Tandemduplikationen gekennzeichnet (Yu et al., 2017a). Auch innerhalb des CYP71B-Clusters gibt es insgesamt acht Tandemkopien, nur CYP71B23 und das Pseudogen CYP71B18 besitzen kein Duplikat innerhalb des Genclusters. Die Tandemgene des Clusters weisen zumeist jeweils ein ähnliches Expressionsmuster auf (siehe Kapitel 4.6.1). Mögliche funktionelle Redundanzen der Duplikate erschweren somit die Charakterisierung der einzelnen Gene. Daher wurden mit Hilfe der Techniken des *genome-editing* zunächst *Knock-out*-Mutanten des gesamten Genclusters generiert.

Die Generierung von CYP71B-Clustermutanten und ihre metabolische Analyse

Hierfür wurden zum einen mehrere TALEN-Paare für die flankierenden Zielgene CYP71B16 und CYP71B37 konstruiert. Nur eine TALEN-Paar-Kombination vermittelte Clusterdeletionen im *Arabidopsis*-Genom. Die maximale, über mehrere Generationen bestimmte, Deletionsrate für das 83 kb große Segment betrug ca. 1% (Tabelle 4-4). Es ist daher anzunehmen, dass

die Clusterexzision hier somatischer Natur war und nicht über die Keimbahn vererbt wurde. Analog der zur obig beschriebenen Generierung der *cyp71a12a13*-Doppelmutanten mittels TALEN-Technologie, scheint eine hohe bis sehr hohe somatische Mutationsrate Voraussetzung zu sein, um stabil mutierte Linien zu erhalten. Potentiell ist die Inaktivität der TALENs in der Keimbahn auf die Verwendung des 35S Promotors zurückzuführen, der in diesem Gewebe kaum aktiv ist (Wilkinson et al., 1997).

Zum anderen wurde das neuere CRISPR/Cas9-System herangezogen, das sich in den letzten Jahren als vielversprechendes Werkzeug der Genommanipulation etabliert hat (zusammengefasst in Puchta, 2016). Um möglicherweise bereits in der T1-Generation homozygote Exzisionsmutanten zu erhalten, wurde als Promotor für die Cas-Nuklease der Eizellen-spezifische Promotor *pEC1.2* gewählt (Wang et al., 2015). Für vier Primärtransformanten, die jeweils die CRISPR-Konstrukte für die Zielsequenzen A und D trugen, konnte die Deletion des Genclusters gezeigt werden. In der zweiten Generation blieb die Mutation in zwei Linien, AD 20 und AD 23 erhalten. Es wurden zum Teil Mutationsraten von über 50 % festgestellt, das wildtypische Allel war jedoch noch in allen Pflanzen präsent. In der dritten Generation konnten Pflanzen mit Mutationsraten von etwa 100 % detektiert werden, in deren Genom zudem die Clustergene durch PCR nicht mehr nachweisbar waren. Mit diesen homozygot clusterdeletierten Linien wurde eine erste Metabolomanalyse mit adulten, nicht-gestressten Pflanzen durchgeführt und mit dem Wildtyp Col-0 verglichen. Da alle Mutanten weiterhin die transgene CRISPR/Cas9-DNA in ihrem Genom trugen, wurden als weitere Kontrolle ebenso transgene Pflanzen, die aber keine Clusterexzision zeigten, mitgeführt.

In den untersuchten Rosettenblättern wurden keine Metabolite bestimmt, die statistisch signifikant von den Genen des *CYP71B*-Clusters abhängig waren. Stattdessen beeinflusste das vorhandene Transgen in den Mutanten- und Kontrolllinien das Metabolitspektrum im Vergleich zum Wildtyp. Dies könnte zum einen durch den Insertionsort des CRISPR-Konstruktes oder zum anderen durch das Produkt des überexprimierten Resistenzgens, der Hygromycin B-Phosphotransferase *hph*, bedingt sein. Es ist bekannt, dass solche Markergene wie beispielsweise auch das *bar*-Gen, das die PPT-Resistenz vermittelt, pleiotropische Effekte auslösen können. Für *hph* wurde dies bisher nicht beschrieben (Ashraf und Brian, 2009; Brian et al., 2009). Durch das Transgen vermittelte transkriptionelle Veränderungen überlagern dabei möglicherweise *CYP71B*-Cluster-abhängige Effekte.

Durch Rückkreuzung der Linie AD 20 mit Col-0 wurden die CRISPR/Cas9-konstruktfreien Clustermutanten AD 20-7-3 x Col-0 -4-89 und AD 20-7-3 x Col-0 -4-93 erhalten. Eine weitere unabhängige Linie kann durch weitere Propagation der bezüglich des Transgens noch heterozygoten Kreuzung der Linie AD 23 und Col-0 generiert werden kann. Diese beiden Mutantenlinien sind zukünftig auf den ausschließlich durch die Clusterdeletion bedingten

Phänotyp zu untersuchen.

Die Funktion des *CYP71B*-Clusters

Die erste metabolische Analyse der Clustermutanten ergab keine Erkenntnisse über die Funktion des *CYP71B*-Clusters. Es wurden adulte, ungestresste *Arabidopsis* beprobt. Biosynthesewege, die die *CYP71Bs* beinhalten, könnten jedoch in adulten Rosettenblättern möglicherweise nicht relevant sein. Stattdessen könnten diese Gene und ihre möglichen Syntheseprodukte in einem anderen Pflanzengewebe oder auch in einem anderen Entwicklungsstadium von Bedeutung sein. Auch der Einfluss biotischer oder abiotischer Stressoren auf die *CYP71B*-Cluster-Mutanten wurde noch nicht untersucht.

Obwohl die Gene des Clusters unter Stressapplikation teilweise koexprimiert werden (Tabelle 4-3), bildet das Cluster wahrscheinlich keinen kompletten Biosyntheseweg ab. Synthesecenter, wie zum Beispiel das *Bx*-Cluster in Mais, enthalten in der Regel mindestens drei verschiedene Gentyphen (zusammengefasst in Nützmann et al., 2016). Die einzigen Gene des Clusters, die keine CYPs sind und für die ausreichend Transkriptionsdaten vorliegen, sind die beiden in Wurzeln und im trockenem Samen exprimierten *AT3G26240* und *AT3G26250* (Tabelle 4-3). Aufgrund ihrer Cys/His-reichen C1-Domänen sind diese Proteine aber funktionell eher in der Signaltransduktion als in Biosyntheseprozessen zu verorten (Bhaskar et al., 2015).

Zu den einzelnen CYPs des Clusters ist, über globale Transkriptionsstudien hinaus, nur wenig bekannt. *CYP71B16* wird mit der Phenylpropanoidsynthese in Verbindung gebracht, primär basierend auf der Koexpression mit einigen Synthesegenen (Ehltting et al., 2007). Eine Überexpression von *CYP78A9*, das eine Rolle in der Fruchtbildung zu spielen scheint, bedingt hingegen die Herunterregulation von *CYP71B16* (Sotelo-Silveira et al., 2013).

CYP71B23 ist durch verschiedene Stressoren induzierbar und schwach mit der Camalexinbiosynthese koreguliert. Innerhalb des Clusters weist *CYP71B23* zudem die höchste Sequenzähnlichkeit zu *CYP71B15* auf (Abbildung 1-8). In Vorversuchen wurde das Indol IAN als *in-vitro*-Substrat von *CYP71B23* und auch *CYP71B20* identifiziert. *CYP71B20* katalysiert seine Umsetzung zu ICHO und GS-IAN (unter Anwesenheit von GSH), *CYP71B23* katalysiert wahrscheinlich ausschließlich die Bildung von ICHO (Fellermeier, 2011). Experimente mit *Knock-out*-Mutanten zeigten jedoch keinen quantitativen Einfluss dieser Gene auf die Camalexinbiosynthese (Dr. S. Mucha, unveröffentlicht).

Das Transkript von *CYP71B26* ist in der ganzen Pflanze nachweisbar und durch verschiedene Reize induzierbar, unter anderem auch durch ABA und Auxin (Schuler et al., 2006). Auch *CYP71B19* und *CYP71B20* werden durch diese Pflanzenhormone vermehrt transkribiert. Zudem ist die lokale Expression von *CYP71B26* im Wurzelgewebe so spezifisch, dass es als Marker gen für den Wurzelcortex verwendet wird (Fröschel, 2016).

Eine STRING-Analyse (*Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins*, <https://string-db.org/>) verknüpft CYP71B26 direkt mit CYP81F2. Zudem ist CYP71B26 unter den Membranproteinen, die in *cyp79b2b3* verglichen mit dem Wildtyp signifikant abgereichert sind. Mostafa et al. (2017) postulieren daher eine Verbindung von CYP71B26 zum Stoffwechsel der indolischen GSL.

Um solche Spekulationen zu bestätigen oder zu revidieren, ist die transgenfreie Clustermutante ein wertvolles Werkzeug. Zukünftige Experimente sollten zusätzlich andere Entwicklungsstufen und Pflanzenorgane, beispielsweise Wurzeln, Keimlinge und Blüten sowie den Einfluss biotischer und abiotischer Stressoren wie osmotischen Stress, Pflanzenhormone oder Pathogene berücksichtigen. Durch sukzessives Einbringen der Clustergene in die Mutante kann schließlich die Funktion der einzelnen Gene charakterisiert werden.

Der Einsatz der CRISPR/Cas9-Technologie in Pflanzen

Obwohl die bisherigen Ergebnisse keine direkten Erkenntnisse über die Funktion des *CYP71B*-Clusters geben können, so hat sich doch die eingesetzte Technologie als geeignet für solch großen DNA-Exzisionen erwiesen. Während im tierischen Organismus (*Caenorhabditis elegans*, Zebrafisch, Maus, Kaninchen, humane Zelllinien) schon einige Beispiele für große Deletionen bis zu 1 Mb mittels gezieltem *genome editing* publiziert sind (zusammengefasst in Song et al., 2017; Xiao et al., 2013), sind stabile multiple Gendeletionen in Pflanzen bislang selten gelungen (Ordon et al., 2017; Zhou et al., 2014). Diese Arbeit kann also als *proof of concept* betrachtet werden, wobei die generierten Cluster-Mutanten zukünftig noch großes Potential bezüglich der funktionellen Untersuchung der deletierten Gene besitzen. Ebenso für Pflanzen bislang vorwiegend nur theoretisch beschrieben ist die Einführung großer chromosomaler Inversionen mittels CRISPR/Cas9. Ein solcher umgekehrter Einbau des 83 kb großen *CYP71B*-Clusters wurde für zwei Pflanzen bestätigt (siehe 4.6.3). Die Erzeugung von Inversionen großer DNA-Abschnitte ist die Voraussetzung zur Generierung von *Balancer*-Chromosomen, die seit vielen Jahren als wertvolles genetisches Werkzeug in der Drosophila-Forschung Anwendung finden. *Balancer*-Chromosomen sind das Produkt einer Reihe gestaffelter Inversionen, durch die die Rekombination unterdrückt werden kann. Die Technik kann insbesondere für den Erhalt rezessiv letaler Mutationen genutzt werden. Frühere Versuche, pflanzliche *Balancer*-Linien zu generieren, scheiterten eben an der gezielten Einführung chromosomaler Inversionen (Torres Ruiz et al., 1998). Neben neuen Möglichkeiten für die pflanzen genetische Grundlagenforschung bieten durch CRISPR/Cas9 gezielt eingeführte Inversionen auch züchterische Chancen. So kann die Reversion bereits vorhandener Inversionen im Genom eines Kreuzungspartners den Gen- und Merkmalstransfer bei der Kreuzung von

Wildpflanzen mit ihren Kultivaren durch erleichterte Rekombination verbessern (Wolters et al., 2015).

Die TALEN- und vor allem die CRISPR/Cas9-Technologie wird derzeit vermehrt auch speziell für die Anwendung in Pflanzen adaptiert und verbessert, insbesondere die bereits kritisch erwähnte Wahl der Cas9-Nuklease, der Nukleasepromotoren und auch das Targetdesign bedürfen einer Effektivitätssteigerung (zusammengefasst in Liu et al., 2017). Schon jetzt ist das gezielte *genome editing* gerade auch für die Erforschung pflanzlicher CYPs ein Meilenstein. Alleine in *Arabidopsis thaliana* liegen 128 der 257 CYPs als Tandemduplikate vor, verteilt auf 40 Gencluster, in *Brassica rapa* sind es 137 von 354 CYP-Genen. Auch aufgrund häufiger Redundanz ist ein Großteil dieser Gene in Ihrer Funktion bislang noch nicht beschrieben (Yu et al., 2017a). Diese Gengruppierungen können nun leichter funktionell differenziert und so leichter charakterisiert werden, wobei die detaillierte Kenntnis über die Funktion eines CYPs entscheidend für erfolgreiches CYP-basiertes *metabolic engineering* ist.

Anhang

981	<u>CAGGACATATTTGTAGCAGGGATTGGTGGAGTCGCTGGCATAACACTATGGGGAATGACCGAGCTGATCAGAAACCAAGAGTGATGAAGAAAGTCAAG</u>	1080
910	~~~~~	910
884	~~~~~	884
707	CAGGACATATTTGTAGCAGGGATTGGTGGAGTCGCTGGCATAACACTATGGGGAATGACCGAGCTGATCAGAAACCAAGAGTGATGAAGAAAGTCAAG	608
946	~~~~~	946
933	~~~~~	933
708	CAGGACATATTTGTAGCAGGGATTGGTGGAGTCGCTGGCATAACACTATGGGGAATGACCGAGCTGATCAGAAACCAAGAGTGATGAAGAAAGTCAAG	609
* * * * *		
1081	<u>ACGAGATTCGGACAACACTTGGGGACAAGAAGGAGAGAATCAAAGAAGAAGATCTAAACCACTTCACTACTTTAAGCTCGTGGTCAAGGAGACATTAAG</u>	1180
910	~~~~~	910
884	~~~~~	884
607	ACGAGATTCGGACAACACTTGGGGACAAGAAGGAGAGAATCAAAGAAGAAGATCTAAACCACTTCACTACTTTAAGCTCGTGGTCAAGGAGACATTAAG	508
946	~~~~~	946
933	~~~~~	933
608	ACGAGATTCGGACAACACTTGGGGACAAGAAGGAGAGAATCAAAGAAGAAGATCTAAACCACTTCACTACTTTAAGCTCGTGGTCAAGGAGACATTAAG	509
* * * * *		
1181	<u>GTTACATCCAACAACACTCCACTCTTGCTCCCAAGACAGACAATGTCTCATATCAAGATTCAAGGCTACGATGTTCTCGGAAAAACAGATCTTAGTCAAC</u>	1259
910	~~~~~	910
884	~~~~~	884
507	GTTACATCCAACAACACTCCACTCTTGCTCCCAAGACAGACAATGTCTCATATCAAGATTCAAGGCTACGATGTTCTCGGAAAAACAGATCTTAGTCAAC	408
946	~~~~~	946
933	~~~~~	933
508	GTTACATCCAACAACACTCCACTCTTGCTCCCAAGACAGACAATGTCTCATATCAAGATTCAAGGCTACGATGTTCTCGGAAAAACAGATCTTAGTCAAC	409
* * * * *		
1260	<u>GTTTATGCGATGGTTCGTGATCCAAAACCTGGGAAAACGCAGATGAGTTAACCCCTGACAGGTTTCTCGACAGTCCGTTGATTTAAAGGAAAAAAT</u>	1359
910	~~~~~	910
884	~~~~~	884
407	GTTTATGCGATGGTTCGTGATCCAAAACCTGGGAAAACGCAGATGAGTTAACCCCTGACAGGTTTCTCGACAGTCCGTTGATTTAAAGGAAAAAAT	308
946	~~~~~	946
933	~~~~~	933
408	GTTTATGCGATGGTTCGTGATCCAAAACCTGGGAAAACGCAGATGAGTTAACCCCTGACAGGTTTCTCGACAGTCCGTTGATTTAAAGGAAAAAAT	309
* * * * *		
1360	<u>ACGAGTTTATACCGTTTGGATCTGGTAGGAGAATATGTCAGGGATGACAATGGGTACCATACTTGTGAGATGGCATTGTTGAATTTGCTTTACTTCTT</u>	1459
910	~~~~~	910
884	~~~~~	884
307	ACGAGTTTATACCGTTTGGATCTGGTAGGAGAATATGTCAGGGATGACAATGGGTACCATACTTGTGAGATGGCATTGTTGAATTTGCTTTACTTCTT	208
946	~~~~~	946
933	~~~~~	933
308	ACGAGTTTATACCGTTTGGATCTGGTAGGAGAATATGTCAGGGATGACAATGGGTACCATACTTGTGAGATGGCATTGTTGAATTTGCTTTACTTCTT	209
* * * * *		
1460	<u>CGATTGGGGATTGGCGAAGCAGGAGGAAGCCAAAGAGATCATCAATGGGGAAGAAAAATTTCTAGCCTTCTTCAAGTCTTCCACCCTGA</u>	1571
910	~~~~~	910
884	~~~~~	884
207	CGATTGGGGATTGGCGAAGCAGGAGGAAGCCAAAGAGATCATCAATGGGGAAGAAAAATTTCTAGCCTTCTTCAAGTCTTCCACCCTGA	119
946	~~~~~	946
933	~~~~~	933
208	CGATTGGGGATTGGCGAAGCAGGAGGAAGCCAAAGAGATCATCAATGGGGAAGAAAAATTTCTAGCCTTCTTCAAGTCTTCCACCCTGA	120
* * * * *		
1	~~~~~ <u>ATGGAATGACATTGATGGTTCTCTGTGCTTAACGACCCCTCTTAACCCCT</u>	50
1	TCCGATGCTCCGCGCCGCATGGCGCCGCGGAATTCGATTGGATTAAATAATGGAAATGACATTGATGGTTTCTCTGTGCTTAACGACCCCTCTTAACCCCT	100
1111	~~~~~	1111
997	~~~~~	997
1	~~~~~CCACCCACACCCCCCTTCTCACATGAGCATATTCAGAAATGGAATGACATTGATGGTTTCTCTGTGCTTAACGACCCCTCTTA-CCCT	89
18	~~~~~TTGATGGTTTCTCTGTGCTTAACGACCCCTCTTAACCCCT	55
155	~~~~~	155
* * * * *		
51	<u>TCTCTTACTTAAAAAATTCCTCAAACGAACCGCCAAAAAAGTGAACCTACCACCATCTCCATGGCGAATTCAGTGATGGAAACCTCCACCAGCTCAGC</u>	150
101	TCTCTTACTTAAAAAATTCCTCAAACGAACCGCCAAAAAAGTGAACCTACCACCATCTCCATGGCGAATTCAGTGATGGAAACCTCCACCAGCTCAGC	200
1111	~~~~~	1111
997	~~~~~	997
90	TCTCTTACTTAAAAA-TTCCCAAACGAACCGCCAAAAAAGTGAACCTACCACCATCTCCATGGCGAATTCAGTGATGGAAACCTCCACCAGCTCAGC	188
56	TCTCTTACTTAAAAAATTCCTCAAACGAACCGCCAAAAAAGTGAACCTACCACCATCTCCATGGCGAATTCAGTGATGGAAACCTCCACCAGCTCAGC	155
155	~~~~~	155
* * * * *		
151	<u>CTCCACCCCTCACCGCTCCCTCCACTCCCTCAGCCTCAGGTATGGCCCACTGATGCTGCTTCATTTTGGCCGTGTCCCCATACCTCGTAGTCTCTCCAGCG</u>	250
201	CTCCACCCCTCACCGCTCCCTCCACTCCCTCAGCCTCAGGTATGGCCCACTGATGCTGCTTCATTTTGGCCGTGTCCCCATACCTCGTAGTCTCTCCAGCG	300
1111	~~~~~	1111
997	~~~~~	997
190	CTCCACCCCTCACCGCTCCCTCCACTCCCTCAGCCTCAGGTATGGCCCACTGATGCTGCTTCATTTTGGCCGTGTCCCCATACCTCGTAGTCTCTCCAGCG	288
156	CTCCACCCCTCACCGCTCCCTCCACTCCCTCAGCCTCAGGTATGGCCCACTGATGCTGCTTCATTTTGGCCGTGTCCCCATACCTCGTAGTCTCTCCAGCG	255
155	~~~~~	155
* * * * *		
251	<u>AAGCAGCTCATGAGATATTGAAAACACAGCATCTTAAGTTTGCCAAACCGCCGAAATCAAAGCCGTTTATGGACTTATGAATGGTGGGCGTATGTTGGT</u>	350
301	AAGCAGCTCATGAGATATTGAAAACACAGCATCTTAAGTTTGCCAAACCGCCGAAATCAAAGCCGTTTATGGACTTATGAATGGTGGGCGTATGTTGGT	400
1111	~~~~~	1111
997	~~~~~	997
289	AAGCAGCTCATGAGATATTGAAAACACAGCATCTTAAGTTTGCCAAACCGCCGAAATCAAAGCCGTTTATGGACTTATGAATGGTGGGCGTATGTTGGT	388
256	AAGCAGCTCATGAGATATTGAAAACACAGCATCTTAAGTTTGCCAAACCGCCGAAATCAAAGCCGTTTATGGACTTATGAATGGTGGGCGTATGTTGGT	355

Abbildung 6-1 Sequenzierung von *CYP71B15* in *cyp71a12 cyp71a13- 1* und *cyp71a12 cyp71a13- 2*. Zeile 1 (fett): Referenzsequenz von *CYP71B15* (Col-0, 1571 bp, Quelle: TAIR 10, <https://www.arabidopsis.org/>). Zeile 2-4: Sequenzierung überlappender PCR-Amplifikate von *CYP71B15* in *cyp71a12 cyp71a13- 2*. Zeile 5-7 (kursiv): Sequenzierung überlappender PCR-Amplifikate von *CYP71B15* in *cyp71a12 cyp71a13- 1*.

