

Lehrstuhl für Genetik der
Technischen Universität München

**Untersuchungen zur Evolution der Benzoxazinonbiosynthese in
dikotylen Pflanzen**

**Katrin Schullehner
(Dipl. Ing. agr. Univ.)**

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

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Gerhard Wenzel

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Alfons Gierl

2. Univ.-Prof. Dr. Wilfried Schwab

Die Dissertation wurde am 10.09.2007 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 12.11.2007 angenommen.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe und ihre Evolution.....	1
1.2	Benzoxazinone als pflanzliche Abwehrstrategie.....	2
1.3	Benzoxazinonbiosynthese in Gramineen	3
1.4	Die Verzweigungsreaktion: Vergleich von Tryptophansynthese α und BX1	4
1.5	Oxygenasen: Enzyme der Modifikation von Substraten.....	6
1.5.1	Cytochrom P450 Monooxygenasen	6
1.5.2	Dioxygenasen	7
1.6	Ziel der Arbeit	7
2	MATERIAL UND METHODEN	9
2.1	Material.....	9
2.1.1	Pflanzen.....	9
2.1.2	Bakterienstämme	9
2.1.3	Plasmide	9
2.1.4	Oligonukleotide	10
2.1.5	Chemikalien und Reagenzien	12
2.2	Molekularbiologische Methoden	12
2.2.1	DNA-Isolierung.....	12
2.2.2	RNA-Isolierung.....	12
2.2.3	cDNA-Synthese	12
2.2.4	Phagen-Banken	12
2.2.5	DNA-Klonierung.....	13
2.2.6	PCR-Verfahren	13
2.2.6.1	Standard-PCR.....	13
2.2.6.2	Quantitative PCR	13
2.2.6.3	DNA-Sequenzierung	13
2.2.7	Southern-Blot und Hybridisierung.....	14
2.2.8	Klonierung von Hairpin-Konstrukten für RNAi.....	14
2.3	Gewebekultur und Transformation mit <i>Agrobacterium</i>	14
2.3.1	<i>A. squarrosa</i> Kalluskultur und „hairy root“ Kultur	14
2.3.2	Herstellung elektrokompeter <i>Agrobacterien</i> und Transformation	15
2.3.3	Transformation von <i>A. squarrosa</i> Kalluskultur.....	15
2.3.4	Transformation von <i>C. orientalis</i>	15
2.3.5	Basta-Test	15

2.4	Proteinbiochemische Techniken	16
2.4.1	<i>Protein-Extraktion aus C. orientalis und L. galeobdolon</i>	16
2.4.2	<i>Proteinbestimmung nach Bradford, 1976</i>	16
2.4.3	<i>Heterologe Expression von Protein in E. coli und Reinigung über Nickel-Affinitätschromatographie</i>	16
2.4.4	<i>SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)</i>	17
2.4.5	<i>Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese</i>	17
2.4.6	<i>Abspaltung der His-Tag durch Thrombinverdau</i>	17
2.4.7	<i>Mikrosomenisolierung aus C. orientalis und L. galeobdolon</i>	17
2.4.8	<i>Mikrosomenisolierung aus A. squarrosa (nach Nezbedova, et al., 2001)</i>	18
2.5	Enzymtests	18
2.5.1	<i>Test der Zimtsäure-4-Hydroxylase-Aktivität</i>	18
2.5.2	<i>In vitro Enzymtests mit Mikrosomen</i>	18
2.5.3	<i>Test der Glycosyltransferase-Aktivität</i>	19
2.5.4	<i>Bestimmung der enzymatischen Parameter der Indol-3-Glycerinphosphatlyase</i>	19
2.5.4.1	<i>Bildung von Indol und GAP aus IGP</i>	19
2.5.4.2	<i>Bildung von IGP aus Indol und GAP</i>	20
2.6	Naturstoff-Analysen	20
2.6.1	<i>Gewinnung von Indol-3-Glycerinphosphat</i>	20
2.6.2	<i>Eisenchlorid-Färbetest</i>	20
2.6.3	<i>Aufreinigung von Pflanzeninhaltsstoffen</i>	20
2.6.3.1	<i>Isolierung von DI(M)BOA-Glc aus A. squarrosa</i>	20
2.6.3.2	<i>Isolierung von EtOAc-löslichen Naturstoffen aus C. orientalis, L. galeobdolon und Z. mays (Bailey und Larson, 1991)</i>	21
2.6.3.3	<i>Isolierung von freiem Tryptophan und Trp-Hydrolyse</i>	21
2.6.3.4	<i>Isolierung von Indol</i>	21
2.6.4	<i>in vivo Fütterungsversuche</i>	21
2.6.4.1	<i>Fütterung mit ¹⁴C-Indol und ¹⁴C-Tryptophan</i>	21
2.6.4.2	<i>Hemmversuche mit Prohexadion-Ca</i>	22
2.6.4.3	<i>Hemmversuche mit 1-Aminobenzotriazol</i>	22
2.6.5	<i>Analytik</i>	22
2.6.5.1	<i>HPLC</i>	22
2.6.5.2	<i>HPLC-MS</i>	22
2.6.5.3	<i>GC-MS</i>	23
2.6.5.4	<i>Dünnschichtchromatographie</i>	23

3	ERGEBNISSE	24
3.1	Benzoxazinongehalte in <i>A. squarrosa</i>, <i>C. orientalis</i>, <i>L. galeobdolon</i> und <i>Z. mays</i>	24
3.2	Indol ist auch die Ausgangssubstanz der Benzoxazinonbiosynthese bei dikotylen Pflanzen	26
3.3	Igl-Kandidaten aus <i>A. squarrosa</i>, <i>C. orientalis</i> und <i>L. galeobdolon</i>	28
3.4	Genomische Southern-Hybridisierung	30
3.5	Enzymcharakteristika der IGL-Enzyme	34
3.5.1	<i>Kinetische Daten für ZmBX1</i>	35
3.5.2	<i>Kinetische Daten für AtTSA1</i>	35
3.5.3	<i>Kinetische Daten für AtTSA2</i>	36
3.5.4	<i>Kinetische Daten für AsIGL-1 und AsIGL-2</i>	36
3.5.5	<i>Kinetische Daten für CoIGL-1 und CoIGL-2</i>	37
3.5.6	<i>Kinetische Daten für CoBX1</i>	38
3.5.7	<i>Kinetische Daten für LglGL1 und LglGL2</i>	38
3.5.8	<i>Charakterisierung der untersuchten Enzyme</i>	39
3.6	Transkriptanalyse der TSA-Kandidatengene	41
3.7	Die Umsetzung von Indol zu Benzoxazinonen wird durch Cytochrom P450 Monooxygenasen katalysiert	42
3.7.1	<i>ABT inhibiert die Indolinon-Synthese</i>	42
3.7.2	<i>Mikrosomenisolierung und Fütterung mit ¹³C-Indol</i>	44
3.7.3	<i>Die Hemmversuche mit Prohexadion-Ca</i>	44
3.8	Entgiftung des Biosyntheseprodukts DIBOA	45
4	DISKUSSION	47
4.1	Benzoxazinone in dikotylen Pflanzen	47
4.2	Der “branch point”	48
4.2.1	<i>Indol ist die direkte Vorstufe von DIBOA</i>	48
4.2.2	<i>IGL-Proteine katalysieren die „branch point“-Reaktion</i>	48
4.2.3	<i>Bei <i>C. orientalis</i> findet man ein BX1</i>	49
4.2.3.1	<i>CoBx1-Expression korreliert mit dem DIBOA-Gehalt</i>	50
4.2.3.2	<i>Die Proteinstruktur von CoBX1 lässt auf ein sehr aktives Protein schließen..</i>	52
4.2.4	<i>Bereitstellung von Indol bei <i>A. squarrosa</i> und <i>L. galeobdolon</i></i>	57
4.2.5	<i>IGL-Proteine aus monokotylen und dikotylen Pflanzen haben einen polyphyletischen Ursprung</i>	59
4.3	Die Modifikation und Funktionalisierung	60

4.3.1	<i>Indol wird durch Cytochrom P450 Monooxygenasen modifiziert.....</i>	60
4.3.2	<i>Dioxygenasen und Cytochrom P450 Enzyme können bei L. galeobdolon die nächsten Schritte katalysieren.....</i>	61
4.4	Ausblick	62
5	ZUSAMMENFASSUNG	63
6	LITERATUR	65
7	ANHANG	77

ABKÜRZUNGEN

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

ε	Extinktionskoeffizient
2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
<i>A. rhizogenes</i>	<i>Agrobacterium rhizogenes</i>
<i>A. squarrosa</i>	<i>Aphelandra squarrosa</i>
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
ABT	1-Aminobenzotriazol
As	<i>Aphelandra squarrosa</i>
AS	Ammoniumsulfat
<i>At</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
bAS	β -Amyrinsynthase
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
<i>C. orientalis</i>	<i>Consolida orientalis</i>
cDNA	Komplementäre DNA
Ci	Curie
Co	<i>Consolida orientalis</i>
Da	Dalton
DHS	Deoxyhyposinsynthase
DIBOA	2,4-Dihydroxy-2 <i>H</i> -1,4-benzoxazin-3(4 <i>H</i>)-on
DIMBOA	2,4-Dihydroxy-7-methoxy-2 <i>H</i> -1,4-benzoxazin-3(4 <i>H</i>)-on
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTE	Dithioerithrol
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC	Enzyme Commission number
EDTA	Ethylendiamin-N-N-N`-N`-Tetraacetat
EtOAc	Ethylacetat
FG	Frischgewicht
FNS	Flavonsynthase
GAP	Glycerinaldehyd-3-phosphat
GAPDH	Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
Glc	Glucosid
GSA	Glutamat-1-semialdehydaminotransferase
<i>h</i>	Hill-Koeffizient
<i>H. lechleri</i>	<i>Hordeum lechleri</i>
H ₂ O _{dest.}	Destilliertes Wasser
HBOA	2-Hydroxy-2 <i>H</i> -1,4-benzoxazin-3(4 <i>H</i>)-on
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-Piperazineethanesulfonsäure
HION	3-Hydroxyindolin-2-on
<i>Hi</i>	<i>Hordeum lechleri</i>
HOAC	Essigsäure

HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HPLC-MS	<i>High Performance Liquid Chromatography-Massenspektrometrie</i>
HSS	Homospermidinsynthase
<i>I. tinctoria</i>	<i>Isatis tinctoria</i>
IGL	Indol-3-Glycerinphosphatlyase
IGP	Indol-3-Glycerinphosphat
ION	Indolin-2-on
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
K	Konzentration
K/Na-P _i	Kalium/Natriumphosphat
kb	Kilobasenpaare
k_{cat}	Wechselzahl
k_{cat}/K_m	katalytischer Effizienzparameter
K_m	Michaelis-Menten-Konstante
K-P _i	Kalium-Phosphat
<i>L. galeobdolon</i>	<i>Lamium galeobdolon</i>
<i>Lg</i>	<i>Lamium galeobdolon</i>
LiAc	Lithiumacetat
MDIBOA	2-Hydroxy-4,7-dimethoxybenzoxazin-3-one
MeOH	Methanol
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
min	Minute
mRNA	messenger RNA
MS	Massenspektrometrie
n	Anzahl der Wiederholungen von Experimenten
n.d.	nicht detektierbar
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PEG	Polyethylenglycol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
<i>Pp</i>	<i>Physcomitrella patens</i>
Rf	<i>retention factor</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>
S	Substrat
<i>S. typhimurium</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
sp.	Species
SPME	Festphasenmikroextraktion
spp.	Subspecies
Ssp	<i>Synechocystis</i> sp.
St	<i>Salmonella typhimurium</i>
Taq-Polymerase	<i>Thermus aquaticus</i> -DNA-Polymerase

TE	Tris-EDTA-Puffer
TRIBOA	2,4,7-Trihydroxy-2 <i>H</i> -1,4-benzoxazin-3(4 <i>H</i>)-on
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSA	α -Untereinheit der Tryptophansynthase
TSB	β -Untereinheit der Tryptophansynthase
UDP	Uridindiphosphat
UV	Ultraviolett
v	Volumen
V	Volt
V_{\max}	maximale Umsetzungsgeschwindigkeit
v_0	Anfangsgeschwindigkeit
Vol.	Volumen
w	Gewicht (<i>weight</i>)
W.n.P.	Wochen nach Pollinierung
WT	Wildtyp
Zm	<i>Zea mays</i>

1 EINLEITUNG

1.1 Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe und ihre Evolution

Pflanzen produzieren eine erstaunliche Anzahl an niedermolekularen Substanzen. Nur wenige davon sind Teil der Primärmetabolismus, diese findet man in allen Organismen. Der große Rest wird als Sekundärstoffe bezeichnet. Dieser Begriff ist historisch begründet und wurde ursprünglich damit assoziiert, dass diese Stoffe als unwesentlich zu betrachten sind. Eine treffendere Definition für diese Substanzen ist die, dass ihre Biosynthese auf ausgewählte Pflanzengruppen beschränkt ist (Pichersky und Gang, 2000).

In höheren Pflanzen findet man eine große Vielfalt dieser pflanzlicher Sekundärmetabolite, von denen etliche von wirtschaftlichem Interesse sind (Harborne, 2001; Wink, *et al.*, 2004). In der Literatur ist von mehr als 200.000 verschiedenen Stoffen die Rede, aber die genaue Zahl kann man bestenfalls schätzen. Viele dieser Verbindungen wurden bereits isoliert und ihre Struktur aufgeklärt (Harborne, 1993; Wink und Schimmer, 1999; Wink und Waterman, 1999). Es scheint die Regel zu sein, dass eine Gruppe von Sekundärstoffen innerhalb eines Taxon dominiert. Dabei ist eine geringe Zahl von Hauptverbindungen vorhanden, begleitet von verschiedenen Derivaten und Nebenverbindungen. So findet man in der Gattung *Hordeum* (Poaceae) bei einigen Wildformen wie *Hordeum lechleri* das Benzoxazinon DIBOA (Niemeyer, 1988), in *H. spontaneum* hingegen das Indolalkaloid Gramin (Gross, *et al.*, 1974). Die Autoren nehmen an, dass beide Biosynthesewege in den Vorfahren beider Arten coexistierten. Aufgrund der ähnlichen biologische Funktion ging aber einer der beiden Biosynthesewege verloren. Dies war wahrscheinlich sogar von Vorteil, da beide Stoffwechselwege um ein Substrat konkurrieren.

Das Muster der pflanzlichen Sekundärstoffe kann sehr komplex sein und sich abhängig von Gewebe und Entwicklungsstadium und zwischen Individuen und Populationen verändern. Die Hauptaufgaben der Sekundärstoffe liegen in ihrer Funktion als Signalstoffe und in der Pathogenabwehr (Wink, 2003). Hier können zwei Prinzipien unterschieden werden. Phytoantizipine sind in ihrer inaktiven Form vorhanden, Phytoalexine werden als Antwort auf Schädigung durch Pathogene gebildet (Osborn, 1996). Sie können als „Vorstufe“, die durch Verwundung, Infektion oder im Körper des Fraßfeindes aktiviert wird, bereits in der Pflanze zu finden sein. In einigen Fällen wird die Biosynthese durch Verwundung oder Infektion induziert und der Sekundärstoff *de novo* gebildet.

1.2 Benzoxazinone als pflanzliche Abwehrstrategie

Eine Gruppe dieser Abwehrstoffe, sind die Hydroxamsäuren oder Benzoxazinone. Sie sind vor allem in Gräsern (Poaceae) zu finden (Barnes, *et al.*, 1987; Niemeyer, *et al.*, 1990; Wu, *et al.*, 2001; Zunniga und Massardo, 1991). Aber auch in vier dikotylen Familien, den Acanthaceae (Baumeler, *et al.*, 2000; Bravo, *et al.*, 2004; Huo, *et al.*, 2005; Kanchanapoom, *et al.*, 2001), den Lamiaceae (Alipieva, *et al.*, 2003), den Ranunculaceae (Özden, *et al.*, 1992) und den Scrophulariaceae (Bravo, *et al.*, 2005) findet man Vertreter, die DIMBOA (2,4-2H-Dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3(4H)-on) bzw. DIBOA (2,4-Dihydroxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-on) synthetisieren. Diese fünf Familien gehören zu drei Überfamilien, deren Verwandtschaftsgrad sehr gering ist (Abbildung 1).

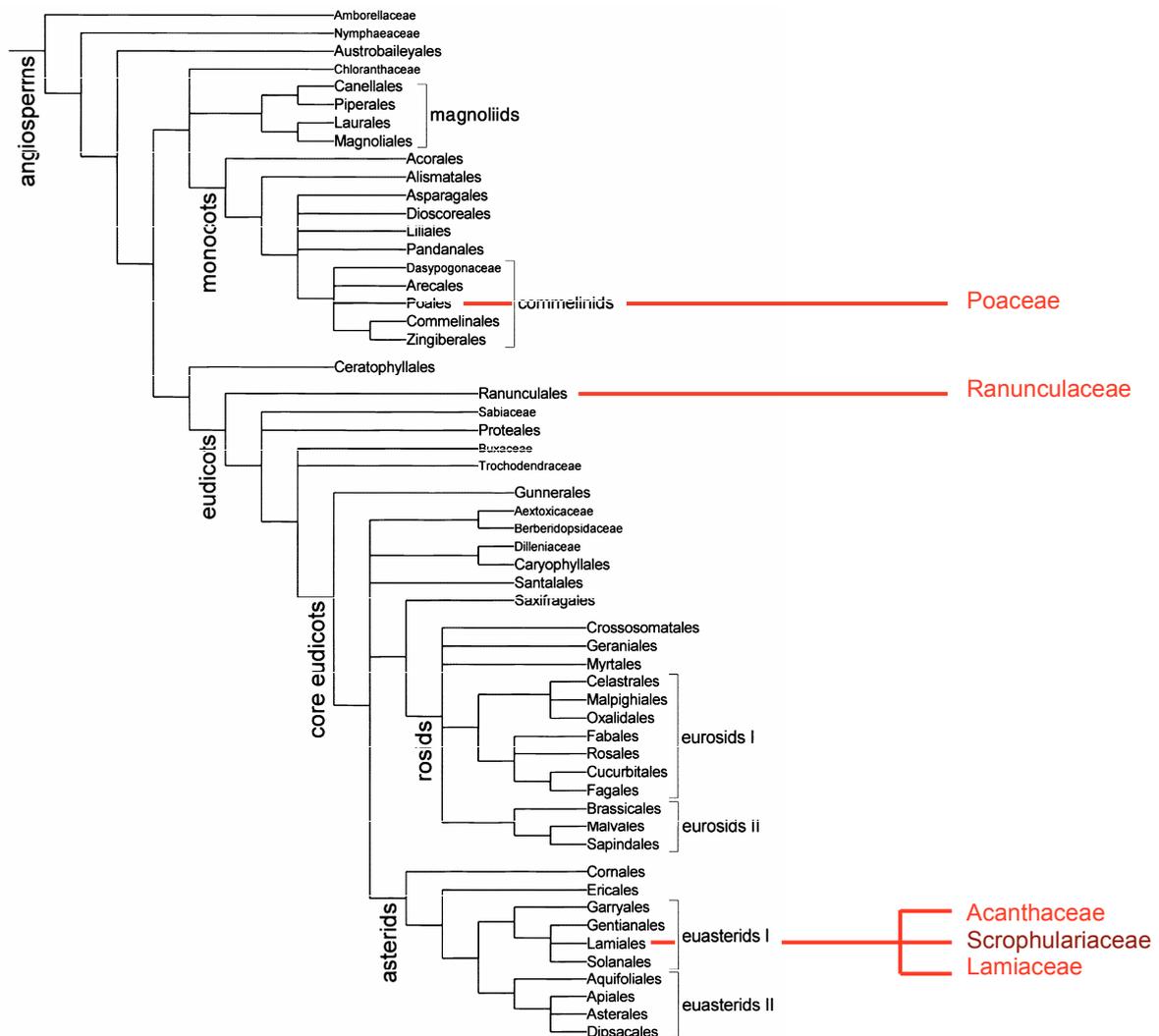


Abbildung 1: Phylogenetischer Stammbaum der Angiospermen (APG, 2003). Hellrot: Familien, von denen eine Benzoxazinon synthetisierender Art in dieser Arbeit untersucht wurde. Dunkelrot: Familie, deren Vertreter zum Teil Benzoxazinone synthetisieren.

Diese Abwehrstoffe wurden vorwiegend in ihrer Rolle bei der Pathogenabwehr und in ihrer allelopathischen Funktion untersucht (Perez und Ormeno-Nunez, 1991; Warnock, *et al.*, 2001). Resistenz gegen Maiszünsler (*Ostrinia nubilalis*), Blattfleckkrankheit (*Helminthosporium turcicum*), Maisblattlaus (*Rhopalosiphum maydis*), Stängelfäule (*Diplodia maydis*), aber auch gegen das Herbizid Atrazin wurde beschrieben (Ernesto und Hermann, 1997; Hamilton, 1964). Es wurde auch nachgewiesen, dass 2-Hydroxy-4,7-dimethoxybenzoxazin-3-one (MDIBOA) die Expression der Virulenzgene von *Agrobacterium tumefaciens* inhibiert (Sahi, *et al.*, 1990; Zhang, *et al.*, 2000). Untersuchungen zeigen auch, dass Benzoxazinone die Keimung verschiedener Pflanzen unterdrücken (Blum, *et al.*, 1991; Perez, 1990). Benzoxazinone sind als Aglucon auch toxisch für Pflanzen, daher werden sie als weniger giftige Glucoside in der Vakuole gespeichert. Eine Glucosidase, die die Glucosidgruppe abspaltet, ist im Chloroplasten lokalisiert. Erst wenn die Zelle z. B. durch Herbivoren geschädigt wird, kommen Enzym und Substrat in Kontakt und das toxische Aglucon wird gebildet (Cicek und Esen, 1998; Esen, 1992).

Darüber hinaus wurde auch postuliert, dass Benzoxazinone an der Aufnahme von Eisen und anderen Mikronährstoffen beteiligt sind (Makleit und Pethö, 1999; Pethö, 1993). Poschenrieder, *et al.*, 2005, zeigten, dass Benzoxazinone Aluminium binden. Sie erhielten in ihrer Arbeit auch Hinweise darauf, dass sie für Pflanzen bei der Toleranz gegenüber Aluminiumtoxizität von Bedeutung sind.

1.3 Benzoxazinonbiosynthese in Gramineen

Der Biosyntheseweg der Benzoxazinone wurde für Mais vollständig aufgeklärt (Frey, *et al.*, 1997, Abbildung 2). Die "branch point"-Reaktion, katalysiert durch BX1, nutzt als Substrat das aus dem Primärstoffwechsel kommende Indol-3-Glycerinphosphat (IGP). Diese Reaktion findet im Chloroplasten statt.

Die weiteren Schritte der Benzoxazinonbiosynthese kann man unter den Begriffen Modifikation und Funktionalisierung zusammenfassen. Hierbei werden in mehreren Schritten Sauerstofffunktionen in das Indolgrundgerüst eingeführt. Diese Reaktionen werden in vielen Fällen von Cytochrom P450 Monooxygenasen oder von Dioxygenasen katalysiert. Auf die Unterschiede beider Enzymklassen wird unter 1.5 genauer eingegangen.

Der letzte Schritt der Benzoxazinonbiosynthese ist die Detoxifikation der Produkte. Da Benzoxazinone als typische Phytoantizipine toxisch für Pflanzen sind, sind sie als Glucoside in der Vakuole gespeichert. Die Reaktion erfolgt durch Glucosyltransferasen.

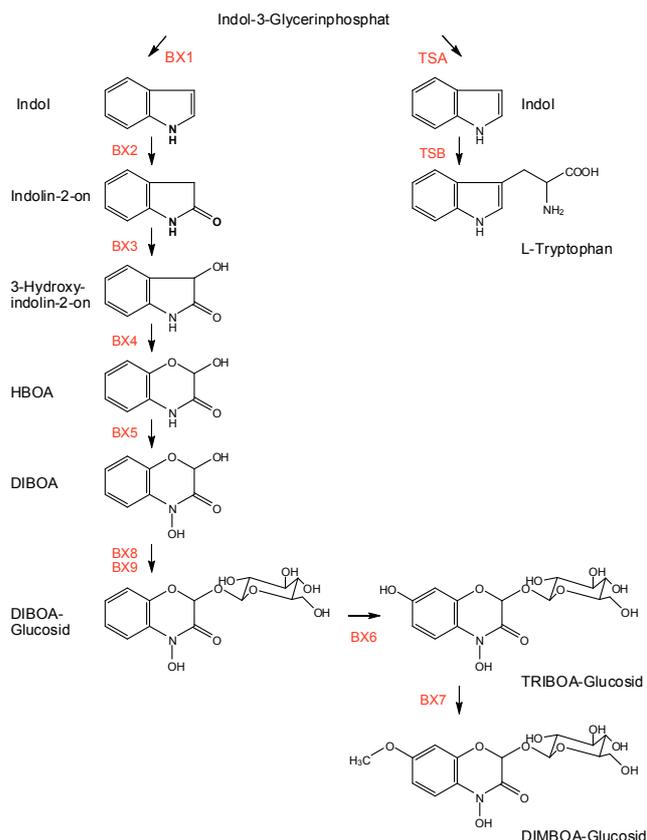


Abbildung 2: Tryptophansynthese in *Zea Mays* und der Abzweig vom Primärmetabolismus in den DIMBOA-Biosyntheseweg (Osterrieder, 2004, modifiziert nach Sicker, *et al.*, 2000). BX1 und TSA sind Indol-3-glycerinphosphatlyasen, BX2-BX5 sind Cytochrom P450 Monooxygenasen, BX8 und BX9 sind UDP-Glycosyltransferasen, BX6 ist eine 2-Oxoglutarat abhängige Dioxygenase, BX7 eine O-Methyltransferase.

1.4 Die Verzweigungsreaktion: Vergleich von Tryptophansynthase α und BX1

Tryptophan ist eine essentielle Aminosäure, sie wird von frei lebenden Prokaryonten, niedrigen Eukaryonten und höheren Pflanzen synthetisiert. Die *de novo* Biosynthese geht von Chorismat aus (Radwanski und Last, 1995).

Die Tryptophansynthase (EC 4.2.1.20) ist ein Heterotetramer und katalysiert die letzten beiden Schritte dieses Stoffwechselweges. Ihre α - und β -Untereinheiten sind als α - β - α -Komplex angeordnet. Die aktiven Zentren jedes α - und β -Dimers sind durch einen 25 Å großen Tunnel miteinander verbunden und regulieren sich wechselseitig über allosterische Signale, die überwiegend in Zusammenhang mit Veränderungen der Tertiärstruktur stehen (Hyde, *et al.*, 1988; Miles, 1991, 2001; Pan, *et al.*, 1997; Peracchi, *et al.*, 1996; Peracchi, *et al.*, 1995; Ruvinov, *et al.*, 1995). Die α -Untereinheit katalysiert die Spaltung von Indol-3-Glycerinphosphat zu Indol und Glyceraldehyd-3-phosphat. Bei der Pyridoxal-5'-Phosphat abhängigen β -Reaktion werden Indol und L-Serin zu L-Tryptophan und Wasser kondensiert (Abb. 2).

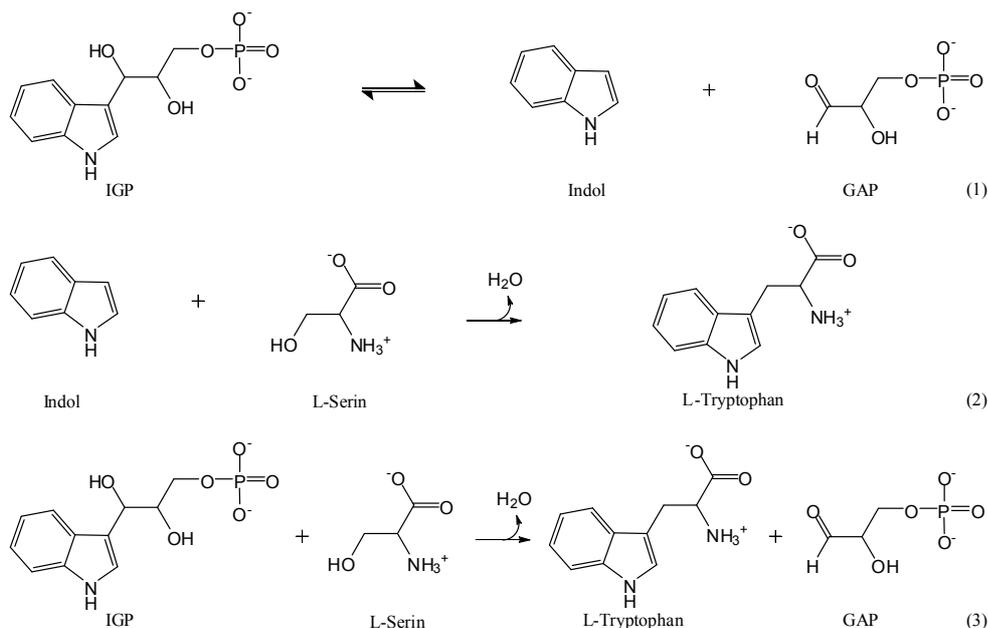


Abbildung 3: Spaltung von IGP zu Indol und GAP in der α -Reaktion (1). Kondensation von Indol und Serin in der β -Reaktion (2). Die physiologisch relevante Reaktion des α - β - α -Komplexes ist die Summe der α - und β - Reaktionen (3).

Beide Untereinheiten stehen in einem Gleichgewicht zwischen offener - weniger aktiven - und geschlossener - aktiveren - Konformation. Die Verschiebung des Gleichgewichts in die eine oder andere Richtung wird von den Eigenschaften verschiedener Liganden und ihrer Bindung an die aktiven Zentren oder regulatorischen Bereiche kontrolliert (Anderson, *et al.*, 1991; Dunn, *et al.*, 1990; Peracchi, *et al.*, 1996; Peracchi, *et al.*, 1995; Strambini, *et al.*, 1992).

In Pflanzen findet man zur Tryptophansynthase α homologe Enzyme, die IGP in Indol und Glycerinaldehyd-3-phosphat spalten. Zwei dieser Enzyme sind Teil der Pathogenabwehr. Das TSA-Homologe in Mais, *ZmBX1*, katalysiert den ersten Schritt der DIMBOA-Biosynthese, das Homologe *ZmIGL* liefert freies Indol (Frey, *et al.*, 1997). Sequenzvergleiche von *ZmBX1*, *ZmIgl*, *ZmTSA* und *ZmTSAlike* aus Mais lassen darauf schließen, dass *BX1* und *Igl* durch Genduplikation aus *TSA* entstanden sind (Gierl und Frey, 2001). Man geht von einem monophyletischen Ursprung aus. Auch die Proteinstrukturen einschließlich der aktiven Zentren sind sehr ähnlich (Kulik, *et al.*, 2005). Die enzymatischen Eigenschaften von *ZmBX1* und *TSA* sind hingegen unterschiedlich. Vergleicht man die Wechselzahlen (k_{cat}) der beiden Enzyme, so arbeitet *BX1* 1400 mal schneller als die monomere bakterielle *TSA* und immer noch vierzehn mal schneller als der bakterielle *TSA-TSB*-Komplex (Frey, *et al.*, 1997; Frey, *et al.*, 2000). Die Ursache dafür sehen Kulik, *et al.*, 2005, in einem Austausch der Aminosäuren, die für die Stabilisierung der inaktiven Konformation von *TSA* zuständig sind. Das Vorhandensein einer aktiven und einer inaktiven Struktur ist Teil der allosterischen Regulation der Tryptophansynthase. Das Abschalten dieser Eigenschaft ist ein gutes

Beispiel dafür, wie die Veränderung eines Gens Enzyme hervorbringen kann, die zwar dieselbe Reaktion katalysieren, aber in unterschiedliche biochemische Wege abzweigen.

In der vorliegenden Arbeit werden die Enzyme, die IGP in Indol und GAP spalten, unter der allgemeinen Bezeichnung Indol-3-Glycerinphosphatlyasen geführt. Sind diese Enzyme an der Tryptophanbiosynthese beteiligt, so ist die Bezeichnung Tryptophansynthase α (TSA). Für die TSA von *Arabidopsis thaliana* wurde eine Komplexbildung mit TSB und damit verbundenen Erhöhung ihrer Effizienz, d. h. Ansteigen von Substrataffinität und Umsatzrate, nachgewiesen (Radwanski und Last, 1995). Handelt es sich um Enzyme, die als Monomer höhere Wechselzahlen als TSAs im Komplex zeigen, werden sie als BX1 bezeichnet. Enzyme, für die keines dieser Kriterien zutrifft, werden als IGL bezeichnet.

1.5 Oxygenasen: Enzyme der Modifikation von Substraten

Der Einbau von Sauerstoff in ein Molekül kann durch verschiedene Enzymklassen katalysiert werden. Cytochrom P450 Monooxygenasen und Dioxygenasen sind die daran am häufigsten beteiligten. Auf sie soll im Folgenden näher eingegangen werden.

1.5.1 Cytochrom P450 Monooxygenasen

Bei Cytochrom P450 Enzymen handelt es sich um externe Monooxygenasen. Sie katalysieren den Einbau eines Sauerstoffatoms aus molekularem Sauerstoff in ein Substrat (S), wobei das andere Sauerstoffatom zu Wasser reduziert wird. Dabei wird ein externes Reduktionsäquivalent (B) verwendet (Ruckpaul, *et al.*, 1989). Den verschiedenen Reaktionen von Cytochrom P450 Monooxygenasen liegt folgende allgemeine Gleichung zugrunde:



Ihr Name leitet sich ab von ihrer Eigenschaft als Hämgruppen beinhaltende Enzyme, die bei der Bindung von Kohlenstoffmonoxid eine charakteristische Verschiebung des Absorptionsmaximums auf 450 nm zeigen (Omura und Sato, 1964). Neben der Hydroxylierung an Kohlenstoffatomen wurde eine Reihe weiterer Reaktionen beschrieben, N-, O- und S-Dealkylierung, Sulphoxidierung, Epoxidierung, Desaminierung, Desulphurierung und Reduktion von Stickoxiden sind nur eine Auswahl. Sono, *et al.*, 1996, und Guengerich, 2001a, b, berichten von mehr als 20 verschiedenen Reaktionen, die von Cytochrom P450 Monooxygenasen katalysiert werden.

Wie die Bezeichnung externe Monooxygenasen zeigt, benötigen Cytochrom P450 Enzyme einen externen Elektronendonator, der Elektronen für die Aktivierung des Sauerstoffs liefert, um das Substrat zu hydroxylieren (Bernhardt, 2004a, b). Es gibt verschiedene Klassen, die

aufgrund ihres Elektronenlieferungssystems unterschieden werden. In dieser Arbeit sind die mikrosomalen Cytochrom P450 Monooxygenasen von Interesse. Sie sind membrangebunden und akzeptieren Elektronen von einer mikrosomalen NADPH-Cytochrom P450 Reduktase. In Pflanzen spielen sie eine große Rolle bei der Biosynthese von Sekundärmetaboliten (Werck-Reichhart und Feyereisen, 2000). Auch an der Detoxifizierung von Herbiziden sind sie beteiligt (Werck-Reichhart, *et al.*, 2000). P450-Gene von Pflanzen bilden eine Supergenfamilie. In *A. thaliana* ist derzeit (Februar 2007) für 40 P450-Gene die Funktion gesichert, für 16 weitere vorhergesagt. Zusätzlich wurden 152 verschiedene P450-Gene in Form von mRNA nachgewiesen, 40 Gene sind annotiert und 24 Teilsequenzen wurden ermittelt (<http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html>).

1.5.2 Dioxygenasen

Neben den Cytochrom P450 Enzymen spielen auch Dioxygenasen eine wichtige Rolle bei der Biosynthese, dem Umbau und dem Abbau von Metaboliten. Zu den Dioxygenasen gehören Enzyme wie Hydroxylasen, Hydroxylasen/Epoxydasen, Cyclasen, Desaturasen und Expandasen. Sie sind definiert als Enzyme, die beide Atome eines Sauerstoffmoleküls in jeweils ein Substrat einbauen. In den meisten Fällen ist eines der beiden Substrate 2-Oxoglutarat (de Carolis und de Luca, 1994). Der Reaktionsmechanismus der Dioxygenasen kann wie folgt verallgemeinert werden:



Dabei ist (S) das Substrat und (SO) das hydroxylierte Produkt.

