Lehrstuhl für Genetik der Technischen Universität München

Die Evolution der Benzoxazinoid-Biosynthese in den Gramineae

Sebastian Grün

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzende:	UnivProf. Dr. S. Weinkauf
Prüfer der Dissertation:	1. UnivProf. Dr. A. Gierl
	2. UnivProf. Dr. Dr. A. Bacher

Die Dissertation wurde am 30. 05. 2001 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 10. 07. 2001 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Substanzen der generellen Abwehr in Gräsern	1
1.1	Die DIMBOA-Biosynthese in Zea mays	4
1.1	Cytochrom P450-Enzyme	6
1.1	Zielsetzung der Arbeit	8
2	Material und Methoden	9
2.1	Abkürzungen	9
2.2	Chemikalien und Reagenzien	11
2.3	Antikörper	11
2.4	Plasmide	12
2.5	LAMBDA-Bakteriophagen	12
2.6	Bakterienstämme	12
2.7	S. cerevisiae	13
2.7.1	Verwendete Hefestämme	13
2.7.2	Anzucht und Induktion der Zellen	13
2.8	Pflanzenmaterial	14
2.8.1	Gersten-Arten und -Linien, sowie deren Anzucht	14
2.8.2	Anzucht von Mais- und Weizenkeimlingen	15
2.8.3	Anzucht von Roggenkeimlingen	16
2.8.4	Anzucht von Reiskeimlingen	16
2.9	Molekulargenetische Methoden	16
2.9.1	DNA-Isolierung	16
2.9.2	RNA-Isolierung und cDNA-Synthese	17
2.9.3	PCR	17
2.9.4	DNA-Sequenzierung	18
2.9.5	Southern-Analyse	20
2.9.6	DNA-Klonierungstechniken	20
2.9.7	Adaptoren	20
2.9.7.1	Herstellung von Adaptoren	20
2.9.7.2	Eingesetzte Adaptoren	21
2.9.8	Gerichtete Mutation von DNA-Sequenzen	22
2.9.9	Transformation von S. cerevisiae	24
2.10	Proteinchemische Methoden	25
2.10.1	Isolierung mikrosomaler Fraktionen aus Hefen	25
2.10.2	Isolierung mikrosomaler Fraktionen aus Gerste	25
2.10.3	Konzentrationbestimmung mikrosomaler Proteine	26
2.10.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	26
2.10.5	Western Blot	26
2.10.6	Cytochrom P450-Tests	27
2.10.7	Bestimmung der Cyt. P450-Reduktase Aktivität	27
2.11	Naturstoffanalysen	28
2.11	Naturstoffanalysen	28

2.11.1	Präparation des DIBOA-Standards	28
2.11.2	Reduktion von DIBOA zu HBOA	28
2.11.3	Präparation des DIMBOA-Standards	29
2.11.4	Analyse Ethylacetat-löslicher Naturstoffe aus Keimlingen	29
2.11.5	Präparation des 3-Hydroxy-Indolin-2-on Standards	30
2.11.6	Isolierung von Gramin aus Keimlingen	30
2.11.7	Analytische und Präparative HPLC	31
2.11.8	Eisenchlorid-Färbetest	31
2.11.9	Erstellen von DIBOA-Glucosid / DIMBOA-Glucosid - haltigen	
	Rohextrakten aus Maiskeimlingen	32
2.12	Computer-gestützte Analysen	32
2.12.1	Sequenzanalysen	32
2.12.2	Protein Sekundär- und Tertiärstruktur-Analysen	32
3	Ergebnisse	33
3.1	Screening verschiedener <i>Oryza</i> -Arten und –Sorten auf das	
	Vorhandensein von Benzoxazinonen	33
3.2	Quantifizierung von DIBOA und Gramin in verschiedenen	
	Hordeum-Arten und –Sorten	35
3.3	Isolierung und Charakterisierung der cDNAs von <i>HlBx2-HlBx5</i>	38
3.3.1	Amplifikation von EST-Sequenzen	38
3.3.2	Erstellen einer keimlingsspezifischen cDNA-Bibliothek aus	
	H. lechleri und Isolierung der vier Bx-homologen cDNAs	
	HlBx2-HlBx5, sowie des Fragmentes 518	40
3.3.3	Charakterisierung der vier cDNAs HlBx2-HlBx5	40
3.3.4	Analyse der abgeleiteten Aminosäure-Sequenzen	42
3.4	Erstellen verschiedener Konstrukte für die heterologe Expression	
	von <i>HlBx</i> 2-5 in <i>S. cerevisiae</i>	45
3.4.1	Modifikation des Expressionsvektors pYeDP60	45
3.4.2	Erstellen des Expressionskonstrukts für HlBx2	46
3.4.3	Erstellen von Expressionskonstrukten für <i>HlBx3</i>	46
3.4.4	Erstellen des Expressionskonstrukts für <i>HlBx4</i>	49
3.4.5	Erstellen von Expressionskonstrukten für HlBx5	51
3.5	Die Heterologe Expression und <i>in vitro</i> Aktivität der HIBX-Enzyme	54
3.5.1	Charakterisierung von HIBX2 durch heterologe Expression	
	in S. cerevisiae	55
3.5.2	Charakterisierung von HIBX3 durch heterologe Expression	
	in S. cerevisiae	56
3.5.3	Charakterisierung von HIBX4A durch heterologe Expression	
	in S. cerevisiae	57
3.5.4	Charakterisierung von HIBX5 durch heterologe Expression	
	in S. cerevisiae	60
3.5.5	Vergleich der HIBX-spezifischen Aktivitäten in vitro	61
3.6	Vorkommen der HlBx-Gene in verschiedenen Hordeum- und	
	Triticum-Arten	62

3.7	Hinweis auf die Beteiligung einer Dioxygenase am DIMBOA-	
	Biosyntheseweg in Zea mays	64
4	Diskussion	66
4.1	Sekundärmetabolite der generellen Abwehr in Gräsern	66
4.2	Substanzen der generellen Abwehr in der Gattung Hordeum	70
4.3	Die DIBOA-Biosynthese in Hordeum lechleri	75
4.4	Klassifizierung der HIBX-Enzyme	79
4.5	Die Evolution der Benzoxazinoidbiosynthese während der	
	Phylogenie der Gräser	80
4.6	Die Beteiligung einer Dioxygenase am DIMBOA-Biosyntheseweg	
	in Mais	83
4.7	Ausblick	83
5	Zusammenfassung	86
6	Literaturverzeichnis	88
	Danksagung	97

1 Einleitung

Kaum eine Pflanzenfamilie ist für den Menschen von einer so großen Bedeutung wie die der Gräser. Gräser bedecken ca. 20 % der Landoberfläche der Erde und kommen in nahezu allen Ökosystemen vor (Kellog, 2001). Die Familie der Gräser beinhaltet ca. 10000 Arten, die in 600 – 700 Gattungen eingeteilt werden. Die Ernährung großer Teile der Weltbevölkerung beruht auf den zu den Gräsern gehörenden Getreiden Reis, Mais, Weizen, Gerste und Roggen. Auch andere wirtschaftlich bedeutende Pflanzen wie Zuckerrohr und Hirse zählen zu den Gräsern.

Die Gräser sind eine relativ junge Pflanzenfamilie. Die ältesten sicheren Belege für das Vorhandensein von Gräsern sind 55 bis 60 Millionen Jahre alte fossilierte Graspollen aus dem Paleozän Afrikas und Südamerikas (Kellogg, 2001). Es sind auch 70 Millionen Jahre alte Pollenfunde bekannt, deren Erhaltungszustand eine sichere Zuordnung zu dieser Pflanzenfamilie jedoch erschwert. Die ersten Gräser waren Bewohner von schattigen, waldigen Standorten. Erst die Eroberung der offenen trockenen Ökosysteme als Lebensraum führte zu der Diversifikation, wie wir sie heute kennen.

1.1 Substanzen der generellen Abwehr in Gräsern

An ihrem natürlichen Standort sind Pflanzen einer großen Anzahl von potentiellen Schädlingen und Krankheitserregern ausgesetzt. In den mittleren Breiten ist eine Wiesenpflanze von schätzungsweise sechs Millionen Bakterien, Pilzen, Protozoen und Algen, bis zu 6000 Nematoden, 100 oder mehr Mikroathropoden, Oligochaeten und Regenwürmern umgeben (Roth, *et al.*, 1994). Gegen diese potentiellen Gefahren schützen sich Pflanzen einerseits durch morphologische Barrieren und andererseits durch biochemische Mechanismen. Generell lassen sich pflanzliche Abwehrmechanismen in zwei Gruppen unterteilen: Die generelle oder unspezifische Abwehr zeichnet sich

1

durch ein breites Wirkungsspektrum gegen viele verschiedene Organismen aus, während die Mechanismen der spezifischen, oder Kultivar-Resistenz dann zum Einsatz kommen, wenn die Barrieren der unspezifischen Resistenz durch einen Angreifer durchbrochen wurden – dabei kommt es dann zu einer direkten Interaktion zwischen einem Gen(produkt) der Wirtspflanze mit einem Gen(produkt) des Pflanzenpathogenen (Gen für Gen Hypothese, Flor, 1956).

Gräser bilden eine Vielzahl von Sekundärstoffen aus, die der Abwehr dienen (Roth, *et al.*, 1994). Hierzu zählen z.B. Polyphenole wie die von manchen Hirse-Arten gebildeten Tannine, das ebenfalls von manchen Hirse-Arten gebildete Blausäureglukosid Dhurrin, Lectine und Protease-Inhibitoren, die in vielen wirtschaftlich bedeutenden Getreide-Arten gefunden werden, sowie verschiedene Phytoalexine. Wichtige unspezifisch wirkende Abwehrstoffe der Gräser sind zudem Indolalkaloide wie z.B. Gramin (Abbildung 1), das in den Gattungen *Hordeum* und *Phalaris* gefunden wird, und insbesondere die Benzoxazinoide.



Abbildung 1: Das Indolalkaloid Gramin (3-(Dimethyl-Amino-Methyl)-Indol).

Die bekanntesten Benzoxazinoide sind das von Weizen und Mais synthetisierte DIMBOA (Abbildung 2), und das in Wildgersten und Roggen zu findende DIBOA (Abbildung 2). Die Biosynthese von DIMBOA findet in der auskeimenden Maispflanze statt, so daß die vorhandenen Mengen mit zunehmendem Alter der Pflanze abnehmen (Cambier *et al.*, 2000). Da Benzoxazinoide auch autotoxische Wirkungen zeigen (Sahi *et al.*, 1995), werden DIBOA und DIMBOA nach ihrer Biosynthese als biologisch inaktive O-Glucoside in der Vakuole der Pflanzenzelle gelagert (Sicker *et al.*, 2000). Dabei kann ihre Konzentration bis zu 1 mmol / kg Frischgewicht (DIBOA) bzw. bis zu 13 mmol / kg Frischgewicht (DIMBOA) betragen (Cambier *et al.*, 2000). Spezifische Glucosidasen, die sich im Chloroplasten befinden, können das toxische Aglucon freisetzen. Dieses geschieht auf Grund der Kompartimentierung jedoch nur bei Verletzung der Zelle, z.B. durch Attacke eines Herbivoren.

Benzoxazinoide wurden in den zu den Subfamilie Panicoideae gehörenden Gattungen Zea, Sorghum, Tripsacum und Coix, und in den zur Subfamilie Pooideae zählenden Gattungen Hordeum, Secale, Triticum, Aegilops, Elymus und Triticale sowie in der Subfamilie Bambusoideae (Chusquea) und dem Unterstamm Arundinae (Arundo) nachgewiesen (Niemeyer, 1988). Außerhalb der Gräser wurden sie auch in dikotylen Pflanzen nachgewiesen, wie z.B. innerhalb der Acanthaceae, Ranunculaceae und Scrophulariaceae. Die zwar weite, aber heterogene Verteilung der Benzoxazinoide wirft die Frage auf, ob die Biosynthese der Benzoxazinoide in oder Gräsern monophyletischen polyphyletischen Ursprungs ist. Benzoxazinoide finden sich gerade in wirtschaftlich bedeutsamen Getreiden wie Roggen, Weizen und Mais, während sie nur in Wildgersten, nicht aber in der Kultivar-Art Hordeum vulgare zu finden ist (Barria et al., 1991). Bei Hordeum findet man DIBOA und Gramin, was die Frage aufwirft, ob deren Vorhandensein in einer Korrelation zueinander steht.

Die Situation bezüglich der Gattung *Oryza* war zu Beginn dieser Arbeit unklar; lediglich eine Literaturangabe (Tang *et al.*, 1975) deutet auf das Fehlen von Benzoxazinonen in Reis hin, ohne jedoch nährere Angaben über die getesteten Linien zu machen. Da nicht auszuschließen war, daß die Situation bezüglich der Sekundärstoffverteilung innerhalb der Gattung *Oryza* der Situation in der Gattung *Hordeum* ähnelt, bestand zu Beginn dieser Arbeit gerade für diese wirtschaftlich bedeutsame Gattung ein Klärungsbedarf.

1.2 Die DIMBOA-Biosynthese in Zea mays

Die DIMBOA-Biosynthese in Mais wurde in jüngster Zeit fast vollständig aufgeklärt (Frey et al., 1997; Gierl und Frey, 1999; Sicker et al., 2000; und von Rad, 2000). Indol-3-Glycerin-Phosphat, ein Intermediat der Tryptophanbiosynthese, ist hierbei Ausgangspunkt des DIMBOA-Biosyntheseweges (Abbildung 2). Während in der Tryptophanbiosynthese das von TSA gebildete Indol sofort durch TSB zu Tryptopan umgesetzt wird, kommt es bei der DIMBOA-Biosynthese zur Freisetzung von Indol durch BX1 (Stettner, 1997). Das freie Indol wird anschließend durch die vier Cytochrom P450-Enzyme BX2-BX5 schrittweise in vier Hydroxylierungsreaktionen zu DIBOA umgesetzt (Frey et al., 1997). Bx1-Bx5 und das ebenfalls an diesem Sekundärstoffwechselweg beteiligte Glucosyltransferase-Gen Bx8 bilden zusammen ein Gencluster auf dem kurzen Arm von Chromosom 4. Die oben genannten vier Hydroxylierungsreaktionen konnten auch in DIBOA-haltigem Roggen nachgewiesen werden, so daß das Vorhandensein homologer Gene naheliegt (Glawischnig et al., 1998). Durch eine weitere Hydroxylierung und die anschließende Methylierung dieser Hydroxy-Gruppe wird DIBOA in Mais zu DIMBOA umgesetzt. Zu Beginn dieser Arbeit war noch nichts über die Identität der beteiligten Enzyme BX6 und BX7 bekannt. Es stellt sich die Frage, ob der letzte Hydroxylierungsschritt, wie alle vorherigen, durch ein P450-Enzym katalysiert wird, obwohl ein solches trotz intensiver Suche bisher nicht gefunden wurde (Grün, unveröffentlichte Ergebnisse), oder diese Reaktion vielleicht durch ein Enzym anderen Typs vermittelt wird. Im Anschluß an die Biosynthese von DIMBOA wird dieses durch die Glucosyltransferasen BX8 und BX9 an der Hydroxygruppe in Position 2 glucosyliert (von Rad, 2000), so daß das Benzoxazinoid als Glucosid in der Vakuole der Pflanzenzelle gespeichert werden kann.



Abbildung 1: Der DIMBOA-Biosyntheseweg in *Zea mays*. Die Konvertierung von Indol zum DIMBOA-Vorläufer DIBOA wird schrittweise durch die vier P450-Enzyme BX2 – BX5 katalysiert. Die Identität von BX6 und BX7 war zu Beginn dieser Arbeit ungeklärt.

1.3 Cytochrom P450-Enzyme

An der Biosynthese von DIMBOA in *Zea mays* sind unter anderem die vier Cytochrom P450-Enzyme BX2-BX5 beteiligt (siehe Punkt 1.2). Cytochrom P450-Enzyme, im folgenden kurz als P450-Enzyme bezeichnet, tragen ihren Namen nach der charakteristischen Absorptionsbande bei 450 nm, die im Kohlenmonoxyd-Differenzspektrum sichtbar wird.

Die häufigsten, von pflanzlichen P450-Enzymen katalysierten Reaktionen sind Hydroxylierungen und oxidative Demethylierungen einer Vielzahl von Substraten unter Verwendung von molekularem Sauerstoff und Reduktionsäquivalenten wie NADPH (Bolwell et al., 1994). Dabei sind pflanzliche P450-Enzyme an der Biosynthese aller Hormontypen, der Oxygenierung von Fettsäuren im Zuge der Cutinbiosynthese, sowie einer Vielzahl Sekundärstoffbiosynthesen, wie von z.B. Lignifizierung, Blütenfarbstoffbiosynthesen, Biosynthesen von Abwehrstoffen wie z.B. Alkaloiden und Cyanogenen Glucosiden, sowie der Detoxifizierung von Xenobiotika beteiligt (Werck-Reichardt und Feyereisen, 2000).

Je nach Übertragungsweg der Elektronen den von Reduktionsäquivalenten werden die P450-Enzyme aller Organismen in vier große Klassen eingeteilt: Klasse I Proteine benötigen hierzu eine FAD-haltige Reduktase und zusätzlich ein Eisen-Schwefel Redoxin. Der Elektronentransfer erfolgt bei P450-Enzymen der Klasse II nur über eine FAD / FMN - haltige P450-Reduktase. P450-Enzym und P450-Reduktase sind dabei beide unabhängig voneinander an der Außenseite der Membranen des Endoplasmatischen Retikulums verankert, und bilden zusammen den funktionellen Monooxygenase-Komplex. Sie sind in Eukaryonten am häufigsten. P450-Proteine der Klasse III kommen ohne Elektronendonor aus, während P450-Proteine der Klasse IV ihre Elektronen direkt von NAD(P)H beziehen können.

6

P450-Enzyme bilden eine der größten Enzym-Überfamilien überhaupt. Allein in *A. thaliana* wurden bisher 286 P450-Gene gefunden (The *Arabidopsis* Genome Initiative, http://www.arabidopsis.org/agi.html). Trotz ihrer extremen Diversität auf der Ebene der Primärstruktur (einige Vertreter sind zueinander gerade einmal zu 16 % identisch) variiert ihre Tertiärstruktur nur wenig.

Cyp51 wird als Ursprung aller eukaryontischen P450-Gene diskutiert (Nelson, 1999). Aus diesem sollen sich in Pilzen, Pflanzen und Tieren die P450-Kollektionen unabhängig voneinander entwickelt haben. Dabei werden Genduplikationsereignisse als Motor der P450-Evolution angenommen (Werck-Reichart und Feyereisen, 2000). In vielen Organismen liegen P450-Gene geclustert vor, wobei diese Cluster jedoch in den meisten Fällen keine funktionellen Einheiten darstellen. Eine Ausnahme bilden jedoch *Bx2-Bx5* (Frey et al., 1997), die zusammen mit den nicht-P450-Genen *Bx1*, *Bx8* und *Bx9* tatsächlich Bestandteile eines Genclusters auf dem kurzen Arm des Chromosoms 4 in Mais bilden. Auch hier wird die Entwicklung des Clusters über Genduplikationsereignisse diskutiert.

Generell werden die P450-Proteine je nach ihrer Identität in Familien (ab 40 % Sequenz-Identität) bzw. Subfamilien (ab 55 % Sequenz-Identität) zusammengefaßt (Werck-Reichardt und Feyereisen, 2000). Familien, die sich auf einen gemeinsamen Vorläufer zurückführen lassen, werden in sogenannten Clans zusammengefaßt (Nelson, 1999). Dabei wird ein Clan stets nach der niedrigsten, in ihm enthaltenen Familiennummer bekannt. Die in 47 Familien zusammengefaßten 512 bekannten pflanzlichen P450-Enzyme (Stand: April 2000, David Nelsons Homepage: http://drnelson.utmem.edu/P450dbplant.html) lassen sich in vier Clans unterteilen: Clan 71 (25 Familien), Clan 72 (4 Familien), Clan 85 (9 Familien) und Clan 86 (4 Familien). Die fünf restlichen Familien sind bisher noch nicht zuordbar.

Die Wildgerste *H. lechleri* gehört zu den DIBOA-produzierenden Vertretern der Gattung *Hordeum*. Im Rahmen dieser Arbeit soll aufgeklärt werden, wie die Benzoxazinoid-Biosynthese in dieser Art verläuft. Die Hypothese, daß diese Biosynthese prinzipiell über orthologe Enzyme unter

7

Entstehung identischer Zwischenprodukte wie in Mais verläuft, soll über die Identifikation und Funktionsbestimmung der entsprechenden Gene verifiziert werden.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, einen Einblick in die Mechanismen der Evolution des Benzoxazinoidstoffwechsels von Gräsern zu gewinnen.

Die Isolierung, Analyse und Funktionsbestimmung von *Bx*-homologen P450-cDNAs aus der Wildgerste *H. lechleri* soll die Frage klären, ob die Benzoxazinoid-Biosynthese innerhalb der Gräser monophyletischen oder polyphyletischen Ursprungs ist. Das Vorkommen von Benzoxazinoiden in verschiedenen Gattungen der Gräser (*Hordeum*, *Oryza*) und die Korrelation mit dem Auftreten des Indolalkaloids Gramin in der Gattung *Hordeum* sollte durch systematische Untersuchungen bestimmt werden.

Außerhalb dieser Fragenkomplexe wird der DIMBOA-Biosyntheseweg in *Zea mays* mittels *in vivo*-Hemmversuchen an Keimlingen weiter untersucht. Ziel dieser Experimente ist die Aufklärung der für die Hydroxylierung an der C7-Position verantwortlichen enzymatischen Reaktion.

2 Material und Methoden

2.1 Abkürzungen

AS	Aminosäure	
A. thaliana	Arabidopsis thaliana	
BSA	Rinderserumalbumin	
cDNA	komplementäre DNA	
d	Tag(e)	
DIBOA	2,4-Dihydroxy-2H-1,4-Benzoxazin-3(4H)-on	
DIMBOA	2,4-Dihydroxy-7-Methoxy-2H-1,4-Benzoxazin-	
	3(4 <i>H</i>)-on	
DIM ₂ BOA	2,4-Dihydroxy-7,8-Dimethoxy-2H-1,4-Benzoxazin-	
	3(4 <i>H</i>)-on	
DMSO	Dimethylsulfoxid	
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat	
DTE	Dithioeryt	
DTT	Dithiothreitol	
EDTA	Ethylendiamin-N-N-N'-N'-Tetraessigsäure	
EtOAc	Ethylacetat	
Glc	Glucose	
h	Stunde	
H.	Hordeum	
HOAc	Essigsäure	
HBOA	2-Hydroxy-2H-1,4-Benzoxazin-3(4H)-on	
HPLC	High Performance Liquid-Chromatography	
IPTG	1-Isopropyl-ß-D-Thiogalactopyranosid	
kb	Kilobase(n)	
kD	Kilodalton	

М	Molar	
MeO	Methoxy	
MeOH	Methanol	
min	Minute(n)	
mM	millimolar	
μΜ	mikromolar	
mRNA	messenger RNA	
n.A.d.H.	Nach Angaben des Herstellers	
n.d.	Nicht bestimmt	
ОН	Hydroxy	
ORF	Opern Reading Frame	
p.A.	pro Analysis	
rpm	Umdrehungen pro Minute	
RT	Raumtemperatur	
S. cerevisiae	Saccharomyces cerevisiae	
SDS	Natriumdodecylsulfat	
SSPE	Natrium-Phosphat-EDTA-Puffer	
TAE	Tris-Acetat-EDTA Gelelektrophorese-Puffer	
TEMED	N-N-N´-N´-Tetramethylendiamin	
Tris	Tris-(hydroymethyl)-aminomethan	
ü.N.	über Nacht	
V _{max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit	
VE-H ₂ O	vollentsalztes Wasser	
WT	Wildtyp	
Z. mays	Zea mays	

Amninosäuren und Nucleotide wurden im Einbuchstaben-Codes abgekürzt. Es wurden die SI-Einheiten und Symbole für chemische Elemente verwendet.

2.2 Chemikalien und Reagenzien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien (analytischer Reinheitsgrad) wurden von folgenden Firmen bezogen: Bio-Rad (USA), Fluka (Schweiz), Merk (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (Deisenhofen). Prohexadion wurde vom Lehrstuhl für Zierpflanzenbau, Professor Forkmann, Technische Universität München, zur Verfügung gestellt.

DNA-Restriktions- und modifizierende Enzyme wurden bezogen von: Boehringer Mannheim, Gibco BRL (USA), MBI Fermentas (Litauen), New England Biolabs (USA), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (Deisenhofen), Stratagen (USA)

Radioaktiv markierte Nukleotide (³²P -dCTP, 3000Ci/mol), sowie Hybond-N Nylonmembran und Nitrocellulosemembran wurden von Amersham-Pharmacia (Freiburg) bezogen. Agarose wurde von FMC Bio Products (USA) bezogen

Die eingesetzten Oligonukleotide wurden von MWG-Biotech (Ebersberg), Gibco BRL (USA) und Sigma-Genosys (UK) im Auftrag synthetisiert.

DIBOA und DIMBOA wurden von Dr. D. Sicker zur Verfügung gestellt. DIMBOA wurde aus Maiskeimlingen, DIBOA wurde aus Roggenkeimlingen isoliert

2.3 Antikörper

Es wurden die in der Doktorarbeit Glawischnig (Glawischnig, 1997) beschriebenen Antikörper verwendet.

2.4 Plasmide

Zur Klonierung und heterologen Expression wurden die in Tabelle 1 beschriebenen Plasmide eingesetzt.

Tabelle 1. Lingesetzle I lasiliu

Vektor	Resistenzmarker /	Literaturnachweis
	Komplementationsmarker	
pBluescript II KS	Ampicillin	Stratagene
Uni-ZAP XR vector	Ampicillin	Stratagene
pYeDP60	Ampicillin /	Urban <i>et al.</i> , 1990
	Adenin	

2.5 LAMBDA-Bakteriophagen

Alle verwendeten Bakteriophagenstämme wurden dem cDNA Synthesis Kit[®], ZAP-cDNA Synthesis Kit[®], and ZAP-cDNA Gigapack III Gold Cloning Kit[®], Fa. Stratagene, entnommen.

- ExAssistTM interference-resistant helper phage
- VCMS13 Interference-Resistant Helper Phage

2.6 Bakterienstämme

Die folgenden E. coli-Stämme wurden verwendet:		
<i>E. coli</i> K803	Wood 1966	
E. coli XL-1 Blue	Bullock et al., 1985	

Die folgenden *E. coli*-Stämme wurden dem cDNA Synthesis Kit[®], ZAP-cDNA Synthesis Kit[®], and ZAP-cDNA Gigapack III Gold Cloning Kit[®], Fa. Stratagene, entnommen:

- XL1-Blue MRF´ strain
- SOLRTM strain
- VC5257 host strain

2.7 Saccharomyces cerevisiae

2.7.1 Verwendete Hefestämme

Es wurden die folgenden S. cerevisiae Stämme verwendet:

- W(R) (Truan *et al.*, 1993)
- WAT11 (Pompon *et al.*, 1996)
- WAT21 (Pompon *et al.*, 1996)

2.7.2 Anzucht und Induktion der Zellen

Sofern nicht anders angegeben, wurde alle Hefestämme bei 28 °C inkubiert, Flüssigkulturen auf dem Roller oder im Schüttler bei 120 rpm. Untransformierte Zellen wurden in YPGA (2 % Glucose, 1 % Hefeextrakt, 1 % Pepton, 30 mg / 1 Adenin), transformierte Zellen im Selektionsmedium SGI (2 % Glucose, 0,1 % Pepton, 0,67 % yeast nitrogen base without aminoacids (Fa. Difco, USA), 20 mg / 1 Tryptophan) gezogen.

Anzucht von Hefezellen zur Transformation: Eine Kolonie von einer frischen, bei 28 °C inkubierten YPGA-Platte wurde in 5 ml YPGA überimpft und ü.N. bei 28 °C auf dem Roller inkubiert. Hieraus wurden 50 ml YPGA

beimpft, und bei 120 rpm und 28 °C bis zum Erreichen einer OD_{600} von 0,6 - 0,8 bebrütet. In diesem Stadium konnten die Zellen zur Transformation eingesetzt werden.

Die Induktion von Zellen erfolgte durch Zufüttern von 27 ml 200 g / l Galactose-Lösung in eine 10 h alte 250 ml Kultur in YPGE (0,5 % Glucose, 1 % Hefeextrakt, 1 % Pepton, 3 % Ethanol), welche aus einer 25 ml Ü.N.-Kultur in SGI angeimpft wurde.

Für die P450-unabhängige Reduktion von Isatin zu 2-Hydroxy-Indolin-2-on in Kultur wurde zusätzlich bei der Induktion in Ethanol gelöstes Substrat (Endekonzentration in der Kultur: 1mM) zugegeben.

2.8 Pflanzenmaterial

2.8.1 Gersten-Arten und –Linien sowie deren Anzucht

Folgende *H. vulgare* Kultivar-Sorten wurden von der Bayerischen Landesanstalt für Bodenkultur und Pflanzenbau, Freising, Deutschland zur Verfügung gestellt:

- H. vulgare "Alexis"
- H. vulgare "Baccara"
- H. vulgare "Nürnberg"

Folgende *H. vulgare* Kultivar-Linien / Sorten wurden von dem Lehrstuhl für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung, TU München, zur Verfügung gestellt:

- H. vulgare B87
- H. vulgare "Nade"

Die drei folgenden Wildgerstenlinien wurden vom Risø National Laboratory, DK-4000 Roskilde, Dänemark zur Verfügung gestellt:

- *H. spontaneum* 42-48,
- *H. spontaneum* 150-31
- H. spontaneum 160-53

Folgende Wild- und Kultivargersten wurden vom IPK, Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung, Gatersleben zur Verfügung gestellt:

- H. brachyantherum Nevski (H2012), GRA 966, Ursprungsland: USA
- H. flexuosum Steud. (H1110), GRA 977, Ursprungsland: Argentinien
- H. lechleri (Steud). Schenck. (H1550), GRA 981, Ursprungsland:
 Argentinien
- H. roshevitzii Bowden (H179) GRA 98 Ursprungsland "Sowjetunion"
- H. vulgare tellus

Für die Quantifizierung von Sekundärstoffen verwendete Keimlinge wurden nach einer Stratifizierungsphase von 7 d bei 7 °C unter folgenden Bedingungen bis zur gewünschten Größe angezogen:

16 h Tag, 16 °C

8 h Nacht, 12 °C

Lichtintensität in Topfhöhe 400 µEinstein / m²s

Pflanzen, die zur Vermehrung eingesetzt wurden, wurden unter gleichen Bedingungen, oder bei 16 h Tag, 24 °C gehalten.

2.8.2 Anzucht von Mais- und Weizenkeimlingen

Der Hybridmais "LG11" (Lima Grain, Frankreich) wurde als Standard WT-Linie für alle Maispräparationen und Enzymtests verwendet, wenn nicht anders angegeben. *Triticum aestivum* "Trakos" (von dem Lehrstuhl für Pflanzenbau u. Pflanzenzüchtung, TU München zur Verfügung gestellt) wurde für die Southern Blots eingesetzt. Keimlinge wurden bis zum Alter von 5 d in Keimpapier im Dunklen bei 28°C angezogen. Die für die DIMBOA-Biosynthese-Hemmversuche vorgesehenen Keimlinge wurden drei Tage bei 28 °C im Dunkeln in mit 0,1 % Prohexadion-Lösung benetztem Keimpapier (Kontrollpflanzen nur mit Wasser) angezogen.

2.8.3 Anzucht von Roggenkeimlingen

Roggenkörner "Halo" (Lochow-Petkus, Bergen Kr. Celle) wurden 6-7 Tage bei 24°C im Dunklen in Keimpapier angezogen.

2.8.4 Anzucht von Reiskeimlingen

Ein Kollektion verschiedener *Oryza*-Arten wurde durch das National Institute of Agriculture and Science (NIAST), Suwon, Süd-Korea zur Verfügung gestellt (siehe 3.1.1).

Nach dem Brechen der Keimruhe durch eine zwölfstündige Inkubation der trockenen Samen bei 50 °C wurden diese sechs Tage lang bei 28 °C auf feuchtem Filterpapier im Dunklen ausgekeimt.

2.9 Molekulargenetische Methoden

2.9.1 DNA-Isolierung

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte zum Teil durch die Boil-Prep-Methode (Holmes & Quiggley, 1981), in der Regel jedoch durch alkalische Lyse (Birnboim & Doly, 1979).

Die DNA-Isolierung aus Phagen erfolgte nach Sommer *et al.* (1990) und Frey *et al.* (1990).

Die Isolierung genomischer DNA aus Gerste erfolgte über die bei Dellaporta *et al.* (1983) beschriebene Methode.

2.9.2 RNA-Isolierung und cDNA-Synthese

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Gersten-Keimlingen erfolgte nach der Guanidinium-Hydrochlorid-Methode von Logemann *et al.* (1987). Aus der Gesamt-RNA wurde mit Hilfe von Oligo(dT)-Latexkugeln (Oligotex, Qiagen) n.A.d.H. Poly-A⁺-RNA (mRNA) isoliert. Die Umschreibung der mRNA in cDNA erfolgte mit Hilfe des TagMan-Kits (Perkin-Elmer, USA) mit 0,75 µg bzw. 1,5 µg Poly-A⁺-RNA pro 50 µl Reaktionsansatz ebenfalls n.A.d.H..

2.9.3. PCR

Für die PCR-Reaktion wurde der Thermoblock UNO (Fa. BIOMETRA) und *Taq*-Polymerase der Fa. Boehringer oder *Pfu*-Polymerase (Stratagene) angewendet.

Standard-Programm: 25 Zyklen: 94°C, 1 min ; 55°C, 30 sec ; 72°C, 2min (Annealingtemp. und Extensionszeit wurden entsprechend der eingesetzten Primer und erwarteten Fragmentlängen variiert) PCR-Puffer: 10 mM Tris pH 8,3; 50 mM KCl, 2,5 mM MgCl

2df	gaceteaageeeaacgagtteea
3df	gacgtccacatgaagggcaagga
4df	gaggtcgacatgtacggcaagga
4df2	gacgccgaggtcgacatgga
4df3	gacgccgaggtcgacatgta
5df	ttcatgcgggacggctgggacaa
hm1	ggycagcgyatgtgcccggg
perf1	gcggatccgargarttymgnccngagag
perf2	gcggatccgargarttymgnccngagcg
perf3	gcggatccgargarttymgnccngaaag
perf4	gcggatccgargarttymgnccngaacg
perf5	ttcwwsccsgagaggtttct
perf6	ttcwwsccsgagaggttcct
c1wr	tcccagtcgaaatggtadat
c2wr	acatcccamtcaaaatggtacat
c3wr	acctcccagtcraaatggtacat
L5Aat	aagggcgagaaggcgacgtcggtgg
L38	gaatgatggcggcggccatggatg
<i>Eco</i> T ₁₇ V	cggaattct ₁₇ d

Tabelle 2: eingesetzte PCR-Primer

Tabelle 3: eingesetzte Mutagenese-Primer:

L37	TCTACGCCAGCTGCTTTGTTGACTGTTTTGTTGTTGTTGATTATTAGATTGGCT
	TGGGTTAGAACTACTACTGCTTCTACTAGATTGAGCAAGCA
L5Eco	AGTTGTGGACGGAATTCATGGCTCTTGAAG
L57	GGTACTTCTGCTCCAGCTGCTTTGTTGTTGTTGGTTTGTGTTGTTGTTGTTGTTG
	TTGTTGTTGTTCGCTTCTTTGAGAACCTCAGCGTCGACAAGA

2.9.4. DNA-Sequenzierung

Die zu sequenzierende DNA wurde über PEG-Fällung (Fa. MWG-Biotech, Ebersberg) gereinigt.