Anhang

155	~~~~~	155
351	<u>TTTTGGTCCCTATGGAGAAATATGGAGACAGATGAAGGTATTTCTACTAAGCCCTCTTTCATATATATGTATATTTATCTTTTTTATAACTTGCACCC</u>	450
401	TTTTGGTCCCTATGGAGAAATATGGAGACAGATGAAGGTATTTCTACTAAGCCCTCTTTCATATATATGTATATTTATCTTTTTTATAACTTGCACCC	500
1111	~~~~~	1111
997	~~~~~	997
389	TTTTGGTCCCTATGGAGAAATATGGAGACAGATGAAGGTATTTCTACTAAGCCCTCTTTCATATATATGTATATTTATCTTTTTTATAACTTGCACCC	488
356	TTTTGGTCCCTATGGAGAAATATGGAGACAGATGAAGGTATTTCTACTAAGCCCTCTTTCATATATATGTATATTTATCTTTTTTATAACTTGCACCC	455
155	~~~~~	155
451	<u>ACACATATATATGTACCACAAATTCATATATAGTATATATATCCCTTAAATCAACTGATAATGATTTTTTGTGTGGCTTTGGATGAAGAGTGTCTGCA</u>	550
501	ACACATATATATGTACCACAAATTCATATATAGTATATATATATCCCTTAAATCAACTGATAATGATTTTTTGTGTGGCTTTGGATGAAGAGTGTCTGCA	600
1111	~~~~~	1111
997	~~~~~	997
489	ACACATATATATGTACCACAAATTCATATATAGTATATATATATCCCTTAAATCAACTGATAATGATTTTTTGTGTGGCTTTGGATGAAGAGTGTCTGCA	588
456	ACACATATATATGTACCACAAATTCATATATAGTATATATATATCCCTTAAATCAACTGATAATGATTTTTTGTGTGGCTTTGGATGAAGAGTGTCTGCA	555
155	~~~~~	155
551	<u>TTCTCAATCTACTCACCACAAAATGGTGCATCCTTTGAGAAGGTAAGAGAGGAAGGTAATGCAATGATGGAGAAGCTAGAGAAAAGCAAGTTGTTCT</u>	650
601	TTCTCAATCTACTCACCACAAAATGGTGCATCCTTTGAGAAGGTAAGAGAGGAAGGTAATGCAATGATGGAGAAGCTAGAGAAAAGCAAGTTGTTCT	700
1111	~~~~~	1111
997	~~~~~	997
589	TTCTCAATCTACTCACCACAAAATGGTGCATCCTTTGAGAAGGTAAGAGAGGAAGGTAATGCAATGATGGAGAAGCTAGAGAAAAGCAAGTTGTTCT	688
556	TTCTCAATCTACTCACCACAAAATGGTGCATCCTTTGAGAAGGTAAGAGAGGAAGGTAATGCAATGATGGAGAAGCTAGAGAAAAGCAAGTTGTTCT	655
155	~~~~~	155
651	<u>TTCTTCAGCAGAAAATCTGAGTGAACCTTTGTTACTCTAACAAGTGATGTCACGAGTAGAGTTTCCTTGGGAAAAAATATTGGGAGGACGAAACCGCA</u>	750
701	TTCTTCAGCAGAAAATCTGAGTGAACCTTTGTTACTCTAACAAGTGATGTCACGAGTAGAGTTTCCTTGGGAAAAAATATTGGGAGGACGAAACCGCA	800
1111	~~~~~	1111
997	~~~~~	997
689	TTCTTCAGCAGAAAATCTGAGTGAACCTTTGTTACTCTAACAAGTGATGTCACGAGTAGAGTTTCCTTGGGAAAAAATATTGGGAGGACGAAACCGCA	788
656	TTCTTCAGCAGAAAATCTGAGTGAACCTTTGTTACTCTAACAAGTGATGTCACGAGTAGAGTTTCCTTGGGAAAAAATATTGGGAGGACGAAACCGCA	755
155	~~~~~	155
751	<u>GGGGTCTCAAGAAGCGAGTGAGGCAGATCATGGAGCTTTTACCGGAGTCCCAATCGGGACTATGTCGCCGGCTTTGGCATGGATAGACAGGATCAACG</u>	850
801	GGGGTCTCAAGAAGCGAGTGAGGCAGATCATGGAGCTTTTACCGGAGTCCCAATCGGGACTATGTCGCCGGCTTTGGCATGGATAGACAGGATCAACG	900
1111	-----GCTTTTACCGGAGTCCCAATCGGGACTATGTCGCCGGCTTTGGCATGGATAGACAGGATCAACG	1046
997	~~~~~	997
789	GGGGTCTCAAGAAGCGAGTGAGGCAGATCATGGAGCTTTTACCGGAGTCCCAATCGGGACTATGTCGCCGGCTTTGGCATGGATAGACAGGATCAACG	888
756	GGGGTCTCAAGAAGCGAGTGAGGCAGATCATGGAGCTTTTACCGGAGTCCCAATCGGGACTATGTCGCCGGCTTTGGCATGGATAGACAGGATCAACG	854
155	~~~~~	155
851	<u>GTTCATCTTAAGATTGTGGAAGTGAGTCGAGCGTATAGTGATCTTATGGAAAAGTGGTCAAGAACATTTAGAGCGGGCGAACATAAAGCGGATTT</u>	950
901	GTTCATCTTAAGATTGTGGAAGTGAGTCGAGCGTATAGTGATCTTATGGAAAAGTGGTCAAGAACATTTAGAGCGGGCGAACATAAAGCGGATTT	1000
1045	GTTCATCTTAAGATTGTGGAAGTGAGTCGAGCGTATAGTGATCTTATGGAAAAGTGGTCAAGAACATTTAGAGCGGGCGAACATAAAGCGGATTT	946
997	~~~~~	997
889	GTTCATCTTAAGATTGTGGAAGTGAGTCGAGCGTATAGTGATCTTATGGAAAAGTGGTCAAGAACATTTAGAGCGGGCGAACATAAAGCGGATTT	932
855	GTTCATCTTAAGATTGTGGAAGTGAGTCGAGCGTATAGTGATCTTATGGAAAAGTGGTCAAGAACATTTAGAGCGGGCGAACATAAAGCGGATTT	926
155	~~~~~	155
951	<u>CGTCAATATACTGTTATCAATCGAAAAAGAAAAGATAATGGATTCAAAGTCAAAGAACGACATAAAAATTTATGATCTTGGTAGGATCATTATAAGCT</u>	1050
1001	CGTCAATATACTGTTATCAATCGAAAAAGAAAAGATAATGGATTCAAAGTCAAAGAACGACATAAAAATTTATGATCTTGGTAGGATCATTATAAGCT	1100
945	CGTCAATATACTGTTATCAATCGAAAAAGAAAAGATAATGGATTCAAAGTCAAAGAACGACATAAAAATTTATGATCTTGGTAGGATCATTATAAGCT	846
997	~~~~~	997
932	~~~~~	932
926	~~~~~	926
155	~~~~~	155
1051	<u>AATTCATTGATAACTAACCTAGAGTTTTCAAGTTTGAGTAATGACATGCAACTTTTCATGACTTGATATCAGGATATGTTTATAGGAGGATTTCAACAA</u>	1150
1101	AATTCATTGATAACTAACCTAAATTTTCAAGTTTGAGTAATGACATGCAACTTTTCATGACTTGATATCAGGATATGTTTATAGGAGGATTTCAACAA	1142
845	AATTCATTGATAACTAACCTAGAGTTTTCAAGTTTGAGTAATGACATGCAACTTTTCATGACTTGATATCAGGATATGTTTATAGGAGGATTTCAACAA	746
997	~~~~~	997
932	~~~~~	932
926	~~~~~	926
155	~~~~~	155
1151	<u>GTTCACCTCTACTAGAAATGGATAATGACGGAGCTGATCAGAAATCCAGAGTGTATGAAGAACTCCAAAACGAGATTCGGTCAACCATTAGGCCACATGG</u>	1250
1142	GTTCACCTCTACTAGAAATGGATAATGACGGAGCTGATCAGAAATCCAGAGTGTATGAAGAACTCCAAAACGAGATTCGGTCAACCATTAGGCCACATGG	1142
745	GTTCACCTCTACTAGAAATGGATAATGACGGAGCTGATCAGAAATCCAGAGTGTATGAAGAACTCCAAAACGAGATTCGGTCAACCATTAGGCCACATGG	646
997	~~~~~	997
932	~~~~~	932
926	~~~~~	926
155	~~~~~	155
1251	<u>TTCATACATAAAAGAAAAGTGAAGTATGAGATCTTGAAGCAGTCAATTAAGAGGTTTCGGGTGCATCCTCCTCTCCACTAATACTTCCC</u>	1350
1142	TTCATACATAAAAGAAAAGTGAAGTATGAGATCTTGAAGCAGTCAATTAAGAGGTTTCGGGTGCATCCTCCTCTCCACTAATACTTCCC	1142
645	TTCATACATAAAAGAAAAGTGAAGTATGAGATCTTGAAGCAGTCAATTAAGAGGTTTCGGGTGCATCCTCCTCTCCACTAATACTTCCC	546
997	~~~~~	997
932	~~~~~	932
926	~~~~~	926
155	~~~~~TAAAGAGGTTTCGGGTGCATC-T-CTC-TGCACTAATACT--CC	195
1351	<u>AGACTATTAACCTGAAGATGTTAAAGTAAAGGGATATGACATAGCCGACGGGACCGAGGATTTCAATTATAACAATTAATAATGACCATCATCTTATTC</u>	1450
1142	AGACTATTAACCTGAAGATGTTAAAGTAAAGGGATATGACATAGCCGACGGGACCGAGGATTTCAATTATAACAATTAATAATGACCATCATCTTATTC	1142
545	AGACTATTAACCTGAAGATGTTAAAGTAAAGGGATATGACATAGCCGACGGGACCGAGGATTTCAATTATAACAATTAATAATGACCATCATCTTATTC	446
997	~~~~~ACTGAAGATGTT-AAAGTAAAGGGATATGACATAG-CGCA-GGACCGAGGATTTCAATTATAACAATTAATAATGACCATCATCTTATTC	911
932	~~~~~	932
926	~~~~~	926
196	AGACTA-TAACTGAAGATGTTAAAGTAAAGGGATATGACATAGCCGACGGGACCGAGGATTTCAATTATAACAATTAATAATGACCATCATCTTATTC	294
1451	<u>CAATATATATAACAACGATTTGGCTAAACTTGTATGAAACATTTCCAGGTGTTAATCAAGCTTGGTCAATCCTAGACACCCCGGATATGGGGAC</u>	1550

Anhang

1142	~~~~~	1142
445	CAATATATATAACAACGATTGGCTAAACTTGTAAATGGAAACATTTCCAGGTGTTAATCAATGCTTGGTCAATCCATAGAGACCCCGGATATGGGGAC	346
910	CAATATATATAACAACGATTGGCTAAACTTGTAAATGGAAACATTTCCAGGTGTTAATCAATGCTTGGTCAATCCATAGAGACCCCGGATATGGGGAC	811
932	~~~~~	932
926	~~~~~	926
295	CAATATATATAACAACGATTGGCTAAACTTGTAAATGGAAACATTTCCAGGTGTTAATCAATGCTTGGTCAATCCATAGAGACCCCGGATATGGGGAC	394
* * * * *		
1551	<u>CGGATGCAGAAGAAATCAAACCAGAGAGACACTTAGATTCAACTTTGGATTATCATGGACAAGATTTGAAATACATCCCATTCGGATCAGGTAGAAGAAT</u>	1650
1142	~~~~~	1142
345	CGGATGCAGAAGAAATCAAACCAGAGAGACACTTAGATTCAACTTTGGATTATCATGGACAAGATTTGAAATACATCCCATTCGGATCAGGTAGAAGAAT	246
810	CGGATGCAGAAGAAATCAAACCAGAGAGACACTTAGATTCAACTTTGGATTATCATGGACAAGATTTGAAATACATCCCATTCGGATCAGGTAGAAGAAT	711
932	~~~~~	932
926	~~~~~	926
395	CGGATGCAGAAGAAATCAAACCAGAGAGACACTTAGATTCAACTTTGGATTATCATGGACAAGATTTGAAATACATCCCATTCGGATCAGGTAGAAGAAT	494
* * * * *		
1651	<u>TTGTCCCGGGATAAATCTTGCTATGGGTTTGGTAGAGGTTACATTTGGCCAACCTTTAGGCCGATTGACTGGAGTGTGATCCTGGACCAATGGGGAT</u>	1750
1142	~~~~~	1142
245	TTGTCCCGGGATAAATCTTGCTATGGGTTTGGTAGAGGTTACATTTGGCCAACCTTTAGGCCGATTGACTGGAGTGTGATCCTGGACCAATGGGGAT	146
710	TTGTCCCGGGATAAATCTTGCTATGGGTTTGGTAGAGGTTACATTTGGCCAACCTTTAGGCCGATTGACTGGAGTGTGATCCTGGACCAATGGGGAT	611
932	~~~~~	932
926	~~~~~	926
495	TTGTCCCGGGATAAATCTTGCTATGGGTTTGGTAGAGGTTACATTTGGCCAACCTTTAGGCCGATTGACTGGAGTGTGATCCTGGACCAATGGGGAT	594
* * * * *		
1751	<u>CAACCTGATCTAGCTGAAGATTTGGTCTCGATGTTTGTGCGAAGAACCCTCTCATTGCATTTCATCTCCGTTGCATGAAATGTTTCTTTTACCCTAT</u>	1850
1142	~~~~~	1142
145	CAACCTGATCTAGCTGAAGATTTGGTCTCGATGTTTGTGCGAAGAACCCTCTCATTGCATTTCATCTCCGTTGCATGAAATGTTTCTTTTACCCTAT	64
610	CAACCTGATCTAGCTGAAGATTTGGTCTCGATGTTTGTGCGAAGAACCCTCTCATTGCATTTCATCTCCGTTGCATGAAATGTTTCTTTTACCCTAT	511
932	~~~~~	932
926	~~~~~	926
595	CAACCTGATCTAGCTGAAGATTTGGTCTCGATGTTTGTGCGAAGAACCCTCTCATTGCATTTCATCTCCGTTGCATGAAATGTTTCTTTTACCCTAT	694
* * * * *		
1851	<u>TATGAAATTCACATAAAGAAGAGTTTTTTTTTCTTCTTCTTGTGTGTCGCAAGGAATAAGAAGAGTTGTAAGAAGAAATAATCCTTCAATTAATAAAC</u>	1950
1142	~~~~~	1142
64	~~~~~	64
510	TATGAAATTCACATAAAGAAGAGTTTTTTTTTCTTCTTCTTGTGTGTCGCAAGGAATAAGAAGAGTTGTAAGAAGAAATAATCCTTCAATTAATAAAC	411
932	~~~~~	932
926	~~~~~	926
695	TATGAAATTCACATAAAGAAGAGTTTTTTTTTCTTCTTCTTGTGTGTCGCAAGGAATAAGAAGAGTTGTAAGAAGAAATAATCCTTCAATTAATAAAC	794
* * * * *		
1951	<u>ATGGTTTTTGTGACATGCTTTTTTTCTGCTCTTTATCACCATAAGTGTAACCTTACCTGTTTCGTGGCATTCAAGTAACAAGAAAGTTGATTTCCCT</u>	2050
1142	~~~~~	1142
64	~~~~~	64
410	ATGGTTTTTGTGACATGCTTTTTTTCTGCTCTTTATCACCATAAGTGTAACCTTACCTGTTTCGTGGCATTCAAGTAACAAGAAAGTTGATTTCCCT	311
932	~~~~~	932
926	~~~~~	926
795	ATGGTTTTTGTGACATGCTTTTTTTCTGCTCTTTATCACCATAAGTGTAACCTTACCTGTTTCGTGGCATTCAAGTAACAAGAAAGTTGATTTCCCT	894
* * * * *		
2051	<u>CTGAAAATCCCTAAAGAATGACACGTTTCCAATACATGACCAATGGCTTGAGGAGGAAGAAACAAGGACTCAAATCTCTTTTACGAAATCAAAATC</u>	2150
1142	~~~~~	1142
64	~~~~~	64
310	CTGAAAATCCCTAAAGAATGACACGTTTCCAATACATGACCAATGGCTTGAGGAGGAAGAAACAAGGACTCAAATCTCTTTTACGAAATCAAAATC	211
932	~~~~~	932
926	~~~~~	926
895	CTGAAAATCCCTAAAGAATGACACGTTTCCAATACATGACCAATGGCTTGAGGAGGAAGAAACAAGGACTCAAATCTCTTTTACGAAATCAAAATC	994
* * * * *		
2151	<u>TGTATCTACATGAGTTGATTATCATCTTATTGTAACCTAGCCAAATAGGAGATCCTCGCAAAACACACACTTGACAATGGTAATCCATAGATCCCAAAA</u>	2250
1142	~~~~~	1142
64	~~~~~	64
210	TGTATCTACATGAGTTGATTATCATCTTATTGTAACCTAGCCAAATAGGAGATCCTCGCAAAACACACACTTGACAATGGTAATCCATAGATCCCAAAA	111
932	~~~~~	932
926	~~~~~	926
995	TGTATCTACATGAGTTGATTATCATCTTATTGTAACCTAGCCAAATAGGAGATCCTCGCAAAACACACACTTGACAATGGTAATCCATAGATCCCAAAA	1094
* * * * *		
2251	<u>AGGTTTTTCATCAACAACCTTCCAAGAATCAGATTGAATGTATAGACTTCAAGATTTGA</u>	2309
1142	~~~~~	1142
64	~~~~~	64
110	AGGTTTTTCATCAACAACCTTCCAAGAATCAGATTGAATGTATAGACTTCAAGATTTGA	51
932	~~~~~	932
926	~~~~~	926
1095	AGGTTTTTCATCAACAACCTTCCAAGAATCAGATTGAATGTATAGACTTCAAGATTTGA	1153

Abbildung 6-2 Sequenzierung von *CYP71A18* in *cyp71a12 cyp71a13- 1* und *cyp71a12 cyp71a13- 2*. Zeile 1 (fett): Referenzsequenz von *CYP71B15* (Col-0, 2309 bp, Quelle: TAIR 10 <https://www.arabidopsis.org/>). Zeile 2-4: Sequenzierung überlappender PCR-Amplifikate von *CYP71A18* in *cyp71a12 cyp71a13- 2*. Zeile 5-7: Sequenzierung überlappender PCR-Amplifikate von *CYP71A18* in *cyp71a12 cyp71a13- 1*.