Für den Benzoxazinonbiosyntheseweg in Gräsern wurde gezeigt, dass Cytochrom P450 Enzyme die Modifikation von Indol zu DIBOA katalysieren (Glawischnig, *et al.*, 1999; Grün, *et al.*, 2005; Nomura, *et al.*, 2002). Einige Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten jedoch darauf hin, dass Dioxygenasen bei einzelnen Schritten für den Einbau von Sauerstoff verantwortlich sind. Auch die 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen von Pflanzen bilden eine Genfamilie. Die Annotierung von Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen wird nicht so aktiv betrieben, wie bei den P450-Enzymen. Deshalb liegen für *A. thaliana* keine konkreten Daten vor. Geschätzt wird ein Bestand von 50 bis 100 Genen.

1.6 Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist, einen Einblick in die Benzoxazinonbiosynthese in dikotylen Pflanzen zu geben. Der Schwerpunkt ist die Bestimmung des „branch point“, die genetische und proteinbiochemische Charakterisierung der Indol-3-Glycerinphosphatlyasen in Benzoxazinon synthetisierenden dikotylen Pflanzen. Untersucht wurden der morgen-

ländische Rittersporn *Consolida orientalis* (Ranunculaceae), das Glanzkölbchen *Aphelandra squarrosa* (Acanthaceae) und die Goldene Taubnessel *Lamium galeobdolon* (Lamiaceae). Um Vergleiche zu den Monokotylen zu ziehen, wurden die bereits veröffentlichten Daten, aber auch weitere Untersuchungen von Mais *Zea mays* (Poaceae) verwendet. Damit sind Arten aus allen Benzoxazinon synthetisierenden Überfamilien vertreten.

Darüber hinaus soll der nächste Schritt der Benzoxazinonbiosynthese untersucht werden. Mikrosomenisolierung und Fütterungsversuche sollen die erste modifizierte Substanz nach Indol bestätigen. Hemmversuche mit 1-Aminobenzotriazol und Prohexadion-Ca geben Aufschluss über die dabei beteiligten Enzymklassen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Pflanzen

Aphelandra squarrosa wurde über Stecklingskultur vermehrt. Dabei wurden junge Triebe abgeschnitten, in Rhizopon ® AA Pulver (Rhizopon, Niederlande) getaucht und auf feuchtem Quarzsand angezogen. Nach ca. drei Wochen entwickelten sich Wurzeln.

Consolida orientalis Saatgut wurde von PD Dr. Margot Schultz zur Verfügung gestellt. Die Samen wurden auf nicht zu feuchter Erde Typ T 2:1 mit Quarzsand ausgestreut, mit wenig Erde bedeckt und zweimal eine Woche bei 4 °C zur Vernalisation aufbewahrt. Die Anzucht erfolgte bei 21 °C.

Lamium galeobdolon wurde vom Staudengarten Weihenstephan, Freising, zur Verfügung gestellt. Die Vermehrung erfolgte über Stecklinge wie bei *A. squarrosa*, nach ca. 3 Tagen entwickelten sich Wurzeln.

2.1.2 Bakterienstämme

Escherichia coli-Stämme: XL1-Blue (Bullock, *et al.*, 1978)
 XL1-Blue Mrf' (Stratagene, USA)
 BI21 (DE3) (Studier und Moffatt, 1986)
 trpA2/F'trpA2 (Creighton, 1970)

Agrobacterium rhizogenes : Arqua1 (Quandt, *et al.*, 1993)
 TR105

Agrobacterium tumefaciens: EHA 101 (Hood, *et al.*, 1986)

2.1.3 Plasmide

Tabelle 1: Verwendete Plasmide

Plasmid	Resistenzmarker	Hersteller
pBlueskript KS+	Ampicillin	Stratagene, USA
pGEM T-Easy	Ampicillin	Promega
pET28a	Kanamycin	Novagen
pRNAi	Ampicillin	Limpens, <i>et al.</i> , 2004
pRedRoot1	Kanamycin	Limpens, <i>et al.</i> , 2004
pTF101.1	Spectinomycin	Margie, <i>et al.</i> , 2004
pTF102	Spectinomycin	Frame, <i>et al.</i> , 2002

2.1.4 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden für PCR- und Sequenzreaktionen verwendet.

Tabelle 2: Degenerierte Oligonukleotide, die für die Amplifikation von *TSA* bzw. *GAPDH* aus *A. squarrosa*, *L. galeobdolon* und *C. orientalis* verwendet wurden.

Name	Sequenz	Gen
Bx1FWD1	ATT ACC GCN GGN GAY CCY GA	<i>Igl</i>
BX1FWD2	ATT ACC GCN GGN GAY CCR GA	<i>Igl</i>
BX1rev1.2	ATY ACN CCR TCN GCY CCC CA	<i>Igl</i>
BX1rev2.2	ATY ACN CCR TCN GCR CCC CA	<i>Igl</i>
GAPDHdicotfwd	ATC AAG ATC GGA ATC AAC GG	<i>GAPDH</i>
GAPDHdicotrev	GCA CTT TTC CAA CAG CCT TG	<i>GAPDH</i>
GAPDHrev2	CAK CCA CCY CTC CAG TCC TT	<i>LgGAPDH</i>

Tabelle 3: Primer zur Sequenzierung.

Name	Sequenz	Vektor/Gen
Universal M13 Fwd (-20)	GTA AAA CGA CGG CCA GT	pGEM, pBlueskriptKS+
Universal M13Rev	GGA AAC AGC TAT GAC CAT G	pGEM, pBlueskriptKS+
SP6 Promotor	GAT TTA GGT GAC ACT ATA G	pGEM, pBlueskriptKS+
T7 Promotor	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	pGEM, pBlueskriptKS+
midFwd	CAT ACT GAA GCG CGG TGT CAA G	<i>AsIgl</i>
midRev	CGT TCT GTA GGA GTC GTA GGG G	<i>AsIgl</i>
Bx1FWD1	ATT ACC GCN GGN GAY CCY GA	<i>Igl</i>
BX1FWD2	ATT ACC GCN GGN GAY CCR GA	<i>Igl</i>
BX1rev1.2	ATY ACN CCR TCN GCY CCC CA	<i>Igl</i>
BX1rev2.2	ATY ACN CCR TCN GCR CCC CA	<i>Igl</i>
Co_TSA2_SeqPrimer	TTC TCT CGC TGT TGC GCC TC	<i>Colgl</i>

Tabelle 4: Primer für Light-Cycler-PCR.

Name	Sequenz	Gen
AphNested1	GGG GCA GTC GTG AGA GCA GCC ATC	<i>AsIgl</i>
AphNested2	TTG AGA GCA GCA GCA GCC ATC ACC	<i>AsIgl</i>
CoTSA1-LCfwd	TGT TAG TAT TTC TGA AAC ATT TGC CAG TCT CAG	<i>CoBx1</i>
CoTSA1-LCrev	CTG TTT CAC GTG TTC TGG TTT GGA AA	<i>CoBx1</i>
CoTSA2-LCfwd	GCC ACA GCC GTC AGT CTC TCC GAA A	<i>Colgl</i>
CoTSA2-LCrev	GCT CCC CAA CCT GCT ATC TGT TTC A	<i>Colgl</i>
GAPDHdicotfwd	ATC AAG ATC GGA ATC AAC GG	<i>AsGAPDH</i> , <i>CoGAPDH</i>
GAPDHdicotrev	GCA CTT TTC CAA CAG CCT TG	<i>AsGAPDH</i> , <i>CoGAPDH</i>
Lg1_uniqueFwd	CAC TCT CAC CGC CGC CCC TA	<i>LgIgl1</i>
Lg1_uniqueRev	GGT TAA CAA CAC AGT TTT GCT G	<i>LgIgl1</i>
Lg2_uniqueFwd	TCT CTC AGC GAT CTT CTT CTC GAG	<i>LgIgl2</i>
Lg2_uniqueRev	GGT AGA TGA ACC CTT CGG CCG	<i>LgIgl2</i>
LgGAPspecFwd	GGG TTG CTC TTC AGA GAG ACG ATG T	<i>LgGAPDH</i>
LgGAPspecREV	CCA CCT CTC CAG TCC TTG GCA GAT	<i>LgGAPDH</i>

Tabelle 5: PCR-Primer zur Amplifikation der Fragmente für Southern-Sonden.

Name	Sequenz	Gen
AsTSAProbe +Hind fwd	TTG AAA GCT GCT GCA AGC AG	<i>Aslgl</i>
AsTSAProbe +Hind rev	CAT CAA AAT TCG CAC ATT CG	<i>Aslgl</i>
AsTSAProbe -Bam fwd	AAG AAC GGT GAT GGC TGC TG	<i>Aslgl</i>
AsTSAProbe -Bam rev	GAG TAA GGA ACC CCC AAT TC	<i>Aslgl</i>
Bx1FWD1	ATT ACC GCN GGN GAY CCY GA	<i>Aslgl</i>
BX1rev2.2	ATY ACN CCR TCN GCR CCC CA	<i>Aslgl</i>

Tabelle 6: Mismatch-Primer zu Einführung von Schnittstellen für die Klonierung der verschiedenen *lgl*-Gene in den Expressionsvektor pET28a. Die jeweiligen Schnittstellen sind unterstrichen.

Name	Sequenz	Gen
At TSA Stop BamHI	TTG TAG <u>GAT CCT</u> CAA AGA AGA GCA GAT TTA AGA G	<i>AtTSA1</i>
At-TSA NdeI	GAT TCT <u>CTC ATA TGG</u> CTT CTC TCT CCA CCT C	<i>AtTSA1</i>
AtTSA2Bamrev	GAG GAT <u>CCT</u> GTC TTT CTC CTT CGG AAC CCG A	<i>AtTSA2</i>
AtTSA2Ndefwd	TTC <u>ATA TGG</u> ATC TTC TCA AGA CTC CTT CCT CCA	<i>AtTSA2</i>
Co Start NdeI	TTT <u>CAT ATG</u> GTT CTC TTA CCA TTT CGC CCA GTT C	<i>CoBx1</i>
Co Stop Bam	CAA <u>GGA TCC</u> TTA AAT CAT GAG TAG ACT GTT GTT TTC AGA C	<i>CoBx1</i>
ConstSA2BamHI	CGG <u>GAT CCT</u> TGG CAT ACA AAA TGA GTA CCG AGT	<i>Colgl-1, Colgl-2</i>
ConstSA2NdeI	TAC <u>ATA TGG</u> CTT CTC TCG CTG TTG C	<i>Colgl-1, Colgl-2</i>
Ka_BglII	AAG GGA <u>AGA TCT</u> TAA CAG AAC TGA AT	<i>Aslgl-1, Aslgl-2</i>
Ka_NdeI1	CGA CTC <u>ATA TGA</u> CCC TTT CAA TAT C	<i>Aslgl-1</i>
Ka_NdeI1_Klon16	CGA CTC <u>ATA TGA</u> CCC TTC CAA TAT C	<i>Aslgl-2</i>
LamiumTSA1BamStop	CAG <u>GAT CCC</u> ATT CGA GAA ATC TAC TTG CGC AGC	<i>Lglgl1</i>
LamiumTSA1NdeStart	CCC <u>ATA TGG</u> CCA CTC TCA CCG CCG C	<i>Lglgl1</i>
LamiumTSA2BamStop	TTG <u>GAT CCG</u> CCC AAA ACC ACT ACT CAA ACA AGT G	<i>Lglgl2</i>
LamiumTSA2Ndefwd	CTC <u>ATA TGG</u> CTA CTC TCC AAA CTG CTA CCA AAG	<i>Lglgl2</i>

Tabelle 7: Mismatch-Primer zu Amplifikation der PCR-Produkte für die Erstellung der RNAi-Konstrukte. Die eingeführten Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen.

Name	Sequenz	Gen
RNAiBam-SwaR	AGG GAT CCA TTT AAA <u>TTG</u> CTC GGG TTT TGA TAT GC	<i>Aslgl</i>
RNAiSpe-AscF	ATA CTA GTG GCG CGC <u>CTC</u> AAG AAA TTC GTG AC	<i>Aslgl</i>
Cons RNAi AscSpe	TGA TAC TAG TGG CGC GCC TGT GAT TGA G	<i>CoBx1</i>
Cons RNAi BamSwa	CCG GAT CCA TTT AAA <u>TTA</u> GAA GTG ATT GAA C	<i>CoBx1</i>
Co_RNAiTSA2_AscSpe	<u>ACT</u> AGT GGC GCG <u>CCC</u> TCA ACC AAA TCT CGC ATA TCC ATG	<i>Colgl</i>
Co_RNAiTSA2_BamSwa	<u>GGA</u> TCC ATT TAA <u>ATC</u> AAC ATT GCA GTT TCC TCC AGA GGA	<i>Colgl</i>

2.1.5 Chemikalien und Reagenzien

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

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 DNA-Isolierung

Die Plasmid-DNA-Präparation aus *E. coli* wurde nach dem Prinzip der alkalische Lyse nach Birnboim und Doly, 1979, durchgeführt. Plasmid-DNA aus Agrobakterien wurde mittels alkalischer Lyse (Plant Transformation Workshop, 2003) isoliert.

Genomische DNA wurde aus *A. squarrosa*, *C. orientalis* und *L. galeobdolon* nach Dellaporta, *et al.*, 1983, isoliert.

2.2.2 RNA-Isolierung

Gesamt-RNA wurde im kleinen Maßstab mit dem NucleoSpin®RNA Plant-Kit (Machery-Nagel, Düren) nach Angaben des Herstellers aus 100 mg Pflanzenmaterial isoliert.

Um poly(A)⁺-RNA zu isolieren, wurden RNA aus etwa 5 g bis 15 g Pflanzenmaterial nach der Guanidinium-Hydrochlorid Methode (Logemann, *et al.*, 1987) isoliert. Die Aufreinigung der poly(A)⁺-RNA erfolgte durch Affinitätschromatographie an Oligo(dT)-Cellulose, durchgeführt mit Oligotex-mRNA-Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers.

2.2.3 cDNA-Synthese

Die Synthese der cDNA erfolgte mit dem TaqMan Kit (Roche, Schweiz) nach Angaben des Herstellers. Zur Synthese wurden 500 ng RNA eingesetzt.

2.2.4 Phagen-Banken

Für die Phagenbanken wurden je 5 µg poly(A)⁺-RNA aus *A. squarrosa*-Wurzeln, 2 Wochen alten *C. orientalis*-Keimlingen und *L. galeobdolon*-Trieben eingesetzt. Die Erstellung der cDNA-Banken erfolgte mit dem cDNA-Synthese Kit, ZAP-cDNA® Synthesis Kit und ZAP-cDNA® Gigapack® III Gold Cloning Kit (Stratagene, USA) nach Angaben des Herstellers.

2.2.5 DNA-Klonierung

Allgemeine Klonierungstechniken wie Restriktionsverdau mit Endonukleasen, T4-Polymerase-Behandlung, alkalische Phosphatase-Behandlung und Ligation wurden nach standardisierten Protokollen (Sambrook, *et al.*, 1989) oder nach Angaben der Hersteller durchgeführt.

2.2.6 PCR-Verfahren

2.2.6.1 Standard-PCR

Die PCR-Reaktionen wurden im Thermoblock UNO (Biometra, Göttingen) durchgeführt. Für Standard-PCR-Reaktionen wurde Taq-Polymerase (Boehringer, Mannheim) verwendet. Für die Amplifikation von Fragmenten für die Proteinexpression wurde ProofStart-Polymerase (Qiagen, Hilden) verwendet.

2.2.6.2 Quantitative PCR

Für die quantitative Bestimmung der Transkriptmengen wurde der FastStart DNA Master SYBR Green Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) verwendet und gegen die Transkriptmenge von *GAPDH* normiert. Die Analyse wurde am Light-Cycler (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) durchgeführt. Die Bedingungen für die quantitative PCR sind in Tabelle 8 angegeben, die verwendeten Primer in Tabelle 4.

Tabelle 8: Light-Cycler-Bedingungen für quantitative PCR.

Gen	MgCl ₂ - Konzentration [mM]	DMSO- Konzentration [%]	Annealing- Temperatur [°C]	Extensions- Zeit [s]	Extensions- Temperatur 2 [°C]
<i>AsIgl</i>	2	3	53	28	72
<i>AsGAPDH</i>	2	-	50	26	82
<i>CoBx1</i>	4	3	62	26	84
<i>CoIgl</i>	4	3	62	35	80
<i>CoGAPDH</i>	2	3	50	26	82
<i>LgIgl1</i>	2	-	50	30	85
<i>LgIgl2</i>	2	-	56	24	86
<i>LgGAP</i>	2	-	58	23	85

2.2.6.3 DNA-Sequenzierung

Für die DNA-Sequenzierung wurde Plasmid-DNA zuvor durch PEG-Fällung gereinigt (Sambrook J, *et al.*, 1989), PCR-Produkte wurden über GFXTM DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham) aufgereinigt. Die Sequenzreaktion erfolgte durch die Didesoxy-Methode nach Sanger, *et al.*, 1977. Standardmäßig wurden 100 ng Plasmid-DNA oder 5-50 ng PCR-Produkt für die Sequenzreaktion eingesetzt, die nach Protokoll des BIG DYE®

Terminator v1.1 Cycle Sequencing-Kit (Applied Biosystems, USA) durchgeführt wurden. Die dabei verwendeten Primer sind in

Tabelle 3 aufgelistet. Die Sequenzierung erfolgte im Kapillarsequenzierer ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA). Die Auswertung erfolgte mittels Vector NTI 10.1.1 (Invitrogen, Karlsruhe).

2.2.7 Southern-Blot und Hybridisierung

Restriktionsverdauete DNA wurde auf einem 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt und anschließend über Nacht auf eine Hybond™ H+ Nylonmembran (Pall Biosupport Membranes) transferiert (Sambrook, *et al.*, 1989). Als Sonden wurden für *AslgI* PCR-Produkte (Tabelle 5) verwendet oder für *CoBx1*, *Colgl* und *Lglgl* die vollständigen Gene, die durch Restriktionsverdau aus pET28a ausgeschnitten und über Geleluatation aufgereinigt wurden. Diese wurden in einer Klenow-Reaktion mit α -³²P dCTP radioaktiv markiert. Die Auswertung erfolgte am STORM®860 Phosphoimager (Amersham Pharmacia Biotech) mittels ImageQuant (Molecular Dynamics).

2.2.8 Klonierung von Hairpin-Konstrukten für RNAi

Um Hairpin-Konstrukte für RNA-Interferenz zu erhalten wurden für *AslgI* ein 357 bp, für *CoBx1* ein 485 bp und für *Colgl* ein 503 bp großes PCR-Produkt in sense und antisense-Richtung in pRNAi kloniert (Limpens, *et al.*, 2004). Über Mismatchprimer wurden dafür je zwei Schnittstellen eingeführt, die verwendeten Primer sind in Tabelle 7 aufgelistet. Die so erhaltenen Hairpin-Konstrukte wurden in die jeweiligen Transformationsvektoren umkloniert. Für *A. squarrosa*-Gene wurde für die Transformation in *A. rhizogenes* der binäre Vektor pRedRoot (Limpens, *et al.*, 2004) verwendet, für *C. orientalis*-Gene pTF101.1 (Margie, *et al.*, 2004) für die Transformation in *A. tumefaciens*.

2.3 Gewebekultur und Transformation mit Agrobacterium

2.3.1 *A. squarrosa* Kalluskultur und „hairy root“ Kultur

Für die *A. squarrosa*-Kalluskultur wurden Blätter in 1,2 % Natriumhypochlorit 10 min oberflächensterilisiert, in flüssigem McCown Woody Plant Medium (Lloyd und McCown, 1980) in ca. 1 cm² große Stücke geschnitten und auf McCown Woody Plant Medium (0,7 % Phytoagar, 3 % Saccharose, 10 mg l⁻¹ Cystein, 10 mg l⁻¹ Thiamin, 1mg l⁻¹ 2,4-D, 0,2 mg l⁻¹ Kinetin, nach Nezbedova, *et al.*, 2001) gesetzt und bei 21 °C in Dunkelheit kultiviert

Die „hairy root“ Kultur wurden auf Gamborg B5 Medium (Gamborg, *et al.*, 1968) mit 3% Saccharose, 0,7 % Phytoagar und 250 mg l⁻¹ Cefotaxim bei 21 °C in Dunkelheit kultiviert.

2.3.2 Herstellung elektrokompetenter Agrobakterien und Transformation

Elektrokompetente Agrobakterien wurden nach (Walkerpeach und Velten, 1994) hergestellt. Die Transformation von *A. tumefaciens* EHA 101 mit den Ti-Plasmid-RNAi-Konstrukten und die Cotransformation von *A. rhizogenes* Arqua1 mit den RNAi-Konstrukten erfolgte durch Elektroporation mit dem Gene-Transfection-Pulser (BioRad, USA) in 0,2 mm Küvetten bei 2,5 V, 400 Ω und 25 µF mit 1 µg DNA. Die Selektion erfolgte auf YEP-Platten mit entsprechenden Antibiotika.

2.3.3 Transformation von *A. squarrosa* Kalluskultur

Um *A. squarrosa* zu transformieren wurden *A. rhizogenes* mit entsprechendem Plasmid über Nacht angezogen, abzentrifugiert und in flüssigem Gamborg B5 Medium resuspendiert. Mit einer Kanüle wurden die bei der Kalluskultur gebildeten Sekundärstrukturen verletzt und die *A. rhizogenes* Suspension aufgetropft. Nach drei Tagen Cokultivierung wurden die infizierten Kalli auf festes Gamborg B5 Medium mit Cefotaxim umgesetzt. Bei Transformation mit RNAi-Konstrukten wurde zusätzlich mit 10 mg l⁻¹ Tryptophan supplementiert.

2.3.4 Transformation von *C. orientalis*

C. orientalis Pflanzen wurden angezogen, bis erste Knospen sichtbar wurden. Eine Übernachtkultur von *A. tumefaciens* mit entsprechendem Ti-Plasmid wurde abzentrifugiert und in der entsprechenden Menge Infektions-Lösung (1 g l⁻¹ N6-Salze, 1x N6-Vitamine, 2,4-D, 700 mg l⁻¹ L-Prolin, 68,4 g l⁻¹ Saccharose, 36 g l⁻¹ Glucose, pH 5,2, 100 µM Acetosyringon, 0,005 % Silwet) resuspendiert, um ein OD₆₀₀=1,0 zu erhalten. Die Bakteriensuspension wurde anschließend mit einem Pinsel auf das Meristem aufgetragen. *C. orientalis*-Blüten wurden von Hand polliniert und die reifen Samen geerntet.

2.3.5 Basta-Test

Eine Woche alte *C. orientalis*-Keimlinge wurden mit 0,05 %iger Basta-Lösung mit 50 µl 50 ml⁻¹ Tween 20 besprüht. Nach etwa drei Tagen konnten die Keimlinge bonitiert werden.

2.4 Proteinbiochemische Techniken

2.4.1 Protein-Extraktion aus *C. orientalis* und *L. galeobdolon*

Das Pflanzenmaterial wurde in Extraktionspuffer (50mM HEPES, 5 mM DTE, pH 7,5) mit $0,3 \text{ g g}^{-1}$ FG Polyclar AT® und Seesand gemörsert, über Mull gegossen und bei 14.000 rpm, 4 °C für 20 min zentrifugiert, in 30 % Ammoniumsulfat 2h, 4 °C gefällt und 30 min bei 14.000 rpm, 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit 70 % AS gefällt und das Pellet in Reinigungspuffer (20 mM HEPES, 5 mM DTE) aufgenommen.

2.4.2 Proteinbestimmung nach Bradford, 1976

Die Proteinkonzentration einer Probe wurde mit dem Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad) nach Bradford, 1976, durchgeführt. Hierfür wurden 800 µl $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ mit 200 µl Biorad protein assay solution (Bio-Rad) und 5 µl Proteinextrakt versetzt und die OD_{595} photometrisch gegen eine Wasserkontrolle mit 5 µl Puffer bestimmt. Die Proteinkonzentration wurde anhand einer BSA-Eichkurve bestimmt.

2.4.3 Heterologe Expression von Protein in *E. coli* und Reinigung über Nickel-Affinitätschromatographie

Zunächst wurden die mit ProofStart-Polymerase (Qiagen, Hilden) generierten PCR-Produkte blunt-end in pBlueskript KS+ kloniert. Nach Bestätigung der korrekten Sequenzen wurden die entsprechenden Gene über die bei der PCR durch Primer eingeführte Schnittstellen in den Expressionsvektor pET28a umklont. Die Primer wurden so gewählt und modifiziert, dass bei der Klonierung das jeweilige Gen am gewünschten Start in Frame mit der aminoterminalen 6xHis-Tag translatiert wird.

Die Expressionsvektoren wurden anschließend in chemisch kompetente *E. coli* Zellen des Stamms BL21 (DE3) transformiert. Die Bakterienkultur wurde bis zu einer OD_{600} zwischen 300 und 500 angezogen, anschließend mit 1 mM IPTG für 2 h bei 37 °C induziert. Nach Zentrifugation bei 4000 rpm, 4 °C wurden die Bakterien in 0,9 % NaCl gewaschen und erneut abzentrifugiert. Das Pellet wurde in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -70 °C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

Zur Aufreinigung wurde im kleinen Maßstab (10 ml Bakterienkultur) nach dem Protokoll zur nativen Präparation bzw. im großen Maßstab (1l Bakterienkultur) zur nativen Präparation „in Batch“ (QIAexpressionist™, Qiagen) gearbeitet. Im kleinen Maßstab wurden die Bakterien in Lysispuffer mittels „freeze & thaw“ lysiert indem sie dreimal in flüssigen Stickstoff schockgefroren und auf Eis wieder aufgetaut wurden. Für die Aufreinigung im großen

Maßstab wurde das Bakterienpellet in 15 ml Lysispuffer resuspendiert und durch Sonifizieren (2 min, 10 s Puls, 15 s Pause, Amplitude 35 %) aufgeschlossen. Abweichend von den Protokollen wurde für den Waschpuffer 50 mM Imidazol eingesetzt und für den Elutionspuffer 250 mM Imidazol.

Die Reinheit der Fraktionen wurde durch SDS-PAGE überprüft und ihre Proteinkonzentration nach Bradford, 1976, bestimmt. Die Fraktionen mit dem höchstem Gehalt an reinem Protein wurden vereinigt und über NAP-10-Säulchen (Pharmacia) in Aufbewahrungspuffer (50 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0, 40 % Glycerin, 5 mM β -Mercaptoethanol) nach Angaben des Herstellers umgepuffert. Die Proteine zeigten bei -70 °C nach mehreren Monaten und bei 4 °C nach einer Woche keinen Rückgang der Aktivität.

2.4.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine wurden in 1x Laemmli-Puffer (50 mM Tris pH 6,8, 2 % SDS, 10 % Glycerin, 5 % β -Mercaptoethanol, Bromphenolblau) über denaturierende Tris-Glycin SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970) nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die Trenngele enthielten 12,5 %, die Sammelgele 5 % Polyacrylamid. Die Elektrophorese wurde mit der Mighty-Small Apparatur (Hoefler/Amersham/Pharmacia/Biotech Gruppe) durchgeführt. Proteine im Gel wurden mit Coumassieblau (Sigma) gefärbt.

2.4.5 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur nativen Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde das NativePAGE™ Novex® Bis-Tris Gel System (Invitrogen) mit NativePAGE™ Novex 4-16% Bis-Tris Gelen verwendet. Die Elektrophorese wurde in einer XCell SureLock™ Mini-Cell (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.4.6 Abspaltung der His-Tag durch Thrombinverdau

Heterolog exprimiertes Protein wurde nach der Aufreinigung über NiNTA über NAP-Säulchen in 1xCleavage-Buffer umgepuffert. Der Thrombinverdau erfolgte mit dem Thrombin Kit (Novagen) nach Angaben des Herstellers.

2.4.7 Mikrosomenisolierung aus *C. orientalis* und *L. galeobdolon*

15 g bis 20 g Pflanzengewebe wurde in etwa 20 ml Extraktionspuffer (250 mM Tris, 250 mM Saccharose, 100 mM Ascorbinsäure, 2 mM DTT, 5 mg/ml BSA, 2 mM EDTA, pH 8,0), Polyclar AT und Seesand auf Eis gemörsert, über Mull filtriert und der Durchlauf

abzentrifugiert (14.000 rpm, 4 °C, 15 min). Der Überstand wurde in einer Beckman Ultrazentrifuge 90 min bei 4 °C, 200000 g abzentrifugiert. Das Pellet wurde in Aufbewahrungspuffer (100 mM Tris, 25 mM Saccharose, 50 mM NaCl, 2 mM DTT, pH 8,0) im Potter resuspendiert und zur weiteren Reinigung erneut 30 min, 4 °C, 200000 g abzentrifugiert. Das Pellet wurde in ca. 2 ml Aufbewahrungspuffer mit 15 % Glycerin resuspendiert und der Proteingehalt mittels Bradford-Test bestimmt. Alle Puffer wurden vor Gebrauch entgast.

2.4.8 Mikrosomenisolierung aus *A. squarrosa* (nach Nezbedova, et al., 2001)

Aphelandra-Wurzeln wurden 30 min bei –20 °C tiefgefroren, danach klein geschnitten und auf Eis in Mikrosomen-Isolierungspuffer (100mM K/Na-Pi, 600 mM Mannitol, 10 mM β -Mercaptoethanol, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF, pH7,4) mit 0,25 g/g FW Polyclar AT und Seesand gemörsert und über Mull gefiltert. Der Durchlauf wurde 20 min bei 14500 rpm, 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde in einer Beckman Ultrazentrifuge 90 min bei 4 °C, 200000 g abzentrifugiert. Das Pellet wurde in Aufbewahrungspuffer (100 mM Tris, 25 mM Saccharose, 50 mM NaCl, 2 mM DTT, pH 8,0) im Potter resuspendiert und zur weiteren Reinigung erneut 30 min, 4 °C, 200000 g abzentrifugiert. Das Pellet wurde in ca. 2 ml Aufbewahrungspuffer mit 15 % Glycerin resuspendiert und der Proteingehalt mittels Bradford-Test bestimmt. Alle Puffer wurden vor Gebrauch entgast.

2.5 Enzymtests

2.5.1 Test der Zimtsäure-4-Hydroxylase-Aktivität

Um die Qualität der Mikrosomen zu testen wurden 25 μ g Mikrosomen-Protein in 50 mM K-P_i pH 7,5 mit 5 mM Zimtsäure und 1 mM NADPH (200 μ l Endvolumen) 30 min bei 30 °C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 5 % HOAc angesäuert und zweimal mit 200 μ l EtOAc ausgeschüttelt, der Überstand wurde einrotiert und der Rückstand in 100 μ l MeOH aufgenommen. Der Umsatz von Zimtsäure zu Coumarsäure wurde mittels HPLC bestimmt. Dazu wurden die Substanzen nach dem reversed Phase Prinzip in einem 15-minütigen Gradienten von 20% bis 100 % MeOH in 2 % Ameisensäure über eine LiChrospher® RP18e 5 μ m Säule (250-4) aufgetrennt.

2.5.2 In vitro Enzymtests mit Mikrosomen

In einem Volumen von 200 μ l wurden in 50 mM K-Pi pH 7,4, 0,7 mM NADPH 150 μ l Mikrosomen-Protein mit 200 μ M Substrat 2 h bei Raumtemperatur inkubiert, mit 200 μ l MeOH abgestoppt, mit 1,3 Volumen 0,1 M Essigsäure angesäuert und dreimal mit EtOAc

ausgeschüttelt. Die EtOAc-Phase wurde eingedampft und der Rückstand in 100 µl MeOH aufgenommen.

Der Umsatz von Indol zu Indolinon, Indolinon zu HION, HION zu HBOA und HBOA zu DIBOA wurde mittels HPLC bestimmt. Die Auftrennung erfolgte über einen 15-minütigen Gradienten von 20 % bis 100 % Acetonitril in 0,3 % Ameisensäure über eine LiChrospher® RP18e 5 µm Säule (250-4).

2.5.3 Test der Glycosyltransferase-Aktivität

25 µg Protein wurde in Assay-Puffer (50 mM HEPES, 5 mM DTE, 1 mM UDP-Glucose, 0,35 mM DIBOA, pH 8,2) bei 37 °C 5 min inkubiert, mit Folch-Lösung (Chloroform:Methanol 2:1 (v:v), 1 % HCl) ausgeschüttelt und mittels HPLC analysiert. DIBOA und DIBOA-Glc wurden bei einem 9-minütigen Gradienten von 10 % bis 50 % Acetonitril und bis 100 % in 1 min in 0,3 % Ameisensäure über eine LiChrospher® RP18e 5 µm Säule (250-4) aufgetrennt.

2.5.4 Bestimmung der enzymatischen Parameter der Indol-3-Glycerinphosphatlyase

Um die Enzymkinetiken der Indol-3-Glycerinphosphatlyasen zu bestimmen wurden sowohl die kinetischen Parameter der Reaktion von IGP zu Indol und GAP gemessen, als auch die der Rückreaktion, in der IGP aus GAP und Indol gebildet wird. Zunächst wurden Enzymkonzentration und Messdauer bestimmt, bei der der Umsatz von Substrat zu Produkt im linearen Bereich liegt. Es wurden pro Enzym mindestens drei unabhängige Messreihen durchgeführt. Durch Zugabe des Substrates wurden die Reaktionen gestartet. Um IGP, GAP und Indol analytisch mittels HPLC zu trennen wurde ein 14-minütiger Gradient von 20 % bis 60 % MeOH in 0,3% Ameisensäure, anschließend in 1 min bis 100% über eine LiChrospher® RP18e 5 µm Säule (250-4) gefahren. Die enzymatischen Parameter, wie K_m , $K_{0,5}$ und V_{max} , wurden mittels GraphPad Prism® Version 4.03 berechnet.

2.5.4.1 Bildung von Indol und GAP aus IGP

Es wurden im 100 µl-Ansatz 0,5 µg Protein eingesetzt und 10 min bei RT in 50 mM Tris pH 8,0, 0,2 mM DTT und IGP inkubiert. Bei *CoBX1* und *ZmBX1* wurden je 0,1 µg Protein für 2 min inkubiert. Die IGP-Konzentrationen wurden von 10 µM bis 900 µM variiert. Bei den Enzymtests zusammen mit *AfTSB1* wurden zusätzlich 1 µg *AfTSB1* und 6 mM Pyridoxalphosphat zum Reaktionsansatz hinzugefügt und vor dem Start der Reaktion 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde mit 1 Vol. MeOH abgestoppt und der Überstand nach Zentrifugation mittels HPLC analysiert. Die entstandenen Mengen an Indol bzw. GAP wurden anhand einer Eichkurve quantifiziert.

2.5.4.2 Bildung von IGP aus Indol und GAP

Es wurden im 100 µl-Ansatz 0,5 µg Protein eingesetzt und 10 min bei RT in 50 mM Tris pH 8,0, 0,2 mM DTT, 5 mM Indol und 2 mM GAP inkubiert. Bei *CoBX1* und *ZmBX1* wurden je 0,1 µg Protein für 2 min inkubiert. Zur Bestimmung der Parameter in Abhängigkeit von Indol wurde dessen Konzentrationen von 45 µM bis 6,0 mM variiert, für GAP wurden Konzentrationen von 10 µM bis 1,0 mM eingesetzt. Anschließend wurde mit 1 Vol. MeOH abgestoppt und der Überstand nach Zentrifugation mittels HPLC analysiert. Die entstandenen Mengen an IGP wurden anhand einer Eichkurve quantifiziert.