Pro Sequenzierungsreaktion wurden 10 bis 30 ng PCR-Fragment bzw. 200-400 ng Plasmidkonstrukt eingesetzt. Die Sequenzierung mittels des Cycle-Sequencing durchgeführt. Es wurden 26 Zyklen gefahren:

Denaturierung: 95°C, 20sec.

Annealing: 50° C, 15 sec.

Polymerisation: 60°C, 60 sec.

Die Sequenzierungs-Reaktionen wurden mit einem ABI PRISM 377 DNA Sequencer (Perkin Elmer, USA) aufgetrennt und analysiert. Die Sequenzdaten wurden mit Hilfe des Programmes SeqMan (DNA-Star, Lasergene) analysiert. Die für die Sequenzierung verwendeten Primer sind in Tabelle 4 dargestellt. Es wurden zudem immer die Primer "Reverse" und "Universal" zum Sequenzieren aus dem Vektor heraus verwendet.

HIBx2		HlBx4	
518ra	catgctggtacgcctctgtgc	11ra	acctccacctcatcggctccc
518ua	ctacatgcactcacacggtc	11ua	tgaagcctctgcgttcggcga
518rb	ttcgacatcatcatgtacggg	LBx4rb	ggacatgacggagctcttggg
518ub	ccttaaatccgggtgggag	LBx4ub	tatccgttgacctcgcagtcg
518rc	acctgctcctcgacaagctaa	LBx4rc	ggtgctggaatactccatggc
518uc	agcttgttcagaaggtgtggc	LBx4uc	ccacctcttgctgactcccat
518rd	ctctcatgattccacacttct	LBx4rd	cgactgcgaggtcaacggata
518ud	ttgttccggccctcctctgt	LBx4ud	cccaagagctccgtcatgtcc
518re	gacatagatatgactgaggtg	LBx4re	tcgccgaacgcagaggcttca
518ue	acatgatgatgtcgaacacca	LBx4k	ggcgggagctgctgcttgaat
LBx2k	ttggcatcgctcgccgctccc		
LBx2ka	cgagggagacgtaggggagat		
HIBx3		HIBx5	
13ra	aageteeccateategggeae	2ra	tgcggctcccgccttcgcctc
13ua	aaacatcatacttagactggg	2ua	agatttactagcataatctcc
LBx3rb	aaggtggtgcactccttccg	LBx5rb	accgtcatcgtgtcctcgccc
LBx3ub	taggatgtttctatgcctg	LBx5ub	agtttcttcataacatgtctg
LBx3rc	acctgttcaacgagatcattg	LBx5rb2	accaacgctccatccaccgtg
LBx3uc	ttgatctccgtgagctcgctg	LBx5rb3	tcctctcgctacagcaagagt
LBx3rd	caaccatcaaggagacgtcg	LBx5uc	tgcggcctttcttccggtgag
LBx3ud	aggacacgaacaaggtgggta	LBx5rd	cagacatgttatgaagaaact
LBx3ux	tagtcgaatgatgagtagcag	LBx5ud	cacggtggatggagcgttggt
		LBx5ue	aggaagaggaggccgttgtgg
		LBx5k	aaggetgeeeggaggegaagg

T.1.11.4.	Et	C .	·
Tapelle 4:	Eingesetzte	Sequenz	vier-Primer
racene	Lingebetzte	Sequenz	

2.9.5 Southern-Analyse

Aus der isolierten Phagen-DNA wurden die cDNAs mit *Eco*RI / *Xho*I ausgeschnitten. Genomische DNA wurde mit *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III, *Apa*I oder *Pst*I verdaut. Für die Übertragung von gelelektrophoretisch aufgetrennter DNA auf "Hybond N⁺"-Folien (Amersham) und die Hybridisierung mit spezifischen DNA-Sonden wurde die in Sambrook *et al.* (1989) beschriebene Methode angewandt. Als Hybridisierungs-Sonden wurden Fragmente der cDNAs (über PCR amplifiziert) oder die gesamten cDNAs verwendet. Die Sonden wurden in einer Klenow-Reaktion mit ³²P-alpha-dCTP radioaktiv markiert. Die Auswertung der Hybridisierung erfolgte über den Phosphoimager "STORM 860" mittels des Programms "Image Quant" (Molecular Dynamics).

2.9.6. DNA-Klonierungstechniken

Die Klonierung von DNA-Fragmenten erfolgte gewöhnlich über die in Sambrook *et al.*, 1989 beschriebenen Standardmethoden. Die Klonierung von PCR-Fragmenten in den Vektor pUC57/T erfolgte über den T-Cloning Kit (Fa. MBI Fermentas).

2.9.7 Adaptoren

2.9.7.1Herstellung von Adaptoren

Die entsprechenden einzelsträngigen Oligonucleotide werden in dem untenstehendem Ansatz 5 min bei 95 °C inkubiert, dann langsam auf RT abgekühlt. Die Qualität des Adapters wurde auf einem 3 % Metaphor-Agarose Gel überprüft.

Ansatz:	
Oligonucleotid 1	25 µM
Oligonucleotid 2	25 µM
MgCl ₂	10 mM
Tris-HCl, pH 8,0	50 mM
H ₂ O	ad 100 µl

2.9.7.2Eingesetzte Adaptoren

```
5<sup>-</sup>-GATCCGAATTCATACGTTAGCATGGCTACGGTCGACC-3<sup>-</sup>
3<sup>-</sup>-GCTTAAGTATGCAATCGTACCGATGCCAGCTGGTTAA-5<sup>-</sup>
```

Adapter *pYAd* zur Einführung von *Eco*RI- und *Sal*I-Schnittstelle an der Klonierungsposition von pYeDP60.

5⁻-GATCCATGGCTCTTGAAGCAGCATACCACTACCTGCA-3⁻ 3⁻-GTACCGAGAACTTCGTCGTATGGTGATGG-5⁻

Adapter *Hl3Ad* zum Einführen einer *Bam*HI-Schnittstelle in unmittelbarer Nachbarschaft zum Translationsstart ATG von *HlBx3*.

```
TCTACGCCAGCTGCTTTGTT-3<sup>^</sup>
AGATGCGGTCGACGAAACAA-5<sup>^</sup>
```

Adapter *H13536a* zur Mutagenese des 5'-Endes von *H1Bx3*.

```
5<sup>-</sup>-CTAGAGAATTCGGCACCATGGCTCTTGAAGCAGCGTACCACTACCTGCA-3<sup>-</sup>
3<sup>-</sup>-TCTTAAGCCGTGGTACCGAGAACTTCGTCGCATGGTGATGG-5<sup>-</sup>
```

Adapter *Hl4Ad* zur Einführung eines Translationstarts in *HlBx4*:

5⁻-AATTCATATAA**ATG**GCTCTTGAAGCTGCTCATCACTACTTGAGACACGCTGTTGGTCATGGTACTTCTGCTCCAG-3⁻ 3⁻-GTATATT**TAC**CGAGAACTTCGACGAGTAGTGATGAACTCTGTGCGACAACCAGTACCATGAAGACGAGGTC-5⁻

Adapter H15556 zur Mutagenese des 5'-Endes von H1Bx5.

2.9.8 Gerichtete Mutation von DNA-Sequenzen

Die gerichtete Mutation von DNA-Sequenzen erfolgte über drei verschiedene Methoden (Abbildung 3):

Sequenzveränderung mittels eines Adapters: Die zu verändernde Sequenz wird mittels zweier Restriktionsendonucleasen ausgeschnitten. In ihre Position wird ein entsprechender DNA-Adapter ligiert)Sequenzen der eingesetzten Adaptoren siehe 2.9.7.2).

Sequenzveränderung mittels einer mutagenisierenden PCR: Sind keine geeigneten Schnittstellen vorhanden, so werden über eine PCR mit einem mismatch-Primer die gewünschten Sequenzänderungen eingeführt (Sequenzen der eingesetzten Primer siehe 2.9.3). Die letzten 20 Basen enthalten kein mismatch, um ein optimales Annealing des Primers zu ermöglichen. Die PCR wurde mittels der *Pfu*-Polymerase durchgeführt, um die Fehlerrate möglichst klein zu halten. Das erhaltene PCR-Fragment wird an beiden Enden mit Restriktionsendonucleasen geschnitten. Anschließend erfolgt die Ligation in das Konstrukt, dessen ursprüngliche entsprechende Sequenz zuvor durch Schneiden mit den gleichen Enzymen entfernt wurde.

Sequenzveränderung mittels der Kombination aus PCR- und Adapter vermittelten Mutagenese: Adapter und mutagenisiertes PCR-Fragment werden in einer Dreipunkt-Ligation in das zuvor entsprechend verdaute Konstrukt inseriert.







Abbildung 3: Schematische Darstellung von drei Methoden zur gerichteten DNA-Sequenzveränderung. Ursprüngliche bzw. unveränderte Sequenzen sind farblos, Adapter-Sequenzen schwarz und durch Mutagenese-Primer entstandene mutierte Sequenzen grau dargestellt. RS = Restriktions-schnittstelle.

2.9.9 Transformation von S. cerevisiae

Die Transformation der Hefezellen mit pYeDP60-Konstrukten erfolgte über Elektroporation (Becker *et al.*, 1991) oder über Hitzeschock Lithiumacetatbehandelter Zellen (Gietz *et al.*, 1992). Es wurden $0,2 - 1 \mu g$ DNA pro Transformationsansatz eingesetzt. Transformierte Zellen wurden über *ADE2*-Komplementation selektiert.

Hitzeschock Lithiumacetat-behandelter Zellen:

10 ml Aliquots der geernteten Zellen wurden jeweils sukzessive mit 10 ml H_2O , 1 ml H_2O , und 1 ml TE / LiAc-Puffer (aus einer 10 x Stammlösung frisch zusammengemischt: 10 x TE: 0,1 M Tris-HCl, pH 7,5, 0,01 M EDTA; 10 x LiAc: 1 M Lithiumacetat, pH 7,5 mit HOAc eingestellt) gewaschen. Nach Resuspendierung in 50 µl TE / LiAc-Puffer wurde die zu transformiende DNA und 50 µg ss Heringssperma DNA, und nach Durchmischen weitere 300 µl frisch angesetzte PEG 4000 Lösung (40 % PEG, 1 x TE, 1 x LiAc) zugegeben. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 120 rpm und 30 °C erfolgte der 15-minütige Hitzeschock bei 42 °C im Wasserbad. Nach kurzem Abzentrifugieren wurde das Zellpellet in 1 ml TE resuspendiert, und jeweils 1/100, 1/20 und 1/2 des Ansatzes auf SGI ausplattiert, und mindestens 4 Tage bei 28 °C inkubiert.

2.10 Proteinchemische Methoden

2.10.1 Isolierung mikrosomaler Fraktionen aus Hefe (Pompon *et al.*, 1996, Grün, 1997)

Galaktose-Induzierte Hefezellen (2.7.2) wurden geerntet, in TEK-Puffer (0,1 M KCl / 50 mM Tris pH 7,4 / 1 mM EDTA) 5 min bei RT gewaschen, und durch heftiges händisches Schütteln (20 x 30 sec.) in 2,5 ml TES-B (50 mM Tris, pH 7,4 / 1 mM EDTA, 0,6 M Sorbitol / 2 mM DTT) und 15 g Glasperlen (Fa. Sigma) geöffnet. Der Überstand wurde abgenommen, das Glasperlen-Pellet 3 x mit je 5 ml TES-B gewaschen. Nach Vereinigen des Überstandes mit den drei Waschfraktionen wurden diese zur Abtrennung von Zelltrümmern 10 min bei 16000 rpm zentzrifugiert. Aus dem Überstand dieses Schrittes wurde die mikrosomale Fraktion durch Einstellen einer Endkonzentration von 0,1 g/ml PEG 4000 / 0,15 M NaCl mindestens 15 min auf Eis ausgefällt, und durch 10-minütige Zentrifugation bei 10000 rpm pelletiert. Das Mikrosomenpellet wurde in TES-B gewaschen, und in 50 mM Tris pH7,4 / 1 mM EDTA / 2 mM DTT / 20 % Glycerin durch Pottern homogenisiert. Aliquots dieser Präparation wurden sofort für Enzymtests eingesetzt oder in Stickstoff eingefroren und bei -70 °C gelagert.

2.10.2 Isolierung mikrosomaler Fraktionen aus Gerste (Bailey & Larson, 1991)

Drei bis sieben Tage alte Keimlinge wurden in Macerierungspuffer (50 mM HEPES pH 7,5 / 0,8 M Saccharose / 5 mM DTE) Polyclar AT und Seesand in einer Reibschale homogenisiert, durch Verbandmull filtriert und der Durchlauf bei 14000 rpm 20 min zentrifugiert. Die Pelletierung der Mikrosomen erfolgte über die Ultrazentrifugation des Überstandes (60000 rpm, 20 min). Nach Resuspendierung (50 mM KPi pH7,5 / 10 % Glycerin / 2 mM DTT) wurden die Mikrosomen in einem Potter homogenisiert. Der Überstand der

Ultrazentrifugation kann nach Ansäuern auf Metaboliten des Sekundärstoffwechsels untersucht werden.

2.10.3 Konzentrationsbestimmung mikrosomaler Proteine

Die Bestimmung des Gesamtproteingehaltes einer Probe erfolgte mittels eines Protein-Assays der Fa. Biorad n.A.d.H.. Die Quantifizierung wurde mittels einer aus BSA hergestellten Eichkurve durchgeführt.

2.10.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurden denaturierende Tris-Gycin SDS-Polyacrylamid-Gele gefahren (Lämmli, 1970). Die Trenngele waren 12,5% ig die Sammelgele 5% ig. Die Elektrophorese wurde in der Mighty-Small Apparatur (Hoefer / Amersham / Pharmacia / Biotech Gruppe) durchgeführt.

2.10.5 Western Blot

Proteingele wurden nach der Elektrophorese 5 min in Western-Transferpuffer unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Proteine aus dem Acrylamidgel durch eine SemiDry-Blotter (BioRad) auf Nitrozellulosemembranen (Amersham-Pharmacia) transferiert. Der Erfolg des Proteintransfers wurde durch Färben der Membran mit Ponceau-Rot und anschließendem Waschen mit VE-H2O überprüft. Nach Entfernen der Ponceau-Rot-Färbung mittels PBS-T wurde die Membran 1 h unter Schütteln mit Kälberserum (Sigma) geblockt, und anschließend mit dem Primären Antikörper (1:300 in 25 ml PBS-T / 0,2 % BSA verdünnt) 1 h unter Schütteln inkubiert. Nach 3 x 10 min. Waschen in PBS-T wurde die Membran für eine Stunde in PBS-T/0,2%BSA mit 0,025% sekundärem Anti-Kanienchen-IgG-Antikörper, an den der Fluoreszensfarbstoff Cy5 (Amersham-Pharmacia)

gekoppelt war, unter Schütteln inkubiert. Zum Abschluß wurde nochmals 3 x 10 min in PBS-T gewaschen und die Membran am STORM Phosphoimager (Molecular Dynamics) im Red Fluorescence Modus ausgewertet.

Western-Transfer Puffer: 5,8 g Tris, 2,93 g Glycin, 3,75 ml 10% SDS, 200 ml MeOH, H_2O ad 11

PBS-T: 80 mM Na₂HPO₄, 20 mM NaH₂PO₄, 100 mM NaCl, 0,1% Tween-20, pH 7,5

2.10.6 Cytochrom P450 Tests

Soweit nicht anders angegeben, wurde die Bestimmung der P450-Aktivität immer bei 25 °C, pH-Wert 7,5 und bei einer Inkubationsdauer von 45 min. durchgeführt. Mikrosomale Fraktionen (0,2 – 2 mg mikrosomales Protein) wurden zusammen mit einer Substratkonzentration von 0,1 – 1 mM und 0,7 mM NADPH in 50 – 100 mM KPi in 200µl Reaktionsvolumen inkubiert. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 1 Vol. Methanol, anschliessend wurde nach Abzentrifugieren der so gefällten Proteine der Überstand mit 1,3 Vol. 0,1 M HOAc angesäuert, 2 x mit 0,55 Vol. EtOAc extrahiert, und die vereinigten organischen Phasen in der Speedvac eingedampft. Der Rückstand wurde in 60 µl Methanol gelöst, und mittels HPLC auf seine Inhaltsstoffe analysiert (siehe Punkt 2.11.7)

2.10.7 Bestimmung der Cyt.P450-Reduktase-Aktivität

Die Bestimmung der Cyt.P450-Reduktaseaktivität aus mikrosomalen Fraktionen erfolgte über den photometrischen Nachweis der Reduktion von Cytochrom c (Beneviste *et al.*, 1988). 2-80 μ g mikrosomales Protein wurde zusammen mit 50 μ M Cytochrom c, 1 mM NADPH, 1 mM KCN in 50 mM Kpi, pH 7,5 bei RT inkubiert, und dabei der Anstieg der OD₅₅₀ kontinuierlich gemessen. Der Anstieg der OD_{550} um 0,021 entspricht einer Reduktion von 1 nmol/ml Cytochrom c.

2.11 Naturstoffanalysen

2.11.1 Präparation des DIBOA-Standards

DIBOA wurde nach Bailey und Larson (1991) und Glawischnig (1997) isoliert. 200 g 3 bis 7 Tage alter Roggenkeimlinge wurden mit flüssigem Stickstoff pulverisiert, und in 5 Vol. H₂O suspendiert. Nach der Homogenisierung dieser Suspension mittels eines Polytron PT 3000 (Kinematic AG), wurde diese 1 h bei RT inkubiert, anschliessend mit konz. HCl auf einen pH von 2,0 angesäuert. Nach einer fünfminütigen Inkubation bei 65 °C wurde die Suspension 10 min bei 5000 rpm abzentrifugiert. Der so erhaltene Überstand wurde diesem Zentrifugationsschritt ein weiteres mal unterzogen. Im Anschluß wurde der Überstand 2 x mit je 0,7 Vol. Ethylacetat extrahiert, und die vereinigten organischen Phasen bei RT im Roationsverdampfer eingedampft. Der Rückstand wurde in 5 ml MeOH gelöst, und DIBOA wurde mittels präparativer HPLC (2.11.7) von den restlichen Verunreinigungen des Rohextraktes abgetrennt. Das abgetrennte DIBOA wurde nun ein weiteres mal 2 x mit je 0,7 Vol. EtOAc extrahiert, die vereinigten org. Phasen erneut eingedampft, und der Rückstand in MeOH gelöst. Das erhaltene Produkt wurde über HPLC-Analytik auf seine Reinheit überprüft.

2.11.2 Reduktion von DIBOA zu HBOA

Je 5 mg DIBOA wurden 15 min in 1 ml HOAc mit 600 mg Zinkstaub gekocht (Honkanen & Virtanen, 1960, Glawischnig, 1997). Das gebildete HBOA wurde von restlichem DIBOA durch präparative HPLC (2.11.7) getrennt.

2.11.3 Präparation des DIMBOA-Standards

DIMBOA wurde aus 4 bis 7 d alten Maiskeimlingen nach Hartenstein *et al.* (1992) isoliert.

Wurzeln und Sproß der Maiskeimlinge wurden bei –20 °C eingefroren. 500 g Keimlingsmaterial wurden in flüssigem Stickstoff pulverisiert, aufgetaut, und anschließend in 1 l Ethyacetat weiter gemörsert. Nach einem Filtrationsschritt wurde das Filtrat in einen Scheidetrichter gegeben, die org. Phase abgetrennt, und die wässrige Phase so lange mit je 100 ml Ethylacetat extrahiert, bis DIMBOA über den Eisenchlorid-Färbetest in der wäßrigen Phase nicht mehr nachweisbar war. Die vereinigten org. Phasen wurden so lange mit 50 ml Portionen gesättigter NaHCO₃-Lösung extrahiert, bis DIMBOA in der org. Phase nicht mehr nachweisbar war. Nach jedem Extraktionsschritt wurde die wäßrige Phase sofort mit konz. HCl angesäuert. Die vereinigten, angesäuerten NaHCO₃-Fraktionen wurden nun erneut so lange mit je 50 ml EtOAc extrahiert, bis DIMBOA in der wäßrigen Phase nicht mehr nachweisbar war. Nach Trocknen der vereinigten org. Phasen über Magnesiumsulfat werden diese filtriert und im Vakuum eingeengt. Die ausgefallenen Kristalle werden über eine Glasfritte abgesaugt und mit einigen ml Diethylether gewaschen.

2.11.4 Analyse Ethylacetat-löslicher Naturstoffe aus Keimlingen

Die Analyse der Ethylacetat-löslichen Naturstoffe aus Keimlingen erfolgte aus dem Rohextrakt, der wie in Punkt 2.11.1 beschrieben hergestellt wird. Da es sich hier nur um eine analytische Methode handelt, in der maximal 2 g Pflanzenmaterial eingesetzt wurden, wurden die entsprechenden Mengen an Reagenzien eingesetzt. Die EtOAc-Extraktion erfolgte mit 2 x 1 Vol. Die Analyse des Rohextraktes wurde mittels HPLC (2.11.7) durchgeführt.

2.11.5 Präparation des 3-Hydroxy-Indolin-2-on Standards

3-Hydroxy-Indolin-2-on (HION) ist ein zweifach hydroxyliertes Derivat des Indols. Da es nicht kommerziell erhältlich war, wurde ein Verfahren entwickelt, es über Reduktion von Isatin durch eine Biokonversion mittels *S. cerevisiae* WAT11 herzustellen. Aus 250 ml Hefekultur mit einer Konzentration von 1 mM Isatin konnten 6,3 mg HION (42 μmol) durch Extraktion und präparative HPLC isoliert werden (2.11.7), was einer Ausbeute von 17 % entspricht. Die Struktur des HION wurde über 2-dimensionale NMR-Techniken (Glawischnig, 1997) nachgewiesen.

2.11.6 Isolierung von Gramin aus Keimlingen

Die Isolierung von Gramin aus Keimlingsmaterial erfolgte wie unter Hoult *et al.*, (1993) und Liu *et al.*, (1990), beschrieben.

0,2 - 1,3 g Keimlingsmaterial wurde in flüssigem Stickstoff pulverisiert, und anschliessend in 30 ml 0,01 % HOAc homogenisiert. Nach einer 24stündigen Inkubation bei RT wurden die Extrakte über Mull gefiltert, und der pH des Durchlaufs mit 0,2 M KOH auf 9,15 eingestellt. Nach 5 min Zentrifugieren bei 3000 rpm wurden jeweils zwei 10-ml Aliquots des Überstandes über Sep-Pak C₁₈ Cartridges (Fa. Waters Associates) folgendermaßen aufgereinigt:

Nachdem die Cartridges durch sukzessives Auftragen von je 2 ml Acetonitril und 1 mM KH₂PO₄ pH 7,0 äquilibiert wurden, erfolgte das Auftragen der Probe. Die Cartridge wurde mit je 2 ml 0,05 M KH₂PO₄ pH 9,5 / Isopropanol (70 / 30) und 0,05 M KH₂PO₄ pH 9,5 / Isopropanol (95 / 5) gewaschen, und anschließend die Probe mit 2 ml 0,05 M KH₂PO₄ pH 2,3 / Isopropanol (70 / 30) eluiert. Nach Eindampfen des Eluates in der Speedvac wurde der Rückstand in 120 µl Graminlaufpuffer (0,05 M KH₂PO₄ + 0,1 % TEA, pH 7,65 / Acetonitril (60 / 40) gelöst, 5 min bei 14000 rpm zentrifugiert, und der Überstand auf der HPLC auf seine Inhaltsstoffe untersucht.

2.11.7 Analytische und Präparative HPLC

Für HPLC-Trennungen wurde entweder das "System Gold" der Fa. Beckmann mit dem Autosampler 507, der Pumpeneinheit 126, dem Diodenarraydetektor 168 und der Bedienungssoftware System Gold V 810, oder das "System Gold Noveau" der Fa. Beckmann verwendet. Für Trennungen nach dem "reversed phase" Prinzip wurden LiChroCART RP-18-Säulen (125 x 4 analytisch, 1 ml/min, 250 x 10 präparativ, 5 ml/min) der Fa. Merck verwendet.

Für die Analyse und Präparation der Substanzen Indol, Indolin-2-on, HBOA, DIBOA, DIMBOA, HION, (3-Hydroxy-Indolin-2-on) und die Analyse der enzymatischen Umsetzungen, sowie die Analyse von Keimlingsextrakten, wurde 5 min isokratisch mit 10 % HOAc, dann mit einem kontinuierlichen Gradienten auf MeOH, H₂O HOAc 70 / 27 / 3 ín 7 min getrennt. Die Präparative Aufreinigung von DIMBOA, sowie die Analyse der DIMBOA-Biosynthese-Hemmversuche erfolgte isokratisch mit 85 % 10 % iger HOAc und 15 % MeOH, die Präparative Aufreinigung der anderen Substanzen erfolgte 10 min isokratisch bei 10 % Essigsäure, gefolgt von einem 12 minütigen linearen Gradienten auf MeOH / H₂O / HOAc 70 / 27 / 30.

Die Analyse von Gramin erfolgte 12 min isokratisch in $(0,05 \text{ M KH}_2\text{PO}_4 + 0,1 \% \text{ TEA}, \text{pH } 7,65 / \text{Acetonitril } (60 / 40).$

2.11.8 Eisenchlorid-Färbetest

Keimlinge und Lösungen wurden auf das Vorhandensein von DIBOA und DIMBOA getestet, in dem sie auf ein mit saurer Eisen(III)chlorid Lösung (Simcox & Weber, 1985) getränktes Filterpapier gelegt bzw. geträufelt wurden (Keimlinge mit einem Skalpell anschneiden). DIBOA und DIMBOA bilden mit FeCl₃ einen blauen Komplex.

2.11.9 Erstellen von DIBOA-Glucosid / DIMBOA-Glucosid – haltigen Rohextrakten aus Maiskeimlingen (abgewandelt nach Hartenstein, 1994)

Wurzeln und Sprosse von je sechs Maiskeimlingen (Anzucht siehe 2.8.2) wurden sofort nach der Ernte in flüssigem Stickstoff zermörsert, und anschließend in je 3 ml Methanol homogenisiert. Nach Filtration wurde der Durchlauf im Vakuum eingedampft, und der Rückstand mit 4 mal 1 ml Aceton / Methanol (1 / 2) extrahiert. Nach erneutem Eindampfen der Extrakte wurde der Rückstand in 120 μ l gelöst, und über HPLC (2.11.7) analysiert.

2.12 Computer-gestützte Analysen

2.12.1 Sequenzanalysen

Sequenzanalysen wurden mit den Analyseprogrammen Sequence Navigator (Applied Biosystems), DNAStar (Lasergene), BLAST (NCBI) und GCG (Genetics Computer Group, inc) erstellt.

2.12.2 Protein-Sekundär- und Tertiärstruktur-Analysen

Für Ähnlichkeitsvergleiche wurde das Programm BLAST (NCBI) und für Sekundärstruktur- und Transmembran-Region – Vorhersagen das Program PHDsec. (http://www.embl-heidelberg.de/predictprotein/predictprotein.html) verwendet.
3 Ergebnisse

Benzoxazinoide sind besonders in der Familie der Gramineae weit verbreitet und spielen eine wichtige Rolle bei der chemischen Grundabwehr und Vermittlung allelopathischer Effekte (Niemeyer 1988).

3.1. Screening verschiedener *Oryza*-Arten und –Sorten auf das Vorhandensein von Benzoxazinoiden

In der Gattung *Oryza* konnten Benzoxazinoide nicht nachgewiesen werden (Tang *et al.*, 1975). Da nicht auszuschließen ist, daß sich die Biosynthese dieser Substanzklasse wie in der Gattung *Hordeum* auf nur einige Arten beschränkt, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Kollektion aus verschiedenen Arten auf das Vorhandensein von Benzoxazinoiden getestet.

Ein Kollektion bestehend aus 260 verschiedenen Oryza-Arten liegt im National Institute of Agriculture and Science (NIAST), Suwon, Süd-Korea vor. Dort erfolgte auch das Screening nach den Benzoxazinoiden DIBOA und DIMBOA im Rahmen eines Forschungsaufenthaltes. Insgesamt wurden 117 verschiedene Reislinien untersucht (Tabelle 5), darunter verschiedene Wildreis-Arten des O. sativa - und des O. officinalis - Komplexes, mehrere Kultivar-Linien von Oryza sativa und Oryza glaberrima, sowie in der Mehrheit verschiedene so genannte "Red-Rice"-Linien. Es wurden jeweils Pools aus 10-60 Einzelpflanzen einer Linie eingesetzt. Das Vorhandensein von DIBOA wurde über eine HPLC-gestützte Analyse der pflanzlichen Rohextrakte nachgewiesen. Die Identifizierung erfolgte über den Vergleich der Retentionszeiten und mit der Spektren denen entsprechenden Referenzsubstanzen. Für eine sichere Identifikation des Benzoxazinoids sollte seine Konzentration zwischen 30 – 70 nmol pro g Pflanzenmaterial (Frischgewicht) liegen - dieser Wert hängt von der Menge und Art der sonstigen im Rohextrakt vorkommenden Substanzen ab. Es konnte zweifelsfrei

nachgewiesen werden, daß keine der untersuchten Reislinien Benzoxazinoide in Konzentrationen, die sich diesem Grenzwert auch nur annähern, enthalten.

Tabelle 5: Aufstellung der untersuchten Oryza Arten und Linien. O. latifolia und O. officinalis entstammen dem O. officinalis Komplex, alle anderen dem O. sativa Komplex

Oryza sativa Linien*)										
Importierter "Red Rice", 1940 in Korea gesammelt										
R2 R3 R4 R5 R6 R7 R11 R12 R13 R16										
	R20	R24	R32	R36	R47	R51	R54	R56	R58	R63
	R65	R71	R72	R74	R78	R79	R81	R82	R83	R86
	R90	R93	R94	R95	R96	R98	R99	R100	R101	R102
	R104	R105	R106	R107	R108	R109	R110	R112	R113	R115
	R117	R118	R122	R124	R127	R131	R132	R133	R136	R138
	R139	R145	R147	R151A	R151B	R152	R154	R155	R156	R157
	R158	R160	R161	R164	R196					
Rundk	örniger , FC4	,Red Rio FC8	ce", kürz	lich ges	ammelt					
Langk	örniger "	Red Ric	e", 1997	7 gesami	nelt					
C	121	125	130	133	136	143	144	151	154	160
	161	162	164	178	190	193	205			
Rundk	örniger , 313	Red Rid, 315	ce", 199 319	7 gesami	melt					
Kultiv	ar Reis-S	Sorten								
Dasanl	bveo		Dongij	nbveo		Gihoby	/eo		Ilmibve	eo
Kayab	veo		Milyan	g 23		Nakdor	ngbyeo		Nampu	ngbyeo
Samka	ngbyeo		Taebok	byeo		Tongilbyeo			Tumpungoyeo	
Andere <i>Oryza</i> -Arten und Linien										
O. bar	thii*:		#14558	34						
O. glal	berrima*	*:	#14554	4		#15267	70		#15267	'1
			#15267	2						
O. latij	folia**:		#14555	50						
O. offi	cinalis**	*:	#14552	26		#14552	29		#14554	8
*)	O. sati	va Kom	plex							

**)

O. officinalis Komplex

3.2 Quantifizierung von DIBOA und Gramin in verschiedenen Hordeum-Arten und –Sorten

Das Indolalkaloid Gramin ist ein Bestandteil der chemischen Grundabwehr gegen Freßfeinde (Ishikawa u. Kanke, 2000) und zeigt eine hohe allelopathische Aktivität (Liu *et al.*, 1990). Es wird diskutiert, daß Gramin in *H. vulgare* die Funktion der dort fehlenden Benzoxazinoide ausübt (Barria *et al.*, 1991). Da zudem die Biosynthese von Gramin über Tryptophan verläuft (Leland et al., 1985), und damit über das Intermediat Indol eine mit der Benzoxazinoid-Biosynthese konkurriende Reaktion darstellen könnte, wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, inwiefern das Vorhandensein von Gramin mit dem Vorhandensein von DIBOA in verschiedenen *Hordeum*-Arten korreliert. DIBOA wurde in den Wildgerste Arten *H. brachyantherum*, *H. flexuosum*, *H. lechleri* und *H. roshevitzii* gefunden, jedoch nicht in *H. vulgare* Tellus (Barria *et al.*, 1991). Gramin wird in verschiedenen *H. vulgare* Linien in stark unterschiedlichen Mengen, sowie in *H. spontaneum* gebildet (Hoult und Lovett, 1993).

In dieser Arbeit wurden DIBOA- und Gramin-Gehalt in den vier Wildgerste-Arten *H. brachyantherum*, *H. flexuosum*, *H. lechleri* und *H. roshevitzii* (jeweils eine Linie), der Wildgerste *H. spontaneum* (drei Linien) und der Kultivar-Gerste *H. vulgare* (vier Sorten) bestimmt (Tabelle 6). Da Größe und Keimungsdauer bei den verschiedenen Arten stark variiert, erfolgte die Quantifizierung bei zwei Wachstumsphasen, um eine Vergleichbarkeit der ermittelten Werte sicherzustellen.

- Phase I: erstes Blatt durchstößt die Coleoptile

- Phase II: erstes voll entwickeltes Blatt.

In den Wildgerste-Linien *H. spontaneum* 42-48, 150-31 und 160-53, sowie den *H. vulgare*-Sorten Alexis, Baccara, Nürnberg und Tellus konnte das Vorhandensein von DIBOA oder anderen Benzoxazinoiden nicht nachgewiesen werden.

35

Die Wildgersten *H. brachyantherum*, *H. flexuosum*, *H. lechleri* und *H. roshevitzii* synthetisieren DIBOA, wobei in jeder Art die Substanzmenge bezogen auf das Frischgewicht der Pflanzen mit zunehmendem Alter abnimmt – sie beträgt in Phase II ungefähr jeweils 60-70 % der in Phase I gefundenen Konzentration.