Tabelle 6-1 Relative Quantifizierung indolischer Verbindungen in den Blättern AgNO₃-behandelter Wildtyp und Mutantpflanzen. Die Tabelle entspricht dem Supplemental Table 1b aus Müller et al. (2015):

Relative quantification of indolic compounds in rosette leaves of wild-type (Col-0) and mutant plants after AgNO₃ treatment. Rosette leaves were detached, sprayed with 5 mM AgNO₃ and incubated for 24 h. Individual rosette leaves were extracted and the resulting extracts analyzed by UHPLC/ESI-QTOFMS. Indolic metabolites were quantified by integration of extracted ion chromatograms, see Supplemental Table 1a. For each metabolite, the resulting peak areas were log₂-transformed and centred to the median of the log₂-transformed peak areas of Col-0. Significance analysis of differences between Col-0 and mutant was performed by *t*-test (two-tailed, unequal variances, * *P* ≤ 0.05, ** *P* ≤ 0.01, *** *P* ≤ 0.001). Significant differences are marked in bold. Data from a single experiment with n=9 to 20 (biological replicates).

compound	genotype / log ₂ [response / median response Col-0] (median ± sd)				
	Col-0 (n=9)	<i>cyp79B2</i> <i>cyp79B3</i> (n=10)	<i>cyp71A12</i> (n=9)	<i>cyp71A13</i> (n=10)	<i>cyp71A12</i> <i>cyp71A13</i> (n=20)
Trp	0.00 ± 0.45	2.35 ± 0.40***	0.42 ± 0.48	-0.11 ± 0.48	0.03 ± 0.47
GS-IAN	0.00 ± 1.16	n.d.	2.13 ± 0.94***	-3.02 ± 0.87***	n.d.
DHCA	0.00 ± 0.86	n.d.	0.65 ± 0.72*	-3.62 ± 0.84***	-6.54 ± 0.60***
Camalexin	0.00 ± 1.13	n.d.	0.24 ± 0.76	-3.13 ± 1.36***	-5.81 ± 0.62***
HC MalonylHex	0.00 ± 0.92	n.d.	0.41 ± 0.91	-2.22 ± 0.52***	n.d.
ICOOH	0.00 ± 0.44	n.d.	-1.81 ± 0.63***	-0.21 ± 0.84	-0.80 ± 0.51**
ICOOMe	0.00 ± 0.64	n.d.	-3.08 ± 0.70***	0.55 ± 1.31	-3.13 ± 0.77***
ICOOGlc	0.00 ± 0.40	-7.92 ± 0.51***	-0.59 ± 0.51**	0.47 ± 0.73	-0.68 ± 0.45***
6-HO-ICOOGlc	0.00 ± 0.90	n.d.	-0.64 ± 0.81	0.69 ± 0.94	-0.29 ± 0.77
6-GlcO-ICOOH	0.00 ± 0.51	-7.45 ± 0.57***	-0.59 ± 0.43**	-0.04 ± 0.66	-0.35 ± 0.37
6-GlcO-ICOOGlc	0.00 ± 0.78	n.d.	0.14 ± 0.62	0.24 ± 0.80	0.30 ± 0.64
ICHO	0.00 ± 0.25	-5.74 ± 0.24***	-0.30 ± 0.45*	-0.01 ± 0.54	0.26 ± 0.31
5-GlcO-ICHO	0.00 ± 0.35	-4.14 ± 0.41***	0.18 ± 0.26	-0.14 ± 0.40	0.17 ± 0.24
4-GlcO-ICHO	0.00 ± 0.36	n.d.	0.04 ± 0.37	-0.05 ± 0.44	0.20 ± 0.33
Dihydroasc Hexoside	0.00 ± 0.49	n.d.	0.16 ± 0.34	-0.80 ± 0.57**	0.96 ± 0.48***
U15	0.00 ± 0.93	n.d.	0.21 ± 0.97	0.04 ± 0.90	0.70 ± 0.63
U16	0.00 ± 0.50	n.d.	-0.48 ± 0.48*	-0.02 ± 0.74	-0.44 ± 0.40
U17	0.00 ± 0.67	n.d.	0.57 ± 0.71	0.06 ± 0.78	0.78 ± 0.60*
U19	0.00 ± 0.36	n.d.	0.06 ± 0.52	-0.39 ± 0.65	0.10 ± 0.46

Tabelle 6-2 Relative Quantifizierung indolischer Verbindungen in den Blättern mit Wasser behandelter Wildtyp und Mutantpflanzen (*mock*). Die Tabelle entspricht dem Supplemental Table 1c aus Müller et al. (2015):

Relative quantification of indolic compounds in rosette leaves of wild-type (Col-0) and mutant plants after mock treatment. Rosette leaves were detached, sprayed with water and incubated for 24 h. Individual rosette leaves were extracted and the resulting extracts analyzed by UHPLC/ESI-QTOFMS. Indolic metabolites were quantified by integration of extracted ion chromatograms, see Supplemental Table 1a. For each metabolite, the resulting peak areas were log₂-transformed and centred to the median of the log₂-transformed peak areas of Col-0. Significance analysis of differences between Col-0 and mutant was performed by *t*-test (two-tailed, unequal variances, * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$). Significant differences are marked in bold. Data from a single experiment with n=9 to 20 (biological replicates).

compound	genotype / log ₂ [response / median response Col-0] (median ± sd)				
	Col-0 (n=9)	<i>cyp79B2</i> <i>cyp79B3</i> (n=10)	<i>cyp71A12</i> (n=10)	<i>cyp71A13</i> (n=10)	<i>cyp71A12</i> <i>cyp71A13</i> (n=20)
Trp	0.00 ± 0.30	1.34 ± 0.74***	0.15 ± 0.52	-0.03 ± 0.49	-0.10 ± 0.61
ICOOGlc	0.00 ± 0.52	-6.31 ± 0.48***	-0.28 ± 0.49	0.22 ± 0.75	-0.28 ± 0.36*
6-HO-ICOOGlc	0.00 ± 0.55	n.d.	-0.45 ± 0.35*	0.28 ± 0.99	-0.43 ± 0.39*
6-GlcO-ICOOH	0.00 ± 0.45	-6.98 ± 0.42***	-0.44 ± 0.38*	-0.09 ± 0.63	-0.31 ± 0.39
6-GlcO-ICOOGlc	0.00 ± 0.61	n.d.	-0.11 ± 0.46	0.12 ± 0.72	-0.12 ± 0.37
ICHO	0.00 ± 0.43	-3.75 ± 0.38***	-0.03 ± 0.35	-0.53 ± 0.33**	0.06 ± 0.44
5-GlcO-ICHO	0.00 ± 0.26	-4.11 ± 0.24***	0.11 ± 0.40	-0.06 ± 0.31	0.18 ± 0.27
4-GlcO-ICHO	0.00 ± 0.33	n.d.	0.03 ± 0.47	0.06 ± 0.42	0.25 ± 0.40
Dihydroasc Hexoside	0.00 ± 0.44	n.d.	0.05 ± 0.27	-0.34 ± 0.27*	0.05 ± 0.32
U15	0.00 ± 0.43	n.d.	1.17 ± 1.07	-0.49 ± 1.24	0.44 ± 0.73
U16	0.00 ± 0.47	n.d.	-0.58 ± 0.30*	-0.19 ± 0.72	-0.34 ± 0.37
U17	0.00 ± 0.47	n.d.	0.06 ± 0.49	0.05 ± 0.48	0.21 ± 0.47
U19	0.00 ± 0.50	n.d.	0.27 ± 0.58	0.15 ± 0.36	0.00 ± 0.46

Tabelle 6-3 Relative Quantifizierung indolischer Verbindungen in den Blättern UV-Licht-behandelter Wildtyp und Mutantpflanzen. Die Tabelle entspricht dem Supplemental Table 1d aus Müller et al. (2015):

Relative quantification of indolic compounds in detached rosette leaves of wild-type (Col-0) and mutant plants after UV treatment. Rosette leaves were detached, irradiated for 2 h with UV light ($\lambda=254$ nm) and incubated for 22 h. Individual rosette leaves were extracted and the resulting extracts analyzed by UHPLC/ESI-QTOFMS. Indolic metabolites were quantified by integration of extracted ion chromatograms, see Supplemental Table 1a. For each metabolite, the resulting peak areas were \log_2 -transformed and centred to the median of the \log_2 -transformed peak areas of Col-0. Significance analysis of differences between Col-0 and mutant was performed by *t*-test (two-tailed, unequal variances, * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$). Significant differences are marked in bold. Data from a single experiment with $n=10$ to 11 (biological replicates).

compound	genotype / \log_2 [response / median response Col-0] (median \pm sd)				
	Col-0 (n=10)	<i>cyp79B2</i> <i>cyp79B3</i> (n=11)	<i>cyp71A12</i> (n=11)	<i>cyp71A13</i> (n=10)	<i>cyp71A12</i> <i>cyp71A13</i> (n=11)
Trp	0.00 \pm 0.38	1.50 \pm 0.50***	0.16 \pm 0.22	-0.05 \pm 0.24	0.00 \pm 0.42
GS-IAN	0.00 \pm 1.18	n.d.	-0.31 \pm 0.69	n.d.	n.d.
DHCA	0.00 \pm 0.90	n.d.	-0.02 \pm 0.56	-4.65 \pm 0.39***	-6.70 \pm 0.41***
Camalexin	0.00 \pm 0.48	n.d.	0.08 \pm 0.37	-6.09 \pm 1.00***	-11.92 \pm 1.37***
HC MalonylHex	0.00 \pm 1.03	n.d.	-0.78 \pm 0.82	-4.53 \pm 1.22***	n.d.
ICOOH	0.00 \pm 0.68	n.d.	-1.07 \pm 0.79**	0.29 \pm 0.49	-0.47 \pm 0.68
ICOOMe	0.00 \pm 0.98	n.d.	-2.27 \pm 0.75***	-0.50 \pm 0.87	-4.52 \pm 0.49***
ICOOGlc	0.00 \pm 0.38	-8.80 \pm 0.71***	-0.21 \pm 0.40	-0.33 \pm 0.44*	-0.65 \pm 0.69**
6-HO-ICOOGlc	0.00 \pm 0.93	n.d.	-0.31 \pm 0.80	-0.36 \pm 0.90	-1.02 \pm 1.23*
6-GlcO-ICOOH	0.00 \pm 0.42	n.d.	-0.36 \pm 0.30	-0.08 \pm 0.36	-0.68 \pm 0.58**
6-GlcO-ICOOGlc	0.00 \pm 0.38	n.d.	-0.31 \pm 0.44	-0.16 \pm 0.55	-0.79 \pm 0.63*
ICHO	0.00 \pm 0.34	-3.13 \pm 0.42***	-0.24 \pm 0.31	0.49 \pm 0.48*	0.20 \pm 0.66
5-GlcO-ICHO	0.00 \pm 0.26	-4.24 \pm 0.54***	0.15 \pm 0.36	-0.17 \pm 0.38	-0.03 \pm 0.34
4-GlcO-ICHO	0.00 \pm 0.32	n.d.	-0.31 \pm 0.66	0.03 \pm 0.68	0.01 \pm 0.31
Dihydroasc Hexoside	0.00 \pm 0.23	n.d.	0.50 \pm 0.61	-0.17 \pm 0.36	0.24 \pm 1.00
U15	0.00 \pm 0.98	n.d.	-0.37 \pm 0.52	-0.32 \pm 0.90	-0.36 \pm 0.78
U16	0.00 \pm 0.30	n.d.	-0.26 \pm 0.36	-0.07 \pm 0.36	-0.56 \pm 1.14*
U17	0.00 \pm 0.73	n.d.	-0.38 \pm 0.65	0.02 \pm 0.73	-0.83 \pm 0.97
U19	0.00 \pm 0.71	n.d.	-0.49 \pm 0.41	-0.40 \pm 0.59	-0.33 \pm 0.60

Tabelle 6-4 Relative Quantifizierung indolischer Verbindungen in den Blättern unbehandelter Wildtyp und Mutantpflanzen (Kontrolle). Die Tabelle entspricht dem Supplemental Table 1e aus Müller et al. (2015):

Relative quantification of indolic compounds in untreated (control) rosette leaves of wild-type (Col-0) and mutant plants. Individual untreated rosette leaves were extracted and the resulting extracts analyzed by UHPLC/ESI-QTOFMS. Metabolites were quantified by integration of extracted ion chromatograms, see Supplemental Table 1a. For each metabolite, the resulting peak areas were log₂-transformed and centred to the median of the log₂-transformed peak areas of Col-0. Significance analysis of differences between Col-0 and mutant was performed by *t*-test (two-tailed, unequal variances, * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$). Significant differences are marked in bold. Data from a single experiment with $n=10$ to 11 (biological replicates).

compound	genotype / log ₂ [response / median response Col-0] (median ± sd)				
	Col-0 (n=10)	<i>cyp79B2</i> <i>cyp79B3</i> (n=11)	<i>cyp71A12</i> (n=10)	<i>cyp71A13</i> (n=11)	<i>cyp71A12</i> <i>cyp71A13</i> (n=11)
Trp	0.00 ± 0.29	2.26 ± 0.82***	-0.01 ± 0.24	-0.01 ± 0.24	0.21 ± 0.23
ICOOGlc	0.00 ± 0.72	n.d.	-1.12 ± 0.81	-0.47 ± 0.52	-0.48 ± 0.69
6-HO-ICOOGlc	0.00 ± 0.81	n.d.	-0.52 ± 0.39	-0.14 ± 0.32	-0.38 ± 0.49
6-GlcO-ICOOH	0.00 ± 0.63	n.d.	-0.61 ± 0.40	0.00 ± 0.39	-0.35 ± 0.35
6-GlcO-ICOOGlc	0.00 ± 0.86	n.d.	-0.40 ± 0.57	0.00 ± 0.55	-0.25 ± 0.45
ICHO	0.00 ± 0.47	-3.13 ± 0.31***	0.58 ± 0.43*	0.19 ± 0.34	0.14 ± 0.29
5-GlcO-ICHO	0.00 ± 0.48	-4.06 ± 0.25***	-0.28 ± 0.58	-0.04 ± 0.33	0.10 ± 0.41
4-GlcO-ICHO	0.00 ± 0.64	n.d.	-0.40 ± 0.58	-0.02 ± 0.40	0.03 ± 0.60
Dihydroasc Hexoside	0.00 ± 0.69	n.d.	-0.08 ± 0.59	-0.28 ± 0.40	-0.29 ± 0.39
U15	0.00 ± 0.86	n.d.	-0.13 ± 0.75	0.66 ± 0.49	0.43 ± 0.69
U16	0.00 ± 0.57	n.d.	-0.48 ± 0.47	0.05 ± 0.35	-0.25 ± 0.33
U17	0.00 ± 0.93	n.d.	-0.21 ± 0.76	0.57 ± 0.44	0.44 ± 0.63
U19	0.00 ± 0.58	n.d.	-0.64 ± 0.51	-0.14 ± 0.39	-0.26 ± 0.58

Tabelle 6-5 Analytische Daten weiterer indolischer Metabolite und 4-Pyridoxinsäure

Verbindung	Elementzusammensetzung	Retentionszeit [min]	Quantifizier ion		Referenz CID-Massenspektrum
			Typ	m/z	
I3M GSL	C ₁₆ H ₂₀ N ₂ O ₉ S ₂	2,33	[M-H] ⁻	447,054	Rochfort et al. (2008)
4-MeO-I3M GSL	C ₁₇ H ₂₂ N ₂ O ₁₀ S ₂	3,02	[M-H] ⁻	477,064	Rochfort et al. (2008)
1-MeO-I3M GSL	C ₁₇ H ₂₂ N ₂ O ₁₀ S ₂	3,77	[M-H] ⁻	477,064	Rochfort et al. (2008)
<i>N</i> -(Indole-3-carbonyl)- aspartic acid (ICO- Asp)	C ₁₃ H ₁₂ N ₂ O ₅	3,49	[M-H] ⁻	275,067	Böttcher et al. (2014)
4-HO-ICHO	C ₉ H ₇ NO ₂	5,09	[M-H] ⁻	160,040	Authentischer Standard
4-Pyridoxinsäure	C ₈ H ₉ NO ₄	1,08	[M-H] ⁻	182,046	Authentischer Standard

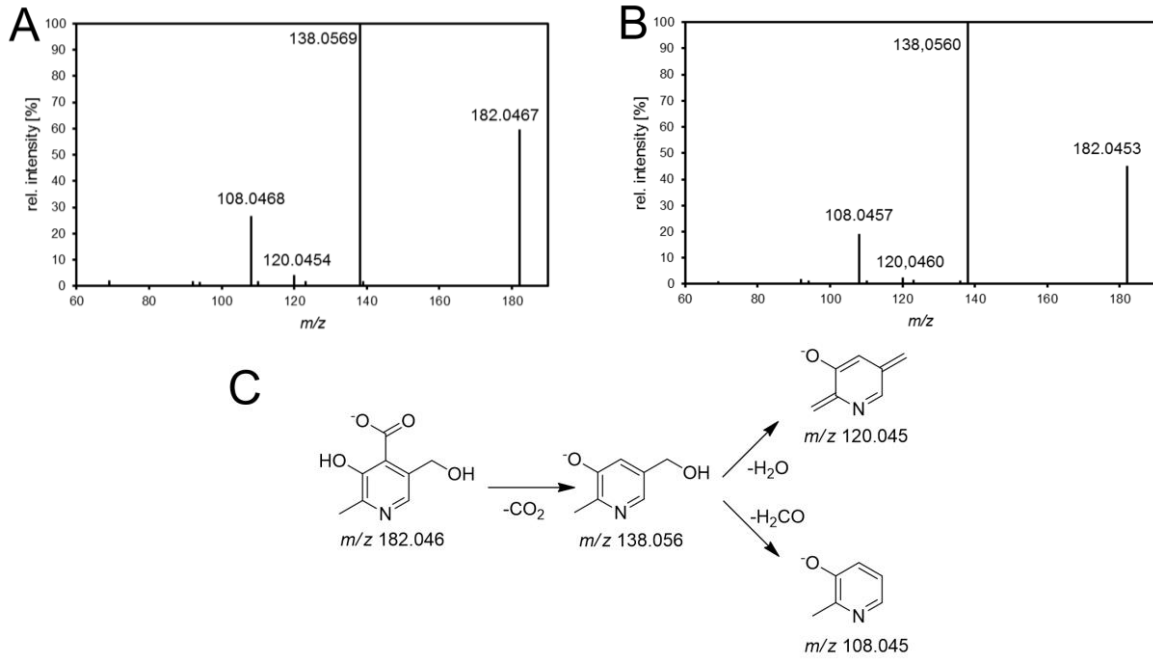


Abbildung 6-3 CID (*collision-induced dissociation*)-Massenspektrenvergleich des $[M-H]^-$ -Ions mit m/z 182,04 (RT 1,08 min) zwischen A: einem Extrakt aus Col-0, unbehandelt (Lösungsmittel 50% MeOH) und B: einer 4-Pyridoxinsäure-Standardlösung (1 μ M in 50% MeOH; Sigma-Aldrich). Kollisionsenergie: 10 eV. C: Mögliche Fragmentierung des $[M-H]^-$ -Ions von 4-Pyridoxinsäure durch CID. Der Basispeak bei $m/z=$ 138,06 entspricht $[M-H-CO_2]^-$. Abbildungen erstellt von Dr. C. Böttcher.

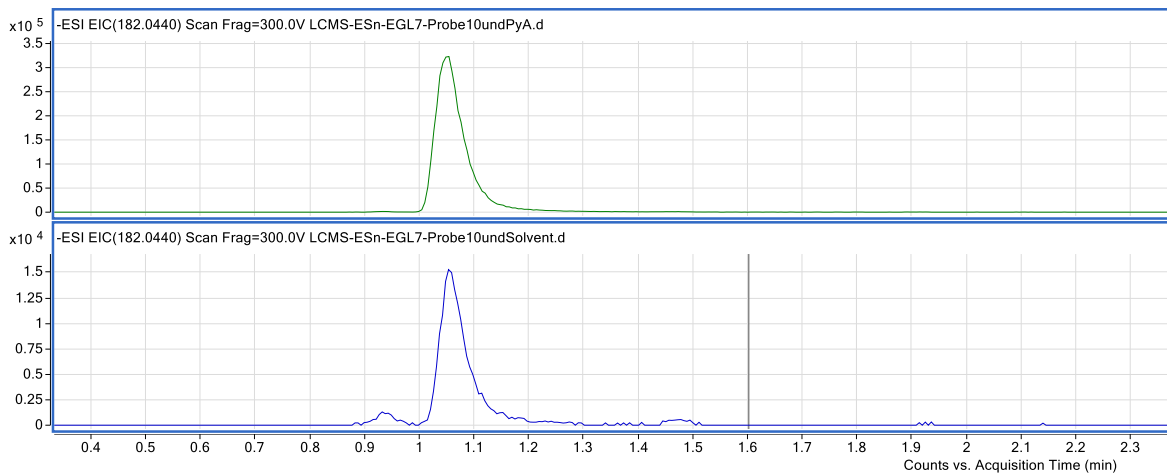


Abbildung 6-4 Dotierungsexperiment eines Extraktes aus Col-0 (unbehandelt) mit 4-Pyridoxinsäure. Oben: 50 μ l Extrakt aus Col-0 (unbehandelt) + 50 μ l 1 μ M 4-Pyridoxinsäure, unten: 50 μ l Extrakt aus Col-0 (unbehandelt) + 50 μ l 50% MeOH. Elution jeweils bei 1,08 min.

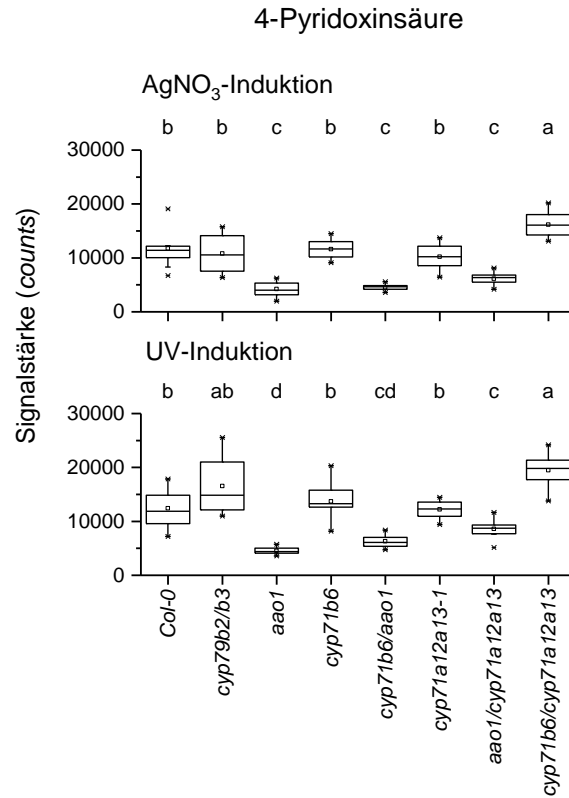


Abbildung 6-5 Relative Quantifizierung von 4-Pyridoxinsäure in Wildtyp und Mutantenlinien nach Stressorbehandlung (oben: Silbernitrat- 24 h, unten: UV-Behandlung 2 h + 22 h). log₂-transformierte Peakflächen, Col-0-medianzentriert. Gleiche Buchstaben bedeuten keine Unterschiede beim Vergleich der Mittelwerte (Tukey HSD-Test, $p \leq 0,05$). Datensatz: Kontrolle (n= 11-12.)