2.6 Naturstoff-Analysen

2.6.1 Gewinnung von Indol-3-Glycerinphosphat

Durch die Rückreaktion der Tryptophansynthase α wird Indol und GAP zu IGP umgesetzt. Im 50 ml Ansatz wurden 10 µg *CoBX1* mit 0,5 mM GAP, 1 mM Indol, 50 mM Tris pH 8,0, 1 mM EDTA pH 8,0 über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Das Vorhandensein von IGP wurde mittels Eisenchlorid-Reagenz (1 ml 0,5 M FeCl_3 , 50 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$, 30 ml konz. H_2SO_4 (Smith und Yanofsky, 1963)) getestet. Der Enzymansatz wurde am Rotivapor aufkonzentriert und durch Zugabe von einem Volumen MeOH wurde das Protein ausgefällt. Der Überstand wurde präparativ über eine Aluspher® RT100 5µm Säule (250-10, präparativ, Merck KGaA) an der HPLC mit einem Gradienten von 10% MeOH bis 100% MeOH in 0,125 % Ammoniak in 15 min aufgereinigt, die gesammelten Fraktionen vollständig einrotiert und in etwa 2 ml 5 mM Tris pH 8,0 gelöst. Die IGP-Konzentration wurde am Photometer bestimmt ($\epsilon_{280}=5,46 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

2.6.2 Eisenchlorid-Färbetest

Aphelandra-Wurzeln, *Consolida*-Keimlinge und *Lamium*-Triebe wurden auf das Vorhandensein von DI(M)BOA getestet, indem das entsprechende Pflanzenmaterial verletzt und die saure FeCl_3 -Färbelösung auf die Verletzung geträufelt wurde. DIBOA und DIMBOA bilden mit Eisen(III)-chlorid einen sichtbaren blauen Komplex (Iwamura, *et al.*, 1996).

2.6.3 Aufreinigung von Pflanzeninhaltsstoffen

2.6.3.1 Isolierung von DI(M)BOA-Glc aus *A. squarrosa*

100 mg Wurzeln wurden in Stickstoff gemörsert und dreimal 30 min und einmal 2 h mit MeOH ausgeschüttelt (Baumeler, *et al.*, 2000). Der Extrakt wurde eingedampft, der Rückstand in MeOH:H₂O 2:1 (v:v) gelöst und mit 1 Volumen Chloroform ausgeschüttelt. Der Überstand wurde entweder mit Dünnschichtchromatographie oder mittels HPLC, wie unter 2.5.3 beschrieben, analysiert.

2.6.3.2 Isolierung von EtOAc-löslichen Naturstoffen aus *C. orientalis*, *L. galeobdolon* und *Z. mays* (Bailey und Larson, 1991)

Das gemörserte Pflanzenmaterial (100 mg bis 250 mg) wurde eine Stunde bei Raumtemperatur in 800 µl Wasser inkubiert, um das Glucosid abzuspalten. Nach Ansäuern mit HCl auf pH 3 wurde 5 min bei 65 °C inkubiert und abzentrifugiert, der Überstand wurde dreimal mit EtOAc ausgeschüttelt, eingedampft und in MeOH gelöst. Die Analyse erfolgte über Dünnschichtchromatographie oder HPLC, wie unter 2.5.3 beschrieben.

2.6.3.3 Isolierung von freiem Tryptophan und Trp-Hydrolyse

In flüssigem Stickstoff gemörsertes Pflanzenmaterial wurde dreimal mit 70 % Aceton extrahiert, um freies Tryptophan zu isolieren. Der Extrakt wurde eingedampft und der Rückstand in MeOH aufgenommen und auf eine Dünnschichtplatte aufgetragen.

Um proteingebundenes Tryptophan zu untersuchen, wurde das Pflanzenmaterial über Nacht mit 200 µl 2 M Ba(OH)₂ bei 90 °C inkubiert, danach mit Trockeneis neutralisiert. Das hydrolysierte Tryptophan wurde präparativ mittels HPLC über eine LiChrospher® RP18e 5 µm Säule (250-4) mit einem Gradienten, wie unter 2.5.4 beschrieben, aufgereinigt, eingedampft, in MeOH aufgenommen und auf eine Dünnschichtplatte aufgetragen.

2.6.3.4 Isolierung von Indol

Um Indol in verschiedenen Pflanzenorganen zu detektieren, wurde das Pflanzenmaterial in destilliertem Äther gemörsert, auf etwa 30 µl einreduziert und direkt mittels GC-MS analysiert.

Um flüchtiges Indol zu detektieren wurde Festphasenmikroextraktion (SPME) angewendet. Dazu wurden die zu untersuchenden Pflanzengewebe in luftdichten Gefäßen ca. 30 min einer Polydimethylsiloxan/Divinylbenzen-Faser (Supelco/Sigma Aldrich) exponiert. Die Analyse erfolgte über GC-MS.

2.6.4 in vivo Fütterungsversuche

2.6.4.1 Fütterung mit ¹⁴C-Indol und ¹⁴C-Tryptophan

A. squarrosa-Wurzeln und verschiedene Pflanzenteile von *C. orientalis* und *L. galeobdolon* wurden bei Raumtemperatur in 400 µl MES-Puffer (50 mM, pH 7,0) mit 25 nCi ¹⁴C-Indol (oder ¹⁴C-Tryptophan) inkubiert. Zur Analyse wurden, wie unter 2.6.3 beschrieben die Metabolite aufgereinigt und mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt. Die Auswertung erfolgte am STORM® 860 Phosphoimager (Amersham Pharmacia Biotech). Mit Hilfe des Programms ImageQuant (Molecular Dynamics) wurde der Einbau der radioaktiven

Markierung in Benzoxazinone bzw. Tryptophan anhand von Eichpunkten quantifiziert. Jeder Fütterungsansatz wurde mindestens zweimal durchgeführt.

2.6.4.2 Hemmversuche mit Prohexadion-Ca

Prohexadion ist ein effizienter Dioxygease-Inhibitor (Fischer, *et al.*, 2003; Rademacher, 2000; Roemmelt, *et al.*, 2003). Zur Durchführung der Hemmversuche wurden *C. orientalis*-Knospen für 0,5 h, 1 h, 5 h und 24 h und *L. galeobdolon*-Triebe für 0,5 h, 1 h und 5h in 400 µl bei RT in 50 mM MES pH 5,7 mit 25 nCi Indol mit und ohne 0,1 % Prohexadion inkubiert. Die Benzoxazinone wurden, wie unter 2.6.3.2 beschrieben, aufgereinigt und mittels DC und HPLC analysiert. Quantifiziert wurden das radioaktiv markierte Produkt DIBOA, wie unter 2.6.4 beschrieben, und der gesamte Benzoxazinongehalt, wie unter 2.5.3 beschrieben.

2.6.4.3 Hemmversuche mit 1-Aminobenzotriazol

ABT inhibiert Cytochrom P450 Monooxygenasen sehr effizient (Chiappella, *et al.*, 2000). Für die Hemmversuche wurden *C. orientalis*-Keimlinge und *L. galeobdolon*-Triebe für 0,5 h, 1 h, 5h und 24 h in 400 µl MES pH 5,7 mit 25 nCi Indol bei RT in Anwesenheit von 500 µM ABT und ohne ABT inkubiert. Die weitere Analyse erfolgte wie unter 2.6.4.2 beschrieben. Quantifiziert wurde das radioaktiv markierte Produkt DIBOA.

2.6.5 Analytik

2.6.5.1 HPLC

Für HPLC-Trennungen wurde das „System Gold“ der Beckman Coulter GmbH mit dem Autosampler 508, der Pumpeneinheit 126, dem Diodenarraydetektor 168 und der Software 32Karat 7.0 oder Dionex HPLC mit der Bedienungssoftware Chromeleon verwendet. Für die analytische Trennung nach dem „reversed phase“ Prinzip wurden eine LiChrospher® RP18e 5 µm Säule (250-4) oder eine Aluspher® RT100 5µm Säule (250-10, präparativ) der Merck KGaA für die präparative Trennung verwendet.

2.6.5.2 HPLC-MS

Die Analyse erfolgte an einer Agilent 100 Series HPLC mit einer Agilent 1100 quaternären Pumpe (Agilent Technologies, Waldbronn). Es wurde eine Luna C-18(2) (150x2mm; 5 µm) Trennsäule (Phenomenex) verwendet. Die Säulentemperatur betrug 25 °C. Es wurde ein 20-minütiger Gradient von 20 % Acetonitril mit 0,1 % Ameisensäure in Wasser mit 0,1% Ameisensäure bis 60 %, anschließend ein 10-minütiger Gradient bis 80% verwendet bei einer Flussrate von 0,2 ml min⁻¹. Es wurden 20 µl Probe injiziert. Die Detektion erfolgte bei 280 nm mittels Agilent UV Variable Wavelength Detector.

Die MS-Analyse wurde mittels Bruker Daltonics esquire 3000+ Ionenfalle durchgeführt. Die Kapillarspannung betrug 4 kV, der Zerstäubergasdruck 30 psi, der Trockengasfluss 9 l min^{-1} bei $330 \text{ }^\circ\text{C}$. Es wurde bei 120 bis 150 m/z gescannt.

2.6.5.3 GC-MS

Zur GC-MS-Analyse wurde der Gaschromatograph Trace GC2000, das Massenspektrometer TraceDSQ und der Autosampler AI/AS 3000 von Thermo Electron Corporation mit der Bedienungssoftware XcaliburTM 1.4 verwendet. Die Temperatur der Ionenquelle betrug $200 \text{ }^\circ\text{C}$, als Trägergas diente Helium. Die Temperatur wurde nach 1 min isotherm bei $40 \text{ }^\circ\text{C}$ bei einem Gradienten von $15 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ auf $250 \text{ }^\circ\text{C}$ erhöht und für 10 min konstant gehalten. Die Auswertung erfolgte anhand der Software Qual Browser version 1.4.

2.6.5.4 Dünnschichtchromatographie

Für die Dünnschichtchromatographie wurden DC-Alufolien Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck KGaA) verwendet. Zur Auftrennung von DI(M)BOA und DI(M)BOA-Glucosid wurde als Laufmittel MeOH: Chloroform 3:2 (v:v) verwendet, um DIBOA, HBOA, Hydroxy-Indolinon, Indolinon und Indol aufzutrennen wurde MeOH:Chloroform 1:14 (v:v) verwendet. Für die DC von Tryptophan wurde BuOH:H₂O:HOAc 5:3:2 (v:v) verwendet.

3 ERGEBNISSE

3.1 Benzoxazinongehalte in *A. squarrosa*, *C. orientalis*, *L. galeobdolon* und *Z. mays*

Benzoxazinone sind in vielen Gräsern (Poaceae) zu finden (Barnes, *et al.*, 1987; Niemeyer, *et al.*, 1990; Wu, *et al.*, 2001; Zunniga und Massardo, 1991), aber auch einzelne Vertreter dikotyler Familien können sie synthetisieren. Die in dieser Arbeit untersuchten Arten sind *Aphelandra squarrosa* (Acanthaceae), *Consolida orientalis* (Ranunculaceae) und *Lamium galeobdolon* (Lamiaceae). Zunächst wurden die Benzoxazinongehalte dieser Pflanzen, aber auch die von Mais in verschiedenen Organen zu verschiedenen Entwicklungsstadien bestimmt. Dazu wurden sie wie unter 2.6.3 und 2.6.3.2 beschrieben aufgereinigt und die Extrakte mittels HPLC anhand von Eichkurven quantifiziert.

Da es bei *A. squarrosa* wegen ihrer Vielzahl an Sekundärmetaboliten sehr schwierig ist, Inhaltsstoffe aufzureinigen, konnte die Standardmethode Benzoxazinone als Aglucone in der EtOAc-Phase zu konzentrieren, nicht angewendet werden. Die Reinigung der glucosilierten Benzoxazinone erfolgte in diesem Fall durch MeOH-Extraktion. Es wurde sowohl DIBOA-Glc als auch DIMBOA-Glc in den Wurzeln der Stecklingskultur und der Wurzelkultur gefunden, wobei DIBOA-Glc den größeren Teil der Benzoxazinone einnimmt. In der Wurzelspitze, einem undifferenzierten Gewebe, findet man die höchsten Konzentrationen (Tabelle 9). Oberirdische Pflanzenorgane bilden keine Benzoxazinone.

Tabelle 9: Benzoxazinongehalt in *A. squarrosa* Wurzeln

<i>A. squarrosa</i> Wurzeln	DIBOA-Glc [nmol/g FG]	DIMBOA-Glc [nmol/g FG]
< 1cm	42	0,35
1-2 cm	33	0,19
2-5 cm	34	0,14
10 cm: Wurzelspitze	150	n.d.
10 cm: Seitenwurzel	58	n.d.
10 cm: Rest	59	0,03
10 cm (Gewebekultur)	64	0,14

Es wurde nachgewiesen, dass in *C. orientalis*, *L. galeobdolon* und *Z. mays* die Benzoxazinone als Glucoside vorliegen. Zur Quantifizierung der Benzoxazinone wurden die Aglucone nach Abspaltung der Glucoside herangezogen.

In allen oberirdischen Organen von *C. orientalis* wurde während der gesamten Entwicklung DIBOA, jedoch kein DIMBOA gefunden. In zwei Wochen alten Keimblättern wurden deutlich niedrigere DIBOA-Gehalte gemessen, als in oberirdischen Teilen acht Wochen alter Pflanzen. In den Wurzeln wurden keine Benzoxazinone gefunden (Tabelle 10).

Tabelle 10: Benzoxazinongehalt in *C. orientalis*.

Organ (Alter nach Keimung)	DIBOA [$\mu\text{mol/g FG}$]
Keimblatt (2 Wochen)	0,2
Wurzel (2 Wochen)	n. d.*
Junges Blatt (8 Wochen)	24
Altes Blatt (8 Wochen)	17
Knospe (8 Wochen)	34
Blüte (8 Wochen)	36

*n. d. nicht detektierbar

L. galeobdolon bildet wie *C. orientalis* ausschließlich DIBOA. In jungen Organen wurde ein höherer Benzoxazinongehalt gemessen als in älteren Organen. Auch Wurzeln bilden DIBOA, wenn auch in deutlich geringeren Konzentrationen (Tabelle 11).

Tabelle 11: Benzoxazinongehalt in *Lamium galeobdolon*.

Organ	DIBOA [$\mu\text{mol/g FG}$]
Knospe	7,7
Blüte	5
Junges Blatt	19
Altes Blatt	17
Wurzel	1,1

Bei Mais wurden verschiedene Pflanzenorgane in verschiedenen Entwicklungsstadien untersucht. Man findet im jungen Keimling sowohl in oberirdischen Pflanzenorganen als auch in der Wurzel hohe DIMBOA-Gehalte, auch in den Kronwurzeln älterer Pflanzen kann DIMBOA detektiert werden (Tabelle 12).

Tabelle 12: Benzoxazinongehalt in *Z. mays*.

Maislinie - Organ (Alter nach Keimung)	DIMBOA ($\mu\text{mol/g FG}$)
B73 - Spross (3 Tage)	19
B73 - Wurzel (3 Tage)	20
B73 - Skutellum (3 Tage)	5,7
B73 - Spross (4 Tage)	15
B73 - Wurzel (4 Tage)	13
Hill – Blatt (10 Wochen)	n. d.*
Hill – Kronwurzel (10 Wochen)	2,8

*n. d. nicht detektierbar

Die Verteilung und Art der Benzoxazinone ist von Pflanze zu Pflanze unterschiedlich. In Mais wurde ausschließlich in sehr jungen Pflanzen, aber auch in den jungen Kronwurzeln alter Pflanzen DIMBOA nachgewiesen, also sowohl in ober- als auch unterirdischen jungen Geweben. In *A. squarrosa* wurde DIBOA und DIMBOA gefunden, jedoch nur in den Wurzeln. Bei *C. orientalis* hingegen ist nur DIBOA nachweisbar, ausschließlich in oberirdischen

Pflanzenteilen. Wie bei Mais ist bei *L. galeobdolon* in der gesamten Pflanze DIBOA zu finden, im Gegensatz zu Mais aber auch in adulten ausdifferenzierten Pflanzenteilen.

3.2 Indol ist auch die Ausgangssubstanz der Benzoxazinonbiosynthese bei dikotylen Pflanzen

Für die Synthese der Benzoxazinone können mehrere Substanzen als Grundgerüst, das modifiziert wird, angenommen werden. Bei Mais ist eindeutig Indol als diese Ausgangssubstanz nachgewiesen worden (Desai, *et al.*, 1996; Frey, *et al.*, 1997; Melanson, *et al.*, 1997). Die Synthese kann aber auch über Tryptophan stattfinden. Eine weitere Möglichkeit wäre auch eine direkte Modifikation von Anthranilat ohne Indol als Zwischenstufe.

A. squarrosa-Wurzeln, *C. orientalis*-Keimlinge und *L. galeobdolon*-Triebe wurden mit ^{14}C -Indol und ^{14}C -Tryptophan gefüttert. Parallel wurden sowohl Benzoxazinone, als auch proteingebundenes und freies Tryptophan, wie unter 2.6.3.2 und 2.6.3.3 beschrieben, aufgereinigt und analysiert. Für alle Pflanzen wurde bei der Fütterung mit ^{14}C -Indol radioaktiv markierte Benzoxazinone und radioaktiv markiertes Tryptophan detektiert (Abbildung 4-6).

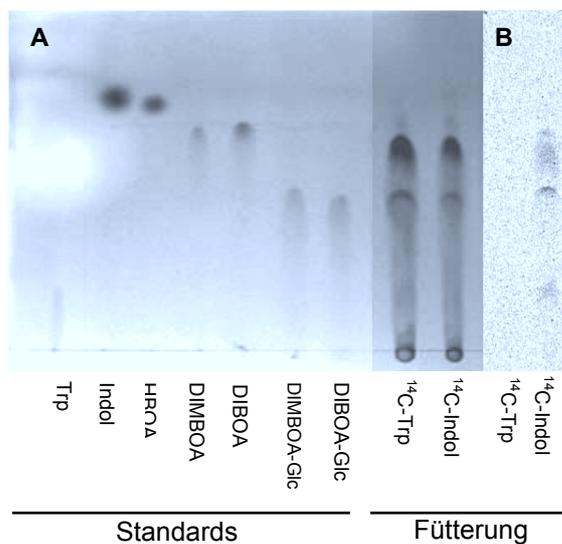


Abbildung 4:
Extrakten aus *A. squarrosa* Wurzeln, gefüttert mit ^{14}C -Indol und ^{14}C -Tryptophan.
A: Standards unter UV-Licht, B: Nachweis der radioaktiv markierten Substanzen am Phosphoscreen.

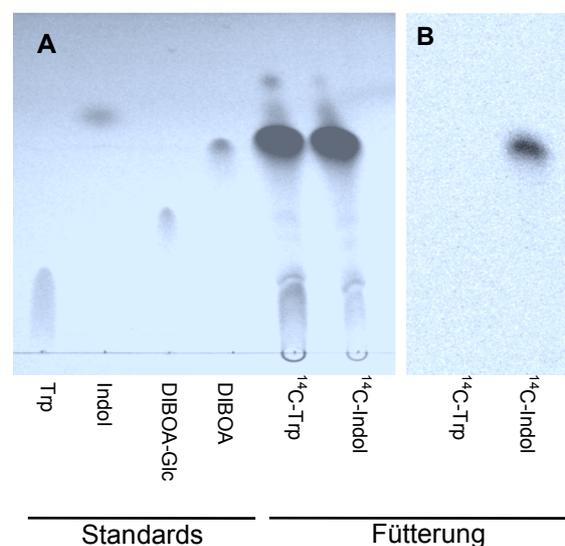
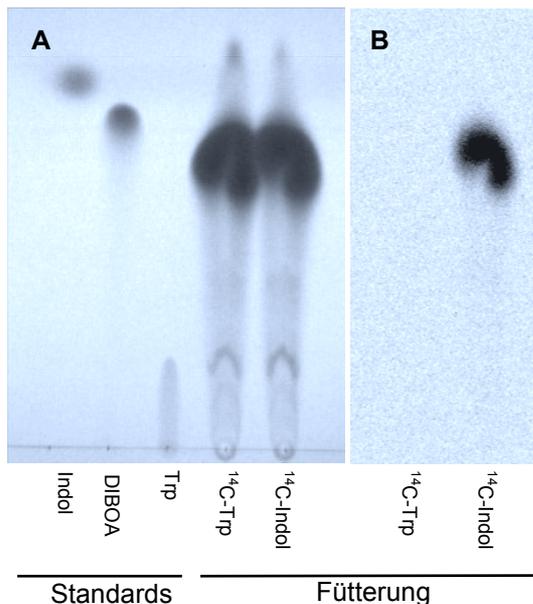


Abbildung 5:
Dünnschichtchromatographie von EtOAc-Extrakten aus *C. orientalis* Keimlingen, gefüttert mit ^{14}C -Indol und ^{14}C -Tryptophan.
A: Extrakte und Standards unter UV-Licht, B: Nachweis der radioaktiv markierten Substanzen am Phosphoscreen.

**Abbildung 6:**

Dünnschichtchromatographie von EtOAc-Extrakten aus jungen Trieben von *L. galeobdolon*, gefüttert mit ^{14}C -Indol und ^{14}C -Tryptophan. A: Extrakte und Standards unter UV-Licht, B: Nachweis radioaktiv markierter Substanzen am Phosphoscreen.

Bei der Fütterung mit ^{14}C -Tryptophan wurde hingegen nur radioaktiv markiertes Tryptophan detektiert, aber keine radioaktiv markierten Benzoxazinone. Die Quantifizierung der radioaktiven Signale ergab für *A. squarrosa*, *C. orientalis* und *L. galeobdolon*, dass der Einbau von ^{14}C -Tryptophan in Protein etwa 20 % bis 50 % geringer ist, als der Einbau von ^{14}C -Indol über Tryptophanbiosynthese in Protein (ohne Abbildung). Es wurde somit nachgewiesen, dass Indol und Tryptophan von den Pflanzen aufgenommen und metabolisiert werden. Auch bei offensichtlich geringerer Aufnahmeeffizienz von Tryptophan wäre Benzoxazinonbiosynthese über Tryptophan in diesem Ansatz nachweisbar. Da diese nicht erfolgt, ist Indol das Intermediat der DIBOA-Biosynthese.

Neben Tryptophan kann auch Anthranilat als unmittelbare Vorstufe der Benzoxazinone ausgeschlossen werden, da im Falle einer Rückreaktion von ^{14}C -Indol zu Anthranilat die radioaktive Markierung an C2 verloren gehen würde und somit das Produkt keine radioaktive Markierung mehr tragen würde.

Dieses entscheidende Ergebnis zeigte, dass Indol die Vorstufe der Benzoxazinone ist. Durch Fütterung mit ^{14}C -Indol an verschiedenen Pflanzenteilen von *C. orientalis* und *L. galeobdolon* wurden die Mengen an neu synthetisiertem Indol bestimmt und so der Ort der höchsten Benzoxazinon-Neusynthese identifiziert. Dazu wurden die Pflanzenteile abgeschnitten und in MES-Puffer mit ^{14}C -Indol 24 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Benzoxazinone wurden, wie unter 2.6.3.1 und 2.6.3.2 beschrieben, isoliert und der Gesamtgehalt mittels HPLC, die Neusynthese über Quantifizierung der radioaktiv markierten Signale (2.6.4.1) bestimmt. Bei *C. orientalis* findet eine ähnlich hohe Neusynthese im zwei Wochen alten Spross und bei acht Wochen alten Pflanzen in Knospen und alten Blättern statt. Signifikant niedriger ist die Neusynthese in jungen Blättern und Blüten der acht Wochen alten Pflanzen (Abbildung 7 A).

Der Anteil des ^{14}C -markierten DIBOA am gesamten DIBOA-Gehalt nach 24 h Inkubation beträgt im zwei Wochen alten Spross etwa 5 %. Er sinkt bei acht Wochen alten Pflanzen in allen Pflanzenteilen auf Werte zwischen 0,01 % und 0,05 %.

Bei *L. galeobdolon* ist die Neusynthese im Vergleich zu *C. orientalis* deutlich niedriger. Alle oberirdischen Gewebe zeigen ähnliche Neusyntheseraten. In der Wurzel macht sie im Vergleich zu den anderen Pflanzenteilen nur etwa 10 % aus (Abbildung 7 B). Der Anteil an ^{14}C -markierten Benzoxazinonen nach 24 h Inkubation am Gesamtgehalt liegt zwischen 0,01 % und 0,03 %.

Der absolute Benzoxazinongehalt ging während der Versuchsdauer von 24 h um etwa 25 % zurück. Untersucht wurden isolierte Pflanzenteile. In diesen finden u. a. Wundreaktionen und Seneszenz statt. Deren Einfluss auf die Benzoxazinonbiosynthese kann nicht abgeschätzt und eingerechnet werden und könnte sich für Blüte bzw. Knospe einerseits und Spross andererseits unterscheiden. Sicher ist jedoch, dass auch alte Teile maturer Pflanzen zur Neusynthese befähigt sind.

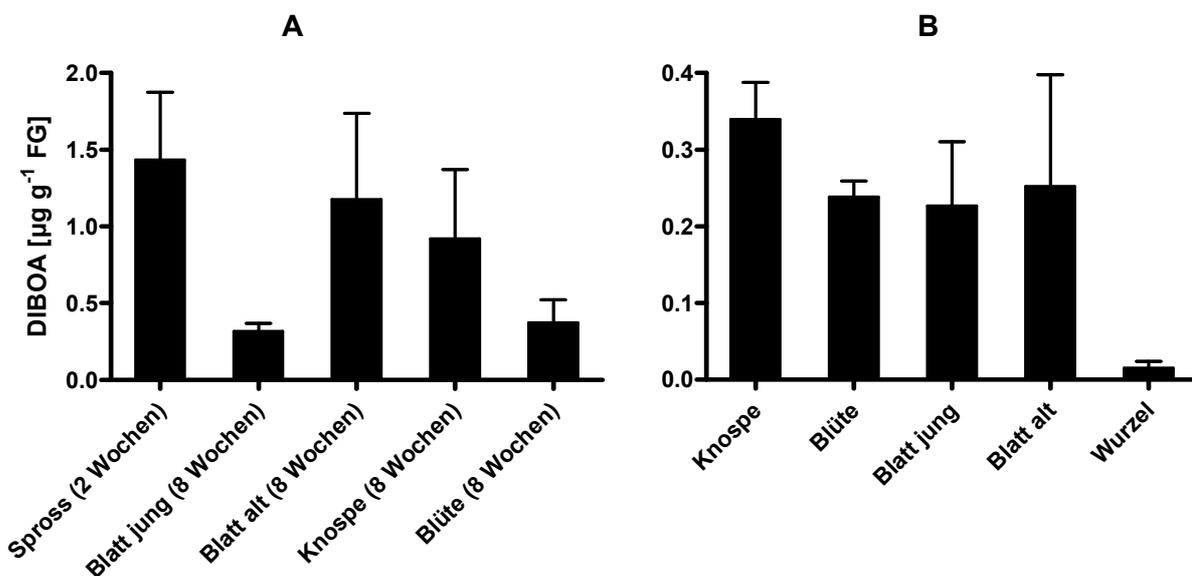


Abbildung 7: DIBOA-Neusynthese in verschiedenen Pflanzenorganen nach 24 h Inkubation in Puffer mit ^{14}C -Indol. A: *C. orientalis*. B: *L. galeobdolon*.

3.3 Igl-Kandidaten aus *A. squarrosa*, *C. orientalis* und *L. galeobdolon*

Ein Alignment der annotierten pflanzlichen Proteinsequenzen von *A. thaliana* TSA1, *A. thaliana* TSA2, *Zea mays* BX1, *ZmIGL*, *ZmTSAlike* und *Hordeum lechleri* BX1 und der Sequenz des Cyanobakteriums *Synechocystis* sp. TSA ergab zwei hoch konservierte Bereiche (Abbildung 8), die die Grundlage für degenerierte Primer (vgl. 2.1.4) bildeten, um

Igl-Gene aus *A. squarrosa*, *C. orientalis* und *L. galeobdolon* zu isolieren. Die PCR-Produkte wurden als Sonden verwendet, um Indol-3-Glycerinphosphatlyasen aus cDNA-Phagenbanken von *A. squarrosa* (Wurzel, 3 Wochen), *C. orientalis* (Keimlinge, 2 Wochen) und *L. galeobdolon* (junge Triebe) zu isolieren.

		61		120
<i>At</i> SA1	(21)	FRHSSPPDSSLSFKRFTP	MASLSTSSPTLGLADTFTQLKKQKQVAFIPYITAGDPDLSTT	
<i>At</i> TSA2	(1)	-----	MDLLKTPSSTVGLSETFARLKSQKQVALIPYITAGDPDLSTT	
<i>Zm</i> TSAlike	(1)	-----	MANGGAAAGKLTVAETFSNLREQKSAFIPFITAGDPDLVTT	
<i>Zm</i> BX11	(60)	TVPAAPPQAPAPAPVPPKQAAAPAEERRSRPVSDTMAALMAKGGTAFIPYITAGDPDLATT		
<i>Zm</i> IGL	(52)	VAPAAP-----	AAPAKLTAGAGGRCLPVSQTM SRLRAQKGTAFIPYITAGDPDLATT	
<i>Ssp</i> TSA	(1)	-----	MNAVAACFNALRQRGECALIPFITAGDPDLATT	
Consensus	(61)	AAP	MA A A S TLGVADTFA LRAQKGTAFIPYITAGDPDLATT	
		121		180
<i>At</i> SA1	(81)	AEALKVLDACGSDIIELGVPYSDPLADGPIQAAATRSLE	RGNTNLDSDIEMLDKVVQPQIS	
<i>At</i> TSA2	(43)	AKALKVLDSCGSDIIELGVPYSDPLADGPAIQAAARRS	LLKGTNFNDSIISMLKEVIPQLS	
<i>Zm</i> TSAlike	(43)	SKALKILNSCGSDVIEVGVYSDPLADGPIQASATRAL	KKGTTLDSDIEMLDKVVTPELS	
<i>Zm</i> BX11	(120)	AEALRLLDGCGADVIELGVPYSDPYIDGPIIQASVAR	ALASGTTMDAVLEMLREVTPELS	
<i>Zm</i> IGL	(104)	AEALRLLDACGADVIELGVPYSDPYADGPIQASAA	RALASGTTPDGVLAMLKEVTPELS	
<i>Ssp</i> TSA	(34)	AEALRILDRAGADLIELGVPYSDPLADGPIQAAAT	RALQKGVKLDVLAIVREVHQDIA	
Consensus	(121)	AEALKILDACGADVIELGVPYSDPLADGPIQAAAT	RAL KGTTLDSDIEMLDKVVTPELS	
		181		240
<i>At</i> SA1	(141)	CPISLFTYYNPILKRG LGKFMSSIRAVGVQGLVVPD	VPL--EETEMLRKEALNNDIIELVL	
<i>At</i> TSA2	(103)	CPIALFTYYNPILR	RGVENYMTVIKNAGVHGLLVPDVPL--EETETLRNEARKHQIIELVL	
<i>Zm</i> TSAlike	(103)	CPIVLFTYYNPILK	RGVGNFMSTIKQAGIHGLVVPDLPL--EETTLRSEAIMHNIIELVL	
<i>Zm</i> BX11	(180)	CPVLLSYKPI	MSR----SLAEMKEAGVHGLIVPDLPY--VAHSLWSEAKNNNIELVL	
<i>Zm</i> IGL	(164)	CPVVLF	SYFNPIVRWGLADFAAAVKEAGVHGLIVPDLPYGNSCALTRTEAIKNSLELVL	
<i>Ssp</i> TSA	(94)	APIILFTYYNP	IFYQGVFVLDKIKAGVKGLVVPDLPL--EESDRLEATAERGLELIL	
Consensus	(181)	CPIVLFTYYNPILK	RGVGFMA IK AGVHGLVVPDLPL EETETLRSEAI NNIIELVL	
		241		300
<i>At</i> SA1	(199)	LTPPTPTERMKLI	VDASEGFIYLVSSIGVTGARSSVSGKVQSLKDIKEATDKPVAVGF	
<i>At</i> TSA2	(161)	LTPPTPKERMNAI	VEASEGFIYLVSSVGVGTGTRSVNEKVQSLQIQEATSKPVAVGF	
<i>Zm</i> TSAlike	(161)	LTPPTPTDRMK	GIAQASEGFLYLVSAVGVGTGARSNVNLRVEHLLREIKKVTDKPVAVGF	
<i>Zm</i> BX11	(234)	LTPPAIPEDRMKE	ITKASEGFVYLVSVNGVTGPRANVNPRVESLIQEVKKVTNKPVAVGF	
<i>Zm</i> IGL	(224)	LTPSTPADRMEEI	TRASRGFVYLATVNGVTGPRANVNTRVQSLIQEVKQVTDIPVAVGF	
<i>Ssp</i> TSA	(152)	LVAPTS	SPERQTAIAKKSQGFVYLVSVTGVTVRTEVGSRVEALLAGMRQVTDKPIGVGF	
Consensus	(241)	LTPPTP	DRMKAI KASEGFVYLVSVVGVGTG RANVN RVQSLQEI K VTDKPVAVGF	
		301		356
<i>At</i> SA1	(259)	GISKPEHVKQIAG	WGADGVIIGSAMVKLLGDAKSPTEGLKELEKLTKSLKSALL--	
<i>At</i> TSA2	(221)	GISKPEHVKQVAE	WGADGVIIGSAMVKILGESESPEQGLKELEFFTKS-----	
<i>Zm</i> TSAlike	(221)	GVSTPEHVKQIV	WGADGVIIGSAIVKQLCEAATPEGLERLEEYARSMKAAMP--	
<i>Zm</i> BX11	(294)	GISKPEHVKQIAE	WGADGVIIGSAMVRQLGEEAASPQGLRRLLEEYARGMKNALP--	
<i>Zm</i> IGL	(284)	GISKPEHVKQIAE	WGADGVIIGSAMVRQLGEEAASPKEGLKRLEKYARSMKNALPCQ	
<i>Ssp</i> TSA	(212)	GISQPEQAEQVKA	WGADAVIIGSAMVKRLAEG-TPEGLQALETFCRELKTAIS--	
Consensus	(301)	GISKPEHVKQIAG	WGADGVIIGSAMVKQLGEEAASP EGLKRLE YARSMK ALP--	

Abbildung 8: Alignment der annotierten Proteinsequenzen von *Af*TSA1, *Af*TSA2, *Zm*BX1, *Zm*IGL, *Zm*TSAlike, *H*/BX1 und *Ssp*TSA. Hochkonservierte Bereiche für das Design degenerierter Primer sind **fett** hervorgehoben.

Aus der *A. squarrosa* cDNA-Bank wurden zwei Klone isoliert, *Aslgl-1* und *Aslgl-2* (Anhang). Sequenzvergleiche zeigten 99,3 % Identität. *Aslgl-1* und *Aslgl-2* sind Proteine von je 321 Aminosäuren Länge, die sich in vier AS unterscheiden. Das führt zu einer Ähnlichkeit und einer Identität von 98,8 % auf. Diese Werte lassen darauf schließen, dass es sich um zwei Allele eines Gens handelt.

Bei *C. orientalis* wurden 3 Klone aus der cDNA-Bank isoliert (*Colgl-1*, *Colgl-2* und *CoBx1*, Anhang). *Colgl-1* und *Colgl-2* sind zu 99,2 % identisch und zeigen zu *CoBx1* 60,9 % bzw.

61,8 % Übereinstimmung. Bei *Colgl-1* und *Colgl-2* handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um zwei Allele eines Gens, *CoBx1* ist ein weiteres Gen. Die Proteinsequenzen von *ColGL-1* und *ColGL-2* sind zu 99,1 % ähnlich und zu 99,1 % identisch, sie zeigen zu *CoBX1* 69,7 % bzw. 69,7 % Ähnlichkeit und 59,9 % bzw. 59,6 % Übereinstimmung.