Die Quantifizierung von DIBOA erfolgte aus zwei Präparationen je einer Wachstumsphase, wobei jede Präparation aus 0,16 bis 1,77 g Pflanzenmaterial bzw. 12 bis 74 Einzelpflanzen durchgeführt wurde. Drei Aliquots jeder Präparation wurden über HPLC analysiert. Der DIBOA-Gehalt unterscheidet sich in den einzelnen Arten (Tabelle 6): In der Phase I weist er mit 661 nmol/g für *H. flexuosum* den niedrigsten Wert und 1403 nmol/g für *H. lechleri* den höchsten Wert auf, in der Phase II liegt der niedrigste Wert bei 327 nmol/g für *H. roshevitzii* während *H. lechleri* mit 977 nmol/g wiederum die höchste Konzentration aller getesteten Wildgersten aufweist.

In den *H. vulgare*-Sorten Alexis, Baccara, Nürnberg (Phase II) und Tellus, sowie den Wildgerste-Arten *H. brachyantherum*, *H. flexuosum*, *H. lechleri* und *H. roshevitzii* konnte das Vorhandensein des Indolalkaloids Gramin nicht nachgewiesen werden. Gramin konnte jedoch in allen drei untersuchten *H. spontaneum*-Linien nachgewiesen werden.

Die Quantifizierung von Gramin erfolgte auf Grund der geringen Menge an zur Verfügung stehendem Pflanzenmaterial aus je zwei Präparationen aus je 0,19 bis 1,25 g Pflanzenmaterial bzw. 1-7 Einzelpflanzen. Zwei Aliquots jeder Präparation wurden über C18 Cartridges aufgereinigt, und aus diesen wurde eine Quantifizierung des Gramins über eine Dreifachbestimmung vorgenommen. Auf Grund der geringen Verfügung zur stehenden Materialmengen ergibt sich eine breitere Streuung der Meßwerte, die in ihrer Tendenz jedoch eindeutig sind.

In einer Präparation der Nürnberger Linie (Phase I) wurde eine Graminkonzentration von ca. 90 nmol/g festgestellt. Dieser Wert konnte jedoch in zwei weiteren Präparationen nicht reproduziert werden. 100 nmol Gramin / g Pflanzenmaterial (Frischgewicht) stellt die Nachweisgrenze für Gramin dar. In

36

der Wachstumsphase II (Wachstumsphase I wurde nicht untersucht) variiert der Gehalt zwischen den einzelnen *H. spontaneum* Linien: so schwankt die Konzentration zwischen 300-400 nmol/g für *H. spontaneum* 42-48 und 1200-1600 nmol/g für *H. spontaneum* 160-53.

Unter den analysierten Arten und Sorten war keine Pflanze, die DIBOA und Gramin gleichzeitig synthetisiert. Generell bewegen sich die Konzentrationen an Gramin und DIBOA in den selben Größenordnungen.

Tabelle 6: Vergleich verschiedener *Hordeum* Arten und Sorten bzw. Linien bezüglich ihres DIBOA- und Gramin-Gehaltes. Es werden jeweils Durchschnittswerte mit Standardabweichungen angegeben.

			DIBOA	Gramin
Art	Sorte /	Phase	(nmol/g	(nmol/g
	Linie		Frischgew.)	Frischgew.)
H. vulgare	Alexis	Ι	0	0
		II	0	0
	Baccara	Ι	0	0
		II	0	0
	Nürnberg	Ι	0	0
		II	0	0
	tellus	Ι	0	n.d.
		II	0	0
H. spontaneum	42-48	Ι	n.d	n.d.
		II *	0	364 (+/-52)
	150-31	Ι	n.d.	n.d.
		II *	0	829 (+/-105)
	160-53	Ι	n.d.	n.d.
		II *	0	1401 (+/-216)
H. brachyantherum	(H 2012)	I **	1020 (+/-328)	0
		II **	647 (+/-121)	0
H. flexuosum	(H 1110)	I **	661(+/-69)	0
		II **	404 (+/-124)	0
H. lechleri	(H 1550)	I **	1403 (+/-171)	0
		II **	977 (+/-163)	0
H. roshevitzii	(H 179)	Ι	n.d.	n.d.
		II ***	327 (+/-16)	n.d.

*) Zwei Präparationen aus Pools von je 1 – 7 Einzelpflanzen,

**) Zwei Präparationen aus Pools von je 12 – 74 Einzelpflanzen

***) Eine Präparation aus einem Pool von 32 Pflanzen

n.d. nicht bestimmt

3.3 Isolierung und Charakterisierung der cDNAs von HlBx2-HlBx5

An der Biosynthese des Benzoxazinons DIMBOA in *Zea mays* sind vier P450-Gene, *Bx2-Bx5* beteiligt, die schrittweise Indol zur DIMBOA-Vorstufe DIBOA umsetzen (Frey *et al.*, 1997). Diese vier P450-spezifischen Reaktionen können auch in DIBOA-haltigen Roggenkeimlingen nachgewiesen werden (Glawischnig *et al.*, 1998). In den oben genannten Wildgersten stellt DIBOA ebenfalls das Endprodukt der Benzoxazin-Biosynthese dar. Da sowohl Mais als auch Roggen und Wildgersten zu der Familie der Süßgräser gehören, liegt die Vermutung eines ähnlichen Biosyntheseweges unter Beteiligung homologer Gene nahe.

3.3.1 Amplifikation von EST-Sequenzen

Die Isolierung dieser P450 Gensequenzen erfolgte mittels einer PCR-Strategie. Es wurde postuliert, daß zu Bx2-Bx5 homologe Sequenzen im H. lechleri-Keimling exprimiert werden. Der erste Schritt beruht auf der Konservierung eines P450-spezifischen Sequenzmotivs (EEF_PERF-Region). Mit Keimlingsspezifischer cDNA (1,5µg) 10 Tage alter H. lechleri Pflanzen wurde unter Anwendung sechs verschiedener degenerierter Primer für diese Region (perf1-perf6, abgewandelt nach Fischer et al., 2001), und des Anchor-Primers *Eco*T₁₇V eine PCR-Reaktion durchgeführt (Abbildung 4). In eine zweite PCR-Reaktion wurde das so entstandene Gemisch aus DNA-Fragmenten, und jeweils spezifische aus den vier Bx-Genen abgeleitete Primer (2df, 3df, 4df3, 5df) zusammen mit dem Anchor-Primer $EcoT_{17}V$ eingesetzt. Alternativ wurden in der zweiten PCR-Reaktion wieder die EEF_PERF-spezifischen Primer sowie als Gegen-Primer die aus den Bx-homologen Weizen-Genen c1wr, c2wr und (unveröffentlichte Ergebnisse, Werck-Reichardt) c3wr (Abbildung 4) verwendet.



Abbildung 4: PCR-Strategie zur Amplifikation von zu *Bx2-Bx5* homologen Sequenzen. Die Primer 2df, 3df, 4df3, 5df sind aus den *Bx*-Genen abgeleitet, c1wr, c2wr und c3wr aus *Bx*-homologen Weizen-Genen (Werck-Reichardt, unver-öffentlichte Ergebnisse).

Die unter Verwendung der Primerkombinationen perf1 / $EcoT_{17}V$, gefolgt von der Primerkombination 2df / EcoT₁₇V erzeugten DNA-Fragmente wurden in pUC57/T kloniert. Mittels Southern Hybridisieren mit einem Sondengemisch aus den Mais-cDNA-Sequenzen von *Bx2-Bx5* wurden Kanditaten-Sequenzen identifiziert. Von 96 Klonen zeigten sieben eine positive Reaktion. Die Sequenzierung ergab ein 435 Bp langes Fragment, *2G* (Abbildung 5), dessen Blast-Analyse als nächst verwandte Sequenz *Bx2* aus Mais aufzeigte. Dieses Fragment wurde als *HlBx2* EST bezeichnet, und als Sonde zum Screenen der keimlingsspezifischen *H. lechleri*-cDNA-Bibliothek verwendet.

Unter Verwendung der Primerkombinationen perf5 / $EcoT_{17}V$ gefolgt von der Primerkombination perf5 / c2wr wurden DNA-Fragmente erhalten, mit denen in analoger Weise verfahren wurde. Es wurde ein 179 Bp langes Fragment, *3G* (Abbildung 5), identifiziert, dessen nächst verwandte Sequenz *Bx3* aus Mais war. Auch dieses Fragment (*HlBx3* EST) wurde als Sonde zum Screenen der cDNA-Bibliothek eingesetzt. Keiner der übrigen PCR-Ansätze führten zu einer Amplifikation P450-spezifischer Gene.

3.3.2 Erstellen einer keimlingsspezifischen cDNA-Bibliothek aus *H. lechleri* und Isolierung der vier *Bx*-homologen cDNAs *HlBx2-HlBx5*, sowie des Fragmentes 518

Aus 1,6 g Pflanzenmaterial von 10 Tage alten Keimlingen wurden 400 µg Gesamt-RNA isoliert, aus welcher 3 µg PolyA+-RNA gewonnen wurden. Für die cDNA-Synthese wurden 1,5 µg mRNA eingesetzt. Das Erstellen der cDNA-Bank erfolgte im LAMBDA-ZAP-System in Form von *Eco*RI / *Xho*I Fragmenten. Dabei befindet sich die *Eco*RI Erkennungsequenz am 5'-Ende der cDNA.

Die primäre Bank umfaßte 5 x 10^5 pfu. Diese wurden amplifiziert, und ein Titer von 9 x 10^{11} pfu erreicht. Hybridisierung von 2,5 x 10^5 pfu dieser Bank mit einem Gemisch der über PCR erzeugten Sonden *HlBx2* EST und *HlBx3* EST (3.3.1) ergab sieben positive Signale. Die entsprechenden Phagen-DNAs wurden in ihre Plasmid-Derivate umgewandelt. Die sieben Konstrukte wurden mittels *Eco*RI / *Xho*I Restriktion analysiert und sequenziert.

3.3.3 Charakterisierung der vier cDNAs HlBx2-HlBx5

Es konnten vier verschiedene Klone identifiziert werden, welche zu den jeweiligen *Bx*-Genen (*Bx2-Bx5*) in *Zea mays* homolog waren (Abbildung 5). Ihre Bezeichnung erfolgte auf Grund ihrer Homologien. Der Vergleich der jeweiligen Sequenzen untereinander legt die Vollständigkeit der Klone *HlBx2*, *HlBx3* und *HlBx5* nahe. Des weiteren wurde eine unvollständige cDNA von *HlBx2* (*518*) isoliert, der am 5'-Ende 111 Bp der codierenden Sequenz fehlen. Legt man das Alignement der *HlBx*-Sequenzen zugrunde, so fehlt der cDNA *HlBx4* das Startcodon ATG; an der entsprechenden Position findet sich das Codon AGG. Da das erste vorhandene ATG in einem anderen Leseraster liegt, und damit seine Verwendung nicht zur Synthese eines funktionellen P450-

Enzyms führen würde, muß angenommen werden, daß die cDNA nicht vollständig ist, oder daß im Laufe der Klonierung eine Mutation auftrat.

	1									100
H1Bx2 H1Bx3 H1Bx4 H1Bx5	AATTCGGCAC	GAGAGCCATT	GTAGGCTTCC	AAT TGGTCAGTTG	TCGGCACCAG TGTGGACC .AATTCGGCA	CCATGGCTCA ACATGGCTCT CCAGGGCTCT	CGTACATGTA TGAAGCAGCA TGAAGCAGCG	GACGAGATGC TACCACTACC TACCACTACC	TCCACGGAGC TGCAGATCGC TGCAGCGCGCGC TGCGGCACGC	AGCAGCAGCT CGTCGGCCAT CGTCGGCCAT
H1BX3 H1BX2 H1BX3	101 CCGCGATCTC GGCACATCCA	TCCTGATTGC CGCCGGCGGC	GACTGCGGTG	CTCTTCTCCC GTTCTCCTGC	TTGTGGTTCT	GCCGCTCCTA TCGACTAGCA	CTCCGCATTA	TTACCAAGCA	GGGAGCGGCG GTCAACAAGA	200 AGCGATGCCA TTGAGCAAG.
HlBx4 HlBx5	GGCACAACCA GGCACGTCCG	CAGAGGCACT CGCCAGCGGC	ACTGCTCACC ACTGCTCCTC	GTTCTCCTGC GTCTGCGTAC	TACTCATCAT CATTACTGCT	CCGACTAGCA GTTGCTGTTG	TGGGTAAGAG CTGTTCGCAT	CCTTCACCAG CGCTAAGAAC	CACCACCACA CTCAGCG	TCAACAAAAT TCGACAAGA.
HlBx2 HlBx3 HlBx4	AGCTGCTGAG CAGCAGCA	CCTGCTCCCG GCTCCCGCCT GCTCCCGCCT	TCTCCCCCGA TCACCTCCAG	GCAAGCTCCC GCAAGCTGCC GCAAGCTGCC	CATCATCGGG CATCATCGGC	CACCTGCACC CACCTCCACC	TAATGGGCGA TCCTCGGCTC TCATCGGCTC	TCTCCCCTAC CCAGACACAC CCACCCTCAT	GTCTCCCTCG ATATCCATCA GTCACCTTCC	CCGGCCTGGC GGGACCTTGA GCGACCTCGC
H1Bx5	AAGCTGCG	GCTCCCGCCT	TCGCCTCCGG	GCAGCCTTCC	CATCATCGGC	CACCTCCACC	ACATCGGCGC	CCAGACCCAC	ATCTCCCTCC	AGCACCTGGT
HlBx2 HlBx3 HlBx4 HlBx5	TGCAAAGTAC TGCCAAGCAT CGCAAAGCAT CGACAAGTAC	GGCCCGGA GGCCGTAATG GGCCGTGACG GGCCACAACG	. ACTCATGCT GCCTCTTGCT GCCTCATGCT GCCTCCTCTT	GGTACGCCTC CCTCCGCATC CGTCCATGTC CCTCCGCGCC	GGTGCCGTGC GGTGCCGTAC GGCGCCGTGC GGCGCCGTGC	CCACTGCCGT CCACCTTGTT CCACCGTCGT CCACCGTCAT	CGTGTCCTCC CGTGTCCTCG CGTGTCCACA CGTGTCCTCG	CCGCGCACTG CCGAGCGCCG CCTCAGGCCG CCCAGCGCCG	CGGAGGCCGT CCGAGGCCGT CCGAGGCCGT CCGAGGCCGT	CCTGCGCACC CCTGCGCACC CCTCCGCACG CATGCGCACT
HlBx2 HlBx3 HlBx4 HlBx5	401 CACGACCACG CACGACCAAA CACGACCACG CACGACCACA	TCTTCGCGTC TCTTTGCGTC TGTTCGCGTC TCCTCGCATC	GCGGCCGCGG GCGGCCGCCA CAGGCCACGA GCGCCCGTGG	TCGATGGTGT TCCATGGCCG AACCCTGTCG TCCATGGCCT	TCGACATCAT CCGCCATCAT CCGACATCAT CCCACATCCT	CATGTACGGG TCGCTACGGC CCGCTACGGC TCGCTACAAC	CAGACGGACT CTGACAGACA TCCACGGACA ACCACCGACG	CGTGCTTCGC TCGCTTTTGC TCGCGTTCGC TCGCCTTCTC	GCCCTACGGC ACCCTATGGT GCCCTATGGC GCCCTTGGGC	500 GACCACTTCC GAGTACTGGC GACTATTGGC GAGTACTGGC
HlBx2 HlBx3 HlBx4 HlBx5	501 GGAAGGCCAG GGCAGGCCAG GTAGGGCTAG AGCACACCAG	GAAGCTTGTG GAAGCTCTTA GAAGGTCGTC GAAGCTCGTC	ACGGTGCACA ACCACGCATA AACACGCATC AACACCCACC	TGCTCAACGC TGCTCAGCGC TGCTCAGCGT TGCTCAGCGC	CAGGAAGATA CAAGGTGGTG CAAGATGGTC CAAGAAGGTG	AGGTCCCAAC CACTCCTTCC TACTCCAAGC CACTCCTTCC	GCCCGGCCCG GCCATGGTCG GCCATGACCG GCCATGGCCG	CGAAGAGGAG TCAGGAAGAG CGAAGAAGAG TCAAGAAGAG	GTCCGGCTGG GTGCGCCTTG GTGCGGCTCG GTGAGCCTCG	600 TGATTGGAAA TTATCAACAA TGGTCGCCAA TCGTTGACAA
HlBx2 HlBx3 HlBx4 HlBx5	601 GATCGCCAAG GACCCGTGAG GATCCATGAG GATCCGTGAG	GCCGCGGGCCG GCGGCCACCA TTGGCCATGG GCGGCCACCA	GGCG GAGG CCGCTCCAGG ACGCTCCATC	CGAGGCCGTG CACGGCGGTG CAAGGCGTTG CACCGTGGTG	GACATGAGCG GACATGAGCG GACATGACGG GATATGAGCG	AGCTCCTGCA AGCTCCTGTC AGCTCTTGGG AGTTTCTGGC	CTCGTACGTC CGGCTACACC CGGGTACGCC CGCCTACACC	AACGACCTCG AATGACGTCG AGCGACTTTG AATGATGTCG	TTTGCCGTGC TATGCCGTGC TGTGCCGTGC TAAGCCGCTC	700 TGTGTCGGGT AGTCCTCGGA GGTCCTCGGA GGTGCTGGGA
HlBx2	701 AAGTTCTCAC	AGGAGGAGGG	GCGGAACAAG	CTGTTCCGTG	AGCTCACCGA	CATCAACGCG	GCGCTCCTGG	GAGGGTTCAA	CATCCTCGAC	800 TACTTCC
HlBx3 HlBx4 HlBx5	GAATCACACC GAGTCCCACC GCAACTCACC	GCAAGGAAGG GGAAGCATGG GGAAGAAAGG	CCGGAACAGG CCGGAACGAG CCGCAACACG	CTTTTCAGCG CTTTTCCGCG CTCTTCAGAG	AGCTCACGGA AGCTCACCGA AGATGACCGA	GATCAACGTG GATCAGCGCC GACCAACGTT	TCCCTTCTTG TCCCTACTAG GACCTTCTAG	GCGGGTTCAG GGGGATTCAA TGGGATTCAA	CCTCGAGAAT CCTGGAGGAC CCTTGAGAAC	TACATCCCCC TACTTCC TTCATCC
HlBx2 HlBx3 HlBx4 HlBx5	801 CGAGCCTGGG CAAATATGAT CAAGGTTGGC CTAGGTGGCC	GAGGTTCGAG CATGGCGGAT AAACCTGGAT ACTGACGGAG	TTGGTCTGCA GTGCTCTTGA GTGTTCCTCA GTGCTCTTCA	AGGTGGCGTG GGCTGGTTTC GGGTGGTTTG GGCTGGTCTG	CGCCAAGGCC CGTCAAGGCT CTCCAAGGCA CTGGAAGGTT	CGACGGGTGA CAGCGACTCA ATGGGAGTCA CAGCGGCACC	GGAAGCGGTG ACAAGAGGTG GCAAGAGGTG TCAACAAATG	GGACCTGCTC GGACGACCTG GGACAACCTG GGACGCCTTG	CTCGACAAGC TTCAACGAGA TTTAACGAGC CTGGAAGAGG	900 TAATTGACGA TCATTGAGGA TCATCGCCGA TCATCAAGGA
HlBx2 HlBx3 HlBx4 HlBx5	901 CCATGCAGCA ACACCTACAC ATACGAAGGC GCACATAAAC	AGGATGGTAA CCCAGCAAAC GGTAAGGAA. TTGAAGCAA.	GCCGTGAGGA CATCATCTGG	TGAGGCCCAG CGAGCAGCAA GACAAC GACAAT	GGGGAGCAAG GCAG GCGG TCTG	AAGAAGACAA C A	AGACTTCATC AGATTTCATA GGACTTCGTA CGACTTCATC	GATGTCTCCC GATCTTCTGC CATCTTTTGC CATGTTTTCC	TATCTCTTCA TCTCTCTCAA TTTCTCTGAA TCTCGCTACA	1000 GCAGGAGTAT GGAAGAGTAC GAAAGAGTAC GCAAGAGTAC
HlBx2 HlBx3 HlBx4 HlBx5	1001 GGTCTCACCA GGTCTCACTA AATCTCTCCA GGTCTCACCG	GGGACCATAT CGGATAACAT CGGATAATGT ACGATAATGT	CAAGGCCATC CAAGGCCATC CAAGGCCATC CAAGTCCCTC	TTGATAGACA TTGGTGGACA TTGGTGAACA TTGATGAACA	TGTTTGAGGC TGTTTGAGGC TGTTTGAGGC TATTCGAGGC	CGGCACGGAT AGGCATAGAA GGCTATAGAA AGCTATAGAA	ACCTCGTATA ACATCCTATC ACATCATTCC ACATCGTATC	TGACGCTGGA TGACGTTGGA TGGTGCTGGA TGGTGCTGGA	GTTTGCCATG ATACGGCATG ATACTCCATG ATACGCCATG	1100 GCGGAGCTCA GCTGAGCTCA GCCGAGCTCA GCCGAGCTTA
HlBx2 HlBx3 HlBx4 HlBx5	1101 TACGGAAGCC TGAACAACAG TCAACAACAG TCAACAACAG	ACACCTTCTG ACACATTCTG GCACGTCATG ACATGTTATG	AACAAGCTGC ACAAAATTAC ACCAAAGTGC AAGAAACTAC	AGGAAGAGGT AGGAGGAGGT AGAAGGAGGT AAACCGAGGT	AAGGAGGAAT AAG AAGGGAGT AAGGACGTTT	GTACC ATCCC .CCACACCCG GCATCATCCA	CAACGG AAGGCAAAAA AGGGCGGAAA AGGGCAAAAA	GCAAGAGATG GTTAGACATG GCTGGACCTG GTTGGACATG	GTCGCCGAAG ATAACGGAGG ATAATGGAGG ATTACGGAGG	1200 ACGATCTCCC AGGATGTTAG AGGACCTCAG AGGACCTCAG
HlBx2 HlBx3 HlBx4 HlBx5	1201 CAACATGACC CAGCATGGCC CCGCATGCCG CAGCTTGCCC	TACCTCAAAG TACCTAAGGG TACCTCAAGG TACCTCAAGG	CTGTTATCAA CAACCATCAA CGACCATCAA CAACCATGAA	GGAAACACTC GGAGACGTCG AGAGGCGATG AGAGGCCCTG	CGGCTGCACC CGCTTGCACC CGCGTACACC CGCTTGCACC	CACCGGTACC CACCGGCGCC CGCCGGCGCC CACCAGGGCC	TCTCATGATT CTTCCTCCTC TTTCCTGCTC TTTACTCCTC	CCACACTTCT CCACACTTCT CCGCACTTCT CCACACTACT	CCCTTGATGC CCACCGCTGA CCACCAACGA CCACCGCTGA	1300 CTGCACGGTT CTGCAACATC CTGCGAGGTC TTGCAACATC
HlBx2 HlBx3 HlBx4 HlBx5	1301 GACGGCTACA GACGGATACG AACGGATACA GACGGATACG	CGATCCCAGC TGGTACCCTC CCATTCCGGC ACATACCCGC	AAACACTCGT CAACACACGT AGGAACACGC CAAAACACGT	GTCGTTATCA GTCCTTGTGA GTCATTGTGA ATCCTTGTGA	ACGCCTGGGC ATGCCTGGGC ACGCTTGGGC ACGGTTGGGC	ACTCGGAAGG CCTTGGGAGG TCTTGCCAGA CATCGGGAGA	CACAGTAGCT GATCTATCGT GACCCGTCGC GACCCAACAG	ACTGGGAAAA CTTGGGAGAG ACTGGGAGAG CTTGGGAGAG	TGAAAACGAA GCCAGATGAT AGCGGAGGAG ACAAGAGGAT	1400 TTCCAACCTG TTCTTGCCTG TTCTACCCAG TTCATGCCCG
HlBx2 HlBx3 HlBx4 HlBx5	1401 AGAGATTCAT AGAGGTTTCT AGAGGTTTCT AGAGGTTCCT	GAATGGAGCC GCAAGATCAA GCAAGAA ACAGGA	GGCGTT GATC GCTGGCGATG GGCCGTGATG AGGTCAGG	TCAAGCC TGGACACCCA CAGAGGTCGA AGAAATCTAG	CATGTATGGGT CATGTATGGT CAACTTGGGT	AATGAGTTCC AAAGATCTTA AAAGATATCC CAAGATTTTA	ATTACTTGCC GGTTCCTGCC GGTTTGTGCC AGTACCTGCC	ATTTGGGTTT ATTTGGGTTC GTTTGGGGCC ATTTGGATCC	GGACGAAGAA GGGCGAAGGA GGGAGGAGGA GGGCGAAGAA	1500 TGTGCCCTGG TTTGTCCAGG TCTGCCCGG TCTGTCCCCGG

HlBx2 HlBx3 HlBx4 HlBx5	1501 GGTTCA.CTC CATGAA.TTT GGCTAACCTT GGCGAA.TTT	GGCATCAGCA CGGGTTCGCC CGCCATCGCT CGCGCTTGCG	ACGGTCGAGA ACCATGGAGG ACTGTGGAGG ACCATGGAGA	CAATGCTGGC TTATGTTGGC TAATGCTGGC TTATGCTAGT	AAACCTCATG AAACCTCATG AAACCTCATA AAATCTCATG	TACCGATTCG TACCATTTCG TACCATTTCG TACCATTTTG	ACTGGAAGCT ATTGGGATGT ACTGGGAGCT ACTGGGAGGT	CCCACCCGGA TCCGAATATG TCCGAGTGAG TCCCAATGAG	TTAAAG ATGGGTA ATGGAGGCCG AAAGAGGGTA	1600 GAAGAGGA CCGGTGCAGG TTGGCGCGAA CTGGTGGAAA
HlBx2 HlBx3 HlBx4 HlBx5	1601 CATAGATATG GGTTGATATG GGTTGATATG GGTTAGTATG	ACTGAGGTGT GCTGAGTCGT TCCGATCAGT GCTGAGACAT	TTGGAATAAC TCGGGTTGAC TTGGGATGAC TTGGGCTGAT	AGTTTCAAGA GCTTCGCCGG GCTTCGCCGA GCTTCGCCGA	AAGGAAAAGC AAGGAGAAGC ACGCAGAGGC AATGAGAAAC	TCATATTAGT TTCAACTTGT TTCACCTTGT TCTACCTTGT	CCCCG <u>TGACC</u> TCCTCAGATT CCCTAAAATT TCCAAGGATT	GTGTGAGTGC CCC <u>TA</u> TACAAATA GTCGAA <u>TAA</u> C	ATGTAGCGTG AGTATCACC TAGTAGTGCC	1700 CAGCGCAAAA A CTAGGTTTTG CCCAATCCCA
HlBx2 HlBx3 HlBx4 HlBx5	1701 GGTTGAGCGA ACCTACTATG TGTTATTATT AGTGTAAGCC	TGGTATTTGG TATGTTGACA TGTATTGGTT TATTTAGACT	TGCGCGCATA TGAGCACAAG GTCTGTTATG TGTGCACAAT	TATGAATGTA AATAAAGGCA TTAGCTGCCT AATTAAGGCA	TTCACAAGCC AGGAAT <u>AAAA</u> ATTACTATGC AGGGCTAAAA	TTTTTTTATT AAAAAAAAAA CGCCTTAATG TAAGCC <u>AAAA</u>	TCAAAAAGAA AAAAAAAAAAA TAGTCGCGCT AAAAAAAAAAA	GGTTGAAACG AC GCACGCTTGC AAAC	CTCGACCTCT TAAGCTTCGG	1800 GCATCATTGC GAGTTTGTTG
HlBx2 HlBx3 HlBx4 HlBx5	1801 GATGCGCACA CACAGGATCA	A ACTAGACAAA GCCTCTGGGA	A TAAATAAAGA A TCCTTGCTCT	A TTTTTTCAAA TATAAATAACT	A AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	AAAAAC	A TGGTTGTATT	CTC <u>AAAAAAA</u>	1 	1892 • • • • • • • • • • • •

Abbildung 5: Vergleich der vier P450-cDNAs *HlBx2-HlBx5*. Startcodons, Stoppcodons und Polyadenylierungs-Sequenzen sind durch Unterstreichen, die als Sonden verwendeten PCR-Fragmente 2G und 3G durch Fettdruck hervorgehoben.

Ausgehend von den Startcodons erstrecken sich die ORFs auf Längen zwischen 1578-1584 Bp und codieren damit für Proteine von 526-528 AS Länge (siehe Tabelle 7).

rubene 7. Zusummennussung der Sequenzunurgse der vier miss Rione.									
P450-Gen	cDNA (Bp)	ORF (Bp)	Proteingröße (AS)						
HlBx2	1779	1581	527						
HlBx3	1706	1581	527						
HlBx4	1809	1584	528						
HlBx5	1710	1578	526						

Tabelle 7: Zusammenfassung der Sequenzanalyse der vier HlBx-Klone:

3.3.4 Analyse der abgeleiteten Aminosäure-Sequenzen

Alle HIBX- und BX-Enzyme weisen die für membrangebundene Cytochrom P450 Enzyme typische Transmembranregion am aminoterminalen Ende auf, gefolgt von einer Reihe geladener Aminosäuren und dem sogenannten Prolin-Cluster (O'Keefe u. Leto, 1989) (Abbildung 6). Die Sauerstoffbindungsstelle mit dem konservierten Threonin an Position 352 erstreckt sich von Position 348 - 358, die hochkonservierte Häm-Bindestelle mit der Konsensussequenz FXXGXXXCXG (Kalb u. Loper, 1988) von Position 489 - 499. Ebenfalls hochkonserviert sind die sogenannte Steroid-Bindestelle (Position 399 - 419), sowie die direkt an den Prolin-Cluster anschließenden vier Aminosäuren GHLH, und die Aminosäuren der Positionen 112 - 128, 248 - 255, 373 - 379, der "PERF"-Region (Position 463 - 468) und der Positionen 505 - 520.