Anhang

Tabelle 6-6 Relative Mediane der Peakflächen (bezogen auf Col-0) von 20 IAOx-abhängigen Metaboliten und Trp in Wildtyp und Mutantenlinien nach Stressorbehandlung und ohne Induktion (Silbernitrat- 24 h, UV-Behandlung 2 h + 22 h). Leerfelder: Metabolit wurde in dieser Linie nicht detektiert.

	Induktion	Metaboliten										
		6-GlcO-ICOOGlc	6-GlcO-ICOOH	5-GlcO-ICHO	6-HO-ICOOGlc	U15	4-GlcO-ICHO	U17	ICOOGlc	ICOOH	ICHO	4-HO-ICHO
Col-0	UV	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
<i>cyp71a12a13</i>		0,51	0,60	0,71	0,37	0,63	0,61	0,59	0,56	0,59	2,13	0,60
<i>aaol</i>		0,51	0,70	2,79	0,54	0,82	0,73	0,59	0,96	0,96	1,61	0,76
<i>cyp71b6</i>		0,58	0,63	0,84	0,36	0,29	0,66	0,28	0,56	0,57	1,50	0,38
<i>aaolxcyp71a12a13</i>		0,28	0,53	1,95	0,38	0,40	0,48	0,32	0,57	0,71	3,04	0,95
<i>cyp71b6xcyp71a12a13</i>		0,51	0,56	0,77	0,30	0,30	0,45	0,33	0,44	0,55	2,81	0,53
<i>cyp71b6xaaol</i>		0,66	0,75	3,15	0,52	1,43	1,10	1,19	0,82	1,78	1,82	1,48
<i>cyp71b6xaaolxcyp71a12a13</i>		0,46	0,46	2,36	0,20	0,61	0,56	0,55	0,32	0,47	2,98	0,97
Col-0	Silber	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
<i>cyp71a12a13</i>		0,76	0,64	0,50	0,38	1,15	0,80	1,77	0,40	0,35	1,41	0,60
<i>aaol</i>		0,49	0,74	1,54	0,48	0,96	0,67	0,97	0,64	0,60	1,33	0,73
<i>cyp71b6</i>		0,64	0,75	0,64	0,57	0,60	0,54	0,78	0,58	0,46	1,15	0,60
<i>aaolxcyp71a12a13</i>		0,28	0,45	1,17	0,28	0,68	0,51	0,66	0,34	0,50	1,63	0,86
<i>cyp71b6xcyp71a12a13</i>		0,71	0,54	0,43	0,31	0,47	0,42	0,74	0,28	0,19	0,83	0,39
<i>cyp71b6xaaol</i>		0,45	0,64	1,84	0,39	1,74	0,85	1,73	0,62	0,65	1,24	0,89
<i>cyp71b6xaaolxcyp71a12a13</i>		0,46	0,39	1,50	0,19	0,59	0,53	0,64	0,23	0,20	0,97	0,56
Col-0	Kontrolle	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
<i>cyp71a12a13</i>		0,42	0,64	0,65	0,61	0,67	0,38	0,39	0,41		1,05	0,75
<i>aaol</i>		0,40	0,78	2,60	0,62	1,06	0,99	0,58	0,64		1,33	0,89
<i>cyp71b6</i>		0,32	0,68	0,74	0,70	0,66	0,60	0,34	0,55		1,34	0,76
<i>aaolxcyp71a12a13</i>		0,13	0,33	1,63	0,20	0,29	0,44	0,17	0,25		1,96	0,30
<i>cyp71b6xcyp71a12a13</i>		0,28	0,50	0,98	0,33	0,30	0,52	0,17	0,45		0,95	0,44
<i>cyp71b6xaaol</i>		0,34	0,59	2,63	0,36	0,73	0,92	0,37	0,57		1,52	0,73
<i>cyp71b6xaaolxcyp71a12a13</i>		0,42	0,54	2,76	0,33	0,65	0,66	0,38	0,35		1,31	0,45

	Induktion	Metaboliten										
		Trp	3M GSL	U19	DihydroAsc	4MeO-3M	ICOOAsp	1MeO-3M GSL	IAN-GSH	Camalexin	ICOOme	
Col-0	UV	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
<i>cyp71a12a13</i>		1,42	2,86	0,67	1,53	1,30	1,05	0,99		0,00	0,17	
<i>aaol</i>		1,46	1,13	1,12	1,34	1,06	0,59	1,09	1,11	0,99	0,88	
<i>cyp71b6</i>		1,31	1,73	0,50	1,30	1,01	8,79	1,17	0,69	0,98	0,42	
<i>aaolxcyp71a12a13</i>		1,65	2,43	0,63	1,94	1,35	1,06	1,36		0,00	0,16	
<i>cyp71b6xcyp71a12a13</i>		1,94	3,51	0,38	2,23	1,85	1,10	1,44		0,09	0,19	
<i>cyp71b6xaaol</i>		1,39	0,85	1,55	1,63	1,17	10,88	1,09	1,71	1,15	1,31	
<i>cyp71b6xaaolxcyp71a12a13</i>		1,59	3,48	0,76	1,97	2,06	0,82	1,25		0,08	0,17	
Col-0	Silber	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00		1,00	1,00	
<i>cyp71a12a13</i>		0,60	1,48	0,54	1,21	1,33		1,88			0,35	
<i>aaol</i>		0,77	1,43	1,16	0,78	1,24		2,00		0,56	0,85	
<i>cyp71b6</i>		0,89	1,37	0,61	0,99	1,21		1,95		0,57	0,60	
<i>aaolxcyp71a12a13</i>		1,04	1,41	0,77	1,02	1,31		0,95			0,34	
<i>cyp71b6xcyp71a12a13</i>		0,84	2,25	0,48	1,84	1,89		3,94			0,19	
<i>cyp71b6xaaol</i>		0,97	1,22	1,42	1,19	1,55		0,95		0,77	0,46	
<i>cyp71b6xaaolxcyp71a12a13</i>		0,83	2,11	0,64	1,92	2,12		3,68			0,16	
Col-0	Kontrolle	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00				
<i>cyp71a12a13</i>		0,73	0,93	0,64	0,57	0,91		1,16				
<i>aaol</i>		0,86	0,80	1,62	0,54	0,83		0,92				
<i>cyp71b6</i>		0,78	0,73	1,03	0,62	0,81		0,78				
<i>aaolxcyp71a12a13</i>		0,57	0,78	1,16	0,31	0,59		0,73				
<i>cyp71b6xcyp71a12a13</i>		1,16	0,85	0,85	0,76	0,79		0,76				
<i>cyp71b6xaaol</i>		0,80	0,74	1,41	0,63	0,81		0,63				
<i>cyp71b6xaaolxcyp71a12a13</i>		1,09	0,98	0,90	0,94	0,94		0,80				

UV-Induktion

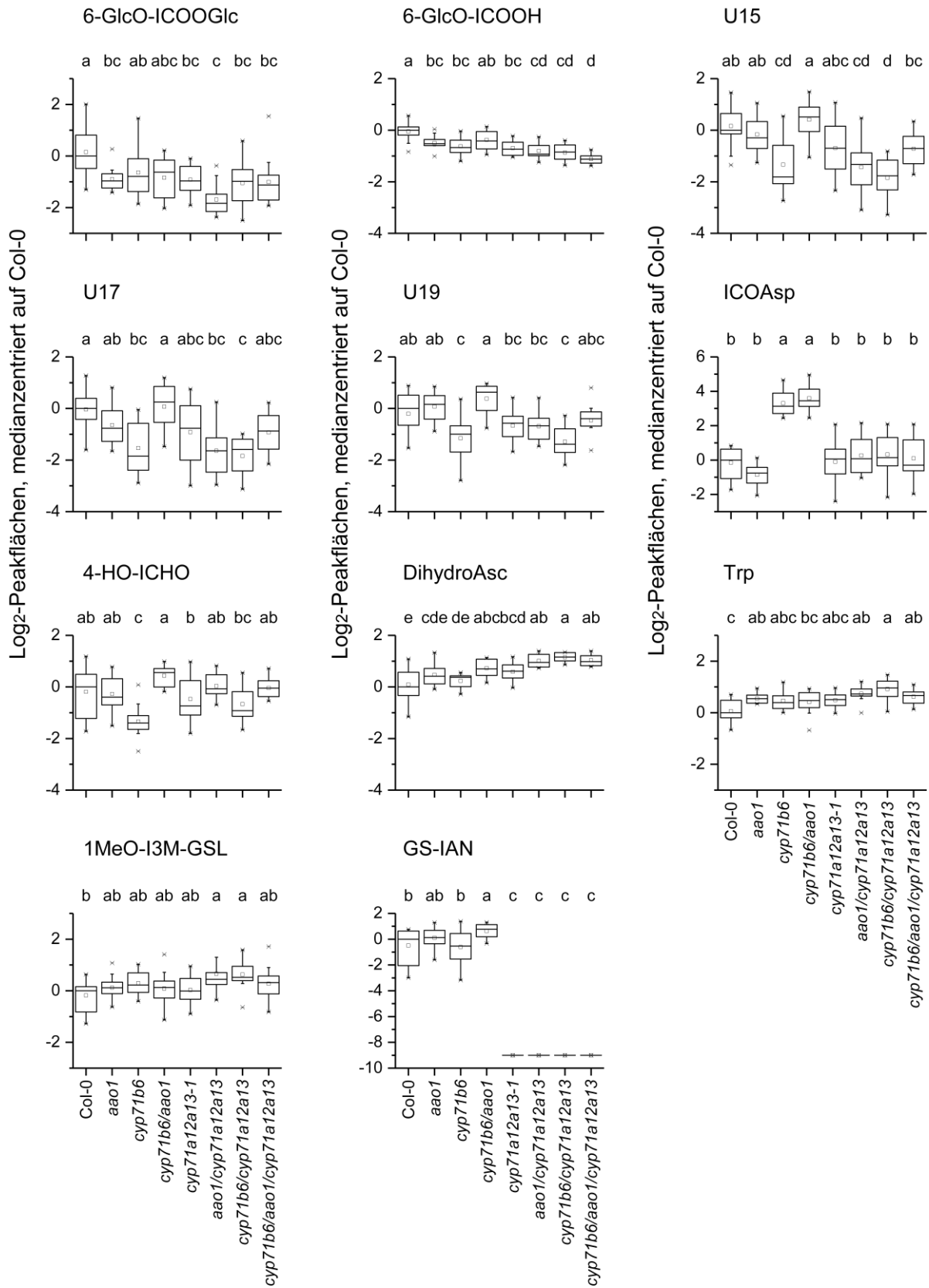


Abbildung 6-6 Relative Quantifizierung weiterer IAOx-abhängiger Metabolite in Rosettenblättern des Wildtyps Col-0 und Mutantenlinien nach UV-Behandlung Peakflächen wurden log₂-transformiert und Col-0-medianzentriert. Gleiche Buchstaben bedeuten keine signifikanten Unterschiede der Mittelwerte

(Tukey HSD-Test, $p \leq 0,05$, $n=11-12$)

AgNO₃-Induktion

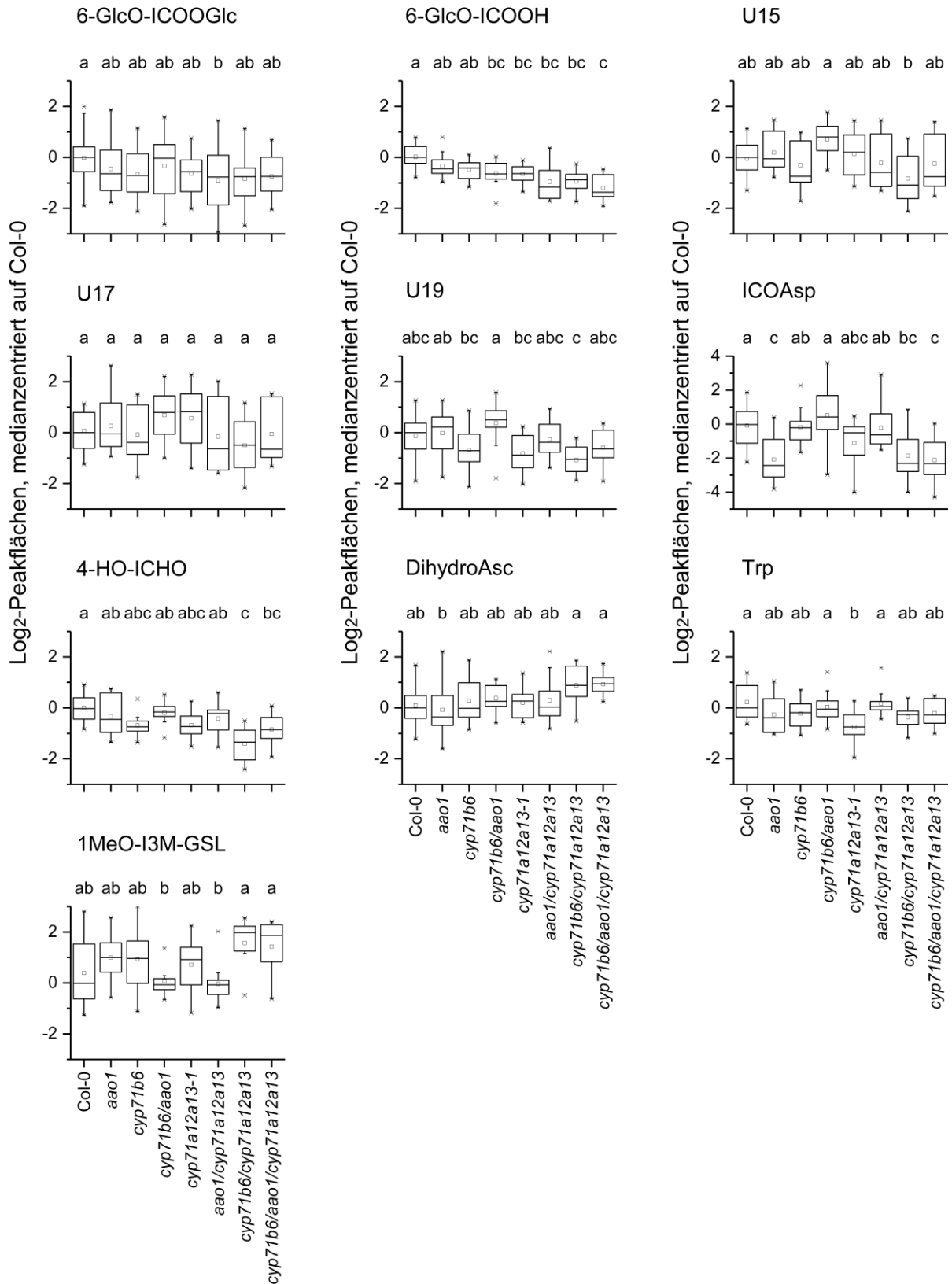


Abbildung 6-7 Relative Quantifizierung weiterer IAOx-abhängiger Metabolite in Rosettenblättern des Wildtyps Col-0 und Mutantenlinien nach AgNO₃-Behandlung Peakflächen wurden log₂-transformiert

und Col-0-medianzentriert. Gleiche Buchstaben bedeuten keine signifikanten Unterschiede der Mittelwerte (Tukey HSD-Test, $p \leq 0,05$, $n=11-12$)

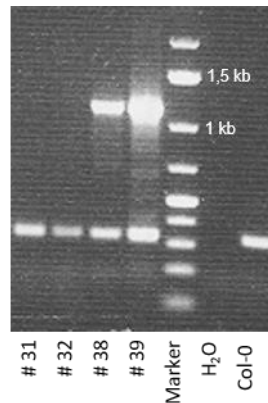


Abbildung 6-8 Analyse der Primärtansformanten, die beide TALEN-Konstrukte zur Exzision des *CYP71B*-Clusters trugen. PCR mit den clusterumspannenden Primern actgggacaagttgagaggt und gaatctcctggactcaatgcc (theoretische Länge des PCR Produktes: ca. 1150 bp). H₂O: Kontrollreaktion ohne Templat, Marker: GeneRuler™ 1 kb Plus DNA-Ladder (Thermo Fisher Scientific).

AD 20-3-8	36	CAAGGTCACCCACAATCGTCTTAAAATTATTATTTATACATGCAAATTGAGTTAAGTTAT	95
At Chromosom 3	9648700	CAAGGTCACCCACAATCGTCTTAAAATTATTATTTATACATGCAAATTGAGTTAAGTTAT	9648641
AD 20-3-8	96	TATTTCTTTTCAAAAGTTTAGTAATAAAGATGTGTCAGAAATAATTGAAGACAACACTGA	155
At Chromosom 3	9648640	TATTTCTTTTCAAAAGTTTAGTAATAAAGATGTGTCAGAAATAATTGAAGACAACACTGA	9648581
AD 20-3-8	156	GCTTCAACATATAGTTGTCCCTTCATCAGTCATCAGATCAACAAATGGCTACTATTTGGT	215
At Chromosom 3	9648580	GCTTCAACATATAGTTGTCCCTTCATCAGTCATCAGATCAACAAATGGCTACTATTTGGT	9648521
AD 20-3-8	216	TTCTCCCActtctctctctctctctctgtctctctctctGCCGCTTT	258
At Chromosom 3	9648520	TTCTCCCACTTCTCTTTCTCTCTTGTCTTCTTGTGCCGCTTT	9648478
AD 20-3-8	258	TCCAAGGCCGGCGATAGGGAAGAAATCAGAGCAAGTGAACTAGCCTGAGCTATCTCGGT	317
At Chromosom 3	9566532	TCCAAGGCCGGCGATAGGGAAGAAATCAGAGCAAGTGAACTAGCCTGAGCTGTCTCGGT	9566591
AD 20-3-8	318	TTCAAATATAAGTTCATCGATCTTGTCTTTCATCGATAAACTTGTGTCGTGGAAACTCTG	377
At Chromosom 3	9566592	TTCAAATATAAGTTCATCGATCTTGTCTTTCATCGATAAACTTGTGTCGTGGAAACTCTG	9566651
AD 20-3-8	378	TCCAAAAGCAATTCTAAACAGGATACTCGCAGCTAGCCAGAAAAGGGATTTACTCAAATC	437
At Chromosom 3	9566652	TCCAAAAGCAATTCTAAACAGGATACTCGCAGCTAGCCAGAAAAGGGATTTACTCAAATC	9566711
AD 20-3-8	438	AACCGGAGGCCGACCTACGGCTGATTCCGTCAGTTTCTTGACCAGCAAGTTACATTCTTC	497
At Chromosom 3	9566712	AACCGGAGGCCGACCTACGGCTGATTCCGTCAGTTTCTTGACCAGCAAGTTACATTCTTC	9566771
AD 20-3-8	498	TTCTACGATATACCCAAAATACTGAACCTTTTGAACAGAAAAGCTCGCGCACCAAGAA	557
At Chromosom 3	9566772	TTCTACGATATACCCAAAATACTGAACCTTTTGAACAGAAAAGCTCGCGCACCAAGAA	9566831
AD 20-3-8	558	CTTACGCCGCTCTCTCCACTCTTACCCTATGGAGTAAAAGTATCTTTAAAACCCCG	617
At Chromosom 3	9566832	CTTACGCCGCTCTCTCCACTCTTACCCTATGGAGTAAAAGTATCTTTAAAACCCCG	9566891
AD 20-3-8	618	AGAGATTAGCCTCGACCCGACAAGTTTAGGCCTGGTGCAACACTTTAGGTCATGAGTTCT	677
At Chromosom 3	9566892	AGAGATTAGCCTCGACCCGACAAGTTTAGGCCTGGTGCAACACTTTAGGTCATGAGTTCT	9566951
AD 20-3-8	678	AAGAACTTCTTCAGCTGCTTCCCTCGATGAGATTACAGTTACAGGGACAAACCCAAAGTG	737
At Chromosom 3	9566952	AAGAACTTCTTCAGCTGCTTCCCTCGATGAGATTACAGTTACAGGGACAAACCCAAAGTG	9567011
AD 20-3-8	738	AA	739
At Chromosom 3	9567012	AA	9567013

Abbildung 6-9 Der Sequenzvergleich von AD 20-3-8 (PCR Produkt mit den Primern CTTCTCCAAGCCCTCCTAC und CAAGGTCACCCACAATCGTCTT) mit der wildtypischen Sequenz von *Arabidopsis thaliana* (Chromosom 3) zeigt vollständige Übereinstimmung bis Base 258 des sequenzierten Abschnittes mit *CYP71B37* sowie sehr gute Übereinstimmung ab Base 258 mit *CYP71B16*. Das *CYP71B*-Cluster wurde invertiert. Ein entsprechender Sequenzvergleich der Linie

