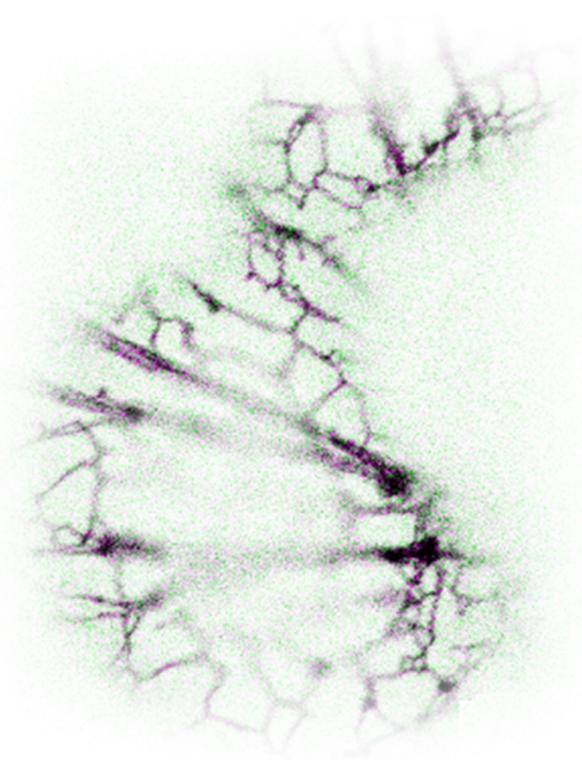




Dissertation

2017

Phytoalexinbiosynthese in *Brassicaceen*:  
Interaktion Camalexin-spezifischer Enzyme und  
Etablierung von *Eutrema salsugineum* als Modellsystem



**Stefanie Mucha**

Technische Universität München



Technische Universität München  
Lehrstuhl für Botanik

Phytoalexinbiosynthese in *Brassicaceen*:  
Interaktion Camalexin-spezifischer Enzyme und  
Etablierung von *Eutrema salsugineum* als Modellsystem

Stefanie Mucha

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

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Ralph Hückelhoven  
Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. Erich Glawischnig  
2. Prof. Dr. Brigitte Poppenberger-Sieberer

Die Dissertation wurde am 09.11.2017 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 19.01.2018 angenommen.



für meinen Opa Manfred († 2014)



## Inhaltsverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| Inhaltsverzeichnis .....  | 1  |
| Abbildungsverzeichnis .....   | 5  |
| Tabellenverzeichnis .....   | 8  |
| Abkürzungsverzeichnis .....   | 10 |
| Zusammenfassung .....   | 14 |
| Summary .....   | 16 |
| 1. Einleitung .....   | 18 |
| 1.1. Sekundäre Pflanzenstoffe in Pflanzen .....   | 18 |
| 1.1.1. Phenolische Sekundärmetabolite .....   | 20 |
| 1.1.2. Isoprenoide Sekundärmetaboliten - Terpene .....  | 21 |
| 1.1.3. Stickstoff- und schwefelhaltige Sekundärmetabolite .....   | 22 |
| 1.2. Phytoalexine als Bestandteil der pflanzlichen Abwehr .....   | 25 |
| 1.3. Cytochrom P450-Monooxygenasen .....  | 29 |
| 1.4. <i>Arabidopsis thaliana</i> und <i>Eutrema salsugineum</i> als Modellsysteme der<br>Phytoalexinbiosynthese ..... | 34 |
| 1.4.1. Camalexin und die Rolle von Glutathiontransferasen in <i>A. thaliana</i> .....                                 | 34 |
| 1.4.2. <i>Eutrema salsugineum</i> und Wasalexin als deren typisches Phytoalexin .....                                 | 41 |
| 2. Zielsetzung der Arbeit .....   | 44 |
| 3. Material und Methoden .....  | 45 |
| 3.1. Chemikalien und Lösungsmittel .....  | 45 |
| 3.2. Medien .....   | 45 |
| 3.3. Antikörper .....   | 46 |
| 3.4. Organismen und Anzuchtbedingungen .....  | 47 |
| 3.4.1. <i>Arabidopsis thaliana</i> .....  | 47 |
| 3.4.2. <i>Eutrema salsugineum</i> .....   | 48 |
| 3.4.3. <i>Nicotiana benthamiana</i> .....   | 48 |
| 3.4.4. <i>Escherichia coli</i> .....  | 48 |

|         |   |    |
|---------|---|----|
| 3.4.5.  | <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....  | 49 |
| 3.4.6.  | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....   | 49 |
| 3.5.    | Methoden .....  | 50 |
| 3.5.1.  | Isolierung von Nukleinsäuren .....  | 50 |
| 3.5.2.  | cDNA-Synthese.....  | 50 |
| 3.5.3.  | Agarosegelelektrophorese.....   | 51 |
| 3.5.4.  | Präparation von DNA aus Agarosegelen.....   | 51 |
| 3.5.5.  | Restriktion von DNA .....   | 52 |
| 3.5.6.  | Dephosphorylierung von DNA .....  | 52 |
| 3.5.7.  | Sequenzierungsreaktion.....   | 52 |
| 3.5.8.  | Polymerasekettenreaktion .....  | 53 |
| 3.5.9.  | Klonierungsstrategien.....  | 55 |
| 3.5.10. | Transformation .....  | 57 |
| 3.5.11. | <i>Yeast-two-Hybrid</i> .....   | 61 |
| 3.5.12. | Samensterilisation .....  | 61 |
| 3.5.13. | Selektion auf Resistenzmarker (BASTA, Hyg) .....                                  | 61 |
| 3.5.14. | Induktion der Phytoalexinbiosynthese.....   | 62 |
| 3.5.15. | Metabolitextraktion.....  | 62 |
| 3.5.16. | Infiltration von <i>N. benthamiana</i> .....                                      | 64 |
| 3.5.17. | Mikrosomenpräparation .....   | 64 |
| 3.5.18. | Bradford-Assay .....  | 66 |
| 3.5.19. | Aktivitätsbestimmung von <i>S. cerevisiae</i> -Mikrosomen.....                    | 66 |
| 3.5.20. | HPLC-Analyse .....  | 66 |
| 3.5.21. | Co-Immunopräzipitation.....   | 67 |
| 3.5.22. | Polyacrylamidgelelektrophorese und Western Blot .....                             | 68 |
| 3.5.23. | Konfokale Mikroskopie.....  | 68 |
| 3.6.    | Internetressourcen und Datenbanken.....   | 69 |
| 4.      | Ergebnisse .....  | 70 |
| 4.1.    | Metabolonbildung von Enzymen der Camalexinbiosynthese in <i>A. thaliana</i> ..... | 70 |

|        |  |     |
|--------|--|-----|
| 4.1.1. | Lokalisationsstudien in <i>N. benthamiana</i> .....  | 70  |
| 4.1.2. | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> als in vivo System zum Nachweis von Protein-Protein Interaktionen.....   | 75  |
| 4.1.3. | Etablierung von FRET-Mikroskopie als Mittel für Interaktionsstudien .....  | 80  |
| 4.1.4. | Identifizierung potentieller Interaktionspartner mittels FLIM-FRET.....  | 84  |
| 4.1.5. | Nachweis von Protein-Protein Interaktionen mittels Co-Immunpräzipitation ....  | 88  |
| 4.1.6. | Analyse der Substrataffinitäten von in Interaktion stehenden Camalexin-spezifischen Enzymen .....  | 90  |
| 4.2.   | Beteiligung von Arabidopsis-GSTs an der Camalexinbiosynthese.....  | 92  |
| 4.2.1. | Etablierung und Optimierung des Expressionssystems <i>S. cerevisiae</i> für die Expression von AtGSTs und P450-Enzymen.....                                      | 92  |
| 4.2.2. | Einfluss von AtGSTs auf die GS-IAN-Bildung durch CYP71B20, CYP71B15 und CYP71A13 in Hefe.....  | 99  |
| 4.2.3. | Die Rolle von AtGSTU2 und AtGSTU4 bei der Camalexinbiosynthese.....  | 101 |
| 4.2.4. | Weitere AtGSTs und ihre Bedeutung während der Synthese von Camalexin nach <i>Botrytis cinerea</i> -Infektion in <i>A. thaliana</i> .....                         | 105 |
| 4.3.   | <i>Eutrema salsugineum</i> als alternatives Modellsystem zur Charakterisierung von Phytoalexinen.....  | 108 |
| 4.3.1. | Induktion von Wasalexin A und B als Abwehrreaktion auf biotische und abiotische Stressoren in <i>E. salsugineum</i> Ökotyp Shandong und Yukon .....              | 108 |
| 4.3.2. | Expressionsanalyse von Genen koexprimierter Biosynthesewege .....  | 111 |
| 4.3.3. | Charakterisierung der transkriptionellen Antwort von <i>E. salsugineum</i> auf Pathogeninfektion, Silbernitrat- und UV-Stress mittels RNAseq und MicroArray..... | 114 |
| 4.3.4. | Gezielte Generierung von knock-out-Mutanten mittels der CRISPR/Cas9-Methode und Evaluierung des „floral dips“ zur Transformation von <i>E. salsugineum</i> ....  | 134 |
| 4.3.5. | Analyse der Relevanz von EsPen2 bei der Pflanzenabwehr .....   | 137 |
| 5.     | Diskussion .....   | 140 |
| 5.1.   | Enzyme der Camalexinbiosynthese bilden ein Metabolon für effektives Substratchanneling.....  | 140 |
| 5.2.   | AtGSTU4 beeinflusst indirekt die Camalexinbiosynthese .....  | 156 |

|  |     |
|--|-----|
| 5.3. Als Reaktion auf Stress findet in <i>E. salsugineum</i> eine umfangreiche Umprogrammierung statt..... | 162 |
| 6. Literaturverzeichnis.....   | 167 |
| 7. Anhang .....  | 182 |
| 8. Danksagung .....  | 190 |
| 9. Lebenslauf.....   | 191 |

## Abbildungsverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| Abbildung 1.1 Vereinfachte Darstellung der Klassifizierung von Sekundärmetaboliten. ....   | 19 |
| Abbildung 1.2 Einteilung von Phytoalexinen aus <i>Brassicaceae</i> anhand ihrer strukturellen Eigenschaften.....                     | 27 |
| Abbildung 1.3 Nomenklatur von CYPs.....  | 29 |
| Abbildung 1.4 konservierte Strukturen von pflanzlichen CYPs.....   | 30 |
| Abbildung 1.5 Phylogenetischer Baum von 246 <i>A. thaliana</i> CYPs.....   | 32 |
| Abbildung 1.6 Phylogenie der verschiedenen <i>Brassicaceae</i> -Spezies.....   | 34 |
| Abbildung 1.7 Expression von CYP79B2::GUS nach <i>Alternaria alternata</i> Infektion. ....   | 35 |
| Abbildung 1.8 Schematische Darstellung des Camalexinbiosyntheseweges.....  | 37 |
| Abbildung 1.9 Phylogenetischer Baum der Arabidopsis-GSTs. ....   | 38 |
| Abbildung 1.10 Schematische Darstellung einer GST-Untereinheit (GSTF1 von <i>Zea mays</i> ).<br>.....                                | 39 |
| Abbildung 1.11 Das Genom von <i>E. salisugineum</i> im Vergleich zu <i>A. thaliana</i> . ....  | 42 |
| Abbildung 4.1 Vorhergesagte Lokalisation Camalexin-spezifischer Enzyme. ....   | 71 |
| Abbildung 4.2 Analyse der Lokalisation potentieller Camalexin-spezifischer Enzyme.....   | 72 |
| Abbildung 4.3 Koloalisation von Camalexin-spezifischen Enzymen im <i>N. benthamiana</i> -<br>System. ....                            | 73 |
| Abbildung 4.4 Veränderte Lokalisation von CYP71A13 bei Anwesenheit von GGP1.....   | 74 |
| Abbildung 4.5 Rekrutierung von AtGSTU4 an der ER-Membran. ....   | 75 |
| Abbildung 4.6 Exemplarische Abbildung des Primärscreenings für CYP71A13.....   | 77 |
| Abbildung 4.7 Nachweis putativer Proteininteraktion im gerichteten <i>Yeast two-Hybrid</i> . ....                                    | 80 |
| Abbildung 4.8 Analysen der FRET-Effizienz zur Interaktionsbestimmung mittels sensitized<br>emission.....                             | 82 |
| Abbildung 4.9 Exemplarische Darstellung der Lebensdauern von CYP71A12-GFP allein (A)<br>und in Interaktion mit CYP71B15-RFP (B)..... | 85 |
| Abbildung 4.10 FRET-FLIM Analysen zur Bestimmung der Interaktion Camalexin-spezifischer<br>Enzyme.....                               | 86 |
| Abbildung 4.11 Überprüfung der Expression von solubilisierten <i>N. benthamiana</i> -Mikrosomen.<br>.....                            | 88 |
| Abbildung 4.12 Exemplarische Co-IP von Camalexin-spezifischen Enzymen.....   | 89 |
| Abbildung 4.13 Nachweis von Protein-Protein-Interaktion von Camalexin-spezifischen<br>Enzymen mittels Co-IP.....                     | 90 |

|  |     |
|--|-----|
| Abbildung 4.14 Exemplarische Darstellung der ermittelten Substratsättigungskurven für die Umsetzung von DHCA, IAOx und Tryptophan durch die entsprechenden Enzyme CYP71B15, CYP71A13 und CYP79B2. .... | 91  |
| Abbildung 4.15 Ermittelte $K_m$ -Werte von CYPs einzeln und unter Anwesenheit eines Interaktionspartners.....  | 92  |
| Abbildung 4.16 Einfluss des genomischen Hintergrundes von <i>S. cerevisiae</i> auf die GS-IAN-Akkumulation.....  | 94  |
| Abbildung 4.17 Optimierung der Induktionsbedingungen.....  | 95  |
| Abbildung 4.18 Etablierung des Induktionszeitpunktes.....  | 96  |
| Abbildung 4.19 Analyse der Akkumulation von GS-IAN in Hefezellen und Medium.....   | 97  |
| Abbildung 4.20 Notwendigkeit des P450-Enzyms bei der GS-IAN-Produktion.....  | 98  |
| Abbildung 4.21 Hefeassay zur Bestimmung der Spezifität von AtGSTs.....   | 100 |
| Abbildung 4.22 Expression von CYP71A13 mit AtGSTU2 (A) bzw. AtGSTU4 (B) in <i>N. benthamiana</i> . ....  | 102 |
| Abbildung 4.23 FRET-FLIM Analyse zur Interaktion von AtGSTU2 und AtGSTU4 mit CYP71A13. ....  | 103 |
| Abbildung 4.24 Bestimmung des Camalexingehaltes in AtGST defizienten bzw. überexprimierenden Pflanzenlinien.....   | 104 |
| Abbildung 4.25 Relative Camalexinbildung in AtGSTU4-defizienten und überexprimierenden Pflanzen nach <i>B. cinerea</i> -Infektion. ....  | 105 |
| Abbildung 4.26 Analyse weiterer AtGSTs bezüglich ihres Einfluss auf die Camalexinbildung nach <i>B. cinerea</i> Infektion. ....  | 107 |
| Abbildung 4.27 Repräsentatives Chromatogramm von Wasalexin.....  | 109 |
| Abbildung 4.28 Wasalexininduktion in <i>E. salsugineum</i> Ökotyp Shandong.....  | 110 |
| Abbildung 4.29 Wasalexinbildung in <i>E. salsugineum</i> Ökotyp Yukon.....   | 111 |
| Abbildung 4.30 Induktion der EsASA1- (A) und EsCYP79B2-Expression (B) nach Stressapplikation.....  | 113 |
| Abbildung 4.31 Venn-Diagramm der überlappenden Transkripte im RNAseq.....  | 115 |
| Abbildung 4.32 Exemplarische Darstellung der RNA-Qualitätskontrolle von OakLabs GmbH. ....   | 116 |
| Abbildung 4.33 Vergleich Microarray und RNAseq nach Zusammenfassung der Daten. ....  | 119 |
| Abbildung 4.34 Vergleich signifikant unterschiedlich exprimierter Gene nach UV-C- und Silbernitratstress.....  | 120 |
| Abbildung 4.35 MapMan Analyse der Microarray-Daten.....  | 121 |
| Abbildung 4.36 Überlappung differentiell regulierter Gene mit anderen Studien. ....  | 123 |
| Abbildung 4.37 RT-qPCR Analyse der Kandidatengene.....   | 133 |

|   |     |
|---|-----|
| Abbildung 4.38 Chromatogram von Espen2 (A) und Alignment mit <i>E. salsugineum</i> Wildtyp (WT) Shandong (B). ..... | 136 |
| Abbildung 4.39 Zusammenfassung der Mutationen der T2 Generation. ....   | 136 |
| Abbildung 4.40 Kolonisation von <i>E. salsugineum</i> -Blättern durch <i>B. graminis</i> . ....                     | 138 |
| Abbildung 4.41 Wasalexingehalt in <i>E. salsugineum</i> -Pflanzen. ....   | 139 |
| Abbildung 5.1 Signifikant induzierte Gene nach <i>B. cinerea</i> -Infektion. ....                                   | 141 |
| Abbildung 5.2 Netzwerk putativer Interakteure von CYP79B2. ....   | 145 |
| Abbildung 5.3 Model eines Dhurrin-Metabolons .....  | 152 |
| Abbildung 5.4 Modell eines Camalexin-Metabolons. ....   | 155 |
| Abbildung 5.5 Biosynthesewege des Sekundärmetabolismus ausgehend von Chorismat. .                                   | 158 |

## Tabellenverzeichnis

|   |     |
|---|-----|
| Tabelle 1.1 Übersicht über Phytoalexine aus verschiedenen Pflanzenfamilien und Strukturklassen.....   | 26  |
| Tabelle 3.1 Zusammensetzung der verwendeten Medien.....   | 45  |
| Tabelle 3.2 Zusammensetzung der für SC- und SD-Medien notwendigen Komponenten. ....   | 46  |
| Tabelle 3.3 verwendete Kreuzungen, Deletions- und Überexpressionslinien von <i>A. thaliana</i> .<br>.....   | 47  |
| Tabelle 3.4 erzeugte knock-out-Linien in <i>E. salisugineum</i> . ....  | 48  |
| Tabelle 3.5 Genotypen der verwendeten Hefestämme.....   | 49  |
| Tabelle 3.6 Reaktionsansatz der cDNA-Synthese. ....   | 51  |
| Tabelle 3.7 Programm der cDNA-Synthese.....   | 51  |
| Tabelle 3.8 Zusammensetzung eines Restriktionsansatzes.....   | 52  |
| Tabelle 3.9 Komponenten der PCR-Reaktionen.....   | 53  |
| Tabelle 3.10 Programm für PCR-Reaktionen. ....  | 53  |
| Tabelle 3.11 Programm für Kolonie-PCR.....  | 54  |
| Tabelle 3.12 Reaktionsansatz für qRT-PCR.....   | 54  |
| Tabelle 3.13 Programm für qRT-PCR-Reaktionen.....   | 55  |
| Tabelle 3.14 Zusammensetzung der BP-Reaktion.....   | 56  |
| Tabelle 3.15 Zusammensetzung des USER-Klonierungsansatzes. ....   | 56  |
| Tabelle 3.16 verwendete Oligos für Klonierung der CRISPR/Cas9-Konstrukte.....   | 57  |
| Tabelle 3.17 verwendete Programme zur Detektion von Metaboliten. ....   | 66  |
| Tabelle 3.18 Anregungs- und Emissionsspektren der verwendeten Fluorophore.....  | 69  |
| Tabelle 3.19 verwendete Programme und Datenbanken. ....   | 69  |
| Tabelle 4.1 Kontrollen zur Evaluierung von Interaktionen im <i>Yeast two-Hybrid</i> .....   | 76  |
| Tabelle 4.2 Scoring des Hefewachstums.....  | 78  |
| Tabelle 4.3 Sequenzierung der identifizierten Interaktionspartner von CYP71A12, CYP71A13<br>und CYP71B15 im ungerichteten <i>Yeast two-Hybrid</i> ..... | 78  |
| Tabelle 4.4 Kontrollen für FRET-Analysen mittels <i>Sensitized emission</i> . ....  | 81  |
| Tabelle 4.5 GFP-Fluoreszenzlebensdauern ermittelt durch FRET-FLIM-Analyse. ....   | 87  |
| Tabelle 4.6 Koexpressionbestimmung von CYP71A13 und CYP71B15. ....  | 101 |
| Tabelle 4.7 Protein-Homologien von AtGSTs der Tau-Klasse zu AtGSTU2.....  | 106 |
| Tabelle 4.8 Zusammenfassung der RNAseq-Ergebnisse .....   | 114 |
| Tabelle 4.9 Bestimmung verschiedener Qualitätsmerkmale der für den Microarray<br>verwendeten RNA. ....  | 117 |

---

|   |     |
|---|-----|
| Tabelle 4.10 Expressionsanalyse von <i>E. salsugineum</i> Genen, die an der Biosynthese von Abwehrstoffen beteiligt sind.....   | 126 |
| Tabelle 4.11 Expressionsanalyse von $\beta$ -Glucosidasen in <i>E. salsugineum</i> .....  | 130 |
| Tabelle 4.12 Zusammenfassung der potentiell an der Wasalexinbiosynthese beteiligten Gene.<br>.....                              | 131 |
| Tabelle 4.13 Übersicht über verwendete Referenzgene für RT-qPCR.....  | 132 |
| Tabelle 4.14 Bestimmung der Transformationseffizienz in <i>E. salsugineum</i> .....   | 135 |
| Tabelle 5.1 Zusammenfassung der Interaktionsstudien.....  | 143 |
| Tabelle 5.2 Koexpressionsbestimmung von AtGSTU4 mit Genen der Tryptophanbiosynthese.<br>.....                                   | 159 |
| Tabelle 7.1 Übersicht über verwendete Agrobakterienstämme.....  | 182 |
| Tabelle 7.2 Verwendete <i>S. cerevisiae</i> -Stämme zur Analyse der Substrataffinitäten von CYP79B2, CYP71A13 und CYP71B15..... | 183 |
| Tabelle 7.3 Übersicht über verwendete <i>S. cerevisiae</i> -Stämme für Yeast-two-Hybrid-Experimente.....                        | 184 |
| Tabelle 7.4 Auflistung aller für die Analyse von AtGSTs verwendeten <i>S. cerevisiae</i> -Stämme.<br>.....                      | 184 |
| Tabelle 7.5 Übersicht über sämtliche verwendete Primer.....   | 186 |

## Abkürzungsverzeichnis

|                    |   |
|--------------------|---|
| °C                 | Grad Celsius  |
| %                  | Prozent   |
| μ                  | mikro   |
| 3AT                | 3-Amino-1,2,4-Triazol                                     |
| ABA                | Abscisinsäure   |
| Abs                | (Licht)-Absorption  |
| ACN                | Acetonitril   |
| AgNO <sub>3</sub>  | Silbernitrat  |
| AK                 | Antikörper  |
| Amp                | Ampicilin   |
| AP                 | alkalische Phosphatase                                    |
| AS                 | Aminosäure  |
| At                 | <i>Arabidopsis thaliana</i>                               |
| AtGST              | Glutathiontransferase aus <i>Arabidopsis thaliana</i>     |
| ATP                | Adenosintriphosphat                                       |
| ATR1               | Arabidopsis P450 Reduktase 1                              |
| <i>B. cinerea</i>  | <i>Botrytis cinerea</i>                                   |
| <i>B. graminis</i> | <i>Blumeria graminis</i>                                  |
| bp                 | Basenpaare  |
| BSA                | Bovines Serumalbumin                                      |
| bzw.               | beziehungsweise   |
| Cas9               | CRISPR associated protein 9                               |
| CCD                | <i>charge-coupled device</i>                              |
| cDNA               | komplementäre DNA   |
| CDNB               | 1-Chloro-2,4-dinitrobenzen                                |
| CFP                | cyan-fluoreszierendes Protein                             |
| CK                 | Cytokinin   |
| Co-IP              | Ko-Immunopräzipitation                                    |
| Col-0              | <i>Arabidopsis thaliana</i> Ökotyp Columbia               |
| CP                 | Carboxypeptidase  |
| CRISPR             | Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats |
| CYP                | Cytochrom-P450-Monooxygenasen                             |
| Cys(IAN)           | mit Cystein konjugiertes IAN                              |
| d                  | Tag   |
| ddH <sub>2</sub> O | bidestilliertes Wasser                                    |
| DHAR               | Dehydroascorbatreduktase                                  |
| DHCA               | Dihydrocamalexinsäure                                     |
| DMSO               | Dimethylsulfoxid  |

---

## Abkürzungsverzeichnis

---

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| DNA                           | Desoxyribonukleinsäure                                    |
| dNTP                          | Deoxynukleotide   |
| DTE                           | Dithiothreitol  |
| DTT                           | Dithiothreitol  |
| dyt                           | double yeast extract tryptone rich                        |
| <i>E. pisi</i>                | <i>Erysiphe pisi</i>                                      |
| <i>E. salsugineum</i>         | <i>Eutrema salsugineum</i>                                |
| EDTA                          | Ethylendiamintetraessigsäure                              |
| ER                            | Endoplasmatisches Reticulum                               |
| <i>EsPEN2</i>                 | <i>E. salsugineum</i> Ortholog von <i>penetration2</i>    |
| ET                            | Salicylsäure  |
| FCS                           | Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie                      |
| FG                            | Frischgewicht   |
| FLIM                          | Fluoreszenzlebensdauer-Mikroskopie                        |
| FRAP                          | Fluorescence Recovery after Photobleaching                |
| FRET                          | Förster Resonanzenergietransfer-Messungen                 |
| Fw                            | <i>Forward</i> / Primer am 5' Ende                        |
| g                             | Gramm   |
| <i>G. orontii</i>             | <i>Golovinomyces orontii</i>                              |
| Gal                           | Galaktose   |
| GFP                           | grün fluoreszierendes Protein                             |
| GGT                           | $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase                          |
| Glu                           | Glucose   |
| GSH                           | Glutathion  |
| GS-IAN                        | glutathionyliertes IAN                                    |
| GST                           | Glutathiontransferase                                     |
| GSTF                          | Glutathiontransferase der Klasse Phi                      |
| GSTL                          | Glutathiontransferase der Klasse Lambda                   |
| GSTT                          | Glutathiontransferase der Klasse Theta                    |
| GSTU                          | Glutathiontransferase der Klasse Tau                      |
| GSTZ                          | Glutathiontransferase der Klasse Zeta                     |
| GTO                           | Glutathiontransferase der Klasse Omega                    |
| GTT                           | Glutathiontransferase aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |
| h                             | Stunde  |
| H <sub>2</sub> O              | Wasser  |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Wasserstoffperoxid  |
| HPLC                          | Hochleistungsflüssigkeitschromatographie                  |
| Hyg                           | Hygromycin  |
| i. d. R.                      | in der Regel  |
| IAN                           | Indol-3-acetonitril                                       |
| IAOx                          | Indol-3-acetaldoxime                                      |
| insg.                         | insgesamt   |

## Abkürzungsverzeichnis

---

|                       |  |
|-----------------------|--|
| JA                    | Jasmonsäure  |
| JNK                   | Jun N-terminale Kinase                                   |
| Kan                   | Kanamycin  |
| KCl                   | Kaliumchlorid  |
| kDA                   | Kilodalton   |
| Km                    | Michaelis-Menten-Konstante                               |
| KO                    | <i>knock-out</i>   |
| l                     | Liter  |
| LiAc                  | Lithiumacetat  |
| LMU                   | Ludwig-Maximilians-Universität München                   |
| LV                    | Leervektor   |
| m                     | Millionen  |
| M                     | molar  |
| m                     | mili   |
| m                     | Masse  |
| m/z                   | Masse pro Ladung   |
| max.                  | maximal  |
| MeOH                  | Methanol   |
| MgCl <sub>2</sub>     | Magnesiumchlorid   |
| min                   | Minute   |
| mind.                 | mindestens   |
| Mio                   | Millionen  |
| mol                   | Stoffmenge   |
| MQ                    | Milipore-Wasser  |
| MS                    | Massenspektrometrie                                      |
| MS-Medium             | Murashige-Skoog-Medium                                   |
| n                     | nano   |
| <i>N. benthamiana</i> | <i>Nicotiana benthamiana</i>                             |
| n.d.                  | nicht detektiert   |
| NaCl                  | Natriumchlorid   |
| NMR                   | nuclear magnetic resonance/Kernspinresonanzspektroskopie |
| OD                    | optische Dichte  |
| <i>P. syringae</i>    | <i>Pseudomonas syringae</i>                              |
| P450                  | Cytochrom-P450   |
| PAGE                  | <i>Polyacrylamide-Gel-Electrophoresis</i>                |
| PCR                   | Polymerasekettenreaktion                                 |
| PCR                   | Polymerasekettenreaktion                                 |
| PEG                   | Polyethylenglykol  |
| pH                    | negative dekadische Logarithmus der Wasserstoffionen     |
| Pol                   | Polymerase   |
| ppt                   | Phosphinothricin   |
| qRT-PCR               | Quantitative <i>real time</i> -PCR                       |

## Abkürzungsverzeichnis

---

|                      |   |
|----------------------|---|
| RFP                  | rot-fluoreszierendes Protein                                  |
| Rif                  | Rifampicin  |
| RNA                  | Ribonukleinsäure  |
| ROS                  | reaktive Sauerstoffspezies ( <i>reactive oxygen species</i> ) |
| rpm                  | <i>rounds per minute</i>                                      |
| RT                   | Raum Temperatur (ca. 22 °C)                                   |
| s                    | Sekunde   |
| <i>S. cerevisiae</i> | <i>Saccharomyces cerevisiae</i>                               |
| SA                   | Salicylsäure  |
| SD                   | Standardabweichung  |
| SD-Medium            | <i>Synthetic Defined</i> Kulturmedium für Hefe                |
| SDS                  | Natriumdodecylsulfat  |
| SDS-PAGE             | Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese           |
| sog.                 | sogenannt   |
| TAP                  | Tandem Affinity Purification                                  |
| TCHQD                | Tetrachlorohydroquinon-Dehalogenase                           |
| T-DNA                | Transfer-DNA  |
| TE-Puffer            | Tris-EDTA-Puffer  |
| Tris                 | <i>Tris</i> (hydroxymethyl)-aminometha                        |
| U                    | unit  |
| üN                   | über Nacht  |
| UV                   | Ultraviolett  |
| vgl                  | vergleiche  |
| Vol.                 | Volumen   |
| w/v                  | <i>weight per volume</i> , Gewicht pro Volumen                |
| WT                   | Wildtyp   |
| Y2H                  | Yeast two hybrid  |
| YFP                  | gelb-fluoreszierendes Protein                                 |
| Zm                   | <i>Zea mays</i>   |

## Zusammenfassung

Im Laufe der Evolution haben Pflanzen eine große Vielfalt an Abwehrmechanismen entwickelt, welches es dem Organismus ermöglicht, mit einer fein abgestimmten Abwehrreaktion auf biotischen und abiotischen Stress zu reagieren. Eine Verteidigungsstrategie ist die *de novo* Synthese von Phytoalexinen nach Pathogenbefall. In der Familie der *Brassicaceae* sind bisher mind. 44 verschiedene Phytoalexine bekannt. Dazu zählt auch das für *Arabidopsis thaliana* typische Camalexin. Die Biosynthese wurde in den vergangenen Jahren bereits detailliert aufgeklärt. Der Metabolit wird ausgehend von Tryptophan über Indol-3-acetaldoxim (IAOx) und Dihydrocamalexinsäure gebildet. Katalysiert werden die einzelnen Reaktionsschritte von Cytochrom-P450-Monooxygenasen (CYPs). In der hier vorliegenden Arbeit sollte die Frage beantwortet werden, ob die Camalexin-spezifischen Enzyme CYP79B2, CYP71A12, CYP71A13 und CYP71B15 miteinander physikalisch interagieren und ob solch eine Komplexbildung zu einem optimierten Substratfluss führt. Mit Hilfe von Förster Resonanzenergietransfer-Messungen (FRET), dem auf Fluoreszenzlebensdauer-Mikroskopie basierendem Nachweis des Förster-Resonanzenergietransfers (FLIM-FRET) und Co-Immunpräzipitation (Co-IP) wurde die Bindung der biosynthetischen Enzyme untereinander und im Fall von CYP71A13 zusätzlich mit der Arabidopsis P450 Reduktase 1 (ATR1) nachgewiesen. Auch unterschiedliche Interaktionsstärken konnten gezeigt werden. Durch konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie konnte weiterhin die Rekrutierung einer cytosolischen Komponente der Camalexinbiosynthese an die Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) beobachtet werden. Eine schwache Interaktion der Gamma-glutamyl peptidase 1 (GGP1) mit CYP71A13 konnte in FRET-FLIM-Analysen bestätigt werden. Die Camalexin-spezifischen Enzyme bilden folglich einen Komplex an der ER-Membran aus. Durch heterologe Co-Expression von zwei CYPs in *Saccharomyces cerevisiae* wurde weiterhin eine Erhöhung der Substrataffinität von CYP79B2 gegenüber Tryptophan in Anwesenheit von CYP71A13 gezeigt. Für die Glutathionylierung des Indol-3-acetonitrils (IAN) während der Camalexinbiosynthese ist wahrscheinlich eine Glutathiontransferase (GST) nötig. Um zu klären, ob die zu katalysierende Reaktion spezifisch durch eine GST vermittelt wird, wurde jeweils in Anwesenheit eines CYPs alle 54 Arabidopsis-GSTs in *S. cerevisiae* exprimiert und auf Aktivitätsunterschiede untersucht. In diesem *in vitro*-Assay konnte eine Spezifität für *A. thaliana*-GST Tau 2 (AtGSTU2) detektiert werden. Entsprechende *knock-out*- und Überexpressionspflanzen zeigten jedoch keinen veränderten Camalexingehalt. Allerdings wurde in den Pflanzenstudien ein Einfluss von *A. thaliana*-GST Tau 4 (AtGSTU4) gezeigt. AtGSTU4 ist deutlich mit allen Tryptophan- und Camalexin-spezifischen Enzymen

koexprimiert und interagiert physikalisch eindeutig mit CYP71A13. In Metabolitanalysen zeigte sich allerdings eine Reduktion des Camalexinlevels in AtGSTU4-überexprimierenden Pflanzen und eine Akkumulation in *knock-out*-Linien, was einer direkten Beteiligung an der Camalexinbiosynthese widerspricht. Die genaue biologische Funktion dieser Interaktion muss in Zukunft näher betrachtet werden.

Im Gegensatz zu Camalexin ist die Biosynthese von Wasalexin, des typischen Phytoalexins in *Eutrema salsugineum*, bisher kaum untersucht. Ziel dieser Arbeit war, Kandidatengene für die Biosynthese zu identifizieren, Mutantenlinien zu generieren und diese zu charakterisieren. In Microarray- und RNAseq-Analysen wurde eine umfangreiche transkriptionelle Umprogrammierung durch UV-C-, Silbernitrat- und *Botrytis cinerea*-Behandlung beschrieben. Es kam zu einer Verschiebung der Expression hin zu Genen der pflanzlichen Abwehr. Unter Stress wurde die Expression von Genen der Indolglucosinolatbiosynthese induziert, wohingegen die meisten Transkripte der aliphatischen Glucosinolatbiosynthese reprimiert vorlagen. Auf Grundlage der vorliegenden Transkriptomdaten wurden anschließend Kandidatengene der Wasalexinbiosynthese gewählt, für die mittels des CRISPR/Cas9-Systems Mutantenlinien erzeugt werden sollten. Für *EsPen2* gelang dies erfolgreich. In Metabolitanalysen und Kolonisationsstudien mit *Blumeria graminis* zeigten sich keine Unterschiede zwischen Mutante und *E. salsugineum* Wildtyp. Wahrscheinlich existieren in *E. salsugineum* redundante Enzyme. Nichtsdestotrotz gelang es im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe des CRISPR/Cas9-Systems eine transgene Pflanzenlinie abseits von *A. thaliana* zu erzeugen. Dies ist bisher nur für einzelne Pflanzenspezies in der Literatur beschrieben.

## Summary

During evolution plants have developed great varieties of defense mechanisms to provide an appropriate and precise response to biotic and abiotic stress. One strategy is the *de novo* synthesis of phytoalexins after pathogen attack. Within the *Brassicaceae* at least 44 different phytoalexins are identified so far - among them camalexin as the major phytoalexin from *Arabidopsis thaliana*. The biosynthesis of camalexin has been studied in great detail. This metabolite is synthesized from tryptophan via indole-3-acetaldoxime (IAOx) and dihydrocamalexin acid (DHCA). The catalytic steps are mediated by cytochrome P450 monooxygenases (CYPs). In this study, the question should be answered whether the camalexin-specific enzymes CYP79B2, CYP71A12, CYP71A13 and CYP71B15 are interacting with each other and if such a complexation leads to an optimized flow of substrates. By the means of Förster resonance energy transfer measurements (FRET), FRET analyses based on fluorescence lifetime imaging (FLIM-FRET) and co-immunoprecipitation (Co-IP) physical interaction between the CYPs and between CYP71A13 and Arabidopsis P450 reductase 1 (ATR1) were detected and intensity variations were shown. Furthermore, a recruitment of cytosolic components (Gamma-glutamyl peptidase 1 (GGP1)) to the membrane of the endoplasmic reticulum (ER) was shown by confocal laser scanning microscopy. Here a weak interaction of GGP1 and CYP71A13 was proven via FRET-FLIM analysis. Thus, camalexin-specific enzymes form a complex at the ER-membrane. An increased substrate affinity of CYP79B2 to tryptophan in presence of CYP71A13 was shown by heterologous expression of the two CYPs and subsequent enzyme assays in *Saccharomyces cerevisiae*. During camalexin biosynthesis glutathionylation of indol-3-acetonitrile (IAN) is catalyzed by glutathione transferases (GST). To clarify whether this reaction is mediated by a specific GST one CYP was expressed together with each of the 54 Arabidopsis GSTs in *S. cerevisiae* and analyzed for differences in activity. In this *in vitro* assay, a specificity for AtGSTU2 was detected. Corresponding studies of knock-out and overexpression plants did not show an altered camalexin content. However, an influence of AtGSTU4 on camalexin biosynthesis was demonstrated. AtGSTU4 is coexpressed with tryptophan- and camalexin specific enzymes and interacts with CYP71A13. Nevertheless, camalexin was reduced in knock-out plants and accumulated in overexpressing plants ruling out a direct role in camalexin biosynthesis. The distinct biological role of this interaction has to be examined in the future.

In contrast to camalexin, the biosynthesis of wasalexin, the major phytoalexin in *Eutrema salsugineum*, is only poorly understood. One aim of this work was to identify candidate genes and to generate and characterize mutant lines. By means of microarray and RNAseq analysis

a substantial transcriptional reprogramming induced by abiotic and biotic stress was shown. A shift in the direction of defense-related gene was observed. *E. salsugineum* plants showed transcriptional induction of indol glucosinolate biosynthesis whereas transcripts of aliphatic glucosinolate biosynthetic genes were repressed. Based on the transcriptomic analysis, candidate genes for wasalexin biosynthesis were chosen and according mutant lines should be generated via the CRISPR/Cas9 system. This was successful for *EsPen2*. In colonization experiments with *Blumeria graminis* and metabolic analyses no differences between wildtype and mutant plants were observed. Presumably redundant enzymes exist in *E. salsugineum*. Nevertheless, in this study a transgenic mutant apart from Arabidopsis was generated. So far this is only shown for a few species.

## 1. Einleitung

Als sessile Lebewesen sind Pflanzen ununterbrochen einer riesigen Vielfalt äußerer Reize ausgeliefert. Neben Trockenheit, starken Temperaturschwankungen und Nährstoffmangel, müssen sie sich auch gegen eine Vielzahl von Herbivoren und Mikroorganismen behaupten. Durch die Entwicklung diverser Abwehrmechanismen ist die Pflanze gut gegen solche Angriffe geschützt. Zum Beispiel hindern Dornen und Stacheln Fraßfeinde an der Besiedlung. Durch die Ausbildung einer wachshaltigen Cuticula wird der Organismus vor zu starkem Austrocknen geschützt und gleichzeitig wird das Eindringen von Pathogenen und Keimen von Pilzsporen (Martin, 1964) verhindert. Lignineinlagerungen in Zellwände führen zur Verholzung des entsprechenden Gewebes. So wird ebenfalls eine Barriere gegen das Eindringen von Mikroorganismen aufgebaut (Wainhouse *et al.*, 1990). Hat das Pathogen die Pflanze infiziert werden vielfältige chemische Verbindungen gebildet, um eine Ausbreitung im Organismus zu stoppen. Dazu zählen unter anderem Flavonoide, Alkaloide, cyanogene Glykoside und Glucosinolate. All diese Substanzen zählen zu den sekundären Pflanzenstoffen.

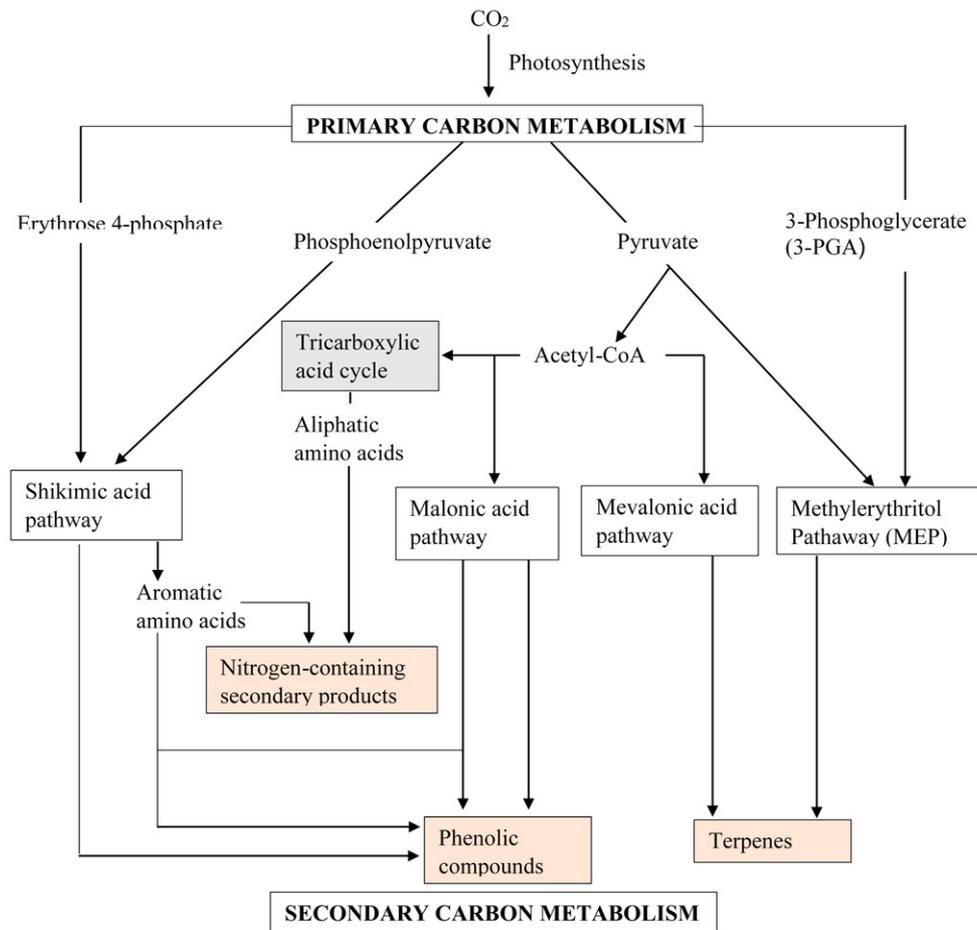
### 1.1. Sekundäre Pflanzenstoffe in Pflanzen

Sekundärmetabolite sind definiert als organische Verbindungen ohne direkten Einfluss auf Wachstum, Entwicklung oder Reproduktion des Organismus und mit geringem Molekulargewicht (< 3000 g/mol) (Williams *et al.*, 1989). Erstmals von Kossel (1891) als solche beschrieben, galten diese Verbindungen zunächst als Abfallprodukte des Primärmetabolismus ohne essentielle Bedeutung für Pflanzen (Sachs (1874), S. 641, Mothes (1955)). Mit der Etablierung der Isotopenmarkierung zur Analyse von Biosynthesewegen (z.B. Calvin und Benson (1948) und Bassham *et al.* (1953)) und Optimierung von NMR- und MS-Messtechniken seit den 1970er Jahren, konnten bis heute ca. 200'000 Sekundärmetaboliten identifiziert und teilweise ihre Synthese aufgeklärt werden (Hartmann, 2007).

Mit der Weiterentwicklung molekularbiologischer und biochemischer Techniken wurde deutlich, dass Sekundärmetabolite eine essentielle Rolle bei der Anpassung von Pflanzen an ihre Umwelt spielen. Sie können unter anderem toxisch auf diverse Mikroorganismen wirken oder das Wachstum anderer Pflanzen unterdrücken (Allelopathie) (Bennett und Wallsgrave, 1994, Reigosa und Malvido-Pazos, 2007). Weiterhin dienen einige Sekundärmetabolite (z.B. Flavonoide) dem Schutz der Blätter vor zu starkem ultravioletten-Licht (UV-Licht) (Li *et al.*, 1993) und andere (z.B. Glucosinolate) wirken als Fraßschutz gegen Insekten (Li *et al.*, 2000).

Während Primärmetabolite ubiquitär im Pflanzenreich vorkommen, ist das Spektrum der sekundären Pflanzenstoffe meist spezifisch für eine taxonomische Gruppe.

Entsprechend ihres biosynthetischen Ursprungs lassen sich Sekundärmetabolite in drei große Gruppen unterteilen: stickstoff- oder schwefelhaltige Sekundärmetabolite (z.B. Alkaloide und Glucosinolate), phenolische Sekundärmetabolite (z.B. Phenylpropanoide) und isoprenoide Sekundärmetabolite (z.B. Terpene) (Harborne, 1999, Ncube und Van Staden, 2015) (siehe Abbildung 1.1).



**Abbildung 1.1 Vereinfachte Darstellung der Klassifizierung von Sekundärmetaboliten.**

Anhand ihres biosynthetischen Ursprunges werden sekundäre Pflanzenstoffe in drei Gruppen eingeteilt: stickstoffhaltige Sekundärmetabolite, phenolische Sekundärmetabolite und Isoprenoide/Terpene (rosa Boxen). Erkennbar ist die enge Verknüpfung zwischen Primär- und Sekundärmetabolismus. (Abbildung aus Ncube und Van Staden (2015))

Durch Modifikationen dieser basalen Grundgerüste entwickelte sich die große Vielfalt unterschiedlichster Sekundärmetabolite und ermöglicht es der Pflanze sich durch ein individuelles Expressionsmuster optimal an vorherrschende Bedingungen (z.B.

Pathogenbefall oder starke Sonneneinstrahlung) anzupassen. Im Folgenden werden die drei Gruppen näher betrachtet.