	1		Trar	nsmembran-Re	egion		Pro	lin-Cluster		100
H1BX2	.MAHVHVD	EMLHGAAAAP	RSLLIATAVL	FSLVVLPLLL	RII	.TKQGAASDA	KLLSLL	PSPPSKLPII	GHLHLMGDLP	YVSLAGLAAK
BX2	MAAQLHHALY	ELLHEAAAAQ	RALLLAIP	FSLLLLPLLL	RYLAASASAS	ATKNDGAAPA	SDPDKLLSLL	PSPPMKLPII	GHLHLMGDIP	YVSLAALATR
H1BX3	MALEAAY.	HYLQIAVGHG	TSTPAA	LLTVLLLLII	RLAWVRTT	TASTRL	SKQQQLP	PSPPGKLPII	GHLHLLGSQT	HISIRDLDAK
BX3	MALGAAYH	HYLQLAGDHG	TATHAL	LLGVLIFLVI	RLVSAR.RTG	TTSANK	RKQQQRLPLP	PWPPGKLPII	GHLHLIGAET	HISIRDLDAK
H1BX4	RALEAAY.	HYLQRAVGHG	TTTEAL	LLTVLLLLII	RLAWVRAFTS	TTTSTK	FKQQLP	PTPPGKLPII	GHLHLIGSHP	HVTFRDLAAK
BX4	MALEAAY.	DYLHVAVVQC	TPTQAAA	VLGVLLLLAI	RLA.AAARSS	SATSPK	WKQHRLP	PTPPGKLPII	GHLHLIGSHP	HVSFRDLHAK
H1BX5	MALEAAH.	HYLRHAVGHG	TSAPAAL	LLVCVPLLLL	LLLFASLRTS	ASTR.K	LRLP	PSPPGSLPII	GHLHHIGAOT	HISLOHLVDK
BX5	MALQAAY.	EYLOOAVGHG	AWSSTOTLTL	LLIAVPTVLL	LLASLAKSTS	SSGRGK	PPLP	PSPPGTLPIV	GHLHHIGPOT	HISLOELVAK
		# #					#	# ## ###	#### #	
	101									200
H1BX2	YGPE.LMLVR	LGAVPTAVVS	SPRTAEAVLR	THDHVFASRP	RSMVFDIIMY	GOTDSCFAPY	GDHFRKARKL	VTVHMLNARK	IRSORPAREE	EVRLVIGKIA
BX2	YGPD.LMLLR	LGAVPTVVVS	SPRVAEAVLR	TYDHVFSSRP	RSLVSDIIMY	GATDSCFAPY	GDHFRKARKL	VTVHLLNASK	VRSORPAREE	EVRGALDRVR
H1BX3	HGRNGLLLLR	TGAVPTLEVS	SPSAAEAVLR	THDOTFASEP	PSMAAATTRY	GLTDIAFAPY	GEYWROARKL	LTTHMLSAKV	VHSERHGROE	EVRLVINKTR
BX3	HGRNGLLLLR	TGAVPTLEVS	SPSAADAVLR	TODHIFASRP	PWMAAETTRY	GPSDVAFVPY	GEYGROGRKL	LTTHMLSTKK	VOSFRHGROE	EVRLVMDKTR
HIBX4	HGRDGLMLVH	VGAVPTVVVS	TPOAAEAVLR	THDHVFASRP	RNPVADITRY	GSTDIAFAPY	GDYWRRARKV	VNTHLLSVKM	VYSKRHDREE	EVRLVVAKTH
BX4	YGHNGLMLVO	VGAVPTIVVS	TPOAAEAVLR	THDHVLASRP	RNPVADTTRY	NCTDVAFAPY	GEYWRTARKV	VNTHLLSAKM	VESKREEREE	EVRLVVARTR
HIBX5	YGHNGLLFLR	AGAVPTVIVS	SPSAAEAVMR	THDHILASRP	WSMASHTLRY	NTTDVAFSPL	GEYWOHTRKI.	VNTHLLSAKK	VHSERHGROE	EVSLVVDKTR
BX5	YGHNGELELR	AGAVPTLIVS	SPSAAEAVMR	THDHICASEP	WSMASHTLRY	NTCOVAESPL	GEYWOOTRKL	MNTHLLSNKK	VYSERHGREE	EVCLVVDNLR
DIIJ	#	##### ##	# ####	# # ###	# #	# # #	# ##	# #	# # # #	##
	201		π ππππ	п п ппп	ππ	πππ	π ππ	ππ		300
ulpv2	201 VAAAA DEA	VDMCETTUCV	WINDI WODAWG	CKECOFECEN	אדרות ושסים זא	AATTCCENTT	DVE DELCEE	FINCKUACAK		
BX2	RAAAAREA	VDMSELLHSE	VNNLVCRAVS	GKESMEEGRN	RUFREDIDIN	AGLLGGEHIO	DVF DRLCRT	FLVEKVACAK	TERVEKENDD	LT.DKI.TDDHA
ulpv3	EAAT DOTA	VDMCELLCCV	TNDUNCEAU	CECUDVECON	DIFCEITEIN	VELLOCECLE	NVTDDNMTMA	DUITERVENCHIC	YODI MKDMDD	TEMETTEEUT
DV3	AAATAADDAA	VDISELLISGI	TNDWVCRAVL	CASUDNOCDN	DIFCEITEIN	VELLAGENIE	DVEDDMMAMA	DVIIDUVSVK	ADDI NODWND	VEDET TOPUV
UDV4	FLAMADORA	IDMTELLOCV	ACDEVCDAVI	GEGUDVUCDN	REFERENCE	ACLICCENTE	DIFFENNANA	DVELDWOOR	MCUCKDNDN	I ENEL LAEV
DV4	DARAPGRA	IDMTELLOGI	ASDFVCRAVL	GESHRKAGRN	VIEDELTETO	ASLLGGFNLE	DIF. PRLANL	DIFIRITOR	AMGVSKRWDN	LENELLOEV
TIDVE	EAATNADOTU	VDMCEELAAV	TNDUTCDOVI	CATUDYYCDN	TIPPENTETN	VDI LUCENI E	NET DEWDIT	DIFIRITOR	MAGVSARWDS	LENELLSEI.
DVE	EAAINAPSIV	VDMOEVI AAV	TNDVVSRSVL	GATHRAKGRN	TEPREMIEIN	VDLLVGFNLE	VVT DDWDIT	DITEDIACHK	VQRHLINKWDA	LIEEVINERN
PVD	LAAARSPSIA	VDMSEVLAAT	INDAASKPAT	GSINKKKGKN	TPLETENT	VDTTAGLMTT	III.PRWPLI	DTTLKTACMV	VIRDICRWDA	TTEEATUEUA
	#			# ###	HH H		#	#	#	
	#	# # #	# # #	# ###	## #	## ##	#	#	#	400
מעווו	# 301	# # #	# # #	# ###	## # Sauersto:	## ## ff-Bindungs	# stelle	#	#	400
H1BX2	# 301 ARMVSREDEA	# # # QGEQEEDKDF	# # # IDVSLSLQQE	# ### YGLTRDHIKA	## # Sauersto: ILIDMFFAGT	## ## Ef-Bindungs: DTSYMTLEFA	# stelle MAELIRKPHL	# LNKLQEEVRR	# NVPNGQ	400 EMVAEDDLPN
H1BX2 BX2	# 301 ARMVSREDEA ARMATHQDE.	# # # QGEQEEDKDF DDDKDF	# # # IDVSLSLQQE IYVLLSLQKE	# ### YGLTRDHIKA YGLTRDHIKA	## # Sauersto: ILIDMFEAGT ILIDMFEAGT	## ## ff-Bindungs: DTSYMTLEFA DTSYMTLEFA ETSYMTLEFA	# stelle MAELIRKPHL MTELIRKPHL	# LNKLQEEVRR MKKLQEEVRR	# NVPNGQ NVPAGQ	400 EMVAEDDL PN EMVTEDNLPG
H1BX2 BX2 H1BX3	# 301 ARMVSREDEA ARMATHQDE. HPSK.PSSG.	# # # QGEQEEDKDF DDDKDF EQQAADF	# # # IDVSLSLQQE IYVLLSLQKE IDLLLSLKEE	# ### YGLTRDHIKA YGLTRDHIKA YGLTTDNIKA	## # Sauersto: ILIDMFEAGT ILIDMFEAGT ILVDMFEAGI	## ## Ef-Bindungs: DTSYMTLEFA DTSYMTLEFA ETSYLTLEYG ETSYLTLEYG	# MAELIRKPHL MTELIRKPHL MAELMNNRHI MAELINNPHY	# LNKLQEEVRR MKKLQEEVRR LTKLQEEVR.	# NVPNGQ NVPAGQ SQGKKL	400 EMVAEDDL PN EMVTEDNLPG DMITEEDVSS
H1BX2 BX2 H1BX3 BX3	# 301 ARMVSREDEA ARMATHQDE. HPSK.PSSG. QSRP.SGES.	# # # QGEQEEDKDF DDDKDF EQQAADF ESEADF	# # # IDVSLSLQQE IYVLLSLQKE IDLLLSLKEE IHVLLSIQQE	# ### YGLTRDHIKA YGLTRDHIKA YGLTTDNIKA YGLTTDNIKA	## # Sauersto: ILIDMFEAGT ILIDMFEAGI ILVDMFEAGI ILVDMFEAGI	## ## ff-Bindungs: DTSYMTLEFA DTSYMTLEFA ETSYLTLEYG ETSYLTLEYG ETSYLTLEYG	# MAELIRKPHL MTELIRKPHL MAELMNNRHI MAELINNRHV	# LNKLQEEVRR MKKLQEEVRR LTKLQEEVR. MEKLQTEVRT	# NVPNGQ NVPAGQ SQGKKL TMGSPDGKKL	400 EMVAEDDLPM EMVTEDNLPG DMITEEDVSS DMLAEEDLGS DLIMEEDLGS
H1BX2 BX2 H1BX3 BX3 H1BX4	# 301 ARMVSREDEA ARMATHQDE. HPSK.PSSG. QSRP.SGES. EG.GK	# # # # QGEQEEDKDF DDDKDF EQQAADF EESEADF EDNAEDF	# # # IDVSLSLQQE IYVLLSLQKE IDLLLSLKEE IHVLLSIQQE VHLLLSLKKE	# ### YGLTRDHIKA YGLTRDHIKA YGLTTDNIKA YNLSTDNIKA	## # Sauersto: ILIDMFEAGT ILIDMFEAGT ILVDMFEAGI ILVDMFEAGI ILVNMFEAAI	## ## ff-Bindungs: DTSYMTLEFA DTSYMTLEFA ETSYLTLEYG ETSYLTLEYG ETSFLVLEYS ETSFLVLEYS	# MAELIRKPHL MTELIRKPHL MAELMNNRHI MAELINNRHV MAELINNRHV	# LNKLQEEVRR MKKLQEEVRR LTKLQEEVR. MEKLQTEVRT MTKVQKEVRE	# NVPNGQ NVPAGQ SQGKKL TMGSPDGKKL .STPEGGKL	400 EMVAEDDLPN EMVTEDNLPG DMITEEDVSS DMLAEEDLGS DLIMEEDLSR
H1BX2 BX2 H1BX3 BX3 H1BX4 BX4	# 301 ARMVSREDEA ARMATHQDE. HPSK.PSSG. QSRP.SGES. EG.GK ALSG.GKQG.	# # # QGEQEEDKDF DDDKDF EQQAADF EESEADF EDNAEDF DHNSEDF	# # # IDVSLSLQQE IYVLLSLQKE IDLLLSLKEE IHVLLSIQQE VHLLLSLKKE VHLLLSLQKD	# ### YGLTRDHIKA YGLTRDHIKA YGLTTDNIKA YGLTTDNIKA YGLTTDNIKG	## # Sauersto: ILIDMFEAGT ILIDMFEAGI ILVDMFEAGI ILVNMFEAAI ILVNMFEAAI	## ## ff-Bindungs: DTSYMTLEFA DTSYMTLEFA ETSYLTLEYG ETSYLTLEYG ETSFLVLEYS ETSFLVLEYS	# MAELIRKPHL MTELIRKPHL MAELMNNRHI MAELINNRHV MAELINNRHV MSELMNNRHV	# LNKLQEEVRR MKKLQEEVRR LTKLQEEVR. MEKLQTEVRT MTKVQKEVRE LAKLQKEVRT	# NVPNGQ NVPAGQ SQGKKL TMGSPDGKKL .STPEGGKL .ATPDG	400 EMVAEDDLPN EMVTEDNLPG DMITEEDVSS DMLAEEDLGS DLIMEEDLSR RMVMEEDLSR
H1BX2 BX2 H1BX3 BX3 H1BX4 BX4 H1BX5	# 301 ARMVSREDEA ARMATHQDE. HPSK.PSSG. QSRP.SGES. EG.GK ALSG.GKQG. NLK.	# # # QGEQEEDKDF DDDKKDF EQQAADF EESEADF DHNSEDF QDNSADF	# # # IDVSLSLQQE IDLLSLQKE IDLLSLKEE IHVLLSIQQE VHLLLSLQKD IHVFLSLQQE	# ### YGLTRDHIKA YGLTTDNIKA YGLTTDNIKA YNLSTDNVKA YGLTTDNIKG YGLTDDNVKS	## # Sauersto: ILIDMFEAGT ILVDMFEAGT ILVDMFEAGI ILVDMFEAGI ILVNMFEAAI LLWNIFEAAI	## ## Ef-Bindungs: DTSYMTLEFA CTSYMTLEFA ETSYLTLEYG ETSYLTLEYG ETSFLVLEYS ETSFLVLEYS ETSFLVLEYS ETSFLVLEYS	# MAELIRKPHL MTELIRKPHL MAELINNRHI MAELINNRHV MAELINNRHV MAELINNRHV	# LNKLQEEVRR MKKLQEEVRR LTKLQEEVR. MEKLQTEVRT MTKVQKEVRE LAKLQKEVRT MKKLQTEVRT	# NVPNGQ NVPAGQ TMGSPDGKKL .STPEGGKL .ATPDG .FASSKGKKL	400 EMVAEDDL PM EMVTEDNLPG DMITEEDVSS DMLAEEDLGS DLIMEEDLSR RMVMEEDLSR DMITEEDLSS
H1BX2 BX2 H1BX3 BX3 H1BX4 BX4 H1BX5 BX5	# 301 ARMVSREDEA ARMATHQDE. HPSK.PSSG. QSRP.SGES. EG.GK. ALSG.GKQG. NLK. EMRKLSGDK.	# # # QGEQEEDKDF DDDKDF EQQAADF EESEADF DHNSEDF QDNSADF EKESDDF	# # # IDVSLSLQQE IVVLLSLQKE IDLLSLKEE IHVLLSLQQE VHLLLSLKKE VHLLSLQQE IDIFLSRQEE IDIFLSRZEE	# ### YGLTRDHIKA YGLTTDNIKA YGLTTDNIKA YNLSTDNVKA YGLTDDNIKG YGFTMDNVKS YGFTMDNVKS	## # Sauersto: ILIDMFEAGT ILVDMFEAGT ILVDMFEAGI ILVDMFEAGI ILVNMFEAAI LLMNIFEAAI LLMNIFEAAI	## ## DTSYMTLEFA DTSYMTLEFA ETSYLTLEYG ETSYLTLEYG ETSFLVLEYS ETSFLVLEYS ETSYLVLEYA ETSYLVLEYA	# MAELIRKPHL MAELINKPHL MAELINNRHV MAELINNRHV MAELINNRHV MAELINNRHV MAELINNRHV	# LNKLQEEVRR MKKLQEEVRR LTKLQEEVR MEKLQTEVRT MKKLQKEVRE LAKLQKEVRT MKKLQAEVRT MKKLQAEVRT	# NVPNGQ NVPAGQ SQGKKL TMGSPDGKKL .STPEGGKL .ATPDG FASSKGKKL .YGAEKKL	400 EMVAEDDL PN EMVTEDNLPG DMITEEDLSS DMLAEEDLSS DLIMEEDLSS DMITEEDLSS DMITEEDLSS
H1BX2 BX2 H1BX3 BX3 H1BX4 BX4 H1BX5 BX5	# 301 ARMVSREDEA ARMATHQDE. HPSK.PSSG. QSRP.SGES. E.G.GK ALSG.GKQG. NLK. EMRKLSGDK.	# # # QGEQEEDKDF DDDKDF EQQAADF EESEADF DHNSEDF DHNSEDF EKESDDF ##	# # # IDVSLSLQQE IVVLLSLQKE IDLLLSLKEE IHVLLSIQQE VHLLLSLKKE VHLLLSLQKD IHVFLSLQQE IDIFLSRYEE ##	<pre># ### YGLTRDHIKA YGLTTDNIKA YGLTTDNIKA YGLTTDNIKA YGLTDDNVKS YGFTDDNVKS YGFTMDNVKS # # #</pre>	<pre>## # Sauersto: LIDMFEAGT LLDMFEAGT LVDMFEAGI LVVMFEAGI LVVMFEAAI LLMNIFEAAI LLMNIFEAAI # ##</pre>	## ## ff-Bindungs; DTSYMTLEFA DTSYMTLEFA ETSYLTLEYG ETSFLVLEYS ETSFLVLEYS ETSFLVLEYS ETSYLVLEYA ETSYLVLESA ## ##	# stelle MAELIRKPHL MTELIRKPHL MAELINNRHV MAELINNRHV MAELINNRHV MAELINNRHV MAELMNNRRV # ##	# LNKLQEEVRR MKKLQEEVRR LTKLQEEVR. MEKLQTEVRT MKKLQAEVRT MKKLQAEVRA ### ###	# NVPNGQ SQGKKL TMGSPDGKKL STPEGGKL ATPDG FASSKGKKL YGA.EKKL	400 EMVAEDDLPN EMVTEDNLPG DMITEEDVSS DMLAEEDLSS DMITEEDLSS DMITEEDLSS DMIREDDLSS #
H1BX2 BX2 H1BX3 BX3 H1BX4 BX4 H1BX5 BX5	# 301 ARMVSREDEA ARMATHQDE. HPSK.PSSG. QSRP.SGES. E.G.GK ALSG.GKQG. NLK. EMRKLSGDK. Steroidbin	<pre># # # QGEQEEDKDFDDDKDFEQQAADFESEADFDHNSEDFQDNSADFQDNSADFQDNSADF ## dugs-Stelle</pre>	# # # IDVSLSLQQE IVVLLSLQKE INVLLSLQKE INVLLSLQQE VHLLLSLKKE VHLLLSLQKD INVFLSLQQE IDIFLSRYEE ##	# ### YGLTRDHIKA YGLTRDHIKA YGLTTDNIKA YGLTTDNIKA YGLTDDNKKS YGFTMDNVKS # # #	<pre>## # Sauersto: ILIDMFEAGT ILUDMFEAGT ILVDMFEAGI ILVNMFEAAI ILVNMFEAAI LLMNIFEAAI LLMNIFEAAI # ###</pre>	## ## DTSYMTLEFA DTSYMTLEFA DTSYMTLEFA ETSYLTLEYG ETSFLVLEYS ETSFLVLEYS ETSYLVLEYA ETSYLVLEYA ## ##	# MAELIRKPHL MAELIRKPHL MAELINNRHV MAELINNRHV MAELINNRHV MAELINNRHV # ##	# LNKLQEEVRR MKKLQEEVRR LTKLQEEVR. MEKLQTEVRT MKKLQKEVRE MKKLQAEVRA ### ###	# NVPNGQ NVPAGQ TMGSPDGKKL .STPEGGKL .ATPDG FASSKGKKL .YGA.EKKL Häm-Binc	400 EMVAEDDLPM EMVTEDNLPG DMLTEEDVSS DLLMEEDLSR RMVMEEDLSR DMITEEDLSS # dungsstelle
H1BX2 BX2 H1BX3 BX3 H1BX4 BX4 H1BX5 BX5 H1BX2	# 301 ARMVSREDEA ARMATHQDE. HPSK.PSSG. QSRP.SGES. E.G.GK ALSG.GKQG. NLK. EMRKLSGDK. Steroidbing	<pre># # # QGEQEEDKDFDDDKDFEQQADFESEADFDHNSEDFDHNSEDFDHNSEDFDHNSADFEKESDDF# dugs-Stelle TLRLHPPVPL</pre>	# # # IDVSLSLQQE IVVLLSLQKE IDLLSLKEE IHVLLSLQQE VHLLLSLQKD IHVFLSLQQE IDIFLSRYEE ## MIHFFSLDAC	# ### YGLTRDHIKA YGLTRDHIKA YGLTDNIKA YGLTDNIKA YGLTDNIKA YGLTDNIKG YGLTDNVKS YGFTMDNVKS # # # TVDGYTIPAN	## # Sauersto: ILIDMFAGT ILVDMFAGI ILVDMFAGI ILVDMFAAI ILVNMFAAI LLMNIFAAI LLMNIFAAI # ## TRVVINAAL	## ## ff-Bindungs: DTSYMTLBPA DTSYMTLBPA ETSYLTLEYG ETSYLVLEYS ETSYLVLEYS ETSYLVLEYA ETSYLVLESA ## ## GRHSSYWENE	# stelle MAELIRKPHL MAELINNRHV MAELINNRHV MAELINNRHV MAELINNRHV MAELMNHRV # ## NEFQPERFM.	# LNKLQEEVRR MKKLQEEVRR LTKLQEEVR MTKVQKEVRE MKKLQTEVRT MKKLQAEVRA ### ### NGAGVDL	# NVPNGQ NVPAGQ SQGKKL TMGSPDGKL .STPEGGKL .ATPDG .FASSKGKKL .YGAEKKL HÄm-Bind KPNEFHYLPF	400 EMVAEDDLPM EMVTEDNLPG DMITEEDVSS DLIMEEDLSS DMITEEDLSS DMITEEDLSS DMITEEDLSS MITEEDLSS dMITEEDL
H1BX2 BX2 H1BX3 BX3 H1BX4 BX4 H1BX5 BX5 H1BX2 BX2	# 301 ARMVSREDEA ARMATHQDE. HPSK.PSSG. QSRP.SGES. E.G.GK ALSG.GKQG. NLK. Steroidbing MTYLKAVIKE MTDLKAVIKE	<pre># # # QGEQEEDKDFDDDKDFEQQAADFESEADFDNAEDFDNAEDFQDNSADF ## dugs-Stelle dugs-Stell TLRLHPPVPL TLRLHPPVPL TLRLHPPVPL</pre>	# # # IDVSLSLQQE IYVLLSLQKE IDLLSLKKE VHLLSLQKE VHLLSLQKD IHVPLSLQQE IDIFLSRYEE ## MIPHFSLDAC LLPHYSLDAC	<pre># ### YGLTRDHIKA YGLTRDHIKA YGLTTDNIKA YGLTDNIKA YNLSTDNVKA YGTDNUKS YGTTDNVKS # # # TVDGYTIPAN EVAGYTIPAN</pre>	## # Saursto: ILIDMFAGT ILIDMFAGT ILVDMFAGI ILVDMFAGI ILVNMFAAI LLMNVFAAI LLMNVFAAI # ## TRVVINAWAL TRVVINAWAL	## ## DTSYMTLBPA DTSYMTLBPA DTSYMTLBPA ETSYLTLEYG ETSYLTLEYG ETSFLVLEYS ETSFLVLEYS ETSYLVLEYA ## ## GRHSSYWENE GRHSSYWENE	# MAELIRKPHL MAELIRKPHL MAELINNRHV MAELINNRHV MAELINNRHV MAELINNRHV # ## NEFQPERFM. NEFQPERFM.	# LINKLQEEVRR MKKLQEEVRR LITKLQEEVRL MEKLQEEVRT MKKLQKEVRT MKKLQAEVRA ### ### NGAGVDL SGDVAGGVDL	# NVPNGQ NVPAGQ SQGKKL .STPEGGKL .ATPDG .FASSKGKKL .YGA.EKKL HÄm-Bind KPNEFHIP F	400 EMVAEDLEN EMVTEDNIPG DMITEDVSS DMIAEDLISS DLIMEEDLSS DMIREDDLSS # dungstelle GFGRRMCFGV GSGRRMCFGV
H1BX2 BX2 H1BX3 BX3 H1BX4 H1BX5 BX5 H1BX2 BX2 H1BX3	# 301 ARMVSREDEA ARMATHQDE. QSRP.SGES. E.G.GK ALSG.GKQG. NLK. EMRRLSGKK. Steroidbing MTULKAVIKE MTDLKAVIKE MTDLKAVIKE	<pre># # # QGEQEEDKDFDDDKDFEQQAADFEESEADFDINSEDFDINSEDFDINSEDFEKESDDFEKESDDF ## dugs-Stelle TIRLHPPVPL TSRLHPPAF</pre>	<pre># # # IDVSLSLQQE IYVLLSLQKE IHVLLSLKKE HHVLLSLKKE VHLLLSLKKE VHLLLSLKKE IDIFLSRVEE ## MIPHFSLDQC LLPHYSLDAC LLPHYSLDAC</pre>	# ### YGLTRDHIKA YGLTRDHIKA YGLTDNIKA YGLTDNIKA YGLTDNIKG YGLTDDNVKS YGFTMDNVKS # # # TVDGYTIPAN NIDGVVUSN	## # Saursto: ILIDMFAGT ILIDMFAGT ILVDMFAGI ILVDMFAGI ILVNMFAAI ILVNMFAAI LLMNIFAAI LLMNIFAAI # ## TRVVINWAL TRVVINWAL TRVVINWAL	## ## ff-Bindungs: DTSYMTLEPA DTSYMTLEPA ETSYLTLEYG ETSYLTLEYG ETSFLVLEYS ETSFLVLEYS ETSYLVLEYA ## ## GRHSSYMENE GRHSSYMERE GRDLSSWERP	# MAELIRKPHL MTELIRKPHL MAELINNRHV MAELINNRHV MAELINNRHV MAELINNRHV # ## NEFQPERFM. DEFUPERFL. DDFLPERFLQ	# LNKLQEEVRR MKKLQEEVRR MEKLQEEVRR MEKLQEEVRT MKKLQEEVRT MKKLQAEVRA ### ### NGAGVDL SGDVAGGVDL DQAGVDTQM	# NVPNGQ NVPAGQ TMGSPDGKKL .STPEGKKL .STPEGKL .FASSKGKL .YGA.EKKL Hām-Bin KPNEFQFIFF RGKDLRFIPF	400 EMVAEDDLEM EMVTEDNLEG DMITEEDUSS DLIMEEDLSS DMITEEDLSS DMITEEDLSS # dungsstelle GFGRRMCFGV GSGRRMCFGV GFGRRICFOM
H1BX2 BX2 H1BX3 BX3 H1BX4 BX4 H1BX5 BX5 H1BX2 BX2 H1BX3 BX3	# 301 ARMVSREDEA ARMATHQDE. HPSK.PSSG. QSRP.SGES. E.G.GK ALSG.GKQG. NLK. EMRKLSGDK. Steroidbinu MTYLKAVIKE MTDLKAVIKE MPYLKATIKE	<pre># # # QGEQEEDKDFDDDKDFESEADFEESEADFDNAEDFDNAEDFDNSADFEKESDDF ## dugs-Stelle TLRLHPPVPL TLRLHPPAPF TLRLHPPAPF</pre>	# # # IDVSLSLQQE IYVLLSLQKE IDLLSLKEE VHLLSLKEE VHLLSLQKE IDIPLSRYEE ## MIPHFSLQZE LLPHYSTADC LLPHYSTADC LLPHYSTADS	# ### YGLTRDHIKA YGLTDDIKA YGLTDDIKA YNLSTDNVKA YGLTDDNVKS YGFTMDNVKS # # # TVDGYTIPAN EVACYTIPAN NIDGYVVPSN EIDGYFVPAG	## # Saursto: ILIDMFAGT ILIDMFAGT ILVDMFAGI ILVDMFAGI ILVNMFAAI ILVNMFAAI LLMNIFAAI LLMNIFAAI # ### TRVVINAWAL TRVLVNAWAL TRVLVHAWAL	## ## ff-Bindungs: DTSYMTLEPA DTSYMTLEPA ETSYLTLEYG ETSYLTLEYG ETSYLVLEYS ETSYLVLEYS ## ## GRHSSYWENE GRHSSYWENE GRHSSYWENE GRHSSYWENE GRDLSSWERP GRDLSWERP	# Steller MAELIRKPHL MTELIRKPHL MAELINNRHV MAELINNRHV MAELINNRHV MAELINNRHV MAELINNRHV # ## NEFQPERFL. DDFLPERFL. DEFLPERFVQ EEFMPERFVQ	# LINKLQEEVRR MKKLQEEVRR LITKLQEEVR. MKKLQEEVRT MKKLQKEVRT MKKLQAEVRA ### ### NGAGVDL SGDVAGGVDL SGDVAGGVDL DQAGDVDTQM E.PGAVDVHM	# NVPNGQ NVPAGQ NGSPDGKKL STPEGKL STPEGKL FASSKGKL .YGA.EKKL Håm-Bin KPNEFHYLPF KPNEFHYLPF KGKDLRFLPF KGKDLRFLPF	400 EMVAEDDLPM EMVTEDNLPG DMIAEEDLSS DMIAEEDLSS DMITEEDLSS DMITEEDLSS MIREDDLSS # ungstelle GFGRRMCPGV GSGRRICPGM GSGRRICPGM
H1BX2 BX2 H1BX3 BX3 H1BX4 H1BX5 BX5 H1BX2 BX2 H1BX3 BX3 H1BX4	# 301 ARMVSREDEA ARMATHQDE. HPSK.PSGS. QSRP.SGES. E.G.GK ALSG.GKQG. NLK. EMRKLSGDK. Steroidbirm MTYLKAVIKE MAYLRATIKE MAYLRATIKE MPYLKATIKE	<pre># # # QGEQEEDKDFDDDKDFEQSADFEESEADFDNAEDFDNNSEDFQDNSADFEKESDDF ## dugs-Stelle ## TLRLHPPVPL TLRLHPPVPL TLRLHPPAPF AMRVHPPAFF</pre>	# # # IDVSLSLQQE IYVLLSLQKE IHVLLSLQKE IHVLLSLQQE VHLLLSLKKE IHVFLSLQQE IDFFLSRYEE ## MIPHFSLDAC LLPHYSLDAC LLPHFSTADS LLPHFSTADS	# ### YGLTRDHIKA YGLTDDNIKA YGLTDDNIKA YGLTDDNIKG YGLTDDNIKG YGLTDDNIKG YGLTDDNIKG YGLTDDNIKG YGLTDDNIKG YGLTDNIKG YGLTDNIKG YGLTDNIKG SUGYVFNG EIDGYFVFAG EVNGYTIPAG	<pre>## # Sauersto: LLIDMFAGT LLIDMFAGT LLUMMFAGI LLVDMFAGI LLVMNFAAI LLMNIFEAAI LLMNIFEAAI TRVVINAWAL TRVLVNAWAL TRVLVNAWAL TRVLVNAWAL</pre>	## ## DTSYMTLEPA DTSYMTLEPA DTSYMTLEPA ETSYLITLEYG ETSYLITLEYG ETSFLULEYS ETSFLULEYS ETSYLULEYS ETSYLULEYS ## ## GRHSSYWENE GRHSSYWENE GRDRTYWENP ARDPSHWERA	# MAELIRKPHL MAELIRKPHL MAELINNRHV MAELINNRHV MAELINNRHV MAELINNRHV MAELINNRHV # ## NEFQPERFM. NEFQPERFM. DDFLPERFLQ EEFMPERFVQ EEFYPERFLQ	# LINKLQEEVRR MKKLQEEVRR MEKLQTEVRT MKKLQTEVRT MKKLQTEVRT MKKLQAEVRA ### ### NGAGVDL SGDVAGVDTQM EGRDA.EVDM	# NVPNGQ NVPAGQ TMGSPDGKKL .STPEGKKL .ATPDG .FASSKGKKL .YGAEKKL HÅM-BIN KPNEFPTIPF RGKDLRFLPF YGKDLRFLPF YGKDLRFVPF	400 EMVAEDDLEM EMVTEDLIS DMLAEEDLSS DMLAEEDLSS DMITEEDLSS DMITEEDLSS HITEEDLSS HITEEDLSS GFGRRMCPGV GFGRRMCPGV GFGRRMCPGV GSGRRICCGM GSGRRICCGM
H1BX2 BX2 H1BX3 BX3 H1BX4 BX4 H1BX5 BX5 H1BX2 BX2 H1BX3 BX3 H1BX4 BX4	# 301 ARMVSREDEA ARMATHQDE. HPSK.PSGS. QSRP.SGES. E.G.GK ALSG.GKQG. NLK. EMRKLSGDK. Steroidbind MTULKAVIKE MAYLRAVIKE MPYLKATIKE MPYLKATIKE	<pre># # # QGEQEEDKDFDDDKDFESEADFEESEADFDNAEDFDNAEDFDNAEDFDNSADFEKESDDFEKESDDFEKESDDF TLRLHPPVPL TSRLHPPAPF TLRLHPPAPF SMRIHPPAPF SMRIHPPAPF</pre>	# # # IDVSLSLQQE IYVLLSLQKE IHVLLSLQKE HHVLLSLQKE VHLLLSLQKE VHLLLSLQKE IDIFLSRYEE ## MIPHFSLDQE LLPHFSLDQC LLPHFSTDDC LLPHFSTDDC LLPHFSTDDC	# ### YGLTRDHIKA YGLTRDHIKA YGLTDNIKA YGLTDNIKA YGLTDNIKA YGLTDNIKS YGFTMDNVKS # # # TVDGYTIPAN NIDGYVUPSN EIDGYFUPAG EVNGYTIPAG	## # Saursto: ILIDMFAGT ILIDMFAGT ILVDMFAGT ILVDMFAGT ILVNMFAAI ILVNMFAAI LLMNIFAAI LLMNIFAAI # ## TRVVVINAWAL TRVLVNAWAL TRVLVNAWAL TRVLVNAWAL	## ## ff-Bindungs: DTSYMTLEPA DTSYMTLEPA ETSVITLEYA ETSVITLEYS ETSFLVLEYS ETSFLVLEYS ETSVLVLEYA ## ## GRHSSYWENE GRHSSYWENE GRHSSYWENE GRDLSSWERP GRDLSSWERP ARDPSHWERA ARDPTCWDKA	# MAELIRKPHL MTELIRKPHL MTELIRKPHL MAELINNRHV MAELINNRHV MAELINNRHV MAELINNRHV # ## NEFOPERFM. NEFVPERFL. DDFLPERFLQ EEFFPERFLE EEFFPERFLE	# LNKLQEEVRR MKKLQEEVR LTKLQEEVR LTKLQEEVR MKKLQEVRE LAKLQKEVRE MKKLQAEVRA ### ### NG . AGVDL SGDVAGGVDL DQAGVDTQM E. PGAVDVHM EGRDA.EVDM	# NVPNGQ NVPAGQ TMGSPDGKKL .MGSPDGKKL .STPEGKKL .YGA.EKKL YGA.EKKL HÅm-Bind KPNEFPTIPF KPNEFQFIAF KPNEFQFIAF KGKDLRFIPF YGKDIRFVPF	400 EMVAEDDLPN EMVTEDNLPG DMITEEDUSS DMIAEEDLSS DMITEEDLSS DMITEEDLSS DMITEEDLSS DMITEEDLSS GFGRRCPGV GSGRRMCPGV GSGRRCPGV GSGRRCPGV GAGRRICCAG AGRRICAG
H1BX2 BX2 H1BX3 BX3 H1BX4 H1BX5 BX5 H1BX2 BX2 H1BX3 BX3 H1BX4 BX4 H1BX5	# 301 ARMVSREDEA ARMATHODE. JPSK.PSGE. GSRP.SGES. E.G.GK ALSG.GKQG. NLK. EMRKLSGDK. Steroidbinu MTYLKAVIKE MAYLRATIKE MPYLKATIKE MPYLKATIKE MPYLKATIKE	<pre># # # QGEQEEDKDFDDDKDFEESEADFEESEADFDNAEDFDNSADFDNSADFEKESDDF ## dugs-Stelle TLRLHPPAPF TLRLHPPAPF TLRLHPPAPF AMRVHPPAPF ALRLHPPAPF ALRLHPPAFI</pre>	# # # IDVSLSLQQE IYVLLSLQKE IDLLSLKEE VHLLSLKE VHLLSLQKE IDIFLSIQE IDIFLSRYEE ## MIPHFSLDAC LLPHFSTADC LLPHFSTADC LLPHFSTADC LLPHFSTADC LLPHFSTADC	# ### YGLTRDHIKA YGLTDDIKA YGLTDDIKA YNLSTDNVKA YGLTDDNVKS YGTDDNVKS # # # TVDGYTIPAN EVACYTIPAN EIDGYFVPAG EINGYTVPAG EINGYTIPAG NIDGYVDIPAK	## # Saursto: ILIDMFAGT ILIDMFAGT ILVDMFAGI ILVDMFAGI ILVNMFAAI ILVNMFAAI LLMNIFAAI LLMNIFAAI # ## TRVVINAWAL TRVLVNAWAL TRVLVNAWAL TRVLVNAWAL TRVLVNAWAL TRVLVNAWAL TRVLVNAWAL	## ## ff-Bindungs: DTSYMTLEPA DTSYMTLEPA ETSYLTLEYG ETSYLTLEYG ETSYLVLEYS ETSYLVLEYS ETSYLVLEYA ETSYLVLEYA ETSYLVLEYA ## ## GRHSSYWENE GRHSSYWENE GRHSSYWENE GRDSSWERP GRDTTWEKP ARDPSYMERA GRDPTAWERQ	# stelle MAELIRKPHL MTELIRKPHL MAELINNRHV MAELINNRHV MAELINNRHV MAELINNRHV MAELINNRHV # ## NEFQPERFL. DEFLPERFL EEFPPERFLE EDFMPERFLQ	# LINKLQEEVRR MKKLQEEVRR LITKLQEEVR. MKKLQEEVRT MKKLQKEVRT MKKLQAEVRA ### ### NGAGVDL SGDVAGGVDL DQAGDVDTQM E.PGAVDVHM EGRDA.EVDM QGRDA.EVDM	# NVPNGQ NVPAGQ SQGKL STPEGKL STPEGKL STPEGKL FASSKGKL .YGA.EKKL HÅm-Bin KPNEFHYIFF KGNDIFVIFF KGKDLRFIPF KGKDLRFIPF .GQDFKYLPF	400 EMVAEDLEM EMVTEDNIPG DMIAEEDLSS DMIAEEDLSS DMITEEDLSS DMITEEDLSS DMITEEDLSS DMITEEDLSS DMITEEDLSS GFGRRMCPGV GSGRRMCPGV GSGRRICCGA GAGRRICCGA GAGRRICCGA
H1BX2 BX2 H1BX3 BX3 H1BX4 BX4 H1BX5 BX5 H1BX2 BX2 H1BX3 BX3 H1BX4 BX4 H1BX5 BX5	# 301 ARMVSREDEA ARMATHQDE. HPSK.PSSG. QSRP.SGES. E.G.GK ALSG.GKQG. NLK. EMRRLSGDK. Steroidbin. MTDLKAVIKE MYLKAVIKE MYLKATIKE MPYLKATIKE MPYLKATIKE LPYLKATIKE LPYLKATKKE LPYLKASMKE	<pre># # # QGEQEEDKDFDDDKDFEESEADFDNAEDFDNAEDFDNNSEDFDHNSEDFDHNSEDFDHNSEDFDHNSEDF TLRLHPPVPL TSRLHPPAFF TLRLHPPVPL TSRLHPPAFF ALRLHPPAFF ALRLHPPGFL ALRLHPGGEL</pre>	# # # IDVSLSLQQE IYVLLSLQKE IDLLSLKKE IHVLSSLQQE VHLLSSLKKD IHVFLSLQQE IDIFLSRVEE ## MIPHFSLDAC LLPHFSTADC LLPHFSTADC LLPHFSTADC LLPHFSTADC LLPHFSTADC LLPHFSTADC	# ### YGLTRDHIKA YGLTRDHIKA YGLTDNIKA YGLTDNIKA YGLTDDNIKG YGLTDDNIKG YGLTDDNIKG YGLTDDNIKG YGLTDDNIKG YGLTDDNIKG YGLTDNIKG SUGYUFPA EIGYYFPAG EIGYYFPAG EINGYTIPAG EINGYTIPAG EINGYTIPAG OLIGYHFPAN	<pre>## # Salersto: LIDMFAGT LLDMFAGT LLDMFAGT LLVDMFAGI LLVNMFAGI LLVNNFAAI LLMNIFAAI # #### TRVVINAWAL TRVLVNAWAL TRVLVNAWAL</pre>	## ## ff-Bindungs: DTSYMTLEPA DTSYMTLEPA ETSYLTLEPA ETSYLTLEPA ETSYLVLEYS ETSFLVLEYS ETSYLVLEYS ETSYLVLEYA ETSYLVLEYA ## ## GRHSSYWENE GRHSGYWERE GRDSSWERP GRDRTTWEKP GRDPTCWDKA GRDPTCWDKA	# MAELIRKPHL MAELIRKPHL MAELINNRHV MAELINNRHV MAELINNRHV MAELINNRHV MAELINNRHV # ## NEFQPERFM. DDFLPERFLQ EEFMPERFLQ EEFMPERFLQ EEFMPERFLQ EEFMPERFLQ EEFMPERFLQ	# LINKLQEEVRR MKKLQEEVRR MEKLQEEVR MEKLQEEVR MKLQKEVRT MKKLQEVRA ### ### NGAGVDL SGDVAGGVDL DQAGDVDTOM E.PGAVDVHM EGRDA.EVDM QGRDA.EVDM GGQEKS.SNL DGWDKSNSYS	# NVPNGQ NVPAGQ TMGSPDGKKL .STPEGKKL .ATPDG .FASSKGKKL .YGA.EKKL Häm-Bin KPNEFQFIAF RGKDLRFLPF KGKDLRFLPF YGKDLRFVPF .GQDFKYLPF .GQDFKYLPF	400 EMVAEDDLPN EMVTEDNLPG DMITEEDUSS DLIAEEDLSS DMITEEDLSS DMITEEDLSS DMITEEDLSS DMITEEDLSS GFGRMCPGV GFGRMCPGV GSGRRMCPGV GSGRRICPGA GSGRRICAGA GSGRRICAGA GSGRRICPGA