AD20-3-11 mit dem Wildtyp ergibt ein analoges Ergebnis. Sequenzvergleich durchgeführt mit dem Online-Tool BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>)

7. Literaturverzeichnis

- Adrian, M., und Jeandet, P. (2012). Effects of resveratrol on the ultrastructure of *Botrytis cinerea* conidia and biological significance in plant/pathogen interactions. *Fitoterapia* 83, 1345-1350.
- Adrian, M., Jeandet, P., Veneau, J., Weston, L.A., und Bessis, R. (1997). Biological Activity of Resveratrol, a Stilbenic Compound from Grapevines, Against *Botrytis cinerea*, the Causal Agent for Gray Mold. *Journal of Chemical Ecology* 23, 1689-1702.
- Agerbirk, N., De Vos, M., Kim, J.H., und Jander, G. (2008). Indole glucosinolate breakdown and its biological effects. *Phytochemistry Reviews* 8, 101.
- Ahuja, I., Kissen, R., und Bones, A.M. (2012). Phytoalexins in defense against pathogens. *Trends in plant science* 17, 73-90.
- Akaba, S., Seo, M., Dohmae, N., Takio, K., Sekimoto, H., Kamiya, Y., Furuya, N., Komano, T., und Koshiba, T. (1999). Production of homo- and hetero-dimeric isozymes from two aldehyde oxidase genes of *Arabidopsis thaliana*. *J Biochem* 126, 395-401.
- Aleksandrova, L.G., Korolev, A.M., und Preobrazhenskaya, M.N. (1992). Study of natural ascorbigen and related compounds by HPLC. *Food Chemistry* 45, 61-69.
- Anders, C., Niewoehner, O., Duerst, A., und Jinek, M. (2014). Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease. *Nature* 513, 569-573.
- Aoki, Y., Okamura, Y., Tadaka, S., Kinoshita, K., und Obayashi, T. (2016). ATTED-II in 2016: A Plant Coexpression Database Towards Lineage-Specific Coexpression. *Plant and Cell Physiology* 57, e5-e5.
- Arnaud, D., und Hwang, I. (2014). A Sophisticated Network of Signaling Pathways Regulates Stomatal Defenses to Bacterial Pathogens. *Molecular plant* 8, 566-581.
- Asada, K. (1999). THE WATER-WATER CYCLE IN CHLOROPLASTS: Scavenging of Active Oxygens and Dissipation of Excess Photons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50, 601-639.
- Asensio, D., Rapparini, F., und Peñuelas, J. (2012). AM fungi root colonization increases the production of essential isoprenoids vs. nonessential isoprenoids especially under drought stress conditions or after jasmonic acid application. *Phytochemistry* 77, 149-161.
- Ashraf, A., und Brian, M. (2009). The pleiotropic effects of the bar gene and glufosinate on the *Arabidopsis* transcriptome. *Plant biotechnology journal* 7, 266-282.
- Bak, S., Beisson, F., Bishop, G., Hamberger, B., Hofer, R., Paquette, S., und Werck-Reichhart, D. (2011). Cytochromes p450. *The Arabidopsis book / American Society of Plant Biologists* 9, e0144.
- Barth, C., und Jander, G. (2006). Arabidopsis myrosinases TGG1 and TGG2 have redundant function in glucosinolate breakdown and insect defense. *The Plant Journal* 46, 549-562.
- Bartling, D., Seedorf, M., Mithofer, A., und 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. *European journal of biochemistry / FEBS* 205, 417-424.
- Bednarek, P., Piślewska-Bednarek, M., Svatoš, A., Schneider, B., Doubský, J., Mansurova, M., Humphry, M., Consonni, C., Panstruga, R., Sanchez-Vallet, A., et al. (2009). A Glucosinolate Metabolism Pathway in Living Plant Cells Mediates Broad-Spectrum Antifungal Defense. *Science* 323, 101-106.
- Bednarek, P., Schneider, B., Svatos, A., Oldham, N.J., und Hahlbrock, K. (2005). Structural complexity, differential response to infection, and tissue specificity of indolic and phenylpropanoid secondary metabolism in *Arabidopsis* roots. *Plant physiology* 138, 1058-1070.
- Bent, A.F., und Mackey, D. (2007). Elicitors, Effectors, and R Genes: The New Paradigm and a Lifetime Supply of Questions. *Annual review of phytopathology* 45, 399-436.
- Bernasconi, P., Walters, E.W., Woodworth, A.R., Siehl, D.L., Stone, T.E., und Subramanian, M.V. (1994). Functional expression of *Arabidopsis thaliana* anthranilate synthase subunit I in *Escherichia coli*. *Plant physiology* 106, 353-358.
- Bhaskar, R.V., Mohanty, B., Verma, V., Wijaya, E., und Kumar, P.P. (2015). A Hormone-Responsive C1-Domain-Containing Protein At5g17960 Mediates Stress Response in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS one* 10, e0115418.
- Birkenbihl, R.P., Diezel, C., und Somssich, I.E. (2012). Arabidopsis WRKY33 is a key transcriptional regulator of hormonal and metabolic responses toward *Botrytis cinerea* infection. *Plant physiology* 159, 266-285.

- Bitinaite, J., Wah, D.A., Aggarwal, A.K., und Schildkraut, I. (1998). FokI dimerization is required for DNA cleavage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 10570-10575.
- Boch, J., Scholze, H., Schornack, S., Landgraf, A., Hahn, S., Kay, S., Lahaye, T., Nickstadt, A., und Bonas, U. (2009). Breaking the Code of DNA Binding Specificity of TAL-Type III Effectors. *Science* 326, 1509-1512.
- Bogdanove, A.J., Schornack, S., und Lahaye, T. (2010). TAL effectors: finding plant genes for disease and defense. *Current opinion in plant biology* 13, 394-401.
- Böttcher, C., Chapman, A., Fellermeier, F., Choudhary, M., Scheel, D., und Glawischnig, E. (2014). The Biosynthetic Pathway of Indole-3-Carbaldehyde and Indole-3-Carboxylic Acid Derivatives in *Arabidopsis*. *Plant physiology* 165, 841-853.
- Böttcher, C., Westphal, L., Schmotz, C., Prade, E., Scheel, D., und Glawischnig, E. (2009). The multifunctional enzyme CYP71B15 (PHYTOALEXIN DEFICIENT3) converts cysteine-indole-3-acetonitrile to camalexin in the indole-3-acetonitrile metabolic network of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant cell* 21, 1830-1845.
- Boudsocq, M., Willmann, M.R., McCormack, M., Lee, H., Shan, L., He, P., Bush, J., Cheng, S.H., und Sheen, J. (2010). Differential innate immune signalling via Ca(2+) sensor protein kinases. *Nature* 464, 418-422.
- Boutrot, F., und Zipfel, C. (2017). Function, Discovery, and Exploitation of Plant Pattern Recognition Receptors for Broad-Spectrum Disease Resistance. *Annual review of phytopathology* 55, 257-286.
- Bowman, J. (1994). *Arabidopsis: An Atlas of Morphology and Development*, 1. Ausgabe (New York: Springer-Verlag).
- Brian, M., Ashraf, A., Yuzuki, M., und Phil, M. (2009). Selectable marker genes and unintended changes to the plant transcriptome. *Plant biotechnology journal* 7, 211-218.
- Browne, L.M., Conn, K.L., Ayer, W.A., und Tewari, J.P. (1991). The Camalexins - New Phytoalexins Produced in the Leaves of *Camelina Sativa* (Cruciferae). *Tetrahedron* 47, 3909-3914.
- Brugliera, F., Tao, G.-Q., Tems, U., Kalc, G., Mouradova, E., Price, K., Stevenson, K., Nakamura, N., Stacey, I., Katsumoto, Y., et al. (2013). Violet/Blue Chrysanthemums—Metabolic Engineering of the Anthocyanin Biosynthetic Pathway Results in Novel Petal Colors. *Plant and Cell Physiology* 54, 1696-1710.
- Burow, M., Losansky, A., Müller, R., Plock, A., Kliebenstein, D.J., und Wittstock, U. (2009). The Genetic Basis of Constitutive and Herbivore-Induced ESP-Independent Nitrile Formation in *Arabidopsis*. *Plant physiology* 149, 561-574.
- Burow, M., und Wittstock, U. (2009). Regulation and function of specifier proteins in plants. *Phytochemistry Reviews* 8, 87-99.
- Burow, M., Zhang, Z.-Y., Ober, J.A., Lambrix, V.M., Wittstock, U., Gershenzon, J., und Kliebenstein, D.J. (2008). ESP and ESM1 mediate indol-3-acetonitrile production from indol-3-ylmethyl glucosinolate in *Arabidopsis*. *Phytochemistry* 69, 663-671.
- Butelli, E., Titta, L., Giorgio, M., Mock, H.-P., Matros, A., Peterek, S., Schijlen, E.G.W.M., Hall, R.D., Bovy, A.G., Luo, J., et al. (2008). Enrichment of tomato fruit with health-promoting anthocyanins by expression of select transcription factors. *Nat Biotech* 26, 1301-1308.
- Cermak, T., Doyle, E.L., Christian, M., Wang, L., Zhang, Y., Schmidt, C., Baller, J.A., Somia, N.V., Bogdanove, A.J., und Voytas, D.F. (2011). Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic acids research* 39, e82.
- Chen, S., Glawischnig, E., Jorgensen, K., Naur, P., Jorgensen, B., Olsen, C., Hansen, C.H., Rasmussen, H., Pickett, J.A., und Halkier, B.A. (2003). CYP79F1 and CYP79F2 have distinct functions in the biosynthesis of aliphatic glucosinolates in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 33, 923-937.
- Cheng, A.-X., Lou, Y.-G., Mao, Y.-B., Lu, S., Wang, L.-J., und Chen, X.-Y. (2007). Plant Terpenoids: Biosynthesis and Ecological Functions. *Journal of Integrative Plant Biology* 49, 179-186.
- Cho, M.-H., und Lee, S.-W. (2015). Phenolic Phytoalexins in Rice: Biological Functions and Biosynthesis. *International journal of molecular sciences* 16, 26152.
- Christen, P., und Mehta, P.K. (2001). From cofactor to enzymes. The molecular evolution of pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzymes. *Chem Rec* 1, 436-447.
- Christian, M., Qi, Y., Zhang, Y., und Voytas, D.F. (2013). Targeted mutagenesis of *Arabidopsis thaliana* using engineered TAL effector nucleases. *G3* 3, 1697-1705.
- Cipollone, R., und Visca, P. (2007). Is there evidence that cyanide can act as a neuromodulator? *IUBMB Life* 59, 187-189.

- Clough, S.J., und Bent, A.F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 16, 735-743.
- Coelho, C., Mahro, M., Trincão, J., Carvalho, A.T.P., Ramos, M.J., Terao, M., Garattini, E., Leimkübler, S., und Romão, M.J. (2012). The First Mammalian Aldehyde Oxidase Crystal Structure: INSIGHTS INTO SUBSTRATE SPECIFICITY. *The Journal of biological chemistry* 287, 40690-40702.
- Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P.D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L.A., et al. (2013). Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. *Science* 339, 819-823.
- Conner, K.P., Woods, C.M., und Atkins, W.M. (2011). Interactions of cytochrome P450s with their ligands. *Archives of biochemistry and biophysics* 507, 56-65.
- Correia, M.A., und Ortiz de Montellano, P.R. (2005). Inhibition of Cytochrome P450 Enzymes. In *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*, P.R. Ortiz de Montellano, ed. (Boston, MA: Springer US), pp. 247-322.
- Coxon, D.T., O'Neill, T.M., Mansfield, J.W., und Porter, A.E.A. (1980). Identification of three hydroxyflavan phytoalexins from daffodil bulbs. *Phytochemistry* 19, 889-891.
- Cruickshank, I.A.M., und Perrin, D.R. (1960). Isolation of a Phytoalexin from *Pisum sativum* L. *Nature* 187, 799-800.
- Dar, T.A., Uddin, M., Khan, M.M.A., Hakeem, K.R., und Jaleel, H. (2015). Jasmonates counter plant stress: A Review. *Environmental and Experimental Botany* 115, 49-57.
- Davini, E., Javarone, C., Trogolo, C., Aureli, P., und Pasolini, B. (1986). The quantitative isolation and antimicrobial activity of the aglycone of aucubin. *Phytochemistry* 25, 2420-2422.
- De Vos, M., Kriksunov, K.L., und Jander, G. (2008). Indole-3-acetonitrile production from indole glucosinolates deters oviposition by *Pieris rapae* (white cabbage butterfly). *Plant physiology* 146, 916-926.
- Dean, R., Van Kan, J.A.L., Pretorius, Z.A., Hammond-Kosack, K.E., Di Pietro, A., Spanu, P.D., Rudd, J.J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., et al. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology* 13, 414-430.
- Denisov, I.G., Makris, T.M., Sligar, S.G., und Schlichting, I. (2005). Structure and Chemistry of Cytochrome P450. *Chemical Reviews* 105, 2253-2278.
- Dinda, B., Debnath, S., und Banik, R. (2011). Naturally Occurring Iridoids and Secoiridoids. An Updated Review, Part 4. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 59, 803-833.
- Dow, M., and, M.-A.N., und Roepenack, E.v. (2000). The Induction and Modulation of Plant Defense Responses by Bacterial Lipopolysaccharides. *Annual review of phytopathology* 38, 241-261.
- Doyon, Y., McCammon, J.M., Miller, J.C., Faraji, F., Ngo, C., Katibah, G.E., Amora, R., Hocking, T.D., Zhang, L., Rebar, E.J., et al. (2008). Heritable Targeted Gene Disruption in Zebrafish Using Designed Zinc Finger Nucleases. *Nature biotechnology* 26, 702-708.
- Droby, S., und Lichter, A. (2007). Post-Harvest *Botrytis* Infection: Etiology, Development and Management. In *Botrytis: Biology, Pathology and Control*, Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski, und N. Delen, eds. (Dordrecht: Springer Netherlands), pp. 349-367.
- Duke, S.O., Cantrell, C.L., Meepagala, K.M., Wedge, D.E., Tabanca, N., und Schrader, K.K. (2010). Natural Toxins for Use in Pest Management. *Toxins* 2, 1943-1962.
- Eckardt, N.A. (2011). Induction of Phytoalexin Biosynthesis: WRKY33 Is a Target of MAPK Signaling. *The Plant cell* 23, 1190-1190.
- Ehltling, J., Provar, N., und Werck, D. (2007). Functional annotation of the *Arabidopsis* P450 superfamily based on large-scale co-expression analysis, Vol 34 Ausgabe.
- Ehltling, J., Sauveplane, V., Olry, A., Ginglinger, J.F., Provar, N.J., und Werck-Reichhart, D. (2008). An extensive (co-)expression analysis tool for the cytochrome P450 superfamily in *Arabidopsis thaliana*. *BMC plant biology* 8, 47.
- Eisenthal, R., Danson, M.J., und Hough, D.W. (2007). Catalytic efficiency and kcat/KM: a useful comparator? *Trends in biotechnology* 25, 247-249.
- Ellinger, D., Naumann, M., Falter, C., Zwikowics, C., Jamrow, T., Manisseri, C., Somerville, S.C., und Voigt, C.A. (2013). Elevated Early Callose Deposition Results in Complete Penetration Resistance to Powdery Mildew in *Arabidopsis*. *Plant physiology* 161, 1433-1444.
- Farmer, E., Mousavi, S., und Lenglet, A. (2013). Leaf numbering for experiments on long distance signalling in *Arabidopsis*.
- Felix, G., Duran, J.D., Volko, S., und Boller, T. (1999). Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *The Plant Journal* 18, 265-276.

- Felix, G., Regenass, M., und Boller, T. (1993). Specific perception of subnanomolar concentrations of chitin fragments by tomato cells: induction of extracellular alkalization, changes in protein phosphorylation, and establishment of a refractory state. *The Plant Journal* 4, 307-316.
- Felle, H., und Bertl, A. (1986). Light-induced cytoplasmic pH changes and their interrelation to the activity of the electrogenic proton pump in *Riccia fluitans*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 848, 176-182.
- Felle, H.H., Hanstein, S., Steinmeyer, R., und Hedrich, R. (2000). Dynamics of ionic activities in the apoplast of the substomatal cavity of intact *Vicia faba* leaves during stomatal closure by ABA and darkness. *Plant J* 24, 297-304.
- Fellermeier, F. (2011). Die Bedeutung der CYP71B-Familie für die Biosynthese indolischer Sekundärstoffe bei *Arabidopsis thaliana*. *Masterarbeit*. Lehrstuhl für Genetik, TU München.
- Ferguson, D.O., und Alt, F.W. (2001). DNA double strand break repair and chromosomal translocation: lessons from animal models. *Oncogene* 20, 5572-5579.
- Ferrari, S., Galletti, R., Denoux, C., De Lorenzo, G., Ausubel, F.M., und Dewdney, J. (2007). Resistance to *Botrytis cinerea* induced in Arabidopsis by elicitors is independent of salicylic acid, ethylene, or jasmonate signaling but requires PHYTOALEXIN DEFICIENT3. *Plant physiology* 144, 367-379.
- Ferrari, S., Plotnikova, J.M., De Lorenzo, G., und Ausubel, F.M. (2003). Arabidopsis local resistance to *Botrytis cinerea* involves salicylic acid and camalexin and requires EDS4 and PAD2, but not SID2, EDS5 or PAD4. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 35, 193-205.
- Field, B., und Osbourn, A.E. (2008). Metabolic Diversification—Independent Assembly of Operon-Like Gene Clusters in Different Plants. *Science* 320, 543-547.
- Fisch, M.H., Flick, B.H., und Arditti, J. (1973). Structure and antifungal activity of hircinol, loroglossol and orchinol. *Phytochemistry* 12, 437-441.
- Forcat, S., Bennett, M., Grant, M., und Mansfield, J.W. (2010). Rapid linkage of indole carboxylic acid to the plant cell wall identified as a component of basal defence in Arabidopsis against *hrp* mutant bacteria. *Phytochemistry* 71, 870-876.
- Frerigmann, H., und Gigolashvili, T. (2014). MYB34, MYB51, and MYB122 distinctly regulate indolic glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular plant* 7, 814-828.
- Frerigmann, H., Glawischnig, E., und Gigolashvili, T. (2015). The role of MYB34, MYB51 and MYB122 in the regulation of camalexin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in plant science* 6, 654.
- Frerigmann, H., Pislewska-Bednarek, M., Sanchez-Vallet, A., Molina, A., Glawischnig, E., Gigolashvili, T., und Bednarek, P. (2016). Regulation of Pathogen-Triggered Tryptophan Metabolism in *Arabidopsis thaliana* by MYB Transcription Factors and Indole Glucosinolate Conversion Products. *Molecular plant* 9, 682-695.
- Frey, M., Chomet, P., Glawischnig, E., Stettner, C., Grun, S., Winklmair, A., Eisenreich, W., Bacher, A., Meeley, R.B., Briggs, S.P., et al. (1997). Analysis of a chemical plant defense mechanism in grasses. *Science* 277, 696-699.
- Frey, M., Schullehner, K., Dick, R., Fiesselmann, A., und Gierl, A. (2009). Benzoxazinoid biosynthesis, a model for evolution of secondary metabolic pathways in plants. *Phytochemistry* 70, 1645-1651.
- Fröschel, C. (2016). Genomweite Analyse der zellschichtspezifischen Expression in der *Arabidopsis*-Wurzel nach Inokulation mit pathogenen und mutualistischen Mikroorganismen. *Dissertation*, Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg.
- Fuchs, R., Kopschke, M., Klapprodt, C., Hause, G., Meyer, A.J., Schwarzlander, M., Fricker, M.D., und Lipka, V. (2016). Immobilized Subpopulations of Leaf Epidermal Mitochondria Mediate PENETRATION2-Dependent Pathogen Entry Control in Arabidopsis. *The Plant cell* 28, 130-145.
- Fucile, G., Di Biase, D., Nahal, H., La, G., Khodabandeh, S., Chen, Y.N., Easley, K., Christendat, D., Kelley, L., und Provart, N.J. (2011). ePlant and the 3D Data Display Initiative: Integrative Systems Biology on the World Wide Web. *PLoS one* 6.
- Fuentes, F., Paredes-Gonzalez, X., und Kong, A.T. (2015). Dietary Glucosinolates Sulforaphane, Phenethyl Isothiocyanate, Indole-3-Carbinol/3,3'-Diindolylmethane: Anti-Oxidative Stress/Inflammation, Nrf2, Epigenetics/Epigenomics and In Vivo Cancer Chemopreventive Efficacy. *Curr Pharmacol Rep* 1, 179-196.
- Gaj, T., Gersbach, C.A., und Barbas, C.F., 3rd (2013). ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends in biotechnology* 31, 397-405.
- Gamir, J., Pastor, V., Cerezo, M., und Flors, V. (2012). Identification of indole-3-carboxylic acid as mediator of priming against *Plectosphaerella cucumerina*. *Plant physiology and biochemistry : PPB / Societe francaise de physiologie vegetale* 61, 169-179.