### 1.1.1. Phenolische Sekundärmetabolite

Phenolische Sekundärmetabolite stellen die am weitesten verbreitete Gruppe der Sekundärmetabolite dar. Sie sind im ganzen Pflanzenreich vertreten und werden aus Phenylalanin über den Shikimisäure-Weg und den Malonsäure-Weg (auch Polyketidweg) synthetisiert (siehe Abbildung 1.1). Entsprechend ihres Grundgerüsts lassen sich phenolische Sekundärmetabolite klassifizieren:

Benzoquinone ( $C_6$ ), Phenolsäuren/Phenolaldehyde ( $C_6-C_1$ ), Phenylessigsäuren ( $C_6-C_2$ ), Hydroxycoumarone/Coumarine ( $C_6-C_3$ ), Naphthochinone ( $C_6-C_4$ ), Xanthone ( $C_6-C_1-C_6$ ), Stilbene ( $C_6-C_2-C_6$ ), Flavonoide ( $C_6-C_3-C_6$ ), Lignine ( $(C_6-C_3)_n$ ) und Tannine ( $(C_6-C_3-C_6)_n$ ) (Ishimaru *et al.*, 1987, Andersen und Markham, 2005, Quideau, 2009).

Einige der Verbindungen, wie Lignine und Flavonoide, sind im Reich der Pflanzen weit verbreitet (Quideau, 2006, Xu *et al.*, 2009). Andere, wie Xanthone, sind nur in wenigen Pflanzenfamilien zu finden (Peres *et al.*, 2000).

Die Produktion phenolischer Sekundärmetabolite ist eine charakteristische Reaktion von Pflanzen auf Stress. Zum Beispiel werden zum Schutz vor UV-Licht verstärkt Flavonoide in Blättern gebildet (Li *et al.*, 1993, Bieza und Lois, 2001, Siipola *et al.*, 2015). Eine antioxidative Wirkung wurde für einige Flavonoide, wie zum Beispiel Kaempferol, Quercetin oder Luteolin, bereits nachgewiesen (Pirker *et al.*, 2006, Agati *et al.*, 2012). Skadhauge *et al.* (1997) zeigten eine Beteiligung von Flavonoiden und Anthocyanen an der Resistenzbildung von Gerste gegen *Fusarium spec.* Padmavati *et al.* (1997) zeigten eine inhibierende Wirkung von Naringenin, Kaempferol, Quercetin und Dihydroquercetin auf das Wachstum von *Pyricularia oryzae* in Reis. Folglich spielen Flavonoide auch eine entscheidende Rolle bei der Pathogenantwort (zusammengefasst in Treutter (2005)).

Lignine sind ein Bestandteil der Zellwand und werden durch abiotischen und biotischen Stress zusätzlich verstärkt synthetisiert und in die Zellwand eingelagert. Auf Grund dessen liegt die Vermutung nahe, dass sie eine physikalische Barriere gegen das Eindringen oder Wachstum von Pathogenen darstellen (Baayen *et al.*, 1996, Bechinger *et al.*, 1999, Bonello *et al.*, 2003, Hudgins *et al.*, 2004). Weiterhin konnte durch *Knock-out* der *Cinnamylalkoholdehydrogenase*-Gene (*CAD*-Gene) in Flachs (*Linum usitatissimum*) gezeigt werden, dass Lignin zur Resistenz gegen *Fusarium oxysporum* beiträgt (Wróbel-Kwiatkowska *et al.*, 2007). Auch in Baumwollpflanzen wurde nachgewiesen, dass Lignin an der generellen Abwehrantwort gegen *Verticillium dahliae* beteiligt ist (Xu *et al.*, 2011). Trotz diverser Mutantanalysen in

*Arabidopsis thaliana* konnte bisher noch kein chemischer Einfluss von Lignin auf die Pathogenabwehr nachgewiesen werden.

### 1.1.2. Isoprenoide Sekundärmetaboliten - Terpene

Während phenolische Sekundärmetabolite im Pflanzenreich am weitesten verbreitet sind, stellen isoprenoide Verbindungen die größte und strukturell diverse Klasse an Sekundärmetaboliten in Pflanze dar. Mindestens 30'000 Verbindungen wurden bereits identifiziert (Broun und Somerville, 2001). Zu den isoprenoiden Verbindungen zählen vor allem Terpene, Steroide und Carotinoide. Die Biosynthese dieser Metabolite erfolgt über zwei unabhängige Wege: den cytosolischen Mevalonsäureweg (MVA) (Lynen, 1964, Bloch, 1965) und den plastidären Methylerythritolweg (MEP) (Lichtenthaler *et al.*, 1997, Schwender *et al.*, 1997, Eisenreich *et al.*, 1998, Eisenreich *et al.*, 2004). Über beide Synthesewege wird Dimethylallyldiphosphat (DMADP) und Isopentenylidiphosphat gebildet, welche die Grundbausteine für alle Terpene darstellen. Über den cytosolischen Mevalonsäureweg werden hauptsächlich Sesquiterpene und Sterole gebildet und über den plastidären Methylerythritolweg vorrangig Monoterpene, Diterpene und Carotinoide (McGarvey und Croteau, 1995, Bartram *et al.*, 2006).

Isoprenoide Verbindungen haben vielfältige Funktionen. Sie fungieren unter anderem auch als Begleitpigment an der Photosynthese (Carotinoide) und als Pflanzenhormon (z.B. Gibberelinsäure, Abscisinsäure, Brassinosteroide) (Bach und Lichtenthaler, 1983, Lange und Ghassemian, 2003). Terpene wiederum sind direkt und indirekt an der Abwehrantwort von Pflanzen beteiligt. Zum Beispiel werden durch Freisetzen von terpenoiden Verbindungen Räuber von Fraßfeinden angelockt, was die Pflanze indirekt vor Angriffen schützt. Kappers *et al.* (2005) zeigten dies in *A. thaliana*. Durch Expression der (3S,6E)-Nerolidolsynthase 1 (*FaNES1*) in Mitochondrien produzierte *A. thaliana* (3S)-(E)-Nerolidol und 4,8-Dimethyl-1,3(E),7-Nonatriene ((E)-DMNT). Im Vergleich zum Wildtyp wurden transgene Pflanzen signifikant häufiger von *Phytoseiulus persimili* (Raubmilben) angezogen. Raubmilben gelten als natürlich Feinde von Spinnmilben. Auch in Reis (*Oryza sativa*) wurden terpenoide Verbindungen mit antimikrobieller Wirkung identifiziert. So werden nach Infektion mit dem Pilz *Pyricularia oryzae* (heute *Magnaporthe oryzae*) verschiedene Diterpene wie Oryzalexin (A-F, S), Momilactone (A und B) und Phytocassane (A bis E) gebildet (Cartwright *et al.*, 1981, Kono *et al.*, 1984, Akatsuka *et al.*, 1985, Kodama *et al.*, 1992, Otomo *et al.*, 2004). Vickers *et al.* (2009) diskutieren die Rolle von volatilen Isoprenoiden während abiotischen Stresses. So greifen sie zum Beispiel die Hypothese von Sharkey (1995) auf, dass sich isoprene Verbindungen in Thylakoidmembranen einlagern und dort physisch hydrophobe Interaktionen

stabilisieren. Auf Grund dessen sollen sie unter Hitzestress (erhöhte Fluktuation von Membranbestandteilen) bestehende photosynthetische Proteinkomplexe schützen. Ein *in vivo* Beweis konnte bisher noch nicht eindeutig erbracht werden.

### 1.1.3. Stickstoff- und schwefelhaltige Sekundärmetabolite

Die dritte Gruppe der Sekundärmetabolite stellen alle stickstoff- und schwefelhaltigen Verbindungen dar. Dazu zählen unter anderem Alkaloide, nicht-proteinogene Aminosäuren, cyanogene Glycoside und Glucosinolate (Wink, 2010).

Alkaloide stellen eine Gruppe strukturell verschiedener und biosynthetisch unabhängiger Moleküle dar. Bisher sind ca. 12000 Verbindungen identifiziert worden, die in etwa 20% aller Pflanzenspezies vorzufinden sind (Facchini, 2001). Trotz der großen strukturellen Diversität lassen sich Alkaloide anhand ihres biosynthetischen Ursprungs klassifizieren (Hegnauer, 1988, Wink, 2003). Viele Alkaloide wirken als Toxine und stellen daher einen generellen Abwehrmechanismus gegen Feinde dar. Kim *et al.* (2006) exprimierten drei für die Koffeinbiosynthese wichtigen *N*-Methyltransferasen in *N. tabacum* und erzeugten so eine Resistenz gegen *Spodoptera litura*-Larven, *Pseudomonas syringae* und diverse andere Pathogene (Kim *et al.*, 2006, Kim und Sano, 2008). Auch eine allelopathische Wirkung wurde bereits beschrieben (Wink, 1983, Wink und Latz-Brüning, 1995, Iqbal *et al.*, 2002). Auf Grund der toxischen Wirkung wurden alkaloide Substanzen zum Beispiel von den Ureinwohnern Südamerikas als Pfeilgift während der Jagd eingesetzt (Boehm, 1920). In der modernen Medizin finden alkaloide Substanzen wie Atropin (Kutchan, 1995), Morphin (Gasser und Guerinot, 1999), Codein (Gasser und Guerinot, 1999), Chinin (López-Meyer und Nessler, 1997), Kokain (Martin, 1987) oder Scopolamin (Kutchan, 1995) Anwendung.

Auch nicht-proteinogene Aminosäuren können toxisch auf tierische Organismen wirken (Dominguez-Bello und Stewart, 1990). In Pflanzen dienen sie neben ihrer Rolle als Signalmolekül der generellen Abwehrantwort. Zum Beispiel weist Canavanin, ein Homolog von Arginin, eine insektizide Wirkung gegen *Manduca sexta* (Tabakschwärmer) auf (zusammengefasst in Rosenthal (2001)) und ist in der Lage das Wachstum anderer Pflanzen zu hemmen (Nakajima *et al.*, 2001)

Das dem Tyrosin strukturell ähnliche Mimosin kommt in einigen tropischen *Leucaena* (eine Gattung der Mimosengewächse) vor und wirkt ebenfalls als Herbizid. Zum Beispiel konnte eine inhibitorische Wirkung auf das Wachstum von Mungbohnenkeimlingen (Smith und Fowden, 1966) und Reis (Prasad und Subhashini, 1994) beobachtet werden. Auch eine antimikrobielle Wirkung wurde bereits beschrieben (Ebuenga *et al.*, 1979). Bei tierischen Organismen (hier

Ratte) führt Mimosin zu Haarausfall, Unfruchtbarkeit und embryonalen Fehlbildungen (Crouse *et al.*, 1962, Hylin und Lichton, 1965, Mosca *et al.*, 1992)

Zu den stickstoffhaltigen Sekundärmetaboliten gehören ebenfalls cyanogene Glycoside. Diese sind definiert als  $\beta$ -Glycoside von  $\alpha$ -Hydroxynitrilen und werden aus Aminosäuren gebildet. Im Reich der Pflanzen wurden sie in mehr als 2500 Spezies, über ca. 130 Familien verteilt, identifiziert (Conn, 1981, Bak *et al.*, 2006, Zagrobelny und Møller, 2011). Da cyanogene Glycoside auch in Farnen gefunden wurden (z.B. im Goldtüpfelfarn (Møller, 2015)), scheint sich die Synthese dieser Metabolite vor mindestens 300 Mio. Jahren entwickelt zu haben (Bak *et al.*, 2006). Höhere Pflanzen enthalten sowohl aromatische (abgeleitet von Tyrosin oder Phenylalanin) als auch aliphatische cyanogene Glycoside (abgeleitet von Isoleucin, Valin oder Leucin) (Zagrobelny *et al.*, 2008). Cyanogene Glycoside sind selbst nicht an der Pflanzenabwehr beteiligt. Erst durch Abspaltung des Zuckerrestes durch  $\beta$ -Glucosidasen entsteht ein instabiles Cyanhydrin, welches spontan zu Cyanwasserstoff (HCN) umgewandelt wird (Morant *et al.*, 2008). In gesunden Pflanzen werden cyanogene Glycoside und die dazugehörigen  $\beta$ -Glucosidasen in verschiedenen Geweben oder Zellkompartimenten gespeichert. Durch Gewebeerstörung, z.B. durch Fraßfeinde, gelangen Enzym und Metabolit zusammen und das toxische Produkt entsteht (Saunders *et al.*, 1977, Frehner und Conn, 1987, Swain *et al.*, 1992). HCN ist giftig für alle tierischen Organismen (u.a. Conn (1969), Oke (1980), Webber *et al.* (1985), Wheeler *et al.* (1990), Cardoso *et al.* (1998)). Obwohl in zahlreichen Studien die Toxizität von HCN gezeigt wurde (z.B. Patton *et al.* (1997)), gibt es auch klare Hinweise auf Anpassungen und Entgiftungsmechanismen einzelner Herbivore. So zeigten Ballhorn *et al.* (2010) das Generalisten, wie zum Beispiel *Schistocerca gregaria* (Wüstenheuschrecke), vom HCN Gehalt in *Phaseolus lunatus* (Limabohne) abgeschreckt wurden, wohingegen Spezialisten, wie *Epilachna varivestis* Mulsant (Mexikanischer Bohnenkäfer), nach dem Verzehr cyanidhaltiger Blätter keine Vergiftungserscheinungen zeigten. Sie stellten die Hypothese auf, dass Spezialisten, zum einen in der Lage sind die HCN-Konzentration im Pflanzenmaterial zu detektieren (und so eine zu hohe Aufnahme verhindert wird) und zum anderen einen Mechanismus entwickelt haben das aufgenommene HCN zu entgiften. Auch *Pieris rapae*-Larven (Kleiner Kohlweißling, bedeutender Schädling im Gemüseanbau) sind in der Lage transient in *A. thaliana* gebildetes Dhurrin durch Expression zweier Enzyme zu entgiften (Stauber *et al.*, 2012).

Glucosinolate enthalten neben dem für die Klasse typischen Stickstoffatom auch Schwefelatome. Sie werden deshalb auch als Thioglycoside bezeichnet. Glucosinolate werden von Pflanzen der Ordnung *Capparales* gebildet, wozu auch die Familie der Brassicaceen zählt. Bisher sind ca. 132 verschiedene Glucosinolate identifiziert worden (Agerbirk und Olsen, 2012). Entsprechend der Aminosäure, aus der sie gebildet werden, lassen sich Glucosinolate in drei Gruppen einteilen: aliphatische Glucosinolate (abgeleitet von Ala, Leu, Ile, Val oder

Met), benzyliche Glucosinolate (abgeleitet von Phe oder Tyr) und indolische Glucosinolate (abgeleitet von Trp) (Sonderby *et al.*, 2010). Ähnlich wie cyanogene Glycoside werden auch Glucosinolate und ihre abbauenden Enzyme getrennt voneinander gespeichert. Verschiedene Forschergruppen postulieren dabei die Einlagerung von Myrosinase in sogenannten Myrosinzellen (Bones und Rossiter, 1996, Thangstad *et al.*, 2004, Wittstock und Burow, 2010). Durch Verwundung der Pflanze gelangen Metabolit und Myrosinase in räumliche Nähe, Glucosinolate werden hydrolysiert und hochreaktive Produkte wie Isothiocyanate, Thiocyanate und Nitrile entstehen (Bones und Rossiter, 1996). Diese Vielfalt an Abwehrstoffen ermöglicht es der Pflanze spezifisch und effektiv Insekten, Bakterien, Pilze und Nematoden abzuwehren (Manici *et al.*, 1997, Bending und Lincoln, 2000, Tierens *et al.*, 2001, Buskov *et al.*, 2002). Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass abhängig von den der Zusammensetzung der Abbauprodukte von Glucosinolaten unterschiedliche Reaktionen ausgelöst werden. So werden Generalisten wie *Trichoplusia ni* (Aschgraue Höckereule) durch hohe Glucosinolatkonzentrationen abgeschreckt. Dabei scheinen sie besonders sensibel auf die Anwesenheit von Isothiocyanaten zu reagieren (Lambrix *et al.*, 2001b, Kliebenstein *et al.*, 2002, Zhang *et al.*, 2006). Ähnliches wurde für *Spodoptera littoralis* (Afrikanischer Baumwollwurm) beobachtet (Burow *et al.*, 2006). Auf Spezialisten wie *Pieris rapae* (Kleiner Kohlweißling) und *Plutella xylostella* (Kohlschabe) haben Abbauprodukte der Glucosinolate eine eher anziehende Wirkung (Ratzka *et al.*, 2002, Wittstock *et al.*, 2004). Mumm *et al.* (2008) beobachteten weiterhin, dass *P. rapae* mehr Eier auf Pflanzen mit hohen Glucosinolatkonzentrationen ablegt. Wie Spezialisten die toxische Wirkung von Isothiocyanaten und anderen Abbauprodukten der Glucosinolate überwinden ist noch nicht vollständig verstanden.

Neben der Klassifizierung von Sekundärmetaboliten anhand ihres biosynthetischen Ursprungs, können sie auch entsprechend ihrer zeitlichen Verfügbarkeit eingeteilt werden. Dabei wird zwischen Phytoalexinen und Phytoanticipinen unterschieden. Phytoalexine werdend *de novo* nach Pathogenbefall synthetisiert (Müller, 1956, Müller, 1958) wohingegen Phytoanticipine zum Zeitpunkt des Befalls bereits in der Zelle vorlagen oder maximal durch Modifikation aus einem Precursor gebildet werden (VanEtten *et al.*, 1994). Es ist anzumerken, dass eine Substanz in einer Pflanzenart als Phytoalexin klassifiziert wird, in einer anderen Art allerdings als Phytoanticipin fungiert (Pedras *et al.*, 2002).

## 1.2. Phytoalexine als Bestandteil der pflanzlichen Abwehr

Obwohl bereits 1902 erste Beobachtungen bezüglich erworbener Resistenzen von Wirtspflanzen nach Pathogenbefall veröffentlicht wurden (vgl. Ward (1902)), fehlte lange Zeit der wissenschaftliche Nachweis eines „Giftes“ als Ursache für diesen Effekt (Müller, 1958). 1939 untersuchten Müller und Kollegen verschiedene *Phytophthora infestans* Stämme auf ihre Fähigkeit Kartoffelknollen zu infizieren. Dabei fanden sie heraus, dass sich nach Inokulation der Wirtspflanze mit einem avirulenten *P. infestans* Stamm das Gewebe in einer Art und Weise veränderte, dass anschließend auch ein virulenter Stamm die Pflanze nicht erfolgreich infizieren konnte. Auch weitere pathogene Mikroorganismen waren nicht in der Lage Pflanzen zu befallen, welche zuvor mit dem avirulenten *P. infestans* Stamm behandelt wurden (Müller und Borger, 1940). Es entstand die Hypothese von postinfektionell gebildeten, nicht spezifischen Metaboliten als Ursache für die erworbene Resistenz – die Phytoalexine. Paxton (1980) veröffentlichte eine einheitliche Definition für Phytoalexine und VanEtten *et al.* (1994) grenzte sie klar von den konstitutiv gebildeten Phytoanticipinen ab. 1960 wurde erstmals ein Phytoalexin (Pisatin aus *Pisum sativum*) isoliert und näher charakterisiert (Cruickshank und Perrin, 1960).

Entsprechend dieser Definition gelten Phytoalexine als antimikrobielle Verbindungen mit niedrigem Molekulargewicht. Außerdem sind sie nicht in gesunden Pflanzen zu finden, sondern werden *de novo* nach Auftreten eines abiotischen oder biotischen Elicitors synthetisiert (Müller und Borger, 1940, Müller, 1958, Paxton, 1980). Dabei kann ein Metabolit in einer Pflanzenfamilie als Phytoalexinen fungieren und in einer anderen Familie als Phytoanticipin (z.B. Indol-3-acetonitrile) (Pedras *et al.*, 2002).

Phytoalexine sind in zahlreichen Pflanzenfamilien zu finden und gehören diversen Klassen von Sekundärmetaboliten an (siehe Tabelle 1.1). Entsprechend Kuc (1995) sind mind. 350 verschiedene Phytoalexine in ca. 30 Pflanzenfamilien bekannt. Die meisten davon (130) wurden in Leguminosen identifiziert. Viele Phytoalexine stammen aus Dikotyledonen, aber auch aus Monokotyledonen konnten Phytoalexine isoliert werden (z.B. Momilactone und Oryzalexine aus Reis oder Zealexin und Kauralexin aus Mais) (Schmelz *et al.*, 2014). Spezifische Phytoalexine sind allerdings meist nur in nah verwandten Arten zu finden (z.B. Camalexin ausschließlich in Arten des Tribus *Camelineae* (Bednarek *et al.*, 2011)).

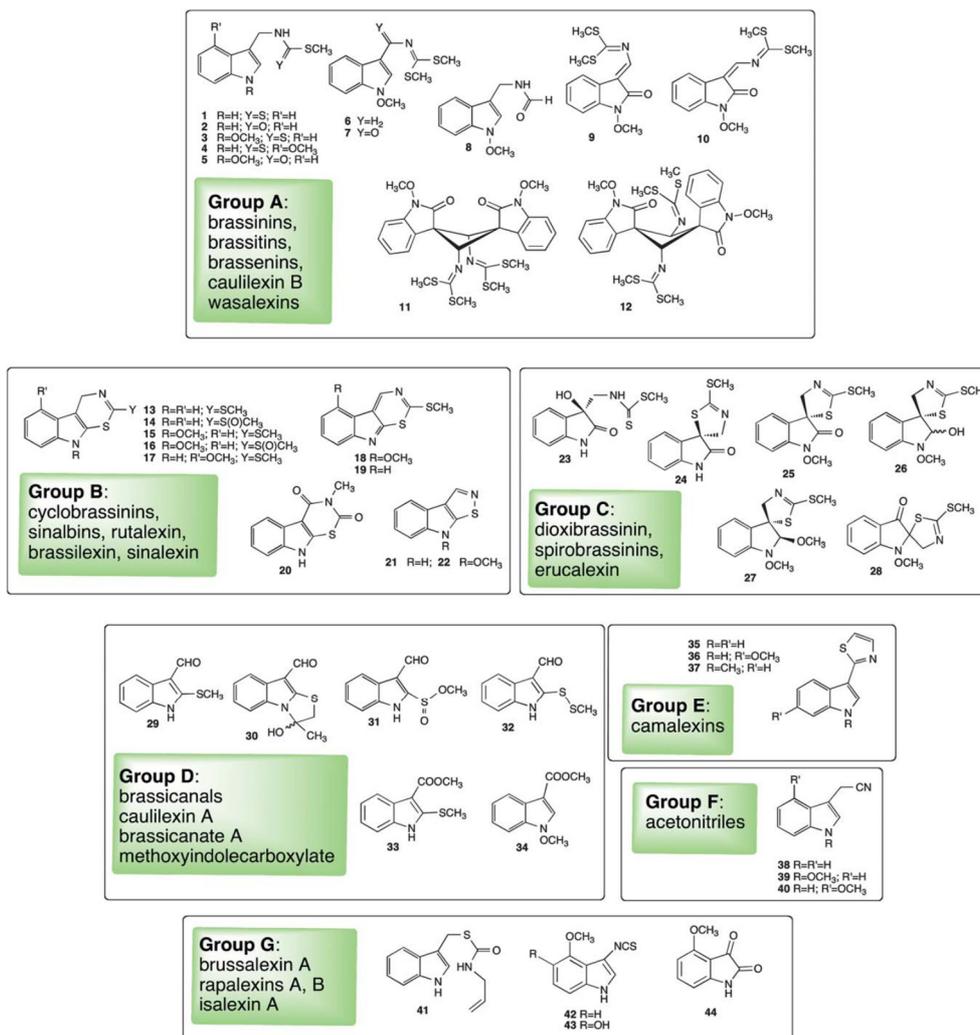
**Tabelle 1.1 Übersicht über Phytoalexine aus verschiedenen Pflanzenfamilien und Strukturklassen.**

Aufgelistet sind verschiedene Pflanzenfamilien und die für diese Familie typischen Phytoalexinklassen. (aus Jeandet *et al.* (2014))

| <b>Familie</b>                                     | <b>Typ des Phytoalexins /Beispiel</b>           | <b>Referenz</b>  |
|--|---|--|
| <b><i>Amaryllidaceae</i></b>                       | Flavane   | (Coxon <i>et al.</i> , 1980)                                   |
| <b><i>Brassicaceae</i><br/>(<i>Cruciferae</i>)</b> | Indolische Phytoalexine/Camalexin               | (Browne <i>et al.</i> , 1991)                                  |
|  | schwefelhaltige Phytoalexine/Brassinin          | (Pedras <i>et al.</i> , 2000)                                  |
| <b><i>Chenopodiaceae</i></b>                       | Flavanone/Betagarin;<br>Isoflavone/Betavulgarin | (Geigert <i>et al.</i> , 1973)                                 |
| <b><i>Compositae</i></b>                           | Polyacetylene/Safynol                           | (Allen und Thomas, 1971)                                       |
| <b><i>Convolvulaceae</i></b>                       | Furanosesquiterpene/Ipomeamaron                 | (Uritani <i>et al.</i> , 1960)                                 |
| <b><i>Euphorbiaceae</i></b>                        | Diterpene/Casben                                | (Sitton und West, 1975)  |
| <b><i>Poaceae</i></b>                              | Diterpenoide/Momilacton                         | (Poloni und Schirawski, 2014,<br>Schmelz <i>et al.</i> , 2014) |
|  | Phytocassane/Kauralexin                         | (Poloni und Schirawski, 2014,<br>Schmelz <i>et al.</i> , 2014) |
|  | Deoxyanthocyanidine/Luteolinidin                | und (LO <i>et al.</i> , 1999, Poloni und<br>Schirawski, 2014)  |
|  | Apigeninidin                                    | (Jeandet <i>et al.</i> , 2013)                                 |
|  | Flavanone/Sakuranetin                           | (Jeandet <i>et al.</i> , 2013)                                 |
|  | Phenylamide                                     | (Park <i>et al.</i> , 2013)                                    |
| <b><i>Leguminosae</i></b>                          | Isoflavone; Isoflavanone; Isoflavane            | und (Jeandet <i>et al.</i> , 2013)                             |
|  | Coumestane                                      |  |
|  | Pterocarpan/Pisatin, Phaseollin, Glyceollin     | (Jeandet <i>et al.</i> , 2013)                                 |
|  | und Maiackiain                                  |  |
|  | Furanoacetylene/Wyeron;                         | (Jeandet <i>et al.</i> , 2013)                                 |
|  | Stilbene/Resveratrol Pterocarpin                |  |
| <b><i>Linaceae</i></b>                             | Phenylpropanoide/ Coniferylalkohol              | (Keen und Littlefield, 1979)                                   |
| <b><i>Malvaceae</i></b>                            | Terpenoide Naphtaldehyde/Gossypol               | (Sunilkumar <i>et al.</i> , 2006)                              |
| <b><i>Moraceae</i></b>                             | Furanopterocarpane/Moracins A-H                 | (Takasugi <i>et al.</i> , 1979)                                |
| <b><i>Orchidaceae</i></b>                          | Dihydrophenanthrene/Loroglossol                 | (Ward <i>et al.</i> , 1975)                                    |
| <b><i>Rutaceae</i></b>                             | Methylierte phenolische                         | (Hartmann und Nienhaus, 1974)                                  |
|  | Komponenten/Xanthoxylin                         |  |
| <b><i>Umbelliferae</i></b>                         | Polyacetylene/Falcarinol                        | (Harding und Heale, 1981)                                      |
|  | Phenolische Komponenten/Xanthotoxin             | (Johnson <i>et al.</i> , 1973)                                 |
|  | 6-Methoxymellein                                | (Condon <i>et al.</i> , 1963)                                  |
| <b><i>Vitaceae</i></b>                             | Stilbene/Resveratrol                            | (Langcake und Pryce, 1976)                                     |
| <b><i>Rosaceae</i></b>                             | Biphenyle/Auarperin                             | (Kokubun und Harborne, 1995)                                   |
|  | Dibenzofurane/Cotonefuran                       | (Kokubun und Harborne, 1995)                                   |
| <b><i>Solanaceae</i></b>                           | Phenylpropanoide                                | (Jeandet <i>et al.</i> , 2013)                                 |
|  | Steroidale Glycoalkaloide                       | (Jeandet <i>et al.</i> , 2013)                                 |
|  | Sesquiterpenoide                                | (Jeandet <i>et al.</i> , 2013)                                 |
|  | Coumarine                                       | (Jeandet <i>et al.</i> , 2013)                                 |
|  | polyacetylenartige Derivate                     | (Jeandet <i>et al.</i> , 2013)                                 |

Von den 3700 *Brassicaceae*-Arten wurden ca. 30 Arten auf das Vorkommen von Phytoalexinen untersucht. Bisher wurden 44 verschiedene Metaboliten identifiziert (Pedras *et al.*, 2011). Die meisten untersuchten Phytoalexine der *Brassicaceae* besitzen ein Indol-Grundgerüst und enthalten einen Schwefelrest. Bisher wurden sieben schwefelfreie

Phytoalexine identifiziert (Pedras und Zheng, 2016). Für die meisten Phytoalexine aus *Brassicaceae* erfolgt die Biosynthese ausgehend von Tryptophan. Die Aminosäure wird aus Anthranilat über den Shikimisäure-Weg synthetisiert (Dosselaere und Vanderleyden, 2001, Knaggs, 2003) und durch oxidative Decarboxylierung weiter prozessiert (Pedras *et al.*, 2011) (Für detaillierte Biosynthese am Beispiel Camalexin siehe Abschnitt 1.4.1). Pedras *et al.* (2011) haben die Phytoalexine der *Brassicaceae* anhand ihrer strukturellen Eigenschaften in sieben Gruppen eingeteilt (siehe Abbildung 1.2).



**Abbildung 1.2 Einteilung von Phytoalexinen aus *Brassicaceae* anhand ihrer strukturellen Eigenschaften.** Die 44 bisher bekannten Phytoalexine der *Brassicaceae* können anhand ihrer strukturellen Eigenschaften in sieben Klassen eingeteilt werden: (A) Strukturen, die ein Indol oder 2-oxiindol und ein Stickstoffatom an Position C-10 enthalten; (B) Strukturen, bei denen ein Ring an die Indolgruppe fusioniert wurde; (C) (S)-dioxibrassinin und Strukturen, die einen spirozyklischen Ring enthalten; (D) Strukturen, die ein Indol und eine Aldehyd- oder Estergruppe an Position C-3 enthalten; (E) Strukturen, die ein Indol und ein Thiazol enthalten; (F) Strukturen, die ein Indol und eine Ethylnitrilgruppe enthalten; (G) alle restlichen Phytoalexine. (aus Pedras *et al.* (2011))

Die antimikrobielle Wirkung von Phytoalexinen wurde bereits in diversen Studien gezeigt (u.a. (Cruickshank, 1962, Langcake und McCarthy, 1979, Akatsuka *et al.*, 1985, Pedras *et al.*, 2007). Für die Synthese sind allerdings keine speziellen Elicitoren des entsprechenden Pathogens nötig. Die Akkumulation kann durch vielfältige, unspezifische Faktoren ausgelöst werden. Dazu zählen unter anderem anorganische Salze (z.B. Natriumselenit, Manganchlorid) (Perrin und Cruickshank, 1965), Polyglucane (Sharp *et al.*, 1984), Ethylen (Chalutz *et al.*, 1969, Chalutz und Stahmann, 1969), Fettsäuren (Bostock *et al.*, 1981), Chitosan-Oligomere (Kendra und Hadwiger, 1984) und Polypeptide (Cruickshank und Perrin, 1968). Aber auch von der Pflanze nach Verwundung oder Infektion abgesonderte volatile Substanzen (Hargreaves und Bailey, 1978, Dixon, 1986, Kuc, 1991, Dixon *et al.*, 1994), UV-Strahlung und geringe Temperaturen sind als Elicitoren der Phytoalexinbiosynthese beschrieben (Hadwiger und Schwochau, 1971, Mercier *et al.*, 1993). In *Brassicaceae* wurden auch Schwermetalle als Induktor beobachtet (Mithöfer *et al.*, 2004, Pedras *et al.*, 2011). Auf Grund dieser großen Diversität wird davon ausgegangen, dass der Auslöser für die Bildung von Phytoalexinen nicht der Elicitor selbst ist, sondern die dadurch hervorgerufene metabolische Störung (Kuc, 1995). Wie bereits erwähnt, wirken Phytoalexine inhibitorisch auf das Wachstum diverser Mikroorganismen. Zum Beispiel beobachteten Adrian *et al.* (1997), dass Resveratrol die Keimung von *Botrytis cinerea*-Sporen hemmt, das Mycelwachstum inhibiert, cytoplasmatische Granulierung auslöst und zu fehlgebildeten Keimschläuchen führt. Die exakte Wirkungsweise der Phytoalexine ist allerdings wenig verstanden und erforscht. Es gibt Hinweise, dass Phytoalexine die Zellwand des Mikroorganismus zerstören. Amin *et al.* (1988) fanden heraus, dass 6-Methoxymellein (Phytoalexin aus Karotte) die Einlagerung von Thymidin, Uridin und Leucin in *Candida albicans*-Zellen verlangsamte. Außerdem wurde eine veränderte Membranpermeabilität beobachtet. Auch für Kieviton (Smith, 1982), Phaseollin (Smith, 1982), Capsidiol (Turelli *et al.*, 1984), Rhishitin (Robertson *et al.*, 1985), Oryzalexin D (Sekido und Akatsuka, 1987) und Camalexin (Rogers *et al.*, 1996) wurde eine destabilisierende Wirkung auf die entsprechende Pilz- oder Bakterienmembran durch Phytoalexine festgestellt.

Phytoalexine sind auch für die Medizin von Interesse. In *in vitro* Studien und Tierexperimenten konnte zum Beispiel für Resveratrol eine entzündungshemmende und antioxidative Wirkung nachgewiesen werden. Auch hemmte Resveratrol die Thrombozytenaggregation und das Wachstum von Krebszellen. Im Mausmodell scheint Resveratrol chemopräventiv auf Brustkrebs zu wirken und chemotherapeutisch in allen drei Stadien der Karzinogenese einzugreifen (Savouret und Quesne, 2002, Athar *et al.*, 2007). Ähnliches wurde für Brassinin und Homobrassinin (Kello *et al.*, 2014), Camalexin (Smith *et al.*, 2014), 3-Deoxyanthocyanidin (Yang *et al.*, 2009) und Maslinsäure (Lozano-Mena *et al.*, 2014) beobachtet. Allerdings muss erwähnt werden, dass bisher nicht genügend klinische Studien vorliegen, um eine tatsächliche antikanzerogene Wirkung auf den menschlichen Körper nachzuweisen.

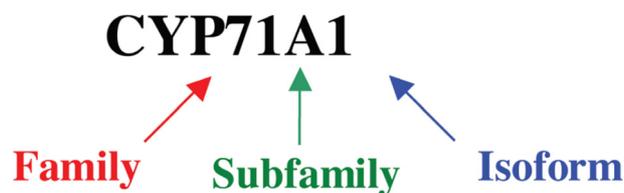
### 1.3. Cytochrom P450-Monooxygenasen

Klingenberg (1958) beschrieb erstmals ein Kohlenstoffmonoxid-bindendes Pigment bei seiner Arbeit mit Cytochrom b5-Reduktasen in Rattenlebermikrosomen. 1962 wurde dieses Pigment erstmals unter dem Namen „P450“ publiziert (Omura und Sato, 1962).

Cytochrom P450-Enzyme (CYPs) sind Hämproteine, die an diversen Biosynthesewegen beteiligt sind und in fast allen bekannten Organismen vorhanden sind (Nelson, 2009b). Bisher wurden in Viren zwei CYPs annotiert, in Archeen 48, in Bakterien 1254, in Pilzen 5729, in Insekten 3452 und in Vertebraten 1978. In Pflanzen wurden insgesamt 7446 für P450-Enzyme codierende Sequenzen gefunden. In *Arabidopsis* sind 244 CYPs (plus 28 Pseudogene) bekannt (<http://drnelson.uthsc.edu/cytochromeP450.html>, Stand 09.07.2017; Nelson (2009a)). Damit stellen sie, nach F-Box Proteinen und *receptor-like kinases* (RLKs), die drittgrößte Proteinfamilie in *A. thaliana* dar (Nelson und Werck-Reichhart, 2011).

Der Name P450 ist abgeleitet von der charakteristischen Eigenschaft dieser Enzyme. Sie binden im reduzierten Zustand Kohlenstoffmonoxid (CO), was zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums zu 450 nm führt (Omura und Sato, 1964).

Die Nomenklatur von CYPs folgt einheitlichen Richtlinien und basiert auf Protein-Sequenzhomologien und phylogenetischen Eigenschaften (Nelson, 2006). CYP beschreibt die Zugehörigkeit zur Superfamilie der Cytochrom P450-Monooxygenasen. Die angeschlossene Zahl gibt die Familie an (Proteine einer Familie müssen eine Sequenzhomologie von mind. 40% aufweisen) und der Großbuchstabe bezeichnet die Unterfamilie (Proteine einer Unterfamilie müssen zu mind. 55% identisch sein). Die letzte Zahl beschreibt die Nummer des individuellen Gens. Dabei wird chronologisch, entsprechend der Einreichung bei einem Komitee, durchnummeriert (siehe Abbildung 1.3) (Nelson, 2006).



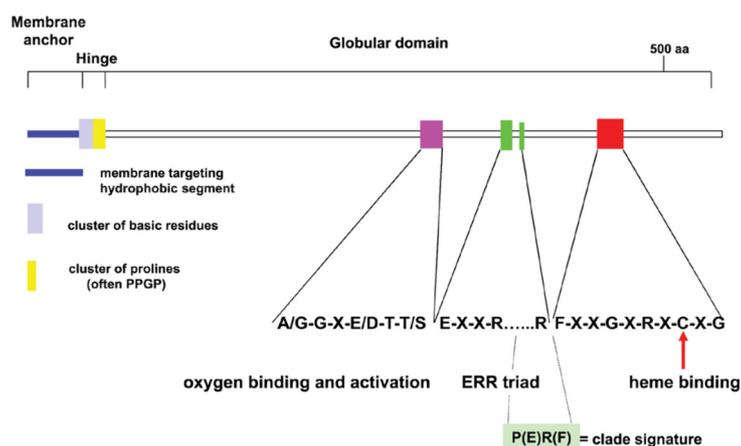
**Abbildung 1.3 Nomenklatur von CYPs.**

Die Bezeichnung von CYPs folgt definierten Richtlinien. Dabei steht CYP für die Zugehörigkeit zu Superfamilie der Cytochrom P450-Monooxygenasen, die Zahl die Zuordnung zu einer Familie, der nachfolgende Buchstabe für die Unterfamilie (Subfamily) und die letzte Zahl gibt die Nummer des entsprechenden Gens (Isoform) an. (Abbildung aus Bak *et al.* (2011))

Obwohl CYPs sehr diverse Primärstrukturen haben und Homologien teilweise unter 20% liegen, haben sie alle einige strukturelle Eigenschaften gemeinsam. Alle CYPs besitzen eine

Häm-Gruppe als katalytisches Zentrum, welches über die Thiolat-Gruppe des konservierten Cysteins mit dem Protein-Backbone verknüpft ist. Auch die Tertiärstruktur der einzelnen Proteine weist Ähnlichkeiten auf. (Graham und Peterson, 1999, Werck-Reichhart und Feyereisen, 2000). Die meisten pflanzlichen CYPs sind am Endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisiert. Für wenige Ausnahmen wurde eine plastidäre Lokalisation nachgewiesen (Schuler und Werck-Reichhart, 2003, Stumpe *et al.*, 2006, Bak *et al.*, 2011).

ER-lokalisierte CYPs sind durch eine kurze hydrophobe Region am N-Terminus an der zytoplasmatischen Seite des ER fixiert. Neben diesem Membrananker besitzen alle CYPs einen Prolin-reichen flexiblen Linker (*hinge*) und einen konservierten Sequenzabschnitt um das hämbindende Cystein. Ebenfalls konserviert liegt die E-R-R Region vor. Es wird vermutet, dass dieser Bereich zur Stabilisierung der Häm-Tasche dient. Weiterhin scheinen viele CYPs ein A/GGCE/D Motiv zu besitzen, welches an der Sauerstoffbindung beteiligt sein könnte (siehe Abbildung 1.4) (zusammengefasst in Bak *et al.* (2011)).



**Abbildung 1.4 konservierte Strukturen von pflanzlichen CYPs.**

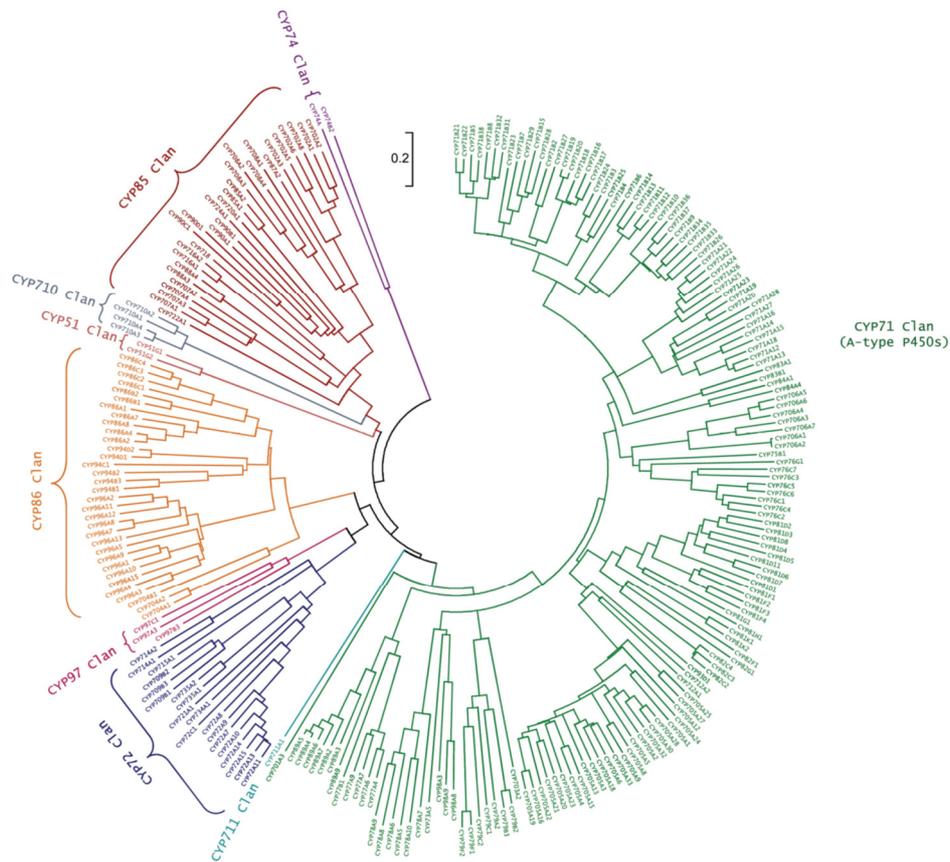
Dargestellt sind die konservierten Strukturen von P450-Proteinen. Trotz hoher Sequenzvariabilität können verschiedene Domänen in allen CYPs identifiziert werden. Dazu zählen der Membrananker (*membrane anchor*), der flexible Linker (*hinge*), die E-R-R Region (ERR triad), das A/GGCE/D Motiv (zur Bindung des Sauerstoffes; *oxygen binding and activation*), das Häm-bindende Cystein (*heme binding*) und die PERF-Region (*clade signature*) (Abbildung aus Bak *et al.* (2011)).

Anhand der „PERF“ Konsensussequenz können CYPs in sog. *clades* eingeteilt werden. In Pflanzen werden CYPs in zwei große Gruppen eingeteilt: Typ A- und Typ *Nicht-A* (siehe Abbildung 1.5). CYPs des Typs-A haben eine charakteristische simple, einheitliche Struktur und besitzen alle ein hochkonserviertes Phase-0-Intron. Nah verwandte Gene liegen oft geclustert auf einem Chromosom vor (Paquette *et al.*, 2000). Durst und Nelson (1995) stellten die Hypothese auf, dass sie alle von einem gemeinsamen Vorfahren abstammen und

pflanzen-spezifische Reaktionen katalysieren. Die Mehrheit der pflanzlichen CYPs gehören der *clade A* an. Oft sind sie an biosynthetischen Prozessen des Sekundärmetabolismus beteiligt. Im Gegensatz dazu weisen Enzyme des *Nicht-A* Typs eine deutlich höhere Variabilität auf. Zu dieser Gruppe zählen mind. acht klar unterscheidbare Untergruppen. Es gibt Beispiele dafür, dass CYPs des *Nicht-A* Typs eine höhere Homologie zu CYPs anderer Organismen haben als zu anderen pflanzlichen CYPs (Durst und Nelson, 1995, Schuler und Werck-Reichhart, 2003). Es wird vermutet, dass diese Enzyme (z.B. CYP51-Enzyme) essentielle, biochemische Funktionen übernehmen, die sich bereits vor der Verbreitung der Pflanzen entwickelt hatten (Paquette *et al.*, 2000). Durch häufige Genduplikationen und Diversifizierung während der Evolution der Angiospermen hat sich die CYP71-Enzyme zur größten Familie der P450er in Pflanzen entwickelt. In *A. thaliana* wurden insgesamt 54 CYP71-Enzyme identifiziert (17 CYP71As und 37 CYP71Bs) (<http://drnelson.uthsc.edu/Arabfam.html>; Nelson (2009b)). Lediglich für einzelne Vertreter der CYP71 Familie konnten bisher Funktionen identifiziert werden. Hauptsächlich sind hier die an der Camalexinbiosynthese beteiligten Enzyme CYP71A13 und CYP71B15 zu nennen (Nafisi *et al.*, 2007, Böttcher *et al.*, 2009) (siehe Abschnitt 1.4.1) sowie CYP71A12, welches in *A. thaliana* sowohl in Blättern (Zhou *et al.*, 1999, Schuegger *et al.*, 2006, Müller *et al.*, 2015) als auch in Wurzeln an der Camalexinsynthese involviert zu sein scheint (Millet *et al.*, 2010).

Als Monooxygenasen sind CYPs an diversen Reaktionen *in planta* beteiligt, z.B. an der Aufrechterhaltung des Hormongleichgewichtes, der Oxygenierung von Fettsäuren, der Synthese von Flavonoiden, diverser Abwehrstoffe und der Entgiftung von Xenobiotika (Chapple, 1998, Kahn und Durst, 2000, Werck-Reichhart und Feyereisen, 2000). Im Allgemeinen ist die katalytische Reaktion eines CYPs in vier Phasen eingeteilt. In der ersten Phase bindet das Substrat im aktiven Zentrum. In Phase 2 wird durch Übertragung eines Elektrons von NADPH  $Fe^{3+}$  zu  $Fe^{2+}$  reduziert und  $O_2$  bindet an  $Fe^{2+}$ . Anschließend wird in der dritten Phase ein weiteres Elektron von NADPH übertragen und es entsteht ein hoch reaktiver Komplex. Ein Sauerstoffatom wird zu Wasser reduziert, das Zweite ist an das Substrat gebunden. In der letzten Phase diffundiert das hydroxylierte Substrat ab und das Enzym liegt erneut in seinem Ausgangszustand vor. (Werck-Reichhart und Feyereisen, 2000, Meunier *et al.*, 2004, Shaik *et al.*, 2005). Aber auch eine Reihe von Reaktionen, in denen kein molekularer Sauerstoff eingeführt wird, wurde bereits detailliert beschrieben (Klasse III Enzyme; (Werck-Reichhart und Feyereisen, 2000). Der vollständige, detaillierte Ablauf der Reaktion konnte noch nicht komplett aufgeklärt werden, was unter anderem an der Kurzlebigkeit der Intermediate liegt (Werck-Reichhart und Feyereisen, 2000). Für die Übertragung der Elektronen von NADPH ins katalytische Zentrum des CYPs sind membranständige Cytochrom P450-Reduktasen essentiell. Einige wenige CYPs nutzen Ferredoxin als Elektronenüberträger

oder benötigen weder Sauerstoff noch Elektronendonatoren für die katalysierte Reaktion (Werck-Reichhart und Feyereisen, 2000, Paine *et al.*, 2005).