H1BX2 BX2 H1BX3 BX3 H1BX4 BX4 H1BX5 BX5 H1BX2 H1BX2 H1BX3 BX3 H1BX4 H1BX5 BX5	# 301 ARMVSREDEA ARMATHQDE. HPSK.PSG. QSRP.SGES. E.G.GK ALSG.GKQG. NLK. EMRKLSGDK. Steroidbind MTYLKAVIKE MAYLRAVIKE MAYLRATIKE MPYLKATIKE LPYLKATIKE LPYLKATIKE ## # ##	<pre># # # QGEQEEDKDFDDDKDFESEADFESEADFDNAEDFDNAEDFDNAEDFDNASDFEKESDDFEKESDDFEKESDDF TLRLHPPVPL TSRLHPPAFF AMRVHPPAFF AMRVHPPAFF ALRLHPPAFF ALRLHPPGPL ALRLHPPGL # ### #</pre>	# # # IDVSLSLQQE IYVLLSLQKE IHVLLSLQKE HHVLLSLQKE UHLLSLQKD UHLLSLQKD IDIFLSIQE IDIFLSIQE IDIFLSIQE LLPHFSLDAC LLPHFSTADC	# ### YGLTRDHIKA YGLTDDIKA YGLTDDIKA YGLTDDIKA YGLTDDIKK YGLTDDIVKS YGGTMDIVKS # # # TVDGYTIPAN NIDGYVVPSN EIDGYVPSN EINGYTIPAG EVNGYTIPAG EINGYTIPAG NIDGYDIPAK QUDGYHIPAN # #	## # Saursto: ILIDMFAGT ILIDMFAGT ILVDMFAGT ILVDMFAGT ILVDMFAGT ILVNMFAAI ILVNMFAAI LLMNIFAAI LLMNIFAAI # ## TRVVVNAWAL TRVLVNAWAL TRVLVNAWAL TRVLVNAWAL TRVLVNAWAL TRVLVNAWAL TRVLVNAWAL TRVLVNAWAL TRVLVNAWAL TRVLVNAWAL TRVLVNAWAL TRVLVNAWAL TRVLVNAWAL TRVLVNAWAL TRVLVNAWAL TRVLVNAWAL TRVLVNAWAL TRVLVNAWAL	## ## ff-Bindungs: DTSYMTLEPA DTSYMTLEPA ETSVILTLEYG ETSVILTLEYG ETSVILTLEYG ETSVILVEYS ETSVILVEYS ETSVILVEYA ## ## GRHSSYWENE GRDSSWENE GRDSSWENE GRDSSWENE GRDSSWENE GRDSSWENE GRDDSWERA ARDPTCWDKA GRDPTAWERQ GRDPAWERQ GRDPAWERQ ## #	<pre># # # # # MAELIRKPHL MTELIRKPHL MTELINNRHV MAELINNRHV MAELINNRHV MAELINNRHV MAELINNRHV # # # NEFQPERFM. DDFLPERFLQ EEFMPERFVQ EEFFPERFLE EDFMPERFLE EDFMPERFLE EDFMPERFLE # ##################################</pre>	# LNKLQEEVRR MKKLQEEVRR LTKLQEEVR MKKLQEEVRT MKKLQEVRA ### ### NGAGVDL SGDVAGGVDL DQACDVDTQM E.PGAVDVHM EGRDA.EVDM EGRDA.EVDM EGQEKS.SNL DGWDKSNSYS	# NVPNGQ NVPAGQ TMGSPDGKKL STPEGGKL ATPDG FASSKGKL .YGA.EKKL Håm-Binu KPNEFQFIAF KGKDLRFIPF KGKDLRFIPF GGDFKYLPF .GQDFKYLPF .GQDFKYLPF	400 EMVAEDDLFM EMVTEDNLFG DMITEEDUSS DMLAEEDLSS DMITEEDLSS DMITEEDLSS MIREDLSS # dungstelte GFGRRMCCGV GSGRRMCCGV GSGRRMCCGV GSGRRICCGM GAGRRICCGM GSGRRICCGA SSGRRICCGA # ### # #
H1BX2 BX2 H1BX3 BX3 H1BX4 BX4 H1BX5 BX5 H1BX2 BX3 H1BX2 BX3 H1BX4 BX4 H1BX5 BX5	# 301 ARMVSREDEA ARMATHQDE. HPSK.PSGE. QSRP.SGES. E.G.GK ALSG.GKQG. NLK. EMRKLSGDK. Steroidbinn MTYLKAVIKE MTYLKAVIKE MPYLKATIKE MPYLKATIKE MPYLKATIKE MPYLKATIKE LPYLKATIKE LPYLKATMKE LPYLKATMKE ## # ##	# # # QGEQEEDKDF DDDKDF ESEADF ESEADF DNAEDF DNAEDF DNSADF EKESDDF EKESDDF TLRLHPPVPL TLRLHPPAPF TLRLHPPAPF AMRVHPPAPF ALRLHPPAPF ALRLHPPAFL ALRLHPPGPL # ### #	# # # IDVSLSLQQE IYVLLSLQKE IDLLSLKEE VHLLSLKE VHLLSLQKE IDIFLSIQE IDIFLSRYEE ## MIPHFSLDAC LLPHFSTADC LLPHFSTADC LLPHFSTADC LLPHFSTADC LLPHFSTADC LLPHFSTADC LLPHYSTADC LLPHYSTADC H# #	# ### YGLTRDHIKA YGLTDDIKA YGLTDDIKA YNLSTDNVKA YGLTDDNVKS YGTDDNVKS YGTDDNVKS # # # TVDGYTIPAN EVACYTIPAN EIDGYFVPAG EINGYTVPAG EINGYTIPAG NIDGYVDFNK QIDCYHIPAN ## #	<pre>## # Sauersto: ILIDMFAGT ILIDMFAGT ILUDMFAGT ILVDMFAGI ILVDMFAGI ILVNMFAAI ILVNMFAAI LLMNIFAAI LLMNIFAAI # ### TRVLVNAWAL TRVLVNAWAL TRVLVNAWAL TRVLVNAWAL TRVLVNAWAL TRVLVNAWAL TRVLVNAWAL TRVLVNAWAL TRVLVNAWAL TRVLVNAWAL TRVLVNAWAL TRVLVNAWAL TRVLVNAWAL TRVLVNAWAL TRVLVNAWAL</pre>	## ## ff-Bindungs: DTSYMTLEPA DTSYMTLEPA ETSYLTLEYG ETSYLTLEYG ETSYLVLEYS ETSYLVLEYS ETSYLVLEYA ETSYLVLEYA ETSYLVLEYA ETSYLVLEYA ETSYLVLEYA ETSYLVLEYA BRHSSYWENE GRHSSYWENE GRHSSYWENE GRDTAWERE GRDTAWERE GRDPTAWERE GRDPTAWERE H # 558	<pre># # stelle MAELIRKPHL MTELIRKPHL MTELINRHV MAELINNRHV MAELINNRHV MAELINNRHV # ## NEFQPERFM. NEFVPERFLC EEFMPERFVQ EEFYPERFLE EDFMPERFVQ EEFYPERFLE EDFMPERFVQ EEFYPERFLE EFMPERFMR # ####</pre>	# LINKLQEEVRR MKKLQEEVRR LITKLQEEVR. MKKLQEEVRT MKKLQKEVRT MKKLQAEVRA ### ### NGAGVDL SGDVAGGVDL DQAGDVDTQM E.PGAVDVHM EGRDA.EVDM QGRDA.EVDM DGRDKSNSYS	# NVPNGQ NVPAGQ SQGKL STPEGKL STPEGKL STPEGKL FASSKGKL .YGA.EKKL HÅm-Bin KPNEFHYIFF KGNDIRFVPF KGKDLRFIPF GGDLRFVPF .GQDFKYLPF .GQDFKYLPF	400 EMVAEDLEM EMVTEDNIPG DMIAEEDLSS DMIAEEDLSS DMITEDDISS # UNITEDDISS GFGRRMCPGV GSGRRICPGM GSGRRICPGM GAGRRICAGA GSGRRICPGM GSGRRICPGM GSGRRICPGM GSGRRICPGM GSGRRICPGM H######
H1BX2 BX2 H1BX3 H1BX4 BX4 H1BX5 BX5 H1BX2 BX2 H1BX3 BX3 H1BX4 H1BX5 BX5 H1BX2 H1BX2	# 301 ARMVSREDEA ARMATHQDE. HPSK.PSSG. QSRP.SGES. E.G.GK ALSG.GKQG. NLK. EMRRLSGDK. Steroidbin. MTYLKAVIKE MYLKAVIKE MYLKATIKE MPYLKATIKE LPYLKATIKE LPYLKATIKE LPYLKATIKE ## # ## 501	<pre># # # QGEQEEDKDFDDDKDFEESEADFDNAEDFDNAEDFDNASDFQDNSADFEKESDDF TLRLHPPVPL TSRLHPPAPF TLRLHPPVPL TSRLHPPAPF ALRLHPPAPF ALRLHPPAFF ALRLHPPGFL # ### # LANLMYRFDW</pre>	# # # IDVSLSLQQE IYVLLSLQKE IHVLLSLKKE IHVLLSLKKE IHVLSLQQE IHVFLSLQQE IDIFLSRVEE ## MIPHFSLDAC LLPHFSTDDC LLPHFSTDDC LLPHFSTDC LLPHFSTDC LLPHFSTDC LLPHFSTDC LLPHFSTDC LLPHFSTDC LLPHFSTDC LLPHFSTDC LLPHFSTDC LLPHFSTDC LLPHFSTDC	# ### YGLTRDHIKA YGLTDNIKA YGLTDNIKA YGLTDNIKG YGLTDDNIKG YGLTDDNIKG YGLTDDNIKG YGLTDDNIKG YGLTDDNIKG YGLTDDNIKG YGLTDNIKG UGGYUFPAN EIGSYFVPAG EIGS	## # Saursto: ILIDMFAGT ILIDMFAGT ILVDMFAGT ILVDMFAGT ILVDMFAGT ILVNMFAAT ILVNNFAAT LLMNIFAAT LLMNIFAAT TRVVNAWAL TRVVNAWAL TRVVNAWAL TRVVNAWAL TRVVNAWAL TRVLVNAWAL TRUVNAWAL TRUVNAWAL TRUVNAWAL TRUVNAWAL TRUVNAWAL TRUVNAWAL TRUVNAWAL TRUVNAWAL TRUVNAWAL TRUVNAWAL TRUVNAWAL TRUVNAWAL TRUVNAWAL TRUVNAWAL TRUVNAWAL	## ## ff-Bindungs: DTSYMTLEPA DTSYMTLEPA ETSYLTLEPA ETSYLTLEPA ETSYLVLEPA ETSYLVLEPA ETSYLVLEPA ETSYLVLEPA ## ## GRHSSYWENE GRDSSYWENE GRDSSYWENE GRDDAWERP GRDPAWERQ GRDPAWERQ # # 558 LVPVTV*.	<pre># # # # # MAELIRKPHL MAELINNRHV MAELINNRHV MAELINNRHV MAELINNRHV # # # NEFQPERFM. DDFLPERFLQ EEFMPERFLQ EEFMPERFLQ EEFMPERFLQ EEFMPERFLQ EEFMPERFLQ EEFMPERFLQ # # #####</pre>	# LINKLQEEVRR MKKLQEEVRR MEKLQEEVR MEKLQEEVRT MKKLQEVRT MKKLQAEVRA ### ### NGAGVDL SGDVAGGVD DQAGDVDTQM E.PGAVDVHM GGRDA.EVDM GGRDA.EVDM EGRDA.EVDM	# NVPNGQ NVPAGQ TMGSPDGKKL .STPEGKKL .ATPDG .FASSKGKKL .YGAEKKL Häm-Bin KPNEFQFIFF RGKDLRFLPF GKDLRFLPF GGDFKYLPF .GQDFKYLPF .GQDFKYLPF	400 EMVAEDDLFM EMVTEDNLPG DMITEEDUSS DMIAEEDLSS DMITEEDLSS DMITEEDLSS DMITEEDLSS DMITEEDLSS GFGRMCPGV GSGRRMCPGV GSGRRMCPGV GSGRRICPGA GSGRRICPGA gSGRRICPGA # ### #
H1BX2 BX2 H1BX3 H1BX4 BX4 H1BX5 BX5 H1BX2 H1BX2 H1BX3 BX3 H1BX4 H1BX5 BX5 H1BX2 BX5	# 301 ARMVSREDEA ARMATHQDE. HPSK.PSGS. QSRP.SGES. E.G.GK ALSG.GKQG. NLK. EMRKLSGDK. Steroidbind MTULKAVIKE MPYLKATIKE MPYLKATIKE LPYLKATKKE LPYLKATKKE LPYLKATKKE LPYLKATKKE H# # ## 501	<pre># # # QGEQEEDKDFDDDKDFESEADFEESEADFDNAEDFDNAEDFDNAEDFDNAEDFDNAEDFDNAEDFDHNSEDFDNAEDNAETFD</pre>	# # # IDVSLSLQQE IYVLLSLQKE IHVLLSLQKE HHVLLSLQKE VHLLSLQKE UHLLSLQKE IDIFLSRYEE ## MIPHFSLDAC LLPHFSTADC H H H H H H H H H H H H H H H H H H H	<pre># ### YGLTRDHIKA YGLTDDNIKA YGLTDDNIKA YGLTDDNIKA YGLTDDNVKS YGGTDDDVVKS YGGTDDDVVKS YGGTDDDVVKS H # # TVDGYTIPAN NIDGYVVPSN EIDGYFVPAG EVNGYTIPAG NIDGYVPSN EINGYTIPAG NIDGYVIPAK QIDGYHIPAN ## #</pre>	## # Saursto: ILIDMFAGT ILIDMFAGT ILVDMFAGT ILVDMFAGT ILVDMFAGT ILVNMFAAI ILVNMFAAI LLMNIFAAI LLMNIFAAI # ## TRVVVNAWAL TRVLVNAWAL	## ## ff-Bindungs: DTSYMTLEPA DTSYMTLEPA ETSVILTLEYG ETSVILTLEYG ETSVILTLEYG ETSVILVEYS ETSVIVLEYS ETSVIVLEYA ## ## GRHSSYWENE GRDSSWENE GRDSSWENE GRDSSWENE GRDSSWENE GRDSSWENE GRDSSWENE GRDSSWENE GRDSSWENE GRDSSWENE GRDATWEKP ARDPTAWERQ GRDPAWERQ GRDPAWERQ BADDTAWERQ GRDPAWERQ # # 558 LVPUTV*. LVPUA*	<pre># # # MAELIRKPHL MTELIRKPHL MTELIRKPHL MAELINNRHV MAELINNRHV MAELINNRHV MAELINNRHV # ## NEFQPERFLA DFLPERFLQ EEFPPERFLE EEFPPERFLE EDFMPERFLE EDFMPERFLE EFFPERFLE EFFPERFLE # #####</pre>	# LNKLQEEVRR MKKLQEEVRR LTKLQEEVR MKKLQEEVRT MKKLQEVRA ### ### NGAGVDL SGDVAGGVDL DQACDVDTQM E.PGAVDVHM EGRDA.EVDM EGRDA.EVDM EGQEKS.SNL DGWDKSNSYS	# NVPNGQ NVPAGQ TMGSPDGKKL STPEGGKL ATPDG FASSKGKL .YGA.EKKL Håm-Binu KPNEFQFIAF KGKDLRFIPF YGKDIRFVPF GGDFKYLPF .GQDFKYLPF .GQDFKYLPF	400 EMVAEDDLFN EMVTEDNLPG DMITEEDUSS DMIAEEDLSS DMITEEDLSS DMITEEDLSS MIREDLSS # dungstelte GFGRRMCPGV GSGRRMCPGV GSGRRMCPGV GSGRRICPGM GAGRRICAGA GSGRRICPGA gSGRRICPGA #######
H1BX2 BX2 H1BX3 H1BX4 BX4 H1BX5 BX5 H1BX2 H1BX2 BX3 H1BX4 BX4 H1BX5 BX5 H1BX2 BX5 H1BX2 BX5	# 301 ARMVSREDEA ARMATHODE. HPSK.PSGE. QSRP.SGES. E.G.GK ALSG.GKQG. NLK. EMRKLSGDK. Steroidbin MTYLKAVIKE MPYLKAVIKE MPYLKATIKE MPYLKATIKE MPYLKATIKE LPYLKATIKE LPYLKATIKE HSASATVETM HSASATVETM HSASATVETM	# # # QGEQEEDKDF DDDKDF EQSADF EESEADF DNAEDF DNAEDF DNSEDF DNSEDF DHNSEDF DHNSEDF TIRLHPPVPL TIRLHPPVPL TIRLHPPVPL TIRLHPPAPF AMRVHPPAPF AMRVHPAPF ALRLHPOGPL # ### # LANLMYRPWU LANLMYRPW	# # # IDVSLSLQQE IYVLLSLQKE IHVLLSLQKE IHVLLSLQQE VHLLLSLKKE ## MIPHFSLQQE LLPHYSLDAC LLPHYSLDAC LLPHYSTADS LLPHFSTNDC LLPHFSTNDC LLPHFSTADC LLPHYSTAC LLPHYSTAC LLPHYSTADC LLPHYSTADC LLPHYSTADC LLPHYSTADC LLPHYSTADC LLPHYSTADC LLPHYSTADC LLPHYSTAC LPHYSTAC LLPHYSTAC	<pre># ### YGLTRDHIKA YGLTDNIKA YGLTDNIKA YGLTDNIKG YGLTDNIKG YGLTDNIKG YGLTDNIKG YGLTDNIKG YGLTDNIKG YGLTDNIKG YGLTDNIKG YGLTDNIKG YGLTDNIKG YGLTDNIKG YGLTDNIKG YGLTDNIKG UDGYLPAG UDGYLPAG UDGYLPAG UDGYLPAG UDGYLPAG UDGYLPAG UDGYLPAG UDGYLPAG SGUDMAESFG</pre>	<pre>## # Sauersto: ILIDMFAGT ILIDMFAGT ILVDMFAGI ILVDMFAGI ILVNMFAGI LLMNIFAAI LLMNIFAAI LLMNIFAAI TRVVNAWAL TRVVNAWAL TRVVNAWAL TRVLVNAWAL TRVLVNAWAL TRVLVNAWAL TRVLVNAWAL TRVLVNAWAL TRILVNGWAI # ## ITVSRKEKLI LTVSRKEKLL</pre>	## ## ff-Bindungs: DTSYMTLEPA DTSYMTLEPA ETSYLTLEYG ETSYLTLEYG ETSYLVLEYS ETSYLVLEYS ETSYLVLEYA ETSYLVLEYA ETSYLVLEYA ETSYLVLEYA ETSYLVLEYA RGRHSSYWENE GRHSSYWENE GRHSSYWENE GRDFJAWERQ GRDPTAWERQ GRDPTAWERQ GRDPTAWERQ GRDPTAWERQ H # 558 LVPVTV*. LVPQA* LVPQI*.	<pre># # # # MAELIRKPHL MAELINKPHU MAELINNRHV MAELINNRHV MAELINNRHV MAELINNRHV # ### NEFQPERFM. NEFVPERFL. DDFLPERFLQ EEFYPERFLE EEFYPERFLE EEFYPERFLE EEFYPERFLE EEFYPERFLQ EEFMPERFNQ # #####</pre>	# LINKLQEEVRR MKKLQEEVRR MEKLQTEVRT MKKLQTEVRT MKKLQTEVRT MKKLQAEVRA ### #### NGAGVDL SGDVAGVDTQM EGRDA.EVDM QGRDA.EVDM GGDAS.SINL DGWDKSNSYS	# NVPNGQ NVPAGQ TMGSPDGKKL .STPEGKL .ATPDG .FASSKGKKL .YGAEKKL Häm-Bin. KPNEFQTIAF RGKDLRFUPF YGKDLRFUPF YGKDLRFVPF .GQDFRVLPF .GQDFRVLPF .GQDFRVLPF	400 EMVAEDDLFN EMVTEDULS DMITEEDUSS DLIMEEDLSS DMITEEDLSS DMITEEDLSS MITEEDLSS MITEEDLSS GFGRRMCPGV GFGRRMCPGV GFGRRMCPGV GSGRRICCGA GAGRRICAGA GSGRRICCGA #######
H1BX2 BX2 H1BX3 H1BX4 BX4 H1BX5 BX5 H1BX2 H1BX2 H1BX3 BX3 H1SX4 H1BX5 BX5 H1BX2 BX2 H1BX2 BX2 H1BX2 BX2 H1BX2 BX3	# 301 ARMVSREDEA ARMATHQDE. HPSK.PSGS. QSRP.SGES. E.G.GK ALSG.GKQG. NLK. EMRKLSGDK. Steroidbin MTYLKAVIKE MYLKAVIKE MYLKATIKE MPYLKATIKE MPYLKATIKE LPYLKATIKE LPYLKATKKE ## # ## 501 HSASATIEJM NFGFATMEJM	<pre># # # QGEQEEDKDFDDDKDFEESEADFEESEADFDNAEDFDNAEDFQDNSADFEKESDDF TLRLHPPVPL TSRLHPPAPF ALRLHPPAPF ALRLHPPAPF ALRLHPPAPF LANLMYRFDW LANLMYRFDW LANLMYRFDW</pre>	# # # IDVSLSLQQE IYVLLSLQKE IHVLLSLQKE HHVLSSLQQE IDILLSLKKE HHVFLSLQQE IDIFLSRVEE ## MIPHFSLDAC LLPHYSTADC LLPHYSTADC LLPHYSTADC LLPHYSTADC LLPHYSTADC LLPHYSTADC LLPHYSTADC LLPHYSTADC LLPHYSTADC H# # KLPPGLKEED QLPAGMKAED QLPAGMKAED VPNMMG.TG EVPG.SG	<pre># ### YGLTRDHIKA YGLTDNIKA YGLTDNIKA YGLTDNIKA YGLTDNIKA YGLTDNVKS # # # TVUGYTIPAN NIDGYVVPSN EIDGYFVPAG EINGYFIPAG NIDGYUPPAN NIDGYUPPAN ## #IDMTEVFG AGVDMZESFG AGVSMZSFG</pre>	## # Sauersto: ILIDMFAGT ILIDMFAGT ILVDMFAGT ILVDMFAGT ILVDMFAGT ILVNMFAAI ILVNMFAAI LLMNIFAAI LLMNIFAAI # ## TRVVINAWAL TRVIVNAWAL TRVIVNAWAL TRVIVNAWAL TRVIVNAWAL TRVIVNAWAL TRULVNAWAL TRILVNGWAI # ## ITVSRKEKLI ITVSRKEKLI LTLRRKEKLL LTLRRKEKLL	## ## ff-Bindungs: DTSYMTLEPA DTSYMTLEPA ETSVLTLEYG ETSVLTLEYG ETSVLVLEYS ETSVLVLEYS ETSVLVLEYA ## ## GRHSSYWENE GRDSSWERP GRDSSWERP GRDSSWERP GRDPTCWDKA ARDPTCWDKA GRDPAWERQ # \$58 LVPVTV*. LVPQA* LVPQIP*. LVPLS*	# MAELIRKPHL MTELIRKPHL MAELINNRHV MAELINNRHV MAELINNRHV MAELINNRHV MAELINNRHV MAELINNRHV MAELINNRHV # ## NEFQPERFL DDFLPERFL DDFLPERFLQ EEFYPERFLE EDFMPERFLQ EEFYPERFLE EDFMPERFLQ EEFYPERFNE # ####	# LNKLQEEVRR MKKLQEEVRR MEKLQEEVR MKLQEEVRT MKKLQEVRT MKKLQAEVRA ### ### NGAGVDL DQAGDVDTQM E.PGAVDHM GGRDA.EVDM QGRDA.EVDM QGRDA.EVDM	# NVPNGQ NVPAGQ TMGSPDGKKL .ATPDG .FASSKGKL .YGA.EKKL Hām-Bind KPNEFQFIFF RGKDLRFIPF RGKDLRFIPF YGKDIRFVPF .GQDFKYLPF .GQDFRYLPF	400 EMVAEDDLFM EMVTEDNLPG DMITEEDUSS DLIMEEDLSS MITEEDLSS DMITEEDLSS MITEEDLSS GFGRRMCPGV GFGRRICPGM GSGRRMCPGV GSGRRMCPG4 GSGRRICPGA GSGRRICPGA GSGRRICPGA # ### # #
H1BX2 BX2 H1BX3 BX3 H1BX4 BX4 H1BX5 BX5 H1BX2 H1BX3 BX3 H1BX4 H1BX5 BX5 H1BX2 BX5 H1BX2 BX5 H1BX3 BX3 H1BX4	# 301 ARMVSREDEA ARMATHQDE. USSC. QSRP.SGES. E.G.GK ALSG.GKQG. NLK. EMRKLSGDK. Steroidbind MTYLKAVIKE MPYLKATIKE MPYLKATIKE LPYLKATKKE LPYLKATKKE LPYLKATKKE LPYLKATKKE LPYLKATKKE H# # ## 501 HSASATIEAM NFGFATMEIM NFGFATMEIM	<pre># # # QGEQEEDKDFDDDKDFESEADFESEADFDNAEDFD</pre>	# # # IDVSLSLQQE IYVLLSLQKE IHVLLSLQKE HHVLLSLQKE UHLLSLKKE VHLLSLQE IDIFLSRYEE ## MIPHFSLDAC LLPHFSTADC	<pre># ### YGLTRDHIKA YGLTDDIKA YGLTDDIKA YGLTDDIKA YGLTDDIKKS YGGTDDNVKS YGGTDDNVKS YGGTDDNVKS H # # TVDGYTIPAN EIDGYVPSN EIDGYVPSN EIDGYVPSN EINGYTIPAG NIDGYVPSN EINGYTIPAG NIDGYVPSN UDGYDIPAK QIDGYDIFAK QID</pre>	## # Saursto: ILIDMFAGT ILIDMFAGT ILVDMFAGT ILVDMFAGT ILVDMFAGT ILVNMFAAI ILVNMFAAI ILVNMFAAI # ## TRVVVNAWAL TRVLVNAWAL	## ## ff-Bindungs: DTSYMTLEPA DTSYMTLEPA ETSVLTLEYG ETSVLTLEYG ETSVLUEYS ETSVLVLEYS ETSVLVLEYA ETSVLVLEYA ETSVLVLEYA ## ## GRHSGYWERE GRDLSSWERP GRDLSSWERP GRDDRTWEKP ARDPTAWERQ GRDPTAWERQ GRDPAWERQ GRDPAWERQ GRDPAWERQ GRDPAWERQ GRDPAWERQ IVPUTV*. LVPQA*. LVPQIP*. LVPLAS* LVPLAS*	<pre># # # KAELIRKPHL MTELIRKPHL MTELIRKPHL MAELINNRHV MAELINNRHV MAELINNRHV MAELINNRHV MAELINNRHV # # NEFQPERFLA EEFPPERFLE EEFFPERFLE EDFMPERFLQ EEFFPERFLE EDFMPERFLQ # #####</pre>	# LINKLQEEVRR MKKLQEEVRR LIKLQEEVR MKKLQEEVRT MKKLQEVRA ### ### NGAGVDL DQAEDVDTQM E.PGAVDVHM EGRDA.EVDM EGRDA.EVDM EGRDA.EVDM	# NVPNGQ NVPAGQ SQGKLL TMGSPDGKL .STPEGKL .STPEGKL .YGA.EKKL YGA.EKKL HÅm-Binn KPNEFQFIAF KGKDLRFIPF YGKDIRFVPF .GQDFKYIPF .GQDFKYIPF .GQDFRYIPF	400 EMVAEDDLEN EMVTEDNLEG DMITEEDUSS DMIAEEDLSS MINEDDLSS MIREDLSS MIREDLSS GGGRRMCPGV GSGRRMCPGV GSGRRMCPGV GSGRRICPGM GAGRRICPGM GAGRRICPGA GSGRRICPGA H#H#H #H
H1BX2 BX2 H1BX3 H1BX4 BX4 H1BX5 BX5 H1BX2 BX2 H1BX3 BX3 H1BX4 BX4 H1BX5 BX5 H1BX2 BX3 H1BX2 BX3 H1BX2 BX3 H1BX2 BX3 H1BX2 BX3 H1BX2	# 301 ARMVSREDEA ARMATHODE. HPSK.PSGE. QSRP.SGES. E.G.GK ALSG.GKQG. NLK. EMRKLSGDK. Steroidbirn MTYLKAVIKE MPYLKATIKE MPYLKATIKE MPYLKATIKE MPYLKATIKE LPYLKATIKE LPYLKATKKE LPYLKATKEL HSASATVETM HSASATVETM NFGFATMEJM NFGFATMEJM TFAIATVEIM	<pre># # # QGEQEEDKDFDDDKDFEQNADFESEADFDNADFDNSEDFQDNSADFEKESDDF TLRLHPPVPL TLRLHPPVPL TLRLHPPVPL ALRLHPAFF AMRVHPPAFF AMRVHPPAFF ALRLHPPGPL # ### # LANLLMYRFDW LANLLYHFDW LANLLYHFDW LANLLYHFDW</pre>	# # # IDVSLSLQQE IYVLLSLQKE IHVLLSLQKE IHVLSLQQE IHVFLSLQQE IDIFLSRYEE ## MIPHFSLDAC LLPHYSTADS LLPHFSTNDC LLPHFSTNDC LLPHFSTNDC LLPHFSTAC LLPHFSTAC LLPHF	<pre># ### YGLTRDHIKA YGLTDNIKA YGLTDNIKA YGLTDNIKG YGLT</pre>	<pre>## # Saursto: LIDMFAGT LLDMFAGT LLDMFAGT LLVMFAGT LLVMFAGT LLVMFAGT LLVMFAGT LLVMFAGT TRVVNAWAL TRVVNAWAL TRVVNAWAL TRVVNAWAL TRVVNAWAL TRVVNAWAL TRVVNAWAL TRVVNAWAL TRVVNAWAL TRVVNAWAL TRVVNAWAL TRVVNAWAL TRVVNAWAL TRIVNAWAL LTLRKKELL LTLRKKELL LTLRKKELL MTLRRTQRLH MTLRTQRLH</pre>	## ## ff-Bindungs; DTSYMTLEPA DTSYMTLEPA ETSYLTLEPA ETSYLTLEPA ETSYLVLEYS ETSFLVLEYS ETSYLVLEYS ETSYLVLEYA ## ## GRHSGYWERE GRDSSWERP GRDTAWERP GRDTAWERQ GRDPAWEKP # # 558 LVPVTV*. LVPQA* LVPQIP*. LVPRIAS*	<pre># # # # MAELIRKPHL MAELINKPHL MAELINNRHV MAELINNRHV MAELINNRHV # ### NEFQPERFL. DDFLPERFLQ EEFMPERFVQ EEFMPERFVQ EEFMPERFVQ EEFMPERFVQ EEFMPERFVQ EEFMPERFVQ # ####</pre>	# LINKLQEEVRR MKKLQEEVRR MEKLQTEVRT MKKLQTEVRT MKKLQTEVRT MKKLQAEVRA ### ### NGAGVDL SGDVAGGVDL DQAGDVDTQM E.PGAVDYRM EGRDA.EVDM QGRDA.EVDM QGRDK.SNSYS	# NVPNGQ NVPAGQ TMGSPDGKKL .STPEGKL .ATPDG .FASSKGKKL .YGAEKKL HÅM-Bin KPNEFQTIAF RGKDLRFUPF YGKDLRFUPF YGKDLRFUPF .GQDFRVLPF .GQDFRVLPF #	400 EMVAEDDLPN EMVTEDNLPG DMITEEDUSS DLIMEEDLSS DMITEEDLSS DMITEEDLSS DMITEEDLSS MITEEDLSS GFGRMCPGV GFGRRCPGV GSGRRICPGA GSGRRICPGA GSGRRICPGA GSGRRICPGA # ### # #
H1BX2 BX2 H1BX3 H1BX4 BX4 H1BX5 BX5 H1BX2 H1BX3 BX3 H1BX4 H1BX5 BX5 H1BX2 BX2 H1BX3 BX3 H1BX4 H1BX4 BX4 H1BX5	# 301 ARMVSREDEA ARMATHQDE. HPSK.PSGS. QSRP.SGES. E.G.GK ALSG.GKQG. NLK. EMRKLSGDK. Steroidbin MTYLKAVIKE MYLKATIKE MYLKATIKE MYLKATIKE MYLKATIKE LPYLKATIKE LPYLKATIKE LPYLKATIKE HSASATIEAM NFGFATMEIM NFGFATMEIM TFAIATVEIM NFALATVEIM NFALATVEIM	<pre># # # QGEQEEDKDFDDDKDFEESEADFEESEADFDNAEDFDNAEDFDNSADFEKESDDFEKESDDF TLRLHPPVPL TSRLHPPAPF ALRLHPPAPF ALRLHPPAPF ALRLHPPAPF LANLMYRPUW LSNLMYRPUW LANLIYHPUW LANLIYHPUW LANLIYHPUW LANLIYHPUW LANLIYHPUM LANL</pre>	# # # IDVSLSLQQE IYVLLSLQKE ILVLLSLKKE VHLLSLKKE VHLLSLKKE UHFLSLQQE IDIFLSRVEE ## MIPHFSLDQC LLPHYSTADC LLPHYSTADC LLPHYSTADC LLPHYSTADC LLPHYSTADC LLPHYSTADC H# # KLPPGLKEED QLPAGMKAED QLPAGMKAED VPNMMG.TG EVPG.SG ELPSEMEAVG EMPAEMERTG EVPNEKEGT	<pre># ### YGLTRDHIKA YGLTDNIKA YGLTDNIKA YGLTDNIKA YGLTDNIKS YGTDDNVKS YGTDDNVKS YGTDDVVKS H # # TVUGYTIPAN NIDGYVPSN EIDGYFUPAG EINGYTIPAG EING EINGYTIPAG EINGYTIPAG EING EINGYTIPAG EINGYTIPAG EINGYTIPAG EIN</pre>	## # Sauersto: ILIDMFAGT ILIDMFAGT ILVDMFAGT ILVDMFAGT ILVDMFAGT ILVNMFAAI ILVNMFAAI LLMNIFAAI LLMNIFAAI # ## TRVVINAWAL TRVLVNAWAL	## ## ff-Bindungs: DTSYMTLEPA DTSYMTLEPA ETSVLTLEYG ETSVLTLEYG ETSVLVLEYS ETSVLVLEYS ETSVLVLEYA ## ## GRHSSYWENE GRDSSWERE GRDLSSWERE GRDLSSWERE GRDDATWERE # # 558 LVPVTV*. LVPQA* LVPQIP*. LVPRIAS* LVPRIK* LVPRIK*	<pre># # # # KELLER MAELIRKPHL MAELINNRHV MAELINNRHV MAELINNRHV MAELINNRHV MAELINNRHV MAELINNRHV # ## NEFQPERFM. DDFLPERFL DDFLPERFL DDFLPERFL EEFYPERFL EEFYPERFL EEFYPERFL # #####</pre>	# LNKLQEEVRR MKLLQEEVRR LTKLQEEVR MEKLQTEVRT MKKLQTEVRT MKKLQAEVRA ### ### NGAGVDL DQAGDVDTQM E.PCAVDVHM EGRDA.EVDM QGRDA.EVDM QGRDA.EVDM DGWDKSNSYS	# NVPNGQ NVPAGQ TMGSPDGKKL .STPEGGKL .ATPDG FASSKGKKL .YGA.EKKL Häm-Bind KPNEFQTFF RGKDLRFIPF GKDLRFIPF YGKDLRFVPF .GQDFKYLPF .GQDFKYLPF #	400 EMVAEDDLFM EMVTEDNLPG DMITEEDUSS DLIMEEDLSS DMITEEDLSS DMITEEDLSS MITEEDLSS GFGRRMCFGV GFGRRICFGA GSGRRMCFGV GSGRRMCFG4 GSGRRICFGA GAGRRICAGA GAGRRICAGA GSGRRICFGA # ### # #
H1BX2 BX2 H1BX3 BX3 H1BX4 BX5 BX5 H1BX2 BX2 H1BX3 BX3 H1BX4 BX5 BX5 H1BX2 BX5 H1BX2 BX3 H1BX2 BX3 H1BX4 BX4 H1BX5 BX5 H1BX2	# 301 ARMVSREDEA ARMATHODE. JPSK.PSGE. GSRP.SGES. E.G.GK ALSG.GKQG. NLK. EMRKLSGDK. Steroidbin MTYLKAVIKE MYLKATIKE MPYLKATIKE MPYLKATIKE MPYLKATIKE MPYLKATIKE LPYLKATIKE LPYLKATIKE HSASATVETM HSASATVETM NFGFATMEIM NFGFATMEIM NFGFATMEIM NFGLATMEIM	<pre># # # QGEQEEDKDFDDDKDFEXSEADFEXSEADFDNAETFDNAETF</pre>	# # # IDVSLSLQQE IYVLLSLQKE IDLLSLKKE VHLLSLKKE VHLLSLQE IDIFLSRYEE ## MIPHFSLDAC LLPHFSTADC	<pre># ### YGLTRDHIKA YGLTDNIKA YGLTDNIKA YGLTDNIKA YGLTDNIKS YGLTDNVKS YGGTMDNVKS YGGTMDNVKS YGGTMDNVKS H # # TVDGYTIPAN NIDGYVFSN EIDGYFVPAG EVNGYTIPAN NIDGYVFSN EINGYTIPAN NIDGYVFSN EINGYTIPAN NIDGYVFSN EINGYTIPAN NIDGYVFSN EINGYTIPAS NIDGYVFSN EINGYTIPAS NIDGYVFSN EINGYTIPAS NIDGYVFSN EINGYTIPAS NIDGYVFSN EINGYTIPAS NIDGYVFSN EINGYTIPAS NIDGYFFS NI</pre>	## # Sauersto: ILIDMFAGT ILIDMFAGT ILUDMFAGT ILVDMFAGT ILVDMFAGT ILVNMFAAT ILVNMFAAT ILVNNFAAT # ## TRVVVNAWAL TRVLVNAWAL	## ## ff-Bindungs: DTSYMTLEPA DTSYMTLEPA ETSVLTLEYG ETSVLTLEYG ETSVLUEYS ETSVLVLEYS ETSVLVLEYA ETSVLVLEYA ETSVLVLEYA ## ## GRHSGYWERE GRDLSSWERP GRDLSSWERP GRDDRTWEKP ARDPTAWERQ GRDPTAWERQ GRDPAWERQ GRDPAWERQ GRDPAWERY # # 558 LVPQT*. LVPQ1P*. LVPQ1P*. LVPRIAS* LVPRIAS* LVPRIK* LVPRIK* LVPRIS*	<pre># # # Ktelle MAELIRKPHL MTELIRKPHL MTELIRKPHL MAELINNRHV MAELINNRHV MAELINNRHV MAELINNRHV # # # NEFQPERFLA EEFPPERFLE EEFFPERFLE EDFMPERFLQ EEFFPERFLE EDFMPERFLQ # # #####</pre>	# LINKLQEEVRR MKKLQEEVRR LIKLQEEVR MKKLQEEVRT MKKLQEVRA ### ### NGAGVDL DQAEDVDTQM E.PGAVDVHM EGRDA.EVDM EGRDA.EVDM EGRDA.EVDM	# NVPNGQ NVPAGQ SQGKLL TMGSPDGKLL .STPEGGKL .STPEGGKL .YGA.EKKL YGA.EKKL HÅm-Binn KPNEFQFIAF KGKDLRFIPF YGKDIRFVPF .GQDFKYLPF .GQDFKYLPF .GQDFRYLPF	400 EMVAEDDLFM EMVTEDNLPG DMITEEDUSS DMIAEEDLSS MINEEDLSS MIREDLSS MIREDLSS GGGRRMCPGV GSGRRMCPGV GSGRRMCPGV GSGRRICPGM GAGRRICAGA GSGRRICPGA ########