Aus der *Lamium* cDNA-Bank wurden zwei Klone isoliert, *Lglgl1* und *Lglgl2* (Anhang). *LglGL1* und *LglGL2* zeigen zueinander 80,0 % Ähnlichkeit und 72,5 % Übereinstimmung, wobei die größten Unterschiede im vorhergesagten Transitpeptid zu finden sind. Beim Vergleich beider Proteine ohne die Transitpeptidsequenz ergeben sich eine Ähnlichkeit von 87,2 % und eine Identität von 79,9 %.

Tabelle 13: Analyse der Ähnlichkeiten (Abschnitt rechts oben) und Identitäten (Abschnitt links unten) der IGL-Proteine zueinander.

	AsIGL-1	AsIGL-2	CoBX1	ColGL-1	ColGL-2	LglGL1	LglGL2
AsIGL-1	-	98,8	70,0	77,4	77,4	79,3	79,8
AsIGL-2	98,8	-	70,0	77,4	77,1	79,3	80,7
CoBX1	57,3	57,3	-	69,7	69,7	70,1	70,0
ColGL-1	64,2	64,2	59,9	-	99,1	80,3	80,0
ColGL-2	63,9	64,2	59,6	99,1	-	80,6	79,4
LglGL1	66,6	66,6	59,5	69,4	69,7	-	80,0
LglGL2	70,4	69,8	61,5	68,1	67,8	72,5	-

Beim Vergleich der Ähnlichkeiten der Proteinsequenzen zueinander, fällt auf, dass *CoBX1* zu allen anderen IGL-Proteinen Ähnlichkeiten von etwa 70 % aufweist. Die anderen Proteine hingegen sind sich zu etwa 80 % ähnlich. Vergleicht man die Sequenzen bezüglich ihrer Identität, so ergibt sich ein entsprechendes Muster. Die IGLs sind mit *CoBX1* zu etwa 60 % identisch und zueinander zwischen 63,9 % und 72,5 %. *CoBX1* scheint also ein Sonderfall der dikotylen IGL-Proteine zu sein. Vergleicht man die Proteinsequenz von *CoBX1* mit den IGLs aus Mais (*ZmBx1*, *ZmIGL*, *ZmTSA*, *ZmTSAlike*) so sind sowohl die Ähnlichkeiten (57,4 %, 61,4 %, 66,4 %, 62,9 %) als auch die Identitäten (44 %, 48,7 %, 53,2 %, 51,4 %) niedriger als zu den dikotylen IGLs.

3.4 Genomische Southern-Hybridisierung

Um abzuschätzen, wie viele *Igl*-Gene in den drei Pflanzen vorhanden sind, wurden sie einer Southernanalyse unterzogen. Für die Interpretation ergeben sich Schwierigkeiten, da die Pflanzen nur teilweise charakterisiert sind.

Über den Ploidiegrad der drei Pflanzen sind folgende Daten bekannt. Bei den Acanthaceae, zu denen auch *A. squarrosa* gehört, sind wenige Spezies untersucht, diese sind alle diploid (Piovano und Bernardello, 1991). Zu *C. orientalis* gibt es genaue Untersuchungen, es handelt sich hierbei um eine diploide Pflanze mit $2n = 16$ (Simon, *et al.*, 1999). Für *Lamium* subg. *Galeobdolon*, dem auch *L. galeobdolon* zugeordnet wird, wurden ebenfalls genauere Untersuchungen durchgeführt. Hier konnten jedoch Ploidiegrade von diploid bis tetraploid gefunden werden (Rosenbaumová, *et al.*, 2004). Das Zählen der Chromosomen in Wurzelmeristemzellen der verwendeten Pflanzen ergab, dass es sich um einen diploiden Chromosomensatz handelt, wobei jedoch einige Zellen tetraploid sind.

A. squarrosa ist Fremdbefruchter, der Pollen wird durch Kolibris übertragen. Diese Pflanzen werden kommerziell über Stecklingskultur vermehrt. Dies führt oft dazu, dass eine Population auf eine Ausgangspflanze zurückgeht, einen Klon darstellt. Das Poolen mehrerer Pflanzen zur DNA-Isolierung sollte keine Auswirkung auf die Anzahl unterschiedlicher Allele haben. *C. orientalis* ist ein obligater Fremdbefruchter und scheint selbstinkompatibel zu sein, daher handelt es sich hier mit hoher Wahrscheinlichkeit um heterozygote Pflanzen. Zur Isolierung der DNA wurden in diesem Fall mehrere Pflanzen verwendet. Bei *L. galeobdolon*, die vegetativ vermehrt wurde, wurde nur eine Pflanze zur DNA-Isolierung verwendet. Es ist nicht klar, ob das Material homozygot oder heterozygot ist, da *L. galeobdolon* fakultativer Fremdbefruchter ist. Für keine der drei Pflanzen sind Daten über die Exon-Intronstruktur der hier untersuchten Gene bekannt und auch der Polymorphiegrad der Gene ist unbekannt.

Zur Southernanalyse wurde genomische DNA mit mehreren Restriktionsenzymen geschnitten. Die Hybridisierung wurde mit unterschiedlicher Stringenz durchgeführt. So konnte zunächst eine Bindung der Sonden an ähnliche Gene erlaubt werden, anschließend wurde die Stringenz erhöht und eine Bindung der Sonden war nur noch an strikt homologe Gene möglich. Zusätzlich wurden auch unterschiedliche Sonden zur Hybridisierung verwendet.

Für die Southern-Hybridisierung von *A. squarrosa* wurde genomische DNA mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III und *Pst*I verdaut. Es wurden drei verschiedene Sonden verwendet, die unterschiedliche Positionen der cDNA abdecken. Stringenteres Waschen der Membran bei niedrigerer Salzkonzentration und höherer Temperatur hatte keine Veränderung des Bandenmusters und der Intensität der Banden relativ zueinander zur Folge. Bei Restriktionsverdau mit *Bam*HI, *Hind*III und *Pst*I leuchten maximal zwei Signale auf. Das Muster im *Eco*RI-Verdau mit der zentralen Sonde (2) ergibt sich durch Überlagerung der Signale mit der 5'-Sonde (1) und der 3'-Sonde (3). Das Gesamtmuster lässt sich am einfachsten durch das Vorhandensein von zwei Genen mit hoher

Verwandtschaft oder durch ein Gen, das mit zwei Allelen vorliegt, erklären. Die Ergebnisse des Screenings der cDNA-Bank sprechen für letztere Möglichkeit.

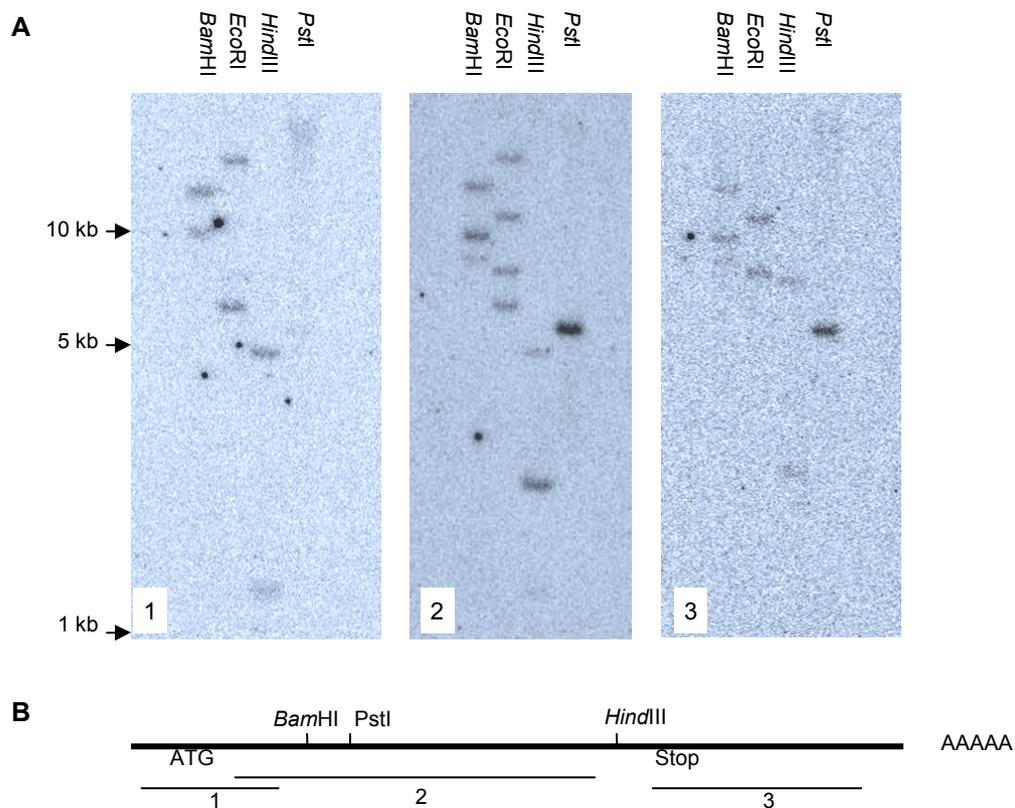


Abbildung 9: A: Genomischer Southern von *A. squarrosa*. Es wurde mit drei verschiedenen Sonden (1, 2, 3) hybridisiert. B: Die Skizze zeigt die Position der Sonden auf der *AslgI* cDNA.

Für die Analyse von *C. orientalis* wurde die DNA mit *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III und *Pst*I verdaut. Mit der cDNA von *CoBx1* ergeben sich bis zu sechs Hybridisierungssignale unter stringenten Bedingungen. Mit der *Colgl*-Sonde kommt beim *Hind*III- und *Eco*RI-Verdau je eine weitere Bande hinzu (ohne Abbildung). Es kann mit dieser Analyse nicht ausgeschlossen werden, dass zusätzlich zu den isolierten *Igl*-Genen weitere Gene vorhanden sind.

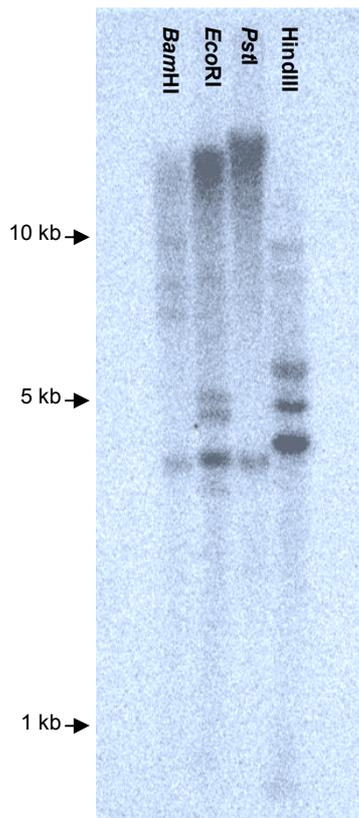


Abbildung 10: Southern-Hybridisierung genomischer DNA von *C. orientalis* verdaut mit *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III und *Pst*I.

Bei der Analyse von *L. galeobdolon* wurden als Restriktionsenzyme *Nco*I und *Pac*I eingesetzt. Als Sonden wurden Fragmente von *LgIgl1* (1) und *LgIgl2* (2) verwendet.

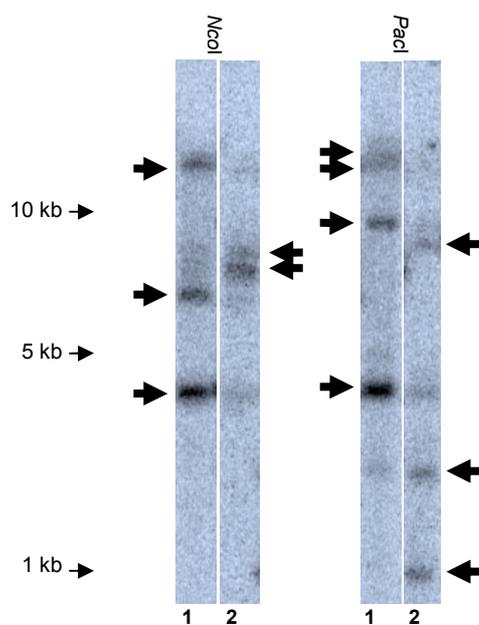


Abbildung 11:

Southern-Hybridisierung von genomischer DNA aus *L. galeobdolon*. Als Sonden wurden *LgIgl1* (1) und *LgIgl2* (2) verwendet.

Bei der Hybridisierung mit *LgIgl1* sind drei spezifische Banden im Verdau mit *Nco*I und vier Banden im Verdau mit *Pac*I zu erkennen. Bei Hybridisierung mit *LgIgl2* findet man zwei bzw.

drei spezifische Banden. Alle anderen Banden sind auf Kreuzhybridisierung mit dem jeweils anderen Gen zurückzuführen. Man erwartet also maximal vier Gene bzw. Allele für *LgIgl1* und drei Gene bzw. Allele für *LgIgl2*.

3.5 Enzymcharakteristika der IGL-Enzyme

Um die Eigenschaften der IGL-Enzyme zu bestimmen wurden den Enzymkinetiken zwei Gleichungen zugrunde gelegt, zum einen die Michaelis-Menten-Gleichung, zum anderen die Hill-Gleichung.

Bei der Michaelis-Menten-Kinetik wird die Anfangsgeschwindigkeit v_o , mit der das Substrat S zum Produkt P umgesetzt wird, in Abhängigkeit von der Substratkonzentration in folgender Gleichung dargestellt:

$$v_o = V_{\max} S (K_m + S)^{-1}$$

V_{\max} ist dabei die maximale Geschwindigkeit bei Sättigung des Enzyms. K_m ist der Michaelis-Menten-Koeffizient, die Substratkonzentration, bei der $v = \frac{1}{2} V_{\max}$ gilt (Michaelis und Menten, 1913).

Die Hill-Gleichung wurde entwickelt, um das Verhalten von Nicht-Michaelis-Menten-Enzymen zu beschreiben. Sie wird wie folgt dargestellt:

$$v = V_{\max} S^h (K_{0,5}^h + S^h)^{-1}$$

Anhand dieser Gleichung kann der Grad der Kooperativität bestimmt werden. Ist $h > 1$ spricht man von positiver Kooperativität, ist $h < 1$ spricht man von negativer Kooperativität (Hill, 1910). Die Michaelis-Menten-Gleichung ist mathematisch gesehen ein Sonderfall der Hill-Gleichung, hier ist $h = 1$. Daher kann der F-Test eingesetzt werden, um abzuschätzen, welche Gleichung die gemessenen Kinetiken besser erklärt. Aus Kurvenfits mit der jeweils wahrscheinlicheren Geschwindigkeitsgleichung wurden die Parameter für alle untersuchten IGL-Enzyme bestimmt.

Alle IGL-Kandidaten aus *A. squarrosa*, *C. orientalis* und *L. galeobdolon* ebenso wie TSA1 und TSA2 aus *A. thaliana* und BX1 aus *Z. mays* wurden heterolog in *E. coli* exprimiert und über einen aminoterminalen 6xHis-Tag aufgereinigt. Die enzymatischen Parameter wurden in mindestens drei unabhängigen Messungen bestimmt, wie unter 2.5.4 angegeben. Die Lagerung bei 4 °C für eine Woche und bei -70 °C für mehrere Monate hatte keinen Einfluss auf die Aktivität der Enzyme. ZmBX1, AfTSA1 und AfTSA2 wurden als Referenzproteine parallel analysiert. Für AfTSA1 wurde bereits gezeigt, dass sie Teil des Tryptophansynthase-

komplexes ist und *trp3-1*, die Knockout-Mutation, zu einem Tryptophanmangelphänotyp führt (Radwanski und Last, 1995).

3.5.1 Kinetische Daten für ZmBX1

ZmBX1 ist das „branch point“-Enzym in der Benzoxazinbiosynthese in Mais. Dieses Enzym zeigt eine sehr hohe Substrat-Affinität und einen schnellen Umsatz dieses Substrates (Frey, *et al.*, 1997). Die publizierten Daten wurden mit heterolog exprimiertem Protein mit 6xHis-Tag am Carboxyterminus erhoben. Als Referenz für die untersuchten Enzyme der dikotylen Pflanzen wurde das analog mit einer aminoterminalen 6xHis-Tag versehene ZmBX1 eingesetzt. Zur Bestimmung der Enzymkinetiken wurde der Umsatz des Substrates zum Produkt mittels HPLC quantifiziert.

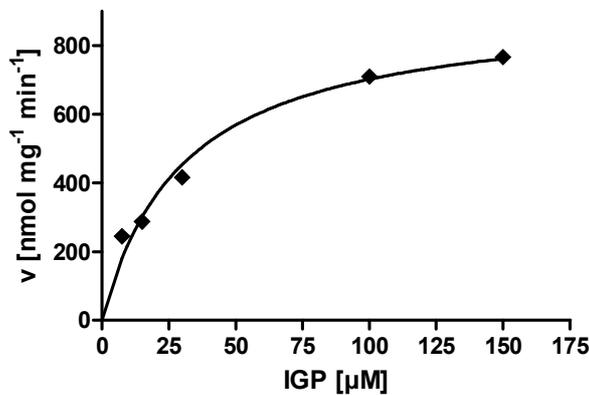


Abbildung 12:
Michaelis-Menten-Kinetik von heterolog exprimiertem ZmBX1.

ZmBX1 zeigt eine typische Michaelis-Menten-Kinetik (Abbildung 12). Die Kenndaten dieses Enzyms wurden bereits veröffentlicht. Der K_m^{IGP} beträgt 13 µM, k_{cat} liegt bei 2,8 s⁻¹. Für die Rückreaktion ist der K_m^{Indol} bei 500 µM und K_m^{GAP} bei 1000 µM, k_{cat} beträgt 0,5 s⁻¹ (Frey, *et al.*, 1997). Die gemessenen Parameter weichen mit einem K_m^{IGP} von 31 µM und einem k_{cat} von 0,51 s⁻¹ geringfügig ab. Die Gründe dafür können die unterschiedliche Position der 6xHis-Tag und die unterschiedliche Messung des Produktes sein. Die Quantifizierung erfolgte mittels HPLC, bei den veröffentlichten Daten wurde mittels Spektralfluorimeter quantifiziert.

3.5.2 Kinetische Daten für AtTSA1

Das *A. thaliana* TSA1 Monomer zeigt keine Michaelis-Menten-Kinetik. Die Geschwindigkeit des Umsatzes von IGP zu Indol in Abhängigkeit zur Substratkonzentration bildet einen sigmoiden Verlauf, der in einem Hill-Plot dargestellt wird (Abbildung 13).

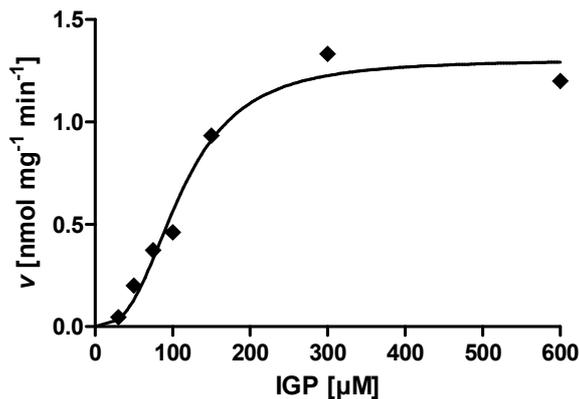


Abbildung 13: Hill-Plot der Enzymkinetik von heterolog exprimierter AtTSA1.

Für AtTSA1 wurde ein $K_{0,5}^{\text{IGP}}$ von 530 μM gemessen. V_{max} beträgt 2,6 $\text{nmol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$. Für der Rückreaktion ergab sich ein $K_{0,5}^{\text{Indol}}$ von 1071 μM und V_{max} beträgt für Indol als variiertes Substrat 31 $\text{nmol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$. Die Enzymkinetik mit GAP als variiertes Substrat für die Rückreaktion folgt der Michaelis-Menten-Kinetik mit K_m^{GAP} von 704 μM und $V_{\text{max}} = 44 \text{ nmol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$.

3.5.3 Kinetische Daten für AtTSA2

AtTSA2 hingegen zeigt Michaelis-Menten-Kinetik (Abbildung 14). K_m^{IGP} liegt bei 399 μM , V_{max} liegt bei 28,8 $\text{nmol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ und setzt damit das Substrat etwa zehnmal schneller um als AtTSA1. Auch die Rückreaktion läuft deutlich effizienter ab. K_m^{Indol} beträgt 390 μM und K_m^{GAP} beträgt 171 μM . $V_{\text{max}}^{\text{Indol}}$ liegt bei 105 $\text{nmol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ und $V_{\text{max}}^{\text{GAP}}$ bei 110 $\text{nmol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$.

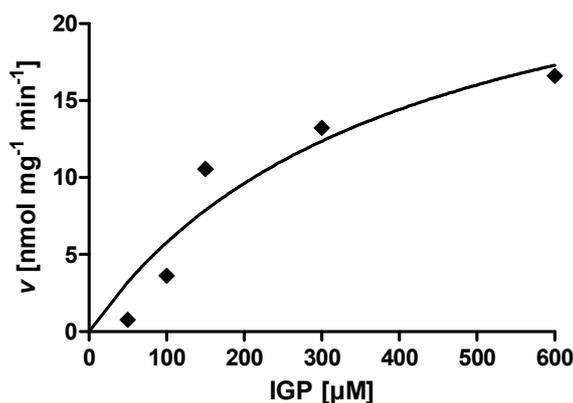


Abbildung 14: Michealis-Menten-Diagramm von AtTSA2.

3.5.4 Kinetische Daten für AsIGL-1 und AsIGL-2

Beide Klone der AsIGL zeigen keine Michealis-Menten-Kinetik, sondern eine sigmoide Kurve, die durch die Hill-Gleichung beschrieben wird, die im Vergleich zu AtTSA1 deutlicher ausgeprägt ist (Abbildung 14).

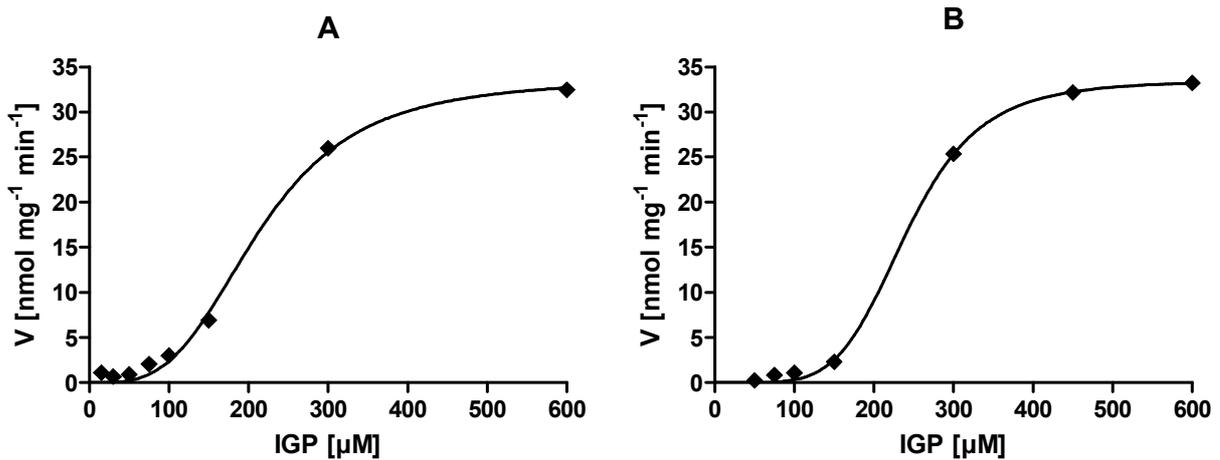


Abbildung 15: Hill-Plot der Enzymkinetiken der AsIGLs. A: Klon AsIGL-1. B: Klon AsIGL-2.

Die $K_{0,5}$ -Werte liegen bei 214 μM bis 241 μM , V_{max} beträgt etwa 34 $\text{nmol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$. Die Enzymkennwerten beider exprimierter Klone, die sich nur um zwei Aminosäuren an Position 52 und 293 unterscheiden, zeigen keine signifikanten Unterschiede. Die Rückreaktion folgt der Michaelis-Menten-Kinetik. Es wurden für Klon AsIGL-1 ein $K_{0,5}^{\text{Indol}}$ von 780 μM und $K_{0,5}^{\text{GAP}}$ von 932 μM gemessen. V_{max} beträgt 5038 $\text{nmol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ bzw. 3413 $\text{nmol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$. Für den Klon AsIGL-2 wurden ähnliche Werte gemessen.

3.5.5 Kinetische Daten für ColGL-1 und ColGL-2

Die Enzymkinetiken für ColGL-1 und ColGL-2 entsprechen der Michaelis-Menten-Kinetik (Abbildung 16).

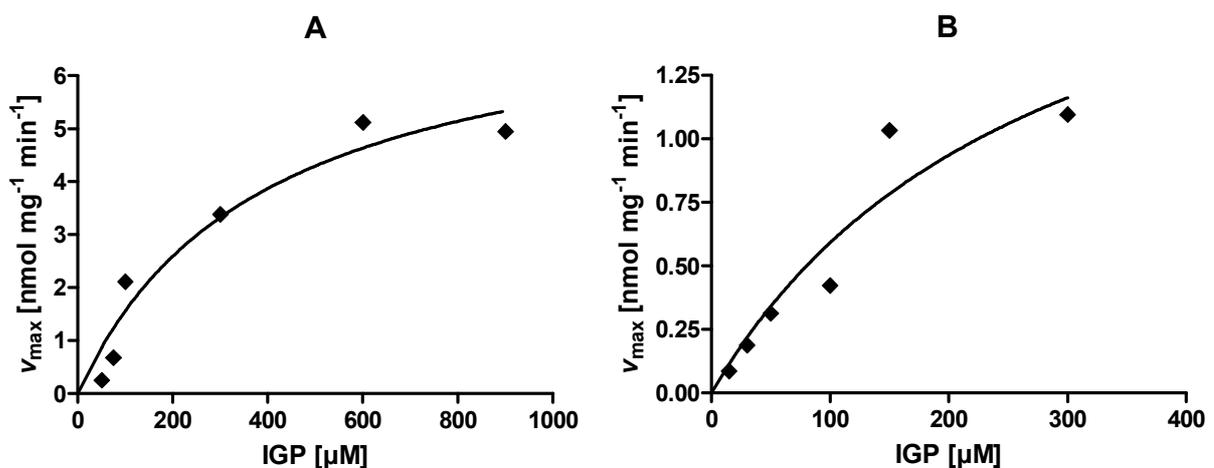


Abbildung 16: Michaelis-Menten-Kinetiken von heterolog exprimierten ColGL-1 (A) und ColGL-2 (B).

Für ColGL-1 beträgt K_m^{IGP} 390 μM und V_{max} liegt bei 13,9 $\text{nmol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$. Für ColGL-2 liegt der K_m^{IGP} bei 279 μM und V_{max} bei 2,2 $\text{nmol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$. Für die Rückreaktion ergab sich für

K_m^{Indol} ein Wert von 565 μM für CoIGL-1 und 446 μM für CoIGL-2, für K_m^{GAP} 40 μM bzw. 841 μM . V_{max} liegt bei 3,6 $\text{nmol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ bzw. 28,6 $\text{nmol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$. Beide Enzyme unterscheiden sich signifikant, obwohl es sich hier um Enzyme handelt, die sich nur um drei Aminosäuren unterscheiden und damit sehr wahrscheinlich zwei Allele eines Gens darstellen. Der Grund dafür können die, wenn auch nur geringen Aminosäureunterschiede an den Position 125, 256, 273 sein, die jedoch nicht in konservierten Bereichen und nicht im aktiven Zentrum oder in den Protein-Protein-Interaktionsdomänen liegen. Allerdings wurden für beide Enzyme eine sehr niedrige Aktivität gemessen, damit verbundenen ist ein hoher Messfehler.

3.5.6 Kinetische Daten für CoBX1

Aus *C. orientalis* wurde noch eine weitere IGL isoliert, CoBX1. Sie zeigt eine hohe Substrataffinität und setzt das Substrat sehr schnell zu Indol um (Abbildung 17).

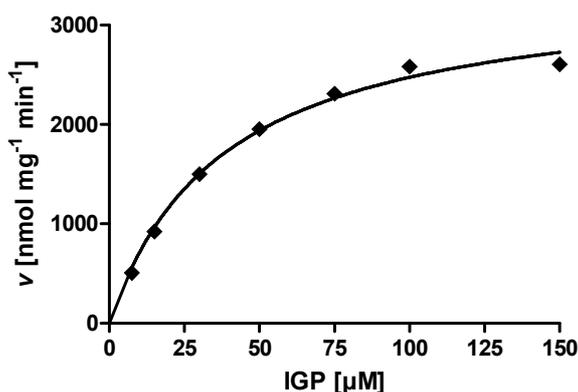


Abbildung 17: Michaelis-Menten-Kinetik von heterolog exprimiertem CoBX1.

Der K_m liegt bei 38 μM und $k_{\text{cat}}^{\text{IGP}}$ bei 1,9 s^{-1} . Damit zeigt dieses Enzym Eigenschaften, wie sie bei ZmBX1 zu finden sind und dieses sogar noch übertreffen.

3.5.7 Kinetische Daten für LgIGL1 und LgIGL2

Beide für *L. galeobdolon* isolierten Enzyme zeigen Michaelis-Menten-Kinetik. LgIGL1 ist signifikant aktiver als LgIGL2. Bei einem K_m^{IGP} von 610 μM beträgt V_{max} bei LgIGL1 36 $\text{nmol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$. Für LgIGL2 wurde ein etwa 25fach niedriger K_m^{IGP} bestimmt. V_{max} ist mit 0,56 $\text{nmol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ deutlich niedriger. Auch in der Rückreaktion unterscheiden sich beide Enzyme. Wiederum hat LgIGL1 höhere K_m -Werte, die etwa das Fünffache betragen, aber gleichzeitig eine rund 100fach höhere V_{max} .

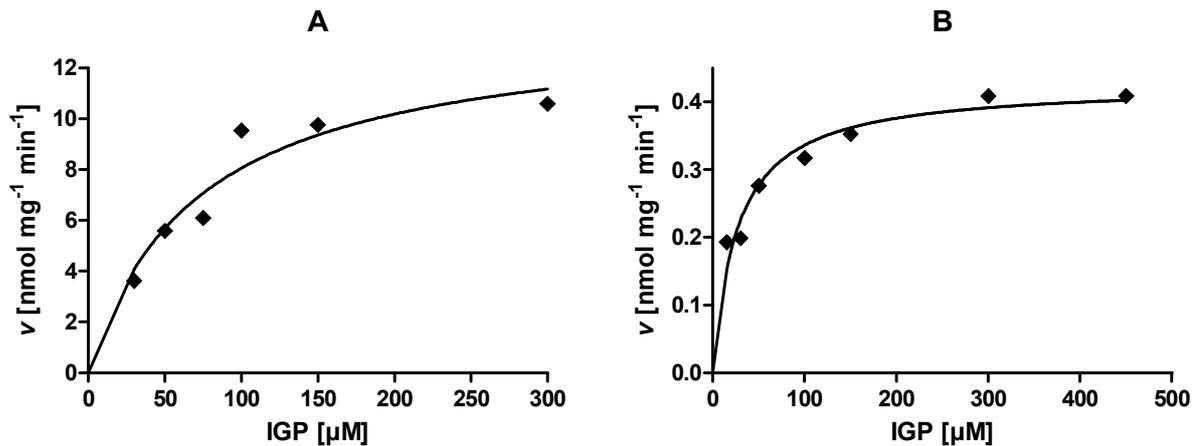


Abbildung 18: Michaelis-Menten-Kinetiken von heterolog exprimierten *LglGL1* (A) und *LglGL2* (B).

3.5.8 Charakterisierung der untersuchten Enzyme

Die untersuchten Enzyme lassen sich aufgrund ihrer enzymatischen Eigenschaften in drei Gruppen unterteilen. Die Unterscheidung dieser drei Gruppen ist signifikant. Zum einen gibt es mit einem $k_{\text{cat}}^{\text{IGP}} > 0,5 \text{ s}^{-1}$ sehr aktive Enzyme, *ZmBX1* und *CoBX1*, die IGP sehr schnell zu Indol umsetzen können. Des weiteren gibt es Enzyme, die man mit einem $k_{\text{cat}}^{\text{IGP}} < 0,005$ als inaktiv einstufen kann, *AfTSA1*, *LglGL2* und *ColGL*, diese Werte liegen im Bereich der monomeren TSA aus *E. coli* (Weischet und Kirschner, 1976). Die dritte Gruppe, zu der *AsIGL*, *LglGL1* und *AfTSA2* gehören, zeigen eine mittlere Aktivität beim Umsatz von IGP zu Indol. Ihre $k_{\text{cat}}^{\text{IGP}}$ -Werte liegen mit $0,03 \text{ s}^{-1}$, $0,05 \text{ s}^{-1}$ und $0,09 \text{ s}^{-1}$ zwischen den beiden angegebenen Grenzwerten. In Tabelle 14 sind die gemessenen Parameter im Überblick aufgelistet.

Tabelle 14: Enzymatische Parameter der untersuchten IGL im Überblick. a, b und c: signifikant unterschiedlich. m: zeigt Michaelis-Menten-Kinetik, $K_{0,5}$ entspricht K_m .

Enzym	$K_{0,5}^{\text{IGP}}$ [μM]	V_{max} [$\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$]	k_{cat} [s^{-1}]	$k_{\text{cat}}/K_m^{\text{IGP}}$ [$\text{mM}^{-1} \text{s}^{-1}$]
<i>CoBX1</i>	38 ^{a,m}	3424 ^a	1,9	49
<i>ZmBX1</i>	31 ^{a,m}	918 ^a	0,51	16
<i>LglGL1</i>	610 ^{b,m}	36 ^b	0,020	0,033
<i>AsIGL-1</i>	214 ^b	34 ^b	0,019	0,089
<i>AsIGL-2</i>	241 ^b	33 ^b	0,018	0,075
<i>AfTSA2</i>	399 ^{b,m}	29 ^b	0,016	0,040
<i>ColGL-1</i>	390 ^{b,m}	7,6 ^{b,c}	0,0042	0,011
<i>AfTSA1</i>	530 ^b	2,6 ^c	0,0014	0,0026
<i>ColGL-2</i>	279 ^{b,m}	2,2 ^c	0,0012	0,0043
<i>LglGL-2</i>	24 ^{c,m}	0,56 ^c	0,0003	0,013

Da bei Bakterien bereits nachgewiesen wurde, dass die Aktivität der TSA im Komplex mit TSB deutlich erhöht wird (Anderson, *et al.*, 1991; Weischet und Kirschner, 1976), sollte dies auch mit den dikotylen Enzymen getestet werden. Da für *A. squarrosa*, *C. orientalis* und *L. galeobdolon* keine Daten über ihre TSBs vorliegen und alle annotierten TSB1 von dikotylen Pflanzen hoch konserviert sind, wurde *AfTSA1* in allen Fällen für diese Untersuchungen verwendet.

Durch Zugabe von heterolog exprimierter *AfTSA1* zum Enzymtest konnte in keinem Fall, auch nicht in der Positivkontrolle mit *AfTSA1*, eine signifikante Veränderung der enzymatischen Eigenschaften festgestellt werden. Native Polyacrylamidgelelektrophorese sollte die Bildung eines Komplexes von TSA und TSB nachweisen, dieser konnte aber nicht gezeigt werden. Es wurde vermutet, dass die Bildung des Komplexes durch die 6xHis-Tag der heterolog exprimierten Proteine behindert wird. Die Abspaltung der 6xHis-Tag durch Thrombinverdau hatte jedoch weder signifikante Auswirkungen auf die enzymatischen Charakteristika der α -Reaktion, noch auf die Bildung eines Komplexes mit *AfTSA1*. Die Bildung des Komplexes scheint allgemein schwierig zu sein, da auch bei Yeast-2-Hybrid-Experimenten bis jetzt keine Interaktion nachgewiesen werden konnte (Celenza, Frey, Glawischnig, persönliche Mitteilung).

Alternativ ist denkbar, dass die Funktion einer IGL darin besteht, das hydrophobe, membrangängige Indol für die Zelle zu retten, indem es in der Rückreaktion zu IGP umgesetzt wird. Daher wurden diese Werte ebenso bestimmt (Tabelle 15).