**Abbildung 1.5 Phylogenetischer Baum von 246 *A. thaliana* CYPs.**

CYPs lassen sich in zwei große *clades* einteilen: Typ A- und Typ *Nicht-A*. Die größte *clade* stellt der CYP71-Stamm (Typ-A) dar, mit 152 CYPs und 20 Pseudogenen. Zum Typ *Nicht-A* gehören 93 CYPs und sieben Pseudogene. Dargestellt ist ein zirkuläres Cladogramm von 246 Vollängen-CYPs aus *A.thaliana*. Insgesamt wurden bisher 47 CYP-Familien identifiziert (<http://www-ibmp.u-strasbg.fr/~CYPedia/>, Stand 14.09.2017; Nelson (2009a)) Die phylogenetische Distanz wurde anhand von Aminosäure-Substitutionen ermittelt. (Abbildung aus Bak *et al.* (2011))

Zahlreiche durch CYPs katalysierte Reaktionen resultieren in toxischen Intermediaten (z.B. Cyanhydrine während der Dhurrinbiosynthese (Nielsen *et al.*, 2008)). Um Autotoxizität zu vermeiden, werden diese Zwischenprodukte innerhalb der Pflanze nicht akkumuliert, sondern direkt weiterreagiert. Diese Kanalisierung von Metaboliten (*metabolic channeling*) bietet weiterhin den Vorteil, dass lokal hohe Substratkonzentrationen erreicht werden, was wiederum einen effektiven Ablauf der Biosynthese garantiert. Außerdem können verschiedene, miteinander konkurrierende Abläufe genau aufeinander abgestimmt werden und *cross-talk* kann minimiert werden (Winkel, 2004). Um dies zu gewährleisten, ist eine Kompartimentierung einzelner Prozesse und ein enger Kontakt der beteiligten Enzyme

essentiell. Die Idee der Komplexbildung von biosynthetischen Enzymen entstand (Winkel, 2004).

Bereits in den 1950er Jahren wurden erste Entdeckungen zu zellulärer Kompartimentierung und *metabolic channeling* innerhalb eines Biosyntheseweges gemacht. So konnten Yanofsky und Rachmeler (1958) bei ihren Studien zur Tryptophanbiosynthese in *Neurospora grassa* nie freies Indol detektieren. Sie stellen die Hypothese auf, dass freies Indol kein Intermediat der Tryptophansynthese darstellt. Später wurde nachgewiesen, dass die bifunktionale Tryptophan-Synthase freies Indol von Indol-3-glycerol-phosphat abspaltet und durch Konjugation von Serin Tryptophan ausgebildet wird (Radwanski und Last, 1995). So wurde bereits vor knapp 60 Jahren *metabolic channelling* während der Biosynthese von Tryptophan beobachtet. Ein Beispiel für die frühe Entdeckung von Kompartimentierung biosynthetischer Enzyme erbrachte Zalokar (1960). Er wies durch Separierung verschiedener Zellstrukturen von *Neurospora*-Hyphen (Kerne, Mitochondrien, Vakuolen etc.) nach, dass bestimmte Enzymaktivitäten nur in definierten Kompartimenten ablaufen. Seit diesen ersten, teilweise zufälligen Entdeckungen wurden im Laufe der Jahre zahlreiche Hinweise für die Metabolonbildung biosynthetischer Enzyme erbracht.

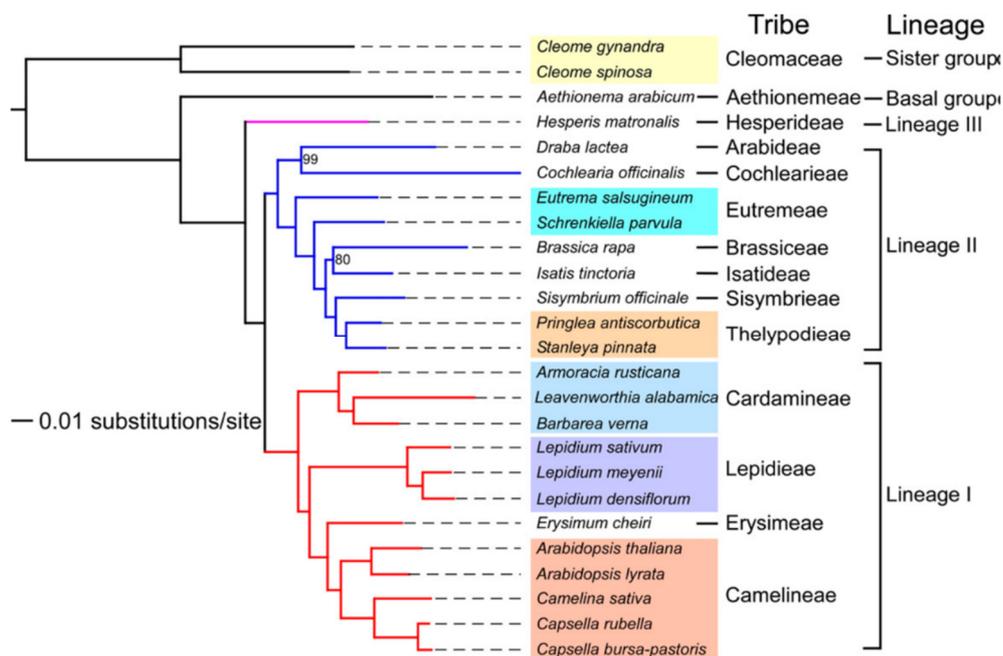
Ein Beispiel dafür ist die Dhurrinbiosynthese in Hirse (*Sorghum bicolor*). Während des Syntheseprozesses entstehen einige Intermediate, die kaum nachweisbar sind (z.B. Cyanohydrin und *N*-hydroxy Aminosäuren). Es wird davon ausgegangen, dass diese Metabolite durch Ausbildung eines Multienzymkomplexes effizient kanalisiert werden (Møller und Conn, 1980, Sibbesen *et al.*, 1995, Kristensen *et al.*, 2005). Um dies nachzuweisen, exprimierten Nielsen *et al.* (2008) zwei CYPs (CYP79A1 und CYP71E1) und die cytosolische UDP-Glycosyltransferase UGT85B1 stabil in *A. thaliana* bzw. transient in *S. bicolor* und detektierten eine veränderte Lokalisation von UGT85B1, wenn das Enzym mit den beiden CYPs koexprimiert wurde. Laursen *et al.* (2016) konnten anschließend eine Interaktion von CYP79A1, CYP71E1, UGT85B1 und POR2b (Cytochrom P450-Reduktase aus *S. bicolor*) mit Hilfe von auf Fluoreszenzlebensdauer-Mikroskopie basierendem Nachweis des Förster-Resonanzenergietransfers (FLIM-FRET) und Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) zeigen. Dabei ergab sich eine Interaktion von UGT85B1 mit CYP79A1 und CYP71E1. Die Glycosyltransferase ist allerdings nicht notwendig für die Bindung der beiden CYPs untereinander. Durch Bestimmung der katalytischen Aktivitäten der biosynthetischen Enzyme in Liposomen wurde ein deutlich erhöhter Fluss von L-Tyrosin zur Dhurrin festgestellt, wenn zu CYP79A1 und CYP71E1 auch UGT85B1 vorhanden war. Dies ist ein weiterer Hinweis auf das Vorhandensein eines Enzymkomplexes mit der Aufgabe des *metabolic channelings*.

Solch eine Komplexbildung konnte auch für Enzyme der Ligninbiosynthese (Chen *et al.*, 2011, Bassard *et al.*, 2012), der Flavonoidbiosynthese (Crosby *et al.*, 2011, Dastmalchi *et al.*, 2016) und des Citratzyklus (Wu und Minter, 2015) gezeigt werden.

## 1.4. *Arabidopsis thaliana* und *Eutrema salsugineum* als Modellsysteme der Phytoalexinbiosynthese

### 1.4.1. Camalexin und die Rolle von Glutathiontransferasen in *A. thaliana*

Browne *et al.* (1991) isolierten erstmals ein schwefelhaltiges Phytoalexin aus einer mit *Alternaria brassicae* infizierten *Brassicaceae*-Art (*Camelina sativa*). Es handelte sich um 3-thiazol-2'-yl-Indol und wurde später als Camalexin bezeichnet. Gleichzeitig identifizierten Tsuji *et al.* (1992) Camalexin als typisches Phytoalexin in *A. thaliana* nach *Pseudomonas syringae* *pv syringae* Infektion. Wie in Abschnitt 1.2 bereits erwähnt, sind einzelne Phytoalexine oft nur in wenigen, nah verwandten Arten zu finden. Dies trifft auch auf Camalexin zu. Außer in *Arabidopsis*- und *Camelina*-Gattungen konnte der Metabolit nur noch in *Capsella spec.* identifiziert werden (siehe Abbildung 1.6) (Jimenez *et al.*, 1997, Zook *et al.*, 1998, Bednarek *et al.*, 2011).



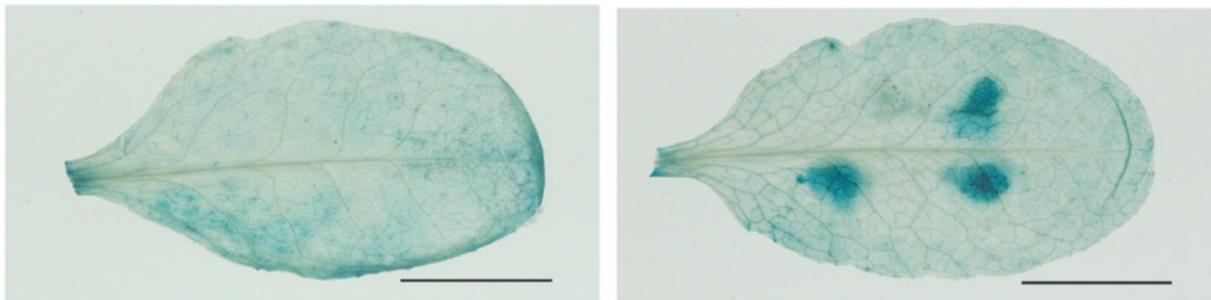
**Abbildung 1.6 Phylogenie der verschiedenen *Brassicaceae*-Spezies.**

Dargestellt ist die Klassifizierung von *Brassicaceae*-Spezies entsprechend ihrer genetischen Distanz (ermittelt anhand von Aminosäure-Substitutionen). Dabei ist die Produktion eines Phytoalexins meist auf Mitglieder eines Stammes beschränkt. So konnte Camalexin bisher nur in *Camelineae*-Arten (rot hinterlegte Box) nachgewiesen werden. (Abbildung aus Kagale *et al.* (2014); farbig markierte Boxen markieren verschiedene Klassen)

Camalexin ist in gesunden Pflanzen nicht nachweisbar. Erst durch Stress wird die Synthese induziert. Wie für alle Phytoalexine sind die auslösenden Faktoren divers. Als Elicitoren fungieren Bakterien (z.B. *P. syringae* (Tsuji *et al.*, 1992, Glazebrook und Ausubel, 1994)), Pilze

(z.B. *Peronospora parasitica* (Glazebrook *et al.*, 1997), *Alternaria brassicicola* (Thomma *et al.*, 1999)), Oomyceten (z.B. *Phytophthora brassicae* (Schlaepfi *et al.*, 2010)) und Viren (Callaway *et al.*, 1996). Aber auch abiotische Faktoren wie Schwermetalle (Tsuji *et al.*, 1993, Mert-Türk *et al.*, 2003) und UV-Strahlung (Mert-Türk *et al.*, 2003) können die Camalexinbildung auslösen. Weiterhin wurden Aciflourfen (Zhao *et al.*, 1998), Fusarinsäure (Bouizgarne *et al.*, 2006) und ein Mangel an aromatischen Aminosäuren (Zhao *et al.*, 1998) als Induktoren der Camalexinbiosynthese beschrieben.

Auffällig ist, dass Camalexin nur lokal begrenzt gebildet wird (siehe Abbildung 1.7). Biosynthetische Gene zeigen lediglich am Ort der Infektion eine verstärkte Expression. Ein Langstrecken-Transport findet offenbar nicht statt (Schuhegger *et al.*, 2007).

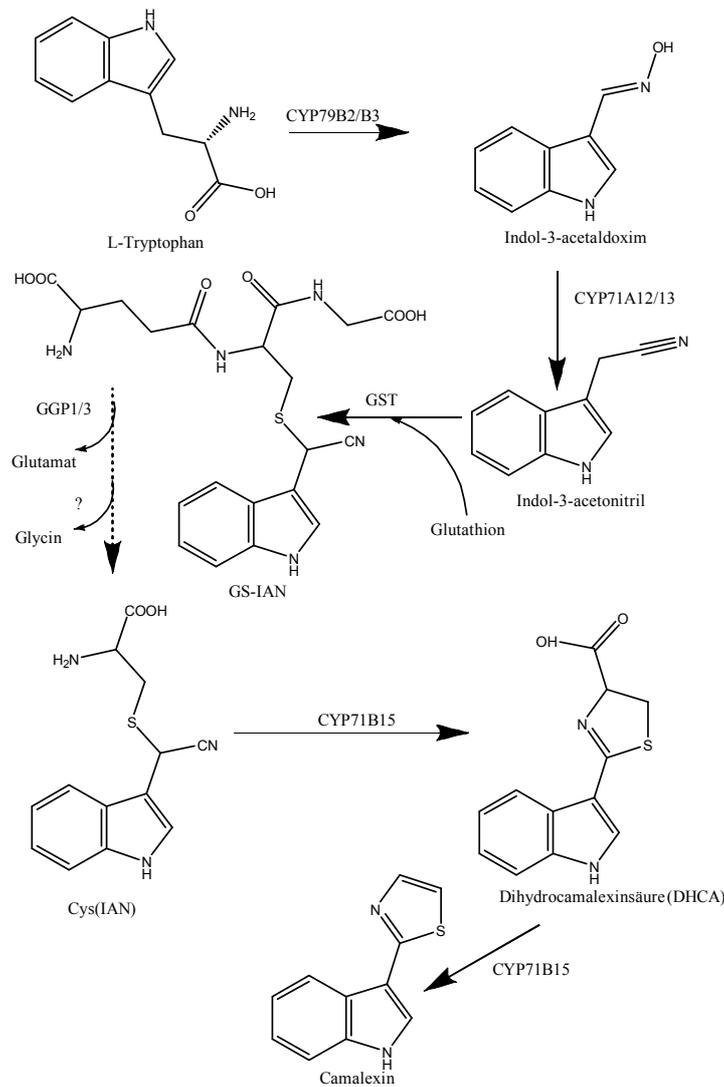


**Abbildung 1.7 Expression von CYP79B2::GUS nach *Alternaria alternata* Infektion.**

24 Stunden nach Infektion mit *A. alternata* (rechts) bzw. nach *mock*-Behandlung (links) wurde die Expression von CYP79B2 analysiert. Am Ort des Pathogenbefalls konnte eine verstärkte Camalexinsynthese gezeigt werden. (Skala: 1 cm; Abbildung aus Schuhegger *et al.* (2007))

Erste Schritte zur Aufklärung der Camalexinbiosynthese wurden mit Hilfe von Fütterungsversuchen mit radioaktiv markierten Verbindungen durchgeführt. Es wurde deutlich, dass der Thiazolring des Camalexins von Cystein abgeleitet ist (Zook und Hammerschmidt, 1997) und das Indolgrundgerüst ausgehend von Tryptophan über Indol-3-acetaldoxim (IAOx) gebildet wird (Glawischnig *et al.*, 2004). Diese erste Reaktion, die Umwandlung von Tryptophan zu IAOx, wird von zwei Enzymen der CYP79-Familie katalysiert – CYP79B2 und CYP79B3 (Hull *et al.*, 2000b, Mikkelsen *et al.*, 2000a). Es folgt die Dehydrierung des IAOx durch CYP71A13, wodurch Indol-3-acetonitril (IAN) entsteht (Nafisi *et al.*, 2007). Das zu CYP71A13 stark homologe Enzym CYP71A12 (89% Identität) kann diese Reaktion teilweise übernehmen (Moldrup *et al.*, 2013, Müller *et al.*, 2015), scheint allerdings eine größere Rolle bei der Synthese von Camalexin in Wurzeln zu spielen (Millet *et al.*, 2010). Auch konnte eine Aktivität von CYP71A12 beim Umsatz von IAN zu Indol-3-Carbaldehyd gezeigt werden (Klein *et al.*, 2013, Müller *et al.*, 2015). Im nächsten Schritt wird Glutathion an IAN addiert (Böttcher *et al.*, 2009, Klein *et al.*, 2013) und sukzessive das Konjugat (GS-IAN) zu Cys(IAN) reduziert. Dabei entfernen GGP1 und GGP3 als  $\gamma$ -Glutamylpeptidasen den Glutamylrest und ein bisher

nicht identifiziertes Enzym spaltet anschließend Glycin ab (Geu-Flores *et al.*, 2011). Möglicherweise spielt hier Phytochelatinsynthase 1 (PCS1) eine Rolle (Su *et al.*, 2011). Weiterhin sind wahrscheinlich sowohl ein CYP für die Aktivierung des IAN als auch eine Glutathiontransferase (GST) für die Glutathionylierung nötig (Dixon *et al.*, 2010, Dixon *et al.*, 2011, Su *et al.*, 2011, Klein *et al.*, 2013) (Siehe unten). Für den Aktivierungsschritt kommen vier CYPs in Betracht: CYP71A13, CYP71B15, CYP71B20 und CYP71B23. Interessanterweise reicht die transiente Expression von CYP79B2, CYP71A13 und CYP71B15 aus, um in *S. cerevisiae* Camalexin zu synthetisieren (Klein *et al.*, 2013). Für CYP71A13 konnte bereits *in vitro* ein Umsatz von IAN zu Cys(IAN) gezeigt werden (Müller *et al.*, 2015). Auch CYP71B15 akzeptiert IAN als Substrat und bildet in Anwesenheit von Glutathion *in vitro* das GS-IAN Konjugat (persönliche Kommunikation E. Glawischnig). CYP71B23 ist mit anderen Camalexin-spezifischen Genen koexprimiert und sowohl CYP71B20 als auch CYP71B23 konnten in *S. cerevisiae*-Mikrosomen IAN zu GS-IAN umsetzen (Fellermeier, 2011). Eine Funktion von CYP71B20 und CYP71B23 *in planta* konnte allerdings bisher noch nicht gezeigt werden. Die finale Umwandlung von Cys(IAN) zu Camalexin erfolgt über Dihydrocamalexinsäure (DHCA) und wird von dem bifunktionellem Enzym CYP71B15 (PAD3) katalysiert (Schuhegger *et al.*, 2006) (siehe Abbildung 1.8).



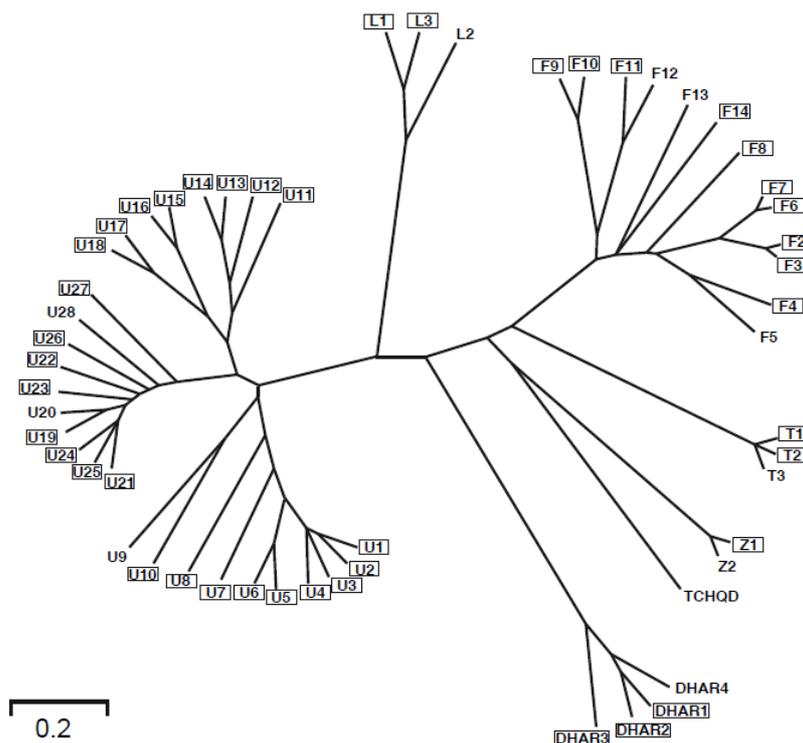
**Abbildung 1.8 Schematische Darstellung des Camalexinbiosyntheseweges.**

Tryptophan als Ausgangsstoff der Camalexinbiosynthese wird von CYP79B2/CYP79B3 zu IAOx (Indol-3-acetaldoxim) umgewandelt. Das Intermediat wird durch CYP71A13 (teilw. auch durch CYP71A12 (Moldrup *et al.*, 2013)) zu IAN (Indol-3-acetonitril) dehydriert. Im nächsten Schritt wird Glutathion an IAN addiert (Böttcher *et al.*, 2009, Klein *et al.*, 2013) und das Konjugat sukzessive zu Cys(IAN) reduziert. Das bifunktionelle Enzym CYP71B15 vermittelt die finale Umwandlung von Cys(IAN) zu Camalexin über DHCA (Dihydrocamalexinsäure). (aus Strickland (2017))

Wie bereits beschrieben ist für die Konjugation von Glutathion an IAN eine GST nötig. In *A. thaliana* wurden bisher 54 GSTs identifiziert und in sieben Klassen eingeteilt – die Tau-Klasse (U), die Phi-Klasse (F), die Lambda-Klasse (L), die Zeta-Klasse (Z), die Theta-Klasse (T), die Dehydroascorbatreduktasen (DHAR) und die Tetrachlorhydroquinondehalogenasen (TCHQD) (siehe Abbildung 1.9) (Krajewski *et al.*, 2013). Die Klassen Tau, Phi, Lambda und DHAR sind pflanzenspezifisch, wohingegen Vertreter der Zeta- und Theta-Klasse auch in tierischen Organismen vorkommen (Dixon *et al.*, 2002b).

Pflanzliche GSTs katalysieren eine Vielzahl von Reaktionen und oftmals kann eine GST verschiedene Funktionen übernehmen. So sind Mitglieder der zwei großen Klassen (Phi und Tau) hauptsächlich für die Konjugation von Glutathion an ein elektrophiles Substrat verantwortlich und auf Grund dessen maßgeblich an Entgiftungsreaktionen von Xenobiotika beteiligt. Allerdings können sie auch zu einem gewissen Maß als Peroxidase fungieren (Edwards und Dixon, 2000, Dixon *et al.*, 2002b). Enzyme der Theta-Klasse weisen dahingegen vorwiegend eine Glutathion-abhängige Peroxidase-Aktivität auf, können aber zum Teil auch entgiftend wirken (Dixon *et al.*, 2009). GSTs der Zeta-Klasse scheinen als Isomerase am Tyrosinkatabolismus beteiligt zu sein. Aber auch eine geringe Transferase- und Peroxidase-Aktivität wurde bereits nachgewiesen (Dixon *et al.*, 2000).

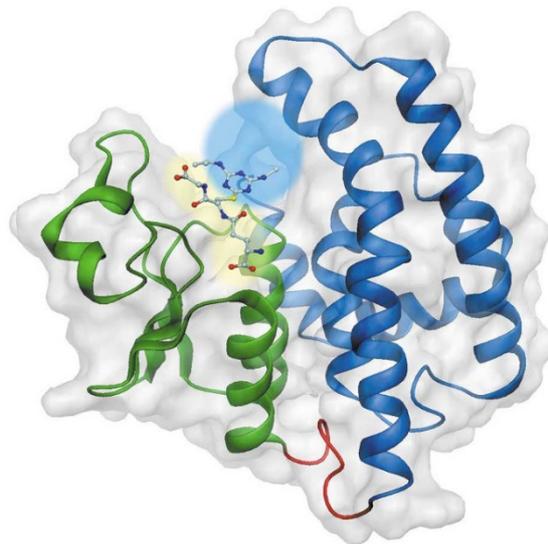
Mitglieder der Lambda- und DHAR-Klasse nehmen eine Sonderstellung ein. Sie weisen keine Glutathion-Transferase-Aktivität auf, sondern sie katalysieren die Deglutathionylierung von Substraten (Dixon *et al.*, 2002a). Im Unterschied zu den anderen fünf Klassen besitzen Lambda- und DHAR-GSTs statt einem Serin ein Cystein im aktiven Zentrum.



**Abbildung 1.9 Phylogenetischer Baum der Arabidopsis-GSTs.**

Dargestellt sind die 54 AtGSTs aus *A. thaliana*. Sie lassen sie in sieben Klassen einteilen: Tau (U), Phi (F), Lambda (L), Zeta (Z), Theta (T), Dehydroascorbatreduktasen (DHAR) und Tetrachlorohydroquinondehalogenasen (TCHQD). Die phylogentische Distanz wurde anhand der Aminosäure-Substitutionen ermittelt. (Abbildung entnommen aus Krajewski *et al.* (2013)).

Weiterhin agieren die meisten GSTs als Hetero- oder Homodimere (Ausnahmen stellen Enzyme der DHAR-Klasse dar) (Dixon *et al.*, 1999). Dabei besitzt jedes Monomer ein katalytisches Zentrum, welches aus zwei Domänen besteht: der *G-site* und der *H-site*. Die N-terminale *G-site* dient der Bindung von Glutathion und die C-terminale *H-site* der Fixierung des zweiten Substrates (Axarli *et al.*, 2009). Die *G-site* ist innerhalb der GST-Familien stark konserviert, wohingegen die Sequenz der *H-site* stark variiert, was die Vielfalt der akzeptierten Substrate widerspiegelt (Dixon *et al.*, 2002b). N- und C-Terminus des Proteins sind über einen kurzen Linker (ca. 10 AS) miteinander verbunden, was zu einer hohen Flexibilität des Proteins führt (Neuefeind *et al.*, 1997, Thom *et al.*, 2002). Dies wiederum deutet auf ein *induced-fit* Modell hin: durch Bindung eines Substrates erfolgt eine Konformationsänderung, welche nachgewiesenermaßen bei GSTs der Tau-Klasse zu einer Umfaltung der letzten Helix des C-Terminus führt. Daraus resultiert eine teilweise Blockade des aktiven Zentrums (Thom *et al.*, 2002, Axarli *et al.*, 2009). Die Bindung des Glutathions erfolgt über eine Interaktion zwischen dem hoch konservierten Serin bzw. Cystein des aktiven Zentrums und dem Schwefelatom des Glutathions. Mit Ausnahme einzelner Proteine (GSTF11, GSTF12, GSTF14 und GSTU14) tragen alle GSTs der Klassen Phi, Tau, Theta, Zeta und TCHQD Serin (Dixon *et al.*, 2002b) und Proteine der Klassen Lambda und DHAR Cystein als Glutathion-bindende Aminosäure (Lallement *et al.*, 2014) (siehe Abbildung 1.10).



**Abbildung 1.10 Schematische Darstellung einer GST-Untereinheit (GSTF1 von *Zea mays*).**

Farblich hervorgehoben sind die N-terminale Region (grün), die C-terminale Region (blau) und der Linker (rot). Weiterhin ist die *G-site* in Gelb und die *H-site* in Blau markiert. Im Stäbchenmodell ist das Atrazin-Glutathion-Konjugat dargestellt. (entnommen aus Dixon *et al.* (2002b)).

Die Wirkungsweise von GSTs bei der Metabolisierung von Xenobiotika ist gut untersucht und verstanden. Bei der Aufklärung der Katalyse von endogenen Reaktionen existieren allerdings noch viele Unklarheiten. Auf Grund starker Redundanz der Enzyme, ist es schwierig eindeutige Aussagen über Funktionen einzelner Enzyme zu treffen. Selbst bei multiplen *knock-outs* lassen sich oftmals keine veränderten Phänotypen erkennen (Sappl *et al.*, 2009). Bekannt ist, dass GSTs als Glutathion-Transferasen, Glutathion-abhängige Peroxidasen, Glutathion-abhängige Isomerasen und Glutathion-abhängige Reduktasen fungieren können (Edwards und Dixon, 2005). Weiterhin scheinen einige GSTs als Bindeprotein agieren zu können. So interagiert GSTF2 direkt mit Auxin (IAA), dem synthetischen Phytohormon 1-Naphthyllessigsäure (NAA) und dem Auxin-Transportinhibitor 1-N-Naphthylphtalaminsäure (NPA) (Smith *et al.*, 2003). Gleichzeitig bindet das Enzym auch Flavonoide, welche als negative Regulatoren für den Auxintransport gelten (Brown *et al.*, 2001) Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass diese GST folglich der Modulierung der Hormonantwort dient (Smith *et al.*, 2003). Ein eindeutiger Nachweis dieser Funktion *in vivo* konnte allerdings bisher noch nicht erbracht werden. Eine physiologische Funktion konnte für GSTF12 (Synonym *TRANSPARENT TESTA 19, TT19*) gezeigt werden. Durch *knock-out*-Analysen und *Labelling*-Experimente in *A. thaliana* wurde deutlich, dass das Protein Flavonoide im Cytosol bindet und sie zur Vakuole transportiert (Kitamura *et al.*, 2004, Sun *et al.*, 2012b).

Weiterhin wird die Expression von GSTs durch abiotischen und biotischen Stress induziert. Als „natürliche“ Induktoren (keine Xenobiotika) gelten: Kälte, Trockenheit, Verwundung, Ozon, Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), Phytohormone, Schwermetalle, hohe Salzkonzentrationen und Pathogenbefall (zusammengefasst in Sappl *et al.* (2009).

Auch sind GSTs mit Genen des Sekundärmetabolismus koexprimiert. Zum Beispiel sind GSTF9, GSTF10, GSTF11 und GSTU20 mit der Glucosinolatbiosynthese assoziiert (Sonderby *et al.*, 2010) und auch für die Camalexinbiosynthese wurde die Beteiligung einer GST postuliert. *In silico* Analysen zeigten, dass GSTU3, GSTU4, GSTU11 und GSTU12 mit Genen der Camalexinbiosynthese koreguliert sind (Dixon *et al.*, 2010, Dixon *et al.*, 2011). Su *et al.* (2011) zeigten durch Analysen von *knock-out*- und Überexpressionspflanzen der GSTF6 ein veränderten Camalexinphänotyp. Diese Effekte konnten in Silbernitrat-behandelten Pflanzen nicht bestätigt werden (Rauhut, 2009). Auch Mehrfachmutanten (*knock-down* für GSTF2, GSTF3, GSTF6 und GSTF7 bzw. *knock-out* von GSTU3 und GSTU4) ließen keinen Einfluss dieser GSTs auf die Camalexinbiosynthese nach Silbernitratinduktion erkennen (Rauhut, 2009).

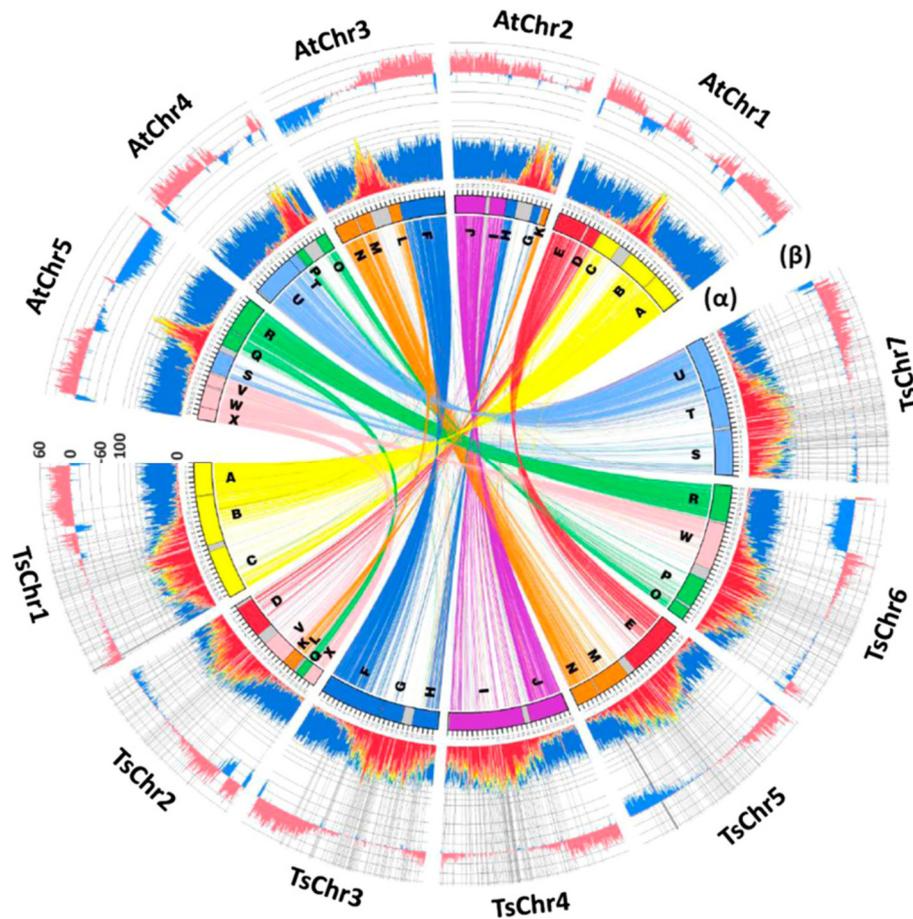
#### 1.4.2. *Eutrema salsugineum* und Wasalexin als deren typisches Phytoalexin

Obwohl *A. thaliana* auf Grund diverser Eigenschaften, wie zum Beispiel eine kurze Generationszeit, ein kleines, sequenziertes Genom und gut etablierte, standardisierte molekularbiologische Methoden, hervorragend als Modellsystem geeignet ist und aus den gewonnen Erkenntnissen durchaus Parallelen zu zahlreichen Nutzpflanzen gezogen werden können, ist die Studie dieser einen Modellpflanze nicht ausreichend, um zum Beispiel Aussagen über evolutionäre Entwicklungen oder Spezialisierungen treffen zu können. *Eutrema salsugineum* (früher *Thellungiella salsuginea*) gehört ebenfalls zur Familie der *Brassicaceae*. Die Entwicklung von *A. thaliana* und *E. salsugineum* trennte sich vor ca. 43 Mio. Jahren (Yang *et al.*, 2013). *E. salsugineum* gilt als typischer Halophyt und ist im Gegensatz zu *A. thaliana* unempfindlich gegenüber hohen Salzkonzentrationen (bis zu 500 mM NaCl), Trockenheit und Kälte (bis -15°C) (Inan *et al.*, 2004, Gong *et al.*, 2005, Amtmann, 2009). Auf Grund der unterschiedlichen Lebensweise und der Vergleichbarkeit zu *A. thaliana* eignet sich *E. salsugineum* gut, um u.a. die Entwicklung von Stoffwechselprozessen und Immunantworten im Laufe der Evolution zu untersuchen. Weiterhin stellen Kälte, Trockenheit und Salzstress zunehmende Bedrohungen für die moderne Landwirtschaft dar, weshalb es von großer Bedeutung wäre die Mechanismen, denen die Toleranz von *E. salsugineum* gegenüber diesen Stressoren zugrunde liegt, zu verstehen.

Als Modellpflanze eignet sich *E. salsugineum* auf Grund der geringen Wuchshöhe, der Fähigkeit zur Selbstbestäubung, einer hohen Samenausbeute und einer vergleichbar kurzen Generationszeit (Amtmann *et al.*, 2005, Amtmann, 2009). Im Unterschied zu *A. thaliana* benötigt *E. salsugineum* allerdings eine deutlich längere Stratifikation (ca. 10 Tage) und eine mind. dreiwöchige Vernalisation (<http://thellungiella.org/protocols.htm>, Stand 13.07.2017).

Ein weiterer Vorteil ist, dass bereits etablierte molekularbiologische Methoden von *A. thaliana* auf die Arbeit mit *E. salsugineum* übertragbar sind (Bressan *et al.*, 2001, Taji *et al.*, 2004) und das Genom 2012/2013 vollständig sequenziert wurde (Wu *et al.*, 2012, Yang *et al.*, 2013). Im gleichen Jahr wurde auch ein erstes Transkriptom veröffentlicht (Lee *et al.*, 2013).

Das Genom von *E. salsugineum* ist 260 Mb groß und somit etwa doppelt so groß wie das Arabidopsisgenom (125 Mb) (Wu *et al.*, 2012). Mit Hilfe von *Next Generation Sequencing* wurden ca. 28'500 Gene auf 7 Chromosomen identifiziert (Vergleich zu *A. thaliana*: ca. 27'000 Gene, 5 Chromosomen (Wortman *et al.*, 2003)). Transkriptomanalysen zeigten, dass ca. 90% der codierenden Sequenzen aus *E. salsugineum* ortholog zu Sequenzen aus *A. thaliana* sind (siehe Abbildung 1.11). Diese Vergleichbarkeit zu *A. thaliana*, die einfachen Kultivierungsbedingungen und die Vielfalt übertragbarer Methoden machen *E. salsugineum* zu einem wissenschaftlich wertvollen Modellorganismus und Gegenstand zahlreicher Forschungsarbeiten.



**Abbildung 1.11** Das Genom von *E. salsugineum* im Vergleich zu *A. thaliana*.

Vererbte Karyotypen sind in farbigen Blöcken dargestellt (A bis X). Sequenzen mit mehr als 70% Ähnlichkeit zwischen *E. salsugineum* und *A. thaliana* sind durch ein farbiges Band verbunden. (α) stellt die Verteilung von repetitiven (rot, orange, gelb) und codierenden Sequenzen (blau) in beiden Spezies dar. (β) gibt den Prozentsatz ähnlicher Sequenzen (>70%) in dieser Region (100 kb Abschnitte) an. Dabei sind *Alignments* in dieselbe Richtung in Pink dargestellt und *Alignments* in entgegengesetzter Richtung in Blau. Für mehr als 90% der Genfamilien in *E. salsugineum* konnte ein Ortholog in *A. thaliana* identifiziert werden. (entnommen aus Wu *et al.* (2012); *Thellungiella salsugineum*= *E. salsugineum*)

Wie zahlreiche andere Pflanzenspezies reagiert auch *E. salsugineum* auf Stress mit der Synthese von Phytoalexinen. Im Gegensatz zu *A. thaliana* produziert *E. salsugineum* allerdings kein Camalexin, sondern Wasalexin A, Wasalexin B und Biswasalexin (Pedras und Adio, 2008, Pedras *et al.*, 2009a). Wasalexin wird ebenfalls von *Eutrema japonicum* (Wasabi, früher *Wasabia japonica*) und *Thlaspi arvense* (Acker-Hellerkraut) nach Pathogenbefall gebildet (Pedras *et al.*, 1999, Pedras *et al.*, 2003). Die Feststellung, dass *E. salsugineum* das gleiche Phytoalexin wie *T. arvense* aufweist war überraschend, da das Phytoalexinspektrum meist charakteristisch für eine Art ist. Wann sich die Entwicklung der Spezies getrennt hat, ist allerdings noch nicht genau bestimmt. Auf Basis von phylogenetischen Vergleichen

zahlreicher Brassicaceae-Gattungen wurde eine evolutive Trennung von *Eutrema* und *Thlaspi* vor ungefähr 22 Mio. Jahren postuliert (Huang *et al.*, 2015).

Die Biosynthese von Wasalexin A, Wasalexin B und Biswasalexin ist bisher kaum verstanden. Besonders die Arbeitsgruppe von M. Soledade C. Pedras setzt allerdings große Bemühungen in die Aufklärung der Biosynthesen verschiedener Phytoalexine. Bekannt ist bisher, dass Wasalexin A und B wie die meisten Phytoalexine der *Brassicaceae* aus Tryptophan synthetisiert werden (Pedras und Adio, 2008). Mit Hilfe von Fütterungsexperimenten mit deuterierten Verbindungen wurden anschließend erste Versuche unternommen, Intermediate der Wasalexinbiosynthese zu identifizieren. Dabei wurde deutlich, dass das IAOx eine Vorläuferverbindung von Wasalexin darstellt. Im Unterschied zur Camalexinbiosynthese (siehe Abschnitt 1.4.1) scheint Wasalexin anschließend allerdings über Indolglucosinolate gebildet zu werden. Hier stellen vermutlich Glucobrassicin und 1-Methoxyglucobrassicin Vorläuferstufen von 1-Methoxybrassinin dar. Wie die Umwandlung von Glucobrassicin zu 1-Methoxybrassinin abläuft, ist noch nicht näher untersucht. Es wird vermutet, dass durch Deglykosylierung ein reaktives Aglycon entsteht, welches spontan zu 1-Methoxyindolyl-3-Methylisothiocyanat umgewandelt wird. In Anwesenheit von S-Adenosylmethionin als Methyl donor könnte anschließend 1-Methoxybrassinin gebildet werden (Pedras *et al.*, 2010, Yaya, 2014). Wurden UV-induzierten Blätter von *E-salsugineum* in einer Lösung mit deuteriertem 1-Methoxybrassinin inkubiert, konnte anschließend in HPLC-MS Messungen markiertes Wasalexin A und B, Biswasalexin sowie die Glucosinolate Glucobrassicin, 1-Methoxyglucobrassicin und 4-Methoxyglucobrassicin nachgewiesen werden (Pedras *et al.*, 2010). Der Einbau von deuteriertem 1-Methoxybrassinin in Wasalexin A und B erfolgte dabei zu einem hohen Prozentsatz (19,2% bzw. 16,7%), was die Vermutung nahelegt, dass zwischen 1-Methoxybrassinin und Wasalexin nur wenige enzymatische Schritte liegen. Auch Biswasalexin A1 und A2 konnten in hohen Anteilen detektiert werden (Pedras *et al.*, 2010). Diese Metabolite entstehen durch *head-to-tail*-Dimerisierung von Wasalexin. Experimentell konnte dies durch Applikation von UV-Licht nachgewiesen werden (Pedras *et al.*, 2009a). Biswasalexin A1 und A2 gelten ebenfalls als Phytoalexine und weisen eine fungizide Wirkung gegen diverse Pathogene auf (z.B. *Sclerotinia sclerotiorum*, *Alternaria brassicicola*) (Pedras *et al.*, 2009a).

Details zur Biosynthese von Wasalexin oder spezifische Synthesegene sind allerdings noch nicht bekannt.

## 2. Zielsetzung der Arbeit

Phytoalexine sind Teil der generellen Abwehrantwort in Pflanzen. Die Biosynthese dieser Sekundärmetabolite aufzuklären, würde die molekulare Grundlage für *metabolic engineering* von Phytoalexinen schaffen und einen Einblick in die Evolution der Phytoalexinsynthese geben. Die Synthese von Camalexin, dem typischen Phytoalexin von *A. thaliana*, wurde in der Vergangenheit bereits intensiv erforscht und ist nahezu vollständig aufgeklärt (Hull et al., 2000b, Schuegger et al., 2006, Glawischnig, 2007, Nafisi et al., 2007, Böttcher et al., 2009, Klein et al., 2013, Müller et al., 2015). Noch nicht endgültig verstanden ist die Umwandlung von IAN zu Cys(IAN) über das entsprechende Glutathionkonjugat. Dieser Syntheseschritt wird vermutlich durch ein CYP und eine GST vermittelt. Ein entsprechender Nachweis konnte bisher allerdings nicht erbracht werden. Ziel dieser Arbeit ist es in Anwesenheit verschiedener CYPs 54 AtGSTs bezüglich ihres Einflusses auf die Camalexinbiosynthese näher zu charakterisieren. Dafür soll *S. cerevisiae* als heterologes Expressionssystem genutzt werden und ein *in vitro* Assay entwickelt und etabliert werden. Weiterhin wird die Hypothese eines Camalexin-Komplexes überprüft. Dafür werden sowohl Methoden wie *Yeast-two-Hybrid* und Co-IP für die Anwendung eingesetzt und optimiert als auch FRET und FRET-FLIM-Analysen für diese Fragestellung etabliert. Eine Protein-Protein-Interaktion der biosynthetischen Enzyme würde einen effektiven Substratfluss ermöglichen, die Bildung toxischer Intermediate minimieren und *cross-talk* zwischen verschiedenen, teilweise konkurrierenden Biosynthesen verhindern. Solch eine Komplexbildung biosynthetischer Enzyme wurde in den letzten Jahren bereits für Dhurrin (Laursen et al., 2016), Lignin (Bassard et al., 2012) und Flavonoide (Dastmalchi et al., 2016) nachgewiesen.

Die Biosynthese von Wasalexin als typisches Phytoalexin von *E. salsugineum* ist im Gegensatz zu Camalexin kaum untersucht. Mit Hilfe von RNAseq- und Microarray-Analysen von UV-C-, Silbernitrat- und *B. cinerea*-gestressten Pflanzen werden in der vorliegenden Arbeit Kandidatengene der Wasalexinbiosynthese identifiziert, mittels des CRISPR/Cas9-Systems *knock-out*-Mutanten erzeugt und anschließend auf einen veränderten Wasalexingehalt überprüft. Die erfolgreiche Generierung von stabilen *knock-out*-Mutanten mittels CRISPR/Cas9 ist, mit Ausnahme von *A. thaliana*, bisher nur für wenige Spezies beschrieben.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Chemikalien und Lösungsmittel

Alle verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von Merck KGaA (Darmstadt), Sigma-Aldrich GmbH (München), Serva (Heidelberg), Bio-Rad Laboratories GmbH (München) oder Carl Roth GmbH & Co KG (Karlsruhe) erworben. Lösungsmittel in HPLC-Qualität stammen von T. Baker (Avantor Performance Materials, Center Valley, USA).

#### 3.2. Medien

Alle verwendeten Medien sind in Tabelle 3.1 aufgeführt. Die Zusammensetzung einzelner Komponenten kann der Tabelle 3.2 entnommen werden.