Abbildung 6: Analyse der Aminosäure-Sequenzen der HIBX-Enzyme, und Vergleich mit den entsprechenden homologen BX-Enzymen aus Zea mays (Kliem, 1994). Funktionelle Domänen sind durch Unterstreichen (Transmembran-Region, Prolin-Cluster) oder durch Einrahmen (Sauerstoff-Bindestelle, Steroid-Bindestelle und Häm-Bindestelle) hervorgehoben. (Zeichenerklärung: "#": an dieser Position AS identisch für alle BX- und HIBX-Enzyme)

Auf Aminosäure-Ebene beträgt der Grad der Identität der HIBX-Sequenzen untereinander zwischen 47 und 67 %, der Grad der Ähnlichkeit zwischen 66 und 83 % (Tabelle 9). Identität und Ähnlichkeit der HIBX-Enzyme untereinander sind damit geringer als Identität und Ähnlichkeit der HIBX-Enzyme zu ihren Homologen aus *Zea mays* (Tabelle 8), der zwischen 76 und 81 %, bzw. 86 und 90 % liegt. Auf Grund der hohen Homologie lassen sich nach der 40 % Regel (Nebert u. Nelson, 1991) die *HIBx*-Gene aus *H. lechleri* in die *Cyp71C*-Familie einordnen.

Tabelle 8: Identität und Ähnlichkeit der HIBX-Enzyme untereinander und mit den BX-Enzymen aus *Zea mays* in %. Die Paare mit der größten Identität / Ähnlichkeit sind durch Fettdruck hervorgehoben

	HIBX2	HIBX3	HIBX4	HIBX5
HIBX3	51 / 70	-	-	-
HIBX4	52 / 71	67 / 83	-	-
HIBX5	47 / 66	67 / 80	58 / 76	-
BX2	80 / 90	51 / 71	50 / 68	49 / 69
BX3	50 / 72	76 / 88	64 / 80	65 / 81
BX4	52 / 72	62 / 79	81 / 90	57 / 77
BX5	46 / 65	61 / 76	54 / 74	78 / 86

Aus den von den cDNAs abgeleiteten Aminosäure-Sequenzen läßt sich mittels des Programmes GCG folgender Stammbaum erstellen (Abb. 7). Besonders auffällig ist die evolutive Distanz zwischen HIBX2 und den restlichen HIBX-Enzymen. Das gleiche gilt auch für die BX-Enzyme aus Mais.



Abbildung 7: Phylogenetischer Stammbaum der *H. lechleri* Enzyme HIBX2-HIBX5 und der *Zea mays* Enzyme BX2-BX5

3.4 Erstellen verschiedener Konstrukte für die heterologe Expression von *HlBx*2-5 in *S. cerevisiae*

Die Bestimmung der *in vitro* Funktion der *H. lechleri* HIBX-Enzyme erfolgte über heterologe Expresssion in *S. cerevisiae*. Es standen Hefestämme zur Verfügung, die verschiedenene chromosomal codierte P450-Reduktasen aus *A. thaliana* oder *S. cerevisiae* unter Kontrolle eines Galactose-induzierbaren Promotors exprimieren (Pompon, 1996). Diese wurden bereits erfolgreich zur heterologen Expression von *Bx2-Bx5* aus *Zea mays* eingesetzt (Grün, 1997). Die Expression der pflanzlichen P450 Gene erfolgte nach Klonierung der cDNA in den Shuttle Vektor pYeDP60 (Urban *et al.*, 1990).

3.4.1 Modifikation des Expressionsvektors pYeDP60

Die Expression der *HlBx*-cDNAs erfolgte bei pYeDP60-Konstrukten über den Galactose-induzierbaren Promotor GAL10CYC1. Die Expressionsrate im Hefesystem

hängt dabei vom Abstand zwischen Klonierungsposition und Promotor ab. Für die Klonierung der cDNAs stehen eine *Bam*HI-Schnittstelle nach der Promotorsequenz und eine *Eco*RI-Schnittstelle vor dem Terminator zur Verfügung. Da die cDNAs jedoch über *Eco*RI (5'-Ende) / *Xho*I (3'-Ende) in pBluescript kloniert vorlagen, war eine Modifikation der Klonierungsposition sinnvoll. Zu diesem Zweck wurde pYeDP60 mit *Bam*HI und *Eco*RI geöffnet, und ein Adapter (*pYAd*) kloniert, der den *Bam*HI-Schnitt enthält, und darauffolgend einen *Eco*RI-Schnitt und einen *Sal*I-Schnitt einführt. Die ursprüngliche *Eco*RI-Schnittstelle wurde dabei beseitigt (2.9.7.2). Im Gegensatz zur *Xho*I-Erkennungssequenz ist die *Sal*I-Erkennungssequenz unique im Vektor. Eine Klonierung der cDNA als *Eco*RI / *Xho*I – Fragmentes in der richtigen Orientierung wurde damit ermöglicht.

3.4.2 Erstellen des Expressionskonstrukts für *HlBx2*

Die *HlBx2*-cDNA enthält interne Schnittstellen (wie z.B. *Eco*RI, Position 1388 im Alignment Punkt 3.3.4), die die Klonierung erschweren. Der partielle cDNA-Klon *518* unterscheidet sich von *HlBx2* durch das Fehlen der ersten 38 Codons des Leserahmens. Fragment 518 wurde mittels *Bam*HI / *Xho*I aus pBluescipt ausgeschnitten (*Bam*HI aus der Vektorsequenz), und in den modifizierten Vektor pYeDP60 ligiert. Dieses Konstrukt wurde mit *Eco*RI geschnitten, so daß der 5'-Bereich dieser cDNA entfernt wurde. Statt dessen wurde das entsprechende *Eco*RI-Fragment der vollständigen cDNA ligiert. Die korrekte Orientierung des Fragmentes wurde durch Sequenzanalyse bestätigt.

3.4.3 Erstellen von Expressionskonstrukten für *HlBx3*

Zur heterologen Expression von *HlBx3* in Hefe wurden drei Expressionskonstrukte hergestellt:

- Klonierung der unveränderten cDNA in pYeDP60. Der Abstand zwischen der *Eco*RI Klonierungsposition und dem Translationsstart ATG beträgt in der *HlBx3*-cDNA 45 Basenpaare. (Knott, 2000)
- Minimierung der Distanz zwischen Klonierungs-Schnittstelle *Bam*HI und Translationsstart (Knott, 2000).
- Gerichtete Mutation des 5´-Endes der codierenden Sequenz im Hinblick auf Codon Usage und GC-Gehalt, sowie Einführung einer AT-reichen Sequenz zwischen *Eco*RI-Schnitt und Translationsstart

Die Minimierung der Distanz zwischen Klonierungs-Schnittstelle und Translationsstart wurde durch Adapter-Ligation erreicht (Abbildung 8). Die Modifikation wurde durch Sequenzieren überprüft. Dieser Klon wurde als *HlBx3A* bezeichnet.

Abbildung 8: Minimierung der Distanz zwischen der BamHI-Restriktionsschnittstelle und des Translationsstartes ATG der HlBx3-cDNA durch Ersetzen des BamHI / PstI-Fragmentes durch den Adapter Hl3Ad. Ursprüngliche cDNA-Sequenz: HlBx3, Modifizierte Sequenz: HlBx3A. cDNA-Großbuchstaben, Vektorsequenz Sequenz in in Kleinbuchstaben. Restriktionsschnittstellen sind durch Unterstreichen, der Translationsstart ATG durch Fettdruck hervorgehoben. Die Numerierung der Nucleotide bezieht sich auf das Alignment in Punkt 3.3.3.

Die "Codon-Usage" in Gräsern und *S. cerevisiae* unterscheidet sich erheblich voneinander. In Gräsern sind die Codons CTC und CTG für Leucin, GCG für Alanin, GTG für Valin, CGC für Arginin und CCC für Prolin häufig. Die entsprechenden tRNAs kommen aber in Hefe lediglich in einer Häufigkeit von 0-3%, bezogen auf die jeweilige Aminosäure, vor. Zudem ist der GC-Gehalt in

den codierenden Sequenzen der Gräser sehr hoch. Diese beiden Faktoren können zu einer verringerten Expressionsrate der heterologen Gene in Hefe führen. Deshalb soll durch gerichtete Mutation des 5'-Endes der codierenden Sequenz die Codon-Usage und GC-Gehalt der Gene an Hefe angeglichen werden. Zwischen *Eco*RI-Schnitt und Translationsstart sollte zudem eine AT-reiche Sequenz eingeführt werden. Um dieses zu bewerkstelligen, wurde neben der Verwendung des Adapters *H3536a* ein modifiziertes PCR-Fragment eingesetzt. Die Kombination beider Methoden ermöglicht die Sequenzänderung eines 129 Bp langen Teils des 5'-Endes der cDNA (siehe 2.9.8 und Abbildung 9).

Der eingesetzte Adapter H13536a weist am 5'-Ende eine BamHI-Schnittstelle, am 3'-Ende eine HincII-Schnittstelle auf und ist 85 Bp lang (Abbildung 9). Die in der PCR-Reaktion verwendeten Primer waren der 105 Bp lange Mutagenese-Primer L37 (2.9.3) und Gegenprimer L38 (2.9.3), der unmittelbar nach der NotI-Schnittstelle 374 Bp stromabwärts vom Translationsstart bindet. Das gereinigte PCR-Fragment wurde mit HincII und NotI verdaut. Adapter und geschnittenes PCR-Fragment wurden über eine Dreipunkt-Ligation in den BamHI/NotI geöffneten Vektor pBluescript erhaltenen zwischen-kloniert. Die Klone wurden über analytische Restriktionsverdaue mit NotI / PstI bzw. PvuII getestet. Die Fragmente positiver Klone wurde sequenziert (Abbildung 9).

HlBx3/pYeDP60 wurde durch Verdau mit *Bam*HI/*Not*I geöffnet, und das ursprüngliche 5'-Ende durch das mit *Bam*HI / *Not*I aus pBluescript ausgeschnittene, modifizierte 5'-Ende ersetzt. Die erhaltenen Klone (*HlBX3e*) wurden über Restriktionsanalysen mit *Bam*HI / *Xho*I und *Pvu*II / *Xho*I getestet.

48



Abbildung 9: Vergleich des 5'-Endes des codierenden Bereiches von Ursprungssequenz *HlBx3* und modifizierter Sequenz *HlBx3a*. Die Numerierung der Nucleotide entspricht dem Alignment Punkt 3.3.3, deshalb erscheint sie nicht immer stimmig. Veränderte Basen sind durch Unterstreichen hervorgehoben. Durch Fettdruck hervorgehobene Codons der Originalsequenz haben in Hefe eine Codon-Usage von weniger als 10 %. Die eingerahmte Sequenz entstammt dem Adapter *Hl3536a*, der Pfeil symbolisiert den aus dem Mutagenese-Primer *L37* hervorgegangenen Sequenzteil. Die letzten 21 Basen sind unverändert. Der Gegenprimer L38 wird durch den gestrichelten Pfeil unterhalb der entsprechenden codierenden Sequenz dargestellt. Die Nucleotid-Sequenzänderung führte zu keiner Veränderung der Aminosäure-Sequenz.

3.4.4 Erstellen des Expressionskonstrukts für HlBx4

Der *HlBx4*-cDNA fehlt das Startcodon. Das Alignment aller vier cDNA-Sequenzen (Abbildung 5, Punkt 3.3.4) zeigt eine gute Übereinstimmung im 5'-Bereich. In diesem Alignment wird den Startcodons von *HlBx2*, *HlBx3* und *HlBx5* bei *HlBx4* das Codon AGG zugeordnet, da dieser Leserahmen für ein P450-Enzym codiert. Daher wurde dieser Leserahmen nach Überführen des AGG-Codons in ein ATG-Codon für die heterologe Expression von *HlBx4* eingesetzt. Die entsprechende Änderung der Gensequenz erfolgte über den Adapter *Hl4Ad* (2.9.7.2 und Abbildung 10). Die Modifikation wurde durch Sequenzieren überprüft. Der Klon mit dem eingeführten Translationsstart wurde als *HlBx4A* bezeichnet.

HlBx4:			
XbaI		ECORI	PstI
<u>tctaga</u> actagtggatcccccgg	gctgca	I <u>GGAATTC</u> GGCACC <u>AGG</u> GCTCTTGAAGCAGCGTACCAC	TAC <u>CTGCAG</u>
HlBx4A:			
	XbaI	EcoRI	PstI
	tctag	<u>agAATTC</u> GGCACC <u>ATG</u> GCTCTTGAAGCAGCGTACCAC	FAC <u>CTGCAG</u>

Abbildung 10: Die Einführung eines Translationstarts für den offenen Leserahmen von *HlBx4* mittels des Adapters *Hl4Ad* am 5'-Ende der cDNA. Ursprüngliche Sequenz: HlBx4, Veränderte Sequenz: HlBx4A. cDNA-Sequenz in Großbuchstaben, Vektorsequenz in Kleinbuchstaben. Wichtige Restriktionsschnittstellen, sowie Beginn des **ORFs** der sind durch Unterstreichen, der Basenaustausch durch Fettdruck hervorgehoben. Bei dieser Klonierung wird der vektorielle Bereich zwischen Xbal- und EcoRI-Schnittstelle entfernt.

HlBx4A wurde mit *Eco*RI / *Xho*I aus pBluescript ausgeschnitten, und in den modifizierten Vektor pYeDP60 (siehe Punkt 3.3.1) ligiert. Die korrekten Konstrukte wurden über Schneiden mit *Bam*HI identifiziert.

3.4.5 Erstellen von Expressionskonstrukten für HlBx5

Zur heterologen Expression von *HlBx5* in Hefe wurden drei verschiedene Strategien verfolgt:

- Klonierung der unveränderten cDNA in pYeDP60 als *Eco*RI / *Xho*I-Fragment. Der Abstand zwischen der *Eco*RI Schnittstelle und dem Translationsstart ATG beträgt in der *HlBx5*-cDNA 29 Basenpaare.
 - Minimierung der Distanz zwischen Klonierungs-Schnittstelle *Eco*RI und Translationsstart
- Gerichtete Mutation des 5´-Endes der codierenden Sequenz im Hinblick auf Codon Usage und GC-Gehalt, sowie Einführung einer AT-reichen Sequenz zwischen *Eco*RI-Schnitt und Translationsstart

Die Verkürzung der Distanz zwischen *Eco*RI-Schnittstelle und Translationsstart erfolgte mittels PCR (siehe 2.9.8 und Abbildung 11). Die in der PCR-Reaktion verwendeten Primer waren der Mismatch-Primer *L5Eco* (2.9.3) und Gegenprimer *L5Aat* (2.9.3), der an der *Aat*II-Schnittstelle 412 Bp stromabwärts vom Translationsstart bindet. Das gereinigte PCR-Fragment wurde mit *Aat*II und *Eco*RI verdaut, und gegen das ursprüngliche *Eco*RI / *Aat*II Fragment von *HlBx5* ausgetauscht. Die modifizierte cDNA *HlBx5A* wurde durch einen *Eco*RI / *Xho*I Verdau ausgeschnitten, und in den modifizierten pYeDP60 ligiert.



Abbildung 11: Mismatch-PCR zur Einführung einer *Eco*RI-Schnittstelle in unmittelbarer Nachbarschaft zum Translationsstart ATG von *HlBx5* mit den Primern *L5Eco* und *L5Aat*. Codierende Sequenzen sind in Großbuchstaben, Nicht-Codierende Sequenzen in Kleinbuchstaben dargestellt. Wichtige Restriktionsschnittstellen sind durch Unterstreichen, ausgetauschte Nucleotide durch Fettdruck hervorgehoben. ### markiert den Translationsstart ATG. Die Numerierung der Nucleotide entspricht derjenigen des Alignment in Punkt 3.3.3.

Die Modifikation des 5'-Endes erfolgte analog zu *HlBx3* (siehe 3.4.3). Durch die gleichzeitige Anwendung von Adapter und PCR-Fragment konnten die ersten 123 Basen des 5'-Endes des codierenden Bereiches von HlBx5 modifiziert werden. Der eingesetzte Adapter H15556 weist am 5'-Ende eine EcoRI-Schnittstelle, am 3'-Ende eine PvuII-Schnittstelle auf, und ist 75 Bp lang (Abbildung 11). Die in der PCR-Reaktion verwendeten Primer waren der 96 Bp lange Mutagenese-Primer L57 (Abbildung 12) und Gegenprimer L5Aat. Das gereinigte PCR-Fragment wurde mit PvuII und AatII geschnitten. Das 5'-Ende von HlBx5/pBluescript wurde über Schneiden mit EcoRI und AatII entfernt. Dieses wurde über eine Dreipunkt-Ligation durch den Adapter Hl5556 sowie das geschnittene PCR-Fragment ersetzt. Die erhaltenen Klone wurden über analytische Restriktionsverdaue mit EcoRI / XhoI, bzw. PvuII getestet. Das 5'-Ende positiver Klone wurde sequenziert, um ungewollte Sequenzänderungen auszuschließen. Ein Klon (*HlBx5e*) erwies sich als korrekt; lediglich in Position 386 war eine Mutation von C nach T zu finden, die aber zu

keiner Änderung der Aminosäuresequenz führt. Dieser Klon wurde zur heterologen Expression eingesetzt.



Abbildung 12: Vergleich des 5´-Endes der cDNA *HlBx5* und der modifizierten Sequenz *HlBx5e*. Die Numerierung der Nucleotide entspricht derjenigen des Alignment in Punkt 3.3.3. Veränderte Basen sind durch Unterstreichen hervorgehoben. Durch Fettdruck hervorgehobene Codons der Originalsequenz haben in Hefe eine Codon-Usage von weniger als 10 %. Die eingerahmte Sequenz entstammt dem Adapter *Hl5556*; der Pfeil symbolisiert den aus dem Mutagenese-Primer *L57* hervorgegangenen Sequenzteil. Die letzten 21 Basen sind unverändert. Der Gegenprimer *L5Aat* wird als gestrichelter Pfeil unter der entsprechenden codierenden Sequenz dargestellt. Die Nucleotid-Sequenzänderung führte zu keiner Veränderung der Aminosäure-Sequenz.

3.5 Die Heterologe Expression und *in vitro* Aktivität der HIBX-Enzyme

Die drei Hefestämme W(R), WAT11 und WAT21 wurden mit je 1 - 3,5 μ g Plasmid transformiert. Die Selektion nach transformierten Zellen erfolgte über Adenin-Komplementation. Je eine transformierte Kolonie wurde weiter angezogen. Die Induktion der Zellen und die Isolation der mikrosomalen Fraktionen erfolgte, soweit nicht anders beschrieben, wie in 2.7.2 und 2.10.1 dargestellt.

Es konnten zwischen 25 mg und 60 mg mikrosomalen Proteins aus einer induzierten 250 ml Kultur isoliert werden. Anschließend erfolgte die Untersuchung auf ihren Gehalt an *H. lechleri* P450 Protein, und auf ihre Fähigkeit, Substrate des DIBOA-Biosyntheseweges in Mais enzymatisch umzusetzen.

Die heterolog exprimierten HIBX-Proteine wurden über Western Blot nachgewiesen, wobei zur Detektion jeweils der gegen das homologe Mais-Protein gerichtete Antikörper (Glawischnig, 1997) eingesetzt wurde. Es wurden je 20 µg mikrosomales Protein eingesetzt. Als Positivkontrolle dienten Hefemikrosomen, die die entsprechenden BX-Proteine aus Mais enthalten. 5 – 27 µg dieser Mikrosomen wurden eingesetzt. Das entspricht 2 – 10 ng des jeweiligen P450 Enzyms. Als Negativkontrolle dienten Mikrosomen induzierter, mit pYeDP60 transformierter Hefe. Die Negativkontrolle zeigte keine BX / HIBX – typische Bande. Die exakte Quantifizierung der HIBX-Proteine konnte nicht durchgeführt werden, jedoch sind auf Grund des hohen Grades an Homologie zwischen den entsprechenden Enzymen beider Arten sowie des Einsatzes von polyklonalen Antikörpern Mengenabschätzungen möglich.

Bei den durchgeführten Enzymtests wurde von der Annahme ausgegangen, daß die HIBX-Enzyme die gleiche Aufgabe im DIBOA-Biosyntheseweg übernehmen, wie ihre jeweils homologen BX-Enzyme aus *Zea mays*. Aus diesem Grund wurden alle Intermediate des DIBOA-Biosyntheseweges, also Indol, Indolin-2-on, 3-Hydroxy-Indolin-2-on, HBOA

54

und DIBOA auf ihre Eignung als Substrat für alle HIBX-Enzyme getestet. Keines dieser Substrate wird durch mikrosomale Fraktionen, die aus induziertem WAT11 pYeDP60 isoliert wurden, umgesetzt. Es wurden Enzymtest-Ansätze ohne NADPH als Negativkontrollen verwendet, um sicher zu stellen, daß es sich um Cytochrom P450-abhängige Reaktionen handelt. Die Durchführung der Tests erfolgt wie in Punkt 2.10.6 beschrieben, wobei statt des reinen Proteins mikrosomale Fraktionen eingesetzt wurden. Nach Extraktion der Edukte und Reaktionsprodukte aus dem Testansatz erfolgte deren HPLC-gestützte Analyse. Die Identifikation der Reaktionsprodukte erfolgte über den Vergleich ihrer Retentionszeiten und, soweit möglich, durch Analyse der Spektren. Dazu wurden parallel die Referenzsubstanzen aufgetragen.

3.5.1 Charakterisierung von HIBX2 durch heterologe Expression in S. cerevisiae

Die Expressionsrate von HIBX2 in Hefe liegt unter der Nachweisgrenze der Western Analyse. Dennoch zeigen mikrosomale Fraktionen aus den induzierten transformierten Hefestämmen P450-spezifische Aktivität: Indol wird NADPH-abhängig zu Indolin-2-on umgesetzt (Abbildung 13), während bei Einsatz aller anderen Substrate des DIBOA-Biosyntheseweges kein Umsatz erfolgt. Die Aktivität von HIBX2 entspricht also der des homologen BX2 aus *Z. mays*. Unter Standardbedingungen (siehe 2.10.6) wurden durch 2 mg BX2 haltige Mikrosomen 6,8 nmol Indol zu Indolin-2-on umgesetzt, durch die gleiche Menge HIBX2-haltiger Mikrosomen jedoch nur 0,16 nmol. Diese Unterschiede in der katalytischen Aktivität spiegeln vermutlich die unterschiedliche Menge an exprimierten P450-Protein wieder.



Abbildung 13: NADPH-abhängiger Umsatz von Indol zu Indolin-2-on durch HIBX2-haltige Mikrosomen aus WAT11. Indol ist in diesem Chromatogramm nicht sichtbar, da es als flüchtige Substanz bei der Einengung der Probe verdampft.

3.5.2 Charakterisierung von HIBX3 durch heterologe Expression in S. cerevisiae

Es wurden drei verschiedene *HlBx3*–Konstrukte eingesetzt (siehe 3.4.4):

Sowohl die originale cDNA, als auch das Konstrukt mit dem unmittelbar der Klonierungsstelle benachbarten Translationsstart *HlBx3A*, wurden im Hefesystem unter Standardbedingungen nicht exprimiert. Die am 5'-Ende des codierenden Bereiches modifizierte cDNA *HlBx3e* wurde im Hefesystem zwar exprimiert (Abbildung 14), aber es konnte keine enzymatische Aktivität festgestellt werden.

Die Anderung der Hefe-Induktions-Bedingungen (20 °C, 48 h Induktionsdauer) führte zwar zur verbesserten Expression von *HlBx3e* (Abbildung 14). Es konnte jedoch auch hier keine Aktivität nachgewiesen werden. Dabei wurden als Substrate sowohl Indolin-2-on, als auch das kein direktes Intermediat des DIBOA-Biosyntheseweges darstellende BOA getestet – beide Substanzen werden durch BX3 umgesetzt (Grün, 1997). Die Hauptbande von HIBX3e liegt etwas unter der des entsprechenden Mais-Enzyms, was von der abgeleiteten Aminosäure-Sequenz erwartet wird. Sie entspricht in der Größe dem ebenfalls katalytisch aktiven WAT11 CYP71C7 aus *Triticum aestivum*.



Abbildung 14: Western Blot mikrosomaler Fraktionen aus WAT11, transformiert mit verschiedenen Konstrukten. M: Marker (Kd); Positivkontrolle: WAT11 BX3 (21 µg mikr. Prot., entspricht 10 ng P450-Enzym), Negativkontrolle: WAT11 pYeDP60 (20 µg mikr. Prot.), Expression unter Standardbedingungen: WAT11 BX3 / HIBX3e; Expression bei 48 h Induktion + 20 °C: WAT11 BX3 / HIBX3e; WAT11 CYP71C7 (Standardbedingungen) 20 µg mikr. Prot.)

3.5.3 Charakterisierung von HIBX4A durch heterologe Expression in *S. cerevisiae*

Die heterologe Expression von *HlBx4A* erfolgte in allen drei Hefestämmen. In allen drei Stämmen liegt die Expressionsrate um das ca. drei bis vier fache





Abbildung 15: Western Blot mikrosomaler Fraktionen aus verschiedenen, HIBX4A exprimierenden Hefestämmen (je 20 µg mikrosomales Protein). M: Marker (Kd), WAT11 BX4 (27 µg (!) mikrosomales Protein) als Positiv- und WAT11 pYeDP60 als Negativkontrolle.

HIBX4A setzt in einer NADPH-abhängigen Reaktion spezifisch 3-Hydroxy-Indolin-2-on zu HBOA um (Abbildung 16). Die Identität von HBOA wurde über seine Retentionszeit bestätigt. Keines der anderen Intermediate des DIBOA- Biosyntheseweges wurde umgesetzt. Die *in vitro* Aktivität von HIBX4A entspricht damit der Aktivität des homologen Enzyms BX4.



Abbildung 16: NADPH-abhängiger Umsatz von 3-Hydroxy-Indolin-2-on zu HBOA durch HIBX4-haltige Mikrosomen aus WAT11.

Der Substratumsatz erfolgte am effektivsten durch mikrosomale Fraktionen, die aus WAT11 isoliert wurden, gefolgt von den Fraktionen aus WAT21 und W(R) (Tabelle 9). Hierin spiegelt sich der Einfluß der verschiedenen Cytochrom P450 Reduktasen der jeweiligen Hefesysteme wieder. Die Aktivität der BX4-haltigen Mikrosomen erscheint geringer (Tabelle 9); da sie aber drei bis vier mal weniger P450 Enzym enthalten (Abbildung 15), ist die BX4-Aktivität in Wirklichkeit doppelt so hoch wie die HLBX4A-Aktivität.

Tabelle 9: Substratumsatz von HIB4 und BX4 in verschiedenen Hefestämmen unter Standardbedingungen

Hefestämme	HlBX4 (1 mg mikr. Prot.)	BX4 (1 mg mikr. Prot.)
W(R)	0,4 nmol	n. d.
WAT11	1,6 nmol	0,8 nmol
WAT21	1,2 nmol	n. d.