- García, I., Castellano, J.M., Vioque, B., Solano, R., Gotor, C., und Romero, L.C. (2010). Mitochondrial β -Cyanoalanine Synthase Is Essential for Root Hair Formation in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant cell* 22, 3268-3279.
- García, I., Gotor, C., und Romero, L.C. (2014). Beyond toxicity: A regulatory role for mitochondrial cyanide. *Plant Signaling & Behavior* 9, e27612.
- García, I., Rosas, T., Bejarano, E.R., Gotor, C., und Romero, L.C. (2013). Transient Transcriptional Regulation of the CYS-C1 Gene and Cyanide Accumulation upon Pathogen Infection in the Plant Immune Response. *Plant physiology* 162, 2015-2027.
- Gassmann, W., und Bhattacharjee, S. (2012). Effector-Triggered Immunity Signaling: From Gene-for-Gene Pathways to Protein-Protein Interaction Networks. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 25, 862-868.
- Gavira, C. (2013). Production de terpènes fonctionnalisés par les cytochromes P450 de plantes recombinants. *Dissertation*.
- Gavira, C., Höfer, R., Lesot, A., Lambert, F., Zucca, J., und Werck-Reichhart, D. (2013). Challenges and pitfalls of P450-dependent (+)-valencene bioconversion by *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering* 18, 25-35.
- Geigert, J., Stermitz, F.R., Johnson, G., Maag, D.D., und Johnson, D.K. (1973). Two phytoalexins from sugarbeet (*Beta vulgaris*) leaves. *Tetrahedron* 29, 2703-2706.
- Geu-Flores, F., Moldrup, M.E., Böttcher, C., Olsen, C.E., Scheel, D., und Halkier, B.A. (2011). Cytosolic gamma-glutamyl peptidases process glutathione conjugates in the biosynthesis of glucosinolates and camalexin in *Arabidopsis*. *The Plant cell* 23, 2456-2469.
- Geu-Flores, F., Nour-Eldin, H.H., Nielsen, M.T., und Halkier, B.A. (2007). USER fusion: a rapid and efficient method for simultaneous fusion and cloning of multiple PCR products. *Nucleic acids research* 35, e55.
- Glawischnig, E., Hansen, B.G., Olsen, C.E., und Halkier, B.A. (2004). Camalexin is synthesized from indole-3-acetaldoxime, a key branching point between primary and secondary metabolism in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 8245-8250.
- Gmelin, R., und Virtanen, A.I. (1961). Glucobrassicin, der Precursor von SCN-, 3-Indolylacetonitril und Ascorbigen in *Brassica oleracea* Species. *Ann Acad Sci Fenn Ser A II Chem* 107, 1-25.
- Goodman, D.B., Church, G.M., und Kosuri, S. (2013). Causes and Effects of N-Terminal Codon Bias in Bacterial Genes. *Science* 342, 475-479.
- Goodstein, D.M., Shu, S., Howson, R., Neupane, R., Hayes, R.D., Fazo, J., Mitros, T., Dirks, W., Hellsten, U., Putnam, N., et al. (2012). Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic acids research* 40, D1178-D1186.
- Götz, C. (2012). Enzymatische Charakterisierung der CYP71A-Unterfamilie im Indolstoffwechsel von *Arabidopsis thaliana*. *Bachelorarbeit*. Lehrstuhl für Genetik, Technische Universität München.
- Goujon, M., McWilliam, H., Li, W., Valentin, F., Squizzato, S., Paern, J., und Lopez, R. (2010). A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI. *Nucleic acids research* 38, W695-W699.
- Gout, E., Boisson, A.-M., Aubert, S., Douce, R., und Bligny, R. (2001). Origin of the Cytoplasmic pH Changes during Anaerobic Stress in Higher Plant Cells. Carbon-13 and Phosphorous-31 Nuclear Magnetic Resonance Studies. *Plant physiology* 125, 912-925.
- Grossmann, K. (1996). A role for cyanide, derived from ethylene biosynthesis, in the development of stress symptoms. *Physiologia plantarum* 97, 772-775.
- Grossmann, K. (2003). Mediation of Herbicide Effects by Hormone Interactions. *Journal of Plant Growth Regulation* 22, 109-122.
- Guengerich, F.P. (2001). Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chemical research in toxicology* 14, 611-650.
- Gunasekar, P.G., Borowitz, J.L., Turek, J.J., Van Horn, D.A., und Isom, G.E. (2000). Endogenous generation of cyanide in neuronal tissue: Involvement of a peroxidase system. *Journal of Neuroscience Research* 61, 570-575.
- Gunasekar, P.G., Prabhakaran, K., Li, L., Zhang, L., Isom, G.E., und Borowitz, J.L. (2004). Receptor mechanisms mediating cyanide generation in PC12 cells and rat brain. *Neuroscience Research* 49, 13-18.
- Guo, B., Zhang, Y., Li, S., Lai, T., Yang, L., Chen, J., und Ding, W. (2016). Extract from Maize (*Zea mays* L.): Antibacterial Activity of DIMBOA and Its Derivatives against *Ralstonia solanacearum*. *Molecules* 21.
- Gust, A.A., Biswas, R., Lenz, H.D., Rauhut, T., Ranf, S., Kemmerling, B., Götz, F., Glawischnig, E., Lee, J., Felix, G., et al. (2007). Bacteria-derived Peptidoglycans Constitute Pathogen-

- associated Molecular Patterns Triggering Innate Immunity in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* 282, 32338-32348.
- Hagemeyer, J., Schneider, B., Oldham, N.J., und Hahlbrock, K. (2001). Accumulation of soluble and wall-bound indolic metabolites in *Arabidopsis thaliana* leaves infected with virulent or avirulent *Pseudomonas syringae* pathovar tomato strains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 753-758.
- Han, L., Li, G.-J., Yang, K.-Y., Mao, G., Wang, R., Liu, Y., und Zhang, S. (2010). Mitogen-activated protein kinase 3 and 6 regulate *Botrytis cinerea*-induced ethylene production in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 64, 114-127.
- Hansen, C.H., Du, L., Naur, P., Olsen, C.E., Axelsen, K.B., Hick, A.J., Pickett, J.A., und Halkier, B.A. (2001). CYP83B1 Is the Oxime-metabolizing Enzyme in the Glucosinolate Pathway in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* 276, 24790-24796.
- Harding, V.K., und Heale, J.B. (1981). The accumulation of inhibitory compounds in the induced resistance response of carrot root slices to *Botrytis cinerea*. *Physiological Plant Pathology* 18, 7-15.
- Hargreaves, J., Mansfield, J., und Coxon, D. (1976). Identification of medicarpin as a phytoalexin in the broad bean plant (*Vicia faba* L.). *Nature* 262, 318-319.
- Harris, J.E., und Dennis, C. (1977). The effect of post-infectious potato tuber metabolites and surfactants on zoospores of oomycetes. *Physiological Plant Pathology* 11, 163-169.
- Hartmann, G., und Nienhaus, F. (1974). The Isolation of Xanthoxylin from the Bark of *Phytophthora*- and *Hendersonula*-infected *Citrus limon* and its Fungitoxic Effect. *Journal of Phytopathology* 81, 97-113.
- Hartmann, T. (1996). Diversity and variability of plant secondary metabolism: a mechanistic view. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 80, 177-188.
- Hartmann, T. (2007). From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry* 68, 2831-2846.
- Hasegawa, R., Maruyama, A., Nakaya, M., Tsuda, S., und Esashi, Y. (1995). The presence of two types of β -cyanoalanine synthase in germinating seeds and their responses to ethylene. *Physiologia plantarum* 93, 713-718.
- Haun, W., Coffman, A., Clasen, B.M., Demorest, Z.L., Lowy, A., Ray, E., Retterath, A., Stoddard, T., Juillerat, A., Cedrone, F., et al. (2014). Improved soybean oil quality by targeted mutagenesis of the fatty acid desaturase 2 gene family. *Plant biotechnology journal* 12, 934-940.
- He, D.Y., Yazaki, Y., Nishizawa, Y., Takai, R., Yamada, K., Sakano, K., Shibuya, Y., und Minami, E. (1998). Gene activation by cytoplasmic acidification in suspension-cultured rice cells in response to the potent elicitor, N-acetylchitoheptaose. *Mol Plant-Microbe Interact* 11, 1167-1174.
- Heffels, P., Müller, L., Schieber, A., und Weber, F. (2016). Profiling of iridoid glycosides in *Vaccinium* species by UHPLC-MS. *Food Research International*.
- Heigwer, F., Kerr, G., und Boutros, M. (2014). E-CRISP: fast CRISPR target site identification. *Nature Methods* 11, 122.
- Hevia, M.A., Canessa, P., Müller-Esparza, H., und Larrondo, L.F. (2015). A circadian oscillator in the fungus *Botrytis cinerea* regulates virulence when infecting *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112, 8744-8749.
- Hille, R. (2005). Molybdenum-containing hydroxylases. *Archives of biochemistry and biophysics* 433, 107-116.
- Horvath, P., und Barrangou, R. (2010). CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science* 327, 167-170.
- Husted, S., und Schoerring, J.K. (1995). Apoplastic pH and ammonium concentration in leaves of *Brassica napus* L. *Plant Physiol* 109, 1453-1460.
- Ibdah, M., Chen, Y.T., Wilkerson, C.G., und Pichersky, E. (2009). An aldehyde oxidase in developing seeds of *Arabidopsis* converts benzaldehyde to benzoic Acid. *Plant physiology* 150, 416-423.
- Ingham John, L. (1976). Induced Isoflavonoids from Fungus-Infected Stems of Pigeon Pea (*Cajanus cajan*). In *Zeitschrift für Naturforschung C*, pp. 504.
- Itoh, K., Maruyama, H., Adachi, M., Hoshino, K., Watanabe, N., und Tanaka, Y. (2007). Lack of dimer formation ability in rat strains with low aldehyde oxidase activity. *Xenobiotica* 37, 709-716.
- Janocha, S., und Bernhardt, R. (2013). Design and characterization of an efficient CYP105A1-based whole-cell biocatalyst for the conversion of resin acid diterpenoids in permeabilized *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 97, 7639-7649.
- Jensen, K., und Møller, B.L. (2010). Plant NADPH-cytochrome P450 oxidoreductases. *Phytochemistry* 71, 132-141.

- Jensen, K., Osmani, S.A., Hamann, T., Naur, P., und Møller, B.L. (2011). Homology modeling of the three membrane proteins of the dhurrin metabolon: catalytic sites, membrane surface association and protein-protein interactions. *Phytochemistry* 72, 2113-2123.
- Jeworutzki, E., Roelfsema, M.R.G., Anschütz, U., Krol, E., Elzenga, J.T.M., Felix, G., Boller, T., Hedrich, R., und Becker, D. (2010). Early signaling through the Arabidopsis pattern recognition receptors FLS2 and EFR involves Ca²⁺-associated opening of plasma membrane anion channels. *The Plant Journal* 62, 367-378.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., und Charpentier, E. (2012). A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science* 337, 816-821.
- Johns, D.G. (1967). Human liver aldehyde oxidase: differential inhibition of oxidation of charged and uncharged substrates. *J Clin Invest* 46, 1492-1505.
- Johnson, C., Brannon, D.R., und Kuć, J. (1973). Xanthotoxin: a phytoalexin of *Pastinaca sativa* root. *Phytochemistry* 12, 2961-2962.
- Jonczyk, R., Schmidt, H., Osterrieder, A., Fiesselmann, A., Schullehner, K., Haslbeck, M., Sicker, D., Hofmann, D., Yalpani, N., Simmons, C., et al. (2008). Elucidation of the final reactions of DIMBOA-glucoside biosynthesis in maize: characterization of Bx6 and Bx7. *Plant physiology* 146, 1053-1063.
- Jones, J.D., und Dangl, J.L. (2006). The plant immune system. *Nature* 444, 323-329.
- Joung, J.K., und Sander, J.D. (2013). TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. *Nature reviews Molecular cell biology* 14, 49-55.
- Kandavelou, K., und Chandrasegaran, S. (2009). Custom-Designed Molecular Scissors for Site-Specific Manipulation of the Plant and Mammalian Genomes. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* 544, 617-636.
- Katz, E., Nisani, S., Yadav, B.S., Woldemariam, M.G., Shai, B., Obolski, U., Ehrlich, M., Shani, E., Jander, G., und Chamovitz, D.A. (2015). The glucosinolate breakdown product indole-3-carbinol acts as an auxin antagonist in roots of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 82, 547-555.
- Keen, N.T., und Littlefield, L.J. (1979). The possible association of phytoalexins with resistance gene expression in flax to *Melampsora lini*. *Physiological Plant Pathology* 14, 265-280.
- Keen, N.T., Zaki, A.I., und Sims, J.J. (1972). Biosynthesis of hydroxyphaseollin and related isoflavanoids in disease-resistant soybean hypocotyls. *Phytochemistry* 11, 1031-1039.
- Kettles, G.J., Druerey, C., Schoonbeek, H.J., Maule, A.J., und Hogenhout, S.A. (2013). Resistance of *Arabidopsis thaliana* to the green peach aphid, *Myzus persicae*, involves camalexin and is regulated by microRNAs. *The New phytologist* 198, 1178-1190.
- Kirby, G.W. (1967). Biosynthesis of the Morphine Alkaloids. *Science* 155, 170-173.
- Kiss, F.M., Khatri, Y., Zapp, J., und Bernhardt, R. (2015). Identification of new substrates for the CYP106A1-mediated 11-oxidation and investigation of the reaction mechanism. *FEBS Letters* 589, 2320-2326.
- Kiss, G., und Neukom, H. (1966). Über die Struktur des Ascorbigens. *Helvetica Chimica Acta* 49, 989-992.
- Kissen, R., und Bones, A.M. (2009). Nitrile-specifier Proteins Involved in Glucosinolate Hydrolysis in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* 284, 12057-12070.
- Kissen, R., Rossiter, J.T., und Bones, A.M. (2009). The 'mustard oil bomb': not so easy to assemble?! Localization, expression and distribution of the components of the myrosinase enzyme system. *Phytochemistry Reviews* 8, 69-86.
- Klein, A.P., Anarat-Cappillino, G., und Sattely, E.S. (2013). Minimum set of cytochromes P450 for reconstituting the biosynthesis of camalexin, a major *Arabidopsis* antibiotic. *Angewandte Chemie* 52, 13625-13628.
- Klewer, A., Luerßen, H., Graf, H., und Siemens, J. (2001). Restriction Fragment Length Polymorphism Markers to Characterize *Plasmodiophora brassicae* Single-spore Isolates with Different Virulence Patterns. *Journal of Phytopathology* 149, 121-127.
- Kliebenstein, D.J., Lambrich, V.M., Reichelt, M., Gershenzon, J., und Mitchell-Olds, T. (2001). Gene Duplication in the Diversification of Secondary Metabolism: Tandem 2-Oxoglutarate-Dependent Dioxygenases Control Glucosinolate Biosynthesis in Arabidopsis. *The Plant cell* 13, 681-694.
- Kliebenstein, D.J., Rowe, H.C., und Denby, K.J. (2005). Secondary metabolites influence *Arabidopsis/Botrytis* interactions: variation in host production and pathogen sensitivity. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 44, 25-36.
- Koiwai, H., Akaba, S., Seo, M., Komano, T., und Koshihara, T. (2000). Functional expression of two Arabidopsis aldehyde oxidases in the yeast *Pichia pastoris*. *J Biochem* 127, 659-664.

- Koiwai, H., Nakaminami, K., Seo, M., Mitsuhashi, W., Toyomasu, T., und Koshiba, T. (2004). Tissue-specific localization of an abscisic acid biosynthetic enzyme, AAO3, in *Arabidopsis*. *Plant physiology* 134, 1697-1707.
- Kokubun, T., und Harborne, J.B. (1995). Phytoalexin induction in the sapwood of plants of the Maloideae (Rosaceae): Biphenyls or dibenzofurans. *Phytochemistry* 40, 1649-1654.
- Koshiba, T., Saito, E., Ono, N., Yamamoto, N., und Sato, M. (1996). Purification and Properties of Flavin- and Molybdenum-Containing Aldehyde Oxidase from Coleoptiles of Maize. *Plant physiology* 110, 781-789.
- Kriechbaumer, V., Park, W.J., Piotrowski, M., Meeley, R.B., Gierl, A., und Glawischnig, E. (2007). Maize nitrilases have a dual role in auxin homeostasis and beta-cyanoalanine hydrolysis. *Journal of experimental botany* 58, 4225-4233.
- Kuc, J. (1957). A biochemical study of the resistance of potato tuber tissue to attack by various fungi. *Phytopathology* 47, 676-680.
- Kuc, J. (1984). Steroid glycoalkaloids and related compounds as potato quality factors. *American Potato Journal* 61, 123-139.
- Kundu, T.K., Hille, R., Velayutham, M., und Zweier, J.L. (2007). Characterization of superoxide production from aldehyde oxidase: an important source of oxidants in biological tissues. *Archives of biochemistry and biophysics* 460, 113-121.
- Lake, B.G., Ball, S.E., Kao, J., Renwick, A.B., Price, R.J., und Scatina, J.A. (2002). Metabolism of zaleplon by human liver: evidence for involvement of aldehyde oxidase. *Xenobiotica* 32, 835-847.
- Langcake, P., und Pryce, R.J. (1976). The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury. *Physiological Plant Pathology* 9, 77-86.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., et al. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23, 2947-2948.
- Latxague, L., Christian, G., Coustille, J.L., Viaud, M.C., und Rollin, P. (1991). Identification of enzymatic degradation products from synthesized glucobrassicin by gas chromatography-mass spectrometry, Vol 586 Ausgabe.
- Lee, S.H., Kwon, Y.-C., Kim, D.-M., und Park, C.B. (2013). Cytochrome P450-catalyzed O-dealkylation coupled with photochemical NADPH regeneration. *Biotechnology and Bioengineering* 110, 383-390.
- Leete, E. (1963). The Biosynthesis of the Alkaloids of *Colchicum*. III. The Incorporation of Phenylalanine-2-C¹⁴ into Colchicine and Demecolcine. *Journal of the American Chemical Society* 85, 3666-3669.
- Li, M., und Sack, F.D. (2014). Myrosin Idioblast Cell Fate and Development Are Regulated by the *Arabidopsis* Transcription Factor FAMA, the Auxin Pathway, and Vesicular Trafficking. *The Plant cell* 26, 4053-4066.
- Liang, W.-S., und Li, D.-B. (2001). The two β -cyanoalanine synthase isozymes of tobacco showed different antioxidative abilities. *Plant Science* 161, 1171-1177.
- Lieberei, R., Biehl, B., Giesemann, A., und Junqueira, N.T.V. (1989). Cyanogenesis Inhibits Active Defense Reactions in Plants. *Plant physiology* 90, 33-36.
- Lipka, V., Dittgen, J., Bednarek, P., Bhat, R., Wiermer, M., Stein, M., Landtag, J., Brandt, W., Rosahl, S., Scheel, D., et al. (2005). Pre- and Postinvasion Defenses Both Contribute to Nonhost Resistance in *Arabidopsis*. *Science* 310, 1180-1183.
- Liu, B., Hong, Y.B., Zhang, Y.F., Li, X.H., Huang, L., Zhang, H.J., Li, D.Y., und Song, F.M. (2014). Tomato WRKY transcriptional factor SIDRW1 is required for disease resistance against *Botrytis cinerea* and tolerance to oxidative stress. *Plant science : an international journal of experimental plant biology* 227, 145-156.
- Liu, X., Wu, S., Xu, J., Sui, C., und Wei, J. (2017). Application of CRISPR/Cas9 in plant biology. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 7, 292-302.
- Lloyd, A., Plaisier, C.L., Carroll, D., und Drews, G.N. (2005). Targeted mutagenesis using zinc-finger nucleases in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 2232-2237.
- Lo, S.-C.C., De Verdier, K., und Nicholson, R.L. (1999). Accumulation of 3-deoxyanthocyanidin phytoalexins and resistance to *Colletotrichum sublineolum* in sorghum. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55, 263-273.
- Luna, E., Pastor, V., Robert, J., Flors, V., Mauch-Mani, B., und Ton, J. (2010). Callose Deposition: A Multifaceted Plant Defense Response. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 24, 183-193.