**Tabelle 3.1 Zusammensetzung der verwendeten Medien.**

| Medium        | Inhalt  | Menge [g/L]       |            |
|---------------|---|-------------------|------------|
| dYT           | Pepton  | 16                |            |
|               | NaCl  | 5                 |            |
|               | Hefeextrakt   | 10                |            |
| YPGE          | Pepton  | 10                |            |
|               | Glucose   | 20                |            |
|               | Hefeextrakt   | 10                |            |
|               | Ethanol (nach dem Autoklavieren zugeben)                  | 30 [ml/L]         |            |
| SC, pH= 5,9   | Aminosäuremischung  | 5,2               |            |
|               | Yeast Nitrogen Base (ohne Ammoniumsulfat und Aminosäuren) | 6,8               |            |
|               | Ammoniumsulfat  | 20                |            |
| SD, pH= 5,8   | Vor dem Autoklavieren                                     |                   |            |
|               |   | 10x Makrosalze    | 100 [ml/L] |
|               |   | 1000x Mikrosalze  | 1 [ml/L]   |
|               | Nach dem Autoklavieren                                    | 10x Dropoutlösung | 100 [ml/L] |
|               |   | 100x Supplement   | 10 [ml/L]  |
|               | 40% Saccharoselösung                                      | 50 [ml/L]         |            |
| SOB           | Trypton   | 20                |            |
|               | Hefeextrakt   | 5                 |            |
|               | NaCl  | 10 [mM]           |            |
|               | KCL   | 2,5 [mM]          |            |
| SOC           | SOB + Glucose   | 20 [mM]           |            |
|               | + MgCl <sub>2</sub>                                       | 10 [mM]           |            |
|               | +MgSO <sub>4</sub>  | 10 [mM]           |            |
| ½ MS, pH= 5,8 | Saccharose  | 20                |            |
|               | Murashige-Skoog-Medium (Duchefa Biochemie)                | 2,2               |            |
|               | Agar-Agar   | 9                 |            |

## Material und Methoden

|                         |                                       |             |
|-------------------------|---------------------------------------|-------------|
| <b>Gamborg, pH= 5,5</b> | <b>Gamborg B5 (Duchefa Biochemie)</b> | <b>1,58</b> |
|                         | Glucose                               | 10          |
|                         | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>       | 650 [mg]    |

**Tabelle 3.2 Zusammensetzung der für SC- und SD-Medien notwendigen Komponenten.**

| <b>1000x Mikrosalze (SD)</b> | <b>Menge [mg/L]</b> | <b>10x Makrosalze (SD)</b>    | <b>Meng [g/L]</b>   |
|------------------------------|---------------------|-------------------------------|---------------------|
| Biotin                       | 2                   | Kaliumdihydrogenphosphat      | 10                  |
| Calciumpantothenat           | 400                 | Ammoniumsulfat                | 50                  |
| Folsäure                     | 20                  | Magnesiumsulfat-Heptahydrat   | 10,24               |
| Myo-Inositol                 | 2000                | Calciumchlorid-Anhydrid       | 1                   |
| Nicotinsäure                 | 400                 | Natriumchlorid                | 1                   |
| p-Aminobenzolsäure           | 200                 |                               |                     |
| Pyridoxinhydrochlorid        | 400                 | 100x Ade-Supplement           | 2                   |
| Riboflavin                   | 200                 | 100x His-Supplement           | 2                   |
| Thiamin HCL                  | 400                 | 100x Trp-Supplement           | 2                   |
| Borsäure                     | 500                 |                               |                     |
| Kupfersulfat                 | 40                  | <b>10x Dropoutlösung (SD)</b> | <b>Menge [mg/L]</b> |
| Eisen-(II)-chlorid           | 200                 | L-Arginin HCl                 | 200                 |
| Kaliumiodid                  | 100                 | L-Threonin                    | 2000                |
| Mangansulfat                 | 400                 | L-Isoleucin                   | 300                 |
| Natriummolybdän              | 200                 | L-Lysin HCl                   | 300                 |
| Zinksulfat                   | 400                 | L-Methionin                   | 200                 |
|                              |                     | L-Phenylalanin                | 500                 |
|                              |                     | L-Tyrosin                     | 200                 |
|                              |                     | L-Valin                       | 1500                |

### **Aminosäuremischung für SC-Medium**

|                |   |                       |              |
|----------------|---|-----------------------|--------------|
| Alanin         | 6 |                       |              |
| Arginin        | 6 | Supplemente (SC)      | Menge [ml/L] |
| Asparaginsäure | 6 | Leucin (100 mM)       | 8            |
| Asparagin      | 6 | Histidin-HCl (100 mM) | 8            |
| Cystein        | 6 | Adeninsulfat (65 mM)  | 15           |
| Glutaminsäure  | 6 | Tryptophan (40 mM)    | 8            |
| Glycin         | 6 |                       |              |
| Isoleucin      | 6 |                       |              |
| Lysin          | 6 |                       |              |
| Methionin      | 6 |                       |              |
| Phenylalanin   | 6 |                       |              |
| Prolin         | 6 |                       |              |
| Serin          | 6 |                       |              |
| Threonin       | 6 |                       |              |
| Valin          | 6 |                       |              |

### **3.3. Antikörper**

#### Primäre Antikörper:

- monoclonaler Anti-FLAG-Antikörper aus Maus von Sigma (F1804)
- monoclonaler Anti-GFP-Antikörper aus Hase von Invitrogen (A-11122)

Sekundäre Antikörper:

- Anti-Maus-Antikörper aus Ziege von Bio-Rad (172-1011)
- Anti-Hase-Antikörper aus Ziege von Life Technologies (65-6120)

Alle Antikörper wurden in einer 1:3000 Verdünnung eingesetzt.

**3.4. Organismen und Anzuchtbedingungen**

3.4.1. *Arabidopsis thaliana*

Alle verwendeten Stämme basieren auf Ökotyp Columbia-0 und sind in Tabelle 3.3 aufgelistet. Die Anzucht erfolgte auf Typ T-Erde mit einer unteren Vermiculit-Schicht bei 22 °C und 50% Luftfeuchtigkeit unter Langtag-Bedingungen (160  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Saatgut wurde auf feuchter Erde ausgestreut, über Nacht bei 4°C stratifiziert und nach Keimung die Pflänzchen in Töpfe vereinzelt. Für die Phytoalexininduktion wurden Blätter ca. 4 Wochen-alter Pflanzen abgeschnitten und behandelt (siehe Abschnitt 3.5.14).

Für die Analyse von GST-*Knock-out*-Pflanzen wurde das Saatgut von Natalie Kowalski und Aaron Klepper (Lehrstuhl für Botanik, Kowalski (2016)) bereitgestellt.

**Tabelle 3.3 verwendete Kreuzungen, Deletions- und Überexpressionslinien von *A. thaliana*.**

Aufgelistet sind alle *A. thaliana*-Linien, die in dieser Arbeit genutzt wurden. Saatgut von allen Linien wurden von Natalie Kowalski und Aaron Klepper bereitgestellt und zuvor auf Homozygotie getestet.

| GST     | SALK-Linie   | Linie  |
|---------|--------------|--------|
| AtGSTU2 | SALK_062920  | #1, #8 |
| AtGSTU4 | SALK_143928C | #2, #8 |
| AtGSTU5 | SALK_107148C | #5     |
| AtGSTU8 | SALK_150234C | #1, #3 |

| GST              | Kreuzung SALK-Linie      | Linie       |
|------------------|--------------------------|-------------|
| AtGSTU5/AtGSTU18 | SALK_049091/SALK_096297C | #10.7/# 5.6 |

| GST     | Überexpressionslinien    | Linie       |
|---------|--------------------------|-------------|
| AtGSTU4 | pCambia3300:35S-GST-Nost | #12, #24    |
| AtGSTU5 | pGreen:35S-GST-Nost      | #3, # 4.7   |
| AtGSTU8 | pGreen:35S-GST-Nost      | #2.9, #1.10 |

### 3.4.2. *Eutrema salsugineum*

Soweit nicht anders angegeben wurde mit *E. salsugineum* Ökotyp Shandong gearbeitet. Einzelne Experimente wurden mit *E. salsugineum* Ökotyp Yukon durchgeführt. Für die Anzucht von Pflanzen wurde das Saatgut auf feuchte Erde ausgebracht und für 10 Tage bei 4°C stratifiziert. Die Anzucht erfolgte bei 22 °C und 50% Luftfeuchtigkeit unter Langtag-Bedingungen (160 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>). Für die Analyse wurden Blätter von ca. 6-Wochen alte Pflanzen behandelt (siehe Abschnitt 3.5.14). Um Saatgut zu generieren war es nötig die Pflanzen für 4 Wochen bei 4°C zu vernalisieren. Anschließend wurden sie erneut unter Langtag-Bedingungen bis zur Samenreife inkubiert.

#### **Tabelle 3.4 erzeugte knock-out-Linien in *E. salsugineum*.**

Aufgelistet sind alle generierten *E. salsugineum*-Deletionsmutanten, das inserierte Konstrukt und Angaben bezüglich der Homozygotie. Die Mutation wurde mit Hilfe des CRISPR/Cas9-Systems eingeführt (Wang *et al.*, 2015). Die Zielsequenzen sind in Tabelle 3.16 aufgeführt.

| Gen                | Plasmid                                     | Homozygot                               |
|--------------------|---|---|
| <i>EsWRKY33.2</i>  | pHEE401:U6p-Insert-U6t-EC1.2p-Cas9-rbcS-E9t | Nein (neue heterozygote Mutation in T2) |
| <i>EsPen2.1</i>    | pHEE401:U6p-Insert-U6t-EC1.2p-Cas9-rbcS-E9t | Ja (T2)                                 |
| <i>EsCYP81F4.1</i> | pHEE401:U6p-Insert-U6t-EC1.2p-Cas9-rbcS-E9t | Nein (neue heterozygote Mutation in T2) |

### 3.4.3. *Nicotiana benthamiana*

*N. benthamiana*-Samen wurden auf feuchter Erde ausgestreut und bei 22 °C und 50% Luftfeuchtigkeit unter Langtag-Bedingungen (160 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) zum keimen gebracht. Anschließend wurden die Pflanzen in einzelne Töpfe pikiert und weiter angezogen. Für Infiltrationsversuche wurden die Pflanzen ca. 2 h vor Verwendung ins Labor gestellt um eine „Akklimatisierung“ zu ermöglichen. Dies verhindert einen unkontrollierten Stomataschluss und erleichtert das Infiltrieren (siehe Abschnitt 3.5.16).

### 3.4.4. *Escherichia coli*

*E. coli* wurde zur Vermehrung von Plasmid-DNA und für Klonierungen eingesetzt. Dabei wurde immer mit dem Stamm XL1 blue (endA1 gyrA96(nalR) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[:Tn10 proAB+ lacIq Δ(lacZ)M15] hsdR17(rK- mK+)) gearbeitet. Die Anzucht erfolgte in dyt-Medium

bei 37°C. Flüssigkulturen wurden bei 200 rpm geschüttelt (Infors HAT Multitron Standard). Platten wurden über Nacht bei 37°C in einem Brutschrank (Haraeus) inkubiert.

### 3.4.5. *Agrobacterium tumefaciens*

Für transiente Proteinexpression in *N. benthamiana* oder für Transformation von *E. salsguineum* wurde *Agrobacterium tumefaciens* MP90 GV3101 eingesetzt. Alle verwendeten Stämme sind in Tabelle 7.1 aufgelistet. Die Anzucht erfolgte in dyt-Medium mit entsprechender Selektion bei 28°C. Flüssigkulturen wurden bei 200 rpm geschüttelt (Infors HAT Multitron Standard). Platten wurden für 2 Tage bei 28°C in einem Brutschrank (Haraeus) inkubiert.

### 3.4.6. *Saccharomyces cerevisiae*

*S. cerevisiae* wurde als Modellorganismus für Interaktionsstudien (*Yeast-two-Hybrid*) und zur Analyse der Spezifität von GSTs während der Camalexinbiosynthese verwendet. Die verschiedenen Stämme sind in Tabelle 3.5 zusammengefasst. Die Anzucht unter Selektionsdruck erfolgte in SD-Medium (bzw. SC-Medium für Anzuchten von Hefen für den ungerichteten *Yeast-two-Hybrid* mit den entsprechenden Supplementen bei 28°C und 200 rpm (Infors HAT Multitron Standard). Platten wurden für 2 Tage bei 28°C in einem Brutschrank (Haraeus) inkubiert. Wildtypische Hefen wurden in YPG angezogen.

**Tabelle 3.5 Genotypen der verwendeten Hefestämme.**

| Stamm                 | Genotyp  | Verwendung                            |
|-----------------------|--|---------------------------------------|
| <b>Y8800</b>          | MAT $\alpha$ leu2-3,112 trp1-901 his3 $\Delta$ 200 ura3-52 gal4 $\Delta$ gal80 $\Delta$ GAL2::ADE2 GAL1::HIS3@LYS2 GAL7::lacZ@met2 cyh2  | Ungerichteter <i>Yeast-two-Hybrid</i> |
| <b>Y8930</b>          | MAT $\alpha$ leu2-3,112 trp1-901 his3 $\Delta$ 200 ura3-52 gal4 $\Delta$ gal80 $\Delta$ GAL2::ADE2 GAL1::HIS3@LYS2 GAL7::lacZ@met2 cyh2  | Ungerichteter <i>Yeast-two-Hybrid</i> |
| <b>AH109</b>          | MAT $\alpha$ , trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, James et al., 1996; gal4 $\Delta$ , gal80 $\Delta$ , LYS2 :: GAL1UAS-GAL1TATA-HIS3, GAL2UAS-GAL2TATA-ADE2, URA3 :: MEL1UAS-MEL1 TATA-lacZ | Gerichteter <i>Yeast-two-Hybrid</i>   |
| <b>#1506 (BY4741)</b> | WT MAT $\alpha$ his3 $\Delta$ 1 leu2 $\Delta$ 0 met15 $\Delta$ 0 ura3 $\Delta$ 0   | Aktivitätstests von CYPs              |
| <b>#2542</b>          | BY4741; GTT1::loxP; GTT2::kanMX; GRX1::loxP; GRX2::loxP; TEF4::loxP  | Transiente Expression von GSTs        |
| <b>#5085</b>          | BY4742, GTO1::loxP, GTO2::loxP, GTO3::kanMX, TEF4::loxP, CPC::loxP, CPY::loxP, CIS2::loxP:URA:loxP   | Transiente Expression von GSTs        |
| <b>#5322</b>          | BY4741+MET15; GTT1::loxP; GTT2::kanMX; GRX1::loxP; GRX2::loxP; TEF4::loxP  | Transiente Expression von GSTs        |

Alle verwendeten Hefestämme sind in Tabelle 7.2, Tabelle 7.3 und Tabelle 7.4 aufgelistet.

### 3.5. Methoden

#### 3.5.1. Isolierung von Nukleinsäuren

##### 3.5.1.1. Extraktion von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Für die Isolation von Plasmid-DNA wurde das Quantum Prep Plasmid Miniprep Kit (Bio-RAD) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Elution erfolgte in 100 µl Wasser. Anschließend wurde die Qualität und Konzentration der Plasmid-DNA mittels Agarosegelelektrophorese überprüft.

##### 3.5.1.2. Extraktion von genomischer DNA aus *A. thaliana*-Blättern

50-100 mg Blattmaterial wurde in flüssigen Stickstoff homogenisiert (Retsch MM2 Mixer Mill Homogenizer) und mit 1 ml vorgewärmten Extraktionspuffer (65 °C, 100 mM Tris pH 8, 700 mM NaCl, 50 mM EDTA pH 8,7 µl/10 ml β-Mercaptomethanol) versehen. Nach 15-minütiger Inkubation (65°C) wurden 650 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zugegeben, das Gemisch invertiert und zentrifugiert (Beckman GS-15R, 14000 rpm, 2 min). Die wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und enthaltene RNA verdaut (30 µg/ml RNase, 37 °C, 30 min). Die DNA wurde durch Zugabe von 1 Volumen Isopropanol gefällt und pelletiert (14'000 rpm, 15 min). Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert (14'000 rpm, 2 min) und nach Abnahme des Überstandes an der Luft getrocknet. Anschließend wurde die DNA in 50-100 µl bidestilliertem H<sub>2</sub>O rückgelöst.

##### 3.5.1.3. RNA-Extraktion aus *A. thaliana*-Blättern

Zur RNA Extraktion wurde das NucleoSpin® RNA II Kit (Machery und Nagel) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Elution erfolgte in 60 µl RNase-freiem H<sub>2</sub>O (im Kit enthalten). Zur Lagerung wurde die isolierte RNA in 2 Vol. 100% Ethanol und 1/10 Vol. Natriumacetat gefällt und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

#### 3.5.2. cDNA-Synthese

Für die cDNA Synthese wurde das TaqMan® Reverse Transcription Reagents Kit von Roche verwendet. Die Zusammensetzung der Reaktion kann Tabelle 3.6 entnommen werden.

**Tabelle 3.6 Reaktionsansatz der cDNA-Synthese.**

| Komponente                            | Volumen [ $\mu$ l]       |
|---------------------------------------|--------------------------|
| RNA (0,5-1 $\mu$ g gesamt RNA)        | x                        |
| H <sub>2</sub> O bidest.              | auf 20 $\mu$ l auffüllen |
| Random Hexamers (50 $\mu$ M)          | 1                        |
| dNTPs (10 mM)                         | 4                        |
| RNAse Inhibitor (20 U/ $\mu$ l)       | 0,4                      |
| 10x RT-Puffer                         | 2                        |
| Reverse Transkriptase (50 U/ $\mu$ l) | 0,5                      |
| MgCl <sub>2</sub> (25 mM)             | 4,4                      |

Die Synthese erfolgte in einem T1 Thermocycler von Biometra mit dem folgenden Programm:

**Tabelle 3.7 Programm der cDNA-Synthese.**

| Schritt | Temperatur [ $^{\circ}$ C] | Zeit [min] |
|---------|----------------------------|------------|
| 1       | 25                         | 10         |
| 2       | 48                         | 45         |
| 3       | 94                         | 5          |
| 4       | 4                          | 5          |

### 3.5.3. Agarosegelelektrophorese

Zum Nachweis von Nukleinsäuren und der Auftrennung entsprechend ihrer Größe wurde Agarosegelelektrophorese verwendet. Es wurde eine 1%-ige Agaroselösung in TAE-Puffer hergestellt (Tris 40 mM, Eisessig 20 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0) und mit Ethidiumbromid versetzt (25  $\mu$ g/50 ml). Die Proben wurden mit 5x Ladepuffer versetzt. Als Größenstandard wurde 1 kb plus DNA ladder (M, Thermo Scientific) verwendet. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 7 V/cm und 400 mA. Das in die DNA interkalierende Ethidiumbromid wurde unter Verwendung von UV-Licht ( $\lambda = 312$  nm) sichtbar gemacht (UVP EpiChemi3 Benchtop Darkroom).

### 3.5.4. Präparation von DNA aus Agarosegelen

Zur Extraktion von DNA-Banden aus Agarosegelen wurde das NucleoSpin® Gel und PCR Clean-up Kit von Machery & Nagel entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Die

Elution erfolgte mit 15-30  $\mu\text{l}$  vorgewärmten ddH<sub>2</sub>O (65°C). Zur Konzentrationsbestimmung wurde ein Aliquot mittels Agarosegelelektrophorese analysiert.

### 3.5.5. Restriktion von DNA

Zur Überprüfung extrahierter Plasmid-DNA (siehe Abschnitt 3.5.1.1) wurde ein Restriktionsverdau durchgeführt. Der Reaktionsansatz (siehe Tabelle 3.8) wurde für 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend mittels Agarosegelelektrophorese analysiert.

**Tabelle 3.8 Zusammensetzung eines Restriktionsansatzes**

| Komponente                               | Volumen [ $\mu\text{l}$ ]      |
|--|--------------------------------|
| Plasmid DNA (ca. 200 ng/ $\mu\text{l}$ ) | x                              |
| 10x CutSmart Reaktionspuffer (NEB)       | 1                              |
| Restriktionsenzym 1(5 Units)             | 0,5                            |
| Restriktionsenzym 2 (5 Units)            | 0,5                            |
| RNase (30 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )    | 1                              |
| H <sub>2</sub> O bidest.                 | auf 10 $\mu\text{l}$ auffüllen |

Zur Generierung von DNA-Fragmenten für Klonierungen wurde der Restriktionsansatz in einem 200  $\mu\text{l}$  Maßstab angesetzt. Für den Verdau wurden 5  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA und 15 Units Enzym eingesetzt. Der Ansatz wurde für mind. 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Auftrennung mittels Agarosegelelektrophorese (siehe Abschnitt 3.5.3) und Extraktion der Banden via Gelextraktion (siehe Abschnitt 3.5.4).

### 3.5.6. Dephosphorylierung von DNA

Beim Klonieren neuer Konstrukte kann es hilfreich sein den linearisierten Vektor zu dephosphorylieren. Dafür wurde in den Restriktionsansatz 1  $\mu\text{l}$  Alkalische Phosphatase (AP) zugegeben und inkubiert.

### 3.5.7. Sequenzierungsreaktion

Ca. 750 ng DNA wurde zusammen mit 2  $\mu\text{l}$  einer 10 mM Primerlösung in einem Mix2Seq-Tube gemischt und zur Sequenzierung zu MWG Eurofins geschickt.

3.5.8. Polymerasekettenreaktion

3.5.8.1. PCR

PCR-Reaktionen wurden in T1 Thermocyclern von Biometra durchgeführt. Für Genotypisierungen oder zur Überprüfung, ob eine Klonierungsreaktion erfolgreich war wurde Go Taq® Polymerase (Promega™) verwendet. Für Generierung von DNA-Fragmenten für klassische Klonierungen wurde Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs) eingesetzt und für Gateway-Klonierungen wurde die PfuTurbo Cx Hotstart DNA Polymerase (Agilent Technologies) verwendet. In Tabelle 3.9 und Tabelle 3.10 sind der verwendete Reaktionsansatz und das Programm aufgelistet.

Tabelle 3.9 Komponenten der PCR-Reaktionen.

|                                 | Go Taq® Polymerase | Pfu HotstartxTurbo  | Q5 Polymerase |
|---------------------------------|--------------------|---------------------|---------------|
|                                 | V [µl]             | V [µl]              | V [µl]        |
| DNA (1ng)                       | x                  | x                   | x             |
| 5x Green Go Taq® Puffer         | 4                  | -                   | -             |
| 10x Turbo C <sub>x</sub> Puffer | -                  | 2                   | -             |
| 5x Q5 Reaktions-Puffer          | -                  | -                   | 2             |
| dNTPs (10 mM)                   | 2                  | 2                   | 2             |
| Primer forward                  | 1                  | 1                   | 1             |
| Reverse (je 10 µM)              | 1                  | 1                   | 1             |
| Polymerase                      |                    | 0,2                 |               |
| H <sub>2</sub> O bidest.        |                    | auf 20 µl auffüllen |               |

Tabelle 3.10 Programm für PCR-Reaktionen.

| Programm               | Temperatur | Zeit    |        |
|------------------------|------------|---------|--------|
| Initiale Denaturierung | 95°C       | 2 min   |        |
| Denaturierung          | 95°C       | 30 s    |        |
| Primer-Anlagerung      | x°C        | 20 s    | 15-25x |
| Elongation             | 72°C       | 30 s/kb |        |
| Abschluss-Elongation   | 72°C       | 2 min   |        |
| Kühlen                 | 4°C        | 1 min   |        |

Die für diese Arbeit benötigten Primer und zugehörige Anlagerungstemperaturen sind in Tabelle 7.5 aufgeführt

### 3.5.8.2. Kolonie-PCR

Zur Überprüfung ob ein Konstrukt in dem entsprechenden Mikroorganismus enthalten war, wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Der Reaktionsansatz entspricht dem der „normalen“ PCR (siehe Tabelle 3.9). Als Template wurde Zellmaterial verwendet, welches zuvor mit einer sterilen Spitze von der Platte entnommen wurde. Das für Kolonie-PCR verwendete Programm ist in Tabelle 3.11 zusammengefasst.

**Tabelle 3.11 Programm für Kolonie-PCR.**

| Programm               | Temperatur | Zeit    |        |
|------------------------|------------|---------|--------|
| Initiale Denaturierung | 95°C       | 5 min   |        |
| Denaturierung          | 95°C       | 30 s    |        |
| Primer-Anlagerung      | x°C        | 20 s    | 30-40x |
| Elongation             | 72°C       | 30 s/kb |        |
| Abschluss-Elongation   | 72°C       | 2 min   |        |
| Kühlen                 | 4°C        | 1 min   |        |

### 3.5.8.3. Quantitative *real time*-PCR (qRT-PCR)

Für qRT-PCR-Reaktionen wurde der LightCycler® 480 (Roche Life Science) verwendet. Der Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

**Tabelle 3.12 Reaktionsansatz für qRT-PCR.**

| Komponente                              | Volumen [µl] |
|---|--------------|
| cDNA (1:10 verdünnt)                    | 2            |
| LC® 480 SYBR Green I Master Mix (Roche) | 5            |
| Primer-Mix (10 µM)                      | 1            |
| H <sub>2</sub> O                        | 2            |

Nach Lauf der PCR (Programm siehe Tabelle 3.13) erfolgte Die Quantifizierung anhand eines Plasmides mit bekannter Konzentration. Es wurden drei verschiedene Konzentrationen (2 pg, 0,2 pg, 0,02 pg, verdünnt in 1x RT-Puffer) als Standards bei jedem Lauf mitgeführt.

**Tabelle 3.13 Programm für qRT-PCR-Reaktionen.**

| Programm               | Temperatur | Zeit    |     |
|------------------------|------------|---------|-----|
| Initiale Denaturierung | 95°C       | 5 min   |     |
| Denaturierung          | 95°C       | 10 s    |     |
| Primer-Anlagerung      | x°C        | 10 s    | 45x |
| Elongation             | 72°C       | 30 s/kb |     |
| Kühlen                 | 4°C        | 30 s    |     |
| Schmelzkurve           | 60         | 95°C    |     |
| Signal-Detektion       | 78°C       |         |     |

### 3.5.9. Klonierungsstrategien

#### 3.5.9.1. Klassisch

Für klassische Klonierungsansätze wurden linearisierter Vektor und Insert in einem molaren Verhältnis von 1:3 ligiert. Dafür wurde die T4-DNA-Ligase von NEB entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur (RT) für 1 h oder über Nacht bei 4°C. Anschließend wurde der gesamte Ansatz in *E.coli* XL 1 Blue- Zellen transformiert (siehe Abschnitt 3.5.10.4).

#### 3.5.9.2. pGEM®-T Easy-Klonierung

Zur Generierung von pGEM®-T Easy-Konstrukten wurde das pGEM®-T Easy-Vektor-System von Promega verwendet. Die Ligation und Transformation erfolgte weitestgehend entsprechend der Herstellerangaben. Es wurden allerdings standardmäßig 0,3 µl des linearisierten Vektors für Ligationsansätze verwendet. Nach 1 h Inkubation des Ligationsansatzes erfolgte die Transformation in *E.coli* XL 1 Blue- Zellen. Anschließend wurden die Zellen auf dyt-Platten (100 µg/ml Ampicillin) über Nacht bei 37°C inkubiert.

#### 3.5.9.3. Gateway™-System

Die Invitrogen™ Gateway™ Rekombinations-Klonierungstechnologie bietet den Vorteil ein Gen schnell und effizient in beliebig viele Vektoren einzubringen und ist nicht auf das Vorhandensein von Restriktionserkennungssequenzen angewiesen. Die Klonierung besteht aus zwei Schritten. In der BP-Reaktion wird das Zielgen in einen *Entry*-Vektor (pDONR223) eingebracht. Ausgehend von diesem Vektor erfolgt in der LR-Reaktion ein Transfer mittels homologer Rekombination in den gewünschten *Destination*-Vektor (pEarleyGate101,102,

202). Für die BP-Reaktion wurden folgende Komponenten gemischt und für 1 h bei RT inkubiert:

**Tabelle 3.14 Zusammensetzung der BP-Reaktion.**

| Komponente                 | Volumen [ $\mu$ l] |
|----------------------------|--------------------|
| pDONR223 (150 ng/ $\mu$ l) | 1                  |
| BP Clonase™ II enzyme mix  | 1                  |
| Insert (50 ng/ $\mu$ l)    | 3                  |
| TE-Puffer (pH=8)           | 3                  |

Nach Abstoppen der Reaktion durch Zugabe von 1  $\mu$ l Proteinase K (37°C, 10 min) wurde der Ansatz in One Shot®OmniMAX™-Zellen (Invitrogen) transformiert und selektiert. Nach Präparation der Plasmid-DNA wurde die LR-Reaktion angesetzt (entsprechend den Herstellerangaben), erneut für 1 h bei RT inkubiert, mit Proteinase K abgestoppt und in *E.coli* XL 1 Blue- Zellen transformiert.

#### 3.5.9.4. USER-System

Das *Uracil-Specific Excision Reagent* (USER)-Klonierungssystem (Nour-Eldin *et al.*, 2006, Geu-Flores *et al.*, 2007) ist eine simple und gezielte Ein-Schritt-Klonierung. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode zur Generierung von pCAMBIA330035SU-Konstrukten verwendet. Der Reaktionsansatz setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

**Tabelle 3.15 Zusammensetzung des USER-Klonierungsansatzes.**

| Komponente  | Volumen [ $\mu$ l]       |
|---|--------------------------|
| pCambia330035SU (PacI/Nt.BbVCI) (120 ng/ $\mu$ l) | 0,3                      |
| Insert  | x                        |
| User-Mix (1 U pro $\mu$ l)                        | 1                        |
| 10x T4 DNA Ligationspuffer                        | 1                        |
| ddH <sub>2</sub> O                                | Auf 10 $\mu$ l auffüllen |

Nach 30-minütiger Inkubation (37°C) wurden 0,5  $\mu$ l T4-Ligase hinzugefügt und erneut für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde der gesamte Ansatz in *E.coli* XL 1 Blue- Zellen transformiert.

### 3.5.9.5. GoldenGate-System (CRISPR/Cas9)

Für die Klonierung der CRISPR/Cas9-Konstrukte (siehe Abschnitt 4.3.4) wurde das GoldenGate-System genutzt. Das Design der Konstrukte und die Durchführung entsprachen den Angaben aus Wang *et al.* (2015) für die Insertion einer *guide*-RNA aus Dikotyledonen (Wang *et al.* (2015), *Additional file 3*). Die verwendeten Oligonukleotide sind Tabelle 3.16 zusammenfasst. Als Zielvektor diente pHEE401 (<https://www.addgene.org/71286/>). Die Wahl der *guide*-RNAs (grau markiert) erfolgte mit dem Programm CRISPRdirect (<https://crispr.dbcls.jp/>). Es wurde definiert, dass ein mögliches *Offtarget* bei mehr als drei Fehlpaarungen nicht mehr erkannt werden kann.

**Tabelle 3.16 verwendete Oligos für Klonierung der CRISPR/Cas9-Konstrukte.**

Aufgelistet sind die Gene, für die mittels des CRISPR/Cas9-Systems Deletionsmutanten erzeugt werden sollte, die entsprechenden Oligos (Target-Sequenz in grau hinterlegt) und der verwendete Primer-Name. Das Konstrukt-Design entsprach den Vorgaben aus Wang *et al.* (2015) für die Insertion einer *guide*-RNA aus Dikotyledonen.

| Target                    | Primer-name                | Sequenz                 |
|---------------------------|----------------------------|-------------------------|
| <b><i>EsWRKY33.1</i></b>  | DT1-BsF <i>EsWRKY33.1</i>  | ATTGTGATAAGAGCTCCTGTGGT |
|                           | DT2-BsR <i>EsWRKY33.1</i>  | AAACACCACAGGAGCTCTTATCA |
| <b><i>EsWRKY33.2</i></b>  | DT1-BsF <i>EsWRKY33.2</i>  | ATTGGAACCATGATGATCAAGGC |
|                           | DT2-BsR <i>EsWRKY33.2</i>  | AAACGCCTTGATCATCATGGTTC |
| <b><i>EsPen2.1</i></b>    | DT1-BsF <i>EsPen2.1</i>    | ATTGGGAAGATCTTGGAGAAGGA |
|                           | DT2-BsR <i>EsPen2.1</i>    | AAACTCCTTCTCCAAGATCTTCC |
| <b><i>EsPen2.2</i></b>    | DT1-BsF <i>EsPen2.2</i>    | ATTGAACATGCTTCTAGCTCACG |
|                           | DT2-BsR <i>EsPen2.2</i>    | AAACCGTGAGCTAGAAGCATGTT |
| <b><i>EsCYP81F4.1</i></b> | DT1-BsF <i>EsCyp81F4.1</i> | ATTGCAGTGGTCACCGTAAGGCG |
|                           | DT2-BsR <i>EsCyp81F4.1</i> | AAACCGCCTTACGGTGACCACTG |
| <b><i>EsCYP81F4.2</i></b> | DT1-BsF <i>EsCyp81F4.2</i> | ATTGGTGTGTTTTGGCGAGTCGG |
|                           | DT2-BsR <i>EsCyp81F4.2</i> | AAACCCGACTCGCCAAAACACAC |
| <b><i>EsMetra8.1</i></b>  | DT1-BsF <i>MeTra#8.1</i>   | ATTGCACGGCCGAAGAAAGACCC |
|                           | DT2-BsR <i>MeTra#8.1</i>   | AAACGGGTCTTTCTTCGGCCGTG |
| <b><i>EsMetra8.2</i></b>  | DT1-BsF <i>MeTra#8.2</i>   | ATTGCACCTTCGTACACGATGGC |
|                           | DT2-BsR <i>MeTra#8.2</i>   | AAACGCCATCGTGTACGAAGGTG |

### 3.5.10. Transformation

#### 3.5.10.1. Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Eine Einzelkolonie von *E. coli* XL 1 wurde in 5 ml dyt-Medium (20 µg/ml Tetrazyclin) angeimpft und über Nacht bei 200 rpm angezogen. Am nächsten Tag wurde eine 100 ml dyt-Medium (2x

50 ml) wurde mit einer  $OD_{550} < 0,1$  angeimpft und bis zu einer  $OD_{550} \sim 0,4-0,5$  wachsen gelassen. Die Zellen wurden geerntet (5000 rpm, 4°C, 10 min) und die Pellets mit je 15 ml eiskalten TBF I (30 mM KAc, 50 mM MnCl<sub>2</sub>, 100 mM RbCl, 10 nM CaCl<sub>2</sub>, 15 % Glycerin, pH 5,0, sterilfiltrieren) gewaschen. Nach 20-minütiger Inkubation wurde erneut zentrifugiert (4000 rpm, 4°C, 5 min) und die Pellets in je 1,8 ml TBF II suspendiert (10 mM NaMOPS, pH 7,0, 10 mM RbCl, 15 mM CaCl<sub>2</sub>, 15 % Glycerin, sterilfiltrieren). 100 µl Aliquots werden bei -80°C eingefroren und bis zur Verwendung gelagert.

### 3.5.10.2. Herstellung chemisch kompetenter Agrobakterien

2x 10 ml dyt-Medium wurden über Nacht mit *Agrobacterium tumefaciens* MP90 GV3101 (35 µg/ml Rifampicin, 25 µg/ml Gentamycin) wachsen gelassen. Am nächsten Tag wurden die Kulturen in je 250 ml dyt-Medium überführt und bis zu einer  $OD_{600} \sim 0,5-0,7$  angezogen (28°C, 200 rpm). Nach 20-minütiger Kühlung der Kulturen auf Eis erfolgte die Zellernte (4000xg, 4°C, 10 min). Die Pellets wurden in je 25 ml 150 mM NaCl-Lösung resuspendiert, die Suspensionen vereint und für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut pelletiert (2000xg, 4°C, 10 min) und in 5 ml 20 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung gelöst. Die Suspension wurde für 30 min auf Eis inkubiert und in 100 ml Aliquots schockgefroren und bei -80°C gelagert.

### 3.5.10.3. Herstellung elektrokompetenter Agrobakterien

200 ml dyt-Medium (35 µg/ml Rifampicin, 25 µg/ml Gentamycin) wurden mit einer 5 ml *Agrobacterium tumefaciens* MP90 GV3101- Vorkultur angeimpft und über Nacht bei 28°C (200 rpm) inkubiert. Die Zellen wurden geerntet (4500 rpm, 4°C, 10 min) und die Pellets mit je 45 ml 10%-iger eiskalter, steriler Glycerinlösung gewaschen (erneut Zentrifugation bei 4500 rpm, 4°C, 10 min). Je zwei Pellets wurden in insg. 45 ml eiskalter Glycerinlösung gewaschen und abzentrifugiert. Es folgten zwei weitere Waschschrirte mit insg. 20 ml und je 4 ml Glycerinlösung. Anschließend wurden die Agrobakterien in 2 ml Glycerinlösung resuspendiert und in 100 µl Aliquots schockgefroren bei -80°C gelagert.

### 3.5.10.4. Hitzeschocktransformation von chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen

Ein Aliquot kompetenter *E. coli* XL 1 Blue-Zellen (siehe Abschnitt 3.5.10.4) wurde aufgetaut und sofort auf Eis gelagert. Die Plasmid-DNA oder ein Ligationsansatz wurde zugegeben und für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 2 min bei 42°C. Danach

wurden die Zellen kurz auf Eis gekühlt und 300 µl dyt-Medium zugegeben. Nach einer 60-minütigen Erholungsphase (37°C, Roller) wurde der Ansatz auf dyt-Platten mit entsprechendem Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

#### 3.5.10.5. Hitzeschocktransformation von chemisch kompetenten Agrobakterien

Für die Transformation chemisch kompetenter Agrobakterien (siehe Abschnitt 3.5.10.2) wurde ein Aliquot von *Agrobacterium tumefaciens* MP90 GV3101 auf Eis aufgetaut und mit Plasmid-DNA gemischt (zu beachten ist, dass bei dieser Methode deutlich mehr DNA eingesetzt werden sollte, um eine ähnliche Effizienz zu erzielen, ca. 500 ng). Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff eingefroren und danach bei 37°C für 5 min einen Hitzeschock unterzogen. Anschließend wurden die Zellen kurz auf Eis abgekühlt, mit 900 µl dyt-Medium gemischt, für 2h bei 28°C (Roller) inkubiert und auf dyt-Platten mit entsprechender Selektion ausplattiert. Nach 48 h Inkubation bei 28°C konnte Koloniewachstum beobachtet werden.

#### 3.5.10.6. Elektroporation von *Agrobacterium tumefaciens*

Die Elektroporation von *Agrobacterium tumefaciens* MP90 GV3101 (siehe Abschnitt 3.5.10.3) erfolgte mit dem GenePulser (zusammen mit Pulse Controller und Capacitance Extender; Bio-Rad Laboratories) in 2 mm Gap-Küvetten (VWR) bei 2,5 kV, 400 Ω und 25 µF. Anschließend wurde 1 ml dyt-Medium hinzugefügt, der Ansatz in ein Eppendorfgefäß übertragen und für 2 h bei 28°C inkubiert (Roller). Nach der Erholungszeit wurden die Zellen auf dyt-Platten mit entsprechender Selektion ausgebracht und für 48 h bei 28°C angezogen.

#### 3.5.10.7. Transformation von *S. cerevisiae*-Zellen

Die Transformation von *S. cerevisiae* erfolgte nach dem Protokoll von (Gietz *et al.*, 1992). 50 ml YPG wurden aus einer 5 ml üN-Kultur angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> = 0,6-0,8 wachsen gelassen (Start OD<sub>600</sub> < 0,1). Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation für 5 min bei 2000x g geerntet und mit 25 ml TE-Puffer gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 1 ml 100 mM LiAc aufgenommen, die Suspension in ein Eppendorfgefäß überführt und abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 400 µl 100 mM LiAc resuspendiert (Endvolumen 500 µl). Die Zellsuspension wurde in 50 µl Aliquots aufgeteilt, kurz zentrifugiert und das restliche LiAc entfernt. Zwischenzeitlich wurde die *carrier*-DNA (salmon

sperm) für 5 min bei 95°C denaturiert und anschließend auf Eis gestellt. Zu dem Zellpellet wurde in angegebener Reihenfolge die folgenden Komponenten hinzugefügt:

240 µl PEG 4000 (50% w/v)

36 µl 1 M LiAc

30 µl *carrier*-DNA (10 mg/ml)

x µl DNA

mit ddH<sub>2</sub>O auf 360 µl auffüllen.

Das Pellet wurde durch leichtes anschnipsen resuspendiert und gemischt. Anschließend erfolgte eine 40-minütige Inkubation bei 42°C. Nach kurzer Inkubation auf Eis und Zentrifugation des Transformationsansatzes wurde das Pellet in 100 µl ddH<sub>2</sub>O resuspendiert und auf SD-Platten mit entsprechenden Supplementen ausplattiert.

#### 3.5.10.8. Transformation von *A. thaliana* via *floral dip*

Zur Generierung stabiler *A. thaliana*-Linien wurde der *A. tumefaciens*-vermittelten DNA-Transfer mittels *floral dip* verwendet (Clough und Bent, 1998). Dafür wurde eine 200 ml Kultur von Agrobakterien, die das entsprechende Konstrukt enthielten, angezogen, die Zellen geerntet (2000 rpm, 4°C, 15 min) und das Pellet in Transformationspuffer (10mM MgCl<sub>2</sub>, 5% Saccharose, 0,01% Silwet, pH=5,8) resuspendiert. In dieser Suspension wurden die Blüten von ca. 3-4 Wochen alten *A. thaliana*-Pflanzen für 1 min inkubiert. Es wurden meist 2 Töpfe á 5 Pflanzen transformiert. Um die Luftfeuchtigkeit zu erhöhen, wurden die Pflanzen über Nacht mit einer Folie abgedeckt. Nach 7 Tagen wurde der Vorgang wiederholt. Dies erhöhte die Ausbeute positiver Transformanden. Nach Abreifen der Samen wurden diese auf Vorhandensein des Konstruktes selektiert (siehe Abschnitt 3.5.13)

#### 3.5.10.9. Transformation von *E. salsugineum* via *floral dip*

Die Transformation von *E. salsugineum*-Pflanzen entsprach weitestgehend dem Transformationsprotokoll von *A. thaliana* (siehe Abschnitt 3.5.10.8). Abweichend davon wurden die Blüten für 2 min in dem Transformationspuffer inkubiert und mindestens 4 Töpfe á 5 Pflanzen behandelt. Außerdem wurde die Transformation dreimal im Abstand von je einer Woche wiederholt.

### 3.5.11. *Yeast-two-Hybrid*

#### 3.5.11.1. gerichteter *Yeast-two-Hybrid*

Der gerichtete *Yeast-two-Hybrid* wurde mit Hilfe des Matchmaker® Gold Yeast-Two-Hybrid System von Clontech durchgeführt. Es wurde entsprechend den Herstellerangaben verfahren. Die Selektion erfolgte auf SD-Platten mit entsprechenden Supplementen nach 3- und 5 Tagen Inkubation bei 28°C.

#### 3.5.11.2. ungerichteter *Yeast-two-Hybrid*

Der ungerichtete *Yeast-two-Hybrid* erfolgte entsprechend dem Protokoll von Dreze *et al.* (2010). Der Assay wurde im Labor von Prof. Dr. Pascal Falter-Braun (ehem. Lehrstuhl für Systembiologie der Pflanzen, TUM; aktuell Helmholtz Zentrum München- Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt Institut für Netzwerkbioogie (INET)) durchgeführt. Es wurden die in diesem Labor etablierten Lösungen und Geräte verwendet.

### 3.5.12. Samensterilisation

Für die Oberflächensterilisation von *E. salsugineum*-Samen wurden 5 ml-Eppendorfgläser verwendet. Das Saatgut wurde zunächst mit 70% Ethanol gewaschen, anschließend mit 5% Natriumhypochlorid-Lösung (+ 0,05% Triton x-100) versetzt (die Samen sollten in der Lösung schwimmen können) und durch invertieren gemischt. Der Sterilisationsvorgang erfolgte für 20 min bei RT auf einem HulaMixer (Invitrogen) (gleichmäßiges Invertieren). Anschließend wurden die Samen 4-5 Mal mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und auf ½-MS-Platten mit entsprechender Selektion ausgebracht.

### 3.5.13. Selektion auf Resistenzmarker (BASTA, Hyg)

#### 3.5.13.1. BASTA®- Selektion

Transgene *A. thaliana*-Samen mit einer Phosphinothricin (PPT)-Resistenz wurden auf Erde ausgestreut und nach der Keimung mit BASTA® (Bayer CropScience AG; 0,1% w/v) besprüht. Der Vorgang wird nach 3 Tagen und nach einer Woche wiederholt.

### 3.5.13.2. Hygromycin-Selektion

Transgene *E. salsugineum*-Pflanzen wurden mittels Hygromycin-Resistenz selektiert. Das Saatgut wurde sterilisiert (siehe Abschnitt 3.5.12) und auf ½-MS-Platten ausgebracht. Diese enthielten 30 µg/ml Hygromycin. Zum Keimen der Samen wurden die Platten in einen Klimaschrank mit Dauerlicht gestellt. Nach der Keimung (ca. 2-3 Tage) wurden die Platten ins Dunkle transferiert (Schublade) und horizontal für 2-3 Tage inkubiert. Positive Transformanden waren anschließend an einem deutlich längeren Hypocotyl erkennbar. Diese Keimlinge wurden für weitere Analysen auf Erde umgesetzt.

### 3.5.14. Induktion der Phytoalexinbiosynthese

Für die Induktion der Phytoalexinbiosynthese wurden Blätter von *A. thaliana* oder *E. salsugineum* abgeschnitten und in eine Petrischale mit einem angefeuchteten Whatman-Papier gelegt. Für eine Bestrahlung mit UV-C-Licht wurden die Proben für 2 h unter eine UV-Lampe (Desaga UVVIS;  $\lambda = 254$  nm, 8 W, Abstand: 20 cm) gestellt, anschließend die Platten verschlossen und für weitere 22 Stunden inkubiert. Die Silbernitrat-Behandlung erfolgte durch Besprühen der Blätter mit einer 5mM Silbernitratlösung und einer anschließenden Inkubationszeit von 24 h. Auch die *B. cinerea*-Infektion (stamm B05.10) erfolgte über Besprühen der Blätter. Zuvor wurde eine  $2 \times 10^5$  Sporen/ ml-Suspension in Gamborg B5-Medium hergestellt. Für eine optimale Induktion der Phytoalexinbiosynthese wurden die Blätter für 48 h inkubiert.

### 3.5.15. Metabolitextraktion

#### 3.5.15.1. Camalexin aus *A. thaliana*-Blättern

Behandelte Blätter (siehe Abschnitt 3.5.14) wurden gewogen und in ein Eppendorfgefäß überführt. Nach Zugabe von 400 µl 100% Methanol wurden die Proben bei 65°C für 1 h inkubiert. Anschließend wurde das Blattmaterial pelletiert (14'000 rpm, 15 min), der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt und erneut Rückstände der Blätter pelletiert. Abschließend wurde der Überstand in ein HPLC-Gefäß überführt. Es ist darauf zu achten, dass beim Befüllen der HPLC-Gefäße keine makroskopischen Verunreinigungen in die Lösung gelangen (Blattmaterial).

### 3.5.15.2. Wasalexin aus *E. salsugineum*-Blättern

Für die Extraktion von Wasalexin aus *E. salsugineum* wurden die Blätter ebenfalls gewogen und in ein Eppendorfgesäß überführt. Anschließend wurde das Material in flüssigen Stickstoff homogenisiert (Retsch MM2 Mixer Mill Homogenizer) und 900 µl 100% Methanol hinzugefügt. Es folgte ein 30-minütiger Inkubationsschritt (1000 rpm; Thermomix 5436, Eppendorf). Das homogenisierte Blattmaterial wurde abzentrifugiert (14'000 rpm, 10 min) und der Überstand in ein neues Eppendorfgesäß überführt. Der Vorgang wurde einmal wiederholt. Die vereinten Überstände wurden eingedampft und das Extrakt in 400 µl 100% Methanol rückgelöst. Diese Lösung wurde in ein HPLC-Gesäß überführt. Auch bei dieser Extraktionsmethode ist besonders darauf zu achten, dass keine makroskopischen Verunreinigungen in die zu analysierende Probe gelangt.