3.5.4 Charakterisierung von HIBX5 durch heterologe Expression in S. cerevisiae

Es wurde versucht, drei verschiedene *HlBx5*–Konstrukte in Hefe heterolog zu exprimieren (siehe 3.4.4). Sowohl die originale cDNA in pYeDP60, als auch das Konstrukt mit dem unmittelbar der Klonierungsstelle benachbarten Translationsstart *HlBx5A* wurden im Hefesystem nicht heterolog exprimiert – es konnte weder das Protein im Western Blot noch enzymatische Aktiviät von HlBX5 in den mikrosomalen Fraktionen nachgewiesen werden.

Die Expression von HIBX5 mit modifiziertem 5'-Ende *HIBX5e* in WAT11 konnte ebenfalls nicht in der Western Analyse detektiert werden. Die entsprechenden mikrosomalen Fraktionen setzen jedoch NADPH-abhängig spezifisch HBOA zu DIBOA um (Abbildung 17). Der im Vergleich zu BX5 sehr viel geringere Umsatz kann auf die geringere Expressionsrate zurückzuführen sein.



Abbildung 17: NADPH-abhängiger Umsatz von HBOA zu DIBOA durch HIBX5e-haltige Mikrosomen aus WAT11

3.5.5 Vergleich der HIBX-spezifischen Aktivitäten in vitro

Tabelle 10: Heterologe Expression und Enzymatische Aktivität der verschiedenen *HlBx*-Konstrukte in WAT11. (-): kein(e) Expression / Substratumsatz; (+): geringe(r) Expression / Substratumsatz; (++): viel Expression / Substratumsatz

CYT.P450	EXPRESSIONS-	PROTEIN-	UMGESETZTE	
ENZYM	KONSTRUKT*)	EXPRESSION**)	SUBSTRATE***)	
HIBX2	Originale cDNA	-	Indol	+
			Indolin-2-on	-
			3-Hydroxy-Indolin-2-on	-
			НВОА	-
			DIBOA	-
HIBX3	Originale cDNA	-	Indolin-2-on	-
	HIBX3A	-	Indolin-2-on	-
	HlBX3e	+	Indolin-2-on	-
			BOA	-
HIBX4	HIBX4A	++	Indol	-
			Indolin-2-on	-
			3-Hydroxy-Indolin-2-on	++
			НВОА	-
			DIBOA	-
HIBX5	Originale cDNA	-	НВОА	-
	HIBX5A	-	НВОА	-
	HIBX5e	-	Indol	-
			Indolin-2-on	-
			3-Hydroxy-Indolin-2-on	-
			НВОА	+
			DIBOA	-

*) in pYeDP60

**) über Western Blot nachgewiesen

***) NADPH-abhängiger Substratumsatz, über HPLC-Analyse getestet

3.6 Vorkommen der *HlBx*-Gene in verschiedenen *Hordeum*- und *Triticum*-Arten

Die Verbreitung von *HlBx*-homologen Genen innerhalb der Gattung *Hordeum* wurde mit Hilfe von Southern Blots analysiert. Es wurde genomische DNA von *H. vulgare tellus, H. spontaneum 150-31, H. spontaneum 160-53, H. lechleri, H. brachyantherum, H. roshevitzii* und *H. flexuosum* analysiert. *HlBx*-spezifische Signale zeigten sich stets bei der genomischen DNA DIBOA-haltiger Gerstenlinien, aber nie bei DIBOA-freien (Abb. 18).

Genomische DNA aus den DIBOA-freien *H. vulgare*-Linien "Nade" und "B87", sowie aus der DIMBOA-haltigen *Triticum aestivum* Linie "Trakos" wurde ebenfalls der Analyse unterzogen. Nur bei Weizen zeigten sich eindeutige P450-Gen-spezifische Signale. Da die evolutionäre Distanz zwischen Weizen und *H. lechleri* größer ist als innerhalb der Gattung *Hordeum*, ist unwahrscheinlich, daß mit diesen Sonden homologe Sequenzen von *Hordeum spc*. nicht nachgewiesen werden können. Das Fehlen von DIBOA in *H. spontaneum* und *H. vulgare* geht also mit dem kompletten Verlust aller P450 Gene der DIBOA-Biosynthese einher.

3 Ergebnisse



Abbildung 18: Southern Blot aus mit unterschiedlichen Restriktionsendonucleasen geschnittener genomischer DNA verschiedener Gerste- und Weizenarten. Als Sonde wurde *HlBx2*-cDNA verwendet.

In die Southern Analyse wurde auch das putative homologe Gen zu Bx1, HIBx1, einbezogen. In diesem Fall ergab sich für alle Gerstenlinien Hybrisisierungssignale (nicht dargestellt).

3.7 Hinweis auf die Beteiligung einer Dioxygenase am DIMBOA-Biosyntheseweg in *Zea mays*

In Mais und Weizen ist im Gegensatz zu den Wildgersten DIMBOA der Hauptbestandteil der chemischen Grundabwehr. Die Umwandlung von DIBOA zu DIMBOA in *Zea mays* findet in zwei Schritten statt (Sicker, *et al.*, 2000): Die Hydroxylierung der C-7-Position von DIBOA führt zur Bildung von TRIBOA. Die Übertragung einer Methylgruppe auf diese 7-Hydroxy-Gruppe führt zur Bildung von DIMBOA, welches noch durch BX8 und BX9 glucosyliert wird (v. Rad, 2000). Die Hydroxylierung der C-7-Position wird jedoch nicht, wie zu erwarten gewesen wäre, durch ein weiteres P450-Enzym durchgeführt. Statt dessen zeigt folgender Versuch (Abbildung 19), daß es sich hierbei wahrscheinlich um eine Dioxygenase handelt:

Prohexadion ist ein Strukturanalogon zu 2-Oxo-Glutarsäure, welche Dioxygenasen als Cofaktor dient (Evans, *et al.*, 1999). Es ist damit in der Lage, die Aktivität von Dioxygenasen zu hemmen. Maispflanzen, die drei Tage lang auf mit 0,1 % Prohexadion-Lösung getränktem Keimpapier gekeimt wurden, synthetisieren kein DIMBOA-Glucosid. Der DIMBOA-Biosyntheseweg ist auf der Stufe von DIBOA inhibiert worden, so daß die hauptsächlich gebildete Substanz nun DIBOA-Glucosid ist (BX8 und BX9 verwenden auch DIBOA als Substrat, v. Rad, 2000).



Abbildung 19: HPLC-Chromatogramme der aus drei Tage alten Maiskeimlingen gewonnenen Rohextrakte: in Wasser angezogen ("Kontrolle"); in 0,1 % Prohexadion angezogen ("Prohexadion"). Während in den Kontrollpflanzen DIMBOA-Glucosid das vorherrschende Benzoxazinoid darstellt, ist die DIMBOA-Biosynthese bei den in Prohexadion angezogenen Keimlingen auf der Stufe des DIBOAs inhibiert – dieses wird ebenfalls durch BX8 und BX9 (v. Rad, 2000) glucosyliert.

4 Diskussion

4.1 Sekundärmetabolite der generellen Abwehr in Gräsern

Die Verteilung von Sekundärmetaboliten der generellen Abwehr in Gräsern bietet ein komplexes Bild. Benzoxazinoide werden in den zu der Subfamilie Panicoideae gehörenden Gattungen Zea, Sorghum, Tripsacum und Coix, sowie in den zur Subfamilie Pooideae zählenden Gattungen Hordeum, Secale, Triticum, Aegilops, Elymus und Triticale, in der Subfamilie Bambusoideae (Chusquea) und dem Unterstamm Arundinae (Arundo) gefunden (Niemeyer 1988) (Abbildung 20). Außerhalb der Familie der Gräser wurden sie auch in dikotylen Pflanzen nachgewiesen, wie z.B. innerhalb der Acanthaceae, Ranunculaceae und Scrophulariaceae. Die Familie der Gramineen setzt sich aus ca. 10.000 Arten zusammen, die sich in mindestens 16 Unterfamilien einordnen lassen (Freeling 2001, und Grass Phylogentics Working Group GPWG: http://www.ftg.fiu.edu.graa/gpwg). Es wird angenommen, daß die Gramineen auf einen gemeinsamen Vorfahren zurückgehen, der vor 65-70 Millionen Jahren existierte (Kellogg, 1998).



Abbildung 20: Stammbaum der Gramineen nach Kellogg, 1998. Die Familie *Joinvillaeceae* als nächster Verwandter der Gräser dient als Outgroup. Benzoxazinoid-haltige Unterfamilien bzw. Unterstämme sind durch Unterstreichen hervorgehoben. Neuere Untersuchungen (GPWG, 2000) bestätigen diesen Stammbum im Wesentlichen, wobei die Gattung *Oryza* den *Erhardtoideae* zugeordnet wird, welche zudem den *Bambusoideae* näher verwandt sind als den *Pooideae*.

Benzoxazinoide sind in der Familie der Gräser also weit, aber nur lückenhaft verbreitet. Auffallend ist ihr Auftreten in den wirtschaftlich bedeutenden Getreiden Mais, Roggen, Weizen sowie einigen Wildgerstearten, während ihr Vorkommen in Reis war zu Beginn dieser Arbeit ungeklärt war. Lediglich eine Quelle (Tang *et al.*, 1975) weist auf das Fehlen dieser Substanzklasse in Reis hin. Da jedoch Angaben über die untersuchten Arten fehlten, und nicht auszuschließen war, daß sich die Biosynthese wie in der Gattung *Hordeum* auf nur einige Arten beschränkt, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Kollektion aus verschiedenen Arten auf das Vorhandensein von Benzoxazinonen getestet.

Die Gattung *Oryza* setzt sich aus 23 Arten zusammen, von denen zwei, *O. glaberrima* und *O. sativa*, Kultivar-Arten sind. Die Zahl der weltweit bestehenden Varietäten wird auf 120000 geschätzt (Kush, 1997). Neun der Wildreis-Arten sind Tetraploid, alle anderen Arten sind diploid. Bezüglich ihrer morphologischen Merkmale (Morishima und Oka, 1960) lassen sich alle Arten in drei Hauptgruppen einteilen: 1) *O. sativa* und seine Verwandten, 2) *O. officinalis* und seine Verwandten und 3) andere. Bei Betrachtung der Genome der Gattung Oryza stößt man ebenfalls auf drei große Genpools: 1) dem des *O. sativa* Komplex, 2) dem des *O. officinalis* Komplex, 3) der der *O. meyeriana*, *O. ridleyi* und *O. schlechteri* Komplexe (Kush, 1997) (Abbildung 21).

O. sativa und *O. glaberrima* werden als ein Beispiel paralleler Evolution kultivierter Pflanzen angesehen (Abbildung 21). Da sich *O. sativa* in sechs Gruppen unterteilen läßt (zu denen auch die Indica-Gruppe = Gruppe I und die Japonica-Gruppe = Gruppe VI zählen) wird ein polyphyletischer Ursprung diskutiert (Khush, 1997). Mit O. *sativa* assoziierte Unkrautformen von Reis werden ebenfalls als *O. sativa* bezeichnet, obwohl sie keine Kultivar-Arten darstellen (Oka, 1988). Zu diesen zählen auch alle sogenannten "Red Rice" Linien.


Abbildung 21: Die Einteilung der Gattung *Oryza* an Hand ihrer Genpoole und die parallele Evolution der zwei Kultivar-Reisarten *O. sativa* und *O. glaberrima* (nach Kush, 1997).

Insgesamt wurden 117 verschiedene Reislinien untersucht (Tabelle 5, Punkt 3.1), darunter verschiedene Wildreis-Arten des *O. sativa* - und des *O. officinalis* - Komplexes, mehrere Kultivar-Linien von *Oryza sativa* und *Oryza glaberrima*, sowie in der Mehrheit verschiedene so genannte "Red-Rice"-Linien, die ebenfalls dem *O. sativa*-Komplex zuzurechnen sind. In keiner der untersuchten Reis-Linien konnten Benzoxazinoide nachgewiesen werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnten jedoch keine Arten aus den *O. meyeriana*, *O. ridleyi* und *O. schlechteri* Komplexen untersucht werden.

Verschiedene *O. sativa* Linien zeigen unterschiedlich starke allelopathische Effekte gegen in Reisfeldern verbreitete Unkräuter wie z.B. "Ducksalad" (*Heteranthera limosa*) oder "Barnyardgras" (*Echinochloea crusgalli*), (Olofsdotter, 2001). Während im Falle der Benzoxazinoid-haltigen Getreidearten hauptsächlich eine Substanz für die unspezifische Abwehr ausgebildet wird, scheint in Reis ein ganzer Cocktail von verschiedenen Substanzen für die Allelopathie verantwortlich zu sein. Die eigentlich aktiven Substanzen *O. sativas* konnten noch nicht identifiziert werden (Rimando *et al.*, 2001). So synthetisiert die stark allelopathisch wirksame Sorte *Taichung Native 1* zwar unter anderen, bisher nicht identifizierten Substanzen, verschiedene phenolische Säuren, die für ihre allelopathischen Effekte bekannt sind. Die gebildeten Mengen reichen jedoch für eine phytotoxische Wirkung nicht aus (Olofsdotter *et al.*, 2001).

4.2 Substanzen der generellen Abwehr in der Gattung Hordeum

Die Gattung *Hordeum* spiegelt die Verteilung von Benzoxazinoiden in Gräsern im Kleinen wieder: Es kommen nebeneinander Benzoxazinoid-haltige und –freie Arten vor. Ein interessanter Aspekt ist das Auftreten einer weiteren, unspezifisch wirkenden Abwehrsubstanz innerhalb dieser Gattung, des Indolalkaloids Gramin. Wirken DIBOA und Gramin synergistisch, oder teilen sie die selbe Funktion?

Die untersuchten Keimlinge der Wildgersten *H. brachyantherum*, *H. flexuosum*, *H. lechleri* und *H. roshevitzii* synthetisieren DIBOA, während in den drei untersuchten *H. spontaneum* Linien sowie den vier untersuchten *H. vulgare* Linien keine Benzoxazinoide nachgewiesen werden konnten. Gramin wird durch Keimlinge der drei untersuchten *H. spontaneum*-Linien synthetisiert, während dieses Indolalkaloid weder in den vier untersuchten *H. vulgare* Linien, noch in den vier Wildgerste Arten *H. brachyantherum*, *H. flexuosum*, *H. lechleri* und *H. roshevitzii* nachgewiesen werden konnte.

Der DIBOA-Gehalt ist bei jüngeren Pflanzen am höchsten (bis 1406 nmol / g Frischgewicht in *H. lechleri*), während er nach Ausbildung des zweiten Blattes noch ungefähr 60 bis 70 % dieses Wertes beträgt (Tabelle 6, Punkt 3.2). Diese Mengen decken sich somit mit den von Barria *et al.* (1991) für die gleichen Wildgerste-Arten unter ähnlichen Bedingungen ermittelten.

Der Gramingehalt der hier untersuchten *H. spontaneum* Linien liegt mit 300-1600 nmol / g Frischgewicht bei Ausbildung des zweiten Keimblattes deutlich unter den von Hoult und Lovett 1993 ermittelten Werten von 5700-8600 nmol / g Frischgewicht. Diese Autoren haben jedoch jüngeres Pflanzenmaterial untersucht, was aufgrund der begrenzten Saatgutmenge bei uns nicht möglich war. Generell bewegen sich die bestimmten Konzentrationen an Gramin und DIBOA in der selben Wachstumsphase in den gleichen Größenordnungen.

Auffallend ist die Tatsache, daß sich unter den hier untersuchten Gerste-Arten und -Sorten keine Pflanze befindet, die DIBOA und Gramin gleichzeitig synthetisiert. Auch aus der Literatur lassen sich keine Beispiele für ein gleichzeitiges Vorkommen dieser beiden Substanzen in einer Einzelpflanze zitieren. Im Folgenden sollen die möglichen Gründe für das gegenseitige Ausschließen beider Substanzen diskutiert werden, wobei die biologischen Funktionen und die Besonderheiten der Biosynthesewege im Vordergrund stehen.

Das Benzoxazinoid DIBOA und das Indolalkaloid Gramin spielen beide eine wichtige Rolle in der generellen Abwehr von Pflanzen. So zeigt das Benzoxazinoid DIMBOA, die methoxylierte Form des DIBOAs, inhibitorische Effekte gegen das Wachstum von Bakterien wie einigen *Erwinia*-Arten (Woodward *et al.*, 1978), und *Agrobacterium tumefaciens* (Sahi *et al.*, 1990). Gramin verlängert die lag-Phase des pflanzenpathogenen Bakteriums *Pseudomonas syringae* (Sepulveda und Corcuera, 1989).

Die Abwehr von Herbivoren zählt ebenfalls zu den Funktionen beider Substanzen. So wurde die Toxizität von DIBOA für *Schizaphis graminum* (Zuniga *et al.*, 1983) und *Rhopalosiphum padi* (Barria *et al.*, 1991) festgestellt. In letzterer Studie zeigt sich auch, daß das Vorkommen von *R. padi* negativ mit ansteigenden DIBOA-Konzentrationen in verschiedenen Wildgerste-Arten korreliert. Die Resistenz gegen *S. graminum* und *R. padi* korreliert ebenfalls mit dem Gramingehalt in den Blättern; die Toxizität für diese beiden Blattlaus-Arten wurde ebenfalls nachgewiesen (Corcuera, 1992). Neuere Studien zweifeln jedoch einen Zusammenhang zwischen Gramingehalt und Resistenz gegen *R. padi* an (Ahman *et al.*, 2000). Beispielsweise scheint die Resistenz gegen die Wanderheuschrecke *Locusta migratoria* auf mehrere Komponenten, von denen Gramin nur eine ist, zurückzuführen zu sein (Ishikawa und Kanke, 2000).

Eine ähnliche Situation zeigt sich auch bei näherer Betrachtung der allelopathischen Effekte beider Substanzen. Sowohl DIBOA als auch Gramin zeigen eine deutliche Phytotoxizität. Ihr allelopathisches Potential ist in verschiedenen Versuchen nachgewiesen worden. So wurde gezeigt, daß DIBOA das Wachstum von *Lepidum sativum* (Kresse), *Echinochloa crusgalli* (Barnes *et al.*, 1987), *Chenopodium album* (Perez und Ormeno-Nunez, 1993) und *Vicea faba* (Friebe *et al.*, 1997) hemmt. Für *Secale cereale* (Roggen) konnte gezeigt werden, daß DIBOA aktiv über die Wurzeln ausgeschieden wird (Schulz *et al.*, 1994). Dieser Vorgang hat starken Einfluß auf die benachbarte Vegetation. Gramin wird ebenfalls durch Keimlinge freigesetzt (Liu und Lovett, 1990, Yoshida *et al.*, 1993), und ein allelopathischer Effekt konnte z.B. auf *Sinapis alba* nachgewiesen werden (Liu und Lovett, 1993). Dieser scheint allerdings auch auf den synergistischen Effekt mit dem gleichzeitig gebildeten Hordenin zurückzugehen.

Bezüglich der biologischen Aktivität der Benzoxazinoide auf molekularer Ebene ist die methoxylierte Form des DIBOAs, DIMBOA, am besten untersucht (Sicker et al., 2000). So hemmt DIMBOA sowohl den Chloroplasten ATPase Kopplungsfaktor (Queirolo et al., 1983), die Plasmamembran H⁺ ATPase (Friebe *et al.*, 1997), als auch andere Enzyme wie Papain (Perez und Niemeyer, 1989a), -Chymotrypsin (Cuevas et al., 1990) und Cholinesterasen (Cuevas und Niemeyer, 1993). Wahrscheinlich sind diese Effekte auf die Interaktion mit nucleophilen NH₂- und SH-Gruppen von Biomolekülen zurückzuführen. Gramin wirkt ebenfalls als ein Entkoppler: so hemmt es in höheren Konzentrationen die Atmungskette auf dem Level von Komplex Ι in Rinder-Mitochondrien. Es wirkt zudem auf Photophosphorylierung, Pi-ATP-Austauschreaktionen und Aufbau des Protonengradienten hemmend, während es auf den Elektronentransport in die

Thylakoide stimulierend wirkt (Corcuera, 1992). Gramin inhibiert außerdem nach Angaben der Firma Latoxan die Aktivität von Acetylcholinesterase und Butyrilcholinesterase (http://www.latoxan.com/HTML/ 00000080.html).

Trotz der Hinweise, daß Gramin im Gegensatz zu DIBOA nicht die alleinige Komponente der chemischen Grundabwehr in Gerstenkeimlingen ist, lassen die Daten doch auf eine überlappende Funktion beider Substanzen schließen. Nichtsdestoweniger gibt es auch Kultivar-Gersten Sorten, die keine der genannten Substanzen produzieren. Da H. vulgare wahrscheinlich seinen Ursprung in domestizierten H. spontaneum hat (Badr et al., 2000), ist das Fehlen von Benzoxazinoiden nicht verwunderlich. Die Fähigkeit zur Graminbiosynthese könnte während Kultivierung als Nebeneffekt bei der Erreichung anderer Zuchtziele verlorengegangen sein, wobei durch die intensive Landwirtschaft (Einsatz von Pestiziden usw.) kein Selektionsdruck zum Erhalt dieser Fähigkeit auftrat. Gerade bezüglich der Sommergersten, die zum Bierbrauen eingesetzt werden, könnte das Vorhandensein von Gramin im Keimling den Brauprozeß negativ beeinflussen, und damit ohne Wissen der genauen Zusammenhänge im Laufe der Züchtung ausgemerzt worden sein (mündliche Mitteilung Dr. M. Baumer, Bayerische Landesanstalt für Bodenkultur und Pflanzenbau).

Sowohl Benzoxazinoide als auch Gramin müssen in sehr großen Mengen synthetisiert werden, um der Pflanze einen wirksamen Schutz gegen Freßfeinde zu gewährleisten. So wurden in einigen Maislinien Konzentrationen bis zu 1 mg / g Frischgewicht gemessen (Sicker *et al.*, 2000). Fütterungsexperimente mit *Schizaphis graminum* zeigen, daß immerhin ca. 0,5 mM DIBOA (Zuniga *et al.*, 1983) bzw. 2,9 mM Gramin (Corcuera *et al.*, 1992) nötig sind, um den Tod von 50 % der Versuchstiere herbeizuführen. Konzentrationen dieser Größenordnungen liegen in den Pflanzen auch tatsächlich vor (siehe oben).

Der DIBOA-Biosyntheseweg in Zea mays zweigt vom Tryptophan-Biosyntheseweg ab (Frey et al. 1997). Dabei wird in Maiskeimlingen ca. 10 bis 20 mal mehr Benzoxazinon als Tryptophan synthetisiert. Ausgehend von Indol-3-Glycerin-Phosphat bildet BX1 freies Indol, welches durch vier P450-Enzyme sukzessive zu DIBOA umgesetzt wird (Abbildung 22). Die Biosynthese von Gramin in Gerste verläuft über Tryptophan (Leland et al., 1985). Über unbekannte Zwischenstufen wird dabei 3-Aminomethyl-Indol (AMI) synthetisiert, welches dann durch eine N-Methyltransferase durch zweimalige sukzessive Methylierung erst zu N-Methyl-3-Aminomethyl-Indol (MAMI) und dann zu Gramin umgewandelt wird. Die Biosynthesen von DIBOA und Gramin laufen also beide über das gleiche Intermediat, Indol, welches auch Intermediat der Tryptophanbiosynthese ist (siehe Punkt 1.2). Es ergibt sich also eine Konkurrenzsituation. Angesichts der gebildeten Mengen an DIBOA oder Gramin, sowie deren überlappende Funktion, könnte der Verzicht auf einen der beiden Sekundärmetaboliten von Vorteil sein.



Abbildung 22: Vergleich der Biosynthesewege des Benzoxazinoids DIBOA (Frey *et al.*, 1997), der Aminosäure Tryptophan in Mais und des Indolalkaloids Gramin in Gerste (Leland *et al.*, 1985). Der DIBOA-Biosyntheseweg ist hellgrau, der Gramin Biosyntheseweg dunkelgrau unterlegt.

4.3 Die DIBOA-Biosynthese in Hordeum lechleri

Die Frage nach der Entwicklung der Benzoxazinoid-Biosynthese während der Phylogenie der Gräser stand bei dieser Arbeit im Vordergrund. Zu diesem Zweck wurde die Biosynthese von DIBOA in der Wildgerste *H. lechleri* untersucht. Zu Beginn dieser Arbeit wurde davon ausgegangen, daß die DIBOA-Biosynthese in *H. lechleri* tatsächlich auf die gleiche Weise wie in Zea mays stattfindet. Grund hierfür war die relativ nahe Verwandtschaft zu Roggen, in dessen Keimlingsstadium ebenfalls die **BX**-spezifischen Reaktionen nachgewiesen werden konnten (Glawischnig et al., 1998). Deshalb wurde eine keimlingsspezifische cDNA-Bank von H. lechleri auf das Vorhandensein von P450-spezifischen ORFs untersucht, und mit ihrer Hilfe die P450-cDNA-Klone HlBx2-HlBx5 isoliert, welche zu den jeweiligen Maisgenen Bx2-Bx5 homolog waren. Abgesehen von einem weiteren Klon, der sich aber als ein HlBx2-Fragment entpuppte, wurden keine weiteren P450-Klone in der untersuchten cDNA-Bank identifiziert. Die Länge der ORFs beträgt zwischen 526 und 528 AS und liegt damit im Bereich der durchschnittlichen Größe von P450-Enzymen. Es lassen sich im Alignment mit den BX-Aminosäuresequenzen alle für pflanzliche P450-Enzyme typischen Domänen identifizieren (3.3.4).

HlBx2-HlBx5 aus H. lechleri weisen einen hohen Grad an Homologie zu Bx2-Bx5 aus Mais auf. Doch gerade bei Cytochrom P450 Enzymen kann von der Homologie nicht auf die Funktion eines Proteins geschlossen werden. So führt z.B. bei P450 BM3 aus Bacillus megatherium der Austausch einer einzelnen Aminosäure (Phenylalanin 87 gegen Alanin) zu einer Änderung der Regiospezifität des Enzyms (Olivier et al., 1997). Die Aminosäurereste 286 und 289 spielen eine entscheidende Rolle für die Substratspezifität von humanem CYP2C9 für Diclofenac und Ibuprofen (Klose et al., 1998). Die Aktivität der P450 Enzyme muß also über Enzymtests verifiziert werden, da sowohl Reaktions- als auch Substratspezifität schon durch den Austausch weniger Aminosäurereste variieren können. Da pflanzliche P450 Enzyme nur als Bestandteil des membrangebundenen Monooxygenasekomplexes aktiv sein können, ist es nicht möglich, Enzymtests mit aufgereinigtem Protein durchzuführen. Die Funktionsbestimmung erfolgt deshalb über heterologe Expression in geeigneten Systemen. Sowohl in E. coli (Barnes et al., 1991 und Halkier et al., 1995), als auch in Baculo-Virus / Insektenzell System (Kraus und Kutchan, 1995) wurden P450 Gene erfolgreich heterolog exprimiert. Für die heterologe Expression von *HlBx2-HlBx5* wurde das in Material und Methoden beschriebene, von Urban und Pompon entwickelte Hefezellsystem mit verschiedenen, hefeeigenen und pflanzlichen überexprimierten P450-Reduktasen benutzt, da dieses auch für die heterologe Expression und Bestimmung der *in-vitro* Aktivität von *Bx2-Bx5* erfolgreich eingesetzt wurde (Frey *et al.*, 1997, Grün, 1997).

Die Funktionsbestimmung von *HlBx2-HlBx5* durch heterologe Expression in *S. cerevisiae* erwies sich als unerwartet schwierig. Lediglich für HlBX4A konnten sowohl heterologe Expression als auch Funktion des P450 Enzyms ohne Probleme nachgewiesen werden (3.5.3). HlBX4A zeigt sich dabei wie BX3-BX5 aus Mais (Grün 1997) am aktivsten in WAT11. Die Expressionsrate von HlBX2 hingegen reichte für eine Detektion im Western-Blot nicht aus – trotzdem gelang eine Bestimmung der Funktion (3.5.1). Die Aktiviät von HlBX5 konnte nur durch den Einsatz einer cDNA mit modifizierten 5'-Ende, *HlBx5e*, bestimmt werden (3.5.4), wobei auch hier, wie bei HlBX2, das gebildete Protein über Western Blot nicht nachgewiesen werden konnte. *HlBx3* wurde nur bei Modifikation des 5'-Endes nach Batard *et al.*, 2000) als *HlBx3e* exprimiert (3.5.2), wobei das exprimierte Protein jedoch keine Aktivität zeigte.

Die Schwierigkeiten bei der Funktionsbestimmung über heterologe Expression lassen sich also auf zwei generelle Problemkomplexe zurückführen: die geringe Expressionsrate und die Expression inaktiven bzw. sehr schwach aktiven Proteins.

Der hohe Grad an Homologie zwischen den jeweiligen BX- und HIBX-Proteinen auf Primärstrukturebene lassen die Verwendung von BXspezifischen Antikörpern in den Western Blots als Grund für die Detektionsschwierigkeiten als unwahrscheinlich gelten. Tatsächlich scheint das Problem der geringen Expressionsrate bezüglich der CYP71C-Proteine genereller Natur zu sein. In der Literatur werden viele Fälle beschrieben, in denen die erfolgreiche heterologe Expression von intakten P450-Genen über CO-Differenzspektren aufgezeigt werden konnte (z.B. Le Bouquin *et al.*,

1999). Im Falle von BX2-BX5 war dieses nur bei BX2 möglich; alle anderen BX-Proteine konnten aufgrund der geringen Menge nur über Western Blot nachgwiesen werden (Grün, 1997). Mögliche Gründe für die geringen Expressionsraten können die unterschiedliche Codon Usage von Hefen und Gräsern, sowie der in Gräsern generell höher liegende GC-Gehalt sein (Batard *et al.*, 2000). Dieses führt zu Schwierigkeiten bei der Translation der mRNA. Eine Modifikation des 5'-Endes von *HlBx3* (3.5.2) und *HlBx5* (3.5.4), wie in obigem Artikel empfohlen, führte dann auch zu einer erhöhten Expressionsrate, die sich jedoch bezüglich *HlBx5* nur an der Aktivität der mikrosomalen Fraktionen erkennen ließ.

Während im Falle von HIBX2 und HIBX5 die geringe Expressionsrate als Grund für die geringe Aktivität zu sehen ist, ist die heterologe Expression von *HIBx3e* über Western Blot eindeutig nachweisbar. Da die Proteine in den Western-Gelen unter denaturierenden Bedingungen gefahren werden, sagt das Vorhandensein einer Bande nichts darüber aus, ob das Protein korrekt gefaltet ist. Die Stabilität des heterolog exprimierten Proteins scheint jedoch im Hefesystem für verschiedene P450-Enzyme stark zu variieren und durch die Anzuchtbedingungen beeinflußbar zu sein (mündliche Mitteilung, Pompon). So wird z.B. auf dem Western Blot (3.5.2) deutlich, daß Mikrosomen aus Hefezellen, die bei niedrigerer Temperatur (20 °C statt 28 °C) induziert wurden, mehr HIBX3e enthalten. Das Molekulargewicht des nachgewiesenen Proteins entspricht dabei demjenigen des katalytisch aktiven CYP71C7 aus Weizen, welches die gleiche Reaktion wie BX3 aus Mais katalysiert (Werck-Reichardt, unveröffentlichte Ergebnisse).

Generell ist es schwierig zu erklären, warum die heterologe Expression und Funktionbestimmung der *HlBx*-cDNAs diese Schwierigkeiten aufwirft, während das gleiche Expressionssystem bei den homologen *Bx*-Genen aus Mais (Frey et al., 1997) und *Cyp71c6-Cyp71c8* aus Weizen (Werck-Reichardt und Grün, unveröffentlichte Ergebnisse) erfolgreich ohne Modifikationen der 5'-Enden der cDNAs eingesetzt werden konnte. Insbesondere ist es schwierig, eine Erklärung für das Fehlen der Aktivität des heterolog exprimierten *HlBx3*

zu finden. Zur Funktionsbestimmung waren beide Enzyme in einander entsprechenden Mengen eingesetzt worden. HIBX3 ist auf Aminosäureebene zu 94 % identisch zu CYP71C7 aus Weizen. Der hohe Grad an Identität läßt Schwierigkeiten bei der heterologen Expression, z.B. im Stadium der posttranslationalen Modifikationen, als unwahrscheinlich erscheinen. Da aber schon der Austausch einer Aminosäure bei P450-Enzymen zur Änderung von Substrat- oder Regiospezifität führen kann (siehe oben), liefert die Homologie der Proteine keinen eindeutigen Hinweis auf eine Übereinstimmung in der Funktion. Es stellt sich weiterhin die Frage, ob HlBx3 das zu Bx3 orthologe Gen darstellt. Da die gescreente, keimlingsspezifische Phagenbank (500.000 cDNA-Klone) mit hoher Wahrscheinlich-keit alle exprimierten Gene repräsentiert, müßte in diesem Falle das orthologe Gen eine wesentlich geringere Expressionsrate als die anderen HlBx-Gene aufweisen. Eine weitere Möglichkeit ist, daß in *H. lechleri* die Umsetzung von Indolin-2-on nicht durch ein P450-Enzym katalysiert wird, sondern durch einen anderen Enzymtyp. In diesem Falle stellte sich dann die Frage nach der Funktion von *HlBx3*. Da auch für HlBx2, HlBx4 und HlBx5 der Funktionsnachweis in Hefe äußerst schwierig war, erscheint es jedoch am wahrscheinlichsten, daß bisher die geeignetsten Voraussetzungen für die funktionelle Expression von HlBx3 noch nicht gefunden wurden.

4.4 Klassifizierung der HIBX-Enzyme

Auf Aminosäure-Ebene beträgt der Grad der Identität der HIBX-Sequenzen untereinander zwischen 47 und 67 %. (3.3.4). Die Identität der HIBX-Enzyme untereinander ist damit geringer als die Identität der HIBX-Enzyme zu ihren Homologen aus *Zea mays* (3.3.4), der zwischen 76 und 81 % liegt. Auf Grund der hohen Homologie lassen sich nach der 40 % Regel (Nebert u. Nelson, 1991) die *HIBx*-Gene aus *H. lechleri* in die CYP71-Familie einordnen. Trotz

die Identität der Mitglieder einer Subfamilie der Regel, daß auf Aminosäureebene mindestens 55 % betragen muß (Werck-Reichhardt und Feiereisen, 2000), wurden die vier Mais P450 Enzyme BX2-BX5 früher als eine Subfamilie, CYP71C, eingestuft (Kliem, 1994). Da mittlerweile die CYP83-Familie ebenfalls in die CYP71 Familie aufgenommen wurde, wird diskutiert, ob CYP71C nicht als eine eigene Familie betrachtet werden sollte (David Nelson's Homepage:http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html). HIBX2-HIBX5 aus H. lechleri würde dann ebenfalls dieser neuen Familie zugeordnet werden können, wobei sich diese neue Familie in zwei Subfamilien unterteilen würde: eine bestehend aus BX2 und HIBX2 (80 % Identität untereinander), die andere bestehend aus BX3-BX5 bzw. HIBX3-HIBX5, deren Identität zu den beiden erstgenannten nur 45 bis 52 % beträgt (Kliem, 1994 und Punkt 3.3.4).