- Lynch, M., und Force, A. (2000). The Probability of Duplicate Gene Preservation by Subfunctionalization. *Genetics* 154, 459-473.
- Lyon, G.D., und Bayliss, C.E. (1975). The effect of rishitin on *Erwinia carotovora* var. *atroseptica* and other bacteria. *Physiological Plant Pathology* 6, 177-186.
- Machata, S. (2016). Enzyme des Indol-3-Acetonitril-Metabolismus in *Arabidopsis thaliana*: Funktion und physikalische Interaktion. *Bachelorarbeit*. Lehrstuhl für Botanik, TU münchen.
- Machingura, M., Salomon, E., Jez, J.M., und Ebbs, S.D. (2016). The β -cyanoalanine synthase pathway: beyond cyanide detoxification. *Plant, cell & environment* 39, 2329-2341.
- Maeda, H., und Dudareva, N. (2012). The Shikimate Pathway and Aromatic Amino Acid Biosynthesis in Plants. *Annual review of plant biology* 63, 73-105.
- Mao, G., Meng, X., Liu, Y., Zheng, Z., Chen, Z., und Zhang, S. (2011). Phosphorylation of a WRKY Transcription Factor by Two Pathogen-Responsive MAPKs Drives Phytoalexin Biosynthesis in *Arabidopsis*. *The Plant cell* 23, 1639-1653.
- Mathieu, Y., Guern, J., Kurkdjian, A., Manigault, P., Manigault, J., Zielinska, T., Gillet, B., Beloeil, J.-C., und Lallemand, J.-Y. (1989). Regulation of Vacuolar pH of Plant Cells. *Plant physiology* 89, 19-26.
- Mathieu, Y., Lapous, D., Thomine, S.C., und and Guern, J. (1996). Cytoplasmic acidification as an early phosphorylation-dependent response of tobacco cells to elicitors. *Planta* 199, 416-424.
- Megna, B.W., Carney, P.R., Nukaya, M., Geiger, P., und Kennedy, G.D. (2016). Indole-3-carbinol induces tumor cell death: function follows form. *J Surg Res* 204, 47-54.
- Melotto, M., Underwood, W., Koczan, J., Nomura, K., und He, S.Y. (2006). Plant Stomata Function in Innate Immunity against Bacterial Invasion. *Cell* 126, 969-980.
- Meng, X., und Zhang, S. (2013). MAPK Cascades in Plant Disease Resistance Signaling. *Annual review of phytopathology* 51, 245-266.
- Meunier, B., de Visser, S.P., und Shaik, S. (2004). Mechanism of Oxidation Reactions Catalyzed by Cytochrome P450 Enzymes. *Chemical Reviews* 104, 3947-3980.
- Mezencev, R., Updegrave, T., Kutschy, P., Repovska, M., und McDonald, J.F. (2011). Camalexin induces apoptosis in T-leukemia Jurkat cells by increased concentration of reactive oxygen species and activation of caspase-8 and caspase-9. *J Nat Med* 65, 488-499.
- Mikkelsen, M.D., Hansen, C.H., Wittstock, U., und 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. *The Journal of biological chemistry* 275, 33712-33717.
- Mikkelsen, M.D., Naur, P., und Halkier, B.A. (2004). Arabidopsis mutants in the C-S lyase of glucosinolate biosynthesis establish a critical role for indole-3-acetaldoxime in auxin homeostasis. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 37, 770-777.
- Millet, Y.A., Danna, C.H., Clay, N.K., Songnuan, W., Simon, M.D., Werck-Reichhart, D., und Ausubel, F.M. (2010). Innate immune responses activated in *Arabidopsis* roots by microbe-associated molecular patterns. *The Plant cell* 22, 973-990.
- Mithofer, A., und Boland, W. (2012). Plant defense against herbivores: chemical aspects. *Annual review of plant biology* 63, 431-450.
- Mizutani, M., und Sato, F. (2011). Unusual P450 reactions in plant secondary metabolism. *Archives of biochemistry and biophysics* 507, 194-203.
- Mojica, F.J.M., Díez-Villaseñor, C.s., García-Martínez, J., und Soria, E. (2005). Intervening Sequences of Regularly Spaced Prokaryotic Repeats Derive from Foreign Genetic Elements. *Journal of Molecular Evolution* 60, 174-182.
- Moscou, M.J., und Bogdanove, A.J. (2009). A Simple Cipher Governs DNA Recognition by TAL Effectors. *Science* 326, 1501-1501.
- Mostafa, I., Yoo, M.J., Zhu, N., Geng, S., Dufresne, C., Abou-Hashem, M., El-Domiaty, M., und Chen, S. (2017). Membrane Proteomics of Arabidopsis Glucosinolate Mutants *cyp79B2/B3* and *myb28/29*. *Frontiers in plant science* 8, 534.
- Moussaieff, A., Rogachev, I., Brodsky, L., Malitsky, S., Toal, T.W., Belcher, H., Yativ, M., Brady, S.M., Benfey, P.N., und Aharoni, A. (2013). High-resolution metabolic mapping of cell types in plant roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, E1232-E1241.
- Mucha, S. (2017). Phytoalexinbiosynthese in Brassicaceen: Interaktion Camalexin-spezifischer Enzyme und Etablierung von *Eutrema salsugineum* als Modellsystem. *Doktorarbeit*. Lehrstuhl für Botanik, Technische Universität München.
- Mugford, S.T., Louveau, T., Melton, R., Qi, X., Bakht, S., Hill, L., Tsurushima, T., Honkanen, S., Rosser, S.J., Lomonossoff, G.P., et al. (2013). Modularity of plant metabolic gene clusters: a

- trio of linked genes that are collectively required for acylation of triterpenes in oat. *The Plant cell* 25, 1078-1092.
- Müller, K.O., und Börger, H. (1940). Experimentelle Untersuchungen über die *Phytophthora*-Resistenz der Kartoffel. *Arb Biol Reichsanst Land Forstwirtschaft* 23, 189–231.
- Müller, T.M., Böttcher, C., Morbitzer, R., Götz, C.C., Lehmann, J., Lahaye, T., und Glawischnig, E. (2015). TALEN-mediated generation and metabolic analysis of camalexin-deficient *cyp71a12 cyp71a13* double knockout lines. *Plant physiology* 168, 849-858.
- Nafisi, M., Goregaoker, S., Botanga, C.J., Glawischnig, E., Olsen, C.E., Halkier, B.A., und Glazebrook, J. (2007). Arabidopsis cytochrome P450 monooxygenase 71A13 catalyzes the conversion of indole-3-acetaldoxime in camalexin synthesis. *The Plant cell* 19, 2039-2052.
- Nakano, R.T., Piślewska-Bednarek, M., Yamada, K., Edger, P.P., Miyahara, M., Kondo, M., Böttcher, C., Mori, M., Nishimura, M., Schulze-Lefert, P., et al. (2017). PYK10 myrosinase reveals a functional coordination between endoplasmic reticulum bodies and glucosinolates in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 89, 204-220.
- Narusaka, Y., Narusaka, M., Park, P., Kubo, Y., Hirayama, T., Seki, M., Shiraiishi, T., Ishida, J., Nakashima, M., Enju, A., et al. (2004). *RCH1*, a Locus in *Arabidopsis* That Confers Resistance to the Hemibiotrophic Fungal Pathogen *Colletotrichum higginsianum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17, 749-762.
- Nelson, D.R., Schuler, M.A., Paquette, S.M., Werck-Reichhart, D., und Bak, S. (2004a). Comparative genomics of rice and Arabidopsis. Analysis of 727 cytochrome P450 genes and pseudogenes from a monocot and a dicot. *Plant physiology* 135, 756-772.
- Nelson, D.R., Zeldin, D.C., Hoffman, S.M., Maltais, L.J., Wain, H.M., und Nebert, D.W. (2004b). Comparison of cytochrome P450 (CYP) genes from the mouse and human genomes, including nomenclature recommendations for genes, pseudogenes and alternative-splice variants. *Pharmacogenetics and Genomics* 14, 1-18.
- Nielsen, K.A., Tattersall, D.B., Jones, P.R., und Møller, B.L. (2008). Metabolon formation in dhurrin biosynthesis. *Phytochemistry* 69, 88-98.
- Niyogi, K.K., Last, R.L., Fink, G.R., und Keith, B. (1993). Suppressors of *trp1* fluorescence identify a new arabidopsis gene, *TRP4*, encoding the anthranilate synthase beta subunit. *The Plant cell* 5, 1011-1027.
- Normanly, J., Grisafi, P., Fink, G.R., und Bartel, B. (1997). Arabidopsis mutants resistant to the auxin effects of indole-3-acetonitrile are defective in the nitrilase encoded by the *NIT1* gene. *The Plant cell* 9, 1781-1790.
- Nützmann, H.-W., Huang, A., und Osbourn, A. (2016). Plant metabolic clusters – from genetics to genomics. *New Phytologist* 211, 771-789.
- Ober, D. (2005). Seeing double: gene duplication and diversification in plant secondary metabolism. *Trends in plant science* 10, 444-449.
- Ollilainen, V. (1999). HPLC analysis of vitamin B6 in foods. *Agri Food Sci* 8, 519–618.
- Omarov, R.T., Akaba, S., Koshiba, T., und Lips, S.H. (1999). Aldehyde oxidase in roots, leaves and seeds of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of experimental botany* 50, 63-69.
- Omura, T., und Sato, R. (1964). The Carbon Monoxide-Binding Pigment of Liver Microsomes. II. Solubilization, Purification, and Properties. *The Journal of biological chemistry* 239, 2379-2385.
- Ordon, J., Gantner, J., Kemna, J., Schwalgun, L., Reschke, M., Streubel, J., Boch, J., und Stüttmann, J. (2017). Generation of chromosomal deletions in dicotyledonous plants employing a user-friendly genome editing toolkit. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 89, 155-168.
- World Health Organization (2002). WHO traditional medicine strategy 2002-2005.
- Ortiz de Montellano, P.R., und Nelson, S.D. (2011). Rearrangement reactions catalyzed by cytochrome P450s. *Archives of biochemistry and biophysics* 507, 95-110.
- Osbourn, A.E., Clarke, B.R., Lunness, P., Scott, P.R., und Daniels, M.J. (1994). An oat species lacking avenacin is susceptible to infection by *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 45, 457-467.
- Otomo, K., Kanno, Y., Motegi, A., Kenmoku, H., Yamane, H., Mitsuhashi, W., Oikawa, H., Toshima, H., Itoh, H., Matsuoka, M., et al. (2004). Diterpene Cyclases Responsible for the Biosynthesis of Phytoalexins, Momilactones A, B, and Oryzalexins A–F in Rice. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 68, 2001-2006.
- Otto, M. (2015). Characterisation of a *cyp71a* triple mutant and conservation of WRKY33 in Brassicacean phytoalexin biosynthesis. *Bachelorarbeit*. Lehrstuhl für Genetik, Technische Universität München.

- Pacher, M., Schmidt-Puchta, W., und Puchta, H. (2007). Two unlinked double-strand breaks can induce reciprocal exchanges in plant genomes via homologous recombination and nonhomologous end joining. *Genetics* 175, 21-29.
- Paddon, C.J., Westfall, P.J., Pitera, D.J., Benjamin, K., Fisher, K., McPhee, D., Leavell, M.D., Tai, A., Main, A., Eng, D., et al. (2013). High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin. *Nature* 496, 528-532.
- Pan, D., und Zhang, L. (2008). Tandemly Arrayed Genes in Vertebrate Genomes. *Comparative and Functional Genomics* 2008, 11.
- Panchy, N., Lehti-Shiu, M., und Shiu, S.-H. (2016). Evolution of Gene Duplication in Plants. *Plant physiology* 171, 2294-2316.
- Park, H.L., Lee, S.-W., Jung, K.-H., Hahn, T.-R., und Cho, M.-H. (2013). Transcriptomic analysis of UV-treated rice leaves reveals UV-induced phytoalexin biosynthetic pathways and their regulatory networks in rice. *Phytochemistry* 96, 57-71.
- Paul, P.K., und Sharma, P.D. (2002). *Azadirachta indica* leaf extract induces resistance in barley against leaf stripe disease. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 61, 3-13.
- Pedras, M.S., und Adio, A.M. (2008). Phytoalexins and phytoanticipins from the wild crucifers *Thellungiella halophila* and *Arabidopsis thaliana*: rapalexin A, wasalexins and camalexin. *Phytochemistry* 69, 889-893.
- Pedras, M.S., Hossain, S., und Snitynsky, R.B. (2011a). Detoxification of cruciferous phytoalexins in *Botrytis cinerea*: spontaneous dimerization of a camalexin metabolite. *Phytochemistry* 72, 199-206.
- Pedras, M.S., Minic, Z., und Abdoli, A. (2014). The phytoalexin camalexin induces fundamental changes in the proteome of *Alternaria brassicicola* different from those caused by brassinin. *Fungal biology* 118, 83-93.
- Pedras, M.S., und Yaya, E.E. (2015). Plant chemical defenses: are all constitutive antimicrobial metabolites phytoanticipins? *Natural product communications* 10, 209-218.
- Pedras, M.S., Yaya, E.E., und Glawischnig, E. (2011b). The phytoalexins from cultivated and wild crucifers: chemistry and biology. *Natural product reports* 28, 1381-1405.
- Pedras, M.S., Zheng, Q.A., Gadagi, R.S., und Rimmer, S.R. (2008). Phytoalexins and polar metabolites from the oilseeds canola and rapeseed: differential metabolic responses to the biotroph *Albugo candida* and to abiotic stress. *Phytochemistry* 69, 894-910.
- Pedras, M.S.C., Nycholat, C.M., Montaut, S., Xu, Y., und Khan, A.Q. (2002). Chemical defenses of crucifers: elicitation and metabolism of phytoalexins and indole-3-acetonitrile in brown mustard and turnip. *Phytochemistry* 59, 611-625.
- Petersen, K., Fiil, B.K., Mundy, J., und Petersen, M. (2008). Downstream targets of WRKY33. *Plant Signal Behav* 3, 1033-1034.
- Pezet, R., und Pont, V. (1990). Ultrastructural Observations of Pterostilbene Fungitoxicity in Dormant Conidia of *Botrytis cinerea* Pers. *Journal of Phytopathology* 129, 19-30.
- Pieterse, C.M., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S., und Van Wees, S.C. (2009). Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature chemical biology* 5, 308-316.
- Poloni, A., und Schirawski, J. (2014). Red card for pathogens: phytoalexins in sorghum and maize. *Molecules* 19, 9114-9133.
- Puchta, H. (2016). Applying CRISPR/Cas for genome engineering in plants: the best is yet to come. *Current opinion in plant biology* 36, 1-8.
- Rajniak, J., Barco, B., Clay, N.K., und Sattely, E.S. (2015). A new cyanogenic metabolite in *Arabidopsis* required for inducible pathogen defence. *Nature* 525, 376-379.
- Ranf, S., Eschen-Lippold, L., Pecher, P., Lee, J., und Scheel, D. (2011). Interplay between calcium signalling and early signalling elements during defence responses to microbe- or damage-associated molecular patterns. *The Plant Journal* 68, 100-113.
- Rashidi, M.R., Smith, J.A., Clarke, S.E., und Beedham, C. (1997). In vitro oxidation of famciclovir and 6-deoxypenciclovir by aldehyde oxidase from human, guinea pig, rabbit, and rat liver. *Drug Metab Dispos* 25.
- Rasmann, S., Kollner, T.G., Degenhardt, J., Hiltbold, I., Toepfer, S., Kuhlmann, U., Gershenzon, J., und Turlings, T.C.J. (2005). Recruitment of entomopathogenic nematodes by insect-damaged maize roots. *Nature* 434, 732-737.
- Rasulov, B., Talts, E., und Niinemets, U. (2016). Spectacular oscillations in plant isoprene emission explain the enigmatic CO₂ response. *Plant physiology*.
- Reuveni, M., und Cohen, Y. (1978). Growth retardation and changes in phenolic compounds, with special reference to scopoletin, in mildewed and ethylene-treated tobacco plants. *Physiological Plant Pathology* 12, 179-189.

- Rochfort, S.J., Trener, V.C., Imsic, M., Panozzo, J., und Jones, R. (2008). Class targeted metabolomics: ESI ion trap screening methods for glucosinolates based on MSn fragmentation. *Phytochemistry* 69, 1671-1679.
- Rodgers, K., und McVey, M. (2016). Error-Prone Repair of DNA Double-Strand Breaks. *J Cell Physiol* 231, 15-24.
- Rogers, E.E., Glazebrook, J., und Ausubel, F.M. (1996). Mode of action of the *Arabidopsis thaliana* phytoalexin camalexin and its role in *Arabidopsis*-pathogen interactions. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* 9, 748-757.
- Rosa, T., Monica, R.L., Federica, M., Giancarlo, A.S., und Francesco, M. (2008). Biological and Pharmacological Activities of Iridoids: Recent Developments. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 8, 399-420.
- Rowe, H.C., Walley, J.W., Corwin, J., Chan, E.K.F., Dehesh, K., und Kliebenstein, D.J. (2010). Deficiencies in Jasmonate-Mediated Plant Defense Reveal Quantitative Variation in *Botrytis cinerea* Pathogenesis. *PLOS Pathogens* 6, e1000861.
- Saga, H., Ogawa, T., Kai, K., Suzuki, H., Ogata, Y., Sakurai, N., Shibata, D., und Ohta, D. (2012). Identification and characterization of *ANAC042*, a transcription factor family gene involved in the regulation of camalexin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* 25, 684-696.
- Sagi, M., und Fluhr, R. (2006). Production of Reactive Oxygen Species by Plant NADPH Oxidases. *Plant physiology* 141, 336-340.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., und Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning : a laboratory manual* Ausgabe (Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory).
- Sampson, D.A., Eoff, L.A., Yan, X.L., und Loren, K. (1995). Analysis of Free and Glycosylated Vitamin B6 in Wheat by High-Performance Liquid Chromatography.
- Sarett, H.P. (1951). A study of the measurement of 4-pyridoxic acid in urine. *Journal of Biological Chemistry* 189, 769-777.
- Schiestl, F.P. (2010). The evolution of floral scent and insect chemical communication. *Ecol Lett* 13, 643-656.
- Schimpl, S., Fauser, F., und Puchta, H. (2014). The CRISPR/Cas system can be used as nuclease for in planta gene targeting and as paired nickases for directed mutagenesis in *Arabidopsis* resulting in heritable progeny. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 80, 1139-1150.
- Schimpl, S., und Puchta, H. (2016). Revolutionizing plant biology: multiple ways of genome engineering by CRISPR/Cas. *Plant Methods* 12, 8.
- Schlaeppli, K., Abou-Mansour, E., Buchala, A., und Mauch, F. (2010). Disease resistance of *Arabidopsis* to *Phytophthora brassicae* is established by the sequential action of indole glucosinolates and camalexin. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 62, 840-851.
- Schlaeppli, K., Bodenhausen, N., Buchala, A., Mauch, F., und Reymond, P. (2008). The glutathione-deficient mutant *pad2-1* accumulates lower amounts of glucosinolates and is more susceptible to the insect herbivore *Spodoptera littoralis*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 55, 774-786.
- Schmelz, E.A., Huffaker, A., Sims, J.W., Christensen, S.A., Lu, X., Okada, K., und Peters, R.J. (2014). Biosynthesis, elicitation and roles of monocot terpenoid phytoalexins. *The Plant Journal* 79, 659-678.
- Schreiber, L., Hartmann, K., Skrabs, M., und Zeier, J. (1999). Apoplastic barriers in roots: chemical composition of endodermal and hypodermal cell walls. *Journal of experimental botany* 50, 1267-1280.
- Schuhegger, R., Nafisi, M., Mansourova, M., Petersen, B.L., Olsen, C.E., Svatos, A., Halkier, B.A., und Glawischnig, E. (2006). CYP71B15 (PAD3) catalyzes the final step in camalexin biosynthesis. *Plant physiology* 141, 1248-1254.
- Schuhegger, R., Rauhut, T., und Glawischnig, E. (2007). Regulatory variability of camalexin biosynthesis. *Journal of plant physiology* 164, 636-644.
- Schuler, M.A., Duan, H., Bilgin, M., und Ali, S. (2006). *Arabidopsis* cytochrome P450s through the looking glass: a window on plant biochemistry. *Phytochemistry Reviews* 5, 205-237.
- Schwartz, R., und Kjeldgaard, N.O. (1951). The enzymic oxidation of pyridoxal by liver aldehyde oxidase. *Biochem J* 48.
- Seo, M., Aoki, H., Koiwai, H., Kamiya, Y., Nambara, E., und Koshiba, T. (2004). Comparative studies on the *Arabidopsis* aldehyde oxidase (AAO) gene family revealed a major role of AAO3 in ABA biosynthesis in seeds. *Plant Cell Physiol* 45, 1694-1703.
- Seo, M., Koiwai, H., Akaba, S., Komano, T., Oritani, T., Kamiya, Y., und Koshiba, T. (2000). Abscisic aldehyde oxidase in leaves of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 23, 481-488.