### 3.5.15.3. GS-IAN-Extraktion aus *S. cerevisiae*

#### Extraktion aus Zellen

Zunächst wurden die zu untersuchenden Hefen in einer 1 ml Vorkultur in SD-Medium mit entsprechenden Supplementen angezogen (üN, 28°C, 200 rpm). Diese wurde in eine 10 ml YPG überführt und bis zu einer OD<sub>600</sub>~0,6 angewachsen. Anschließend wurden die Zellen pelletiert (1000x g, 5min) und in YP+Galaktose resuspendiert. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte für 16 h (28°C, 200 rpm). Anschließend wurden die Zellen mit 0,1 mM IAN und 0,2 mM Glutathion (GSH) für 24 h gefüttert. Gebildetes glutathionyliertes IANs (GS-IAN) sollte dann mittels HPLC analysiert werden. Um die Metabolite zu extrahieren, wurden die Zellen zunächst geerntet (14'000 rpm, 2min). Das Pellet wurde mit 900 µl ddH<sub>2</sub>O gewaschen und erneut abzentrifugiert (14'000 rpm, 2 min). Durch Zugabe von 350 µl 100% Methanol (+ 0,2% Ameisensäure), kräftiges vortexen und Inkubation für 15 min (RT, max. rpm im Thermomix 5436, Eppendorf) wurden die Zellen aufgeschlossen und Metabolite extrahiert. Zelltrümmer wurden pelletiert (14'000 rpm, 10 min) und der Überstand in HPLC-Gesäße überführt. Anschließend wurden 100 µl in die HPLC injiziert und analysiert (siehe Abschnitt 3.5.20). Zu beachten ist, dass keine makroskopischen Verunreinigungen in die HPLC-Gesäße gelangen.

### Extraktion aus Medium

Um zu untersuchen ob GS-IAN aus den Hefezellen sekretiert werden konnte, wurde der Metabolit auch aus dem Medium extrahiert. Dafür wurde nach Ernte der Zellen 1 ml Medium in ein Eppendorfggefäß überführt und mit 800 µl Ethylacetat ausgeschüttelt (1 min vortexen; 2 min bei 14'000 rpm zentrifugieren). Die Ethylacetatphase wurde in ein neues Eppendorfggefäß überführt und der Extraktionsschritt wiederholt. Die vereinten Überstände wurden eingedampft, das Extrakt in 150 µl 100% Methanol aufgenommen und in ein HPLC-Gefäß überführt. 100 µl wurden in die HPLC injiziert und analysiert (siehe Abschnitt 3.5.20).

#### 3.5.16. Infiltration von *N. benthamiana*

Kulturen von Agrobakterien, die das entsprechende Konstrukt tragen, wurden in 25 ml dyt-Medium mit entsprechender Selektion angezogen (28°C, 200 rpm, 1-2 Tage). Anschließend wurde OD<sub>600</sub> auf 0,6 eingestellt und die entsprechende Kulturmenge abzentrifugiert (2500 rpm, 10 min). Das Pellet wurde in 50 ml Infiltrationspuffer aufgenommen (10 mM MES, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 150 µM Acetosyringon, pH=5,6) und für 2 h unter sanften Schwenken inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien zusammen mit einem p19-enthaltenden Stamm (Voinnet *et al.*, 2003) im Verhältnis 1:1:1 (z.B. x-GFP/y-RFP/p19) gemischt und die Suspension mit einer 2 ml-Spritze in die apikale Blattseite von *N. benthamiana* infiltriert. Es wurden 4-6 Blätter infiltriert und für eine optimale Proteinexpression für 4 Tage in der Pflanzenkammer inkubiert.

#### 3.5.17. Mikrosomenpräparation

##### 3.5.17.1. Mikrosomenpräparation aus *N. benthamiana*

Alle Schritte erfolgten auf Eis. Die infiltrierten Blätter wurden geerntet und in einem Gemisch aus Seesand und Polyklar® AT (Serva) (Verhältnis 1:1) und 5 ml gekühlten Mikrosomenpuffer 1 (100 mM Ascorbinsäure, 50 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 250 mM Tricin, 2 mM EDTA, DTE 2mM, 5 g/L BSA, pH 8,2) gemörsert. Weitere 20 ml Mikrosomenpuffer 1 wurden hinzugeben, die Lösung in ein Zentrifugationsröhrchen überführt und pelletiert (JA20 Röhrchen, Beckman Coulter Avanti J-26 XP, 14'000 rpm, 4 °C, 10 min). Der Überstand wurde durch einen Verbandmull (Hartmann) filtriert und erneut zentrifugiert (14'000 rpm, 4°C, 10 min). Erneut wurde der Überstand in ein neues Zentrifugationsröhrchen überführt und die Zellmembranen durch Zentrifugation bei 60'000x g für 2 h pelletiert (8°C). Das Pellet wurde in

1,5 ml Mikrosomenpuffer 2 (50 mM NaCl, 100 mM Tricin, 250 mM Saccharose, 2mM EDTA, 2 mM DTE, pH 8,2) aufgenommen und gepottert. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

#### 3.5.17.2. Solubilisierung von *N. benthamiana*-Mikrosomen

Zum solubilisieren der Proteine wurden 500 ml Mikrosomen mit Triton X-100 versetzt (Endkonzentration 0,5%). Das Gemisch wurde für 1 h (oder über Nacht) unter mehrmaligen Invertieren auf Eis inkubiert. Anschließend wurden Zellmembranen pelletiert (14000 rpm, 1,5 h, 4 °C) und der Überstand mit den gelösten Proteinen in ein neues Eppendorfgefäß überführt.

#### 3.5.17.3. Mikrosomenpräparation aus *S. cerevisiae*

Zunächst wurde eine 5 ml üN-Kultur der entsprechenden Hefen in SD-Medium (mit entsprechenden Supplementen) angezogen. Diese wurde in eine 25 ml SD-Medium-Kultur überführt und diese erneut über Nacht bei 28°C angezogen. Anschließend wurde mit dieser Zellsuspension eine 250 ml YPGE-Kultur angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8 bis 1,9 angezogen. Die Proteinexpression wurde durch Zugabe von 30 ml 20%-iger Galaktoselösung induziert (über Nacht).

Für die Präparation der Mikrosomen erfolgten alle Schritte auf Eis. Zunächst wurden die Zellen in ein Zentrifugationgefäß überführt und pelletiert (JA10, Beckman Coulter Avanti J-26 XP, 7000 rpm, 10 min, 4 °C). Der Überstand wurde vorsichtig abgegossen und der Pellet in 25 ml kaltem TEK-Puffer (0,1 M KCl in TE\*: 50 mM Tris pH 7,5; 1 mM EDTA pH 8,0) resuspendiert. Die Lösung wurde in ein Falcon-Gefäß überführt und die Zellen abzentrifugiert (Swing-Out Rotor, Beckmann Coulter Allegra X-22 R, 4500 rpm, 10 min, 4 °C). Das Pellet wurde in 2,5 ml TES-B-Puffer (0,6 M Sorbitol, 2 mM Dithiothreitol (DTE) in TE\*, DTE frisch zugeben) resuspendiert. Zum Aufschluss der Zellen wurden 8 g Glass Beads (0,5-0,7 mm, Retsch, vorgekühlt) zu der Zellsuspension hinzugefügt und dreimal für je 20 s bei 4 m/s aufgeschlossen (FastPrep-24, MP Biomedicals). Anschließend wurde viermal mit je 5 ml TES-B-Puffer gewaschen und die Überstände in einem Zentrifugationsröhrchen gesammelt (JA20). Die Pelletierung der Membranfraktion erfolgte durch Zentrifugation für 2 h bei 60'000x g (8°C). Das Pellet wurde in 1,5 ml TEG-Puffer (20 % Vol. Glycerin, 2 mM DTE in TE\*, DTE frisch zugeben) aufgenommen und durch pottern homogenisiert. Die Mikrosomen wurden in Aliquots bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### 3.5.18. Bradford-Assay

Die Messung der Gesamtproteinkonzentration erfolgte nach der Methode von Bradford (1976). Es wurde 1 ml Bradford Reagenz (BioRad) in eine Halbmikroküvette gegeben und mit 1 ml Proteinprobe gemischt. Anschließend wurde die Absorption bei  $\lambda=595$  nm bestimmt und anhand einer BSA-Regressionsgerade die entsprechende Konzentration ermittelt.

### 3.5.19. Aktivitätsbestimmung von *S. cerevisiae*-Mikrosomen

Um die Aktivität der isolierten Proteine in Hefemikrosomen nachzuweisen wurden Enzymtests durchgeführt. Dafür wurden 5  $\mu$ l Substrat (2 mM– 50 mM), 5  $\mu$ l NADPH (5 mM) und 40  $\mu$ l Mikrosomen gemischt und für 45- 90 min inkubiert (RT). Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 2 Volumen 100% Methanol abgestoppt, der Ansatz für 20 min bei  $-20^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren und abzentrifugiert (14000 rpm, 15-20 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ). Der Vorgang wird einmal wiederholt. Anschließend wird der Überstand in ein HPLC-Gefäß überführt und 100  $\mu$ l in der HPLC analysiert. Für die  $K_M$ -Wert-Bestimmung wurde der Enzymtest mit einer Verdünnungsreihe des entsprechenden Substrates angesetzt und analysiert.

### 3.5.20. HPLC-Analyse

Die Detektion von Metaboliten erfolgte mit Hilfe von Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC). Die HPLC-Anlage bestand aus einer P680 HPLC Pumpe (Dionex), einem ASI-100 automatisiertem Probeninjektor (Dionex), einem PDA-100 Photodioden Array Detektor (Dionex), einem RF-10AXL Fluoreszenzdetektor (Shimadzu) und einer LiChrospher 100 RP-18 Säule (250 x 3 mm, 5  $\mu$ m, Merck). Als Fließmittel wurden 0,3% Ameisensäure und Acetonitril eingesetzt. Der Fluss betrug 0,6 ml/min. Die verschiedenen verwendeten Programme sind in Tabelle 3.17 zusammengefasst.

**Tabelle 3.17 verwendete Programme zur Detektion von Metaboliten.**

| Nachweis von      | Retentionszeit<br>[min] | Anregung<br>[nm] | Emission (E) /<br>UV-Detektion<br>[nm] | Programm          |                 |
|-------------------|-------------------------|------------------|--|-------------------|-----------------|
|                   |                         |                  |  | Laufzeit<br>[min] | Acetonitril [%] |
| <b>Tryptophan</b> | 3,9                     | 278              | 360 (E)                                | 0                 | 25              |
| <b>IAOx</b>       | 11,2                    | 278              | 360 (E)                                | 2                 | 25              |
| <b>IAN</b>        | 14,3                    | 278              | 360 (E)                                | 10,5              | 45              |
|                   |                         |                  |  | 13                | 100             |
|                   |                         |                  |  | 15                | 100             |

## Material und Methoden

|                  |            |            |                |          |           |
|------------------|------------|------------|----------------|----------|-----------|
| <b>IAOx</b>      | <b>7,9</b> | <b>278</b> | <b>360 (E)</b> | <b>0</b> | <b>33</b> |
| <b>IAN</b>       | 10,6       | 278        | 360 (E)        | 2        | 33        |
|                  |            |            |                | 6,5      | 45        |
|                  |            |            |                | 9        | 100       |
|                  |            |            |                | 10,5     | 100       |
| <b>Cys(IAN)</b>  | 7,1        | -          | 278            | 0        | 20        |
| <b>DHCA</b>      | 6,3        | -          | 344            | 1        | 20        |
| <b>Camalexin</b> | 14,5       | 318        | 370 (E)        | 8        | 40        |
|                  |            |            |                | 14       | 100       |
|                  |            |            |                | 16       | 100       |
| <b>Camalexin</b> | 8,8        | 318        | 370 (E)        | 0        | 20        |
|                  |            |            |                | 1        | 20        |
|                  |            |            |                | 7        | 80        |
|                  |            |            |                | 7,5      | 100       |
|                  |            |            |                | 9        | 100       |
|                  |            |            |                | 9,1      | 20        |
|                  |            |            |                | 12       | 20        |
| <b>Wasalexin</b> | 21,5       | 318        | 370 (E)        | 0        | 20        |
|                  |            |            |                | 2        | 20        |
|                  |            |            |                | 19       | 70        |
|                  |            |            |                | 22       | 100       |
|                  |            |            |                | 25       | 100       |
|                  |            |            |                | 25,1     | 20        |
|                  |            |            |                | 29       | 20        |
| <b>GS-IAN</b>    | 9,8        | -          | 244            | 0        | 20        |
| <b>IAN</b>       | 22,2       | 318        | 370 (E)        | 2        | 25        |
|                  |            |            |                | 19       | 50        |
|                  |            |            |                | 24       | 100       |
|                  |            |            |                | 26       | 100       |
|                  |            |            |                | 26,1     | 20        |
|                  |            |            |                | 30       | 20        |

### 3.5.21. Co-Immunopräzipitation

Zunächst erfolgte eine Äquilibration der zu verwendenden GFP-Trap\_A Beads (ChromoTek). Dafür wurden pro Ansatz 10 ml Beads mit je 500 µl Co-IP-Puffer (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,5 mM EDTA) gemischt und sedimentiert (2000x g, 1 min). Der Waschschrift wurde zweimal wiederholt. Anschließend wurde zu jedem Ansatz je 400 µl solubilisierte *N. benthamiana*-Mikrosomen (siehe Abschnitt 3.5.17.1 und 3.5.17.2) hinzugefügt und im HulaMixer® Sample Mixer (ThermoFisher Scientific) inkubiert (1h, 4°C, 16 rpm). Um ungebundene Proteine zu entfernen wurden die Beads erneut sedimentiert (2000x g, 1 min) und zweimal mit Co-IP-Puffer gewaschen. Eine potentielle Interaktion zweier Proteine wurde mittels SDS-PAGE und Western Blot nachgewiesen (siehe Abschnitt 3.5.22.)

### 3.5.22. Polyacrylamidgelelektrophorese und Western Blot

#### 3.5.22.4. SDS-PAGE

Proteine solubilisierter Mikrosomen oder aus Co-IP-Ansätzen wurden zunächst mit 0,25 Vol. 5x Lämmli (1,5 M Tris, pH 6,8 ml; 0,5 M Bromphenolblau 2 ml; Glycerol 20 ml; SDS 2g;  $\beta$ -Mercaptoethanol 20 ml) denaturiert (10 min, 55°C). Anschließend wurden die Proben (gleiche Volumina), zusammen mit 3  $\mu$ l Proteinmarker (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder) auf ein 12%-iges SDS-Gel in Laufpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS, pH 8,3) aufgetragen. Zur Auftrennung der Proteine wurde eine Spannung von 130V bei 48 mA angelegt. Es wurde darauf geachtet, dass die Lauffront nicht verloren ging, damit auftretende Degradationsprodukte auch detektiert werden konnten.

#### 3.5.22.5. Western Blot

Nach erfolgter Elektrophorese wurden die Proteingele für 15 min in Western-Transfer-Puffer (25 mM Tris, 192 mM Glycine, 10% Methanol, pH 8,3) equilibriert. Der Transfer erfolgte mittels *semi dry western blot*. Dafür wurde zwischen jeweils zwei Stapel Whatman-Papier das Trenngel auf eine Nitrozellulosemembran (Amersham Protran Premium 0.45 NC; GE Healthcare Life Sciences) platziert und eventuelle Luftblasen durch vorsichtiges Ausstreichen entfernt. Der Transfer erfolgte für 70 min (15V, 400 mA). Zur Überprüfung des Transfers erfolgte eine Ponceau-Färbung (Sigma). Die Membran wurde anschließend für mind. 1 h (RT) in TBST (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,3 % Tween-20, pH 7,6) +5% Milchpulver inkubiert. Die Behandlung mit dem primären Antikörper (siehe Abschnitt 3.3) erfolgte ebenfalls für 1 h bei RT. Nach mehrmaligen Waschen mit TBST (3x 15 min, besser häufigerer Wechsel des Waschpuffers) wurde die Membran für mind. 1 h bei RT, oder  $\bar{u}$ N in sekundärer Antikörperlösung (siehe Abschnitt 3.3) bei 4°C inkubiert. Nach erneutem Waschen der Membran erfolgte die Detektion. Dafür wurden die Komponenten des Clarity Western ECL Substrates im Verhältnis 1:1 gemischt und auf der Membran verteilt. Die Detektion selbst erfolgt im ImageQuant LAS 4000.

### 3.5.23. Konfokale Mikroskopie

Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie wurde am FluoView™1000 (FV1000) mit angeschlossenen inversen IX81-Mikroskop von Olympus durchgeführt. FRET-FLIM-Analysen wurden von Verena Kriechbaumer (Oxford Brookes University) entsprechend Kriechbaumer

*et al.* (2015) durchgeführt. Nach Einrichtung der *Imaging Unit* (CALM) an der TU-München wurden einige FRET-FLIM-Studien am FluoView™3000 (FV3000) wiederholt und überprüft (siehe Abschnitt 4.1.4). Die Anregungs- und Emissionswellenlängen sind in Tabelle 3.18 zusammengefasst.

**Tabelle 3.18 Anregungs- und Emissionsspektren der verwendeten Fluorophore.**

In Lokalisationsstudien, FRET- und FRET-FLIM-Analysen wurden die Fluorophorpaare CFP/YFP bzw. GFP/RFP verwendet. Die Analyse erfolgte am FV1000 von Olympus. Aufgelistet sind die entsprechenden Anregungs- und Emissionswellenlängen.

| Fluorophore | Anregung [nm] | Emission [nm] |
|-------------|---------------|---------------|
| CFP         | 405           | 480-520       |
| GFP         | 488           | 500-550       |
| YFP         | 488           | 520-580       |
| RFP         | 561           | 570-630       |

### 3.6. Internetressourcen und Datenbanken

Folgende Online-Datenbanken und Programme wurden in Laufe dieser Arbeit genutzt:

**Tabelle 3.19 verwendete Programme und Datenbanken.**

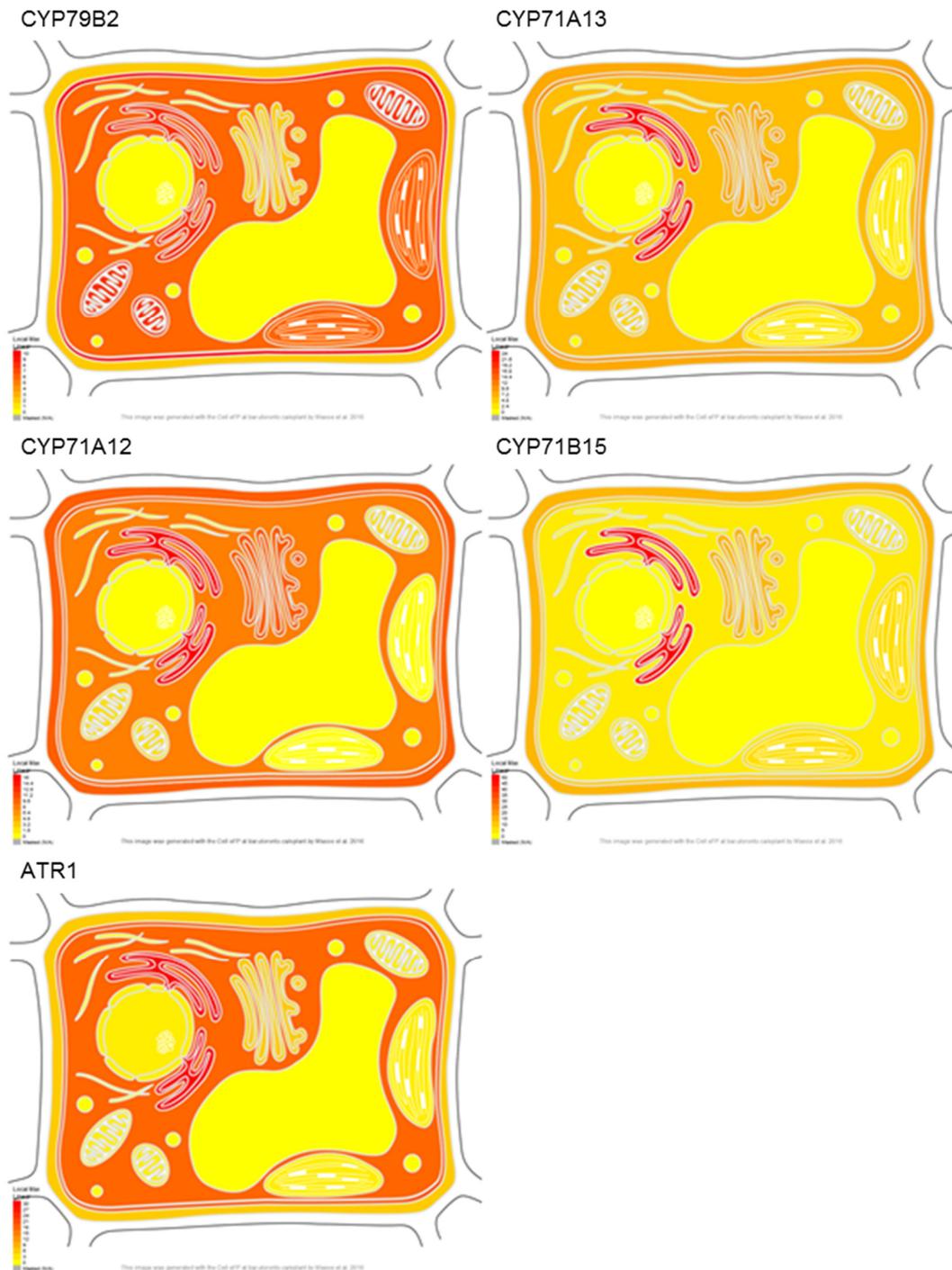
| Programm  | Quelle  |
|---|---|
| NCBI - National Center for Biotechnology Information            | <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>   |
| UniProt   | <a href="http://www.uniprot.org/">http://www.uniprot.org/</a>   |
| TAIR - The Arabidopsis Information Resource                     | <a href="https://www.arabidopsis.org/">https://www.arabidopsis.org/</a>   |
| ePlant  | <a href="http://bar.utoronto.ca/eplant/">http://bar.utoronto.ca/eplant/</a>   |
| eFP Browser   | <a href="http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi">http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi</a>                                       |
| Primer3plus   | <a href="http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi">http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi</a> |
| Gentle, v1.9.4  | <a href="http://gentle.magnusmanske.de/">http://gentle.magnusmanske.de/</a>   |
| CYPedia - Cytochrome P450 Expression Database using Arabidopsis | <a href="http://www-ibmp.u-strasbg.fr/~CYPedia/">http://www-ibmp.u-strasbg.fr/~CYPedia/</a>   |
| ATTED-II  | <a href="http://atted.jp/">http://atted.jp/</a>   |
| STRING  | <a href="https://string-db.org/cgi/network.pl?taskId=GzCs0bv0lqQf">https://string-db.org/cgi/network.pl?taskId=GzCs0bv0lqQf</a>                 |
| MapMan  | <a href="https://omictools.com/mapman-tool">https://omictools.com/mapman-tool</a>   |
| GraphPad PrismGraph   | <a href="https://www.graphpad.com/">https://www.graphpad.com/</a>   |

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Metabolonbildung von Enzymen der Camalexinbiosynthese in *A. thaliana*

#### 4.1.1. Lokalisationsstudien in *N. benthamiana*

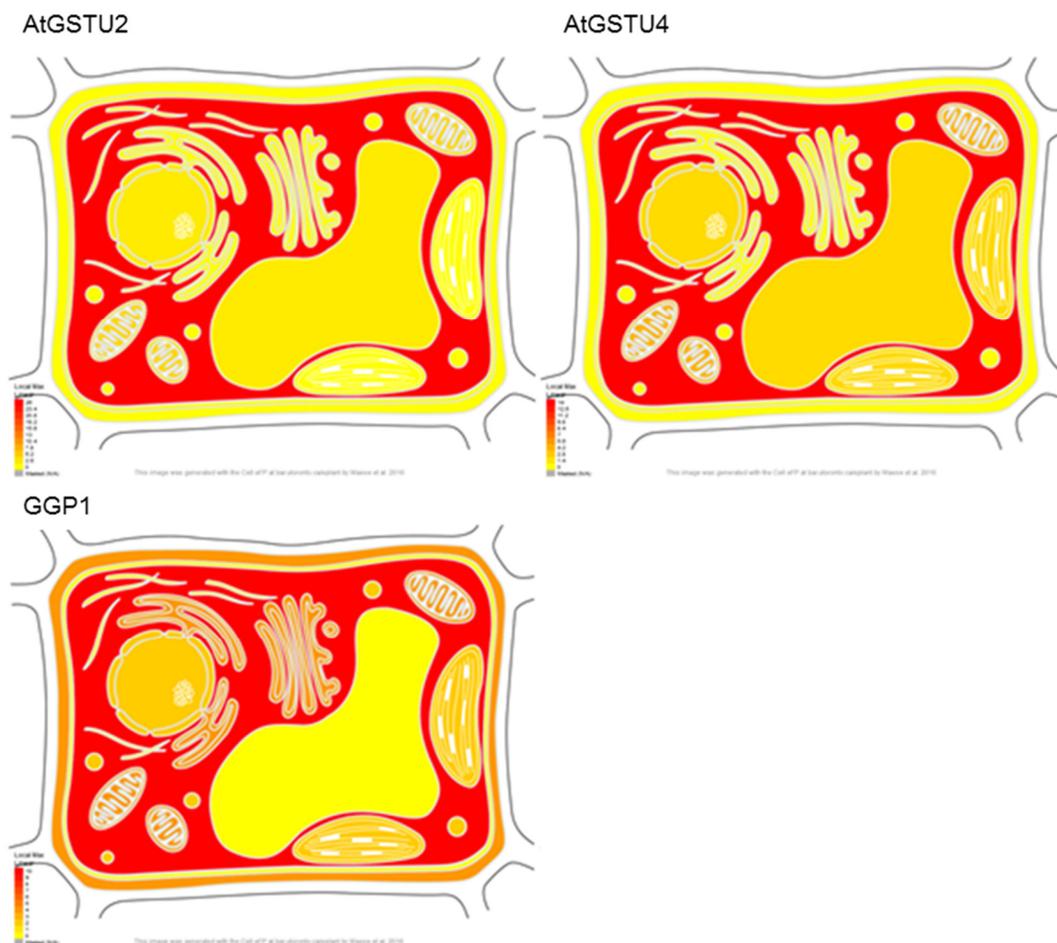
Für eine Interaktion zweier Proteine ist deren Kolo­kalisierung unabdingbar. Deshalb wurde zunächst die Lokalisation der Camalexin-spezifischen Enzyme aus *A. thaliana* genauer charakterisiert. In Abbildung 4.1 ist die *in silico* Analyse der Expressionsorte der untersuchten Proteine dargestellt. Die Teilabbildungen stammen von der Online-Plattform *eplant* (<https://bar.utoronto.ca/eplant/>, 21.05.2017, (Tanz *et al.*, 2013)). Zellkompartimente, in denen das entsprechende Protein akkumuliert vorliegt, wurden in rot eingefärbt. Bereiche, in denen das entsprechende Protein nicht nachgewiesen werden konnte, sind in gelb abgebildet. Die Farbgebung ist unabhängig von der absoluten Proteinkonzentration. Generell wurde für CYP79B2, CYP71A12, CYP71A13 und CYP71B15 eine starke Lokalisation am ER und in der Plasmamembran vorhergesagt. Auffällig war weiterhin, dass CYP71A13 und CYP71B15 eine stringen­tere Lokalisation aufzuweisen schienen als CYP79B2. CYP79B2 und auch CYP71A12 waren laut dieser Plattform ubiquitär in der Zelle vorhanden. Für die Arabidopsis-P450-Reduktase 1 (ATR1) als möglicher Elektronendonator für die an der Camalexinbiosynthese beteiligten CYPs, wurde ebenfalls eine starke Expression am ER prog­nostiziert. Aber auch ein Vorkommen in der Plasmamembran und im Cytosol wurde für das Protein vorhergesagt.



**Abbildung 4.1 Vorhergesagte Lokalisation Camalexin-spezifischer Enzyme.**

Die zelluläre Lokalisation der an der Camalexinbiosynthese beteiligten Enzyme wurde *in silico* über die Plattform *eplant* analysiert. Rot eingefärbte Bereiche zeigen eine hohe Expressionsrate an, in gelben Bereichen wurde das entsprechende Protein nicht gefunden. Alle vier CYPs (CYP79B2, CYP71A12, CYP71A13 und CYP71B15) wiesen, entsprechend der Datenbank, eine Plasma- und ER-Membran Lokalisation auf. Je nach Enzym konnte auch eine Expression in Plastiden oder im Cytosol festgestellt werden. Atr1 war am stärksten im ER vertreten. Keines der Enzyme wurde im Kern oder in der Vakuole detektiert. Die schwächste Expressionsrate wies CYP79B2 auf. (entsprechend Tanz *et al.* (2013))

Im weiteren Verlauf der Studie wurden weitere potentielle Camalexin-spezifische Enzyme in die Analysen integriert. Für GGP1 wurde bereits eine Beteiligung an der Camalexinbiosynthese gezeigt (Geu-Flores *et al.*, 2011). AtGSTU2 und AtGSTU4 wurden in eigenen Studien als Kandidaten für den Glutathionylierungsschritt identifiziert (siehe Abschnitt 4.2) und wurden anschließend in Interaktionsstudien inkludiert und näher charakterisiert. Für AtGSTU2 und AtGSTU4 wurde hauptsächlich eine cytosolische Lokalisation prognostiziert. GGP1 schien schwächer exprimiert zu sein als die AtGSTs, wies entsprechend der Online-Plattform allerdings ebenfalls eine vorrangig cytosolische Lokalisation auf.

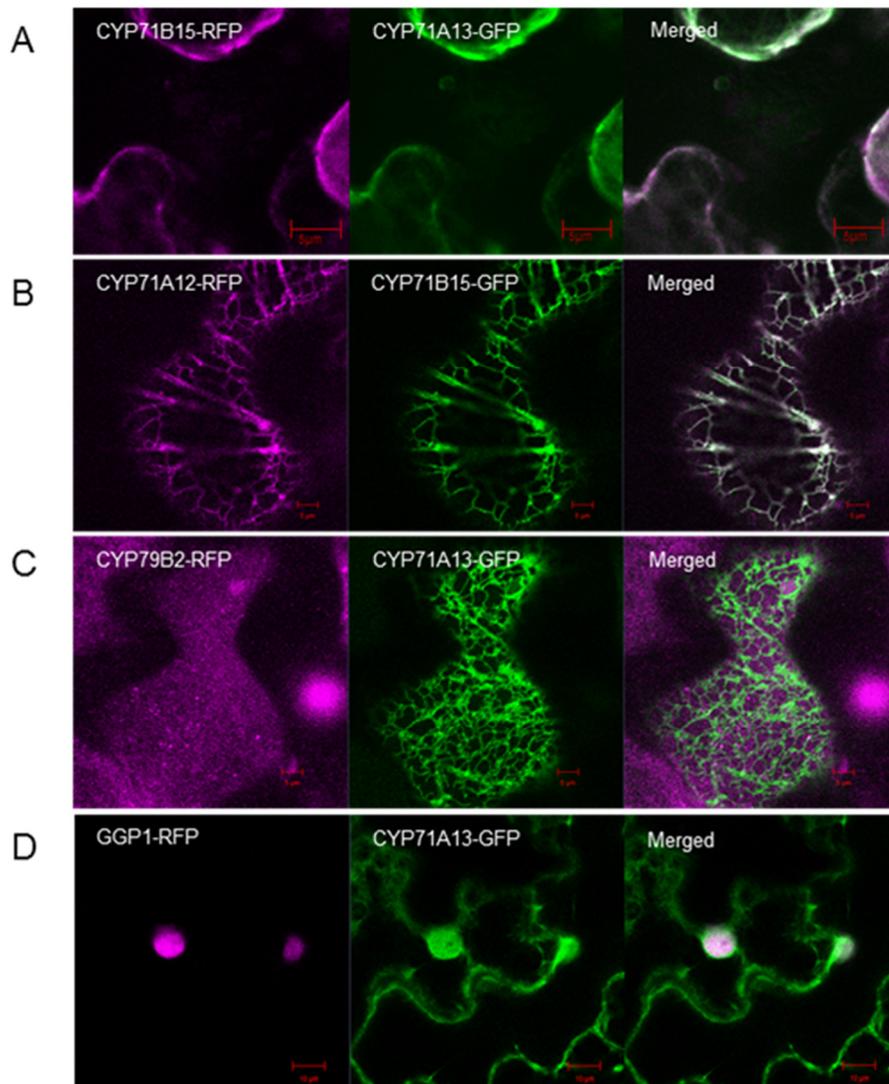


**Abbildung 4.2 Analyse der Lokalisation potentieller Camalexin-spezifischer Enzyme.**

Entsprechend Abbildung 4.1 wurde das Expressionsmuster von GGP1, AtGSTU2 und AtGSTU4 untersucht. GGP1, AtGSTU2 und AtGSTU4 wurden entsprechend der Plattform *epPlant* am häufigsten im Cytosol detektiert. Für GGP1 wurde im Gegensatz zu den AtGSTs auch eine Lokalisation am ER, in den Mitochondrien und in Plastiden vorhergesagt. (nach Tanz *et al.* (2013))

Die Plattform *epPlant* vereint experimentell dokumentierte und bioinformatisch vorhergesagte Lokalisationen von Proteinen in der Zelle. Um die tatsächliche Verteilung in der pflanzlichen Zelle zu untersuchen und um eine für Interaktion essentielle Kolo-kalisation der oben

genannten Proteine in Pflanze zu untersuchen, wurden CYP79B2, CYP71A12, CYP71A13, CYP71B15 und GGP1 (C-terminale Fusion an GFP bzw. RFP) transient in *N. benthamiana* exprimiert und mit Hilfe konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie untersucht (siehe Abbildung 4.3). Das vorhergesagte Auftreten der Camalexin-spezifischen CYPs am ER konnte bestätigt werden (Abbildung 4.1 A-C). GGP1 zeigte neben der cytosolischen Lokalisation, auch eine Akkumulation im Zellkern (Abbildung 4.1 D).

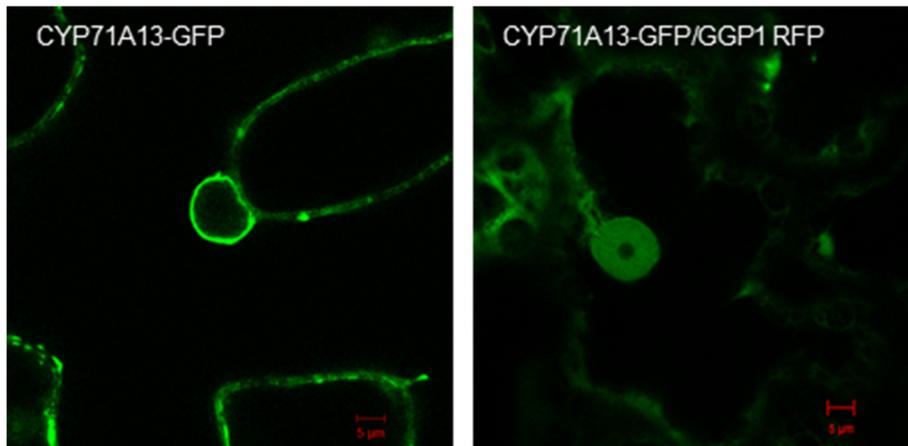


**Abbildung 4.3 Kolokalisation von Camalexin-spezifischen Enzymen im *N. benthamiana*-System.**

Jeweils zwei Fluoreszenz-markierte CYPs (A-C) oder CYP71A13 und GGP1 (D) wurden transient in *N. benthamiana* exprimiert. Anschließend erfolgte konfokale Mikroskopie zur Lokalisationsbestimmung. Kolokalisation konnte für CYP71B15 mit CYP71A13 (A) und CYP71A12 (B) und für CYP71A13 mit GGP1 (D) am ER detektiert werden. Für die Kombinationen CYP71A13/CYP79B2 (C) konnte keine Überlagerung festgestellt werden. Es wurden in 3 Ansätzen jeweils mind. 15 Zellen analysiert.

Eine Kolokalisation konnte für CYP71B15 mit CYP71A13 und CYP71A12 und für CYP71A13 mit GGP1 festgestellt werden. CYP79B2 zeigte nicht die gleiche Lokalisation wie CYP71A13.

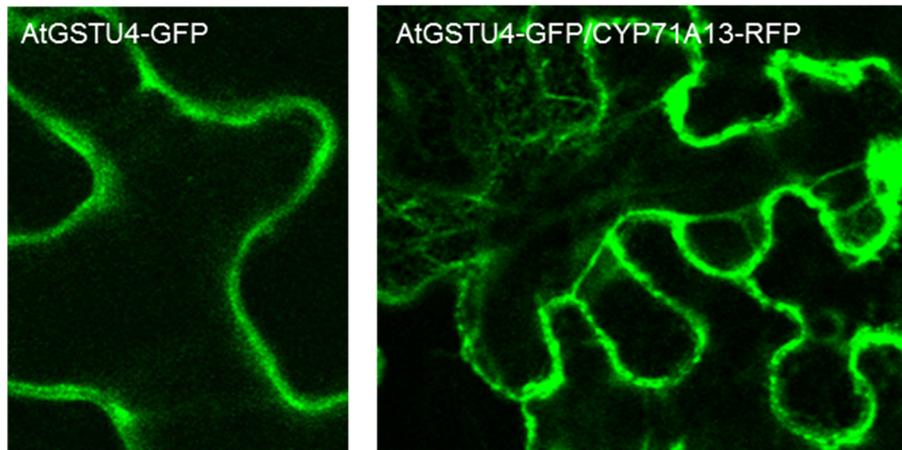
Auffällig war weiterhin, dass CYP79B2 nur sehr schwach exprimiert wurde und hohe Laserintensitäten nötig waren, um ein ausreichend starkes Signal detektieren zu können. Auch zeigte sich eine veränderte Lokalisation von CYP71A13 bei gleichzeitiger Expression von GGP1. In Abbildung 4.4 ist zu sehen, dass CYP71A13 bei Koexpression von GGP1 sowohl am ER als auch im Zellkern nachweisbar war. Dieses Phänomen konnte in ca. 80% aller untersuchten Zellen gezeigt werden.



**Abbildung 4.4** Veränderte Lokalisation von CYP71A13 bei Anwesenheit von GGP1.

Während verschiedener konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie-Analysen zeigte sich immer eine Lokalisation von CYP71A13 an der ER-Membran (links). Durch Koexpression von GGP1 veränderte sich dieses Schema. CYP71A13 konnte sowohl am ER als auch im Zellkern nachgewiesen werden (rechts). Analysiert wurden in drei Wiederholungen mind. 15 Zellen. Mehr als 80% der untersuchten Zellen wiesen die veränderte Lokalisation auf.

Auch AtGSTU4 wies bei Anwesenheit von CYP71A13 eine veränderte Lokalisation auf. Wurde das Protein einzeln in *N. benthamiana* exprimiert zeigte sich reproduzierbar eine cytosolische Lokalisation (siehe Abbildung 4.5, linke Teilabbildung). Durch Koexpression von CYP71A13 wurde das Protein an die ER-Membran rekrutiert. Das charakteristische ER-Netz („Stränge“) wurde sichtbar (siehe Abbildung 4.5, rechte Teilabbildung).



**Abbildung 4.5 Rekrutierung von AtGSTU4 an der ER-Membran.**

AtGSTU4-GFP wurde einzeln (links) und in Kombination mit CYP71A13-RFP (rechts) in *N. benthamiana* exprimiert. Mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie wurde reproduzierbar eine Rekrutierung von AtGSTU4 vom Cytosol an die ER-Membran beobachtet. Analysiert wurden 4 Wiederholungen mit mind. 20 Zellen.

Da für die meisten Camalexin-spezifischen Enzyme eine Kolokalisation gezeigt werden konnte, sollte im Folgenden eine potentielle Interaktion der Proteine, mittels *Yeast two-Hybrid*, FRET und Co-IP, untersucht werden.

#### 4.1.2. *Saccharomyces cerevisiae* als *in vivo* System zum Nachweis von Protein-Protein Interaktionen

##### 4.1.2.1. Ungerichteter *Yeast two-Hybrid*

In einem ersten Ansatz wurde versucht, potentielle Interaktionspartner von CYP71A12, CYP71A13 und CYP71B15 mit Hilfe der Hochdurchsatz-*Yeast two-Hybrid*-Methode zu ermitteln (Walhout und Vidal, 2001).

Nach Generierung der pDEST-DB Konstrukte für alle drei P450-Enzyme wurden die Plasmide in den *S. cerevisiae* Stamm Y8930 (*MAT α*) transformiert und gegen eine Bibliothek von ca. 19000 AD-Konstrukten (Y8800, *MATa*) getestet (Arabidopsis Interactome Mapping, 2011).

Entsprechend der Arbeit von Dreze *et al.* (2010) wurde der hier durchgeführte *Yeast two-Hybrid* Test in drei Phasen unterteilt: Primärscreen, sekundäre Phänotypisierung und Verifizierung potentieller Interaktionspartner.

Im Primärscreen wurden Hefen, die DB-CYP71A12, DB-CYP71A13 oder DB-CYP71B15 enthalten, jeweils mit 96 Pools mit je 188 AD-Konstrukten auf YEPD Platten gepaart und anschließend auf Selektionsplatten gestempelt. Für DB-CYP71A13 ist dies exemplarisch in

Abbildung 4.6 dargestellt. Am unteren Ende der Platte wurden jeweils sechs Kontrollen aufgetropft, mit deren Hilfe die Qualität des Experimentes evaluiert werden konnte (siehe Tabelle 4.1). So würde zum Beispiel Wachstum der Kontrolle 1 auf Selektivnährmedium unspezifisches Hefewachstum anzeigen und auf Kontaminationen hinweisen. Über die Wachstumsstärke der Kontrollen 3 bis 5 lassen sich später Rückschlüsse auf die Interaktionsstärke zweier Proteine ziehen. Die Kontrollen 2 und 6 dienten zur Überprüfung von Autoaktivatoren auf Cycloheximid (CHX) (Kaufer *et al.*, 1983).

**Tabelle 4.1 Kontrollen zur Evaluierung von Interaktionen im *Yeast two-Hybrid*.**

An jedem Schritt des Experiments wurden die aufgeführten Kontrollen mitgeführt, um sowohl auf Autoaktivität der Konstrukte zu testen als auch die Interaktionsstärke einschätzen zu können. Bereitgestellt wurden die Konstrukte dankenswerter Weise von der AG Falter-Braun (Dreze *et al.*, 2010).

|                    | <b>Plasmid Kombinationen</b>        | <b>Protein</b>  | <b>Interaktionsstärke</b>           |
|--------------------|-------------------------------------|---|-------------------------------------|
| <b>Kontrolle 1</b> | pDEST-AD<br>pDEST-DB                | Kein Insert<br>Kein Insert                            | Keine Interaktion, Hintergrund      |
| <b>Kontrolle 2</b> | pDEST-AD-E2F1<br>pDEST-DB-CYH2-pRB  | Humanes E2F1, aa 342–437<br>Humanes pRB, aa 302–928   | Schwach (Kontrolle für CHX Platten) |
| <b>Kontrolle 3</b> | pDEST-AD-Jun<br>pDEST-DB-Fos        | Maus Jun, aa 250–325<br>Ratte Fos, aa 132–211         | Moderat                             |
| <b>Kontrolle 4</b> | pDEST-AD<br>pDEST-DB-Gal4           | Kein Insert<br>Hefe Gal4, aa 1–881                    | Sehr stark                          |
| <b>Kontrolle 5</b> | pDEST-AD-dE2F1<br>pDEST-DB-dDP      | Drosophila E2F, aa 225–433<br>Drosophila DP, aa 1–377 | Stark                               |
| <b>Kontrolle 6</b> | pDEST-AD-CYH2-dE2F1<br>pDEST-DB-dDP | Drosophila E2F, aa 225–433<br>Drosophila DP, aa 1–377 | Stark (Kontrolle für CHX Platten)   |

Wie in Abbildung 4.6 zu erkennen ist, konnten vier Kolonien auf Sc-Leu-Trp-His+1mM 3AT Medium wachsen. Folglich scheint CYP71A13 mit mindestens vier Proteinen aus der Bibliothek von AD-Konstrukten interagieren zu können. Da ein *spot* einem Pool von 188 Konstrukten entspricht, besteht die Möglichkeit, dass CYP71A13 mit mehreren Proteinen dieses Pools in Kontakt steht. Um alle Interaktionen zu erfassen, wurden von großen Kolonien bis zu drei Stichproben entnommen und weiter untersucht (siehe Pfeile).



**Abbildung 4.6** Exemplarische Abbildung des Primärscreenings für CYP71A13.

Nach erfolgtem *Mating* der AD-pools (Stamm Y8800, MAT $\alpha$ ) mit DB-CYP71A13 (Stamm 8930, MAT $\alpha$ ) wurden die diploiden Hefen auf Selektionsplatten Sc-Leu-Trp-His+1mM 3AT gestempelt und auf Wachstum überprüft. Je nach Koloniegröße wurden bis zu 3 Proben isoliert, verifiziert und sequenziert. Erneut wurden die sechs Kontrollen mit bekannter Interaktionsstärke mitgeführt (siehe Tabelle 4.1).

Das gleiche experimentelle Vorgehen wurde für CYP71A12 und CYP71B15 angewandt. Die zugehörigen CHX-Platten wiesen kein Wachstum auf. Folglich ist keines der DB-Konstrukte autoaktiv. Für weitere Analysen wurden für DB-CYP71A12 elf, für DB-CYP71A13 sieben und für DB-CYP71B15 sechs Stichproben entnommen und erneut auf Sc-Leu-Trp angezogen. Anschließend erfolgte der zweite Schritt des ungerichteten *Yeast two-Hybrids* – die sekundäre Phänotypisierung. Hierfür wurden alle Kolonien auf vier verschiedene Selektionsplatten gestempelt (Sc-Leu-Trp-His+1mM 3AT, Sc-Leu-Trp-His+1mM 3AT+ 1mg/l CHX, Sc-Leu-Trp-Ade und Sc-Leu-Trp-Ade+ 1mg/l CHX) und auf Wachstum analysiert. Erneut dienen Platten mit CHX zur Überprüfung auf Autoaktivität. Anzumerken ist, dass Selektion auf Adenin-Prototrophie stringenter ist als auf Histidin-Prototrophie. Im anschließenden *Scoring* wurde das Wachstum jeder Kolonie auf allen vier Platten analysiert und bewertet. Zehn der 23 Hefekolonien waren in der Lage sowohl auf -His+1mM 3AT als auch auf -Ade Platten zu wachsen. Dies deutet auf starke Interaktion der enthaltenen Proteine hin. 13 der 23 Hefen wuchsen lediglich auf -His+1mM 3AT Platten und enthielten folglich schwächere Interaktionspartner (siehe Tabelle 4.2). Da kein Wachstum auf CHX-Platten beobachtet werden konnte, konnte Autoaktivität einzelner Konstrukte ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt).