4.5 Die Evolution der Benzoxazinoidbiosynthese während der Phylogenie der Gräser

Die Tatsachen, daß die Identität und Ähnlichkeit der jeweiligen homologen BX- und HIBX-Proteine zueinander höher sind als der BX- bzw. HIBX-Proteine untereinander, und sich ihre Funktionen, soweit ermittelt, gleichen, lassen den Schluß zu, daß die Duplikationsereignisse, welche zu der Ausbildung der verschiedenen P450-Gene des Benzoxazinoid-Stoffwechsels in Gräsern führten, schon sehr früh in der Evolution stattgefunden haben müssen, und der Stoffwechselweg in Gräsern monophyletischen Ursprungs ist. Mikrosomen aus Roggen (Glawischnig et al., 1998) und aus Weizen (Werck-Reichardt und Grün, unveröffentlichte Daten) zeigen ebenfalls BX-spezifische Reaktionen, wobei in Weizen die entsprechenden Gene bereits isoliert sind, und ebenfalls einen hohen Grad an Homologie zu den *Bx*-Genen in Mais aufweisen (Werck-Reichardt, unveröffentlichte Daten). Da diese homologen Gene in unterschiedlichen Subfamilien gefunden wurden, müssen ihre Biosynthesewege schon sehr früh in der Entwicklung der Gräser ausgebildet worden sein. Lindner (1987) diskutiert die These, daß der letzte gemeinsame Vorfahre von Reis und Mais vor 66 Millionen Jahren lebte. Da Reis mit den zur Subfamilie der Pooideae zählenden Getreiden Gerste, Roggen und Weizen wesentlich näher verwandt ist als mit dem zur Subfamilie Panicoideae zählenden Mais (Kellogg 1998, und Kellogg, 2001, siehe Abbildung 20 in Punkt 4.1), wäre es wahrscheinlich, daß der Benzoxazinoid-Biosyntheseweg schon zu Beginn der Evolution der Gräser vorhanden gewesen sein könnte. In diesem Falle führte der sekundäre Verlust dieses Biosyntheseweges zur Entstehung Benzoxazinoid-freier Gattungen, wie z.B. *Oryza*.

Benzoxazinoide wurden auch in dikotylen Pflanzen gefunden, wie z.B. innerhalb der Acanthaceae, Ranunculaceae und Scrophulariaceae (Niemeyer, 1988). Da aber noch nichts über die Stoffwechselwege in diesen Pflanzen bekannt ist, kann nur spekuliert werden, ob diese in dikotylen und monokotylen Pflanzen gleichen Ursprungs sind.

stellt den Verzweigungspunkt zwischen Primärstoffwechsel Bx1 (Tryptophan-biosynthese) und DIMBOA-Biosyntheseweg in Zea mays dar (Frey, et al., 1997, siehe Punkt 1.2). Aus H. lechleri wurde eine zu Bx1 homologe Sequenz, HlBx1, isoliert (Tsai und Frey, unveröffentlichte Ergebnisse). Das codierte Protein setzt wie BX1 Indolgycerin-3-Phosphat unabhängig von TSB zu freiem Indol um, und öffnet wahrscheinlich in H. lechleri den DIBOA-Biosyntheseweg. Bx1 könnte über ein Genduplikationsereignis aus TSA hervorgegangen sein, so daß die Entwicklung DIBOA-Biosyntheseweges in der neuartigen Nutzung des eines Primärstoffwechselgens ihren Anfang nahm (Gierl und Frey 2001). Es existieren noch weitere Beispiele für die Nutzung eines Gens des Primärstoffwechsels für Sekundärstoffwechselreaktionen. Zu nennen wären hier ein Serin-Carboxypeptidase-ähnliches Protein aus A. thaliana, das im Sekundärstoffwechsel als Acyltransferase fungiert (Lehfeld et al., 2000), und die Homospermidin-Synthase aus Senecio vernalis, die wahrscheinlich durch Duplikationsereignisse aus der ubiquitär vorkommenden Deoxyhypusin-

Synthase hervorgegangen ist (Ober und Hartmann, 1999). Die Homospermidin-Synthase katalysiert dabei die Bildung der ersten Pyrrolizidin-Biosynthese spezifischen Substanz. Pyrrolizine spielen ebenfalls ein wichtige Rolle in der generellen Abwehr. Im Gegensatz zu der Benzoxazinoidbiosynthese in Gräsern, die monophyletischen Ursprungs zu sein scheint, wird für die Biosynthese der Pyrrolizidine, die hauptsächlich in vier verschiedenen Dikotylen-Familien vorkommen, ein polyphyletischer Ursprung diskutiert.

Die Mais-P450-Gene *Bx2-Bx5* liegen zusammen mit dem Indolglycerinphosphatlyase-Gen *Bx1*, sowie dem DIBOA / DIMBOA spezifischen Glucosyltransferase-Gen *Bx8* innerhalb von 6 cM auf dem kurzen Arm von Chromosom 4 und bilden dort ein Gencluster (Gierl und Frey, 2001).

Es ist bislang nicht bekannt, ob die HlBx-Gene in H. lechleri ebenfalls ein Gencluster bilden. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Southern Blots (siehe 3.6) zeigen, daß die Gene HlBx2-HlBx5 in den Benzoxazinoidfreien Gerstenlinien H. vulgare tellus, H. vulgare Nade, H. vulgare B87, H. spontaneum 150-31, H. spontaneum 160-53, komplett verloren gegangen sein müssen. Das kann durch ein gekoppeltes Vorliegen dieser Gene erklärt werden, wobei diese Erklärung jedoch nicht zwingend ist. Auch die Inaktivierung eines einzigen Gens dieses Biosyntheseweges kann zum Verlust der anderen beteiligten Gene führen, weil jene in diesem Fall funktionslos geworden sind, und somit keinem selektiven Druck mehr unterliegen. Bezüglich HlBx1 ist die Southern-Analyse in diesem Punkt nicht aussagekräftig. Zwar finden sich in allen untersuchten Gerstenarten zu Bx1 homologe Sequenzen; diese können aber auch auf das TSA-Gen zurückzuführen sein.

4.6 Die Beteiligung einer Dioxygenase am DIMBOA-Biosyntheseweg in Mais

Auch in Mais ist der Benzoxazinoidbiosyntheseweg noch nicht bis zur Vollständigkeit aufgeklärt. So ist noch nicht bekannt, welche Enzyme an der Konversion von DIBOA zu DIMBOA beteiligt sind. Es gibt jedoch bereits erste Hinweise. Maiskeimlinge, die unter Zusatz des Dioxygenasehemmstoffs Prohexadion bilden anstelle angezogen werden, des gewöhnlich vorkommenden Benzoxazinoids DIMBOA nur dessen Vorstufe DIBOA - ein Hinweis, daß die Hydroxylierung der C7-Position nicht eine P450-Enzym katalysierte, sondern eine Dioxygenase-katalysierte Reaktion darstellt (siehe 3.7). Ein potentielles Kandidatengen, Diox79, kartiert auf dem kurzen Arm von Chromosom vier,. Es sind momentan Tests in Arbeit, um die vermutete dieses in Funktion Gens der DIMBOA-Biosynthese zu bestätigen (unveröffentlichte Ergebnisse).

Dioxygenasen spielen auch in anderen Pflanzen eine wichtige Rolle bei der Vermittlung von Resistenz gegen Freßfeinde. Ein Beispiel hierfür ist *PIOX* (Pathogen Induced Oxygenase) aus *Nicotiana attenuata*, dessen Transkription allerdings durch Herbivorenbefall erst induziert wird (Hermsmeier *et al.*, 2001).

4.7 Ausblick

Nach wie vor ist die Funktion von *HlBx3* nicht erwiesen. Die dringendste Frage im Kontext dieser Arbeit ist die heterologe Expression des funktionellen Proteins, bzw. die Klärung der Frage, ob HlBX3 wirklich für die Umsetzung von Indolin-2-on verantwortlich ist.

Eine grobe Kartierung von *HlBx1-HlBx5* im *H. lechleri* Genom sollte Aufschluß darüber geben, ob diese ebenfalls als Gencluster vorliegen, um tiefere Einblicke in die Evolution dieses Biosyntheseweges zu gewinnen. In

diesem Zusammenhang ist auch die Frage nach der Benzoxazinoid-Biosynthese in Dikotylen wichtig, um zu klären, ob dieser Stoffwechselweg schon vor der Entstehung von Mono- und Dikotylen existierte, oder im Pflanzenreich zwei mal erfunden wurde.

Gramin wird lediglich in zwei Gattungen, *Hordeum* und *Phalaris*, gefunden, die zudem der gleichen Subfamilie, Pooideae, angehören. Es könnte sich also um einen jüngeren Biosyntheseweg als den der Benzoxazinoide handeln. Die Biosynthese von Gramin ist immer noch nicht restlos geklärt. Eine Aufklärung der Evolution dieses Weges könnte Aufschluß über die Gründe geben, wie und warum neben einem bereits bewährten Abwehrmechanismus ein weiterer erfunden wurde, der in einigen Arten den ersteren verdrängt hat.

Die Einführung des DIBOA-Biosyntheseweges in die modernen Kultivarformen der Gerste und des Reis könnten zu Pflanzen mit einer erhöhten Resistenz gegen Schädlinge führen, was zu einer Senkung des Verbrauchs an umweltschädlichen Pflanzenschutzmitteln führen würde. Hierbei müßte jedoch durch profunde Kenntnisse der Regulationsmechanismen dieses Stoffwechselweges die zeitliche Koordination der Biosynthese um Vergiftungserscheinungen beim Konsumenten sichergestellt sein, auszuschließen. Eine sinnvolle Verwendung DIBOA-produzierender Sommergersten ist fraglich, da das in den Keimlingen vorhandene Benzoxazinoid die am Brauprozeß beteiligten Mikroorganismen negativ beeinflussen könnten. Für die hauptsächlich als Viehfutter eingesetzten Wintergersten hingegen könnte sich der Einsatz von DIBOA-produzierenden Sorten als lohnend erweisen.

Tabelle 11: Zusammenfassung der in dieser Arbeit beantworteten (**[**) Fragestellungen bezüglich Auftreten und Biosynthese der Benzoxazinoide innerhalb der Gramineen.

		Benzoxazinoid	Benzoxazinoid	
	Mais	-haltige	-freie	Reis
		Gerstenarten	Gerstenarten	
Benzoxazi-				
noide	+	+	-	•
Gramin	-	1	+/-	-
Gene*)	+	1	1	n.d.
Gen-				
funktionen*)	+	?!	n.d.	n.d.
C7-Hydroxy-				
lierung	1	n.d.	n.d.	n.d.

*) Gene und Genfunktionen bezüglich der Benzoxazinoid-Biosynthese

n.d. nicht bestimmt, bzw. keine Angaben vorhanden

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Evolution der Benzoxazinoid-Biosynthese in der Familie der Gräser untersucht.

Durch einen groß angelegten Screen verschiedener Kultivar- Wild- und Unkraut-Reisarten konnte das Vorkommen von Benzoxazinoiden in der Gattung *Oryz*a weitgehend ausgeschlossen werden. Ein quantitativer Vergleich zwischen DIBOA-Gehalt und Gramin-Gehalt Benzoxazinoid-haltiger und freier *Hordeum*-Arten zeigte, daß sie in ähnlichen Mengen in den Keimlingen verschiedener Arten vorkommen, wobei sie sich gegenseitig ausschließen. DIBOA und Gramin übernehmen wahrscheinlich ähnliche Funktionen in der generellen Abwehr.

Aus einer keimlingsspezifischen cDNA-Bank aus der Benzoxazinoidhaltigen Wildgerste H. lechleri wurden vier Cytochrom P450-Gene, HlBx2 – HlBx5, isoliert. Die Sequenzanalyse dieser Klone ergab einen hohen Grad von Homologie zu den an der DIMBOA-Biosynthese beteiligten P450-Genen Bx2 -Bx5 aus Zea mays. Durch heterologe Expression im Hefesystem konnten die Funktionen von HIBX2, HIBX4 und HIBX5 verifiziert werden. Diese entsprechen jenen der jeweiligen BX-Enzyme aus Mais. Diese Ergebnisse deuten auf einen monophyletischen Ursprung der Benzoxazinoide innerhalb der Gräser hin, wobei Genduplikationsereignisse eine entscheidende Rolle gespielt haben müssen. Da Benzoxazinoide in verschiedenen Subfamilien auftauchen, muß die Entwicklung der Benzoxazinoid-Biosynthese in einem gemeinsamen Vorläufer erfolgt sein. Das Auftreten Benzoxazinoid-freier über Gräser erklärte sich dann den sekundären Verlust dieses Stoffwechselweges. Dieser geht in Benzoxazinoid-freien Arten der Gattung Hordeum mit dem Verlust aller an der Biosynthese beteiligten P450-Gene einher. Die Analyse der Genome Benzoxazinoid-haltiger und Benzoxazinoidfreier Arten dieser Gattung mittels Southern Blots zeigt, daß HlBx2-HlBx5homologe DIBOA-produzierenden Gene in den Wildgersten Н. brachyantherum, H. flexuosum, H. lechleri und H. roshevitzii vorkommen,

während sie in den Benzoxazinoid-freien Arten *H. spontaneum* (Wildgerste, zwei untersuchte Linien) sowie *H. vulgare* (Kultivargerste, zwei untersuchte Linien) vollständig fehlten.

Inhibierungsversuche an Maiskeimlingen zeigten, daß BX6, ein noch unidentifiziertes Enzym der DIMBOA-Biosynthese in *Zea mays*, verantwortlich für die Hydroxylierungsreaktion an C-7, eine Dioxygenase sein muß.

6 Literaturverzeichnis

Ahman, I. und Tuvesson, S. (2000) Does indole alkaloid gramine confer resistance in barley to aphid *Rhopalosiphum padi*? Journal of Chemical Ecology **26** (1): 233-256

Argandona, V. H., Zuniga, G. E. und Corcuera, L. J. (1986) Distribution of gramine and hydroxamic acids in barley and wheat leaves. Phytochemistry **26** (7): 1917-1918

Badr, A., Müller, K., Schäfer-Pregl, R., Rabey, H. E., Effgen, S., Ibrahim, H. H., Pozzi, C., Rohde, W. und Salamini, F. (2000) On the Origin and Domestication History of Barley (*Hordeum vulgare*). Mol. Biol. Evol. **17** (4): 499-510

Bailey, B. A. und Larson, R. L. (1991) Maize microsomal benzoxazinone Nmonooxygenase. Plant Physiology **95**: 792 - 796

Barnes, J. P., Putnam, A. R., Burke, B. A. und Aasen, A. (1987) Isolation and Characterisation of Allelochemicals in rye herbage. Phytochemistry **26** (5): 1385-1390

Barnes, H. J., Arlotto, M. P. und Waterman, M. R. (1991) Expression and Enzymatic Activity of Recombinant Cytochrome P450 17 alpha-hydroxylase in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88** 5597 - 5601

Barria, B. N., Copaja, S. V. und Niemeyer, H. M. (1991) Occurrence of DIBOA in wild *Hordeum* species and its relationship to aphid resistance. Phytochemistry **33** (1): 89-91

Batard, Y., Hehn, A., Nedelkina, S., Schalk, M., Pallet, K., Schaller, H., Werck-Reichart, D. (2000) Increasing Expression of P450 and P450-Reductase Proteins from Monocots in Heterologous Systems. Archives of Biochemistry and Biophysics **379** (1): 161-169

Becker, M. D. und Guarente, L. (1991) High-Efficiency transformation of Yeast by Electroporation. Methods in Enzymology **194**: 182 - 187

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

Bolwell, G. P., Bozak, K. und Zimmerlin, A. (1994) Plant Cytochrome P450. Phytochemistry **37** (6): 1491 - 1506

Brandon, S. G., d'Ennequin, M., Peek, A. S., Sawkins, M. C. (2000) Maize as a model for the evolution of plant nuclear genomes. PNAS 97 (13) 7008 - 7015

Bullock, W. O., Fernandez, F. M. und Short, J. M. (1987) A high efficiency plasmid transforming red A Escherichia coli strain with beta galactosidase selection. Biotechniques **5**: 376 - 379

Cambier, V., Hance, T. und de Hoffmann, E. (2000) Variation of DIMBOA and related compounds content in relation to the age and plant organ in maize. Phytochemistry **53**: 223 - 229

Corcuera, L. J. (1993) Biochemical basis for the resistance of barley to aphids. Phytochemistry **33** (4): 741 - 747

Dellaporta, S. L., Wood, J. und Hicks, J. B. (1983) A plant DNA minipreparation: version II. Plant Mol. Bil. Rep. 1: 19 - 21

Ebana, K., Yan, W., Dilday, R. H., Namai, H. und Okuno, K. (2001) Variation in the Allelopathic Effects of Rice with Water Soluble Extracts. Agronomy Journal **93**: 12-16

Evans, J. R., Evans, R. R., Regusci, C. L. (1999) Mode of Action, Metabolism, and Uptake of BAS 125W, Prohexadione-calcium. HortScience **34** (7): 1200-1201

Feuillet, C. and Keller, B. (1999) High gene density is conserved at syntenic loci of small and large grass genomes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96**: 8265-8270

Fischer, T. C. Klattig, J. T. und Gierl, A. (2001) A general cloning strategy for divergent plant cytochrome P450 genes and its application in *Lolium rigidum* and *Ocimum basilicum*. Theor. Appl. Genet., im Druck

Flor, H. H. (1956). The complementary gene systems in flax and flax rust. Advances in Genetics 8: 29 - 54.

Freeling, M. (2001) Grasses as a Single Genetic System. Reassassment 2001. Plant Physiology **125**: 1191-1197

Frey, M., Reinike, J., Grant, S., Saedler, H. und Gierl, A. (1990) Excision of the En/Spm transposable element of Zea mays requires two element-encoded proteins. EMBOA-J. **9**: 4937 - 5044

Frey, M., Chomet, P., Glawischnig, E., Stettner, C., Grün, S., Winklmair, A., Eisenreich, W., Bacher, A., Meeley, R. B., Briggs, S. P., Simcox, K. und Gierl, A. (1997) Analysis of Chemical Plant Defense Mechanism in Grasses. Science **277**: 696 - 699

Friebe, A., Roth, U., Klück, P., Schnabl, H. und Schulz, M. (1997) Effects of 2,4-Dihydroxy-1,4-Benzoxazin-3-ones on the activity of plasma membrane H⁺ ATPase. Phytochemistry **44** (6): 997-983

Gierl, A. und Frey, M. (2001) Evolution of Benzoxazinone Biosynthesis and Indole Production in Maize. Planta, im Druck

Gietz, D., St. Jean, A., Woods, R. A. und Schiestl, R. H. (1992) Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. Nucl. Acids Res. **20** (6): 1425

Glawischnig, E. (1997) Biochemische und genetische Aufklärung der Biosynthese von Benzoxazinonen in *Zea mays*. Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie, Biologie und Geowissenschaften der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften genehmigten Dissertation.

Grass Genera of the World: Descriptions, Illustrations, Identification, and Information Retrieval; including Synonyms, Morphology, Anatomy, Physiology, Phytochemistry, Cytology, Classification, Pathogens, World and Local Distribution, and References.' Version: 18th August 1999. URL http://biodiversity.uno.edu/delta/.

Grün, S. (1997) Funktionsbestimmung von vier P450-Enzymen des Maiskeimlings (*Zea mays*) durch heterologe Expression in *Saccharomyces cerevisiae*. Diplomarbeit angefertigt am Lehrstuhl und Institut für Genetik der Technischen Universität München

Halkier, B. A., Nielson, H. L., Koch, B. und Moller, B. L. (1995) Purification and Characterisation of Recombinant Cytochrom P450_{TYR} Expressed at High Levels in *Escherichia coli*. Archives of Biochemistry and Biophysics **322** (1) 1 - 9

Hartenstein, H., Lippmann, T. und Sicker, D. (1992) A efficient procedure for the isolation of pure 2,4-Dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (DIMBOA from maize. Indian Journal of Heterocyclic Chemistry. 2: 75 – 76

Hartenstein, H. (1994) Isolierung, selektive Synthesen und Stereoisomerentrennung von 1,4-Benzoxazin3(4H)-onen und ihren Acetalglucosiden aus Gramineae. Dissertation, Universität Leipzig Hashimoto, Y., und Shudo, K. (1996) Chemistry of Biologically active Benzoxazinoids. Phytochemistry **43** (3): 551-559

Hermsmeier, D. Schittko, U. und Baldwin, I. T. (2001) Molecular Interactions between the Specialist Herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and Its Natural Host *Nicotiana attenuata*. I. Large-Scale Changes in the Accumulation of Growth- and defense-Related Plant mRNAs. Plant Physiology **125**: 683 - 700

Holmes, D. und Quiggley, M. (1981) A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. Anal. Biochem. **114**: 193 - 197

Honkanen, E., und Virtanen, A. (1960) The synthesis of precursor II of benzoxazolinone formed in rye plants and the enzymatic hydrolysis of precursor I, the glucoside. Acta Chem. Scand. **14**, 504 - 507

Hoult, A. H. C. und Lovett, J. V. (1993) Biologically active secondary metabolites of barley. III. A method for identification and quantification of hordenine and gramine in barley by high-performance liquid chromatography. Journal of Chemical Ecology **19** (10): 2245-2254

Ishikawa, Y. and Kanke, T. (2000) Role of gramine in the feeding deterrence of barley against the migratory locust, *Locusta migratoria* (*Orthoptera*: *Acrididae*). Applied Entomology and Zoology **35** (2): 251-256

Kalb, V. F. und Loper, J. C. (1988) Proteins from eight eukaryontic cytochrome P450 families share a segment region of sequence similarity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **85**: 7221 - 7225

Kellogg, E. A. (1998) Relationship of cereal crops and other grasses. PNAS **95**: 2005-2010.

Kellog, E. A. (2001) Evolutionary History of the Grasses. Plant Physiology **125**: 1198 - 1205

Khush, G. S. (1997) Origin, dispersal, cultivation and variation of rice Plant Molecular Biology **35**: 25 - 34

Kliem, R. (1994) Untersuchung der Expression einer Cytochrome-P450-Genfamilie in *Zea mays*. Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln. Klose, T. S. Ibeanu, G. C., Ghanayem, B. I., Pedersen, L. G., Li, L., Hall, S. D. und Goldstein, J. A. (1998) Identification of Residues 286 and 289 as Critical for Conferring Substrate Specificity of Human CYP2C9 for Diclofenac and Ibuprofen. Archives of Biochemistry and Biophysics 357 (2): 240 - 248

Knott, J. M. (1999) Charakterisierung von Cytochrom P450-Enzymen der Unterfamilie CYP71C aus Mais und Gerste. Diplomarbeit angefertigt am Lehrstuhl für Genetik der Technischen Universität München

Komatsuda, T., Tanno, K., Salomon, B., Bryngelsson, T., von Bothmer, R. (1999) Phylogeny in the genus *Hordeum* based on nucleotide sequences closely linked to the *vrs1* locus (row number of spikelets). Genome **42**: 973-981

Kraus, P. und Kutchan, T. M. (1995) Molecular cloning and heterologous expression of cDNA encoding berbamunine synthase, a C-O phenol coupling cytochrome P450 from higher plant *Berberis stolonifora*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **92**: 2071 - 2075

Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural protzeins during assembly of the hesd of bacteriophage T4. Nature **227**: 680 - 685

Le Bouquin, R., Pinot, F., Benveniste, I., Salauen, J.-P. und Durst, F. (1999) Cloning and Functional Characterisation of CYP94A2, a Medium Chain Fatty Acid Hydroxylase from *Vicia sativa*. Biochemical and Biophysical Research Communications **261**: 156 - 162

Lehfeldt, C., Shirley, A. M. Meyer, K., Ruegger, M. O., Cusumano, J. C., Viitanen, P. V., Strack, D. und Chapple, C. (2000) Cloning of the SNG1 gene of *Arabidopsis* reveals a role for a serine Carboypeptidase-like proteine a an acyltransferase in secondary metabolism. Plant Cell **12**: 1295 - 1306

Leland, T. J., Grumet, R. und Hanson, A. D. (1985) Biochemical, immunulogical and genetic characterisation of natural gramine-free variants of *Hordeum vulgare* L. Plant Science **42**: 77 -82

Lindner, H. P. (1987) The evolutionary history of the Poales / Restionales: a hypothesis. Kew Bull **42**: 297 –318.

Liu, D. L. und Lovett, J. V. (1990) Allelopathy in barley: potential for biological suppression of weeds. Pp 85-92 in Bassett, C., Whitehouse, L. J., Zabkiewicz, J. A. (Ed.) "Alternatives to the Chemical Control of Weeds." Proceedings of an International Conference, Rotorua, New Zealand, July 1989. *Ministry of Forestry, FRI Bulletin 155*

Liu, D. L. und Lovett, J. V. (1993) Biologically active secondary metabolites of Barley. II. Phytotoxicity of barley allelochemicals. Journal of Chemical Ecology **19** (10): 2231-2244

Logemann, J., Schell, J. und Willmitzer, L. (1987) Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. Anal. Biochem. **163**: 16 - 20

Lovett, J.V. Ryuntu, M. Y. und Liu, D. L. (1988) Allelopathy, Chemical Communication, and Plant defense. Journal of Chemical Ecology **15** (4): 1193-1202

Morishima, H. und Oka, H. I. (1960) The pattern of interspecific variation in the genus *Oryza*: its quantitative representation by statistical methods. Evolution **14**: 153 - 165

Nebert, D. W. und Nelson, D. R. (1991) The P450-superfamily: update on new sequences, Gene Mapping and recommended nomenclature. DNA and Cell Biology **10**: 1 -14

Nelso, D. R. (1999) Cytochrome P450 and the Individuality of Species. Archives of Biochemistry and Biophysics **369** (1): 1 - 10

Niemeyer, H. M. (1988) Hydroxamic acids (4-Hydroxy-1,4-Benzoxazin-3ones), defence chemicals in the gramineae. Phytochemistry **27** (11): 3349-3358

Ober, D. und Hartmann T. (1999) Homospermidine synthase, the first patheway-specific enzyme of pyrrolizidine alkaloid biosynthesis, evolved from deoxyhypusine synthase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96**: 14777 - 14782

Oka, H. I. (1988) origin of cultivated rice. Japan Scientific Societies Press, Tokyo. 25 pp.

O`Keefe D. P. und Leto, K. J. (1989) Cytochrome P450 from the mesocarp of avocado (Pesea americana). Plant Physiology **89**: 1141 - 1149

Oliver, C. F., Modi, S., Sutcliffe, M. J., Primrose, W. U., Lian, L.-U. und Roberts, G. C. K (1997) A Single Mutation in Cytochrome P450 BM3 Changes Substrate Orientation in a Catalytic Intermediate and the Regiospecifity of Hydroxylation. Biochemistry **36**: 1567 - 1572

Olofsdotter, M. (2001) Rice – A Step Toward Use of Allelopathy. Agronomy Journal **93**: 3-8

Overland, L. (1966) The Role of allelopathic substances in the "smother crop" barley. American Journal of Botany **53** (5): 423-432

Perez, F. J. und Ormeno-Nunez, J. (1993) Weed growth interference from temperate cereals. The effect of hydroxamic acid exuding rye (*Secale cerale* L.) cultivar. Weed Research **33**: 115-119

Pompon, D., Louerat, B., Bronine, A. und Urban, P. (1996) Yeast Expression of Animal and Plant P450s in Optimized Redox Environments. Methods in Enzymology **272**: 51 - 64

Rimando, A. M., Olofdotter, M., Dayan, F. E. und Duke, S. O. (2001) Searching for Rice Allelochemicals: An example of Bioassay-Guided Isolation. Agronomy Journal **93**: 16-20

Roth, L., Daunderer, M. und Kormann, K. (1994) Giftpflanzen – Pflanzengifte: Giftpflanzen von A-Z. Notfallhilfe, Allergische und phototoxische Reaktionen. 4., überarb. und wesentlich erw. Aufl. – Landsberg / Lech:ecomed, 1994

Sahi, S. V., Chilton, M. D. und Chilton, W. S. (1990) Corn metabolites affect groth and virulence of *Agrobacterium tumefaciens* PNAS 87: 3879-3883

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

Salas, M. L. and Corcuera, L. J. (1991) Effect of Environment on Gramine Content in Barley Leaves and Susceptibility to the Aphid *Schizaphis Graminum* Phytochemistry **30** (10): 3237-3240

Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning. A laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press

Schopfer, C. R. und Ebel, J. (1998) Identification of elicitor-induced cytochrome P450s of soybean (*Glycine max* L.) using differential display of mRNA. Mol. Gen. Genet. **258** (4): 315 -323

Schulz, M., Friebe, A., Klück, P., Seipl, M. und Schnabl, H. (1994) Allelopathic effects of living Quackgrass (Agropyron repens L.). Identification of inhibitory allelochemicals exuded from rhizome borne roots. Angewandte Botanik **68**: 195-200

Sepulveda B. A. und Corcuera, L. J. (1989) Effect of gramine on the susceptibility of barley leaves to *Pseudomomas syringae*. Phytochemistry **29** (2): 465-467

Sicker, D., Frey, M., Schulz, M. und Gierl, A. (2000) Role of Natural Benzoxazinones in the Survival Strategy of Plants. in: A survey of Cell Biology, Joen (ed) Intern. Rev. Cytol. **198**: 319-346

Simcox, K und Weber, D. (1985) Location of the benzoxazinless (bx) Locus in maize by monosomic and B-A translocation analysis. Crop Science **25**, 827 - 830

Sommer, H., Beltan, J. – P., Hujser, P., Pape, H., Lönning, W. - E., Daedler, H. und Schwarz-Sommer, Z. (1990) Deficiens, a hoeotic gene involved in the control of flower morphogenesis in Antherinum majus, the protein shows homology to transcription factors. EMBO-J. 9: 605 - 613

Stettner, C. (1997) DIMBOA-Biosynthese in Mais: Isolierung und funktionelle Charakterisierung des *Bx1*-Gens. Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie, Biologie und Geowissenschaften der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften genehmigten Dissertation.

Tang, C.-S., Chang, S. H., Hoo, D. und Yanagihara, K. H. (1975) Gas chromatographic determination of 2(3)-Benzoxazolinones from cereal plants. Phytochemistry **14**: 2077-2079

Truan, G. *et al.* (1993) Enhanced in vivo monooxygenase activities of mammalian P450s in engineered yeast cells producing high levels of NADPH-P450 reductase and human cytochrome b_5 . Gene **125**: 49 - 55

Urban, P., Cullin, C. und Pompon, D. (1990) Maximizing the expression of mammalian cytochrome P450 monooxygenase activities in yeast cells. Biochimie **72**: 463 - 472

Velozo, J. A. *et al.* (1999) Increase in gramine content in barley infested by the aphid *Schizaphis graminum* R. Phytochemistry **52**: 1059-1061

von Rad, U. (2000) Isolierung und funktionelle Charakterisierung der UDP-Glucosyltransferasen Bx8 und Bx9 des DIMBOA-Biosyntheseweges in *Zea mays*. Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie, Biologie und Geowissenschaften der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften genehmigten Dissertation.

Werck-Reichart, D. und Feyereisen, R. (2000) Cytochrome P450: a success story. Genome Biology 1 (6): reviews 3003.1 - 3003.9

Wood, W. B. (1966) Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*: Bacterial mutants affecting the restriction and modification of DNA. Journal of Molecular Biology **16**: 118 – 133 Woodward, M. D., Corcuera, L. J., Helgeson, J. P., Kelman, A. und Upper, C. D. (1978) Factors that Influence the Activity of 2,4-Dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one on *Erwinia* Species in Growth Assays. Plant Physiology **61**: 803-805

Yoshida, H., Tsumuki, H., Kanehisa, K. und Corcuera, L. J. (1993) Release of gramine from the surface of barley leaves. Phytochemistry **34** (4): 1011-1013

Zuniga, G. E., Argandona, V. H., Niemeyer, H. M. und Corcuera, L. J. (1983) Hydroxamic acid content in wild and cultivated Gramineae. Phytochemistry **22** (12): 2665-2668

Danksagung:

Besonders bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Alfons Gierl für das Interesse am Fortgang meiner Arbeit, seine Unterstützung und Diskussionsbereitschaft. Ebenso möchte ich Frau Dr. Monika Frey für ihre zahlreichen Hilfestellungen, ihre konstruktiven Hinweise und ihre ständige Bereitschaft zum Gespräch danken.

Mein Dank gilt auch meinen Kolleginnen und Kollegen im Labor: Thilo Fischer, Erich Glawischnig, Regina Hüttl, Annette Martin, Park Woong-June, Oksana Shevshenko, Karolin Stahl, Conny Stettner, Uta v. Rad und Albert Winklmair für Hilfsbereitschaft, Humor und die allgemein gute Atmosphäre im Labor.

Zusätzlich bedanke ich mich bei allen anderen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Genetik für die schöne Zeit, die ich hier verbracht habe.

Mein Dank gilt weiterhin folgenden Personen und Institutionen:

Frau Maya Khaliani für ihre Mitarbeit an dem Dioxygenase-Projekt Herrn Jürgen Knott für seine Arbeiten an *HlBx3* Herrn Pui Jen-Tsai für seine Arbeiten an *HlBx1*

Für die Bereitstellung von Pflanzenmaterial:

Dr. Max Baumer, Bayerische Landesanstalt für Bodenkultur und Pflanzenbau, Freising,

Lehrstuhl für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung, TU München, Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung, Gatersleben

Prof. Dr. Danielle Werck-Reichard für die Bereitstellung des Hefe-Expressionssystems

Prof. Dr. Sicker für die Bereitstellung von Referenzsubstanzen und Isolationsmethoden

Dr. Eun Moo Young, und Dr. Chung Tae-Young, daß ich am NIAST in Suwon, Süd-Korea vier interessante Wochen verbringen konnte, sowie Dr. Yeh Wan-Hae für die Bereitstellung der Kollektion verschiedener Reis-Arten.

Außerdem Dr. Cho Kang Jim, Dr. Kim Jung-Bong, Dr. Lee Kang Seob, Dr. Nam Jae-Jak, Dr. Suh Suhk-Chul, Dr. Yoon In-Sun und Dr. Yun Doh-Won für ihre theoretische und praktische Hilfe, sowie daß sie mir das Leben in Korea näherbrachten.

Ferner gilt mein Dank der KOSEF und der DFG, die mir den Forschungsaufenthalt in Südkorea finanziell ermöglichten.

Allen Mitarbeitern des SFB 369 für die anregenden Diskussionen sowie die hilfsbereite Zusammenarbeit