Tabelle 15: Enzymatische Parameter der Rückreaktion von der untersuchten IGL im Überblick. a, b, c und d: signifikant unterschiedlich. m: zeigt Michaelis-Menten-Kinetik, $K_{0,5}$ entspricht K_m .

Enzym	$K_{0,5}^{\text{Indol}}$ [μM]	$k_{\text{cat}}^{\text{Indol}}$ [s^{-1}]	$K_{0,5}^{\text{GAP}}$ [μM]	$k_{\text{cat}}^{\text{GAP}}$ [s^{-1}]
CoBX1	675 ^{a,m}	8,9 ^d	93 ^{b,m}	1,1 ^a
ZmBX1	243 ^{a,m}	1,4 ^a	2897 ^{a,m}	3,0 ^a
AsIGL-2	466 ^{a,m}	2,9 ^a	880 ^{a,m}	1,0 ^a
AsIGL-1	780 ^{a,m}	2,8 ^a	932 ^{a,m}	1,9 ^a
LgIGL1	1161 ^a	0,42 ^a	510 ^{a,m}	0,67 ^a
<i>AfTSA2</i>	390 ^{a,m}	0,058 ^{a,b}	171 ^{a,m}	0,061 ^c
<i>AfTSA1</i>	1071 ^a	0,017 ^b	704 ^{a,m}	0,024 ^c
CoIGL-2	446 ^{a,m}	0,008 ^b	841 ^{a,m}	0,016 ^b
CoIGL-1	565 ^{a,m}	0,006 ^b	40 ^{b,m}	0,0020 ^c
LgTSA2	243 ^a	0,0050 ^b	108 ^{a,b}	0,0050 ^c

Es ist zu erkennen, dass aktive und mäßig aktive Enzyme bei der Rückreaktion gute Umsatzraten zeigen, die inaktiven Enzyme hingegen geringe. Auch wenn in einigen Fällen die Wechselzahlen für die Rückreaktion höher sind als bei der Hinreaktion, kann eine

Bevorzugung der Rückreaktion wegen der niedrigeren Substrataffinitäten zu Indol bzw. GAP ausgeschlossen werden.

3.6 Transkriptanalyse der TSA-Kandidatengene

Bei *A. squarrosa* wurden die Transkriptmengen von *Aslgl* in Wurzeln unterschiedlicher Länge und damit unterschiedlichen Alters bestimmt (Tabelle 16). Eine Korrelation zum Benzoxazinongehalt konnte nicht festgestellt werden. Dieser ist in jungen Wurzeln am höchsten und nimmt mit zunehmendem Alter ab, die Transkriptmengen in den Wurzeln unterscheiden sich wenig und sind in Wurzeln von 1 bis 3 cm Länge am höchsten.

Tabelle 16: Transkriptmengen von *Aslgl* relativ zu *AsGAPDH*.

	pg <i>Aslgl</i> /pg <i>AsGAPDH</i>
Wurzel <1cm	0,047
Wurzel 1 bis 3 cm	0,065
Wurzel >3 cm	0,038

Die Transkripte von *Colgl* sind in allen Geweben relativ gleichmäßig und in geringen Konzentrationen zu finden. In jungen, metabolisch aktiven Geweben, (Spross und Wurzel von Pflanzen zwei Wochen nach Keimung, junge Blätter und Knospen acht Wochen alter Pflanzen) ist die Expression etwa zwei- bis dreimal stärker, als in älteren Organen (Blüte oder altes Blatt). Die Expression von *CoBx1* hingegen variiert stark und erreicht bezogen auf die Expression von *CoGAPDH* deutlich höhere Konzentrationen als *Colgl*. Die schwächste Expression mit 0,31 pg *CoBx1*/ pg *CoGAPDH* ist in alten Blättern zu finden. Auch in der Wurzel, die keine Benzoxazinone synthetisiert, sind die Transkriptmengen sehr niedrig. Eine etwa 20- bis 30-fach höhere Expression findet man hingegen im Spross und in der Knospe, die gleichzeitig auch große Benzoxazinonmengen aufweisen. Auch in der Blüte findet man deutlich erhöhte Transkriptmengen (Tabelle 17).

Tabelle 17: Transkriptmengen von *CoBx1* und *CoTSA* relativ zu *CoGAPDH*.

	pg <i>CoBx1</i> /pg <i>CoGAPDH</i>	pg <i>CoTSA</i> /pg <i>CoGAPDH</i>
Spross (2 Wochen)	7,47	0,013
Wurzel (2 Wochen)	0,87	0,0096
Junges Blatt (8 Wochen)	1,72	0,0074
Altes Blatt (8 Wochen)	0,31	0,0053
Knospe (8 Wochen)	11,2	0,0091
Blüte (8 Wochen)	3,18	0,0043

Lglgl2 ist im Vergleich zu *Lglgl1* etwa zehnmals stärker exprimiert. Eine Ausnahme stellt die Expression in den Wurzeln dar, wo beide Gene etwa gleich stark exprimiert werden. Da in altem Blattgewebe die Mengen an GAPC-RNA um mehr als den Faktor Hundert niedriger

liegen als in allen anderen untersuchten Geweben und damit am Detektionslimit sind, wurde auf die Bestimmung von *LgIgl1* und *LgIgl2* verzichtet (Tabelle 18).

Tabelle 18: Transkriptmengen von *LgIgl1* und *LgIgl2* relativ zu *LgGAPDH*.

	pg <i>LgIgl1</i> /pg <i>GAPDH</i>	pg <i>LgIgl2</i> /pg <i>GAPDH</i>
Knospe	0,034	0,48
Blüte	0,014	0,41
Junges Blatt	0,035	0,26
Wurzel	0,21	0,16

Auch die Analyse der Transkriptmengen zeigt die Besonderheit von *CoBx1*. Im Vergleich zu allen anderen *Igl* ist es sehr hoch exprimiert und das Expressionsmuster zeigt die größte Amplitude.

3.7 Die Umsetzung von Indol zu Benzoxazinonen wird durch Cytochrom P450 Monooxygenasen katalysiert

Indol liefert das Grundgerüst der Benzoxazinone. Um jedoch von Indol zu den Benzoxazinonen zu gelangen, müssen in mehreren Schritten Sauerstoffatome in das Molekül eingebaut werden. In der pflanzlichen Sekundärmetabolitbiosynthese wird dies vor allem durch zwei Klassen von Enzymen katalysiert, 2-Oxoglutarat-abhängige Dioxygenasen und Cytochrom P450 Monooxygenasen.

Cytochrom P450 Monooxygenasen katalysieren die Schritte von Indol zu DIBOA (Frey, *et al.*, 1997) und eine Dioxygenase oxidiert DIBOA-Glc zu TRIBOA-Glc (Frey, *et al.*, 2003). Welche Enzyme in diesen Biosyntheseweg bei den dikotylen Pflanzen eingebunden sind, sollte zunächst durch Hemmversuche festgestellt werden. Dazu sind zwei Systeme etabliert. 1-Aminobenzotriazol ist in der Lage Cytochrom P450 Monooxygenasen zu hemmen (Kim, *et al.*, 2004) und Prohexadion-Ca ist ein Dioxygenaseinhibitor (Fischer, *et al.*, 2003).

3.7.1 ABT inhibiert die Indolinon-Synthese

1-Aminobenzotriazol ist ein effizienter Cytochrom P450 Inhibitor. In Leber und Niere von Ratten verursacht dieser Inhibitor einen deutlichen Rückgang der Cytochrom P450 Mengen (Mugford, *et al.*, 1992). Auch in Pflanzen wurde eine erfolgreiche Hemmung dieser Enzyme beobachtet (Kim, *et al.*, 2004). Das Prinzip dieses Inhibitors beruht auf einer Oxidation durch Cytochrom P450, bei der Benzyn freigesetzt wird, das wiederum eine Phenylierung der prosthetischen Hämgruppe der Cytochrom P450 Enzyme bewirkt. Dabei wird ein anomales Porphyrin gebildet, das zu einem völligen Verlust der Enzymaktivität führt (Kim, *et al.*, 2004). ABT wurde als *in vivo*-Hemmstoff bei *C. orientalis* und *L. galeobdolon* eingesetzt.

Zwei Wochen alte Sprosse von *C. orientalis* wurde für 0,5 h, 1 h, 5 h und 24 h in MES-Puffer mit ^{14}C -Indol in Anwesenheit von ABT und ohne Inhibitor gefüttert. Zu allen Zeitpunkten wird im Mittel die DIBOA-Biosynthese gehemmt. Signifikant ist dies nach 5 h und 24 h Inkubation. Nach 1 h Inkubation konnte bereits ABT in den Extrakten nachgewiesen werden. Zwischenprodukte der DIBOA-Biosynthese konnten weder durch Dünnschichtchromatographie noch mittels HPLC nachgewiesen werden.

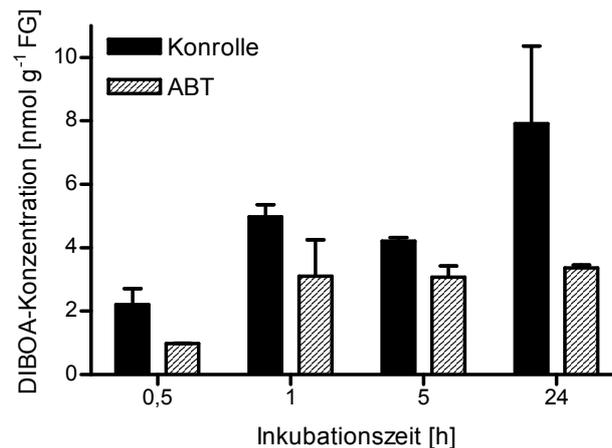


Abbildung 19: Umbau von ^{14}C -Indol zu ^{14}C -DIBOA in zwei Wochen alten Sprossen von *C. orientalis* in MES pH 5,7 in Anwesenheit und Abwesenheit von ABT nach unterschiedlicher Inkubationszeit.

Junge Triebe von *L. galeobdolon* wurden für 0,5 h, 1 h, 5 h und 24 h mit ^{14}C -Indol in Anwesenheit von ABT und ohne Inhibitor gefüttert. Auch hier sieht man einen signifikanten Unterschied zwischen Hemmung und Kontrolle, in diesem Fall nach 5 h Inkubationszeit. Nach 24 h Stunden besteht kein Unterschied zwischen Kontrolle und ABT-Inkubation mehr (Abbildung 20).

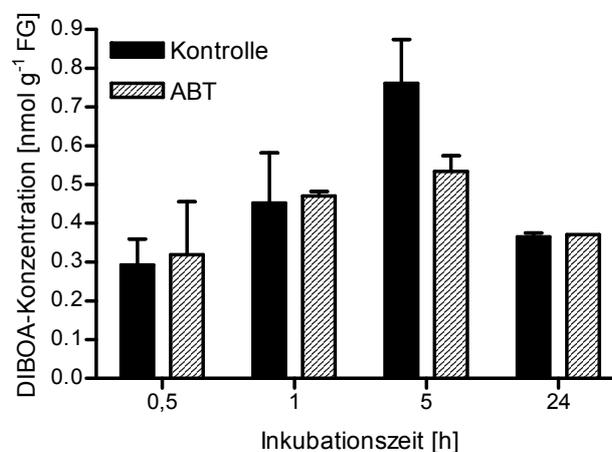


Abbildung 20: Umbau von ^{14}C -Indol zu ^{14}C -DIBOA in *L. galeobdolon*-Trieben in MES pH 5.7 in Anwesenheit und Abwesenheit von ABT nach unterschiedlicher Inkubationszeit.

Die Menge an neu synthetisiertem DIBOA nimmt nach 24 h sowohl in den Kontrollextrakten als auch in den ABT inhibierten Extrakten deutlich ab. Anscheinend überwiegt nach dieser Zeit der Abbau die Neusynthese. Auch bei *L. galeobdolon* konnten keine Zwischenprodukte der DIBOA-Biosynthese detektiert werden.

3.7.2 Mikrosomenisolierung und Fütterung mit ¹³C-Indol

Die durchgeführten Hemmversuche lassen darauf schließen, dass wenigstens der erste Schritt beim Umsatz von Indol zu DIBOA durch Cytochrom P450 Monooxygenasen katalysiert wird. Cytochrom P450 Monooxygenasen sind membrangebundene Enzyme, die NADPH-Reduktasen als Elektronenlieferant benötigen. In Mikrosomen finden sich Cytochrom P450 Enzyme im funktionellen Komplex mit der Reduktase. Mikrosomenisolierung und anschließende *in vitro* Enzymtests wurden daher zum Umsatz von Indol benutzt, das entstandene Produkt sollte im Anschluss spezifiziert werden.

Mikrosomen wurden aus jungen Trieben zwei Wochen alter Pflanzen und aus jungen Blättern und Knospen acht Wochen alter *C. orientalis* Pflanzen isoliert. Um die Qualität der Mikrosomen zu bestimmen wurde zunächst der Umsatz von Zimtsäure zu Cumarsäure bestimmt. Dieser betrug für erstere etwa 10 %, für Mikrosomen aus älteren Pflanzen etwa 30 % des Umsatzes, der bei Mais-Mikrosomen gemessen wurde. Mikrosomen aus älteren Pflanzen konnten Indol in geringen Mengen zu einem Produkt umsetzen, das mittels HPLC anhand von Retentionszeit und Spektrum als Indolin-2-on identifiziert werden konnte, die Ausbeute war jedoch zu gering, um die Ergebnisse mit HPLC-MS zu bestätigen.

Bei *L. galeobdolon* wurden junge Triebe zur Isolierung von Mikrosomen verwendet. Im Vergleich zu Mais-Mikrosomen war der Umsatz von Zimtsäure zu Cumarsäure etwa doppelt so effektiv. Bei der Fütterung der Mikrosomen mit unmarkiertem Indol und ¹³C-Indol wurde mittels HPLC ein Umsatz zu einem Produkt gemessen, dass durch Retentionszeit und Spektrum als Indolin-2-on identifiziert wurde. Durch HPLC-MS konnte dieses Ergebnis bestätigt werden, dieses Produkt zeigte die jeweilige charakteristische Masse, die für das unmarkierte Indolin-2-on mit 134 bzw. 141 für das markiert Produkt erwartet wurde.

3.7.3 Die Hemmversuche mit Prohexadion-Ca

Prohexadion-Ca wurde bereits erfolgreich als Dioxygenaseinhibitor in Pflanzen eingesetzt (Fischer, *et al.*, 2003; Roemmelt, *et al.*, 2003). Die Hemmung beruht auf der hohen Strukturähnlichkeit mit 2-Oxoglutarat (Rademacher, 2000). Die Hemmversuche an den dikotylen Pflanzen wurden wie folgt durchgeführt. Knospen von *C. orientalis* wurden 0,5 h,

1 h, 5 h und 24 h, junge Triebe von *L. galeobdolon* 0,5 h, 1 h und 5 h in MES-Puffer mit ^{14}C -Indol mit und ohne Prohexadion inkubiert wie unter 2.6.4.2 beschrieben.

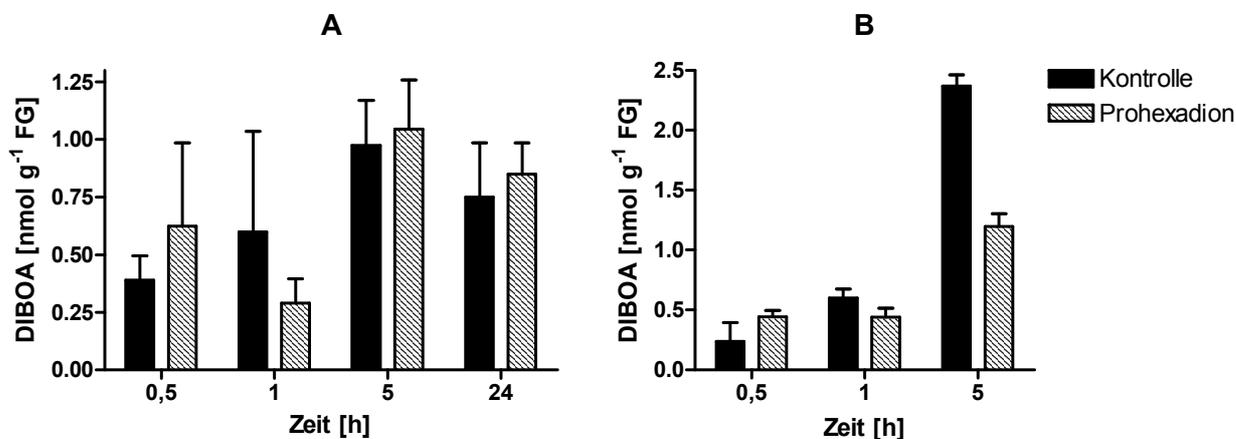


Abbildung 21: Neu synthetisiertes DIBOA zu verschiedenen Zeitpunkten. A: *C. orientalis*. B: *L. galeobdolon*.

Bei *C. orientalis* kann kein signifikanter Unterschied in der DIBOA-Neusynthese bei inhibierten und nicht inhibierten Extrakten aus Knospen gemessen werden (Abbildung 21). Eine Beteiligung von Dioxygenasen an der DIBOA-Biosynthese kann daher sehr wahrscheinlich ausgeschlossen werden. Auch auf den Gesamtgehalt an DIBOA hat Prohexadion-Ca keine Auswirkung.

Fütterungsversuche mit *L. galeobdolon* zeigen hingegen nach 5 h Inkubation mit Prohexadion einen deutlichen Rückgang an neu synthetisiertem DIBOA. Auch der Gesamtgehalt an DIBOA ist in diesen Extrakten signifikant niedriger im Vergleich zu nicht inhibierten Extrakten. Er beträgt 52,2 % der entsprechenden Kontrolle. Hier liegt der Schluss nahe, dass an mindestens einem Schritt nach der Indolinon-Synthese eine Dioxygenase beteiligt ist. Ein Zwischenprodukt der DIBOA-Biosynthese konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

3.8 Entgiftung des Biosyntheseprodukts DIBOA

Benzoxazinone sind als Aglucon autotoxisch für die Pflanze, daher werden sie als Glucoside in der Vakuole gespeichert. Für Mais ist bereits bekannt, dass diese Glucosylierung durch UDP-Glucosyltransferasen katalysiert wird (von Rad, *et al.*, 2001). Sowohl für *A. squarrosa* als auch für *C. orientalis* und *L. galeobdolon* wurde nachgewiesen, dass die Benzoxazinone als weniger giftige Glucoside vorliegen. Das setzt voraus, dass auch in diesen Pflanzen eine Glucosylierung stattfinden muss. Daher wurden bei *C. orientalis* und *L. galeobdolon* *in vitro*

Versuche durchgeführt um den Umsatz von DIBOA zu DIBOA-Glc in Abhängigkeit von UDP-Glucose nachzuweisen.

Proteinrohextrakt von Blättern zwei Wochen alter Keimlinge und Sprosse von *L. galeobdolon* wurden wie beschrieben mit Ammoniumsulfat gefällt. Die Fraktion 40 % - 70 % wurde jeweils in Anwesenheit und Abwesenheit von UDP-Glucose mit DIBOA inkubiert. Es konnte für beide Pflanzen ein UDP-Glucose-abhängiger Umsatz zu DIBOA-Glc festgestellt werden. Bei Abwesenheit von UDP-Glucose wurde keine Umsetzung von DIBOA zu DIBOA-Glc nachgewiesen.

4 DISKUSSION

4.1 Benzoxazinone in dikotylen Pflanzen

Benzoxazinone sind in vielen Vertretern der Gräser (Poaceae) zu finden (Niemeyer, 1988; Wu, *et al.*, 2001; Zunniga und Massardo, 1991), aber auch bei einigen Vertretern weniger dikotyler Familien, den Acanthaceae (Baumeler, *et al.*, 2000; Bravo, *et al.*, 2004; Huo, *et al.*, 2005; Kanchanapoom, *et al.*, 2001), Lamiaceae (Alipieva, *et al.*, 2003), Scrophulariaceae (Macias, *et al.*, 2006) und Ranunculaceae (Özden, *et al.*, 1992).

Vor einigen Jahren wurde bereits nachgewiesen, dass *C. orientalis* in den Blüten DIBOA-Glc bildet (Özden, *et al.*, 1992). Auch bei *L. galeobdolon* wurde aus oberirdischen Pflanzenteilen DIBOA und DIBOA-Glc isoliert (Alipieva, *et al.*, 2003). Für *A. squarrosa* gibt es genaue quantitative Untersuchungen zum Benzoxazinongehalt in der gesamten adulten Pflanze (Baumeler, *et al.*, 2000). Auch in dieser Veröffentlichung wurden Benzoxazinone nur in der Wurzel nachgewiesen, allerdings in höheren Konzentrationen (durchschnittlich 0,5 bis maximal 3 $\mu\text{mol DIBOA-Glc g}^{-1}$ FG und 0,1 bis 0,2 $\mu\text{g DIMBOA-Glc g}^{-1}$ FG) als in der vorliegenden Arbeit. Die am nächsten liegende Erklärung ist, dass unterschiedliche Linien von *A. squarrosa* verwendet wurden und vor allem, dass die Induktion und Anzucht der Wurzeln unter unterschiedlichen Bedingungen erfolgte (feuchte Kammer im Gewächshaus gegen Anzucht im Weckglas). Genaue Daten zu den Benzoxazinongehalten von *C. orientalis* und *L. galeobdolon* wurden bisher noch nicht veröffentlicht, die gemessenen Konzentrationen sind etwa in der gleichen Größenordnung wie Mais. Dagegen scheint *A. squarrosa* einen niedrigeren Bedarf an Benzoxazinonen zu haben. Hier wurden deutlich geringere Konzentrationen gemessen. Auch der Ort der Synthese ist im Gegensatz zu den anderen untersuchten Pflanzen sehr limitiert und auf Wurzeln beschränkt.

Allen untersuchten Pflanzen ist gemeinsam, dass die Benzoxazinone als Glucoside vorliegen, die Art der Benzoxazinone hingegen ist von Art zu Art unterschiedlich. Bei den untersuchten Maislinien wird fast ausschließlich DIMBOA gefunden, der DIBOA-Gehalt liegt unter 1 %. Bei *C. orientalis* und *L. galeobdolon* findet man dagegen nur DIBOA. *A. squarrosa* ist in der Lage, sowohl DIBOA als auch DIMBOA zu synthetisieren. Ein gemeinsames Muster der Benzoxazinonverteilung ist nicht zu erkennen. In den Gräsern Mais, Weizen, Roggen und *Hordeum lechleri* finden sich die Benzoxazinone in Spross und Wurzeln der Keimlinge und jungen Pflänzchen, die adulten Pflanzen weisen dagegen nur noch geringe Konzentrationen auf. Dagegen werden bei *C. orientalis* und *L. galeobdolon* auch in adulten Pflanzen hohe DIBOA-Gehalte erreicht, bei *C. orientalis* in Spross, Blüte und Knospe, bei *L. galeobdolon* in Wurzel, Spross und Blüte. *A. squarrosa* bildet Benzoxazinone

nur in der Wurzel. Tendenziell fällt der Benzoxazinongehalt bei den drei Dikotylen mit zunehmendem Alter eines Organs. Für *C. orientalis* wurde im jungen Spross die höchste Neusyntheserate von DIBOA detektiert, alle untersuchten Organe von *L. galeobdolon* synthetisieren DIBOA gleichmäßig. Die Benzoxazinonbiosynthese in Gräsern und in individuellen dikotylen Pflanzen folgt also jeweils einem eigenen spezifischen Expressionsmuster.

4.2 Der "branch point"

4.2.1 Indol ist die direkte Vorstufe von DIBOA

Fütterungsversuche mit ^{14}C -Indol und ^{14}C -Tryptophan zeigten, dass Indol auch bei den Dikotylen Vorstufe der DIBOA-Biosynthese ist. Ein alternativer Biosyntheseweg, der ohne das Intermediat Indol über Anthranilat abläuft, wurde für Benzoxazolinat postuliert (Liu, *et al.*, 2002). Diese Teilstruktur des Antitumor-Wirkstoffes C-1027 weist eine große Strukturähnlichkeit zu DIBOA und DIMBOA auf (Abbildung 22). Dieser oder ein vergleichbarer Weg zu den Benzoxazinonen kann für *C. orientalis*, *L. galeobdolon* und *A. squarrosa* definitiv ausgeschlossen werden, da es in diesem Fall nicht möglich gewesen wäre, bei der durchgeführten Fütterung ein radioaktiv markiertes Produkt zu erhalten. Das gefütterte Indol ist an C2 markiert. Diese Markierung wäre bei einer Rückreaktion zu Anthranilat verloren gegangen. Das einzige bei Pflanzen bekannte Enzym für die Indolbiosynthese ist die Indol-3-Glycerinphosphatlyase.

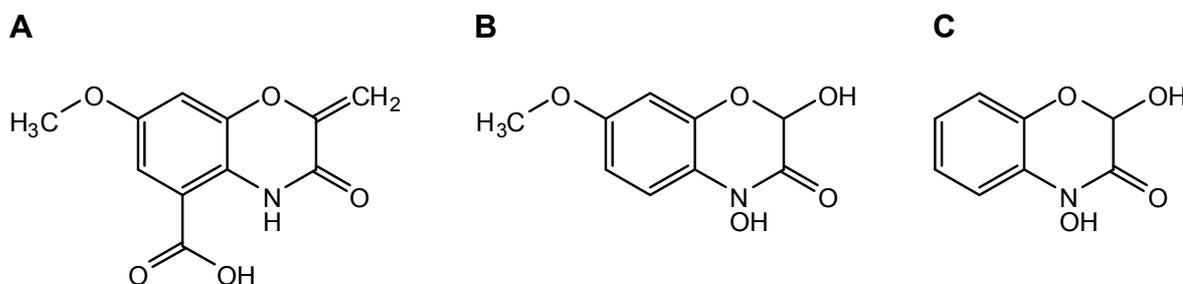


Abbildung 22: A: 3,4-Dihydro-7-methoxy-2-methylen-3-oxo-2H-1,4-benzoxazine-5-carboxylsäure, Benzoxazolinat, B: 2,4-Dihydroxy-7-Methoxy-1,4-Benzoxazin-3-on, DIMBOA, C: 2,4-Dihydroxy-1,4-Benzoxazin-3-on, DIBOA.

4.2.2 IGL-Proteine katalysieren die „branch point“-Reaktion

Um die enzymatischen Eigenschaften und die möglichen Funktionen der in der vorliegenden Arbeit untersuchten IGL-Proteine diskutieren zu können, soll nochmals auf die Besonderheiten der Tryptophansynthase α (am Beispiel der *E. coli* TSA) und auf ZmBX1 eingegangen werden.

Die Tryptophansynthase α ist ein Teil des Tryptophansynthasekomplexes, bestehend aus jeweils zwei α - und β -Dimeren, die sich wechselseitig allosterisch regulieren (Miles, 1991, 2001; Pan, *et al.*, 1997; Peracchi, *et al.*, 1996; Peracchi, *et al.*, 1995; Ruvinov, *et al.*, 1995). Die aktiven Zentren der α - und β -Untereinheit sind durch einen 25 Å großen Tunnel miteinander verbunden, durch den Indol diffundieren kann. Eine wichtige Eigenschaft der Tryptophansynthasen ist der Wechsel zwischen der weniger aktiven und der aktiven Konformation der aktiven Zentren. Die Konformation ist abhängig von der Ligandenbindung an das aktive Zentrum der α -Untereinheit und der covalenten Bindung des Intermediates an das aktive Zentrum der β -Untereinheit (Miles, 1995). So wird zum Beispiel bei *E. coli* die Aktivität der TSA um das hundertfache erhöht, wenn ein Komplex mit TSB gebildet wird (Creighton und Yanofsky, 1966).

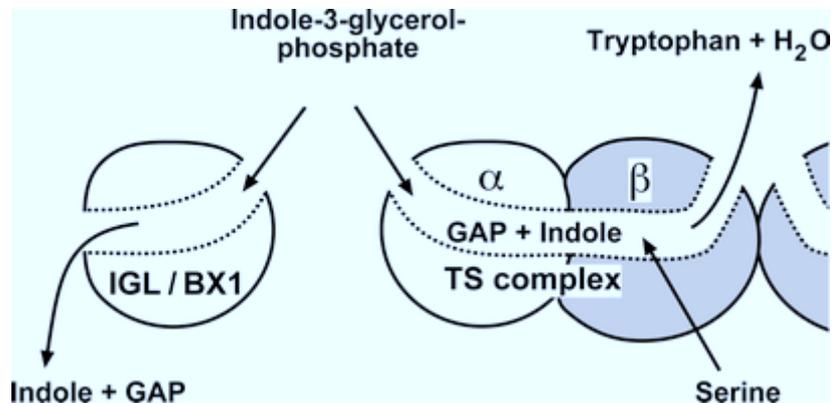


Abbildung 23: Vergleich von *ZmBx1* bzw. *ZmIGL* mit dem TS-Komplex. Erstere katalysieren die Spaltung von IGP zu freiem Indol und GAP, letzter die Bildung von Tryptophan (Gierl und Frey, 2001).

ZmBX1 und *ZmIgl* sind Homologe der Tryptophansynthase α , die eine Besonderheit aufweisen. Sie bilden keinen Komplex mit TSB (Kriechbaumer, 2006), zeigen aber eine sehr hohe Aktivität, 1400fach höher als das bakterielle TSA-Monomer und immer noch vierzehn mal höher als die bakterielle TSA im Komplex. Ihre Aufgabe ist es, Indol für den Sekundärmetabolismus zu liefern (Abbildung 23, Frey, *et al.*, 1997; Frey, *et al.*, 2003).

4.2.3 Bei *C. orientalis* findet man ein BX1

Die hohe Substrataffinität und die schnelle Umsatzrate, die sogar *ZmBx1* übertrifft, sind gute Argumente dafür, dass *CoBX1* am Sekundärmetabolismus beteiligt ist. Aber nicht nur die Fähigkeit effizient Indol zu liefern spricht dafür, sondern auch die Expression des entsprechenden Gens.

4.2.3.1 *CoBx1*-Expression korreliert mit dem DIBOA-Gehalt

Radwanski, *et al.*, 1995, stellten die These auf, dass „housekeeping“-Enzyme wie die Tryptophansynthase in allen Pflanzengewebe und während der gesamten Entwicklung zu finden sein müssen und ihre Konzentration sich nur wenig ändern wird. Dies haben sie schließlich durch quantitative Immunoblotanalyse bestätigt. Des Weiteren kann man annehmen, dass bei Genen, die in den Sekundärmetabolismus involviert sind, eine Korrelation der Genexpression mit den Mengen an Stoffwechselprodukt zu finden ist. Diese Hypothesen sollen die Grundlage folgender Argumentation sein.

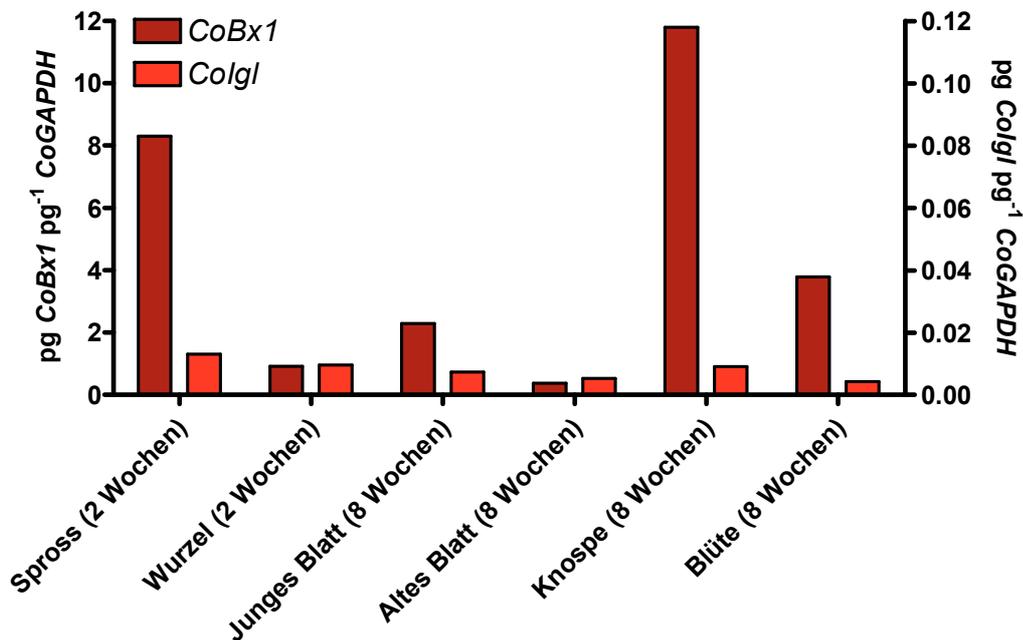


Abbildung 24: Transkriptmengen von *CoBx1* (dunkelrot) und *Colgl* (hellrot) relativ zu *CoGAPDH*.

Bei *C. orientalis* wurden zwei verschiedene *Igl*, *CoBx1* und *Colgl*, gefunden und analysiert (Abbildung 24). Die relativ konstanten Transkriptmengen von *Colgl* sprechen dafür, dass es sich um ein Gen handelt, das in den Primärstoffwechsel, in diesem Fall in die Tryptophanbiosynthese, involviert ist.

Eine Korrelation der Transkriptmengen von *CoBx1* mit dem absoluten Gehalt an DIBOA in den verschiedenen Pflanzenteilen ist nicht zu erkennen (Abbildung 25, A).

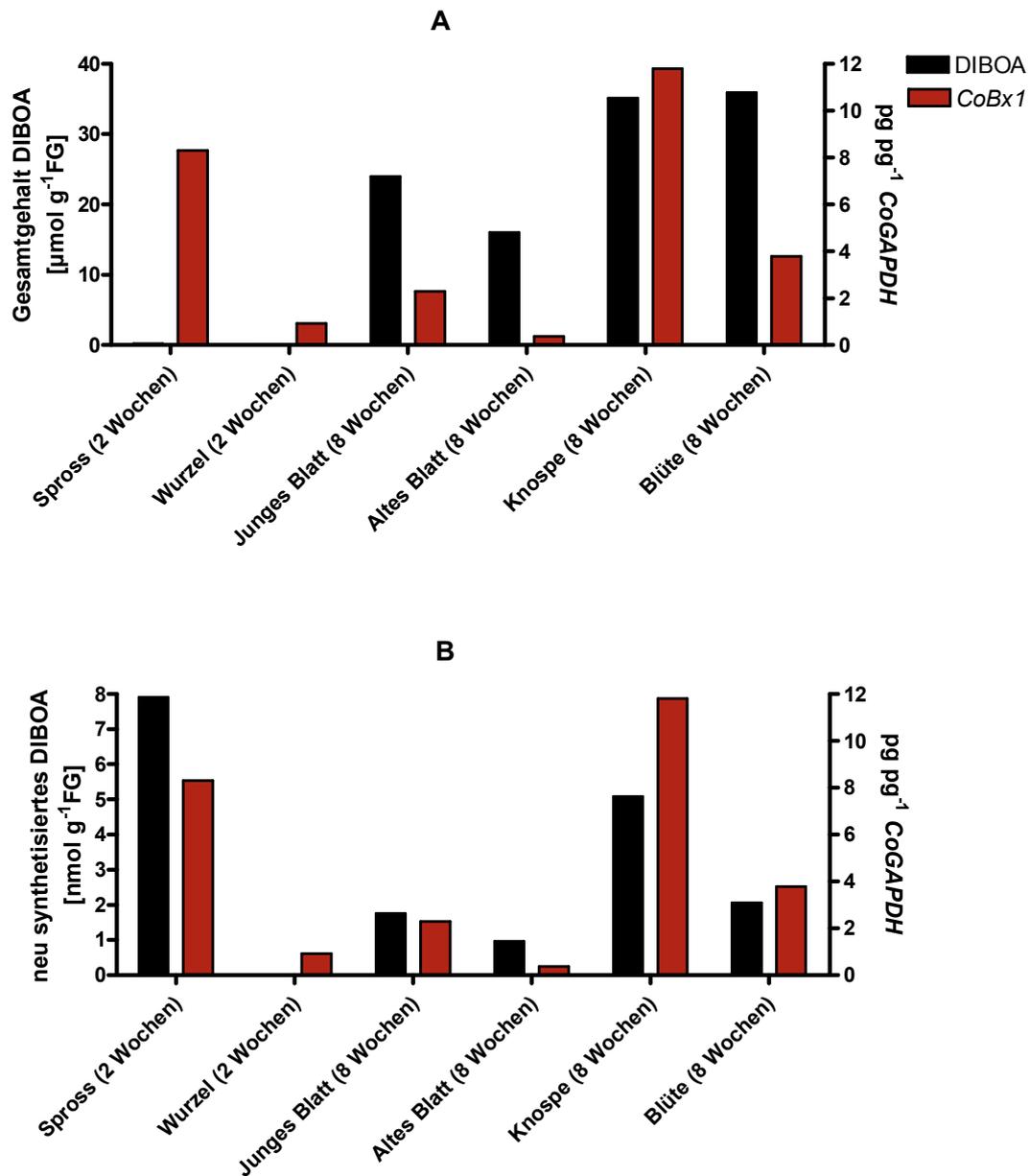


Abbildung 25: Vergleich der Transkriptmengen von *CoBx1* mit DIBOA-Konzentrationen in verschiedenen Pflanzenteilen. A: Gesamtgehalt an DIBOA. B: in 24 h neu synthetisiertes DIBOA.