**Tabelle 4.2 Scoring des Hefewachstums.**

Nach erfolgreichem Transfers der Hefekolonien auf vier verschiedene Selektionsplatten (Sc-Leu-Trp-His+1mM 3AT, Sc-Leu-Trp-His+1mM 3AT+ 1mg/l CHX, Sc-Leu-Trp-Ade und Sc-Leu-Trp-Ade+ 1mg/l CHX) erfolgte die Evaluierung des Wachstums. Kolonien die sowohl Adenin- als auch Histidin-Prototrophie zeigten und kein Wachstum auf den CHX-Platten aufwiesen sind gelb markiert. Alle Kolonien die nur auf einem Selektionsnährmedium wachsen konnten und kein Wachstum auf CHX-Platten zeigten sind rot markiert (Dreze *et al.*, 2010). N.a. gibt an, dass kein Wachstum detektiert werden konnte.

|   | 1          | 2 | 3          | 4 | 5          | 6 | 7           | 8 | 9           | 10 | 11          | 12 |
|---|------------|---|------------|---|------------|---|-------------|---|-------------|----|-------------|----|
| A | CYP71A12-1 |   | CYP71A12-2 |   | CYP71A12-3 |   | CYP71A12-4  |   | CYP71A12-5  |    | CYP71A12-6  |    |
| B |            |   |            |   |            |   |             |   |             |    |             |    |
| C | CYP71A12-7 |   | CYP71A12-8 |   | CYP71A12-9 |   | CYP71A12-10 |   | CYP71A12-11 |    | CYP71A12-12 |    |
| D |            |   |            |   |            |   |             |   |             |    |             |    |
| E | CYP71A13-2 |   | CYP71A13-3 |   | CYP71A13-4 |   | CYP71A13-5  |   | CYP71A13-6  |    | CYP71A13-7  |    |
| F |            |   |            |   |            |   |             |   |             |    |             |    |
| G | CYP71B15-1 |   | n.a.       |   | CYP71B15-2 |   | CYP71B15-3  |   | CYP71B15-4  |    | CYP71B15-5  |    |
| H |            |   |            |   |            |   |             |   |             |    |             |    |

Um die Interaktionspartner zu identifizieren wurden die in Tabelle 4.2 gelb markierten Hefen lysiert, die AD-Konstrukte amplifiziert und anschließend sequenziert. In Tabelle 4.3 sind die Sequenzierungsergebnisse aufgelistet. CYP71A12 zeigte bei der sekundären Phänotypisierung im ungerichteten *Yeast two-Hybrid* eine Interaktion mit dem Magnesiumtransporter 6, der Nicotinsäure Phosphoribosyltransferase 2 und SUN1 Domäne. CYP71A13 zeigte ebenfalls Interaktion mit der Nicotinsäure Phosphoribosyltransferase 2. Weiterhin konnten die kurze Kette der Ribulose-1,5-bisphosphate Carboxylase und der Transkriptionsfaktor TCP14 als potentielle Interaktionspartner identifiziert werden. Für CYP71B15 konnte, wie auch schon für CYP71A12 und CYP71A13, die Nicotinsäure Phosphoribosyltransferase 2 als möglicher Interakteur bestimmt werden.

**Tabelle 4.3 Sequenzierung der identifizierten Interaktionspartner von CYP71A12, CYP71A13 und CYP71B15 im ungerichteten *Yeast two-Hybrid*.**

Aufgelistet sind die sequenzierten AD-Konstrukte, die nach erfolgter sekundären Phänotypisierung eine Interaktion mit den getesteten P450-Enzymen gezeigt haben

| DB-Konstrukt | Ath Nummer AD-X | Ath Annotierung AD-X                                  |
|--------------|-----------------|---|
| CYP71A12-1   | At2G23420       | nicotinate phosphoribosyltransferase 2                |
| CYP71A12-3   | At3G58970       | Magnesiumtransporter 6                                |
| CYP71A12-4   | At5G04990       | SAD1/UNC-84 DOMAIN PROTEIN 1                          |
| CYP71A12-5   | At5G04990       | SAD1/UNC-84 DOMAIN PROTEIN 1                          |
| CYP71A12-6   | At5G04990       | SAD1/UNC-84 DOMAIN PROTEIN 1                          |
| CYP71A12-7   | At5G04990       | SAD1/UNC-84 DOMAIN PROTEIN 1                          |
| CYP71A13-1   | At2G23420       | nicotinate phosphoribosyltransferase 2                |
| CYP71A13-2   | At5G38430       | Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase, kurze Kette 1B |
| CYP71A13-5   | At3G47620       | Transkriptionsfaktor TCP14                            |

CYP71B15-1

At2G23420

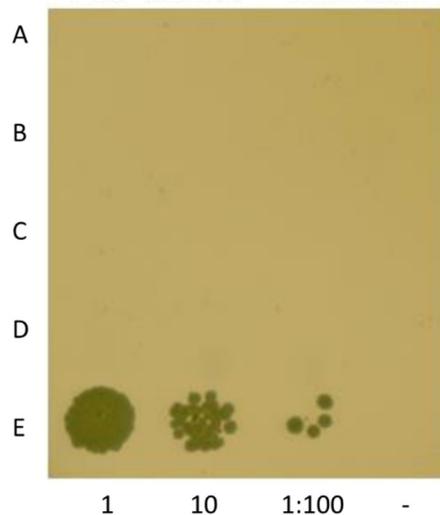
nicotinate phosphoribosyltransferase 2

---

Um falsch positive Interaktionen zu eliminieren, erfolgte im letzten Schritt des Experimentes eine vierfache Verifizierung. Zeigte sich in mindestens drei von vier Ansätzen ein positives Wachstum auf den Selektionsplatten und nie ein Wachstum auf den CHX-Platten, galt das Interaktionspaar als bestätigt. Keine der zuvor ermittelten Interaktionspaare konnte in diesem Schritt verifiziert werden (Daten nicht gezeigt).

#### 4.1.2.2. Gerichteter *Yeast two-Hybrid*

Zusätzlich zum ungerichteten *Yeast two-Hybrid* wurde ein gerichteter *Yeast two-Hybrid* durchgeführt. Entsprechend dem Matchmaker® Gold *Yeast two-Hybrid* System von Clontech wurden pBRIDGE™ (BD-X) und pGAD424 (AD-X) Konstrukte von CYP71A12, CYP71A13 und CYP71B15 und CYP79B2 generiert und in den Hefestamm AH109 transformiert (siehe Tabelle 7.3). Anschließend wurde auf Histidin-Prototrophie selektiert. Um eine detailliertere Aussage über die Interaktionsstärke treffen zu können, wurden drei verschiedene Verdünnungsstufen untersucht (500 Zellen/10µl, 50 Zellen/10µl und 5 Zellen/10µl) und mit der Wachstumsstärke der Positivkontrolle BD-PP2CA/AD-RCAR1 verglichen (bereitgestellt von Moritz Ruschhaupt, Lehrstuhl für Botanik, TUM). Um mögliche Autoaktivitäten der pBRIDGE™ Konstrukte auszuschließen, wurden DB-X Konstrukte in Kombination mit pGAD424 ohne Insert als Negativkontrolle mitgeführt. Wie in Abbildung 4.7 zu erkennen ist, konnte für keine Kombination von P450-Enzymen eine Interaktion im Hefesystem nachgewiesen werden.



**Abbildung 4.7 Nachweis putativer Proteininteraktion im gerichteten *Yeast two-Hybrid*.**

Folgende Kombinationen wurden in Dreifachbestimmung auf Interaktion in Hefe untersucht: BD-CYP71B15/AD-CYP71B15 (A), BD-CYPB15/AD-CYP71A13 (B), BD-CYP71B15/AD-CYP71A12 (C) und BD-CYP71B15/AD-CYP79B2 (D). Als Positivkontrolle wurden die interagierenden Proteine BD-PP2CA und AD-RCAR1 verwendet (bereitgestellt von Moritz Ruschhaupt, Lehrstuhl für Botanik, TUM) (E). Die Selektion erfolgte auf SD-Leu-Trp-His +1mM 3AT Medium. Aufgetropft wurden je drei Verdünnungsstufen mit je 500 Zellen/10 $\mu$ l, 50 Zellen/10 $\mu$ l und 5 Zellen/10 $\mu$ l. Autoaktivität der BD-Konstrukte wurde in der Negativkontrolle ausgeschlossen. Es konnte für keine Kombination positive Interaktion nachgewiesen werden.

#### 4.1.3. Etablierung von FRET-Mikroskopie als Mittel für Interaktionsstudien

Obwohl *Yeast two-Hybrid* als robuste und häufig verwendete Nachweismethode für Protein-Protein-Interaktionen gilt, ist dieses Verfahren wenig zuverlässig wenn es um die Detektion schwacher oder kurzlebiger Interaktionen geht. Fluoreszenzbasierte *in planta* Techniken, wie Förster Resonanzenergietransfer-Messungen (FRET) oder dem auf Fluoreszenzlebensdauer-Mikroskopie basierendem Nachweis des Förster-Resonanzenergietransfers (FLIM-FRET) eignen sich dank höherer Sensitivität und Spezifität besser für den Nachweis solcher Interaktionen.

Eine Methode der FRET-Bestimmung ist die direkte Bestimmung des Energietransfers von Donor (CFP) auf Akzeptor (YFP) - die *Sensitized emission* Messung. Um verlässliche Daten zu erhalten ist es wichtig, dass diverse Kontrollen mitgeführt werden, um Hintergrundrauschen zu filtern. So muss zum Beispiel die im Akzeptorkanal detektierte Emission des Donors (das sog. „Durchbluten“) und die Emission des Akzeptors, hervorgerufen durch die Anregung mit der Donor-Wellenlänge, korrigiert werden (van Rheenen *et al.*, 2004).

In dieser Arbeit wurden C-terminale YFP- und CFP-Fusionsproteine von verschiedenen Camalexin-spezifische Enzymen transient in *N. benthamiana* exprimiert. Zur Analyse wurden

jeweils Pflanzen mit den beiden potentiell interagierenden Proteinen benötigt und Pflanzen, welche jeweils nur das Donor-Protein oder das Akzeptor-Protein enthalten. Um die oben beschriebenen Korrekturen durchführen zu können, wurden mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie Einzelaufnahmen des Donor-Proteins, angeregt mit Donor-Wellenlänge und detektiert im Donorkanal (a); des Akzeptor-Proteins, angeregt durch Akzeptor-Wellenlänge und detektiert im Akzeptorkanal (d); des Donor-Proteins, angeregt mit Donor-Wellenlänge und detektiert im Akzeptorkanal (b) und des Akzeptorproteins, angeregt durch Donor-Wellenlänge und detektiert im Akzeptorkanal (c) gemacht (siehe Tabelle 4.4) Mit Hilfe dieser Kontrollen können Unterschiede in der Sensitivität der Fluorophore und der Laserintensitäten ausgeglichen werden und das „Durchbluten“ der Signale in den jeweilig anderen Detektionskanal eliminiert werden. Da diese Varianzen von Experiment zu Experiment schwanken können, mussten die Kontrollen für jeden Ansatz einzeln mitgeführt werden. Das Ermitteln von standardisierten Koeffizienten war nicht möglich.

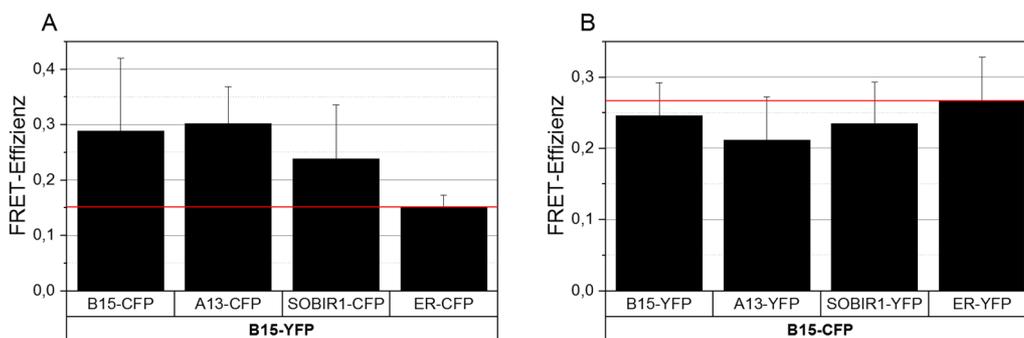
**Tabelle 4.4 Kontrollen für FRET-Analysen mittels *Sensitized emission*.**

Auf Grund der überlappenden Spektren von CFP und YFP war es nötig verschiedene Kontrollen bei der Berechnung der FRET Effizienz zu berücksichtigen (a-d). Die Kombinationen setzen sich wie folgt zusammen: DDd = Donorprotein mit Donorwellenlänge angeregt und im Donorkanal detektiert; Add = Akzeptorprotein mit Donorwellenlänge angeregt und im Donorkanal detektiert; Ada = Akzeptorprotein mit Donorwellenlänge angeregt und im Akzeptorkanal detektiert; AAa = Akzeptorprotein mit Akzeptorwellenlänge angeregt und im Akzeptorkanal detektiert; D steht hierbei für Donor und A für Akzeptor.

| Kombination  | Protein | Anregung [nm] | Detektion [nm] | Bedeutung der Kontrolle                               |
|--------------|---------|---------------|----------------|---|
| <b>a</b> DDd | X-CFP   | 458           | 458            | Maximal mögliche Anregungsstärke des Donors           |
| <b>b</b> ADd | X-CFP   | 458           | 515            | "Durchbluten" der Donoremmission in den Akzeptorkanal |
| <b>c</b> ADa | X-YFP   | 458           | 515            | "Durchbluten" der Akzeptoremmission in den Donorkanal |
| <b>d</b> AAa | X-YFP   | 515           | 515            | Maximal mögliche Anregungsstärke des Akzeptors        |

Zur Etablierung von FRET via *Sensitized emission* als Methode zum Nachweis für die Interaktion Camalexin-spezifischer Enzyme wurden zunächst die Enzymkombinationen CYP71A13/CYP71B15 und CYP71B15/CYP71B15 gewählt und analysiert, da für diese bereits Indizien einer Interaktion vorlagen (ungerichtete Co-IP und Koexpressionsdaten; Chapman (2014) und persönliche Kommunikation E. Glawischnig). Später wurde das Probenet um die Kombination CYP71B15/SOBIR1 erweitert. SOBIR1 (Suppressor of Bir1-1) interagiert mit *Receptor-like-kinases* (RLK) und fungiert in diesem Fall als Adapter-Kinase (Liebrand *et al.*, 2013, Gust und Felix, 2014). In einem ungerichteten Co-IP-Ansatz wurde SOBIR1 als Interaktionspartner von CYP71B15 gefunden (persönliche Kommunikation E. Glawischnig). Diese Interaktion sollte mittels FRET überprüft werden. Unspezifische Interaktionen zwischen

den Fluorophoren wurden mit Hilfe von ER lokalisierenden CFP und YFP Proben bestimmt und als Schwellenwert für „echten“ FRET definiert. Zusätzlich wurden zwei verschiedene Probensets generiert, um die Robustheit der ermittelten FRET-Effizienzen evaluieren zu können. Im ersten experimentellen Ansatz wurde CYP71B15-CFP als konstant gesetzt und die dazugehörigen YFP-Partner variiert (siehe Abbildung 4.8 B). Im zweiten Probenset wurde dahingegen CYP71B15-YFP festgesetzt und die CFP fusionierten Proteine wurden verändert (siehe Abbildung 4.8 A). Jedes Experiment wurde sechs Mal unabhängig voneinander durchgeführt, wobei jede Einzelmessung aus mindestens 100 Messpunkten besteht. Wie in Abbildung 4.8 zu erkennen, besteht eine deutliche Diskrepanz zwischen dem Set A (konstantes YFP-Protein) und dem Set B (konstantes CFP-Protein). Fungiert CYP71B15 als Donor (Abbildung 4.8 B) ergaben sich für alle Kombinationen FRET-Effizienzen zwischen 0,21 und 0,27. Wobei die Negativkontrolle CYP71B15-CFP/ER-YFP den höchsten Energietransfer mit einer Effizienz von 0,27 aufwies. In dieser Konstellation kann unter Verwendung der *sensitized emission*-Methode keine Interaktion postuliert werden. In Abbildung 4.8 A hingegen wurde CYP71B15 als Akzeptorprotein konstant gesetzt. Die Negativkontrolle wies lediglich eine FRET-Effizienz von 0,15 auf, wohingegen die Proteinkombinationen CYP71A13/CYP71B15, CYP71B15/CYP71B15 und SOBIR1/CYP71B15 Energietransfer-Effizienzen zwischen 0,23 und 0,31 zeigten. Es konnte ein deutlicher Anstieg der Übertragungsrate beobachtet werden und somit von einer Interaktion aller getesteten Proteine in diesem experimentellen Ansatz ausgegangen werden.



**Abbildung 4.8 Analysen der FRET-Effizienz zur Interaktionsbestimmung mittels *sensitized emission*.**

Verschiedene Fluoreszenz-markierte P450-Enzyme wurden transient in *N. benthamiana* exprimiert und mit Hilfe konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie auf FRET untersucht. Dabei wurde CYP71B15 entweder der Donor (A) oder der Akzeptor (B) konstant gesetzt und das jeweilige Partnerprotein variiert. Die untersuchten Kombinationen waren CYP71B15/CYP71B15, CYP71B15/CYP71A13 und CYP71B15/SOBIR1. Als Negativkontrolle dienten ER-assoziierte Fluorophore (ER-YFP/ER-CFP). Die Standardabweichungen ergaben sich aus sechs unabhängigen biologischen Wiederholungen, wobei jede Einzelmessung aus 100 Messpunkten bestand. In rot ist die FRET-Effizienz der Negativkontrolle dargestellt und gibt die Nachweisgrenze an.

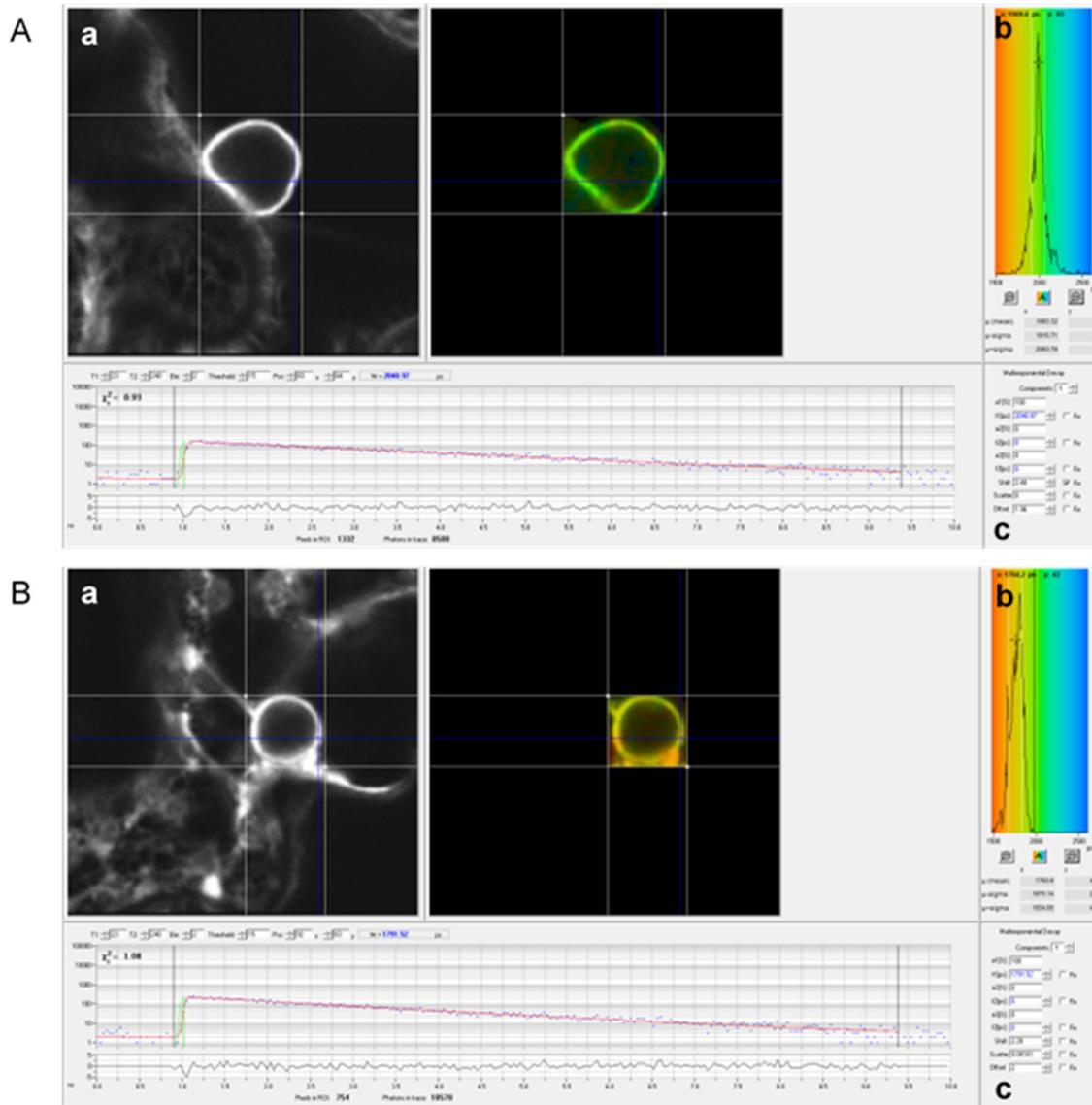
Um eine Vergleichbarkeit zu ermöglichen, wurden sämtliche Kontrollen und Messparameter für beide Ansätze (Set A und Set B) gleich gewählt. Die Diskrepanz zwischen den Sets kann folglich nicht mit Messungenauigkeiten erklärt werden. Die einzige Variable bestand in der Wahl des Donors bzw. Akzeptors. Obwohl während der Mikroskopie auf gleiche Leuchtkraft der Fluoreszenzfarbstoffe in allen Proben geachtet wurde, konnte dies nicht für alle Proteine erreicht werden. Besonders ER-CFP und ER-YFP wurden stärker exprimiert als die P450-Fusionsproteine und leuchteten um ein Vielfaches stärker als die restlichen Proben. Eine starke Expression des Donors führt allerdings zu einer artifiziellen Erhöhung der FRET-Effizienz (persönliche Kommunikation Thorsten Seidel, Universität Bielefeld). Dies würde bedeuten, dass die ermittelte FRET-Effizienz der Kombination ER-CFP/B15-YFP als falsch positiv und dieses Probenset als nicht auswertbar zu betrachten ist. Auf Grund der vielen nicht kontrollierbaren Variablen, unter anderem die Überlagerung der Spektren von CFP und YFP, ist die Bestimmung der FRET-Effizienz mit Hilfe von *sensitized emission* suboptimal für die hier durchgeführten Interaktionsstudien (van Rheenen *et al.*, 2004).

Eine weitere in dieser Arbeit verwendete Methode zur Analyse von Protein-Protein-Interaktion ist *acceptor photobleaching*. Da bei dieser Methode lediglich die Fluoreszenz des Donors gemessen wird, ist die Wahrscheinlichkeit Artefakte auf Grund spektraler Überlappungen zu generieren deutlich reduziert. In der Theorie wird das Akzeptor-Fluorophor durch hohe Strahlungsintensität zerstört und es kann kein Energieübertrag von Donor-Farbstoff auf Akzeptor-Farbstoff stattfinden. Im Falle einer Interaktion zweier Proteine könnte eine Zunahme der Strahlungsintensität des Donors detektiert werden (Wouters *et al.*, 1998). Erneut sollte die Interaktion von CYP71A13 mit CYP71B15, CYP71B15 mit SOBIR1 und CYP71B15 auf Homodimerisierung untersucht werden. Nach Etablierung der Bedingungen für einen vollständiges Bleichen von YFP ohne die Fluoreszenz von CFP zu inhibieren, wurde versucht die FRET-Effizienz zu ermitteln. Es zeigte sich, dass die Fusionsproteine eine sehr hohe Fluktuationsrate innerhalb der Zellmembran aufwiesen. Teilweise wanderten bereits während des Bleichvorgangs wieder fluoreszierende Proteine in den zu messenden ROI ein. Folglich konnte keine Aussage über positive Interaktion getroffen werden. Auch die Bestimmung der FRET-Effizienz mittels *acceptor photobleaching* ist für die zu untersuchenden Proteinkombinationen ungeeignet.

#### 4.1.4. Identifizierung potentieller Interaktionspartner mittels FLIM-FRET

Nachdem sich herausgestellt hat, dass die angewendeten FRET-Methoden für die hier zu untersuchende Fragestellung ungeeignet sind, wurde die Interaktion Camalexin-spezifischer Enzyme mittels FLIM-FRET analysiert. Dies erfolgte in Kooperation mit Verena Kriechbaumer (Oxford Brookes University). Es wurden neue Donor- (GFP) und Akzeptorkonstrukte (RFP) generiert (Karimi *et al.*, 2005). Neben den bereits zuvor getesteten Proteinen CYP71A13 und CYP71B15, wurden in diesem experimentellen Ansatz auch CYP79B2, CYP71A12 und GGP1 in die Interaktionsstudien einbezogen. Nach transienter Expression verschiedener Proteinkombinationen (siehe Abschnitt 3.5.16) in *N. benthamiana* wurde mittels konfokaler FLIM die Lebenszeit von CYP71A12-GFP, CYP71A13-GFP und CYP71B15-GFP in mindestens zwei technischen und mindestens drei biologischen Wiederholungen gemessen. Im Falle einer Interaktion wird Energie strahlungsfrei vom Donor auf den Akzeptor übertragen werden, was anhand einer verkürzten Lebensdauer des Donors (*Quenching*) nachweisbar ist (Periasamy und Clegg, 2009). Diese Verschiebung ist exemplarisch für CYP71A12-GFP und CYP71B15-RFP in Abbildung 4.9 dargestellt. Wurde CYP71A12-GFP einzeln in *N. benthamiana* exprimiert (A) hatte GFP eine Lebenszeit von  $2,1 \pm 0,01$  ns. Zu erkennen ist dies auch in Teilabbildung b. Hier wurde die Anzahl der gemessenen Photonen pro Zeiteinheit aufgetragen und mit Falschfarben hinterlegt. In Teilabbildung c ist der Laserpuls und die damit einhergehende Anregung des Fluorophors zu erkennen. Erkennbar ist auch wie die Energie über die Zeit wieder abgegeben wurde, bis das Fluorophor erneut im Ausgangszustand vorliegt. Für die Proteinkombination CYP71A12-GFP/CYP71B15-RFP wurde auf diese Weise eine GFP-Lebensdauer von  $1,9 \pm 0,04$  ns bestimmt (B). Die hier beobachtete Reduktion der Fluoreszenzlebensdauer um 0,2 ns ist ein eindeutiger Hinweis auf Protein-Protein-Interaktion (Schoberer und Botchway, 2014).

Eine Verringerung der Fluoreszenz-Lebenszeit in diesem Maßstab konnte auch für die Kombination mit umgekehrter Fluoreszenzmarkierung (CYP71B15-GFP/CYP71A12-RFP) bestätigt werden. In diesem Fall betrug die Lebensdauer der GFP-Fluoreszenz 1,8 ns, statt 2,0 ns in der Probe von CYP71B15-GFP allein (siehe Abbildung 4.10 und Tabelle 4.5)

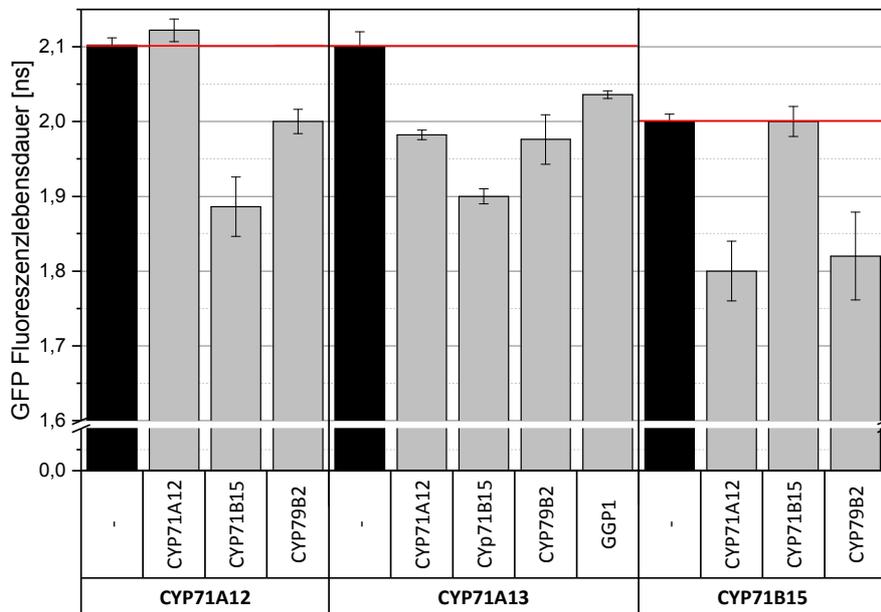


**Abbildung 4.9 Exemplarische Darstellung der Lebensdauern von CYP71A12-GFP allein (A) und in Interaktion mit CYP71B15-RFP (B).**

Mittels FLIM wurden jeweils die Lebensdauer der GFP-Fluoreszenz bestimmt. Im Falle einer Interaktion tritt ein Energieübertrag auf das Akzeptorprotein auf und die Lebenszeit des Donors ist verringert. (A) CYP71A12-GFP wurde einzeln in *N. benthamiana* exprimiert (Aa) und durch einen Laserpuls angeregt (Ac). Eine Lebensdauer von  $2,1 \pm 0,01$  ns konnte ermittelt werden (Ab). (B) Expression von CYP71A12-GFP und CYP71B15-RFP. Zu erkennen ist eine Verschiebung der Fluoreszenz-Lebensdauer in den roten Bereich (Falschfarben, Bb). Dies entspricht einer Reduzierung der Lebenszeit auf 1,9 ns. Eine Interaktion konnte bestätigt werden. Die Messungen wurden durchgeführt von Verena Kriechbaumer (Oxford Brookes University).

In Abbildung 4.10 und Tabelle 4.5 sind ebenfalls die Fluoreszenzlebensdauern weiterer getesteter Proteinkombinationen zu sehen. Eine nach Schoberer und Botchway (2014) auf Interaktion beruhende Fluoreszenzlöschung konnte für die Proteine CYP71A13-GFP/CYP71B15-RFP (1,9 ns anstatt 2,1 ns) und CYP71B15-GFP/CYP79B2 (1,8 ns statt 2,0 ns) ermittelt werden.

Eine Verringerung der GFP-Fluoreszenzlebensdauer konnte auch für CYP71A12 in Kombination mit CYP79B2-RFP beobachtet werden. Ein ähnliches Ergebnis wurde für CYP71A13-GFP mit CYP71A12, CYP79B2 und GGP1 und für CYP71B15 mit GGP1 detektiert. In diesen Fällen beträgt die Reduktion allerdings nur 0,1 ns. Ob hier auch von einer Protein-Protein-Interaktion ausgegangen werden kann, muss in weiteren Experimenten evaluiert werden. Eine Theorie ist, dass Proteine, die wie CYP71A12-GFP/CYP71B15-RFP, eine hohe Reduktion der Fluoreszenzlebensdauer zeigten, eine stärkere und konstantere Bindung eingehen, als solche die nur eine geringe Fluoreszenzlöschung aufwiesen. Für CYP71A12-GFP/CYP71A12-RFP und CYP71B15-GFP/CYP71B15-RFP konnten keine Unterschiede in der Fluoreszenzlebensdauer im Vergleich zu einzeln exprimierten Proteinen festgestellt werden (2,1 ns für CYP71A12 und 2,0 ns für CYP71B15).



**Abbildung 4.10 FRET-FLIM Analysen zur Bestimmung der Interaktion Camalexin-spezifischer Enzyme.**

Jeweils zwei Camalexin-spezifische Proteine wurden transient in *N. benthamiana* exprimiert und nach vier Tagen mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie die GFP-Fluoreszenzlebensdauer bestimmt. Als Referenz wurde die GFP-Fluoreszenzlebensdauer des Donors allein ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte von mindestens zwei biologischen und mindestens drei technischen Wiederholungen. Die rote Linie repräsentiert den Schwellenwert. Die Messungen wurden von Verena Kriechbaumer (Oxford Brookes University) durchgeführt. Bei allen Kombinationen mit GFP-Fluoreszenzlebensdauern unter diesem Schwellenwert kann von einer Interaktion ausgegangen werden.

**Tabelle 4.5 GFP-Fluoreszenzlebensdauern ermittelt durch FRET-FLIM-Analyse.**

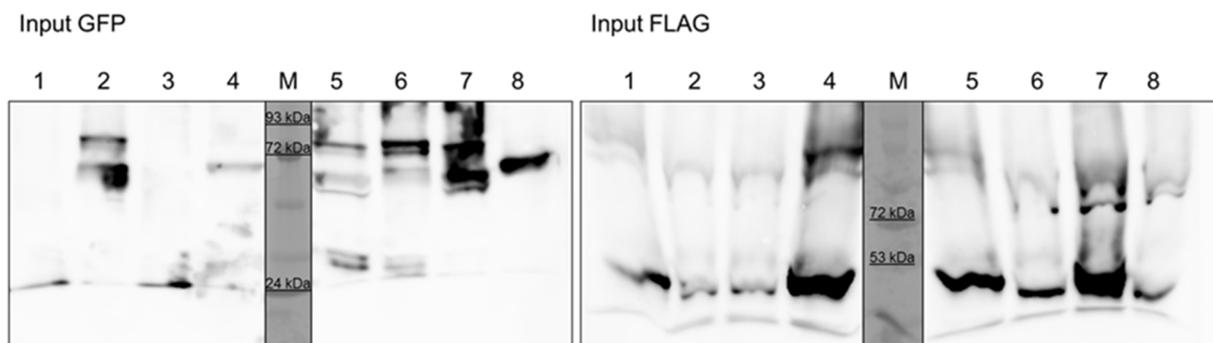
CYP71A12-GFP, CYP71A13-GFP und CYP71B15-GFP wurden einzeln oder in Kombination mit verschiedenen anderen Camalxin-spezifischen Enzymen in *N. benthamiana* exprimiert und auf ihre Donorlebenszeit untersucht. Die Standardabweichung ergab sich aus mindestens zwei biologischen und mindestens drei technischen Wiederholungen. Die Messungen wurden von Verena Kriechbaumer (Oxford Brookes University) erhoben. Bei einer Reduktion der GFP-Fluoreszenzlebensdauer von 0,2 ns kann von einer Protein-Protein-Interaktion ausgegangen werden (Schoberer und Botchway, 2014). Bei einer Abweichung von 0,1 ns wird auch eine Interaktion vermutet, die möglicherweise schwach ausgeprägt ist und temporär vorliegt.

| GFP      | RFP      | Mittelwert | SD   | $\Delta$ [ns] |
|----------|----------|------------|------|---------------|
| CYP71A12 | (-)      | 2,10       | 0,01 | 0             |
|          | CYP71A12 | 2,12       | 0,02 | 0             |
|          | CYP71B15 | 1,88       | 0,04 | 0,2           |
|          | CYP79B2  | 2,0        | 0,02 | 0,1           |
| CYP71A13 | (-)      | 2,10       | 0,02 | 0             |
|          | CYP71A12 | 1,98       | 0,01 | 0,1           |
|          | CYP71B15 | 1,90       | 0,01 | 0,2           |
|          | CYP79B2  | 1,98       | 0,03 | 0,1           |
|          | GGP1     | 2,03       | 0,01 | 0,1           |
| CYP71B15 | (-)      | 2,00       | 0,01 | 0             |
|          | CYP71A12 | 1,80       | 0,04 | 0,2           |
|          | CYP71B15 | 2,00       | 0,02 | 0             |
|          | CYP79B2  | 1,82       | 0,06 | 0,2           |
|          | GGP1     | 1,90       | 0,03 | 0,1           |

Im Verlauf der Arbeit wurde ebenfalls ein FLIM-fähiges Mikroskop (Olympus FV3000, FLIM-Einheit von PicoQuant) am Department für Pflanzenwissenschaften der TU-München eingerichtet. Für die Etablierung des Gerätes wurden FLIM-Messungen mit den Kombinationen CYP71A13-GFP/CYP71B15-RFP (Reduktion der Fluoreszenzlebensdauer von 2,13 ns auf 1,87 ns) und AtGSTU4/CYP71A13 (Reduktion der Fluoreszenzlebensdauer von 2,16 ns auf 1,83 ns) durchgeführt. Es konnten die zuvor erhaltenen Ergebnisse (siehe Abbildung 4.10 und Abbildung 4.23) bestätigt werden. Damit konnte bewiesen werden, dass die erhaltenen Daten zuverlässig und robust waren. Das verwendete Gerät schien keinen Einfluss auf durchgeführte Messungen zu haben.

## 4.1.5. Nachweis von Protein-Protein Interaktionen mittels Co-Immunpräzipitation

Im Unterschied zu FRET-FLIM-Analysen werden mittels Co-Immunpräzipitation (Co-IP) robuste und starke Interaktionen detektiert. Transiente Bindungen würden durch die Präparationsbedingungen gelöst werden. Dieser Umstand kann genutzt werden um in Kombination mit den durchgeführten FRET-FLIM-Messungen einen Überblick über die Stärke der ermittelten Interaktionen von Camalexin-spezifischen Enzymen zu generieren. Dafür wurden jeweils ein GFP/YFP- und ein FLAG-markiertes Camalexin-spezifisches Enzym in *N. benthamiana*-Blätter infiltriert, nach viertägiger Expression Mikrosomen isoliert und eine potentielle Interaktion mittels Co-IP überprüft. Verschiedene Interaktionspaare sollten analysiert werden (siehe unten). In Abbildung 4.11 ist exemplarisch gezeigt, dass die exprimierten Proteine erfolgreich in solubilisierten Mikrosomen nachgewiesen werden konnten (Input). Neben der zu erwartende Banden auf Höhe von ca. 81 kDa (~ 56 kDa CYP + 25 kDa GFP-Tag) für GFP/YFP-markierte Proteine bzw. 65 kDa (~56 kDa CYP + 9 kDa FLAG-Tag) für FLAG-markierte Proteine, wurden auch zusätzliche Banden nachgewiesen.

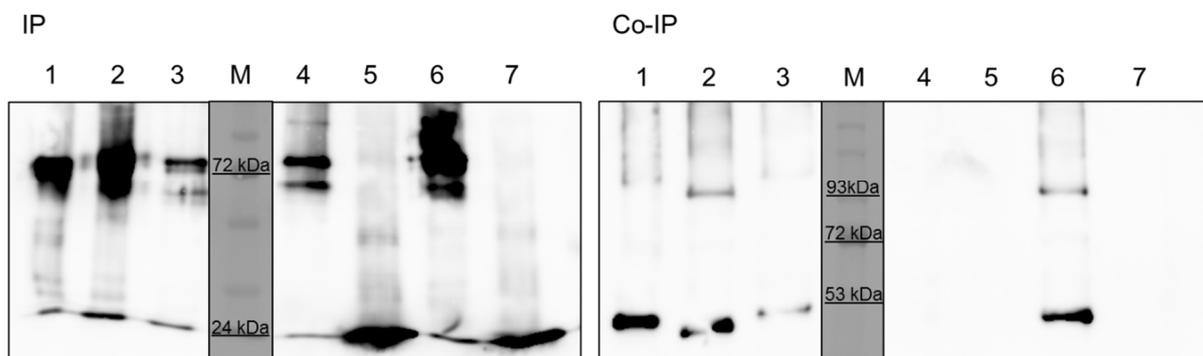


**Abbildung 4.11 Überprüfung der Expression von solubilisierten *N. benthamiana*-Mikrosomen.**

Verschiedene GFP/YFP- und FLAG-markierte CYPs wurden in *N. benthamiana* exprimiert, Mikrosomen isoliert und mittels Wester Blot auf ihr Vorhandensein überprüft. Dies ist exemplarisch, inklusive Kontrollen, für die Kombiantionen CYP71A13/CYP71B15 und CYP71A12/CYP71B15 abgebildet. Alle Proteine konnten erfolgreich in solubilisierten Mikrosomen nachgewiesen werden. 1- mGFP/CYP71A13-FLAG; 2- CYP71A12-GFP/CYP71B15-FLAG; 3- mGFP/CYP71B15-FLAG; 4- CYP73A5-GFP/CYP71A13-FLAG; 5- CYP71B15-GFP/CYP71A13-FLAG; 6- CYP71A13-GFP/CYP71B15-FLAG; 7- CYP71B15-GFP/CYP71A12-FLAG; 8- CYP73A5GFP/CYP71B15-FLAG; M- Marker

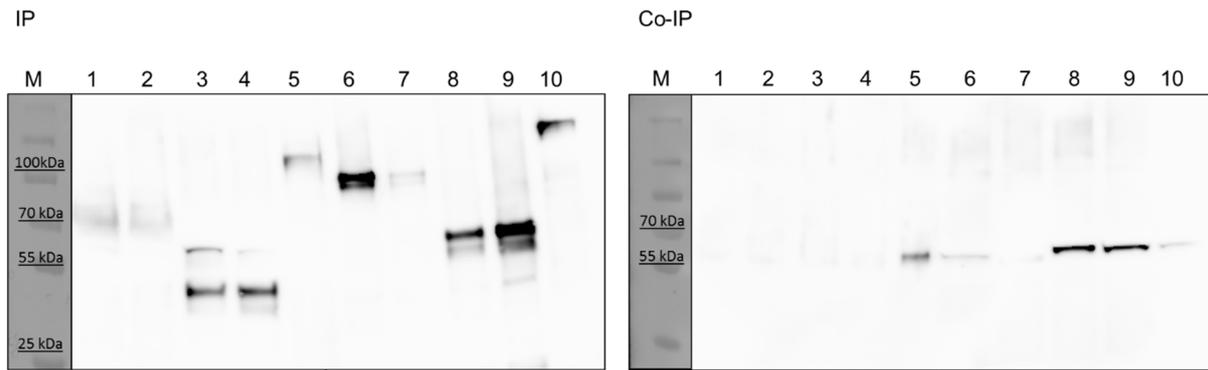
Dies kann zum einen auf Degradation der Proteine zurückgeführt werden und ist zum anderen durch posttranslationale Modifikationen erklärbar. Durch Phosphorylierungen und Glycosylierungen am Protein werden im Western Blot oftmals charakteristische Doppelbanden (bis hin zu Schmierbildung) sichtbar. (besonders auffällig im Input GFP). Auch durch Dimerisierung der Enzyme können Banden auf abweichender Höhe beschrieben werden.

Besonders die FLAG-markierten Enzyme wiesen in diesem Fall ein atypisches Laufmuster auf. Während der Durchführung der Experimente wurde deutlich, dass Camalexin-spezifische Enzyme, trotz Lagerung in Lämmli-Puffer, nicht stabil vorlagen. Oftmals waren Degradationen verschieden starker Ausprägung detektierbar. Trotzdem wurde mit den Analysen fortgefahren. Anschließend sollte eine Interaktion zwischen CYP71A13 mit CYP71B2, CYP71B15, AtGSTU4, AtGSTU2, ATR1 und GGP1, sowie zwischen CYP71B15 mit CYP71A12 und ATR1 überprüft werden. Es ist bereits bekannt, dass CYPs auch unspezifisch miteinander interagieren können (Bassard *et al.*, 2012). Um die Echtheit der in dieser Arbeit ermittelten Interaktionen evaluieren zu können, wurde deshalb CYP73A5, als Enzym der Ligninbiosynthese, in die durchgeführten Analysen integriert. Camalexin-spezifische Enzyme interagieren nicht mit CYP73A5 (siehe Abbildung 4.12; Co-IP, Spur 4). Die in diesem Ansatz gezeigten Interaktionen können folglich nicht auf zufällige Bindungseffekte zurückgeführt werden. Falsch positive Bindungen, die durch Interaktion der Fluorophore entstehen könnten, wurden durch Co-IP-Ansätze mit mGFP als Interaktionspartner ausgeschlossen. Eine echte Interaktion konnte für CYP71A13 mit CYP71B15, ATR1 und AtGSTU4 nachgewiesen werden. Auch CYP71B15 und CYP71A12 gehen eine Bindung ein (siehe Abbildung 4.12 und Abbildung 4.13).



**Abbildung 4.12 Exemplarische Co-IP von Camalexin-spezifischen Enzymen.**

Dargestellt sind IP (links) und Co-IP (rechts) von verschiedenen CYPs. Als Kontrolle für unspezifische Interaktionen wurde eine Bindung zwischen CYP71B15 und CYP73A5 untersucht. Zur Evaluierung falsch-positiver Komplexbildung auf Grund von Interaktion der verwendeten Markierungen (GFP, FLAG) wurde mGFP als putativer Interaktionspartner in die Analysen integriert. Eine Interaktion wurde für CYP71B15 mit CYP71A13 und CYP71A12 nachgewiesen. Alle Versuche wurden in dreifacher Wiederholung durchgeführt. 1- CYP71B15-GFP/CYP71A12-FLAG; 2- CYP71A13-GFP/CYP71B15-FLAG; 3- CYP71B15-GFP/CYP71A13-FLAG; 4- CYP73A5-GFP/CYP71A13-FLAG; 5- mGFP/CYP71B15-FLAG; 6- CYP71A12-GFP/CYP71B15-FLAG; 7- mGFP/CYP71A13-FLAG; M- Marker



**Abbildung 4.13 Nachweis von Protein-Protein-Interaktion von Camalexin-spezifischen Enzymen mittels Co-IP.**

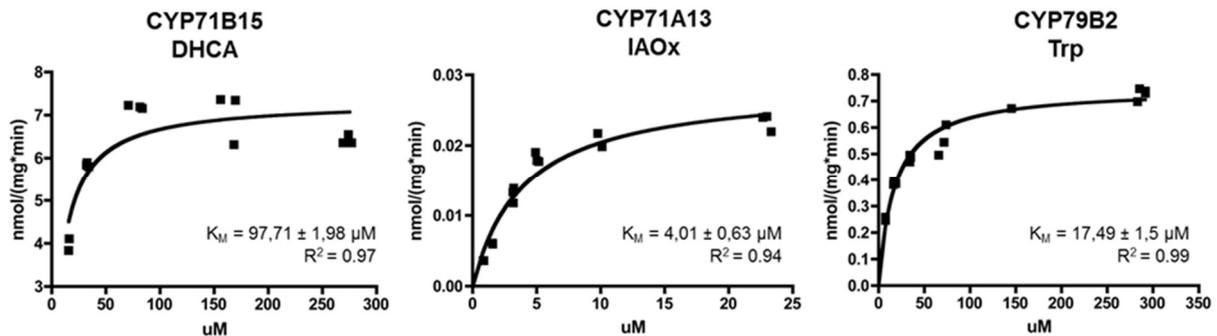
Dargestellt sind IP (links) und Co-IP (rechts) von Camalexin-spezifischen Enzymen. In den Spuren 1 bis 5 wurde der Input aufgetragen und analysiert. In den Spuren 6 bis 10 ist die dazugehörige IP bzw. Co-IP sichtbar. Die Abbildung ist repräsentativ für drei unabhängige Wiederholungen, die alle das gleiche Ergebnis aufzeigten. 1- CYP71B15-GFP/CYP71A13-FLAG; 2- CYP71B15-GFP/CYP71A12-FLAG; 3- AtGSTU4-GFP/CYP71A13-FLAG; 4- AtGSTU4-GFP/CYP71B15-FLAG; 5- ATR1-GFP/CYP71A13-FLAG; 6- CYP71B15-GFP/CYP71A13-FLAG; 7- CYP71B15-GFP/CYP71A12-FLAG; 8- AtGSTU4-GFP/CYP71A13-FLAG; 9- AtGSTU4-GFP/CYP71B15-FLAG; 10- ATR1-GFP/CYP71A13-FLAG; M- Marker

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass CYP71A13 eine starke Bindung mit CYP71B15, ATR1 und AtGSTU4 eingeht. Zusätzlich interagiert CYP71B15 mit CYP71A12. Diese Interaktionen konnten sowohl in FRET-FLIM-Messungen als auch in Co-IP-Versuchen nachgewiesen werden. Schwächere Bindungen, die ausschließlich mittels FRET-FLIM detektierbar waren, existieren zwischen CYP71A13 und CYP79B2 bzw. GGP1, zwischen CYP71B15 mit CYP71A12, CYP71A13 bzw. CYP79B2 und zwischen CYP71A12 und CYP79B2 (siehe Abbildung 4.10). Weiterhin wurden keine unspezifischen Interaktionen zwischen den Fluorophoren oder mit Camalexin-unspezifischen CYPs sichtbar.