- Seo, S., Mitsuhashi, I., Feng, J., Iwai, T., Hasegawa, M., und Ohashi, Y. (2011). Cyanide, a Coproduct of Plant Hormone Ethylene Biosynthesis, Contributes to the Resistance of Rice to Blast Fungus. *Plant physiology* 155, 502-514.
- Shephard, E.A., Phillips, I.R., Bayney, R.M., Pike, S.F., und Rabin, B.R. (1983). Quantification of NADPH: cytochrome P-450 reductase in liver microsomes by a specific radioimmunoassay technique. *Biochemical Journal* 211, 333-340.
- Shirakawa, M., Ueda, H., Shimada, T., und Hara-Nishimura, I. (2016). Myrosin cells are differentiated directly from ground meristem cells and are developmentally independent of the vasculature in *Arabidopsis* leaves. *Plant Signaling & Behavior* 11, e1150403.
- Shlezinger, N., Minz, A., Gur, Y., Hatam, I., Dagdas, Y.F., Talbot, N.J., und Sharon, A. (2011). Anti-Apoptotic Machinery Protects the Necrotrophic Fungus *Botrytis cinerea* from Host-Induced Apoptotic-Like Cell Death during Plant Infection. *PLoS Pathogens* 7, e1002185.
- Siegień, I., und Bogatek, R. (2006). Cyanide action in plants — from toxic to regulatory. *Acta Physiologiae Plantarum* 28, 483-497.
- Siemens, J., Glawischnig, E., und Ludwig-Müller, J. (2008). Indole Glucosinolates and Camalexin do not Influence the Development of the Clubroot Disease in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Phytopathology* 156, 332-337.
- Sitton, D., und West, C.A. (1975). Casbene: An anti-fungal diterpene produced in cell-free extracts of *Ricinus communis* seedlings. *Phytochemistry* 14, 1921-1925.
- Smith, B., Randle, D., Mezencev, R., Thomas, L., Hinton, C., und Odero-Marah, V. (2014). Camalexin-induced apoptosis in prostate cancer cells involves alterations of expression and activity of lysosomal protease cathepsin D. *Molecules* 19, 3988-4005.
- Smith, B.A., Neal, C.L., Chetram, M., Vo, B., Mezencev, R., Hinton, C., und Odero-Marah, V.A. (2013). The phytoalexin camalexin mediates cytotoxicity towards aggressive prostate cancer cells via reactive oxygen species. *J Nat Med* 67, 607-618.
- Sønderby, I.E., Geu-Flores, F., und Halkier, B.A. (2010). Biosynthesis of glucosinolates—gene discovery and beyond. *Trends in plant science* 15, 283-290.
- Song, L., und Thornalley, P.J. (2007). Effect of storage, processing and cooking on glucosinolate content of *Brassica* vegetables. *Food and Chemical Toxicology* 45, 216-224.
- Song, Y., Lai, L., und Li, Z. (2017). Large-scale genomic deletions mediated by CRISPR/Cas9 system. *Oncotarget* 8, 5647-5647.
- Sotelo-Silveira, M., Cucinotta, M., Chauvin, A.L., Chavez Montes, R.A., Colombo, L., Marsch-Martinez, N., und de Folter, S. (2013). Cytochrome P450 CYP78A9 is involved in *Arabidopsis* reproductive development. *Plant physiology* 162, 779-799.
- Srivastava, S., Brychkova, G., Yarmolinsky, D., Soltabayeva, A., Samani, T., und Sagi, M. (2017). Aldehyde Oxidase 4 plays a critical role in delaying silique senescence by catalyzing aldehyde detoxification. *Plant physiology*.
- Staats, M., und van Kan, J.A.L. (2012). Genome update of *Botrytis cinerea* strains B05.10 and T4. *Eukaryot Cell* 11, 1413-1414.
- Stanulović, M., und Chaykin, S. (1971). Aldehyde oxidase: Catalysis of the oxidation of N1-methylnicotinamide and pyridoxal. *Archives of biochemistry and biophysics* 145, 27-34.
- Stefanato, F.L., Abou-Mansour, E., Buchala, A., Kretschmer, M., Mosbach, A., Hahn, M., Bochet, C.G., Metraux, J.P., und Schoonbeek, H.J. (2009). The ABC transporter BcatrB from *Botrytis cinerea* exports camalexin and is a virulence factor on *Arabidopsis thaliana*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 58, 499-510.
- Su, T., Xu, J., Li, Y., Lei, L., Zhao, L., Yang, H., Feng, J., Liu, G., und Ren, D. (2011). Glutathione-indole-3-acetonitrile is required for camalexin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant cell* 23, 364-380.
- Sugihara, K., Kitamura, S., Tatsumi, K., Asahara, T., und Dohi, K. (1997). Differences in aldehyde oxidase activity in cytosolic preparations of human and monkey liver. *Biochem Mol Biol Int* 41, 1153-1160.
- Sunilkumar, G., Campbell, L.M., Puckhaber, L., Stipanovic, R.D., und Rathore, K.S. (2006). Engineering cottonseed for use in human nutrition by tissue-specific reduction of toxic gossypol. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 18054-18059.
- Tanaka, Y., und Brugliera, F. (2013). Flower colour and cytochromes P450. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 368, 20120432.
- Tang, G., Qin, J., Dolnikowski, G.G., Russell, R.M., und Grusak, M.A. (2009). Golden Rice is an effective source of vitamin A. *The American Journal of Clinical Nutrition* 89, 1776-1783.
- Taylor, I.B., Linforth, R.S.T., Alnaieb, R.J., Bowman, W.R., und Marples, B.A. (1988). The Wilty Tomato Mutants *Flacca* and *Sitiens* Are Impaired in the Oxidation of Aba-Aldehyde to Aba. *Plant Cell and Environment* 11, 739-745.

- Testerink, C., und Munnik, T. (2011). Molecular, cellular, and physiological responses to phosphatidic acid formation in plants. *Journal of experimental botany* 62, 2349-2361.
- The Arabidopsis Genome, I. (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408, 796.
- Thomma, B.P., Eggermont, K., Penninckx, I.A., Mauch-Mani, B., Vogelsang, R., Cammue, B.P., und Broekaert, W.F. (1998). Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 15107-15111.
- Thomma, B.P., Nelissen, I., Eggermont, K., und Broekaert, W.F. (1999). Deficiency in phytoalexin production causes enhanced susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to the fungus *Alternaria brassicicola*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 19, 163-171.
- Tischlerova, V., Kello, M., Budovska, M., und Mojzis, J. (2017). Indole phytoalexin derivatives induce mitochondrial-mediated apoptosis in human colorectal carcinoma cells. *World Journal of Gastroenterology* 23, 4341-4353.
- Tomita, S., Tsujita, M., und Ichikawa, Y. (1993). Retinal oxidase is identical to aldehyde oxidase. *FEBS Letters* 336, 272-274.
- Torres, R., Martin, M.C., Garcia, A., Cigudosa, J.C., Ramirez, J.C., und Rodriguez-Perales, S. (2014). Engineering human tumour-associated chromosomal translocations with the RNA-guided CRISPR-Cas9 system. 5, 3964.
- Torres Ruiz, R.A., Haupt, W., und Haberer, G. (1998). The use of balanced lines for preservation of mutants in *Arabidopsis* and other plants. *Journal of experimental botany* 49, 1597-1601.
- Townsend, J.A., Wright, D.A., Winfrey, R.J., Fu, F., Maeder, M.L., Joung, J.K., und Voytas, D.F. (2009). High-frequency modification of plant genes using engineered zinc-finger nucleases. *Nature* 459, 442.
- Traka, M., und Mithen, R. (2009). Glucosinolates, isothiocyanates and human health. *Phytochemistry Rev* 8, 269-282.
- Tsuda, K., und Katagiri, F. (2010). Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity. *Current opinion in plant biology* 13, 459-465.
- Tsuji, J., Jackson, E.P., Gage, D.A., Hammerschmidt, R., und Somerville, S.C. (1992). Phytoalexin Accumulation in *Arabidopsis thaliana* during the Hypersensitive Reaction to *Pseudomonas syringae* pv *syringae*. *Plant physiology* 98, 1304-1309.
- Tzin, V., und Galili, G. (2010). The Biosynthetic Pathways for Shikimate and Aromatic Amino Acids in *Arabidopsis thaliana*. *The Arabidopsis Book*, e0132.
- Ubbink, J.B., Serfontein, W.J., Becker, P.J., und Devilliers, L.S. (1986). Determination of Urinary 4-Pyridoxic Acid Levels as 4-Pyridoxic Acid Lactone Using High-Performance Liquid-Chromatography. *Am J Clin Nutr* 44, 698-703.
- Unger, J.M., Hershman, D.L., Martin, D., Etzioni, R.B., Barlow, W.E., LeBlanc, M., und Ramsey, S.R. (2015). The Diffusion of Docetaxel in Patients With Metastatic Prostate Cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 107, dju412-dju412.
- Uritani, I., Uritani, M., und Yamada, H. (1960). Similar metabolic alterations induced in Sweet Potato by poisonous chemicals and by *Ceratostomella fimbriata*. *Phytopathology* 50.
- Van Der Biezen, E.A., und Jones, J.D.G. (1998). Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends in Biochemical Sciences* 23, 454-456.
- van Kan, J.A.L. (2006). Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. *Trends in plant science* 11, 247-253.
- VanEtten, H.D., Mansfield, J.W., Bailey, J.A., und Farmer, E.E. (1994). Two Classes of Plant Antibiotics: Phytoalexins versus "Phytoanticipins". *The Plant cell* 6, 1191-1192.
- Verhage, A., van Wees, S.C., und Pieterse, C.M. (2010). Plant immunity: it's the hormones talking, but what do they say? *Plant physiology* 154, 536-540.
- Viljoen, A., Mncwangi, N., und Vermaak, I. (2012). Anti-Inflammatory Iridoids of Botanical Origin. *Current Medicinal Chemistry* 19, 2104-2127.
- Wagner, A.E., und Rimbach, G. (2009). Ascorbigen: chemistry, occurrence, and biologic properties. *Clinics in dermatology* 27, 217-224.
- Wagner, L., und Flores, H. (1994). Effect of taxol and related compounds on growth of plant pathogenic fungi. *Phytopathology* 84, 1173-1178.
- Waki, T., Yoo, D., Fujino, N., Mameda, R., Denessiouk, K., Yamashita, S., Motohashi, R., Akashi, T., Aoki, T., Ayabe, S., et al. (2016). Identification of protein-protein interactions of isoflavonoid biosynthetic enzymes with 2-hydroxyisoflavanone synthase in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *Biochemical and biophysical research communications* 469, 546-551.

- Wang, K.L.-C., Li, H., und Ecker, J.R. (2002). Ethylene Biosynthesis and Signaling Networks. *The Plant cell* 14, S131-S151.
- Wang, M.Y., Liu, X.T., Chen, Y., Xu, X.J., Yu, B., Zhang, S.Q., Li, Q., und He, Z.H. (2012). *Arabidopsis* acetyl-amido synthetase GH3.5 involvement in camalexin biosynthesis through conjugation of indole-3-carboxylic acid and cysteine and upregulation of camalexin biosynthesis genes. *J Integr Plant Biol* 54, 471-485.
- Wang, Z.P., Xing, H.L., Dong, L., Zhang, H.Y., Han, C.Y., Wang, X.C., und Chen, Q.J. (2015). Egg cell-specific promoter-controlled CRISPR/Cas9 efficiently generates homozygous mutants for multiple target genes in *Arabidopsis* in a single generation. *Genome biology* 16, 144.
- Weaver, B.A. (2014). How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. *Molecular Biology of the Cell* 25, 2677-2681.
- Wilkinson, J.E., Twell, D., und Lindsey, K. (1997). Activities of CaMV 35S and nos promoters in pollen: implications for field release of transgenic plants. *Journal of experimental botany* 48, 265-275.
- Williams, P.A., Cosme, J., Sridhar, V., Johnson, E.F., und McRee, D.E. (2000). Mammalian Microsomal Cytochrome P450 Monooxygenase. *Molecular Cell* 5, 121-131.
- Winter, D., Vinegar, B., Nahal, H., Ammar, R., Wilson, G.V., und Provart, N.J. (2007). An "Electronic Fluorescent Pictograph" browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS one* 2, e718.
- Wishnick, M., und Lane, M.D. (1969). Inhibition of Ribulose Diphosphate Carboxylase by Cyanide: INACTIVE TERNARY COMPLEX OF ENZYME, RIBULOSE DIPHOSPHATE, AND CYANIDE. *Journal of Biological Chemistry* 244, 55-59.
- Wolters, A.-M.A., Caro, M., Dong, S., Finkers, R., Gao, J., Visser, R.G.F., Wang, X., Du, Y., und Bai, Y. (2015). Detection of an inversion in the Ty-2 region between *S. lycopersicum* and *S. habrochaites* by a combination of de novo genome assembly and BAC cloning. *TAG Theoretical and Applied Genetics Theoretische Und Angewandte Genetik* 128, 1987-1997.
- Xiao, A., Wang, Z., Hu, Y., Wu, Y., Luo, Z., Yang, Z., Zu, Y., Li, W., Huang, P., Tong, X., et al. (2013). Chromosomal deletions and inversions mediated by TALENs and CRISPR/Cas in zebrafish. *Nucleic acids research* 41, e141.
- Xing, H.L., Dong, L., Wang, Z.P., Zhang, H.Y., Han, C.Y., Liu, B., Wang, X.C., und Chen, Q.J. (2014). A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants. *BMC plant biology* 14, 327.
- Ye, X., Al-Babili, S., Klöti, A., Zhang, J., Lucca, P., Beyer, P., und Potrykus, I. (2000). Engineering the Provitamin A (β -Carotene) Biosynthetic Pathway into (Carotenoid-Free) Rice Endosperm. *Science* 287, 303-305.
- Yesbergenova, Z., Yang, G., Oron, E., Soffer, D., Fluhr, R., und Sagi, M. (2005). The plant Mo-hydroxylases aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase have distinct reactive oxygen species signatures and are induced by drought and abscisic acid. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 42, 862-876.
- Yip, W.-K., und Yang, S.F. (1988). Cyanide Metabolism in Relation to Ethylene Production in Plant Tissues. *Plant physiology* 88, 473-476.
- Yu, J., Tehrim, S., Wang, L., Dossa, K., Zhang, X., Ke, T., und Liao, B. (2017a). Evolutionary history and functional divergence of the cytochrome P450 gene superfamily between *Arabidopsis thaliana* and Brassica species uncover effects of whole genome and tandem duplications. *BMC genomics* 18, 733.
- Yu, X., Feng, B., He, P., und Shan, L. (2017b). From Chaos to Harmony: Responses and Signaling upon Microbial Pattern Recognition. *Annual review of phytopathology* 55, 109-137.
- Yue, Q., Bacon, C.W., und Richardson, M.D. (1998). Biotransformation of 2-benzoxazolinone and 6-methoxy-benzoxazolinone by *Fusarium moniliforme*. *Phytochemistry* 48, 451-454.
- Zarepour, M., Simon, K., Wilch, M., Nielander, U., Koshiba, T., Seo, M., Lindel, T., und Bittner, F. (2012). Identification of superoxide production by *Arabidopsis thaliana* aldehyde oxidases AAO1 and AAO3. *Plant molecular biology* 80, 659-671.
- Zdunek-Zastocka, E., Omarov, R.T., Koshiba, T., und Lips, H.S. (2004). Activity and protein level of AO isoforms in pea plants (*Pisum sativum* L.) during vegetative development and in response to stress conditions. *Journal of experimental botany* 55, 1361-1369.
- Zhang, P.G., Sutton, J.C., und Hopkin, A.A. (1994). Evaluation of microorganisms for biocontrol of *Botrytis cinerea* in container-grown black spruce seedlings. *Canadian Journal of Forest Research* 24, 1312-1316.
- Zhao, J., und Last, R.L. (1995). Immunological Characterization and Chloroplast Localization of the Tryptophan Biosynthetic Enzymes of the Flowering Plant *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* 270, 6081-6087.

- Zhao, Y., Hull, A.K., Gupta, N.R., Goss, K.A., Alonso, J., Ecker, J.R., Normanly, J., Chory, J., und Celenza, J.L. (2002). Trp-dependent auxin biosynthesis in *Arabidopsis*: involvement of cytochrome P450s CYP79B2 and CYP79B3. *Genes & development* 16, 3100-3112.
- Zhou, C., Tokuhisa, J.G., Bevan, D.R., und Esen, A. (2012). Properties of β -thioglucoside hydrolases (TGG1 and TGG2) from leaves of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science* 191-192, 82-92.
- Zhou, H., Liu, B., Weeks, D.P., Spalding, M.H., und Yang, B. (2014). Large chromosomal deletions and heritable small genetic changes induced by CRISPR/Cas9 in rice. *Nucleic acids research* 42, 10903-10914.
- Zhou, N., Tootle, T.L., und Glazebrook, J. (1999). *Arabidopsis* *PAD3*, a gene required for camalexin biosynthesis, encodes a putative cytochrome P450 monooxygenase. *The Plant cell* 11, 2419-2428.

8. Danksagung

Zunächst danke ich meinem Doktorvater Erich Glawischnig für die Möglichkeit, bei ihm meine Doktorarbeit anfertigen zu dürfen. Der herzliche und zwanglose Umgang innerhalb der Arbeitsgruppe ermöglichte das Einbringen eigener Ideen und Diskussionen auf Augenhöhe.

Ich danke ebenso meinem Zweitprüfer Prof. Dr. Wilfried Schwab und dem Prüfungsvorsitzenden Prof. Dr. Erwin Grill für die Begutachtung und Prüfung meiner Dissertation.

Ein besonderer Dank geht an unsere Kollaborationspartner Dr. Robert Morbitzer, Prof. Dr. Thomas Lahaye, Dr. Karin Kleigrew, Dr. Jürgen Behr und allen voran Dr. Christoph Böttcher, dessen tatkräftige Unterstützung für diese Arbeit und die daraus entstandenen und noch entstehenden Publikationen unverzichtbar war und ist.

Des Weiteren danke ich dem ehemaligen Lehrstuhl für Genetik und dem Lehrstuhl für Botanik für die Unterstützung unserer und meiner Arbeit in allen Belangen. Neben meinem Dank an die Professoren Gierl und Grill möchte ich ein extra Lob an die guten Seelen Carolin und Beate richten, die immer eine Lösung für alle bürokratischen Herausforderungen hatten.

Die Zeit in Freising wäre nicht dieselbe gewesen ohne meine Kollegen Steffi, Moritz, Sebastian, Natalie, Michl, Aaron und alle anderen. Steffi ist sicherlich das Musterexemplar einer Kollegin. Meistens jedenfalls. Es ist nicht selbstverständlich, so viele Menschen, mit denen man den Arbeitsalltag bestreitet, auch als Freunde bezeichnen zu können.

Zu den besten Dingen, die mir in den letzten Jahren passiert sind, gehört zweifellos meine WG. Grade am Anfang war es diese zweite Familie, die so manches Mal die Dinge wieder grade gerückt hat. Aber auch der richtigen Familie, meinen Eltern, Kerstin und auch Jürgen, möchte ich an dieser Stelle danken, für ihr *laissez-faire*, ihre Unterstützung und ihre Geduld.

9. Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name Teresa Müller
Geburtsdatum 20.08.1986
Geburtsort Würzburg

Berufstätigkeit

04/2013-10/2017 **Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Rahmen einer Dissertation** am Lehrstuhl für Genetik/Botanik, TU München (apl. Prof. Dr. E. Glawischnig). Forschungsthema: *Das Biosynthesenetzwerk indolischer Sekundärmetabolite in Arabidopsis thaliana*.

06/2011-10/2012 **Wissenschaftliche Mitarbeiterin** am Lehrstuhl für Lebensmittelchemie, Julius-Maximilians-Universität Würzburg (Prof. Dr. L. Lehmann)

Ausbildung und Studium

12/2011-11/2012 **Berufspraktische Ausbildung zur staatlich geprüften Lebensmittelchemikerin** am Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit.

11/2011 **Praktikum** an der Bayerischen Landesanstalt für Wein- und Gartenbau, Veitshöchheim. Thema: *Mykorrhizierung von Stadtbäumen*

10/2006 -04/2011 **Studium der Lebensmittelchemie** an der Julius-Maximilians-Universität, Würzburg. Abschluss: Staatsexamen
Thema der wissenschaftlichen Abschlussarbeit: *Untersuchung der Genexpression und des Metabolismus weiblicher Rattenleberpräzisionsgewebeschnitte mittels biochemischer und chromatographischer Methoden*

06/2006 **Abitur** am Friedrich-Koenig Gymnasium, Würzburg.

10. Publikationen

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

TRANSCRIPTION ACTIVATOR-LIKE EFFECTOR NUCLEASE-Mediated Generation and Metabolic Analysis of Camalexin-Deficient cyp71a12 cyp71a13 Double Knockout Lines. **Müller TM**, Böttcher C, Morbitzer R, Götz CC, Lehmann J, Lahaye T, Glawischnig E. *Plant Physiol.* 2015 Jul;168(3):849-58.

Konferenzbeitrag auf dem Plant Biology Europe EPSO/FESPB Congress 2016 in Prag. “*Cytochrome P450 enzymes in the Arabidopsis indole-3-acetonitrile metabolic network: Biological functions and protein-protein interactions*”

Konferenzbeitrag auf der International Glucosinolate Conference 2017 in Berlin. “*The metabolic network of tryptophan-derived defence compounds in Arabidopsis*”.

Weitere Publikationen:

Substantial reprogramming of the Eutrema salsugineum (Thellungiella salsuginea) transcriptome in response to UV and silver nitrate challenge. Mucha S, Walther D, **Müller TM**, Hinch DK, Glawischnig E. *BMC Plant Biol.* 2015 Jun 12;15:137.

Sustained exposure to abscisic acid enhances the colonization potential of the mutualist fungus Piriformospora indica on Arabidopsis thaliana roots. Peskan-Berghöfer T, Vilches-Barro A, **Müller TM**, Glawischnig E, Reichelt M, Gershenzon J, Rausch T. *New Phytol.* 2015 Nov;208(3):873-86.