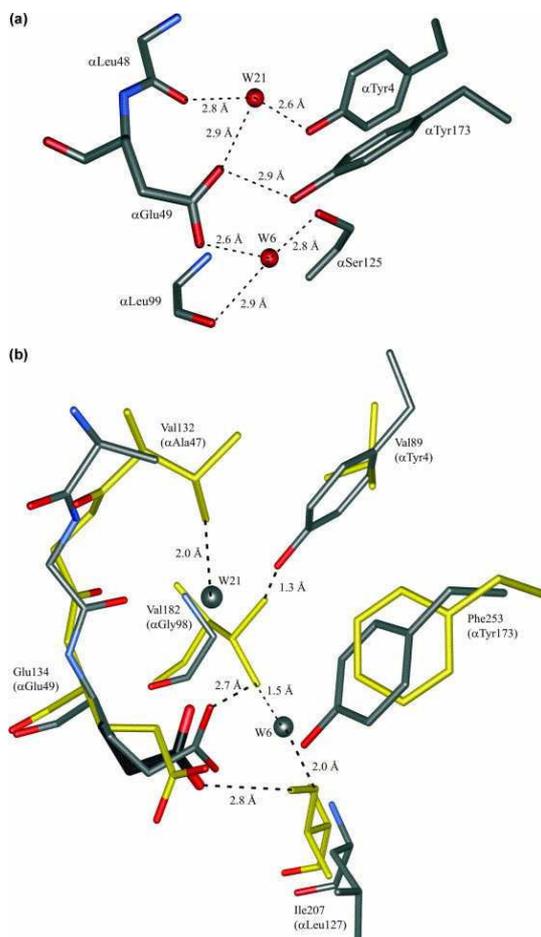
Der Gesamtgehalt an DIBOA kann aber keinen Hinweis auf die metabolischen Vorgänge in einem Pflanzenorgan geben. Daher ist es sinnvoll die Transkriptmengen mit den Mengen an neu synthetisiertem DIBOA zu vergleichen (Abbildung 25, B). Betrachtet man zunächst die zwei Wochen alte Pflanze, so findet man in den oberirdischen Pflanzenteilen eine große Menge an *CoBx1*, ebenso wie eine sehr hohe Neusyntheserate an DIBOA. In der Wurzel, die keine messbaren Mengen an DIBOA produziert, finden sich hingegen nur sehr geringe Transkriptmengen. Auch in der acht Wochen alten Pflanze findet man ähnliche Relationen, in der Knospe jeweils sehr hohe Werte, im jungen Blatt und in der Blüte ähnlich niedrige Werte.

Alte Blätter bilden einen Sonderfall. Die Syntheserate an DIBOA ist hier sehr hoch, die Transkriptmengen hingegen sehr niedrig. Dies kann darauf zurückzuführen sein, dass zwar die Transkription schon deutlich zurückgegangen ist, aber immer noch genügend Protein vorhanden ist, um DIBOA in hohen Mengen zu synthetisieren.

Auch wenn bereits die enzymatischen Parameter zeigen, dass CoBX1 ähnlich effizient wie ZmBX1 Indol bildet, gibt erst die Korrelation von den CoBx1-Transkriptmengen und den Mengen an neu synthetisiertem DIBOA einen Hinweis darauf, dass CoBX1 sehr wahrscheinlich in die Benzoxazinonbiosynthese eingebunden ist. Daneben könnten noch weitere Stoffwechselwege mit Indol beliefert werden. Sicher ausgeschlossen wurde, dass die Pflanze freies Indol produziert, wie es in verschiedenen Arten zu finden ist. Dies wurde durch Etherextrakte der verschiedenen Pflanzenteile und Festphasenmikroextraktion (SPME) mittels GC-MS gezeigt.

4.2.3.2 Die Proteinstruktur von CoBX1 lässt auf ein sehr aktives Protein schließen

Die Untersuchung verschiedener Mutationen zeigte die Bedeutung von α Glu49 und α Asp60 der Tryptophansynthase α bei der Substratbindung oder der Katalyse. So ist die α Asp60Asn Mutante katalytisch inaktiv (Miles, *et al.*, 1988; Milton, *et al.*, 1986; Nagata, *et al.*, 1989). Bei *E. coli* führte eine Mutation an α Glu49 zu einer Inaktivierung der Tryptophansynthase α



(Miles, *et al.*, 1982; Ogasahara, *et al.*, 1980; Yutani, *et al.*, 1982; Yutani, *et al.*, 1980; Yutani, *et al.*, 1977; Yutani, *et al.*, 1979; Yutani, *et al.*, 1987). α Glu49 wurde schließlich als die Aminosäure identifiziert, die die Aldolspaltung katalysiert und ein Proton von C3'OH der Glyceryl-Seitenkette akzeptiert. In Abwesenheit von IGP bildet α Glu49, jetzt in der inaktiven Konformation, eine Wasserstoffbrückenbindung mit α Tyr173 (Crawford, *et al.*, 1987). Wie bereits beschrieben, ist eine wichtige Eigenschaft der Tryptophansynthase die wechselseitige, allosterische Regulation der α - und β -

Abbildung 26: Umgebung des katalytischen Glutamat. (a) inaktive Konformation von α Glu49, eine H-Brückenbindung zu α Tyr173 ist ausgebildet. (b) Bei BX1 (gelb) liegt Glu134 in der aktiven Konformation vor. Aufgrund einiger Aminosäureaustausche ist eine inaktive Konformation bei BX1 energetisch nicht favorisiert Kulik, *et al.*, 2005.

Untereinheiten. Die Bildung des $\alpha\beta\alpha$ -Komplexes führt zu einer Erhöhung der Aktivität um das 30fache oder mehr (Anderson, *et al.*, 1991; Dunn, *et al.*, 1990; Dunn, *et al.*, 1987). Kulik, *et al.*, 2005, verglichen nun diese Kristallstruktur mit der von *ZmBX1*, um Hinweise auf die Ursache der unterschiedlichen enzymatischen Eigenschaften beider Enzyme zu erhalten. Mehrere Aminosäurenunterschiede sollen für diese Änderungen eine entscheidende Rolle spielen. Dabei ist wiederum α Glu49 bzw. Glu143 in *ZmBX1* von Bedeutung. Dadurch, dass bei *ZmBX1* α Tyr173 durch Phe253 ersetzt ist und die Seitenketten von Val182, anstelle von α Gly98, und Ile207, anstelle von α Leu127, Wassermoleküle verdrängen, entsteht eine hydrophobe Höhlung, die verhindert, dass die inaktive Konformation von Glu134 stabil ist (Abbildung 26).

Nach der Modellierung von CoBX1 auf der Basis von *SfTSA* (PDB Code 1QOQ, Weyand und Schlichting, 1999) wurde ein signifikanter Unterschied zwischen den BX1-artigen und TSA-artigen IGL festgestellt (Brandt, persönliche Mitteilung). Auffällig war, dass bei den BX1-artigen an der entsprechenden Position (Abbildung 27, 2) Valin bzw. bei CoBX1 Leucin (L139, Abbildung 29) zu finden ist, bei den TSA-Artigen, mit Ausnahme von *ZmTSAlike*, hingegen Alanin, Glycin oder Serin. Diese Aminosäuren haben eine deutlich kürzere, Serin zudem eine polare Seitenkette, was die Ausprägung der hydrophoben Höhlung verringert oder auch verhindern kann.

	1	65
<i>ZmIgl1</i>	(1) -MASAIKAASTSSRWSSSPAAVHSSPLSKRLPAAVAMPGR-----RRSVATVRAVAAVAP	
<i>CoBX1</i>	(1) -MALAITSSAFSL-----VCQKPAVIQKSS-----ETRG	
<i>ZmBX1</i>	(1) -MAFAPKTSSSSS-LSSALQAAQSPPLLLRRMSSTATPRRRYDAAVVVTTTTTARAAAAAVTVPA	
<i>LgIGL1</i>	(1) ---SSLKATGFLO-----LRTNYSLPEYPLYPS-----SLTS----STNRS	
<i>AsIGL-1</i>	(1) MAAAALKASCVFQ-----PKASFDTRGRRRS-----LLAV----PTSTS	
<i>AsIGL-2</i>	(1) MAAAALKASCVFQ-----PKASFNTRGRRRS-----LLAV----PTSTS	
<i>AtTSA2</i>	(1) -----	
<i>ZmTSA</i>	(1) -MAFALKAAAAGS-----AS-----FSAAGPRRR-----AAATGRVSFRSAAPV	
<i>CoIGL-1</i>	(1) -MAAAFKSTCFLO-----SSNPTNNLFLRSSTQ-----KLKTSNISTKSRI	
<i>AtTSA1</i>	(1) -MAIAFKSGVFFL-----QSPKSQIGFRHSSP-----PD----SSLSF	
<i>CoIGL-2</i>	(1) -MAAAFKSTCFLO-----SSNPTNNLFLRSSTQ-----KLKTSNISTKSRI	
<i>LgIGL2</i>	(1) MAANSLKSICFPQ-----LKT TNQ S I S Q R S-----SSRVS	
<i>ZmTSAlike</i>	(1) -----	
<i>StTSA</i>	(1) -----	
	66	130
<i>ZmIgl1</i>	(55) AAPAAPAKLTAG-----AGGRCLPVSQTMSRLRAQGKTAFIPYITAGDPLATTAEALRL LDA	
<i>CoBX1</i>	(29) SLTISPSLTIS-----PSSVSISETFASLRQGGKVALVPYITAGDPLSTTAEALKVLDY	
<i>ZmBX1</i>	(64) APPQAPAPAPVPPKQAAAPAERRSRPVSDTMAALMAKGKTAFIPIYITAGDPLATTAEALRLD LG	
<i>LgIGL1</i>	(35) FKLRPIMATLTA-----APT VGLSKTF SR LKQGGKVAFIPIYITAGDPLSTTAEV LKVLDS	
<i>AsIGL-1</i>	(36) FKCKPPMAALTT-----APTLSISETFSKLRQGEVALIPYITAGDPLSTTAKALKILDS	
<i>AsIGL-2</i>	(36) LKCKPPMAALTT-----APTLPISSETFSKLRQGEVALIPYITAGDPLSTTAKALKILDS	
<i>AtTSA2</i>	(1) ----MDLLKTP-----SSTVGLSETFARLKSQGGKVALIPYITAGDPLSTTAKALKVLD S	
<i>ZmTSA</i>	(39) VAVRAAAAAAAA-----VAEDKRSISGTFAE LRQGGKTALIPFI TAGDPLATTAKALRILDA	
<i>CoIGL-1</i>	(41) SMASLAVAPPTA-----ATAVSLSETFIRLKEQGRVAFIPFI TAGDPLSTTAEALKVLD S	
<i>AtTSA1</i>	(34) KRFTPMASLSTS-----SPTLGLADTF TQLKKQGGKVAFIPIYITAGDPLSTTAEALKVLD A	
<i>CoIGL-2</i>	(41) SMASLAVAPPTA-----ATAVSLSETFIRLKEQGRVAFIPFI TAGDPLSTTAEALKVLD S	
<i>LgIGL2</i>	(31) LCYKPPMATLQT-----ATKAGISETFSR LKQGGKVALIPYITAGDPLSTTAEALKVLD S	
<i>ZmTSAlike</i>	(1) -----MANGG-----AAAGKLTVAETF SNLREQGGKSAFIPFI TAGDPLVTT SKALKILNS	
<i>StTSA</i>	(1) -----MERYENLFAQLNDRREGAFVFPVTLGDPPGIEQSLKIIDLID	

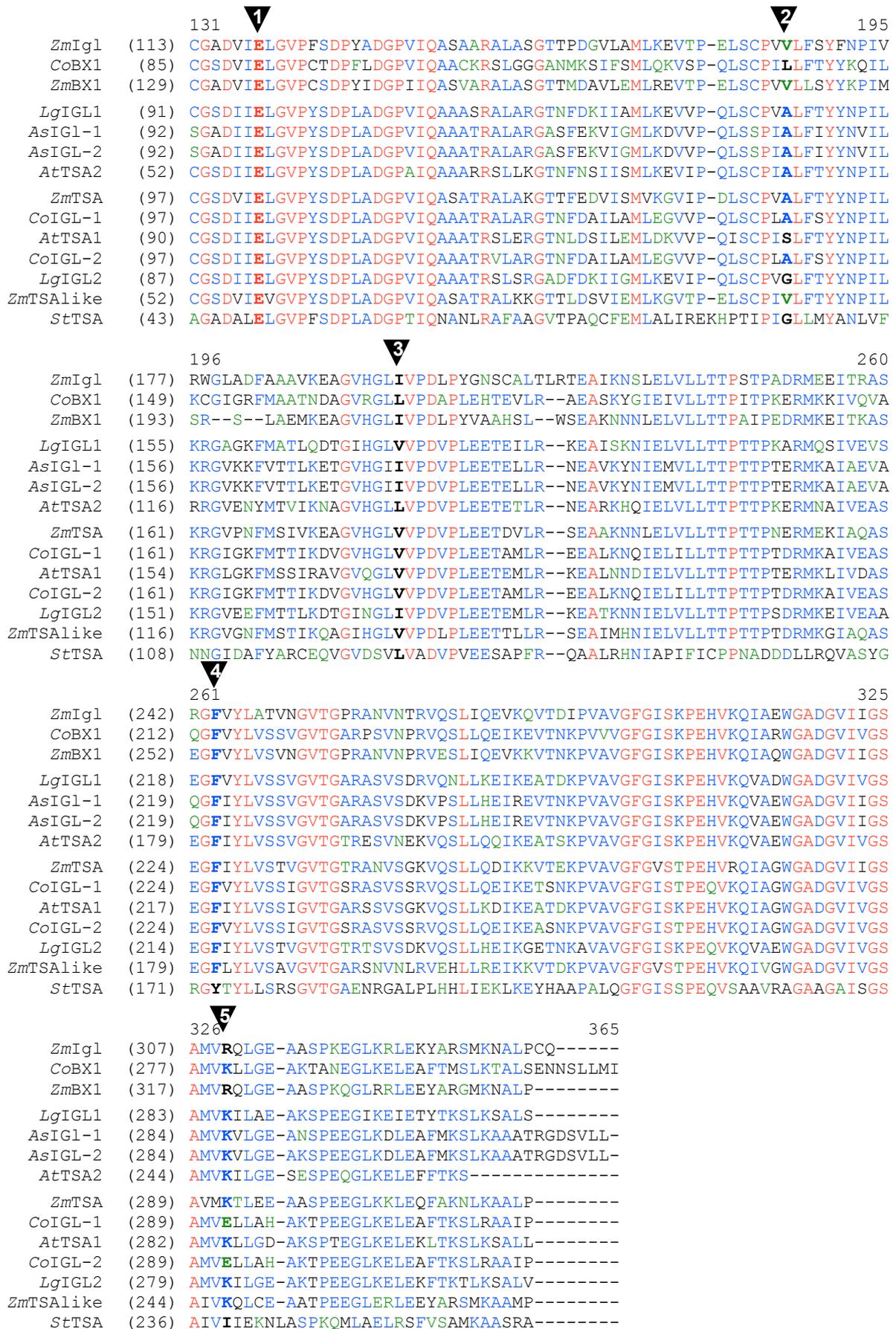


Abbildung 27: Alignment der verschiedenen IGL von *S. typhimurium*, *Z. mays* und der Dikotylen, geordnet nach k_{cat} . Die Pfeile markieren α Glu49, α Gly97, α Leu127, α Tyr173 und α Ile239 von StTSA und die Aminosäuren der pflanzlichen IGL an entsprechender Position.

Auch die Unterscheidung von IGLs mittlerer und geringer Aktivität ist durch die Aminosäuren an dieser Position möglich. Bei IGLs mittlerer Aktivität ist durch Alanin, zwar mit einer hydrophoben, aber deutlich kürzeren Seitenkette, die Bildung der hydrophoben Höhlung verringert. Bei den IGLs mit geringer Aktivität sind Glycin, ohne Seitenkette, und Serin, mit einer kurzen polaren Seitenkette, zu finden. Dies führt zu einer weiteren Abschwächung der hydrophoben Höhlung. Eine Ausnahme bildet CoIGL. Trotz Alanin an der beschriebenen Position handelt es sich um ein IGL geringer Aktivität. Brandt (persönliche Mitteilung) begründet dies durch eine Interaktion mit dem Aminosäurerest entsprechend Position Arg320 (Abbildung 27, 5). Bei CoIGL findet man hier anstelle der basischen Aminosäuren Arginin oder Lysin das saure Glutamat (Glu292, Abbildung 32).

Kulik, *et al.*, 2005, geben neben den bereits besprochenen Unterschieden von *Zm*BX1, *Co*BX1 und *Sf*TSA an der Position Val182 bzw. α Gly98 weitere Aminosäuren im aktiven Zentrum an, die für die unterschiedlichen enzymatischen Eigenschaften verantwortlich sind. Hier sind allerdings keine Auffälligkeiten bei den pflanzlichen IGLs zu finden, die eine Gruppierung in BX1- und TSA-Artige zulassen. So ist an der entsprechenden Position von Phe253 (Abbildung 27, 4) diese Aminosäure konserviert für alle pflanzlichen IGLs, ebenso wie die drei langkettigen, unpolaren Aminosäuren Val, Leu und Ile entsprechend an der Position Ile207 (Abbildung 27, 3).

Ein Vergleich der modellierten Proteinstrukturen soll die besonderen Charakteristika der verschiedenen Proteine verdeutlichen.

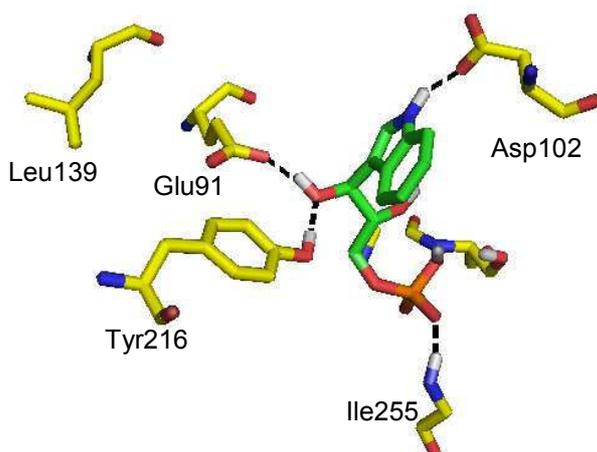


Abbildung 29: Modellierter Proteinstruktur des aktiven Zentrums von CoBX1 mit Substrat IGP (grün).

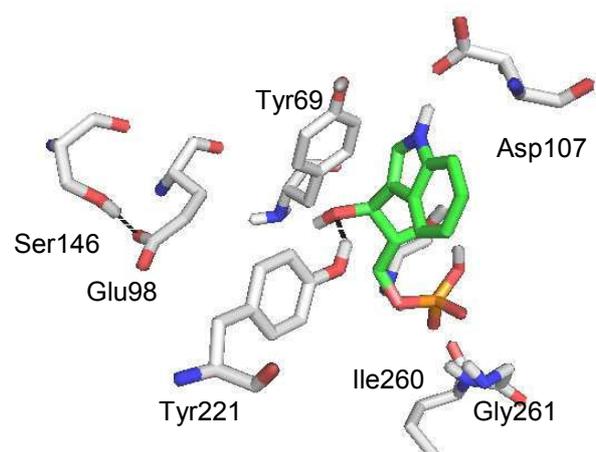


Abbildung 28: Modellierter Proteinstruktur des aktiven Zentrums von AfTSA1 mit Substrat IGP (grün).

Bei CoBX1 sind die starke Substratbindung und dessen Nähe zum katalytisch aktiven Glu91 (Abbildung 29) gut zu erkennen. Die hohe Effizienz dieses Enzyms kann dadurch gut nachvollzogen werden.

Bei AfTSA1 bildet Glu98 hingegen eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem benachbarten Ser146 aus (Abbildung 28). Dies führt zu einer schlechten Bindung des Substrates und zu einer niedrigen Effizienz dieses Enzyms.

Bei IGLs mit mittlerer Aktivität können zwei Konformationen angenommen werden. Welche davon nun tatsächlich vorliegt, kann durch Proteinmodellierung nicht bestimmt werden. Die Orientierung des katalytisch aktiven Glutamat ist jedoch sehr wahrscheinlich die Ursache der mittleren Aktivität. Bei AfTSA2 bildet Glu58 in der inaktiven Konformation eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem benachbarten Ala98 aus, bei der aktiven mit dem Substrat (Abbildung 30).

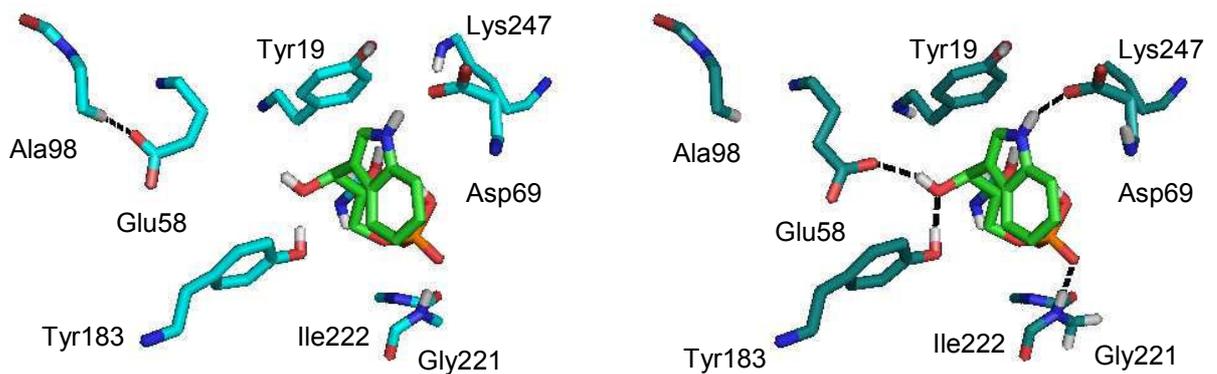


Abbildung 30: Modellierte Proteinstruktur des aktiven Zentrum von AfTSA2 mit dem Substrat IGP (grün). Links: inaktive Konformation, rechts: aktive Konformation.

Dies ist auch bei LglGL1 zu erkennen (Abbildung 31).

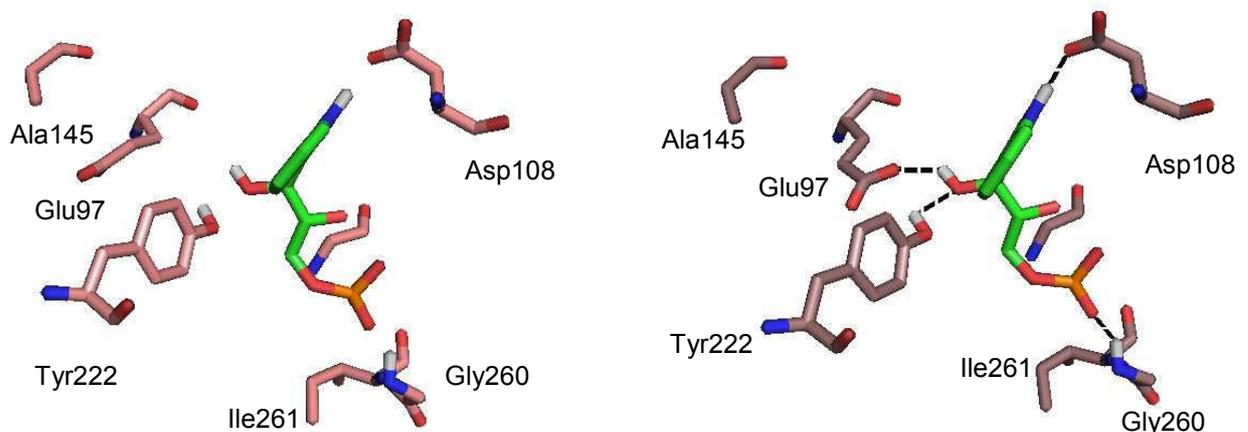


Abbildung 31: Modellierte Proteinstruktur des aktiven Zentrum von LglGL1 mit dem Substrat IGP (grün). Links: inaktive Konformation, rechts: aktive Konformation.

Einen Sonderfall stellt CoIGL dar. Hier ist Glu103 zum aktiven Zentrum orientiert, die Ursache der geringen Aktivität wird der Orientierung von Tyr228 zugeschrieben, die wahrscheinlich durch Glu292 verursacht wird.

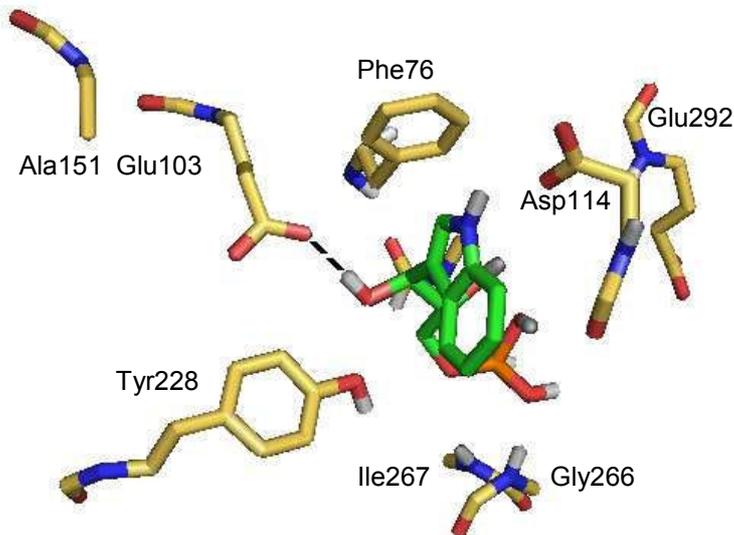


Abbildung 32: Modellierte Proteinstruktur des aktiven Zentrum von CoIGL mit dem Substrat IGP (grün).

4.2.4 Bereitstellung von Indol bei *A. squarrosa* und *L. galeobdolon*

Bei *A. squarrosa* und *L. galeobdolon* wurde kein BX1-artiges IGL gefunden. Es sind allerdings jeweils IGIs mittlerer Aktivität zu finden. Es stellt sich die Frage, ob BX1-Enzyme dieser beiden Pflanzen bei der Analyse nicht identifiziert wurden. Die Southernanalyse weist für *A. squarrosa* eindeutig zwei Sequenzen aus, die Allele oder homologe Gene darstellen können. Da zwei unterschiedliche cDNA-Klone isoliert wurden, liegt mit großer Wahrscheinlichkeit der ganze Bestand an *Igl*-Genen vor. *A. squarrosa* bildet nur eine geringe Menge an Benzoxazinonen, die Bereitstellung von Indol durch Enzyme mit den Kenndaten von AsIGL1 und AsIGL2 ist leicht nachvollziehbar.

Bei *L. galeobdolon* wurden hohe Benzoxazinonkonzentrationen im Bereich von *C. orientalis* und *Z. mays* gemessen. Es wurden cDNAs isoliert, die unterschiedliche Gene darstellen, die sich soweit unterscheiden, dass sie in der Southern-Hybridisierung jeweils spezifische Banden und auch Banden mit größerer Homologie aufzeigen. Diese Muster kann durch zwei Gene erklärt werden. Die Transkriptmengen-Analyse für *LgIgl1* und *LgIgl2* gibt keinen Anhaltspunkt, ob eines der Gene oder beide in die DIBOA-Biosynthese einbezogen sind. Obwohl es keinen Hinweis auf ein unentdecktes *Igl*-Gen gibt, kann seine Existenz nicht ausgeschlossen werden. Es kann aber spekuliert werden, die vorhandenen Enzyme mit

mittleren enzymatischen Kenndaten ausreichend Indol für die nächsten Schritte der DIBOA-Biosynthese bereitstellen.

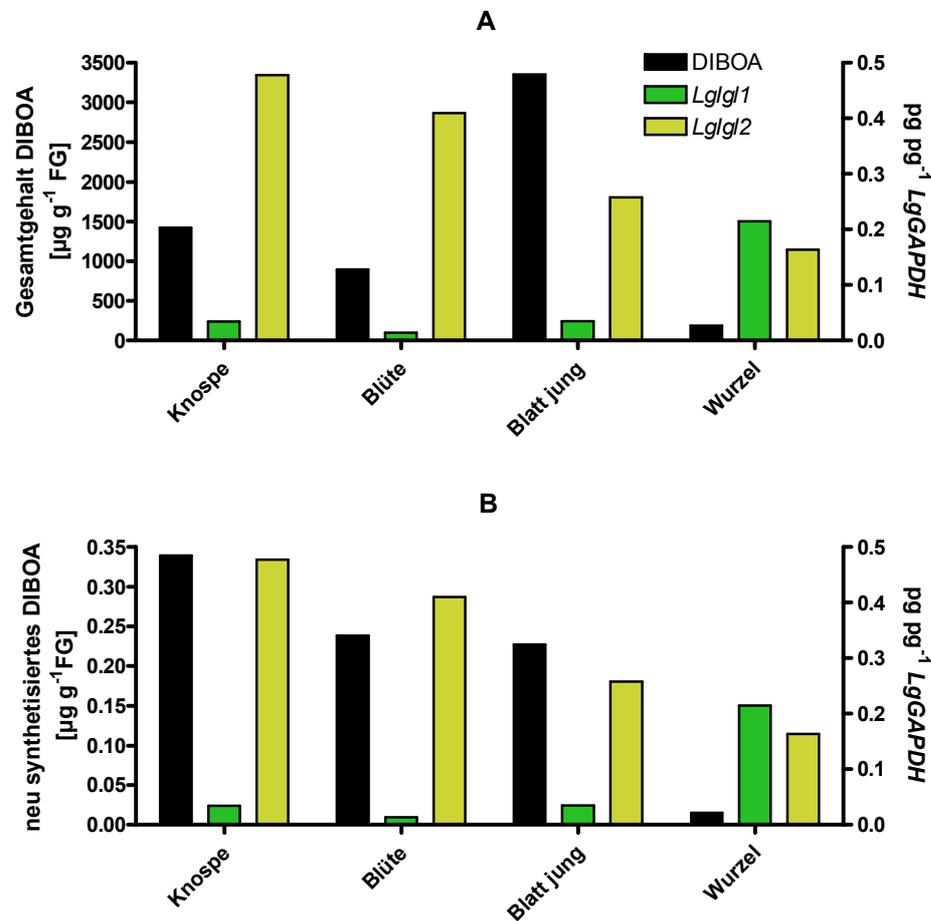


Abbildung 33: Vergleich der Transkriptmengen von *Lglg1* und *Lglg2* mit DIBOA-Konzentrationen in verschiedenen Pflanzenteilen. A: Gesamtgehalt an DIBOA. B: in 24 h neu synthetisiertes DIBOA.

Keine der untersuchten IGLs konnte der Tryptophanbiosynthese zugeordnet werden. Eine Komplexbildung wurde nicht nachgewiesen. Es ist unwahrscheinlich, dass diese Werte artifiziell durch Bedingungen der heterologen Expression hervorgerufen sind, da die enzymatischen Parameter der IGLs mit geringer Aktivität im Bereich der bakteriellen monomeren TSAs liegen. Unterstützt wird dies auch durch die vorhergesagten Eigenschaften der modellierten Proteine (4.2.3.2). Die Bildung des Komplexes bei *A. thaliana* scheint allgemein schwierig zu sein, da auch bei Yeast-2-Hybrid-Experimenten bis jetzt keine Interaktion nachgewiesen werden konnte (Celenza, Frey, Glawischig, persönliche Mitteilung). Eher unwahrscheinlich ist der Einfluss der Position, an der das Transitpeptid zur Expression abgeschnitten wurde. Der Start des heterologen Proteins wurde für alle Konstrukte möglichst analog zum Beginn der prozessierten Proteine (*AfTSA1*, *ZmBX1*) gelegt.

4.2.5 IGL-Proteine aus Monokotylen und dikotylen Pflanzen haben einen polyphyletischen Ursprung

Die Fragestellung dieser Arbeit ist, ob die Benzoxazinonbiosynthese in Monokotylen und Dikotylen mono- oder polyphyletischen Ursprungs ist. Dies kann anhand der *Bx1*-Gene überprüft werden. Monophyletisch entstandene *Bx1*-Gene wären enger miteinander verwandt als *Bx1* und *TSA* einer Pflanze. Im zweiten Fall wird angenommen, dass die Fähigkeit, Benzoxazinone zu synthetisieren im Laufe der Evolution unabhängig voneinander entstand. Hier würde man erwarten, dass *Bx1*-Sequenzen verschiedener Spezies keine gemeinsame Wurzel aufweisen würden.

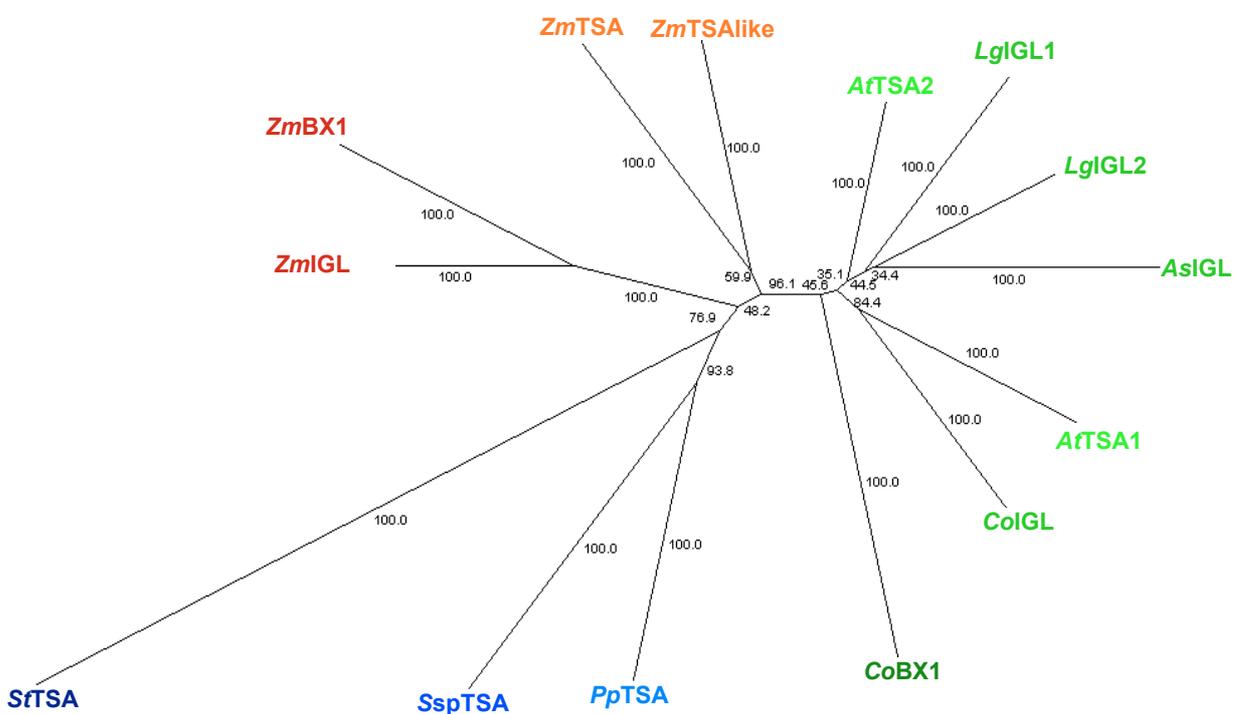


Abbildung 34: Phylogenetischer Stammbaum nach Neighbourjoining (Saitou und Nei, 1987), Bootstrap $n=1000$. Blau: Outgroup, *St*: *Salmonella typhimurium*, *Ssp*: *Synechococcus* sp., *Pp*: *Physcomitrella patens*. Grün: Dikot IGLs, *Co*: *C. orientalis*, *At*: *A. thaliana*, *As*: *A. squarrosa*, *Lg*: *L. galeobdolon*. Rot/Orange: Mais-IGL.