#### 4.1.6. Analyse der Substrataffinitäten von in Interaktion stehenden Camalexin-spezifischen Enzymen

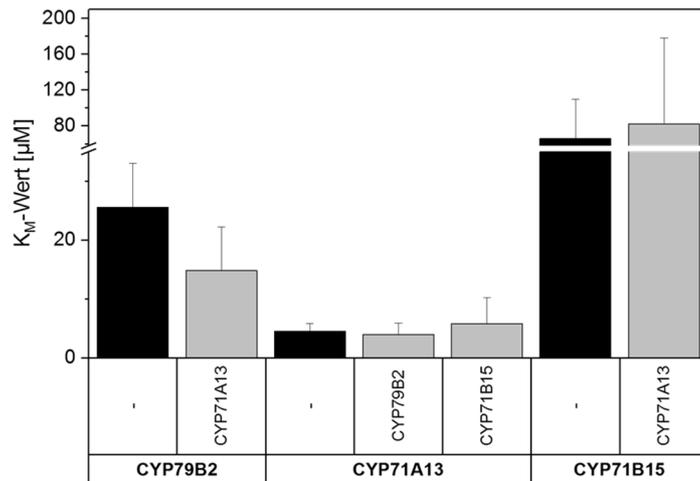
Da mittels FLIM-FRET- und Co-IP-Analysen eine Interaktion zwischen CYP79B2 und CYP71A13 sowie zwischen CYP71A13 und CYP71B15 gezeigt werden konnte, sollte im Anschluss die Frage geklärt werden, ob diese Bindung auch zu einer Veränderung der Substrataffinitäten führt. Dafür wurden jeweils *CYP71A13* zusammen mit *CYP79B2* oder *CYP71B15* in den Hefestamm BY4141, in den bereits pGREG505:*ATR1* transformiert wurde, eingebracht, exprimiert und  $K_M$ -Werte bestimmt. Zusätzlich wurde der  $K_M$ -Wert der Einzelenzyme bestimmt. Dafür wurde in Enzymtests mit angeschlossener HPLC-Analyse der

Umsatz der typischen Substrate analysiert. In Abbildung 4.14 sind exemplarisch Kinetiken von CYP71B15, CYP71A13 und CYP79B2 dargestellt. Die  $K_M$ -Wert-Bestimmungen erfolgten in mindestens dreifacher Wiederholung. Die durchschnittlichen  $K_M$ -Werte für CYP79B2 und CYP71A13 mit durchschnittlich 25  $\mu\text{M}$  bzw. 4,5  $\mu\text{M}$  entsprachen weitgehend den Literaturangaben ( $K_M^{\text{CYP79B2}} = 21 \mu\text{M}$  (Mikkelsen *et al.*, 2000b);  $K_M^{\text{CYP71A13}} = 5 \mu\text{M}$  (Müller *et al.*, 2015). CYP71B15 dahingegen setzt DHCA deutlich schlechter um als in der Literatur beschrieben ( $K_M^{\text{CYP71B15}} = 65,9 \mu\text{M}$  zu 29  $\mu\text{M}$  (Schuhegger *et al.*, 2006)).



**Abbildung 4.14 Exemplarische Darstellung der ermittelten Substratsättigungskurven für die Umsetzung von DHCA, IAOx und Tryptophan durch die entsprechenden Enzyme CYP71B15, CYP71A13 und CYP79B2.** Abgebildet ist eine repräsentative Kinetik von CYP71B15, CYP71A13 und CYP79B2. Insgesamt wurde der  $K_M$ -Wert in mind. dreifacher Wiederholung bestimmt. Analysiert wurde die Daten mit Hilfe des Programms GraphPad PrismGraph (Michaelis-Menten-Analyse). Die ermittelten durchschnittlichen  $K_M$ -Werte betragen für CYP71B15 (Umsatz von DHCA)  $66 \mu\text{M} \pm 43,7 \mu\text{M}$ ; für CYP71A13 (Umsatz von IAOx)  $4,5 \mu\text{M} \pm 1,3 \mu\text{M}$  und für CYP79B2 (Umsatz von Tryptophan)  $25 \mu\text{M} \pm 7,4 \mu\text{M}$  (Bachelorarbeit Benjamin Strickland (2017)).

Im Anschluss sollte der Einfluss eines zweiten CYPs auf die Substrataffinität genauer analysiert werden. Dazu wurde zusätzlich ein zweites Camalexin-spezifisches Enzym in Hefe koexprimiert und erneut die entsprechenden  $K_M$ -Werte ermittelt. So konnte für die Kombination CYP71A13/CYP79B2 eine Reduktion des  $K_M^{\text{CYP79B2}}$ -Wertes für das Substrat Tryptophan um 36,5% gezeigt werden. Die Affinität von CYP71B15 zu DHCA änderte sich durch Koexpression von CYP71A13 nicht. Für den  $K_M$ -Wert für CYP71A13 konnte ebenfalls in keiner Kombination eine Änderung festgestellt werden (siehe Abbildung 4.15). Generell ergaben sich zwischen den Replikaten starke Schwankungen. Die erhaltenen Ergebnisse zeigen eine Tendenz auf, signifikante Unterschiede konnten in diesem experimentellen Ansatz noch nicht nachgewiesen werden.



**Abbildung 4.15** Ermittelte  $K_M$ -Werte von CYPs einzeln und unter Anwesenheit eines Interaktionspartners.

In einem ATR1-tragendem *S. cerevisiae*-Stamm wurden CYP79B2, CYP71A13 oder CYP71B15 allein (schwarz) oder in Kombination mit einem jeweiligen Interaktionspartner (grau) exprimiert und auf eine veränderte Substrataffinität untersucht. Im Fall von CYP79B2 wurde die Tryptophan-, für CYP71A13 die IAox- und für CYP71B15 die DHCA-Affinität mittels Enzymtests und angeschlossener HPLC-Analyse untersucht. Alle Analysen wurden in mind. dreifacher Wiederholung durchgeführt. Die Ermittlung des  $K_M$ -Wertes erfolgte mit dem Programm GraphPad *PrismGraph* (Michaelis-Menten-Analyse) (Bachelorarbeit Benjamin Strickland (2017)). Eine Reduktion des  $K_M$ -Wertes war für CYP79B2 in Kombination mit CYP71A13 feststellbar. Der  $K_M$ -Wert für Tryptophan sank um ca. 36%.

## 4.2. Beteiligung von Arabidopsis-GSTs an der Camalexinbiosynthese

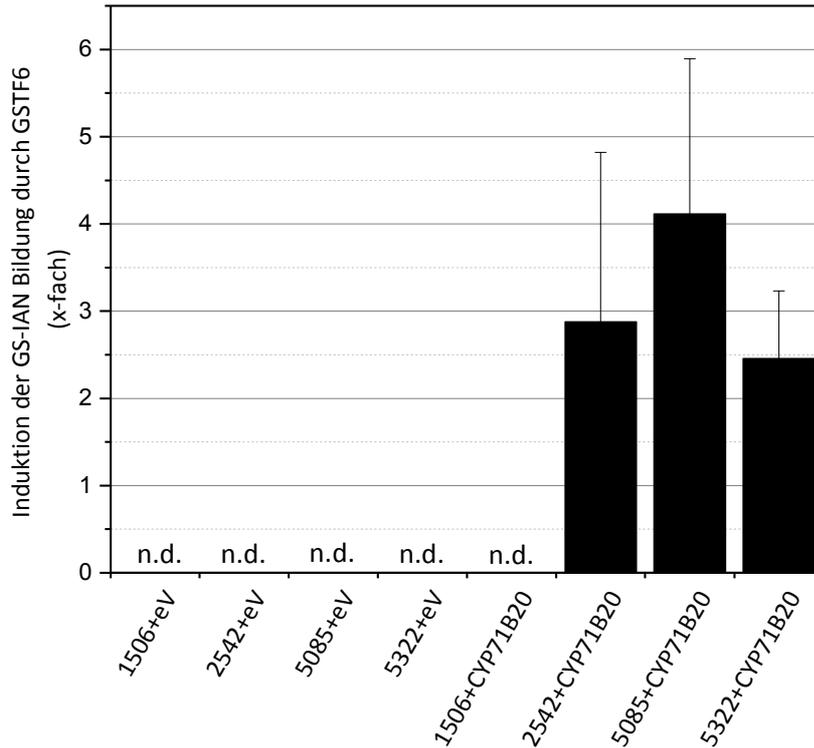
### 4.2.1. Etablierung und Optimierung des Expressionssystems *S. cerevisiae* für die Expression von AtGSTs und P450-Enzymen

Ein Schritt der Camalexinbiosynthese ist die Glutathionylierung von IAN (siehe Abschnitt 1.4.1). Ob dieser Schritt durch eine GST vermittelt wird konnte bisher noch nicht eindeutig nachgewiesen werden. Diese Hypothese zu überprüfen war ein Ziel der vorliegenden Studie. Weiterhin sollte untersucht werden, ob in *A. thaliana* eine spezifische AtGST für die Glutathionylierung von IAN verantwortlich ist.

Für diese Analysen wurde das Expressionssystem *S. cerevisiae* gewählt. Dafür wurde jeweils ein P450-Enzym (CYP71A13, CYP71B15 oder CYP71B20), die ATR1 und eine AtGST gemeinsam in Hefe exprimiert und auf GS-IAN Bildung untersucht. Alle 54 AtGSTs wurden freundlicherweise von Natalie Kowalski (Lehrstuhl für Botanik, TU-München) im Expressionsvektor pSH62 zur Verfügung gestellt. In Anlehnung an die Arbeiten von Rauhut (2009) und Su *et al.* (2011) wurden für die Etablierung des Assays zunächst AtGSTF2,

AtGSTF3, AtGSTF4 und AtGSTF6 verwendet und später alle 54 *A. thaliana*-GSTs auf ihre Fähigkeit IAN zu glutathionylieren untersucht.

Zunächst wurde der optimale Expressionshintergrund von Hefe bestimmt. Dafür standen vier verschiedene Hefestämme zur Verfügung (bereitgestellt von Natalie Kowalski). BY4741 als Wildtyp enthält alle sieben bekannten Hefe-GSTs (Nummer 1506) (Collinson und Grant, 2003). Dem Stamm 2542 fehlten die vier Hefe-eigene GSTs GTO1, GTO2, GTO3 und TEF4. Im Stamm 5322 waren GTT1, GTT2, GRX1, GRX2 und TEF4 deletiert. Im Stamm 5085 waren neben den vier GSTs GTO1, GTO2, GTO3 und TEF4 zusätzlich auch die Gene für CIS2, CPC und CPY deletiert. Diese drei Gene sind entscheidend am Katabolismus von Glutathionkonjugaten beteiligt und ihr Fehlen könnte sich positiv auf die Akkumulation von GS-IAN in den Hefezellen auswirken. Um dies zu überprüfen wurde in jedem dieser vier Hefestämme ATR1 und AtGSTF6 mit und ohne CYP71B20 exprimiert, die induzierte Kultur mit GSH und IAN gefüttert und auf GS-IAN Bildung analysiert. In Abbildung 4.16 ist zu erkennen, dass ohne die Expression des P450-Enzyms kein Umsatz zu GS-IAN stattgefunden hat. Auch wenn CYP71B20 exprimiert wurde, konnte in der Wildtyphefe (Stamm 1506) kein GS-IAN detektiert werden. Erst durch die Deletion verschiedener Proteine der Hefe wurde eine Produktakkumulation erzielt. Im Stamm 2542 konnte eine Induktion der GS-IAN Bildung um das  $2,9 \pm 1,9$ -fache, im Vergleich zur Umsatzrate ohne AtGSTF6, ermittelt werden. Im Stamm 5322 betrug diese Anreicherung das  $2,5 \pm 0,8$ -fache. Die höchste Anreicherung ( $4,1 \pm 1,7$ -fach im Vergleich zur Aktivität ohne AtGSTF6) wurde im Stamm 5085 erreicht. Damit konnte bestätigt werden, dass der verminderte Katabolismus den Abbau des Glutathionkonjugats verlangsamt.

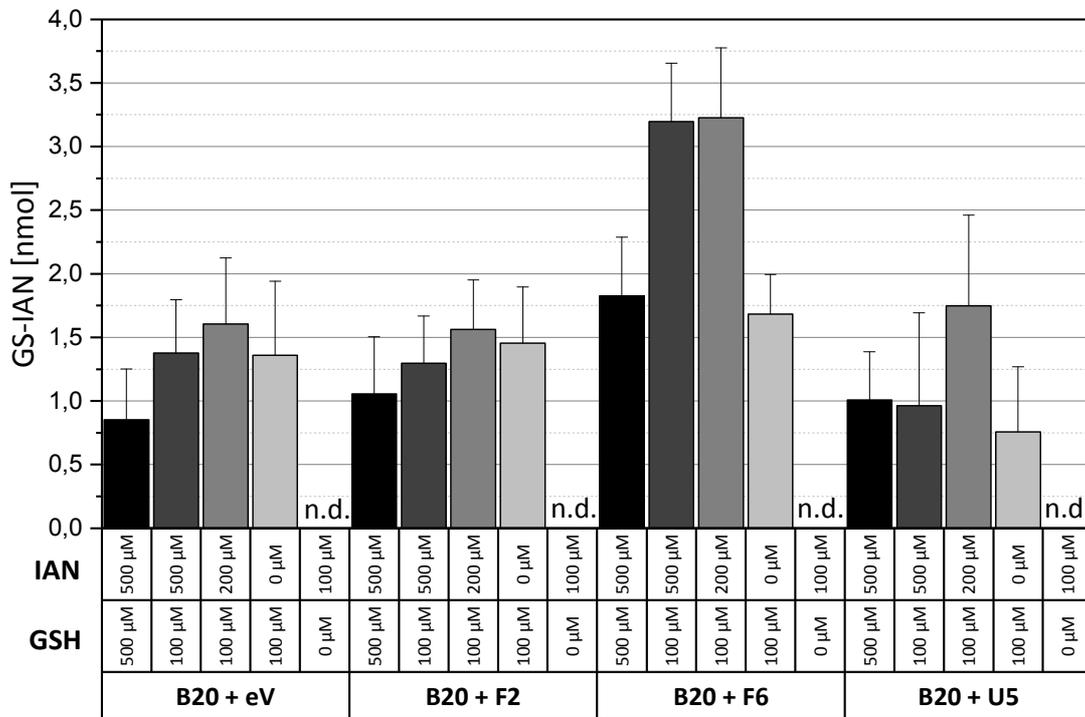


**Abbildung 4.16 Einfluss des genomischen Hintergrundes von *S. cerevisiae* auf die GS-IAN-Akkumulation.**

Es wurden CYP71B20 in vier verschiedenen *S. cerevisiae* Stämmen exprimiert und auf GS-IAN-Akkumulation untersucht. Alle Stämme enthielten AtGSTF6. Ohne P450-Enzym konnte keine Aktivität detektiert werden. Ist CYP71B20 vorhanden wird IAN und GSH umgesetzt. Die größte Akkumulation wurde im Stamm 5085 detektiert. Die Standardabweichung ergab sich aus drei biologischen und drei technischen Wiederholungen. Bezeichnung der Stämme: 1506 – Wildtyp BY4742, 2541 – BY4742  $\Delta$ gto1  $\Delta$ gto2 $\Delta$ gto3 $\Delta$ tef4, 5085 – BY4742  $\Delta$ gto1 $\Delta$ gto2 $\Delta$ gto3 $\Delta$ tef4 $\Delta$ cis2 $\Delta$ cpc $\Delta$ cpy, 5322 – BY4741  $\Delta$ grx1  $\Delta$ grx2  $\Delta$ gtt1  $\Delta$ gtt2  $\Delta$ tef4

Um die optimalen Induktionsbedingungen für den später durchgeführten Test auf Spezifität der AtGSTs zu ermitteln, wurde der Einfluss verschiedener Konzentrationen von IAN und GSH auf die GS-IAN-Bildung untersucht (siehe Abbildung 4.17). ATR1, CYP71B20 als P450-Enzym und drei verschiedene ATGSTs (AtGSTF2, AtGSTF6 und AtGSTU5) wurden im Hefestamm 5085 exprimiert. Auch ohne Expression von AtGSTs konnte ein Umsatz zu GS-IAN festgestellt werden, der sich nicht von den Umsatzraten, erzeugt durch AtGSTF2 und AtGSTU5, unterschied. In dem hier verwendeten Hefestamm waren vier von sieben endogenen GSTs deletiert. Anscheinend könnten demnach die noch vorhandenen drei Enzyme den Umsatz von IAN und GSH zu GS-IAN katalysieren. Ohne GSH-Zugabe (unabhängig von der AtGST) wurde kein GS-IAN gebildet (siehe Abbildung 4.17). Endogenes GSH war offenbar nicht ausreichend für die Reaktion. Die höchste GS-IAN-Bildung konnte unter Verwendung von 200  $\mu$ M IAN und 100  $\mu$ M GSH erzielt werden. AtGSTF6 hatte in diesem Versuch in Kombination mit CYP71B20

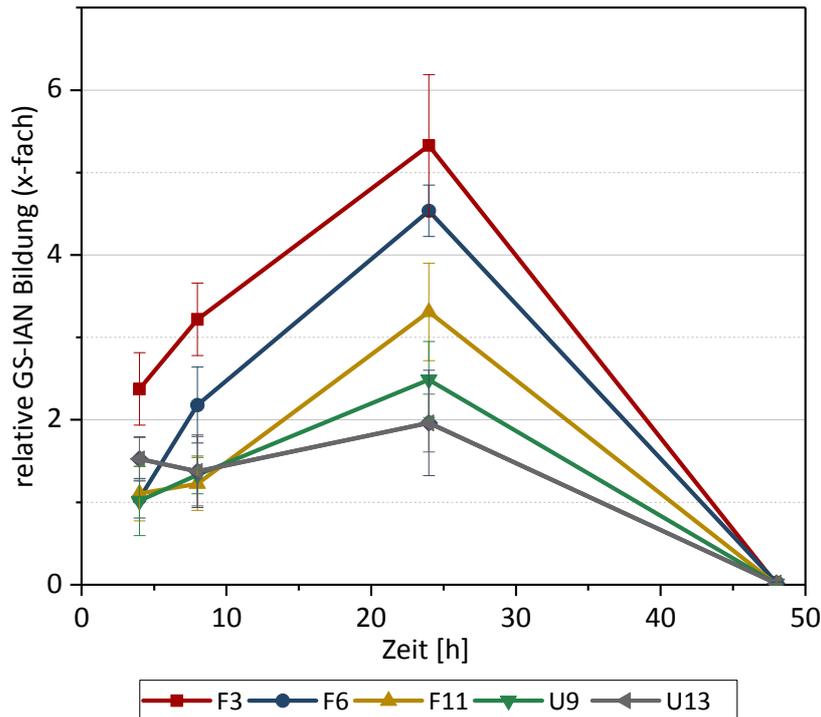
die höchste Aktivität. Es wurden  $3,2 \pm 0,5 \mu\text{M}$  GS-IAN detektiert. Ob sich diese Beobachtung bestätigen lässt, wurde in Abschnitt 4.2.2 näher untersucht.



**Abbildung 4.17 Optimierung der Induktionsbedingungen.**

Überprüft wurden verschiedene GSH und IAN Konzentrationen und ihr Einfluss auf die GS-IAN Bildung durch CYP71B20 und drei verschiedenen AtGSTs. Durch den Einsatz von  $100 \mu\text{M}$  GSH und  $200 \mu\text{M}$  IAN konnten für alle getesteten AtGSTs die höchsten GS-IAN Ausbeuten erzielt werden. Die Standardabweichung ergab sich aus drei biologischen Messungen.

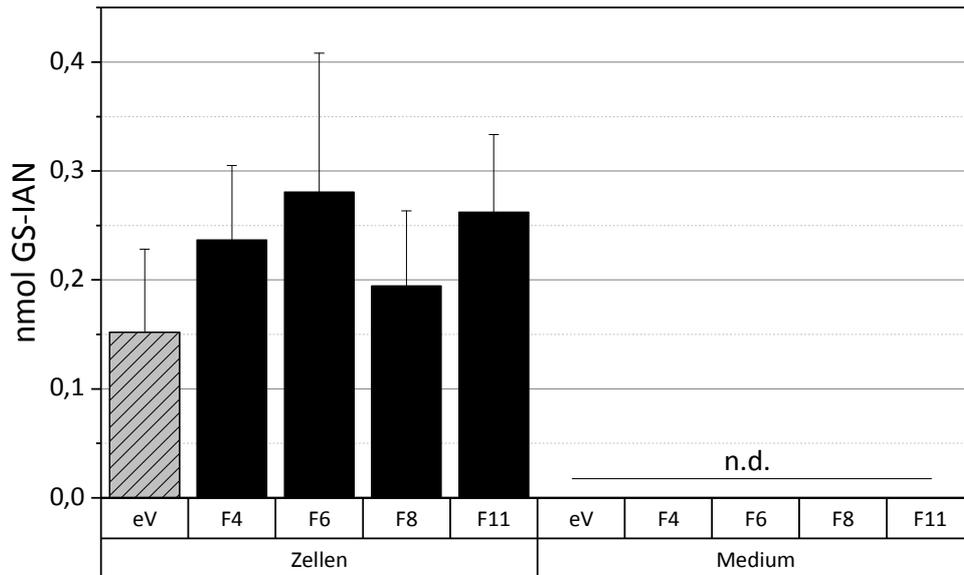
Zur Bestimmung des optimalen Induktionszeitpunktes, wurde die GS-IAN-Bildung von CYP71B20 und fünf verschiedenen AtGSTs (AtGSTF3, AtGSTF6, AtGSTF11, AtGSTU9, und AtGSTU13) über einen Zeitraum von 48 Stunden untersucht. Proben wurden 4, 8, 24 und 48 Stunden nach Galaktosezugabe extrahiert und der GS-IAN-Gehalt via HPLC bestimmt (siehe Abbildung 4.18). Da bereits bekannt war, dass auch ohne AtGST ein Umsatz stattfindet, wurden in diesem Test alle Werte auf die Umsatzrate ohne AtGST normiert. Bereits nach vier Stunden konnte eine deutliche GS-IAN-Bildung detektiert werden. Die maximale GS-IAN-Akkumulation wurde nach 24 Stunden Inkubation erreicht. Nach 48 Stunden war in keiner Probe GS-IAN mehr nachweisbar. Die Proteine waren eventuell bereits degradiert und nicht mehr aktiv. Auch in diesem Ansatz zeigte sich in Proben mit AtGSTF6 ( $4,5 \pm 0,3$ -fach gesteigert im Vergleich zur Leervektorkontrolle), neben Proben mit AtGSTF3 ( $5,3 \pm 0,8$ -fach im Vergleich zur Kontrolle) die höchste Akkumulation von GS-IAN.



**Abbildung 4.18 Etablierung des Induktionszeitpunktes.**

Dargestellt ist die GS-IAN-Bildung von CYP71B20 in Kombination mit AtGSTF3, AtGSTF6, AtGSTF11, AtGSTU9 bzw. AtGSTU13 in Abhängigkeit von der Induktionsdauer. Die transformierten Hefen wurden 4h, 8h, 24h oder 48h nach Galaktose-Induktion mit GSH und IAN gefüttert und anschließend der GS-IAN Gehalt analysiert. Alle Werte wurden auf die Leervektorkontrolle (ohne AtGST) normiert. Standardabweichungen entsprechend drei unabhängigen Wiederholungen. Nach 24h Induktion wurde die höchste Umsatzrate festgestellt.

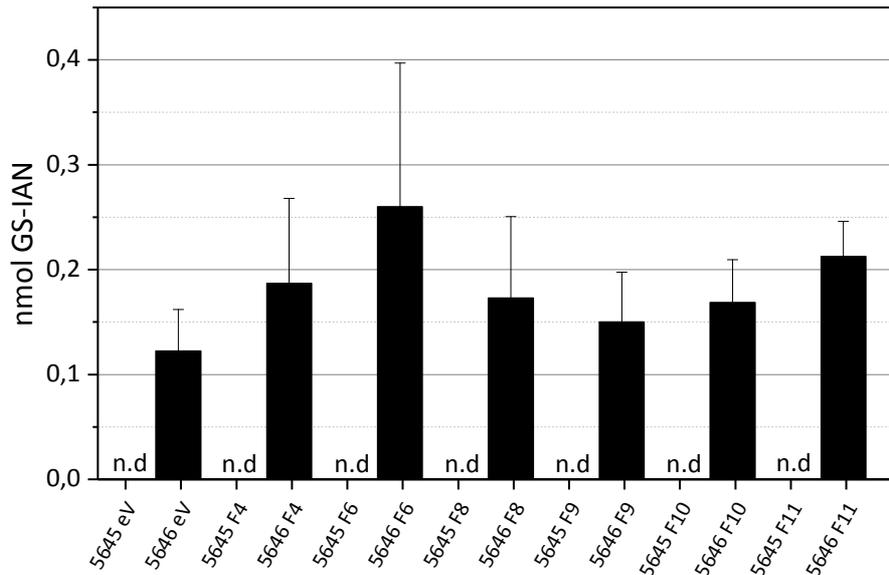
Weiterhin sollte überprüft werden, ob der Metabolit auch ausgeschleust werden kann und dann frei im Medium vorliegt. Dafür wurde ATR1, CYP71B20 und verschiedene AtGSTs (AtGSTF4, AtGSTF6, AtGSTF8 und AtGSTF11) im Hefestamm 5085 exprimiert, induziert und anschließend das gebildete GS-IAN sowohl aus den Zellen als auch aus dem Medium extrahiert. Wie in Abbildung 4.19 zu erkennen konnte der Metabolit ausschließlich in den Zellen nachgewiesen werden. In keiner der vier biologischen Wiederholungen konnte GS-IAN im Medium detektiert werden. Auch in diesem experimentellen Ansatz wurde beobachtet, dass GSH auch ohne AtGST an IAN konjugiert werden konnte (eV zeigte Bildung von  $0,2 \pm 0,1$  nmol GS-IAN).



**Abbildung 4.19 Analyse der Akkumulation von GS-IAN in Hefezellen und Medium.**

Überprüft wurde, ob das gebildete GS-IAN aus den Zellen ins Medium geschleust wird. Dafür wurden induzierte Hefekulturen mit GSH und IAN gefüttert, Zellen von Medium getrennt und GS-IAN aus beiden Fraktionen extrahiert. Der Metabolit konnte nur in den Zellen, nicht im Medium nachgewiesen werden. Die Standardabweichungen ergaben sich aus vier biologischen Wiederholungen.

Obwohl *S. cerevisiae* drei endogene P450-Enzyme besitzt (<http://drnelson.uthsc.edu/P450.statsfile.html>, Stand 08.08.2017), konnte während der Etablierung des optimalen Hefestammes (siehe Abbildung 4.16) beobachtet werden, dass ohne CYP71B20 kein Umsatz von GSH und IAN zu GS-IAN erfolgen kann. Um dies näher zu untersuchen, wurde im Hefestamm 5085 ATR1 ohne CYP71B20 (folgend als Stamm 5645 bezeichnet) und mit CYP71B20 (folgend als Stamm 5646 geführt) exprimiert und erneut verschiedene AtGSTs (AtGSTF4, AtGSTF6, AtGSTF8, AtGSTF9, AtGSTF10 und AtGSTF11) auf ihre Aktivität bezüglich der GS-IAN-Bildung untersucht. Es ist deutlich zu erkennen, dass endogene Enzyme der Hefe nicht in der Lage sind diese Reaktion zu katalysieren (siehe Abbildung 4.20). Nur unter Anwesenheit des pflanzlichen P450-Enzyms konnte unabhängig von der AtGST GS-IAN detektiert werden. Dass auch ohne Expression einer AtGST GS-IAN detektiert wurde deutet darauf hin, dass CYP7B20 auch mit vorhandenen endogenen GSTs die Umwandlung von IAN zu GS-IAN katalysiert. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass dieser Schritt unter den vorliegenden Bedingungen nicht-enzymatisch abläuft.



**Abbildung 4.20 Notwendigkeit des P450-Enzyms bei der GS-IAN-Produktion.**

Überprüft wurde, ob die Aktivität hefeeigener P450-Enzyme ausreichend ist für die Konjugation von GSH an IAN. Wieder wurden verschiedene AtGSTs mit und ohne CYP71B20 in *S.cerevisiae* exprimiert und die GS-IAN-Bildung bestimmt. Unabhängig von der AtGST konnte ohne P450-Enzym kein Umsatz erfolgen. Standardabweichungen ergaben sich aus mindestens drei Messungen.

Trotz konstanter Anzucht- und Extraktionsbedingungen fällt auf, dass es starke Schwankungen sowohl in der absoluten GS-IAN-Menge gibt, als auch Unterschiede in der Umsatzrate der gleichen AtGST in verschiedenen Tests. Beispielsweise wurde in einem Versuch  $4,5 \pm 0,3$  nmol GS-IAN gebildet (siehe Abbildung 4.18, Absolutwerte nicht gezeigt), in einem anderen Versuch lediglich  $0,3 \pm 0,1$  nmol (siehe Abbildung 4.19).

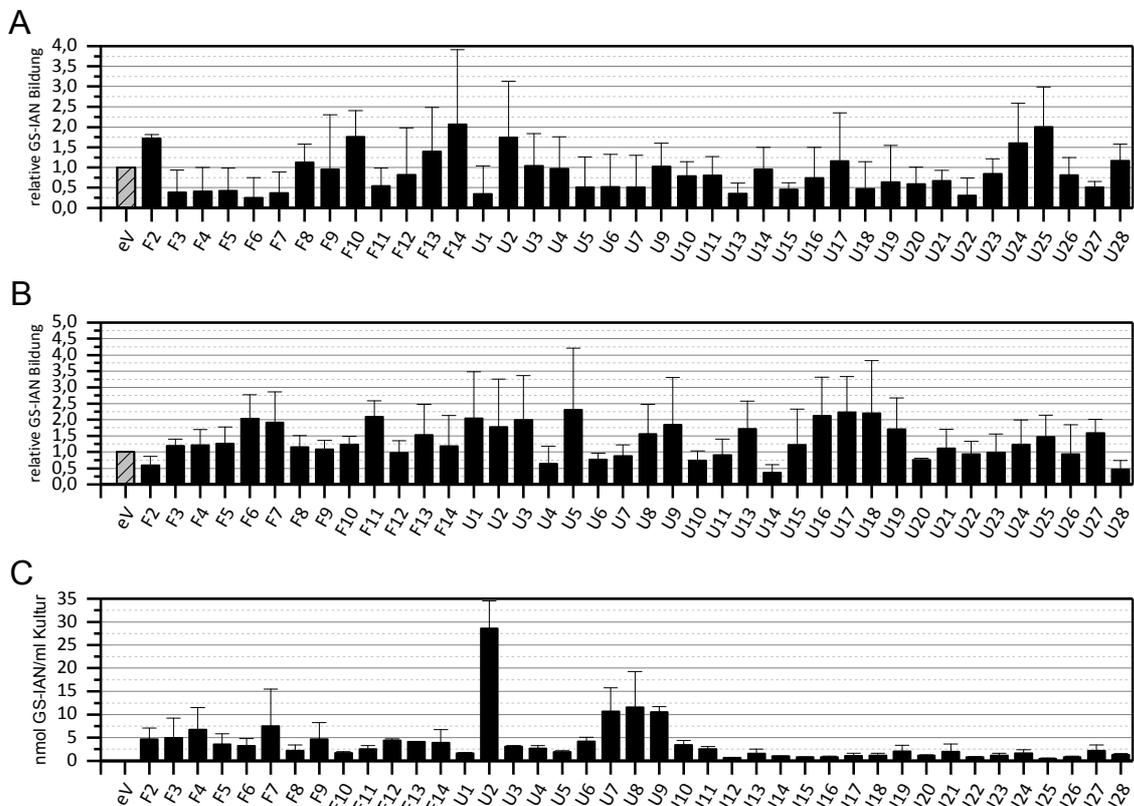
Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass der Stamm 5085 (BY4742  $\Delta$ gto1 $\Delta$ gto2 $\Delta$ gto3 $\Delta$ tef4 $\Delta$ cis2 $\Delta$ cpc $\Delta$ cpy) für die Untersuchung der Spezifität von AtGSTs für die Glutathionylierung von IAN am geeignetsten war. Alle folgenden Analysen erfolgten deshalb in diesem Hefe-Hintergrund. Die Kultur wurde für 24 Stunden mit Galaktose induziert und Fütterungen erfolgten mit 200  $\mu$ M IAN und 100  $\mu$ M GSH. Da mit großen Schwankungen in der gemessenen GS-IAN Menge zu rechnen war, wurden mindestens 4 unabhängige Wiederholungen pro Probe analysiert. Um die Umsatzrate endogener GSTs zu eliminieren, wurde immer eine Leervektorkontrolle mitgeführt und während der Auswertung zur Normalisierung genutzt.

#### 4.2.2. Einfluss von AtGSTs auf die GS-IAN-Bildung durch CYP71B20, CYP71B15 und CYP71A13 in Hefe

Su *et al.* (2011) fanden durch Analyse von *knock-out*- und Überexpressionspflanzen heraus, dass nach *B. cinerea*-Infektion AtGSTF6 einen Einfluss auf die Camalexinbiosynthese hat und möglicherweise die Konjugation von GSH an IAN katalysiert. Rauhut (2009) untersuchten die Beteiligung von AtGSTF6 an der Camalexinbiosynthese (nach Silbernitratinduktion), konnte den zuvor beschriebenen Effekt allerdings nicht bestätigen und erklärte sich dies durch die starke Redundanz von GSTs in *A. thaliana*. In der vorliegenden Arbeit wurde die Fähigkeit aller 54 AtGSTs IAN zu glutathionylieren systematisch untersucht. Weiterhin wurde die Frage geklärt, ob diese Reaktion durch eines der Camalexin-spezifischen CYPs vermittelt wird. *In vitro* Analysen zeigten, dass sowohl CYP71A13, CYP71B15 und CYP71B20 IAN als Substrat akzeptieren (Fellermeier, 2011, Götz, 2012). Um dies aufzuklären wurde der zuvor etablierte Hefeassay verwendet (siehe Abschnitt 4.2.1). Im Stamm 5085 wurde die ATR1, jeweils ein P450-Enzym (CYP71A13, CYP71B15 oder CYP71B20) und eine AtGST exprimiert. Nach Induktion, Fütterung und Metabolitextraktion wurde die gebildete GS-IAN-Menge mittels HPLC analysiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 4.21 zusammengefasst. Für eine bessere Übersichtlichkeit wurden lediglich AtGSTs abgebildet, die einen Umsatz zu GS-IAN zeigten. Für Enzyme der Klassen Lambda (L), Theta (T), Zeta (Z), Dehydroascorbatreduktasen (DHAR) und Tetrachlorohydroquinon-Dehalogenasen (TCHQD) konnte für keines der untersuchten P450-Enzyme Aktivität detektiert werden. Als Kontrolle für unspezifischen Umsatz von GSH und IAN durch Hefe-eigene GSTs wurde in allen drei Ansätzen eine Leervektorkontrolle (eV) mitgeführt. Für CYP71B15 (A) und CYP71B20 (B) konnte in dieser Kontrolle ebenfalls GS-IAN detektiert werden. Diese P450-Enzyme akzeptieren auch endogene GSTs oder benötigen keine GST für die katalysierte Reaktion. Um den tatsächlichen Einfluss der AtGSTs ermitteln zu können, wurden alle Daten auf die zugehörige Kontrolle normalisiert. Im Gegensatz dazu setzt CYP71A13 GSH und IAN nur mit AtGSTs um (Abbildung 4.21 C).

Dass, wie von Su *et al.* (2011) veröffentlicht, AtGSTF6 spezifisch an der Camalexinbiosynthese beteiligt ist, konnte in dieser Studie nicht bestätigt werden. Keine der untersuchten P450-Enzyme zeigte eine signifikant höhere Aktivität in Zusammenhang mit dieser AtGST. Für CYP71B15 und CYP71B20 konnte generell keine AtGST identifiziert werden, die spezifisch die Konjugation von GSH an IAN katalysiert. Betrachtet man Abbildung 4.21 C fällt auf, dass CYP71A13 mit AtGSTU2 im Vergleich zu allen anderen getesteten GSTs signifikant mehr GS-IAN bildet ( $28,6 \pm 6,0$  nmol GS-IAN/ml Kultur). In der Tau-Klasse zeigten auch AtGSTU7 ( $10,6 \pm 5,2$  nmol GS-IAN/ml Kultur), AtGSTU8 ( $11,6 \pm 7,7$  nmol GS-IAN/ml Kultur) und AtGSTU9 ( $10,5 \pm 1,2$  nmol GS-IAN/ml Kultur) eine erhöhte Aktivität. Eine niedrigere,

aber innerhalb der Phi-Klasse trotzdem erhöhte, Aktivität wurde in Kombination mit AtGSTF4 ( $6,7 \pm 4,8$  nmol GS-IAN/ml Kultur) und AtGSTF7 ( $7,5 \pm 3,5$  nmol GS-IAN/ml Kultur) detektiert. Oft weisen AtGSTs, die entsprechend ihrer Phylogenie in einer Gruppe zusammengefasst werden (siehe Abbildung 1.9), auch eine vergleichbare Fähigkeit zur GS-IAN-Bildung auf (siehe Abbildung 4.21 C). Alle Enzyme der Phi-Klasse katalysieren die Konjugation von GSH an IAN in ähnlichen Größenordnungen (im Mittel  $4,2 \pm 1,6$  nmol GS-IAN/ml Kultur). Das gleiche gilt für die Enzyme AtGSTU11 bis AtGSTU18 (Mittel  $1,2 \pm 0,6$  nmol GS-IAN/ml Kultur) und AtGSTU19 bis AtGSTU28 (Mittel  $1,3 \pm 0,6$  nmol GS-IAN/ml Kultur). Die Gruppe AtGSTU1 bis AtGSTU10 zeigt ein vielfältigeres Aktivitätsmuster. Wie bereits weiter oben im Abschnitt beschrieben, wird von CYP71A13 in Kombination mit AtGSTU2 am meisten GS-IAN gebildet und auch die Enzyme AtGSTU7, AtGSTU8 und AtGSTU9 setzen vermehrt GSH und IAN um.



**Abbildung 4.21 Hefeassay zur Bestimmung der Spezifität von AtGSTs.**

AtGSTs sind essentiell für die Konjugation von GSH an IAN (Su *et al.*, 2011). In der hier abgebildeten Studie wurde untersucht, ob es eine favorisierte Kombination von P450-Enzym und AtGST für diese Reaktion gibt. Dafür wurden CYP71B15 (A), CYP71B20 (B) oder CYP71A13 (C) zusammen mit allen 54 AtGSTs in Hefe exprimiert und auf GS-IAN Bildung analysiert. Dargestellt sind jene AtGSTs die einen Umsatz zeigten. Standardabweichungen ergaben sich aus mindestens vier unabhängigen Wiederholungen (für AtGSTU2 zehn unabhängige Wiederholungen). Alle Werte wurden auf die Leervektorkontrolle normalisiert. Für CYP71B15 und CYP71B20 konnte keine Spezifität festgestellt werden. CYP71A13 hingegen setzte in Kombination mit AtGSTU2 hoch signifikant GSH und IAN zu GS-IAN um ( $p < 0,01$ ).

## 4.2.3. Die Rolle von AtGSTU2 und AtGSTU4 bei der Camalexinbiosynthese

Der breit angelegte Hefeassay zeigte, dass CYP71A13 spezifisch mit AtGSTU2 GSH und IAN zu GS-IAN umwandelt (siehe Abschnitt 4.2.2). Die biologische Relevanz dieser Aktivität wurde nachfolgend in *in planta* Studien analysiert.

Auffällig war, dass die entsprechenden Gene in *A. thaliana* nicht koexprimiert sind. *AtGSTU4*, mit 85% Sequenzhomologie und 83,6% Homologie auf Proteinebene ist ein naher Verwandter von *AtGSTU2* und zeigt hingegen sowohl mit *CYP71A13* ( $r = 0,49$ ) als auch mit *CYP71B15* ( $r = 0,62$ ) starke Koexpression (siehe Tabelle 4.6) (Aoki *et al.*, 2016).

**Tabelle 4.6 Koexpressionbestimmung von CYP71A13 und CYP71B15.**

Analysiert wurden *CYP71A13* (oben) und *CYP71B15* (unten) bezüglich ihrer koexprimierten Gene. Abgebildet ist der Rang und jeweilige Pearson-Korrelationskoeffizient eines koexprimierten Gens. Zu sehen ist, dass beide P450-Enzyme mit *AtGSTU4* und *AtGSTU10* aufgelistet werden. Auch andere Gene des Camalexinbiosyntheseweges weisen eine hohe Pearson-Korrelation auf. Die Koexpressionsdaten wurden mit Hilfe der Datenbank ATTED-II erhoben (Aoki *et al.*, 2016)

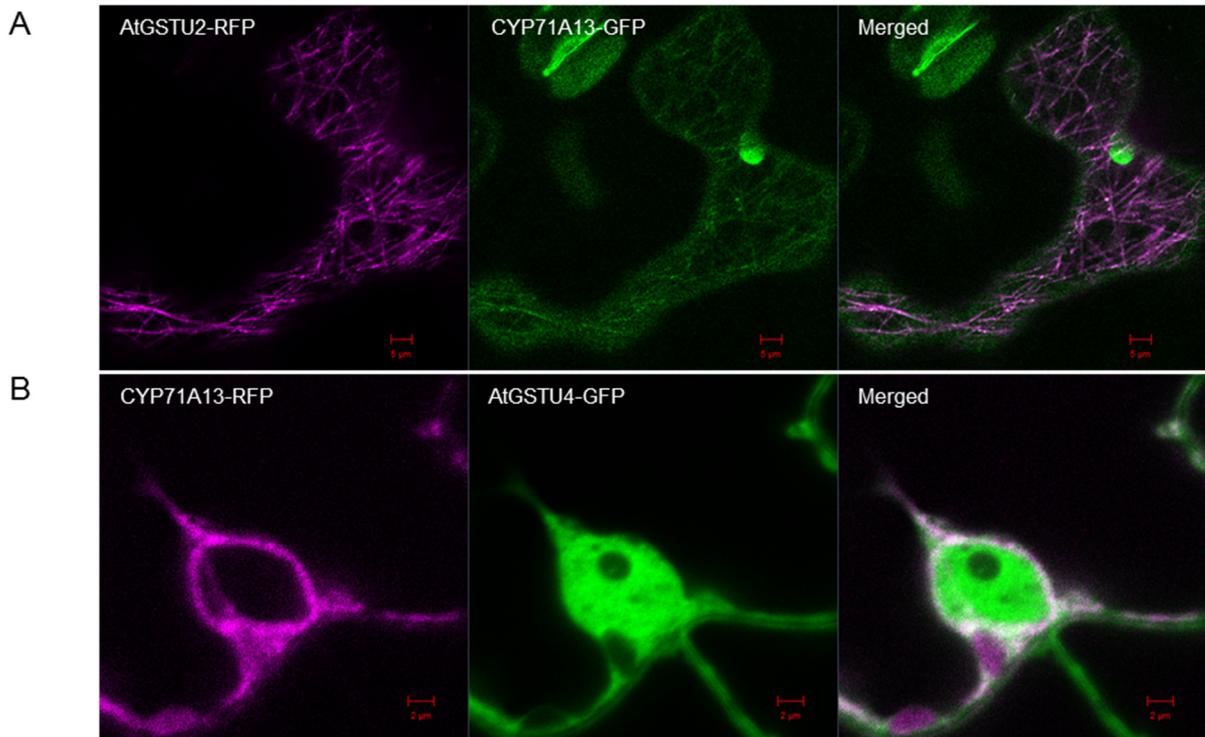
| Rang | Pearson-Korrelation | Locus     | Name            |
|------|---------------------|-----------|-----------------|
| 1    | 1.00                | At2g30770 | <i>CYP71A13</i> |
| 2    | 0.67                | At3g26830 | <i>CYP71B15</i> |
| 14   | 0.51                | At1g74590 | <i>AtGSTU10</i> |
| 17   | 0.49                | At2g29460 | <i>AtGSTU4</i>  |
| 23   | 0.48                | At5g44990 | <i>GHR3</i>     |
| 26   | 0.47                | At2g30750 | <i>CYP71A12</i> |
| 33   | 0.45                | At2g29470 | <i>AtGSTU3</i>  |

| Rang | Pearson-Korrelation | Locus     | Name            |
|------|---------------------|-----------|-----------------|
| 1    | 1.00                | At3g26830 | <i>CYP71B15</i> |
| 2    | 0.67                | At2g30770 | <i>CYP71A13</i> |
| 5    | 0.62                | At2g29460 | <i>AtGSTU4</i>  |
| 12   | 0.58                | At1g74590 | <i>AtGSTU10</i> |
| 28   | 0.53                | At2g30750 | <i>CYP71A12</i> |
| 56   | 0.48                | At5g44990 | <i>GHR3</i>     |

Im Hefeassay konnte für dieses Enzym allerdings keine erhöhte Aktivität festgestellt werden (siehe Abbildung 4.21). Aufgrund der nahen Verwandtschaft zu AtGSTU2, der deutlichen Koexpression mit Camalexin-spezifischen Enzymen und der niedrigen Umsatzrate zu GS-IAN in *S. cerevisiae* wurde AtGSTU4 als Negativkontrolle in allen folgenden Experimenten mitgeführt. Zunächst wurde überprüft, ob AtGSTU2, AtGSTU4 und CYP71A13 kolokalisieren. Wie in Abbildung 4.22 A zu erkennen, ist dies für AtGSTU2 nicht der Fall. Es ist keine Überlagerung des GFP und RFP Signals erkennbar. Dahingegen lokalisierte AtGSTU4

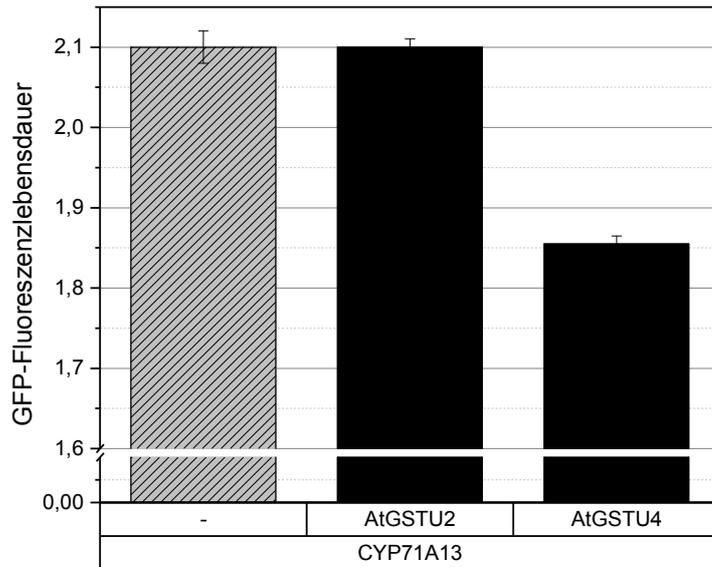
gemeinsam mit CYP71A13 am ER (Abbildung 4.22 B; Rekrutierung zum ER – siehe Abbildung 4.5).