Die phylogenetische Analyse zeigt für die BX1-Funktion keine gemeinsame Wurzel auf. IGL-Proteine der Gräser zeigen eine sehr gute Gruppierung nach ihrer Funktion (Grün, *et al.*, 2005). Der phylogenetische Baum der Dikot- und Mais-IGL zeigte jedoch eine eindeutige Gruppierung von Monokot- und Dikot-IGLs (Abbildung 34). Das BX1-artige IGL CoBX1 ist zwar den anderen dikotylen IGL-Proteinen nicht sehr eng zugeordnet, aber eine Verwandtschaft zu den BX1-artigen aus *Z. mays* ist nicht zu erkennen.

In der Literatur findet man einige Beispiele zur polyphyletischen Evolution. Polyphyletischen Ursprungs sind zum Beispiel die Homospermidinsynthesen (HSS), die die erste spezifische

Reaktion der Pyrrolizidinalkaloidbiosynthese katalysieren. Sie entstanden durch Genduplikation der Deoxyhypusinsynthase (DHS) unabhängig in verschiedenen Familien der Angiospermen (Reimann, *et al.*, 2004). Beide Enzyme transferieren dabei NAD^+ -abhängig eine Aminobutylgruppe von Spermidin an das Substrat. Eine Besonderheit dieser Enzyme ist, dass DHS nicht nur die eigentliche Reaktion, die posttranslationale Aktivierung des Initiationsfaktors eIF5A katalysiert, sondern auch die Reaktion von HSS. Umgekehrt ist es für die HSS jedoch nicht möglich, eIF5A als Substrat zu akzeptieren (Ober und Hartmann, 1999). Diese Eigenschaft kann sehr gut dazu herangezogen werden, um die Enzyme dem Primär- oder Sekundärstoffwechsel zuzuordnen. Leider kann dies nicht auf die IGL-Enzyme angewendet werden, da in beiden Synthesewegen das gleiche Substrat verwendet und das gleiche Produkt gebildet wird.

Auch bei der Saponinbiosynthese findet man ein Beispiel dafür, dass Enzyme, die die gleiche Reaktion katalysieren unabhängig in unterschiedlichen Familien entstehen. Saponine werden von mehr als 1000 verschiedenen dikotylen Arten synthetisiert, in Gramineen sind sie jedoch nur bei Hafer (*Avena* spp.) zu finden. β -Amyrinsynthasen (bAS1) katalysieren den ersten spezifischen Schritt der Saponinbiosynthese. Die bAS1 von Hafer unterscheidet sich allerdings deutlich von den dikotylen β -Amyrinsynthasen, zeigt aber hohe Ähnlichkeit zu Cycloartenolsynthasen, die an der Sterolbiosynthese beteiligt sind. Bemerkenswert ist hierbei, dass beide Enzyme zwar das selbe Substrat verwenden, aber zu unterschiedlichen Produkten konvertieren (Qi, *et al.*, 2004)

4.3 Die Modifikation und Funktionalisierung

Bei Gräsern erfolgt die Modifikation und Funktionalisierung der Intermediate durch zwei Klassen von Enzymen, zum einen von Monooxygenasen, zum anderen von Dioxygenasen. Der Unterschied dieser beiden Klassen besteht darin, dass Dioxygenasen beide Sauerstoffatome an je ein Substrat binden (de Carolis und de Luca, 1994). In den meisten Fällen ist eines dieser beiden Substrate 2-Oxoglutarat, das zu Succinat weiterreagiert, dabei wird CO_2 freigesetzt. Durch Monooxygenasen wird ein Sauerstoffatom in das Substrat eingebaut, dabei wird das zweite zu H_2O reduziert (Chapple, 1998). Die am häufigsten vorkommenden Monooxygenasen sind Cytochrom P450 Enzyme.

4.3.1 Indol wird durch Cytochrom P450 Monooxygenasen modifiziert

Bei *C. orientalis* und *L. galeobdolon* konnte eine Inhibierung der P450 Enzyme durch ABT festgestellt werden. Ein Umsatz von ^{14}C -markiertem Indol zu ^{14}C -DIBOA wurde bei *C. orientalis* und *L. galeobdolon* nach 5 h signifikant gehemmt. Da in beiden Fällen keine Intermediate gefunden werden konnten, kann davon ausgegangen werden, dass mindestens

der erste Schritt der Benzoxazinonbiosynthese nach der Indolsynthese von einem Cytochrom P450 katalysiert wird. Dies wird auch durch *in vitro* Enzymtests bestätigt. Sowohl bei *C. orientalis* als auch bei *L. galeobdolon* konnte Indol von isolierten Mikrosomen in Indolinon umgesetzt werden.

4.3.2 Dioxygenasen und Cytochrom P450 Enzyme können bei *L. galeobdolon* die nächsten Schritte katalysieren

Ein weiterer Fütterungsversuch, bei dem Prohexadion-Ca als Dioxygenaseinhibitor eingesetzt wird, hat ergeben, dass die DIBOA-Neusynthese nach 5 h Inkubation bei *L. galeobdolon* zurückgeht. Da aber die Indolinon-Synthese durch *in vitro* Enzymtests mit Mikrosomen abhängig von NADPH nachgewiesen wurde, muss wenigstens einer der nächsten Schritte durch eine Dioxygenase katalysiert werden. Ein zusätzliches Argument für diese Annahme ist, dass auch der gesamte DIBOA-Gehalt im Vergleich zur Kontrolle um etwa 50 % niedriger ist. Die Dünnschichtchromatographie der Ethylacetatextrakte aus *L. galeobdolon* lässt jedoch kein Signal erkennen, das den R_f -Wert eines Intermediates zeigt.

Dass bei verschiedenen Stoffwechselwegen Dioxygenasen und Cytochrom P450 Monooxygenasen gegeneinander ausgetauscht werden können, wurde bereits mehrmals beschrieben. Um Flavone aus den gleichen Substraten zu synthetisieren, entstanden in Pflanzen zwei unterschiedliche Enzymsysteme. Ausschließlich bei den Apiaceae findet man die Flavonsynthase I (FSN I), eine 2-Oxoglutarat abhängige Dioxygenasen (Gebhardt, *et al.*, 2005). Bei allen anderen Pflanzen, die Flavone synthetisieren, katalysiert die Flavonsynthase II (FNS II), eine NADPH- und O_2 -abhängige Cytochrom P450 Monooxygenase, die entsprechende Reaktion (Martens und Mithöfer, 2005). Ein weiteres Beispiel ist die Gibberellinsynthese. Wo der Pilz *Gibberella fujikuroi* ein P450 Enzym für die Synthese benötigt, wird bei Pflanzen das strukturgleiche Gibberellin von Dioxygenasen synthetisiert (Hedden, *et al.*, 2001).

Bei *C. orientalis* ist keine signifikante Hemmung durch Prohexadion zu erkennen, auch auf den gesamten DIBOA-Gehalt zeigen sich keine Auswirkungen. Hier kann man also davon ausgehen, dass der ganze Biosyntheseweg bis DIBOA von Cytochrom P450 Enzymen katalysiert wird. Diese können wahrscheinlich sogar auf die Familie CYP71 eingegrenzt werden, da alle untersuchten P450 Enzyme, die Indol oder seine Derivate umsetzen können, in dieser Familie zu finden sind (<http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html>). Allerdings sind die Fütterungsversuche nur Ein Hinweis, eine Klonierung dieser Gene kann erst vollständige Gewissheit bringen.

4.4 Ausblick

Die Funktion der einzelnen IGL-Proteine soll auch auf genetischer Ebene durch Mutation bestätigt werden. Es sind jedoch für keine der drei dikotylen Pflanzen Knock-out-Mutanten erhältlich. Allerdings ist RNAi eine geeignete Möglichkeit, um die *Igl*-Gene gezielt zu inhibieren.

Da bei *A. squarrosa* die Benzoxazinone in der Wurzel zu finden sind, ist in diesem Fall eine *A. rhizogenes* induzierte Wurzelkultur sehr gut geeignet. Diese wurde bereits etabliert (vgl. 2.3.1) und auch das Vorhandensein von Benzoxazinonen wurde nachgewiesen. Ein RNAi-Konstrukt für *AsIgl* wurde in pRedRoot kloniert und in *A. rhizogenes* Arqua1 transformiert. Eine erfolgreiche Transformation von *A. squarrosa* konnte noch nicht nachgewiesen werden.

Bei *C. orientalis* wurden für *Colgl* und *CoBx1* RNAi-Konstrukte kloniert und in *A. tumefaciens* transformiert. Bis jetzt wurden noch keine stabil transformierten Pflanzen durch Infiltration des Meristems (2.3.4) erhalten. Eine weitere Möglichkeit ist eine transiente Transformation durch Infiltration von Blättern mit *A. tumefaciens* (Sparkes, *et al.*, 2006). Als Kontrolle soll hierbei die Glutamat-1-semialdehydaminotransferase (GSA) dienen. Das Fehlen dieses Enzyms führt zu einer Inhibierung der Chlorophyllsynthese. Für Tabak wurde bereits gezeigt, dass durch Antisense-Konstrukte die *Gsa*-Expression zurückgeht und dies zu Chlorosen an Blättern führt (Hofgen, *et al.*, 1994).

Interessant wäre sicherlich noch eine enzymatische Charakterisierung der IGL aus *Isatis tinctoria*. Da der Färberwaid vermutlich in großen Mengen Indol für die Isatinbiosynthese benötigt, ist eventuell auch hier eine effiziente IGL zu erwarten. Die Tatsache, dass *I. tinctoria* wie *A. thaliana* eine Brassicaceae ist, wäre sicherlich auch interessant bei der Analyse der phylogenetischen Verwandtschaft der IGL-Proteine.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Benzoxazinonbiosynthese ist ein sekundärer Stoffwechselweg, der in Gräsern weit verbreitet ist. Für sie ist der Syntheseweg weitgehend aufgeklärt. Man findet Benzoxazinone auch sporadisch bei wenigen Vertretern dikotyleter Familien. Untersuchungen an *Aphelandra squarrosa* (Acanthaceae), *Consolida orientalis* (Ranunculaceae) und *Lamium galeobdolon* (Lamiaceae) sollen die Frage des evolutionären Ursprungs der Benzoxazinonbiosynthese in Dikotylen aufklären.

Einbauversuche mit markierten Vorstufen lieferten den Beweis, dass Indol das Ausgangssubstrat der Benzoxazinonbiosynthese ist. Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit war die Analyse der Indol-3-Glycerinphosphatlyasen (IGL), die einzigen, in Pflanzen bekannten Enzyme, die Indol synthetisieren können. Im Primärmetabolismus sind sie als α -Untereinheit (TSA) des Tryptophansynthasekomplexes an der Tryptophansynthese beteiligt. TSAs zeigen als Monomer nur sehr geringe Umsatzraten. Die zu TSA homologen BX1-Enzyme der Gräser katalysieren dagegen effizient als Monomer die Bildung von Indol, den ersten spezifischen Schritt der Benzoxazinonbiosynthese, die so genannte „branch point“-Reaktion.

Bei *C. orientalis* wurde ein IGL mit besonderen Eigenschaften gefunden und charakterisiert. CoBX1 zeigt mit einem niedrigen K_m -Wert und einer sehr hohen Wechselzahl ($k_{cat} = 1,9 \text{ s}^{-1}$) Eigenschaften wie BX1 aus *Zea mays*. Ähnliche Aminosäuren am aktiven Zentrum von CoBX1 und ZmBX1 scheinen für diese hohe Aktivität charakteristisch zu sein. Eine Korrelation der Transkriptmengen von *CoBx1* mit der DIBOA-Neusyntheserate bestätigt die Beteiligung an der Benzoxazinonbiosynthese. Bei *A. squarrosa* und *L. galeobdolon* wurden keine BX1-artigen gefunden. Allerdings gibt es bei beiden Arten IGL, die eine höhere Umsatzrate zeigen, als monomere TSAs. Es ist nicht ausgeschlossen, dass diese Enzyme genug Indol für die Benzoxazinonbiosynthese bereitstellen können.

Für die Enzyme der „branch point“-Reaktion, liefert die phylogenetische Analyse deutliche Hinweise auf eine polyphyletische Evolution. Es können zwar alle IGL auf einen gemeinsamen Ursprung zurückgeführt werden, die BX1-artigen IGL sind jedoch erst nach der evolutionären Trennung von Gräsern und Dikotyledonen unabhängig voneinander entstanden.

Der nächste Schritt im Biosyntheseweg wird bei *C. orientalis* und *L. galeobdolon* durch Cytochrom P450 Monooxygenasen katalysiert. Indolinon wurde, wie bei den Gräsern, als erstes Intermediat gefunden. Auch die weiteren Schritte zu DIBOA werden bei *C. orientalis*

von P450 Enzymen katalysiert. Bei *L. galeobdolon* wurden auch Hinweise auf eine Beteiligung von Dioxygenasen gefunden.

SUMMARY

Benzoxazinone biosynthesis is a secondary plant metabolic pathway, ubiquitous in grasses. For them the biosynthetic pathway is well elucidated. Benzoxazinones are found sporadically in few members of dicotyledonous plant families. By analysis of the pathway in *Aphelandra squarrosa*, *Consolida orientalis* and *Lamium galeobdolon* the question of the evolutionary origin of the benzoxazinone biosynthesis in dicotyledonous plants should be addressed.

Incorporation of labelled substrates gave evidence for indole as precursor of benzoxazinone biosynthesis. Focus of this work was the analysis of indole-3-glycerol phosphate lyases (IGL), the only known enzymes in plants capable of producing indole. In primary metabolism the IGL TSA (tryptophan synthase alpha-subunit) is part of the tryptophan synthase complex and involved in tryptophan biosynthesis. Monomeric TSAs show very low activity. In contrast TSA homologous BX1 enzymes in grasses efficiently catalyse the formation of indole, the first specific step in benzoxazinone biosynthesis, the so-called branch point reaction.

In *C. orientalis* an IGL with special features was found and characterised. CoBX1 shows low K_m -value and very high turnover number ($k_{cat} = 1,9 \text{ s}^{-1}$), like BX1 in maize. Similar amino acids in the active centre of CoBX1 and ZmBX1 seem to be characteristic for high activity. Correlation of transcript levels of *CoBx1* and the amount of newly synthesised DIBOA confirm the participation in benzoxazinone biosynthesis. In *A. squarrosa* and *L. galeobdolon* no BX1 enzymes were found. However, in both species IGLs were found showing higher activity than monomeric *E. coli* TSAs. These enzymes may be sufficient to provide indole for the secondary metabolism.

Phylogenetic analysis of enzymes of the branch point reaction provides an indication of polyphyletic evolution. BX1-Enzymes developed after separation of grasses and dicots independently.

In *C. orientalis* and *L. galeobdolon* the next step of benzoxazinone biosynthesis is catalysed by cytochrome P450 monooxygenases. Like in grasses, indolin-2-one was confirmed as first intermediate. In *C. orientalis* further steps to DIBOA are also catalysed by P450 enzymes. In *L. galeobdolon* indication for participation of dioxygenases was found.

6 LITERATUR

- Alipieva, K. I., Taskova, R. M., Evstatieva, L. N., Handjieva, N. V. and Popov, S. S. (2003) Benzoxazinoids and iridoid glucosides from four *Lamium* species. *Phytochemistry* 64: 1413-7
- Anderson, K. S., Miles, E. W. and Johnson, K. A. (1991) Serine modulates substrate channeling in tryptophan synthase. A novel intersubunit triggering mechanism. *J Biol Chem* 266: 8020-33
- APG (2003) An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. pp 399-436
- Bailey, B. A. and Larson, R. L. (1991) Maize Microsomal Benzoxazinone N-Monooxygenase. *Plant Physiol* 95: 792-796
- Barnes, C. J., Lavy, T. L. and Mattice, J. D. (1987) Exposure of non-applicator personnel and adjacent areas to aerially applied propanil. *Bull Environ Contam Toxicol* 39: 126-33
- Baumeler, A., Hesse, M. and Werner, C. (2000) Benzoxazinoids-cyclic hydroxamic acids, lactams and their corresponding glucosides in the genus *Aphelandra* (Acanthaceae). *Phytochemistry* 53: 213-22
- Bernhardt, R. (2004a) Cytochrome P-450. *Encyclopedia Biol. Chem.*: 544–549
- Bernhardt, R. (2004b) Optimized chimeragenesis; creating diverse p450 functions. *Chem Biol* 11: 287-8
- Birnboim, H. and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids. Res.* 7: 1513-1523
- Blum, U., Wentworth, T. R., Klein, K., Worsham, A. D., King, L. D., Gerig, T. M. and Lyu, S. W. (1991) Phenolic acid content of soils from wheat-no till, wheat-conventional till, and fallow-conventional till soybean cropping systems. *Journal of Chemical Ecology* V17: 1045-1068
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-54

- Bravo, H. R., Copaja, S. V., Figueroa-Duarte, S., Lamborot, M. and San Martin, J. (2005) 1,4-benzoxazin-3-one, 2-benzoxazolinone and gallic acid from *Calceolaria thyrsoflora* Graham and their antibacterial activity. *Z Naturforsch [C]* 60: 389-93
- Bravo, H. R., Copaja, S. V. and San Martin, J. (2004) Contents of 1,4-benzoxazin-3-ones and 2-benzoxazolinone from *Stenandrium dulce* (Nees). *Z Naturforsch [C]* 59: 177-80
- Bullock, W., Fernandez, J. and Short, J. (1978) XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA* *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Bio Tech*: 376-378
- Chapple, C. (1998) MOLECULAR-GENETIC ANALYSIS OF PLANT CYTOCHROME P450-DEPENDENT MONOOXYGENASES. pp 311-343
- Chiapella, C., Radovan, R. D., Moreno, J. A., Casares, L., Barbe, J. and Llagostera, M. (2000) Plant activation of aromatic amines mediated by cytochromes P450 and flavin-containing monooxygenases. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 470: 155-160
- Cicek, M. and Esen, A. (1998) Structure and expression of a dhurrinase (beta-glucosidase) from sorghum. *Plant Physiol* 116: 1469-78
- Crawford, I. P., Niermann, T. and Kirschner, K. (1987) Prediction of secondary structure by evolutionary comparison: application to the alpha subunit of tryptophan synthase. *Proteins* 2: 118-29
- Creighton, T. E. (1970) A steady-state kinetic investigation of the reaction mechanism of the tryptophan synthetase of *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* 13: 1-10
- Creighton, T. E. and Yanofsky, C. (1966) Indole-3-glycerol phosphate synthetase of *Escherichia coli*, an enzyme of the tryptophan operon. *J Biol Chem* 241: 4616-24
- de Carolis, E. and de Luca, V. (1994) 2-Oxoglutarate-dependent dioxygenase and related enzymes: Biochemical characterization. *Phytochemistry* 36: 1093-1107
- Dellaporta, S. L., Wood, J. and Hicks, J. B. (1983) A plant DNA miniprep: version II *Plant Mol. Biol. Rep* 1: 19-21
- Desai, S. R., Kumar, P. and Chilton, W. S. (1996) Indole is an Intermediate in the Biosynthesis of cyclic hydroxamic acids in maize. *Chem. Commun.* : 1321

- Dunn, M. F., Aguilar, V., Brzovic, P., Drewe, W. F., Jr., Houben, K. F., Leja, C. A. and Roy, M. (1990) The tryptophan synthase holoenzyme complex transfers indole between the alpha- and beta-sites via a 25-30 Å long tunnel. *Biochemistry* 29: 8598-607
- Dunn, M. F., Aguilar, V., Drewe, W. F., Jr., Houben, K., Robustelli, B. and Roy, M. (1987) The interconversion of *E. coli* tryptophan synthase intermediates is modulated by allosteric interactions. *Indian J Biochem Biophys* 24: suppl 44-51
- Ernesto, G. and Hermann, M. N. (1997) Environmental Effects on the Accumulation of Hydroxamic Acids in Wheat Seedlings: The Importance of Plant Growth Rate. *Journal of Chemical Ecology* 23: 543-551
- Esen, A. (1992) Purification and Partial Characterization of Maize (*Zea mays* L.) beta-Glucosidase. *Plant Physiol* 98: 174-182
- Fischer, T. C., Halbwirth, H., Meisel, B., Stich, K. and Forkmann, G. (2003) Molecular cloning, substrate specificity of the functionally expressed dihydroflavonol 4-reductases from *Malus domestica* and *Pyrus communis* cultivars and the consequences for flavonoid metabolism. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 412: 223-230
- Frame, B. R., Shou, H., Chikwamba, R. K., Zhang, Z., Xiang, C., Fonger, T. M., Pegg, S. E., Li, B., Nettleton, D. S., Pei, D. and Wang, K. (2002) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of maize embryos using a standard binary vector system. *Plant Physiol* 129: 13-22
- Frey, M., Chomet, P., Glawischnig, E., Stettner, C., Grün, S., Winklmeier, A., Eisenreich, W., Bacher, A., Meeley, R. B., Briggs, S. P., Simcox, K. and Gierl, A. (1997) Analysis of a chemical plant defense mechanism in grasses. *Science* 277: 696-9
- Frey, M., Huber, K., Park, W. J., Sicker, D., Lindberg, P., Meeley, R. B., Simmons, C. R., Yalpani, N. and Gierl, A. (2003) A 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase is integrated in DIMBOA-biosynthesis. *Phytochemistry* 62: 371-6
- Frey, M., Stettner, C., Pare, P. W., Schmelz, E. A., Tumlinson, J. H. and Gierl, A. (2000) An herbivore elicitor activates the gene for indole emission in maize. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 14801-6
- Gamborg, O. L., Miller, R. A. and Ojima, K. (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* 50: 151-8

- Gebhardt, Y., Witte, S., Forkmann, G., Lukacin, R., Matern, U. and Martens, S. (2005) Molecular evolution of flavonoid dioxygenases in the family Apiaceae. *Phytochemistry* 66: 1273-84
- Gierl, A. and Frey, M. (2001) Evolution of benzoxazinone biosynthesis and indole production in maize. *Planta* 213: 493-8
- Glawischnig, E., Grün, S., Frey, M. and Gierl, A. (1999) Cytochrome P450 monooxygenases of DIBOA biosynthesis: specificity and conservation among grasses. *Phytochemistry* 50: 925-30
- Gross, D., Lehmann, H. and Schuette, H. R. (1974) Biosynthesis of gramine. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen* 166: 281-7
- Grün, S., Frey, M. and Gierl, A. (2005) Evolution of the indole alkaloid biosynthesis in the genus *Hordeum*: distribution of gramine and DIBOA and isolation of the benzoxazinoid biosynthesis genes from *Hordeum lechleri*. *Phytochemistry* 66: 1264-72
- Guengerich, F. P. (2001a) Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chem Res Toxicol* 14: 611-50
- Guengerich, F. P. (2001b) Uncommon P450-catalyzed reactions. *Curr Drug Metab* 2: 93-115
- Hamilton, R. (1964) A corn mutant deficient in 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one with an altered tolerance of atrazine. *Weeds* 12: 27-30
- Harborne, J. B. (1993) *Introduction to Ecological Biochemistry*. Academic Press, London
- Harborne, J. B. (2001) Twenty-five years of chemical ecology. *Nat Prod Rep* 18: 361-79
- Hedden, P., Phillips, A. L., Rojas, M. C., Carrera, E. and Tudzynski, B. (2001) Gibberellin Biosynthesis in Plants and Fungi: A Case of Convergent Evolution? *J Plant Growth Regul* 20: 319-331
- Hill, A. V. (1910) The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves. *J. Physiol.*: iv-vii.
- Hofgen, R., Axelsen, K. B., Kannangara, C. G., Schuttke, I., Pohlenz, H., Willmitzer, L., Grimm, B. and Wettstein, D. V. (1994) A Visible Marker for Antisense mRNA Expression in Plants: Inhibition of Chlorophyll Synthesis with a Glutamate-1-Semialdehyde Aminotransferase Antisense Gene. *PNAS* 91: 1726-1730

- Hood, E. E., Helmer, G. L., Fraley, R. T. and Chilton, M. D. (1986) The hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in a region of pTiBo542 outside of T-DNA. *J Bacteriol* 168: 1291-301
- Huo, C., An, D., Wang, B., Zhao, Y. and Lin, W. (2005) Structure elucidation and complete NMR spectral assignments of a new benzoxazolinone glucoside from *Acanthus ilicifolius*. *Magn Reson Chem* 43: 343-5
- Hyde, C. C., Ahmed, S. A., Padlan, E. A., Miles, E. W. and Davies, D. R. (1988) Three-dimensional structure of the tryptophan synthase alpha 2 beta 2 multienzyme complex from *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem* 263: 17857-71
- Iwamura, H., Nakagawa, E. and Hirai, N. (1996) Localization of benzoxazinones that occur constitutively in wheat seedlings. *Z Naturforsch [C]* 51: 807-12
- Kanchanapoom, T., Kasai, R., Picheansoonthon, C. and Yamasaki, K. (2001) Megastigmane, aliphatic alcohol and benzoxazinoid glycosides from *Acanthus ebracteatus*. *Phytochemistry* 58: 811-7
- Kim, T.-W., Chang, S. C., Lee, J. S., Hwang, B., Takatsuto, S., Yokota, T. and Kim, S.-K. (2004) Cytochrome P450-catalyzed brassinosteroid pathway activation through synthesis of castasterone and brassinolide in *Phaseolus vulgaris*. *Phytochemistry* 65: 679-689
- Kriechbaumer, V. (2006) Tryptophan- und Auxinbiosynthese in *Zea mays*. TU München
- Kulik, V., Hartmann, E., Weyand, M., Frey, M., Gierl, A., Niks, D., Dunn, M. F. and Schlichting, I. (2005) On the structural basis of the catalytic mechanism and the regulation of the alpha subunit of tryptophan synthase from *Salmonella typhimurium* and BX1 from maize, two evolutionarily related enzymes. *J Mol Biol* 352: 608-20
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-5
- Limpens, E., Ramos, J., Franken, C., Raz, V., Compaan, B., Franssen, H., Bisseling, T. and Geurts, R. (2004) RNA interference in *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of *Arabidopsis* and *Medicago truncatula*. *J Exp Bot* 55: 983-92
- Liu, W., Christenson, S. D., Standage, S. and Shen, B. (2002) Biosynthesis of the Eneidyne Antitumor Antibiotic C-1027. *Science* 297: 1170-1173

- Lloyd, G. and McCown, B. (1980) Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. Proc. Int. Plant Prop. Soc.: 421–427
- Logemann, J., Schell, J. and Willmitzer, L. (1987) Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. Anal Biochem 163: 16-20
- Macias, F. A., Marin, D., Oliveros-Bastidas, A. and Molinillo, J. M. (2006) Optimization of benzoxazinones as natural herbicide models by lipophilicity enhancement. J Agric Food Chem 54: 9357-65
- Makleit, P. and Pethö, P. (1999) DATE Tudományos Közleményei 34: 33-39
- Margie, M. P., Huixia, S., Zibiao, G., Zhanyuan, Z., Anjan, K. B. and Kan, W. (2004) Assessment of conditions affecting *Agrobacterium*-mediated soybean transformation using the cotyledonary node explant. Euphytica V136: 167-179
- Martens, S. and Mithöfer, A. (2005) Flavones and flavone synthases. Phytochemistry 66: 2399-2407
- Melanson, D., Chilton, M. D., Masters-Moore, D. and Chilton, W. S. (1997) A deletion in an indole synthase gene is responsible for the DIMBOA-deficient phenotype of bxbx maize. Proc Natl Acad Sci U S A 94: 13345-50
- Michaelis, L. and Menten, M. L. (1913) Kinetik der Invertinwirkung. Biochem. Z. : 333–369
- Miles, E. W. (1991) Structural basis for catalysis by tryptophan synthase. Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol 64: 93-172
- Miles, E. W. (1995) Tryptophan synthase. Structure, function, and protein engineering. Subcell Biochem 24: 207-54
- Miles, E. W. (2001) Tryptophan synthase: a multienzyme complex with an intramolecular tunnel. Chem Rec 1: 140-51
- Miles, E. W., McPhie, P. and Yutani, K. (1988) Evidence that glutamic acid 49 of tryptophan synthase alpha subunit is a catalytic residue. Inactive mutant proteins substituted at position 49 bind ligands and transmit ligand-dependent to the beta subunit. J Biol Chem 263: 8611-4
- Miles, E. W., Yutani, K. and Ogasahara, K. (1982) Guanidine hydrochloride induced unfolding of the alpha subunit of tryptophan synthase and of the two alpha

- proteolytic fragments: evidence for stepwise unfolding of the two alpha domains. *Biochemistry* 21: 2586-92
- Milton, D. L., Napier, M. L., Myers, R. M. and Hardman, J. K. (1986) In vitro mutagenesis and overexpression of the *Escherichia coli* trpA gene and the partial characterization of the resultant tryptophan synthase mutant alpha-subunits. *J Biol Chem* 261: 16604-15
- Mugford, C. A., Mortillo, M., Mico, B. A. and Tarloff, J. B. (1992) 1-Aminobenzotriazole-Induced Destruction of Hepatic and Renal Cytochromes P450 in Male Sprague-Dawley Rats. pp 43-49
- Nagata, S., Hyde, C. C. and Miles, E. W. (1989) The alpha subunit of tryptophan synthase. Evidence that aspartic acid 60 is a catalytic residue and that the double alteration of residues 175 and 211 in a second-site revertant restores the proper geometry of the substrate binding site. *J Biol Chem* 264: 6288-96
- Nezbedova, L., Hesse, M., Drandarov, K., Bigler, L. and Werner, C. (2001) Phenol oxidative coupling in the biogenesis of the macrocyclic spermine alkaloids aphelandrine and orantine in *Aphelandra* sp. *Planta* 213: 411-7
- Niemeyer, H., Pesel, E., Copaja, S., Bravo, H., Franke, S. and Francke, W. (1990) Changes in hydroxamic acid levels of wheat plants induced by aphid feeding. *Phytochemistry*: 447-449
- Niemeyer, H. M. (1988) Hydroxamic acid content of *Triticum* species. *Euphytica* 289-293
- Nomura, T., Ishihara, A., Imaishi, H., Endo, T. R., Ohkawa, H. and Iwamura, H. (2002) Molecular characterization and chromosomal localization of cytochrome P450 genes involved in the biosynthesis of cyclic hydroxamic acids in hexaploid wheat. *Mol Genet Genomics* 267: 210-7
- Ober, D. and Hartmann, T. (1999) Homospermidine synthase, the first pathway-specific enzyme of pyrrolizidine alkaloid biosynthesis, evolved from deoxyhypusine synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 14777-82
- Ogasahara, K., Yutani, K., Suzuki, M., Sugino, Y., Nakanishi, M. and Tsuboi, M. (1980) State of Tyr49 in a mutant tryptophan synthase alpha-subunit substituted at position 49. *J Biochem (Tokyo)* 88: 1733-8

- Omura, T. and Sato, R. (1964) The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. Part I. Evidence for its hemoprotein nature. *J. Biol. Chem.* 239: 2370–2378
- Osbourn, A. E. (1996) Preformed Antimicrobial Compounds and Plant Defense against Fungal Attack. *Plant Cell* 8: 1821-1831
- Osterrieder, A. (2004) Die subzelluläre Lokalisierung von DIMBOA und DIMBOA Biosynthesegenen in Zea Mays. Diplomarbeit TU München
- Özden, S., Özden, T., Attila, I., Kucukislamoglu, M. and Okatan, A. (1992) Isolation and identification via high-performance liquid chromatography and thin-layer chromatography of benzoxazolinone precursors from *Consolida orientalis* flowers. *Journal of Chromatography A* 609: 402-406
- Pan, P., Woehl, E. and Dunn, M. F. (1997) Protein architecture, dynamics and allostery in tryptophan synthase channeling. *Trends in Biochemical Sciences* 22: 22-27
- Peracchi, A., Bettati, S., Mozzarelli, A., Rossi, G. L., Miles, E. W. and Dunn, M. F. (1996) Allosteric regulation of tryptophan synthase: effects of pH, temperature, and alpha-subunit ligands on the equilibrium distribution of pyridoxal 5'-phosphate-L-serine intermediates. *Biochemistry* 35: 1872-80
- Peracchi, A., Mozzarelli, A. and Rossi, G. L. (1995) Monovalent cations affect dynamic and functional properties of the tryptophan synthase alpha 2 beta 2 complex. *Biochemistry* 34: 9459-65
- Perez, F. J. (1990) Allelopathic effect of hydroxamic acids from cereals on *Avena saliva* and *A. fatua*. *Phytochemistry* 29: 773-776
- Perez, F. J. and Ormeno-Nunez, J. (1991) Differences in hydroxamic acid content in roots and root exudates of wheat (*Triticum aestivum* L.) and rye (*Secale cereale* L.): Possible role in allelopathy. *J. Chem. Ecol.* 17:1037-1043. *J. Chem. Ecol.* 17: 1037-1043
- Pethö, M. (1993) Occurrence of Cyclic Hydroxamic Acids in the Tissues of Barnyard Grass (*Echinochloa crus-galli* L./P.B.) and Their Possible Role in Allelopathy. *Acta Agron. Hung* 42: 197-202
- Pichersky, E. and Gang, D. R. (2000) Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. *Trends Plant Sci* 5: 439-45

- Piovano, M. A. and Bernardello, L. M. (1991) Chromosome Numbers in Argentinean Acanthaceae. *Systematic Botany* 16: 89-97
- Poschenrieder, C., Tolra, R. P. and Barcelo, J. (2005) A role for cyclic hydroxamates in aluminium resistance in maize? *J Inorg Biochem* 99: 1830-6
- Qi, X., Bakht, S., Leggett, M., Maxwell, C., Melton, R. and Osbourn, A. (2004) A gene cluster for secondary metabolism in oat: implications for the evolution of metabolic diversity in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 8233-8
- Quandt, H. J., Pühler, A. and Broer, I. (1993) Transgenic root nodules of *Vicia hirsuta*: a fast and efficient system for the study of gene expression in indeterminate-type nodules. *Molecular Plant-Microbe Interactions*: 699–706.
- Rademacher, W. (2000) GROWTH RETARDANTS: Effects on Gibberellin Biosynthesis and Other Metabolic Pathways. pp 501-531
- Radwanski, E. R. and Last, R. L. (1995) Tryptophan biosynthesis and metabolism: biochemical and molecular genetics. *Plant Cell* 7: 921-34
- Radwanski, E. R., Zhao, J. and Last, R. L. (1995) *Arabidopsis thaliana* tryptophan synthase alpha: gene cloning, expression, and subunit interaction. *Mol Gen Genet* 248: 657-67
- Reimann, A., Nurhayati, N., Backenkohler, A. and Ober, D. (2004) Repeated Evolution of the Pyrrolizidine Alkaloid-Mediated Defense System in Separate Angiosperm Lineages. pp 2772-2784
- Roemmelt, S., Zimmermann, N., Rademacher, W. and Treutter, D. (2003) Formation of novel flavonoids in apple (*Malus domestica*) treated with the 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase inhibitor prohexadione-Ca. *Phytochemistry* 64: 709-716
- Rosenbaumová, R., Plačková, I. and Suda, J. (2004) Variation in *Lamium* subg. *Galeobdolon* (Lamiaceae) – insights from ploidy levels, morphology and isozymes. *Plant Systematics and Evolution* 244: 219-244
- Ruckpaul, K., Rein, H. and Blanck, J. (1989) Regulation mechanism of the activity of the hepatic endoplasmic cytochrome P-450. In: K. Ruckpaul and H. Rein (eds) *Basis and Mechanism of Regulation of Cytochrome P450*. 1. Akademie-Verlag, Berlin, pp 1–55

- Ruvinov, S. B., Yang, X. J., Parris, K. D., Banik, U., Ahmed, S. A., Miles, E. W. and Sackett, D. L. (1995) Ligand-mediated changes in the tryptophan synthase indole tunnel probed by Nile red fluorescence with wild type, mutant, and chemically modified enzymes. *J Biol Chem* 270: 6357-69
- Sahi, S. V., Chilton, M. D. and Chilton, W. S. (1990) Corn metabolites affect growth and virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 3879-83
- Saitou, N. and Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406-25
- Sambrook J, Fritsch EF and T, M. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. . Cold Spring Harbor, New York, USA
- Sambrook, J., Fritsch, E. and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. . Cold Spring Harbor, New York, USA
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5463-7
- Sicker, D., Frey, M., Schulz, M. and Gierl, A. (2000) Role of natural benzoxazinones in the survival strategy of plants. *Int Rev Cytol* 198: 319-46
- Simon, J., Bosch, M., Molero, J. and Blanché, C. (1999) A CONSPECT OF CHROMOSOME NUMBERS IN TRIBE DELPHINIEAE (RANUNCULACEAE).
- Smith, O. H. and Yanofsky, C. (1963) [86] Intermediates in the biosynthesis of tryptophan. *Methods in Enzymology*. Academic Press, pp 590-597
- Sono, M., Roach, M. P., Coulter, E. D. and Dawson, J. H. (1996) Hemecontaining oxygenases. *Chem. Rev.* 96: 2841–2888
- Sparkes, I. A., Runions, J., Kearns, A. and Hawes, C. (2006) Rapid, transient expression of fluorescent fusion proteins in tobacco plants and generation of stably transformed plants. *Nat Protoc* 1: 2019-25
- Strambini, G. B., Cioni, P., Peracchi, A. and Mozzarelli, A. (1992) Conformational changes and subunit communication in tryptophan synthase: effect of substrates and substrate analogs. *Biochemistry* 31: 7535-42

- Studier, F. W. and Moffatt, B. A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology* 189: 113-130
- von Rad, U., Hüttl, R., Lottspeich, F., Gierl, A. and Frey, M. (2001) Two glucosyltransferases are involved in detoxification of benzoxazinoids in maize. *Plant J* 28: 633-42
- Walkerpeach, C. and Velten, J. (1994) *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plant cells cointegrate and binary vector systems. In: S. Gelvin and R. Schilperoort (eds) *Plant Molecular Biology Manual*. Kluwer Academic Publishers, Belgium., pp 1-19
- Warnock, D. F., Hutchison, W. D., Tong, C. B. S. and Davis, D. W. (2001) Evaluating Maize for Allelochemicals That Affect European Corn Borer (Lepidoptera: Crambidae) Larval Development. *Crop Sci* 41: 1761-1771
- Weischet, W. O. and Kirschner, K. (1976) Steady-state kinetic studies of the synthesis of indoleglycerol phosphate catalyzed by the alpha subunit of tryptophan synthase from *Escherichia coli*. Comparison with the alpha2 beta2-complex. *Eur J Biochem* 65: 375-85
- Werck-Reichhart, D. and Feyereisen, R. (2000) Cytochromes P450: a success story. *Genome Biol* 1: REVIEWS3003
- Werck-Reichhart, D., Hehn, A. and Didierjean, L. (2000) Cytochromes P450 for engineering herbicide tolerance. *Trends Plant Sci* 5: 116-23
- Weyand, M. and Schlichting, I. (1999) Crystal structure of wild-type tryptophan synthase complexed with the natural substrate indole-3-glycerol phosphate. *Biochemistry* 38: 16469-80
- Wink, J., Gandhi, J., Kroppenstedt, R. M., Seibert, G., Straubler, B., Schumann, P. and Stackebrandt, E. (2004) *Amycolatopsis decaplanina* sp. nov., a novel member of the genus with unusual morphology. *Int J Syst Evol Microbiol* 54: 235-9
- Wink, M. (2003) Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry* 64: 3-19
- Wink, M. and Schimmer, O. (1999) Modes of action of defensive secondary metabolites. In: E. Wink (ed) *Function of Plant secondary metabolites and their exploitation in biotechnology*. Sheffield Academic Press and CRC Press, pp 17–133.

- Wink, M. and Waterman, P. (1999) Chemotaxonomy in relation to molecular phylogeny of plants. In: M. Wink (ed) *Biochemistry of Plant Secondary Metabolism*. Sheffield Academic Press and CRC Press, pp 300–341
- Wu, H., Haig, T., Pratley, J., Lemerle, D. and An, M. (2001) Allelochemicals in wheat (*Triticum aestivum* L.): production and exudation of 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one. *J Chem Ecol* 27: 1691-700
- Yutani, K., Khechinashvili, N. N., Lapshina, E. A., Privalov, P. L. and Sugino, Y. (1982) Calorimetric study of tryptophan synthase alpha-subunit and two mutant proteins. *Int J Pept Protein Res* 20: 331-6
- Yutani, K., Ogasahara, K. and Sugino, Y. (1980) pH dependence of stability of the wild-type tryptophan synthase alpha-subunit and two mutant proteins (Glu49 replaced by Met or Gln). *J Mol Biol* 144: 455-65
- Yutani, K., Ogasahara, K., Sugino, Y. and Matsushiro, A. (1977) Effect of a single amino acid substitution on stability of conformation of a protein. *Nature* 267: 274-5
- Yutani, K., Ogasahara, K., Suzuki, M. and Sugino, Y. (1979) Comparison of denaturation by guanidine hydrochloride of the wild type tryptophan synthase alpha-subunit of *Escherichia coli* and two mutant protein (Glu 49 replaced by Met or Gln). *J Biochem (Tokyo)* 85: 915-21
- Yutani, K., Ogasahara, K., Tsujita, T., Kanemoto, K., Matsumoto, M., Tanaka, S., Miyashita, T., Matsushiro, A., Sugino, Y. and Miles, E. W. (1987) Tryptophan synthase alpha subunit glutamic acid 49 is essential for activity. Studies with 19 mutants at position 49. *J Biol Chem* 262: 13429-33
- Zhang, J., Boone, L., Kocz, R., Zhang, C., Binns, A. N. and Lynn, D. G. (2000) At the maize/*Agrobacterium* interface: natural factors limiting host transformation. *Chem Biol* 7: 611-21
- Zunniga, G. and Massardo, F. (1991) Hydroxamic acid content in undifferentiated and differentiated tissues of wheat. *Phytochemistry*: 3281–328

7 ANHANG

Sequenzen der cDNA-Klone der isolierten *IgI*-Gene.*A. squarrosa*:

AsIGL-1 1 M A A A
AsIgl-1 3 GAGGATTGGGAAGAATCGGCTTGATTGAATAGAGACCTAAGAACGGTGATGGCTGCTGCT

21 A L K A S C F V Q P K A S F D T R G R R
63 GCTCTCAAAGCAAGTTGCTTCGTCAGCCGAAGGCCAGTTTCGATACCAGAGGACGACGC

41 R S L L A V P T S T S F K C K P P M A A
123 CGTTTCGCTTCTTGCTGTTCCGACGAGCACATCCTTCAAGTGTAAGCCCCGATGGCTGCT

61 L T T A P T L S I S E T F S K L K Q R G
183 CTCACGACTGCCCAACCCTTCAATATCCGAAACTTTCTCCAAGTTGAAGCAGCGGGGA

81 E V A L I P Y I T A G D P D L S T T A K
243 GAAGTGGCGTTGATTCCATACATTACAGCTGGAGATCCTGACCTTCAACCACTGCAAAA

101 A L K I L D S S G A D I I E L G V P Y S
303 GCGCTGAAAATCCTTGATTCATCTGGCGCAGACATCATAGAATTGGGGTTCCCTACTCG

121 D P L A D G P V I Q A A A T R A L A R G
363 GATCCTTTGGCTGACGGTCCGTATCCAGGCTGCAGCTACACGTGCATTAGCCAGGGGA

141 A S F E K V I G M L K D V V P Q L S S P
423 GCCAGCTTTGAGAAGGTCATTGGGATGTTGAAGGACGTGGTTCCTCAACTATCATCTCCA

161 I A L F I Y Y N V I L K R G V K K F V T
483 ATTGCACTATTCATATATTATAATGTCATACTGAAGCGGGTGCAAGAAATTCGTGACC

181 T L K E T G V H G I I V P D V P L E E T
543 ACCTTGAAAGAACTGGAGTTCATGGAATTATTGTTCCGGATGTGCCCTCTCGAGGAGACT

201 E L L R N E A V K Y N I E M V L L T T P
603 GAGTTATTGAGAAATGAAGCTGTAAATACAATATAGAAATGGTGCTGCTTACGACCCCT

221 T T P T E R M K A I A E V A Q G F I Y L
663 ACGACTCCTACAGAACGAATGAAAGCCATTGCTGAAGTTGCACAAGGATTTATCTACCTT

241 V S S V G V T G A R A S V S D K V P S L
723 GTAAGCTCAGTGGGCGTCACGGGAGCAAGGGCATCAGTCAGCGACAAGGTTCCATCTCTC

261 L H E I R E V T N K P V A V G F G I S K
783 CTACATGAAATTAGAGAGGTAACCAACAAACCAGTGGCAGTTGGTTTGGCATATCAAAA

281 P E H V K Q V A E W G A D G V I I G S A
843 CCCGAGCATGTTAAACAGGTGGCTGAATGGGGGCGAGATGGAGTGATCATTGGTAGTGCC

301 M V K V L G E A N S P E E G L K D L E A
903 ATGGTCAAGGTGCTGGGTGAAGCAAACCTCCTGAGGAGGGCTTGAAAGATTTGGAAGCC

321 F M K S L K A A A T R G D S V L L
963 TTCATGAAAAGCTTGAAAGCTGTGCAACGAGGGTGATTTCAGTTCTGTTATAGGATTCC

1023 CTTATGAAGCAGAAGATTTGACTTAATTTCCCTGACACTTAAAAATGGTCGGATACAATG

1083 GATAGCATGTTCTTAGCCCTCACCATTGGGGCTTGGCAAGTTGGCTGTAGCAAAGTTCC

1143 TTTGCCCTTGATTTAGCCCTCAGTTTCAAGTGTTTCCCATCTTTATTAATATGTTATTA

1203 TTTATAAAATAAAGGACGAATGTGCGAATTTTGATGAATATTATTTATTTATATTAATAA

1263 AAAAAAAAAA

AsIGL-2 1 R T V M A A A A L K A S C F V Q P K A S
AsIgl-2 2 AGAACGGTGATGGCTGCTGCTCTCAAAGCAAGTTGCTTCGTCCAGCCGAAGGCCAGT

21 F N T R G R R R S L L A V P T S T S L K
62 TTCAATACCAGAGGACGACGCCGTTTCGCTTCTTGCTGTTCCGACGAGCACATCCTTGAAG

41 C K P P M A A L T T A P T L P I S E T F
122 TGTAAGCCCCGATGGCTGCTCTCACGACTGCCCTACCCTTCCAATATCCGAAACTTTC

61 S K L K Q R G E V A L I P Y I T A G D P
182 TCCAAGTTGAAGCAGCGGGGAGAAGTGGCGTTGATTCCATACATTACAGCTGGCGATCCT

81 D L S T T A K A L K I L D S S G A D I I
242 GACCTTTCAACCACTGCAAAGCGCTGAAAATCCTTGATTTCATCTGGCGCAGACATCATA

101 E L G V P Y S D P L A D G P V I Q A A A
302 GAATTGGGGGTTCCCTTACTCGGATCCTTTGGCTGACGGTCTGTTATCCAGGCTGCAGCT

121 T R A L A R G A S F E K V I G M L K D V
362 ACACGTGCATTAGCCAGGGGAGCCAGCTTTGAGAAGGTCATTGGGATGTTGAAGGACGTG

141 V P Q L S S P I A L F I Y Y N V I L K R
422 GTTCCTCAACTATCATCTCCAATTGCACTATTCATATATTATAATGTCATACTGAAGCGC

161 G V K K F V T T L K E T G V H G I I V P
482 GGTGTCAAGAAATTCGTGACCACCTTGAAAGAACTGGAGTTCATGGAATTATTGTTCCG

181 D V P L E E T E L L R N E A V K Y N I E
542 GATGTGCCTCTCGAGGAGACTGAGTTATTGAGAAATGAAGCTGTTAAATACAATATAGAA

201 M V L L T T P T T P T E R M K A I A E V
602 ATGGTGTGCTTACGACCCCTACGACTCCTACAGAACGAATGAAAGCCATTGCTGAAGTT

221 A Q G F I Y L V S S V G V T G A R A S V
662 GCACAAGGATTTATCTACCTTGTAAGCTCAGTGGGCGTCACGGGAGCAAGGGCATCAGTC

241 S D K V P S L L H E I R E V T N K P V A
722 AGCGACAAGGTTCCATCTCTCTACATGAAATTAGAGAGGTAACCAACAAACCAGTGGCA

261 V G F G I S K P E H V K Q V A E W G A D
782 GTTGGTTTTGGCATATCAAACCCGAGCATGTTAAACAGGTGGCTGAATGGGGGGCAGAT

281 G V I I G S A M V K V L G E A K S P E E
842 GGAGTGATCATTGGTAGTGCCATGGTCAAGGTGCTGGGTGAAGCAAAATCTCCCGAGGAG

301 G L K D L E A F M K S L K A A A T R G D
902 GCCTTGAAAGATTTGGAAGCCTTCATGAAAAGCTTGAAAGCTGCTGCAACGAGGGGTGAT

321 S V L L
962 TCAGTTCTGTTATAGGATTCCCTTATGAAGCAGAAGATTTGACTTAATTTCTGACACT

1022 TAAAAATGGTTGGATACAATGGATAGCATGTTCTTAGCCCCCACCATTTGGGGCTTGGA

1082 AGTTGGCTGTAGCAAAGTTCCTTTGCCCTTGATTTAGCCCTCAGTTTCAAGTGTGTTGCCA

1142 TCTTTATTAATATGTTATTATTTATAAAATAAAGGACGAATGTGCGAATTTTGATGAAT

1202 ATTATTTATTTATATTAATTTTTTCTGTTTAAACCTCGTGCCGAATCTCGGCAC

C. orientalis:

CoBX1
 CoBx1

2 TAGCACCATTGCTGAGATTGTGCTGTAAGGGGTCAACAAGTAATGGCACTTGCAATTACA
 M A L A I T

21 S S A F S L V C Q K P A V I Q K S S E T
 62 AGCTCAGCCTTTTCTCTTGTATGCCAAAAACCTGCTGTTATTTCAGAAGTCTCAGAGACA

41 R G S L T I S P S S L T I S P S S V S I
 122 AGGGGTTCTCTTACCATTTGCCCCAGTTCTCTTACCATTTGCCCCAGTTCTGTTAGTATT

61 S E T F A S L R Q Q G K V A L V P Y I T
 182 TCTGAAACATTTGCCAGTCTCAGACAACAAGGCAAAGTGGCATTAGTCCCATATATTACC

81 A G D P D L S T T A E A L K V L D Y C G
 242 GCCGGCGATCCCGATCTTTCCACCACAGCAGAAGCACTCAAAGTGCTTGATTATTGTGGT

101 S D V I E L G V P C T D P F L D G P V I
 302 TCGGATGTGATTGAGCTAGGTGTACCATGCACCGATCCGTTTCTCGATGGTCCAGTTATC

121 Q A A C K R S L G G G A N M K S I F S M
 362 CAGGCAGCTTGTAACGGTCGCTAGGAGGGGGTGCCAATATGAAGTCAATCTTTTCCATG

141 L Q K V S P Q L S C P I L L F T Y Y K Q
 422 TTGCAAAGGTCTCCCCACAATTATCTTGTCCAATATTATTATTACATATTACAAGCAA

161 I L K C G I G R F M A A T N D A G V R G
 482 ATACTGAAATGTGGAATTGGACGGTTCATGGCTGCCACAAATGACGCTGGTGTGCGTGGT

181 L L V P D A P L E H T E V L R A E A S K
 542 CTTCTAGTTCAGATGCTCCTCTAGAGCATAACAGAGGTCTTAAGAGCGGAAGCTTCAAAA

201 Y G I E I V L L T T P I T P K E R M K K
 602 TATGGAATTGAAATAGTACTCTTGACAACACCAATTACACCAAAAAGAACGAATGAAAAAG

221 I V Q V A Q G F V Y L V S S V G V T G A
 662 ATGTGCAAGTTGCCCAAGGATTTGTGTATCTTGTAGCTCGGTTGGAGTTACTGGTGCT

241 R P S V N P R V Q S L L Q E X K E V T N
 722 CGACCATCTGTAAACCCAAGAGTTCAATCACTTCTACAAGAAATNAAGGAGGTAACCTAAC

261 K P V V V G F G I S K P E H V K Q I A R
 782 AAACCAGTAGTGGTCGGCTTTGGCATTTCCAAACCAGAACACGTGAAACAGATAGCGCGA

281 W G A D G V I V G S A M V K L L G E A K
 842 TGGGGAGCTGATGGTGTAAATCGTGGCAGTGCCATGGTTAAGCTTTTAGGCGAAGCAAAA

301 T A N E G L K E L E A F T M S L K T A L
 902 ACTGCCAATGAGGGATTGAAGGAGCTTGAAGCCTTCACAATGTCTCTCAAACCGCTTTG

321 S E N N S L L M I -
 962 TCTGAAAACAACAGTCTACTCATGATTTAAAACCTATTTGAAGAATAAGTTTCAGTGTAGG

1022 ACTACCTGTAAGTAACCTAATTGTAGTTAGATAGTTAAGGTCGTTTTCATGTGTTTGAATCT

1082 GTAACAAATAAAAGTTGTTGTAAGAATAGCTATGTGCCTATGTATACACTAGTGAATCGA

1142 AGTATGTAATCGAATGTGTGTAGTCTGATGGAAAAAAAAA

CoIG1-1
 CoIgl-1

M A A A F K S T C F L

1 GGCACGAGGCTGATTTCGCACGATTTTAATGGCCGAGCTTTCAAATCGACCTGCTTTCTC
 21 Q S S N P T N N L F L R S S T Q K L K T
 61 CAATCCAGCAACCCCAACAACCTATTCCCTTCGTTCCCTCAACTCAAAAGCTTAAAACC
 41 S N I S T K S R I S M A S L A V A P P T
 121 AGTAACATCTCAACCAATCTCGCATATCCATGGCTTCTCTCGCTGTTGCGCCTCCACA
 61 A A T A V S L S E T F I R L K E Q G R V
 181 GCCGCCACAGCCGTCAGTCTCTCCGAAACTTTTCATCCGCTTGAAAGAACAGGGCAGAGTT
 81 A F I P F I T A G D P D L S T T A E A L
 241 GCATTCATCCCTTTTATTACGGCTGGAGACCCAGATTTATCAACAACAGCAGAAGCATTG
 101 K V L D S C G S D I I E L G V P Y S D P
 301 AAAGTGTTAGACTCATGTGGTTCAGACATAATTGAATTGGGTGTACCATACTCTGATCCT
 121 L A D G P V I Q A A A T R A L A R G T N
 361 TTGCAGATGGCCAGTTATCCAGGCAGCTGCTACGCGTGCTTTGGCTAGAGGGACCAAT
 141 F D A I L A M L E G V V P Q L S C P L A
 421 TTCGATGCAATCCTTGCATGTTGGAAGGGTGTTCGCAATTATCTTGTCCGCTTGCA
 161 L F S Y Y N P I L K R G I G K F M T T I
 481 TTATTCTCATACTACAATCCGATCCTGAAGCGTGGCATCGGAAAATTCATGACACTATA
 181 K D V G V H G L V V P D V P L E E T A M
 541 AAAGACGTTGGTGTACATGGACTTGTGGTACCTGATGTTCCCTCTGGAGGAACTGCAATG
 201 L R E E A L K N Q I E L I L L T T P T T
 601 TTGAGGGAGGAAGCACTCAAGAACCAAATTGAATTAATTCTACTTACAACCCCACTACT
 221 P T D R M K A I V E A S E G F V Y L V S
 661 CCAACAGATCGAATGAAAGCTATTGTTGAAGCTTCAGAAGGATTTGTGTATCTTGTGAGC
 241 S I G V T G S R A S V S S R V Q S L L Q
 721 TCAATTGGAGTGACTGGTTCCCGTGCATCAGTAAGCTCGCGGTTCAATCTCTTCTCAG
 261 E I K E T S N K P V A V G F G I S T P E
 781 GAAATCAAGGAGACCTCAAATAAACAGTTGCAGTTGGTTTTGGTATTTTCGACACCAGAA
 281 Q V K Q I A G W G A D G V I V G S A M V
 841 CAGGTGAAACAGATAGCAGGTTGGGGAGCTGATGGTGAATTGTTGGTAGTCCGATGGTG
 301 E L L A H A K T P E E G L K E L E A F T
 901 GAGTTGCTAGCACATGCAAAAACGCCAGAGGAGGGGCTGAAGGAGCTGGAAGCCTTACC
 321 K S L R A A I P -
 961 AAATCCTTAAGGGCTGCCATTCCCTTGAGAGAAGATTTCTGCATTAGCATGCACTCGGTAC
 1021 TCATTTTGTATGCCAACAATGGCGAGGAAAGAATGATTGACCATAAATAGAATGCAGGGT
 1081 AACACTATTCAATTTAATTGATTGCAGTTTCACTATTGGTGTACACTTTTTTCTCATTAA
 1141 TGAAATTGACTTTGTTGAA

CoIGL-2
 CoIgl-2

M A A A F K S T C F L

1 GGCACGAGGCTGATTTCGCACGATTTTAATGGCCGAGCTTTCAAATCGACCTGCTTTCTC
 21 Q S S N P T N N L F L R S S T Q K L K T
 61 CAATCCAGCAACCCACCAACAACCTATTCCCTTCGTTCCCTCAACTCAAAAGCTTAAAACC
 41 S N I S T K S R I S M A S L A V A P P T
 121 AGTAACATCTCAACCAATCTCGCATATCCATGGCTTCTCTCGTGTGCGCCTCCACA
 61 A A T A V S L S E T F I R L K E Q G R V
 181 GCCGCCACAGCCGTCAGTCTCTCCGAAACTTTTCATCCGCTTGAAAGAACAGGGCAGAGTT
 81 A F I P F I T A G D P D L S T T A E A L
 241 GCATTCATCCCTTTTATTACGGCTGGAGACCCAGATTTATCAACAACAGCAGAAGCATTG
 101 K V L D S C G S D I I E L G V P Y S D P
 301 AAAGTGTTAGACTCATGTGGTTCAGACATAATTGAATTGGGTGTACCATACTCTGATCCT
 121 L A D G P V I Q A A A T R V L A R G T N
 361 TTGCAGATGGCCAGTTATCCAGGAGCTGCTACGCGTGTGCTGGCTAGAGGGACCAAT
 141 F D A I L A M L E G V V P Q L S C P L A
 421 TTCGATGCAATCCTTGCATGTTGGAAGGGTGTTCGCAATTATCTTGTCCGCTTGCA
 161 L F S Y Y N P I L K R G I G K F M T T I
 481 TTATTCTCATACTACAATCCGATCCTGAAGCGTGGCATTGGAAAATTCATGACACTATA
 181 K D V G V H G L V V P D V P L E E T A M
 541 AAAGACGTTGGTGTACATGGACTTGTGGTACCTGATGTTCCCTCTGGAGGAACTGCAATG
 201 L R E E A L K N Q I E L I L L T T P T T
 601 TTGAGGGAGGAAGCACTCAAGAACCAAATTGAATTAATTCTACTTACAACCCCACTACT
 221 P T D R M K A I V E A S E G F V Y L V S
 661 CCAACAGATCGAATGAAAGCTATTGTTGAAGCTTCAGAAGGATTTGTGTATCTTGTGAGC
 241 S I G V T G S R A S V S S R V Q S L L Q
 721 TCAATTGGAGTGACTGGTTCCCGTGCATCAGTAAGCTCGCGGTTCAATCTCTTCTCAG
 261 E I K E A S N K P V A V G F G I S T P E
 781 GAAATCAAGGAGCCTCAAATAAACAGTTGCAGTTGGTTTTGGTATTTTCGACACCAGAA
 281 H V K Q I A G W G A D G V I V G S A M V
 841 CACGTGAAACAGATAGCAGGTTGGGAGCTGATGGTGTAAATTGTTGGTAGTGCATGGTG
 301 E L L A H A K T P E E G L K E L E A F T
 901 GAGTTGCTAGCACATGCAAAAACGCCGAGGAGGGGCTGAAGGAGCTGGAAGCCTTACC
 321 K S L R A A I P -
 961 AAATCCTTAAGGGCTGCCATTCCCTTGAGATAAGATTTCTGCATTAGCATGCACTCGGTAC
 1021 TCATTTTGTATGCCAACAATGGCGAGGAAAGAATGATTGACCATAAATAGAATGCAGGGT
 1081 AACAGTATTCAATTTAATTGATTGCAGTTTCACTATTGGTGTACTTTTTTCTCATTAA
 1141 TGAAATTGACTTTGTTGAA

L. galeobdolon:

LgIGL1 1 S S L K A T G F L Q L R T N Y S L P E Y
LgIgl1 3 TCTTCTCTCAAGGCAACAGGCTTCTCCAACCTCAGGACTAATTACAGTTTACCTGAATAC

21 P L Y P S S L T S S T N R S F K L R P I
 63 CCATTATACCTTCATCTCTTACCTCTTCGACGAACAGATCCTTCAAACCTGAGGCCCATC

41 M A T L T A A P T V G L S K T F S R L K
 123 ATGGCCACTCTCACCGCGCCCTTACAGTCGGCCTCTCTAAAACCTTCTCCAGATTGAAA

61 Q Q G K V A F I P Y I T A G D P D L S T
 183 CAACAAGGAAAGGTGGCGTTTATTCCATATATTACTGCTGGTGATCCTGACCTCTCTACA

81 T A E V L K V L D S C G S D I I E L G V
 243 ACGGCGGAAGTTTAAAAGTCTCGACTCATGTGGCTCAGACATTATTGAATTGGGAGTG

101 P Y S D P L A D G P V I Q A A A S R A L
 303 CCTTATTCCGACCTTTGGCTGATGGTCTGTATTTCAGGCGGCTGCCTCACGTGCATTA

121 A R G T N F D K I I A M L K E V V P Q L
 363 GCCAGAGGAACCAACTTTGATAAGATCATTGCAATGTTGAAGGAAGTGGTACCTCAATTA

141 S C P V A L F T Y Y N P I L K R G A G K
 423 TCTTGTCTGTGCACTTTTACATATTATAACCAATACTCAAACGTGGCGGGGAAA

161 F M A T L Q D T G I H G L V V P D V P L
 483 TTCATGGCCACTTTGCAAGATACCGGAATACATGGACTTGTGTTCCAGATGTGCCTCTG

181 E E T E I L R K E A I S K N I E L V L L
 543 GAGGAGACTGAGATATTGAGAAAGGAAGCTATTAGTAAAAATATAGAACTGGTACTGCTG

201 T T P T T P K A R M Q S I V E V S E G F
 603 ACAACACCCACTACCCAAAAGCACGCATGCAGTCCATCGTTGAAGTGTCTGAAGGTTTT

221 V Y L V S S V G V T G A R A S V S D R V
 663 GTATACCTTGTGAGCTCTGTGGGAGTTACTGGAGCACGAGCATCTGTGAGTGATAGGGTT

241 Q N L L K E I K E A T D K P V A V G F G
 723 CAAAATCTTCTAAAAGAAATTAAGGAGGCAACTGACAAAACCCGTAGCTGTTGGGTTTGGC

261 I S K P E H V K Q V A D W G A D G V I V
 783 ATATCAAACCCGAACATGTTAAACAGGTGGCTGATTGGGGAGCGGACGGCGTGATTGTT

281 G S A M V K I L A E A K S P E E G I K E
 843 GGTAGCGCCATGGTTAAAATACTCGCTGAAGCAAATCTCCTGAAGAAGGCATAAAAAGAG

301 I E T Y T K S L K S A L S
 903 ATCGAGACTTACACAAAAGTTTGAAATCTGCACTTTCTTGAAACTCAGTGCAGCAAAAC

963 TGTGTTGTTAACCTCACATGCTATTCAAGTCTCTGAATTAGTTACGGTCATGTAATAATA

1023 ACTATTGACTTTGTTTTTGTATTATAAGACGGAATTCTACTTGAACCTCAATTTTTAGAG

1083 CTGCGCAAGTAGATTTCTCGAATGTCTGTCTGATAACAATGTAATGTTTGAAACTTTAGG

1143 ATATTATTATAGGTATATGATTATTAATAAAAAAAAAA

LgIGL-2 1 M A A N S L K S I C
LgIgl-2 3 CAGAGATTAAGCATAACCGAACTCATAAAAATGGCCGCTAATTCTCTCAAGTCAATTTGC

21 F P Q L K T T N Q S I S Q R S S S R V S
63 TTCCCTCAACTGAAAACCAAAACCAAGCATCTCTCAGCGATCTTCTTCTCGAGTATCG

41 L C Y K P P M A T L Q T A T K A G I S E
123 CTCTGTTATAAGCCTCCCATGGCTACTCTCCAAACTGCTACCAAAGCTGGAATTTCCGAG

61 T F S R L K Q Q G K V A L I P Y I T A G
183 ACTTTCTCCCGATTGAAACAGCAAGGAAAAGTGGCTTTGATCCCGTACATTACAGCTGGC

81 D P D L S T T A E A L K V L D S C G S D
243 GATCCGGACCTTTCGACCACTGCAGAAGCACTGAAAGTTCTCGACTCGTGTGGCTCAGAC

101 I I E L G V P Y S D P L A D G P V I Q A
303 ATTATCGAATTAGGGGTGCCTTATTCGGACCCCTTGGCTGATGGCCCTGTTATCCAGGCT

121 A A T R S L S R G A D F D K I I G M L K
363 GCTGCCACACGTTTCGTTAAGCAGAGGAGCCGACTTTGATAAAATTATTGGAATGCTGAAG

141 E V I P Q L S C P V G L F T Y Y N P I L
423 GAAGTGATTCTCAATTATCTTGTCCAGTTGGATTATTCACGTATTACAACCCAATACTT

161 K R G V E E F M T T L K D T G I N G L I
483 AAGCGTGGCGTGGAGGAATTCATGACAACCTTTGAAAGATACCGGAATTAATGGACTTATC

181 V P D V P L E E T E M L R K E A T K N N
543 GTTCCTGACGTCCCTCTTGAGGAGACTGAGATGTTGAGGAAGGAAGCTACTAAGAACAAT

201 I E L V L L T T P T T P S D R M K E I V
603 ATAGAACTGGTGTCTTACAACCCCACTACTCCAAGTGATCGAATGAAAGAAATTTGTA

221 E A A E G F I Y L V S T V G V T G T R T
663 GAAGCGGCCGAAGGGTTCATCTACCTCGTGAGCACAGTGGGAGTGACGGGGACGAGAACA

241 S V S D K V Q S L L H E I K G E T N K A
723 TCTGTGAGCGATAAAGTTCAATCTCTGCTACACGAAATTAAGGGGAAACGAACAAGGCG

261 V A V G F G I S K P E Q V K Q V A E W G
783 GTGGCAGTTGGTTTCGGCATATCAAAACCCGAGCAAGTTAAACAGGTGGCCGAGTGGGGC

281 A D G V I V G S A M V K I L G E A K T P
843 GCGGATGGGGTAATCGTCGGTAGCGCGATGGTGAAGATTTTGGGGGAGGCTAAAACCTCT

301 E E G L K E L E K F T K T L K S A L V
903 GAAGAAGGGCTGAAAGAAGTGGAGAAGTTACCAAAAACCTTAAAATCTGCACCTGTTTGA

963 GTAGTGGTTTTGGGCCAATTTAACTTTCTGTGGCAATTCTCAATTGAGTTTGTGAGAATA

1023 TTGTGGTTTTGAAAGCCTTTAATAAAAATCCTCGTGC

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Herrn Prof. Dr. Alfons Gierl, für die Möglichkeit, diese Arbeit an seinem Lehrstuhl anfertigen zu können, für sein Interesse und seine fachliche Unterstützung.

Frau Dr. Monika Frey für ihre jederzeit große Unterstützung, Diskussionsbereitschaft und zahlreichen Hilfestellungen und Ratschläge, welche stets zur Verbesserung der Arbeit beigetragen haben.

Dr. Uli Genschel, Dr. habil. Erich Glawischnig und Prof. Dr. Ramon Torres-Ruiz für ihre Bereitschaft zu Diskussionen, ihr Fachwissen und ihre Ideen.

Herrn Prof. Dr. Wilfried Schwab und seinen Mitarbeitern Florian Vitzthum und Barbara Fink für die Messungen am GC-MS und HPLC-MS. Dank auch an PD Dr. Wolfgang Brandt für das Protein-Modelling und seine konstruktiven Ideen.

Meinen Kolleginnen und Kollegen für die große Hilfsbereitschaft in allen Fragen und für die schöne Zeit auch außerhalb des Labors: Andreas Fießelmann, Dr. Rafał Jończyk, Thomas Rauhut, Dr. Lilla Römisch-Margl, Birgit Treml, Zheng Yu, Regina Dick, Miriam Vogg und Peggy Müller. Ein Dankeschön auch an Regina Hüttl für Sequenzierungen und technische Hilfestellungen, Peter Dobos für seinen grünen Daumen und sein Fachwissen in der Gewebekultur, Heidi Miller-Mommerskamp, Nicole Däschlein, Stefanie Dommel und den Damen im Sekretariat Petra Wick, Carolin Ziegler und Hedi Kellner, die jede bürokratische Hürde meisterten.

Den Ehemaligen Dr. Silvia Ronconi, Dr. Holger Schmidt, Anne Osterrieder, Dr. Regina Schuegger, Dr. Regina Stefanek, Ruohe Yin, Katharina Lange und Dr. Annette Martin, besonders bei Dr. Verena Kriechbaumer und Dr. Gertraud Spielbauer, für ihre Unterstützung und Freundschaft auch noch über große Entfernungen.

Meinem „Bacheloranden“ Jürgen Ederer und meinen Praktikanten Thomas Schaser, Emre Anbarci und Moritz Rapp für die Mitarbeit an verschiedenen Projektteilen.

Nicht zuletzt danke ich meine Eltern, die immer großes Interesse an meiner Arbeit gezeigt haben und mir auf jede erdenkliche Art zur Seite standen.

Schulweg 7
94563 Otzing

Telefon +49 9931 2502
E-Mail katrin.schullehner@wzw.tum.de

Curriculum Vitae

Katrin Schullehner

Persönliche Informationen

- Nationalität: deutsch
- Geburtsdatum: 02.07.1978
- Geburtsort: Deggendorf
- Familienstand: ledig

Ausbildung

- 2003-2007: Experimentelle Arbeiten zur vorliegenden Dissertation am Lehrstuhl für Genetik der TU München
- 1997-2003: Studium der Agrarwissenschaften an der TU München
Fachrichtung Agrarbiologie
Diplom (Dipl. Ing. agr. Univ.)
- 1988-1997: Comenius-Gymnasium Deggendorf
Abitur
- 1984-1988: Grundschule Otzing