**Abbildung 4.22 Expression von CYP71A13 mit AtGSTU2 (A) bzw. AtGSTU4 (B) in *N. benthamiana*.**

Kolokalisation wurde mit Hilfe konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie analysiert. CYP71A13 und AtGSTU2 waren in unterschiedlichen Zellkompartimenten lokalisiert. Für CYP71A13 in Kombination mit AtGSTU4 ist eine klare Signalüberlagerung zu erkennen. Das Experiment wurde mit drei biologischen Wiederholungen durchgeführt und jeweils mindestens zehn Zellen analysiert.

Weiterhin wurde eine mögliche Interaktion von CYP71A13 mit AtGSTU2 und AtGSTU4 unter Zuhilfenahme von FRET-FLIM analysiert (siehe Abbildung 4.10). Als Kontrolle wurde die GFP-Lebensdauer des Donors CYP71A13 allein bestimmt ( $2,1 \pm 0,02$  ns). Für AtGSTU2 konnte keine Verringerung der Donor-Lebenszeit festgestellt werden. Wie auch bei der Bestimmung der Kolokalisation fiel auf, dass das Fluorophor von CYP71A13 in Kombination mit AtGSTU4 entgegen der Erwartung bereits nach  $1,9 \pm 0,01$  ns wieder im Ausgangszustand vorlag. Die GFP-Lebensdauer war um 0,2 ns reduziert. Entsprechend Schoberer und Botchway (2014) kann von einer Protein-Protein-Interaktion ausgegangen werden.



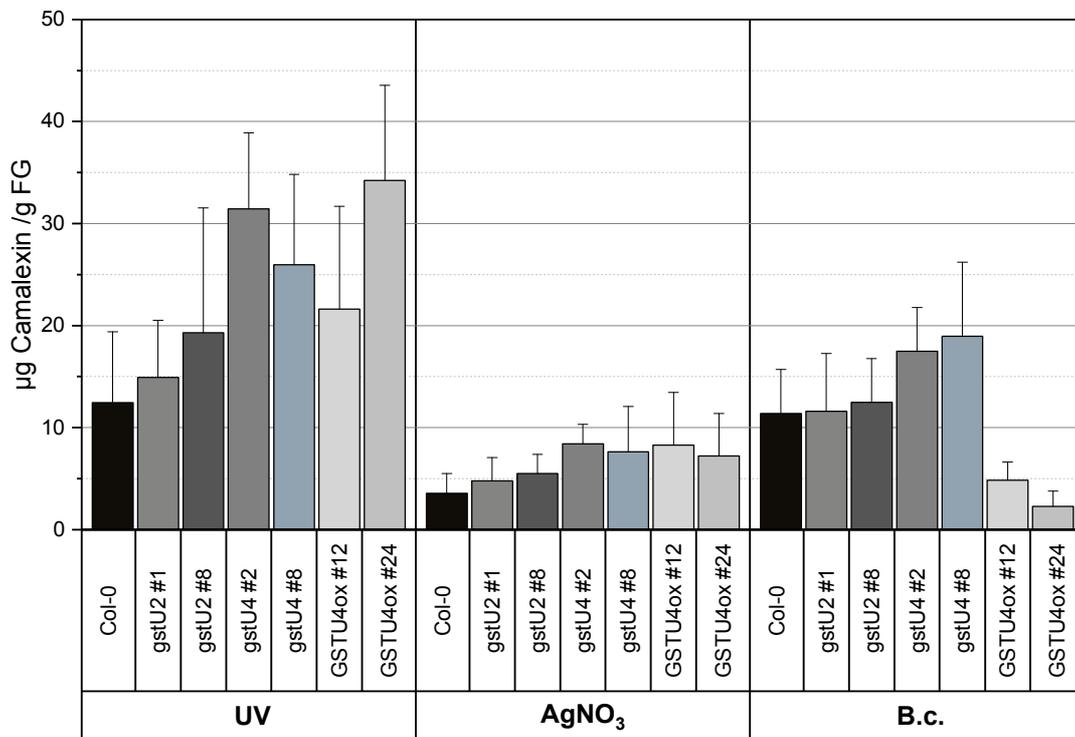
| GFP             | RFP     | Mittelwert | Abweichung | $\Delta$ [ns] |
|-----------------|---------|------------|------------|---------------|
| <b>CYP71A13</b> | (-)     | 2,10       | 0,02       | 0             |
|                 | AtGSTU2 | 2,10       | 0,01       | 0             |
|                 | AtGSTU4 | 1,89       | 0,01       | 0,2           |

**Abbildung 4.23 FRET-FLIM Analyse zur Interaktion von AtGSTU2 und AtGSTU4 mit CYP71A13.**

Alle Proteine wurden transient in *N. benthamiana* exprimiert und nach vier Tagen analysiert. Dabei wurde mittels FLIM die GFP-Lebensdauer ermittelt. Von einer Protein-Protein-Interaktion kann ausgegangen werden, wenn die Lebenszeit im Vergleich zu CYP71A13 allein als Donor um mindestens 0,2 ns reduziert ist (Schoberer und Botchway, 2014). Für AtGSTU4 konnte dies nachgewiesen werden. Die Standardabweichungen ergaben sich aus mindestens zwei biologischen und drei technischen Wiederholungen.

In diesen ersten Versuchen stellte sich heraus, dass AtGSTU4 im Gegensatz zu AtGSTU2 *in planta* als an der Camalexinbiosynthese beteiligtes Enzym fungieren könnte. Nichtsdestotrotz wurden weiterhin beide Enzyme in *knock-out* und Überexpressionsanalysen in *A. thaliana* auf einen veränderten Phänotyp untersucht. Analysiert werden sollte, ob sich der Camalexingehalt in *AtGSTU2* bzw. *AtGSTU4* defizienten oder überexprimierenden Pflanzen ändert. Dafür wurden Blätter von fünf Wochen alten Pflanzen abgeschnitten und mit UV-C Licht bestrahlt, mit 5 mM Silbernitratlösung besprüht oder mit *B. cinerea* infiziert. Nach 24 Stunden (UV-C, Silbernitrat) bzw. 48 Stunden (*B. cinerea*) wurde jeweils die Camalexinkonzentration bestimmt. Wie in Abbildung 4.24 zu erkennen ist, konnte mit keinem der drei Stressoren ein signifikant veränderter Camalexinphänotyp in *AtgstU2* Pflanzen detektiert werden. Nach abiotischem Stress konnten auch in *AtgstU4* und *AtGSTU4ox* Pflanzen keine signifikant veränderte Camalexinkonzentration detektiert werden. Zwar reicherte sich Camalexin nach UV-C-Bestrahlung in *AtGSTU4* defizienten Pflanzen an, allerdings war dieselbe Veränderung auch in überexprimierenden *A. thaliana*-Pflanzen zu beobachten. Folglich konnte der in diesen

Linien beobachtete Phänotyp nicht auf Verlust oder Akkumulation des Enzyms zurückgeführt werden. Betrachtet man *B. cinerea*-infizierte Pflanzen, so ist erkennbar, dass sich Camalexin in *knock-out*-Pflanzen ebenfalls akkumulierte. In diesem Fall reagierten *AtGSTU4* überexprimierende Pflanzen gegensätzlich, der analysierte Metabolit wurde in deutlich geringeren Mengen synthetisiert.

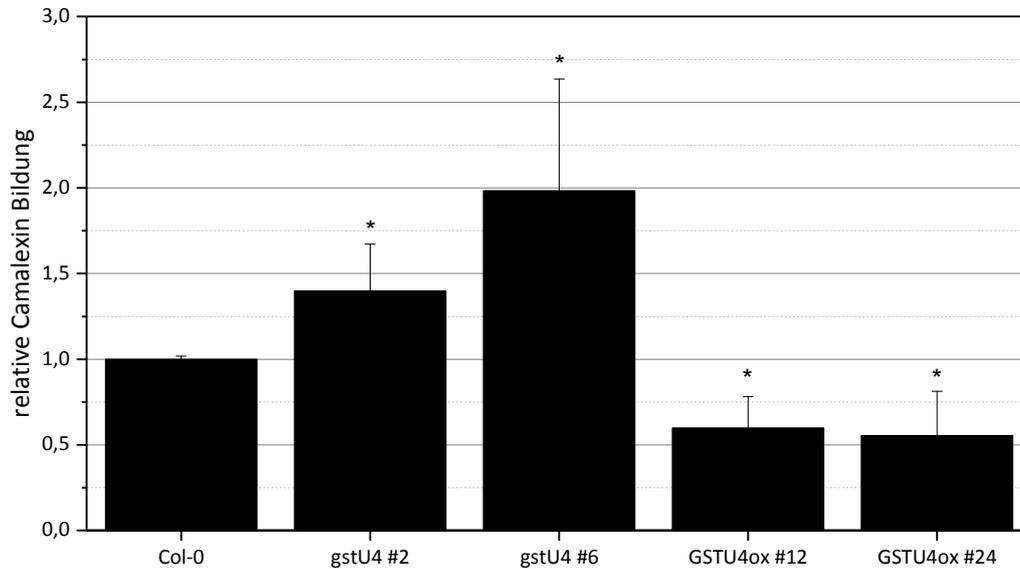


**Abbildung 4.24 Bestimmung des Camalexingehaltes in *AtGST* defizienten bzw. überexprimierenden Pflanzenlinien.**

Blätter von je zwei *AtGSTU2* und *AtGSTU4* *knock-out*-Linien und zwei *AtGSTU4* Überexpressionslinien wurden geerntet und mit UV-C-Licht, Silbernitrat oder *B. cinerea* behandelt. 24 Stunden nach Stressinduktion wurde Camalexin extrahiert und via HPLC quantifiziert. *AtgstU2* Pflanzen reagierten auf keinen der drei Stressoren mit einem verändertem Camalexingehalt. In *AtGSTU4* Pflanzen zeigte sich kein klarer Camalexin-Phänotyp unter UV-C- und Silbernitratbelastung. Nach *B. cinerea*-Infektion akkumuliert sich Camalexin im *Knock-out* (1,6 fach vom Wildtyp) und reduziert sich drastisch im Überexprimierer (ca.3,5 fach vom Wildtyp). Die Mittelwerte und Standardabweichungen ergaben sich aus 5 technischen und drei biologischen Wiederholungen.

Um den Rolle dieser *AtGST* nach *B. cinerea* Infektion im Detail zu betrachten, wurden die in allen durchgeführten Experimenten erhobenen Daten in Abbildung 4.25 in Relation zum Wildtyp dargestellt. Es wird deutlich, dass die ermittelten Unterschiede in den Pflanzenlinien zwar gering, aber signifikant waren. In *knock-out*-Pflanzen wurde bis zu 100% mehr Camalexin gebildet als im Wildtyp. In Überexpressionslinien halbierte sich nahezu die Konzentration von Camalexin. *AtGSTU4* scheint nach Pathogenbefall einen Einfluss auf die

Camalexinbiosynthese zu haben. Der beobachtete Phänotyp spricht allerdings gegen eine direkte Beteiligung von AtGSTU4 an der Camalexinbiosynthese.



**Abbildung 4.25** Relative Camalexinbildung in *AtGSTU4*-defizienten und überexprimierenden Pflanzen nach *B. cinerea*-Infektion.

Um den Einfluss von *AtGSTU4* auf die Camalexinbiosynthese besser evaluieren zu können, wurden alle unter gleichen Bedingungen durchgeführten Experimente zusammengefasst und relativ zum Wildtyp dargestellt. Im *Knock-out* reichert sich Camalexin signifikant an. Im Überexprimierer ist die Metabolitmenge signifikant reduziert. (n= 27, t-test, p-Wert < 0,05)

Um die biologische Funktion von *AtGSTU4* während der Camalexinbiosynthese weiter aufzuklären wurden Überexpressions- und *knock-out*-Pflanzen mittels Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (LC-MS) auf sich verändernde Metabolitmuster untersucht. In ersten Messungen zeigte sich eine Akkumulation von 4-Amino-4-deoxychorismat in *AtGSTU4* überexprimierenden Pflanzenproben. Diese Analyse erfolgte in Zusammenarbeit mit Karin Kleigrewe (Bavarian Center for Biomolecular Mass Spectrometry - BayBioMS, TU-München).

#### 4.2.4. Weitere *AtGSTs* und ihre Bedeutung während der Synthese von Camalexin nach *Botrytis cinerea*-Infektion in *A. thaliana*

Nachdem für *AtGSTU4* ein Einfluss auf die Bildung von GS-IAN gezeigt werden konnte, wurden weitere *AtGST-knock-out*- und Überexpressionspflanzen auf einen möglichen veränderten Camalexinphänotyp untersucht. In vorherigen Studien wurde bereits aufgezeigt, dass Enzyme der Phi-Klasse nicht an der Camalexinbiosynthese beteiligt sind (Rauhut, 2009). Auch wurde bereits gezeigt, dass *AtGSTs* untereinander eine hohe Redundanz aufweisen. So

konnte trotz Deletion von vier Enzymen der Phi-Klasse (AtGSTF6, ATGSTF7, AtGSTF9 und AtGSTF10) keine veränderte Aktivität gegenüber dem Standardsubstrat 1-Chloro-2,4-Dinitrobenzen (CDNB) nachgewiesen werden (Sappl *et al.*, 2009). Aus diesen Gründen wurden keine AtGSTs der Phi-Klasse in der hier dargestellten Analyse berücksichtigt.

Aus der Tau-Klasse wurden AtGSTU5, AtGSTU8 und AtGSTU18 ausgewählt und auf ihre Rolle während der durch *B. cinerea* ausgelösten Phytoalexinsynthese untersucht. AtGSTU5 wurde in die durchgeführten Studien integriert, da es eine Protein-Homologie von 83,6% zu AtGSTU2 aufweist. Ähnlich wie AtGSTU4 zeigte auch AtGSTU5 im Hefeassay nur eine äußerst geringe Aktivität ( $1,9 \pm 0,2$  nmol GS-IAN/ml Kultur). Kowalski (2016) konnte weiterhin in zahlreichen Tests zeigen, dass dieses Enzym sehr effizient GSH an diverse Substrate konjugieren kann. AtGSTU8 hingegen weist lediglich eine Protein-Homologie von 65,3% zu AtGSTU2 auf. Trotzdem zeigte es im Hefeassay die zweit höchste Umsatzrate von IAN und GSH zu GS-IAN und wurde deshalb als Kandidat ausgewählt. Zuletzt wurde auch eine Doppelmutante von *AtGSTU5* und *AtGSTU18* in die Analysen integriert. In dieser Linie gab es erste Indizien dafür, dass sie im Keimlingsstadium unter Herbizidbelastung einen leicht veränderten Camalexingehalt aufweisen (persönliche Kommunikation A. Klepper, Lehrstuhl für Botanik). AtGSTU18 selbst ist nur entfernt mit AtGSTU2 verwandt (56,4% Homologie auf Proteinebene), konjugiert aber, ähnlich wie AtGSTU5, GSH an zahlreiche Substrate (Kowalski, 2016). Die Protein-Homologie von 20 AtGSTs der Tau-Klasse in Bezug auf AtGSTU2 ist in Tabelle 4.7 zusammenfassend dargestellt.

**Tabelle 4.7 Protein-Homologien von AtGSTs der Tau-Klasse zu AtGSTU2.**

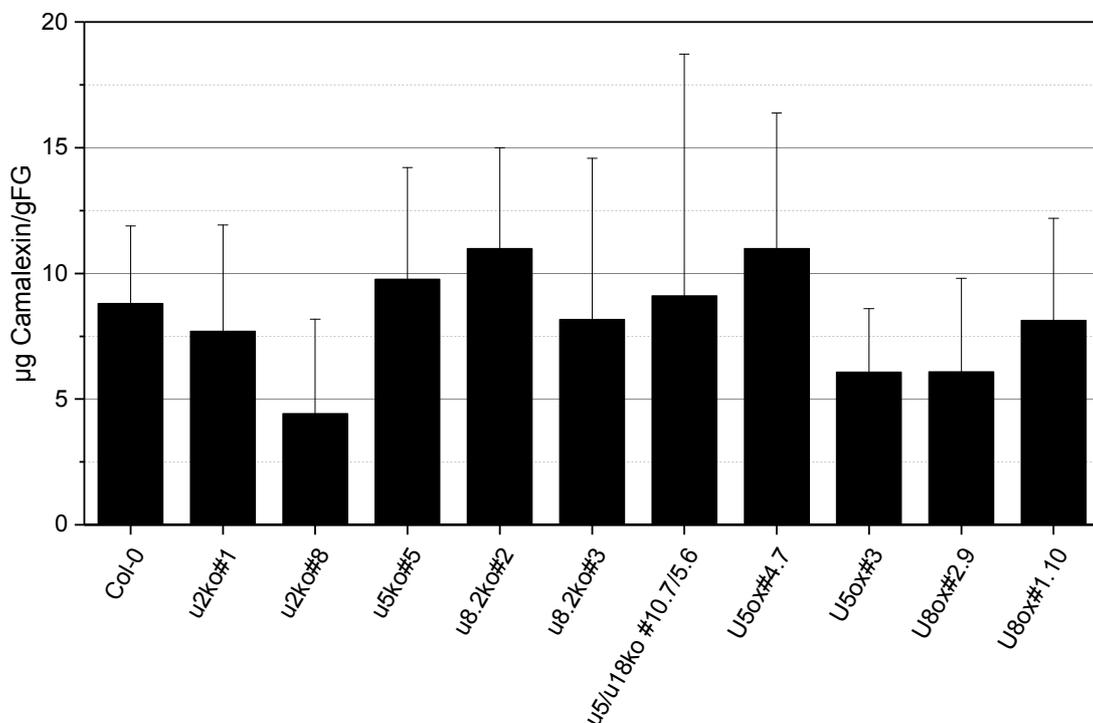
Zusätzlich AtGSTU4 wurden *knock-out*- und Überexpressionspflanzen von AtGSTU5, AtGSTU8 und AtGSTU18 (grau markiert) auf einen möglichen Camalexinphänotyp untersucht. Die Wahl erfolgte anhand von Protein-Homologie (identische Aminosäuren) und der ermittelten Aktivität in *S. cerevisiae* (siehe Abbildung 4.26).

| At Nummer          | Protein | Homologie | At Nummer          | Protein | Homologie |
|--------------------|---------|-----------|--------------------|---------|-----------|
| <b>AT2G29490.1</b> | GSTU1   | 89.3%     | <b>AT5G62480.1</b> | GSTU9   | 61.3%     |
| <b>AT2G29470.1</b> | GSTU3   | 86.7%     | <b>AT1G17170.1</b> | GSTU24  | 60.9%     |
| <b>AT2G29460.1</b> | GSTU4   | 83.6%     | <b>AT1G10370.1</b> | GSTU17  | 60.0%     |
| <b>AT2G29450.1</b> | GSTU5   | 83.6%     | <b>AT1G69930.1</b> | GSTU11  | 56.9%     |
| <b>AT2G29440.1</b> | GSTU6   | 79.1%     | <b>AT1G10360.1</b> | GSTU18  | 56.4%     |
| <b>AT2G29420.1</b> | GSTU7   | 74.2%     | <b>AT1G78340.1</b> | GSTU22  | 55.1%     |
| <b>AT3G09270.1</b> | GSTU8   | 65.3%     | <b>AT1G78380.1</b> | GSTU19  | 55.1%     |
| <b>AT1G59700.1</b> | GSTU16  | 64.0%     | <b>AT1G17190.1</b> | GSTU26  | 54.2%     |
| <b>AT1G74590.1</b> | GSTU10  | 61.8%     | <b>AT1G17180.1</b> | GSTU25  | 53.8%     |
| <b>AT1G59670.1</b> | GSTU15  | 61.8%     | <b>AT1G78370.1</b> | GSTU20  | 50.7%     |

Wenn möglich wurden jeweils zwei unabhängige Linien von *Knock-out*- und Überexpressionspflanzen untersucht. Homozygote Linien wurde freundlicherweise von Aaron

Klepper und Natalie Kowalski (Lehrstuhl für Botanik) bereitgestellt. Anschließend wurden die Pflanzen mit *B. cinerea* infiziert und die gebildete Camalexinmenge mit Hilfe von HPLC analysiert.

Das Ergebnis der Studie ist in Abbildung 4.26 dargestellt. Zwischen Wildtyppflanzen und den AtGST-defizienten bzw. überexprimierenden Pflanzen konnte nach Pathogeninfektion kein Camalexinphänotyp nachgewiesen werden. Keine der getesteten AtGSTs schien einen signifikanten Beitrag zur Camalexinbiosynthese zu leisten. Wie auch in verschiedenen Studien gezeigt, weisen AtGSTs eine hohe Redundanz bezüglich ihrer Funktion auf. Durch den *Knock-out* verschiedener AtGST-Cluster (z.B. *AtGSTU1* bis *AtGSTU7* oder *AtGSTU11* bis *AtGSTU18*) könnte dies eingehend untersucht werden. Hierbei würde sich das CRISPR/Cas9 System anbieten, da es eine gezielte Einführung von Mutationen ins Genom ermöglicht (Wang *et al.*, 2015).



**Abbildung 4.26** Analyse weiterer AtGSTs bezüglich ihres Einfluss auf die Camalexinbildung nach *B. cinerea* Infektion.

Untersucht wurden zusätzlich zu AtGSTU2 und AtGSTU4 auch AtGSTU5, AtGSTU8 und AtGSTU18 bezüglich ihrer Beteiligung an der Camalexinbiosynthese. 24 Stunden nach Infektion durch das nekrotrophe Pathogen wurde die Camalexinkonzentration in *knock-out* und Überexpressionslinien via HPLC bestimmt. Außer für AtGSTU4 konnte in keiner Linie ein verändertes Metabolitmuster detektiert werden. Die Mittelwerte und Standardabweichungen ergaben sich aus acht technischen und drei biologischen Wiederholungen.

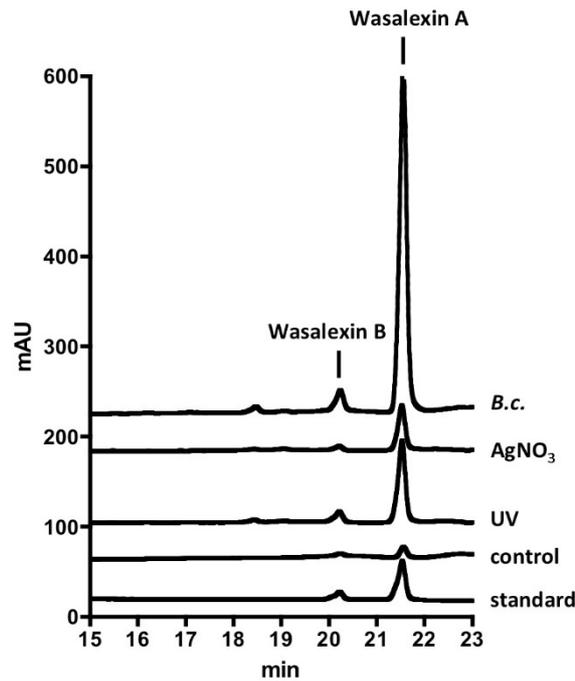
Zusammenfassend ist festzustellen, dass *in vitro* AtGSTs in Kombination mit CYP71A13 unerlässlich für die Konjugation von GSH an IAN sind und damit essentiell an der Biosynthese

des für *A. thaliana* typischen Phytoalexins beteiligt sind. AtGSTU2 katalysiert die Reaktion in *S. cerevisiae* am effizientesten, spielt aber in Arabidopsis wahrscheinlich keine Rolle. Auch für andere AtGSTs konnte keine herausragende Bedeutung für die Camalexinbiosynthese *per se* festgestellt werden. In *AtGSTU4* defizienten und überexprimierenden Pflanzen wurde ein veränderter Camalexinphänotyp festgestellt. Dieser spricht allerdings gegen einen direkten Einfluss des Enzyms auf die Camalexinbiosynthese.

### **4.3. *Eutrema salsugineum* als alternatives Modellsystem zur Charakterisierung von Phytoalexinen**

#### 4.3.1. Induktion von Wasalexin A und B als Abwehrreaktion auf biotische und abiotische Stressoren in *E. salsugineum* Ökotyp Shandong und Yukon

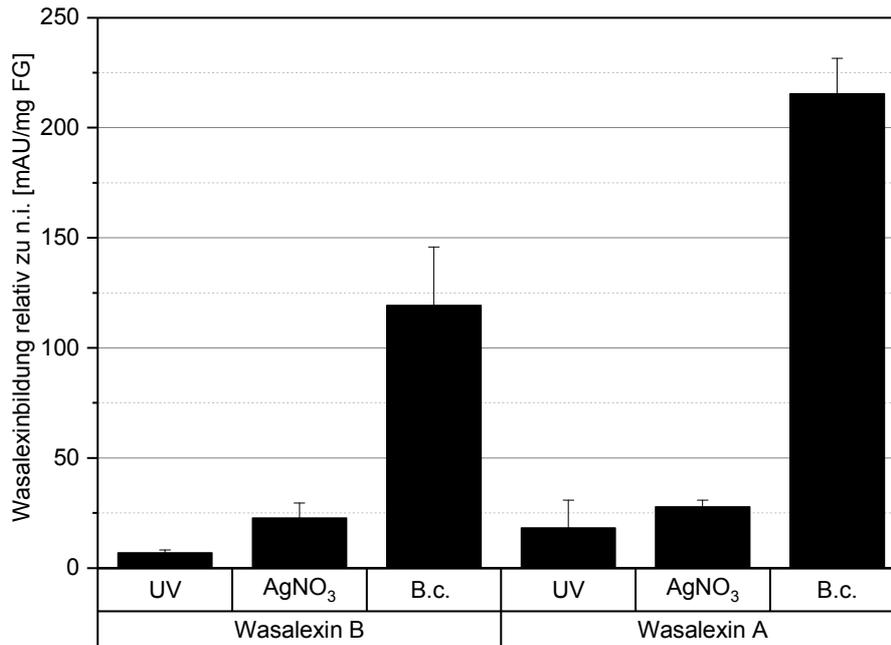
Wasalexin als typisches Phytoalexin von *E. salsugineum* wird durch abiotischen und biotischen Stress induziert (Pedras und Adio, 2008, Pedras und Zheng, 2010). In diesen Studien wurden allerdings andere Stressoren appliziert als in der hier vorliegenden Arbeit. Deshalb wurde zunächst die Induzierbarkeit des Phytoalexins durch UV-C-Strahlung, Silbernitrat und *B. cinerea*-Infektion überprüft. Blätter von zehn Wochen alten *E. salsugineum*-Pflanzen (Ökotyp Shandong) wurden abgeschnitten und für 24 (UV-C und Silbernitrat) bzw. 48 Stunden (*B. cinerea*) behandelt. Als Kontrolle dienten nicht gestresste Blätter der gleichen Pflanzen. In Abbildung 4.27 ist exemplarisch ein Chromatogramm (363 nm) dargestellt. Gut sind die Peaks der beiden Diastereomere Wasalexin A und B zu sehen. Alle drei getesteten Stressoren sind in der Lage die Phytoalexinbiosynthese zu induzieren. In nicht induzierten Pflanzen ist kaum Wasalexin detektierbar. Die minimalen Mengen könnten eine Reaktion auf die Verwundung der Blätter während des Abschneidens sein.



**Abbildung 4.27** Repräsentatives Chromatogramm von Wasalexin.

*E. salsugineum*-Blätter wurden mit *B. cinerea* infiziert, mit 5 mM Silbernitrat besprüht bzw. für zwei Stunden UV-C-Strahlung ausgesetzt. Nach Wasalexinextraktion erfolgte eine HPLC-Analyse (siehe Abschnitt 3.5.20). Dargestellt ist eine repräsentatives Chromatogramm bei 363 nm. Für eine bessere Wiederfindung wurde ein Wasalexinstandard mitgeführt. Als Negativkontrolle wurden Blätter mit Wasser besprüht (control). Die zwei Diastereomere Wasalexin A und B konnten deutlich voneinander separiert werden. (Mucha *et al.*, 2015)

Für eine detaillierte Darstellung des gebildeten Wasalexins nach Stressapplikation wurde eine umfangreiche Metabolitbestimmung durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 4.28 für *E. salsugineum* Ökotyp Shandong dargestellt. Erneut ließ sich sowohl durch abiotischen als auch biotischen Stress die Wasalexinbiosynthese stimulieren. In nicht induzierten Blättern konnten lediglich Spuren des Metaboliten nachgewiesen werden (Wasalexin A 0,026 mAU/mg FG, Wasalexin B 0,004 mAU/mg FG). In *B. cinerea* infizierten Blättern wurde in diesem Ansatz die höchste Wasalexinkonzentration gemessen (Wasalexin A 215±16-fach, Wasalexin B 119±26-fach, im Vergleich zu nicht induzierten Pflanzen). Durch Aufsprühen der 5 mM Silbernitratlösung konnte eine Anreicherung um das 28±3-fache für Wasalexin A und um das 22,7±6,9-fache für Wasalexin B ermittelt werden. In diesem Experiment war UV-C-Strahlung der schwächste Induktor. Die Wasalexinbiosynthese war um 18,2±12,7-fach (Wasalexin A) bzw. 7,0±1,2-fach (Wasalexin B) erhöht.

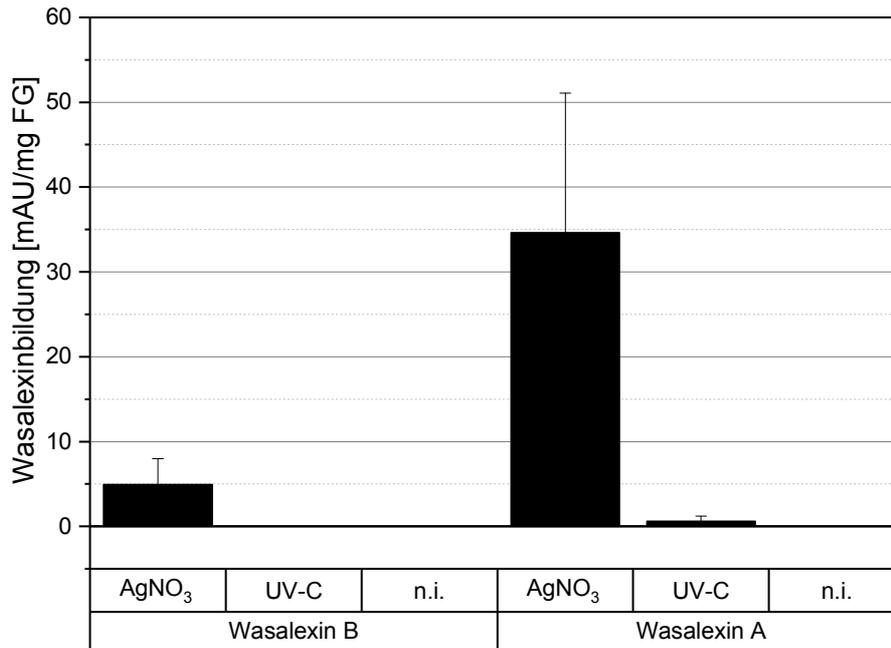


**Abbildung 4.28 Wasalexininduktion in *E. salsugineum* Ökotyp Shandong**

Blätter von 10 Wochen alten Pflanzen des Ökotyps Shandong wurden für zwei Stunden mit UV-C-Licht bestrahlt, mit 5 mM Silbernitrat besprüht oder *B.cinerea* infiziert (siehe Abschnitt 3.5.14). Anschließend wurde der Wasalexingehalt mit Hilfe von HPLC bestimmt. Die Normierung erfolgte auf nicht behandelte Proben. Standardabweichungen ergaben sich aus drei technischen und drei biologischen Wiederholungen. Sowohl die Synthese von Wasalexin A als auch Wasalexin B lässt sich durch die drei verwendeten Stressoren induzieren.

Generell ist festzustellen, dass die Induktion des Phytoalexins mit den drei Stressoren starken Schwankungen unterworfen war. Abhängig von der Pathogenität des Pilzes wurden teils sehr starke Abwehrantworten ausgelöst (in Folge dessen hohe Wasalexinkonzentration) und in manchen Fällen konnte nur eine schwache Anreicherung des Metaboliten detektiert werden. Auch für die abiotischen Induktoren wurden teilweise große Schwankungen zwischen einzelnen biologischen Wiederholungen sichtbar. Trotz kontrollierter Wachstumsbedingungen und Randomisierung aller Pflanzen konnten möglicherweise keine einheitlichen, reproduzierbaren Pflanzenanzuchten generiert werden. Die Induktion der Biosynthese war allerdings jederzeit klar zu sehen und eindeutig quantifizierbar.

Als Alternative zu *E. salsugineum* Ökotyp Shandong wurde auch der Ökotyp Yukon als Modellsystem in Betracht gezogen. Die Analyse der Wasalexinbiosynthese dieses Ökotyps ergab, dass lediglich durch Silbernitratbelastung die Bildung des Phytoalexins induziert werden konnte (siehe Abbildung 4.29).



**Abbildung 4.29** Wasalexinbildung in *E. salsugineum* Ökotyp Yukon.

Blätter von 10 Wochen alten Pflanzen des Ökotyps Yukon wurden für zwei Stunden mit UV-C Licht bestrahlt oder mit 5 mM Silbernitrat besprüht. Nach 24 h Inkubation wurde der Wasalexingehalt mit Hilfe von HPLC bestimmt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Blattproben. Standardabweichungen ergaben sich aus drei technischen und drei biologischen Wiederholungen. In *E. salsugineum* Ökotyp Yukon konnte die Wasalexinbiosynthese durch Silbernitratbehandlung induziert werden, wohingegen UV-C Bestrahlung keine Reaktion auslöste.

#### 4.3.2. Expressionsanalyse von Genen koexprimierter Biosynthesewege

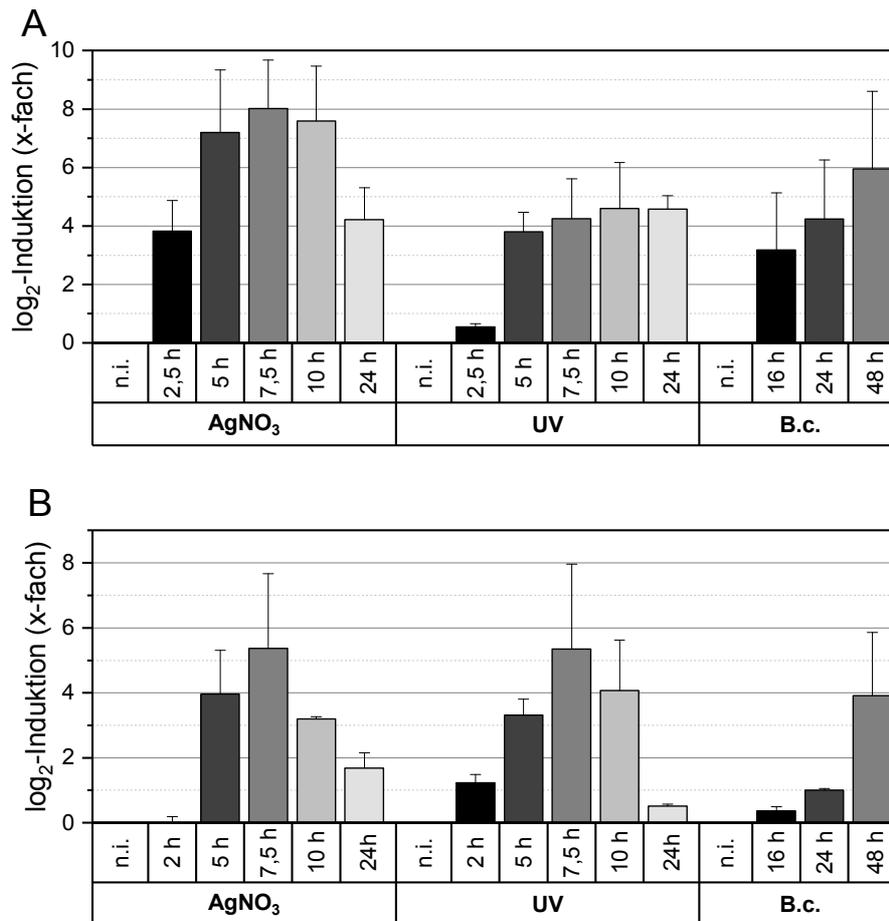
Wasalexin entsteht wie auch Camalexin in *A. thaliana* aus Tryptophan. Die aromatische Aminosäure wiederum wird über den Shikimisäure-Weg synthetisiert. Als Schlüsselenzym hierbei katalysiert die Anthranilat-Synthase 1 (ASA1) die Umwandlung von Chorismat und L-Glutamin zu Anthranilat (Niyogi und Fink, 1992, Radwanski und Last, 1995). Steht Tryptophan zur Verfügung dient es als Vorläufer für vielfältig Metabolite wie Auxin (Indol-3-essigsäure, IAA), Glucosinolate und indolische Phytoalexine (Zhao *et al.*, 2002, Glawischnig *et al.*, 2004, Pedras *et al.*, 2010, Sonderby *et al.*, 2010). An dieser Verzweigungsstelle zwischen Primär- und Sekundärmetabolismus wandelt CYP79B2 Tryptophan zu IAOx um (Hull *et al.*, 2000b, Mikkelsen *et al.*, 2000a). Beide Arabidopsis-Schlüsselenzyme haben Orthologe in *E. salsugineum*. *EsASA1* (Thhalv10013041m) weist eine Homologie von 92% auf Sequenzebene und 90,2% auf Proteinebene auf. Die DNA-Sequenz von *EsCYP79B2* (Thhalv10024861m) ist zu 91% identisch zum Arabidopsis-Ortholog. Die Proteine gleichen sich zu 90,8%. Aufgrund der starken Ähnlichkeit wurde in der vorliegenden Studie davon ausgegangen, dass die

Enzyme in *E. salsugineum* ebenfalls eine entscheidende Rolle bei der Synthese von Sekundärmetaboliten spielen.

Um zu überprüfen ob auch in *E. salsugineum* die Tryptophansynthese und der von Tryptophan abhängige Sekundärmetabolismus durch Stress induziert werden kann, wurde die Expression von *EsASA1* und *ESCYP79B2* während Schwermetallbelastung, UV-C-Bestrahlung und *B. cinerea* Infektion zu verschiedenen Zeitpunkten mittels RT-qPCR analysiert (siehe Abbildung 4.30, Normalisierung auf das geometrische Mittel von drei Referenzgenen (siehe Tabelle 4.12)). Zu sehen ist, dass die Expression von *EsASA1* (Abbildung 4.30 A) 7,5 h nach UV-C- und Silbernitratbelastung ihr Maximum erreichte. Nach *B. cinerea*-Infektion wurde das Expressionsmaximum nach 48 h erreicht. Auch fällt auf, dass die Behandlung mit Silbernitrat die stärkste Reaktion induzierte (256-fach in AgNO<sub>3</sub> zu 24,2-fach in UV zu 61,8-fach in *B. c.*). Nach UV-C-Belastung war 5 h nach Induktion ein starker Anstieg der Expression detektierbar (13,9-fach), der im weiteren Verlauf nicht mehr drastisch zunahm (24,2-fach). Im Vergleich dazu stieg die Expression von Silbernitrat-induzierten Proben kontinuierlich über die Zeit bis zum Messzeitpunkt nach 7,5 h an (von 14,1-fach auf 257,8-fach). Auch nach *B. cinerea*-Infektion konnte eine gleichmäßige Zunahme der *EsASA1* Expression ermittelt werden (von 9-fach auf 61,8-fach).

Ein ähnliches Expressionsmuster konnte für *EsCYP79B2* detektiert werden (Abbildung 4.30 B). Erneut wurde nach abiotischem Stress das Expressionsmaximum nach 7,5 h erreicht. Auch wurde für *EsCYP79B2* die höchste Genexpression nach 48 h gemessen. Generell war die Induktionsrate von *EsCYP79B2* nicht so stark wie für *EsASA1* (max. 257-fach zu max. 41,1-fach).

In diesem ersten Test wurde die Induzierbarkeit von zwei für die Synthese indolischer Sekundärmetabolite essentielle Gene bestätigt. Die gewonnenen Erkenntnisse bezüglich des Expressionsmaximums von *EsASA1* und *EsCYP79B2* dienten zur Etablierung der optimalen Bedingungen für die anschließend durchgeführten RNAseq- und Microarray-Analysen. Im weiteren Verlauf wurde die generelle Transkriptomantwort von *E. salsugineum* auf UV-C-, Silbernitrat- und *B. cinerea*-Stress eingehend untersucht (veröffentlicht in Mucha *et al.* (2015)).



**Abbildung 4.30 Induktion der *EsASA1*- (A) und *EsCYP79B2*-Expression (B) nach Stressapplikation.**

Blätter von *E. salsugineum* wurden mit UV-C-Licht bestrahlt, mit 5 mM Silbernitrat besprüht oder mit *B. cinerea* infiziert. Mit Hilfe von RT-qPCR wurden die Expressionsstärken nach 2 h; 5 h; 7,5 h; 10 h und 24 h (UV-C Bestrahlung und Silbernitratbehandlung) bzw. nach 16 h, 24 h und 48 h (*B. cinerea*-Infektion) bestimmt. Alle Werte wurden auf das geometrische Mittel von drei Referenzgenen normalisiert (*EsActin1*, *EsYLS8* und *EsPP2AA2*) (Vandesompele *et al.*, 2002). Das Induktionslevel wurde auf die Expression von *EsASA1* bzw. *EsCYP79B2* in nicht induzierten Blätter (n.i.) normiert. Standardabweichungen repräsentieren zwei technische und drei biologische Wiederholungen. Nach abiotischem Stress wurde nach 7,5 Stunden das Expressionsmaximum erreicht. Nach Pathogeninfektion wurde dies nach 48 h detektiert.

4.3.3. Charakterisierung der transkriptionellen Antwort von *E. salsugineum* auf Pathogeninfektion, Silbernitrat- und UV-Stress mittels RNAseq und MicroArray

4.3.3.1. Vergleich von RNA-seq und Microarray - generelle Transkriptomantwort

Anhand der in Abschnitt 4.3.2 gewonnenen Erkenntnisse bezüglich der optimalen Expression stressinduzierter Synthesegene, wurden Blätter von *E. salsugineum* UV-C-Licht ausgesetzt, mit Silbernitrat besprüht oder mit *B. cinerea* infiziert. Anschließend erfolgte eine Inkubation für insgesamt 8h (UV und Silbernitrat) bzw. 48h (*B. cinerea*). Als Kontrolle dienten Mock-behandelte Pflanzen.

RNAseq-Analysen wurde in Zusammenarbeit mit LGC Genomics durchgeführt (Illumina HiSeq 2000). Mit freundlicher Unterstützung von Dr. Dirk Walther und Dr. Dirk Hincha (Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie, Potsdam) wurden die Daten bioinformatisch und statistisch ausgewertet. Wenn möglich wurde das passende *A. thaliana*-Ortholog identifiziert und annotiert.

In Tabelle 4.8 ist eine Übersicht der im RNAseq ermittelten *Reads* dargestellt. Es wurden zwischen 33 Mio. und 45,5 Mio. Reads pro cDNA Bibliothek generiert (n.i. 33,45 Mio., UV 45,33 Mio., AgNO<sub>3</sub> 33,28 Mio., *B.c.* 35,92 Mio.). Ca. 75% der 29284 bekannten Transkripte wurden in dem durchgeführten RNAseq wiedergefunden (Referenzgenom aus Yang *et al.* (2013)).

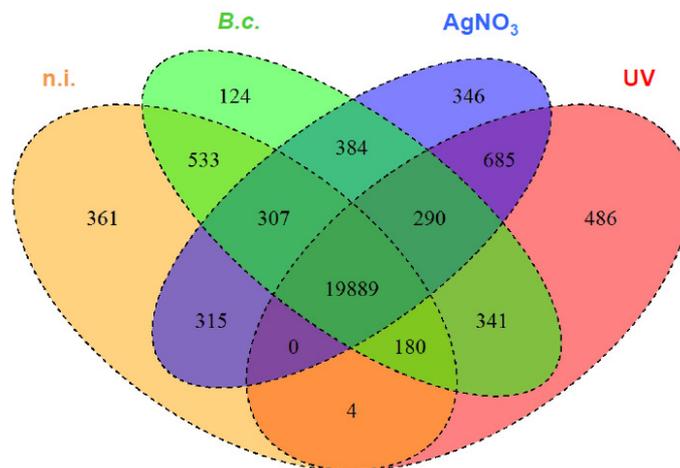
**Tabelle 4.8 Zusammenfassung der RNAseq-Ergebnisse**

*Reads* wurden gegen 29284 Referenz-Transkripte des JGI Genom von *E. salsugineum* abgeglichen (Yang *et al.*, 2013). Zwei Sequenzfehler pro Transkript wurden zugelassen. Insgesamt wurden zwischen 33 Mio. und 45,5 Mio. Reads identifiziert. Zwischen 7 Mio. und 23 Mio. Reads konnten keinem Transkript zugeordnet werden (*uncounted*). Zwischen 22 Mio. und 26 Mio. Reads konnten einem bekannten Transkript zugeordnet werden (*counted*). Davon wurden zwischen 14 Mio. und 19,5 Mio. Reads einer einzelnen Referenz zugeordnet (*uniquely*). Zwischen 6,5 Mio. und 8,5 Mio. Reads passten zu mehreren Referenztranskripten (*non-specific*). Insgesamt konnten ca. 75% des veröffentlichten Transkriptoms identifiziert werden. (entnommen aus Mucha *et al.* (2015))

|             |                 | n.i.       | UV         | AgNO <sub>3</sub> | B.c.       |
|-------------|-----------------|------------|------------|-------------------|------------|
| reads       | total fragments | 33,445,682 | 45,326,703 | 33,278,110        | 35,924,995 |
|             | uncounted       | 8,100,893  | 22,525,573 | 7,470,863         | 12,091,407 |
|             | counted         | 25,344,789 | 22,801,130 | 25,807,247        | 23,833,588 |
|             | - uniquely      | 17,567,426 | 14,322,990 | 19,065,875        | 16,287,764 |
|             | - non-specific  | 7,777,363  | 8,478,140  | 6,741,372         | 7,545,824  |
| transcripts | hit (reads > 0) | 23,237     | 23,730     | 23,985            | 23,655     |
|             | uniquely hit    | 21,589     | 21,875     | 22,216            | 22,048     |
|             | (% of total)    | (73,7%)    | (74,7%)    | (75,9%)           | (75,3%)    |

Beim Vergleich der zuvor identifizierten Transkripte zwischen den drei Behandlungen und der Kontrolle konnte eine Überschneidung von ca. 90% in den einzelnen cDNA-Bibliotheken ermittelt werden (siehe Abbildung 4.31). 3142 der 29284 identifizierten Transkripte zeigten eine mind. zweifache Induktion nach *B. cinerea*-Infektion. Davon waren 56,4% bzw. 61,3% zusätzlich durch UV-C bzw. Silbernitrat hochreguliert. Insgesamt 4325 aller Transkripte nach UV-C-Induktion zeigten eine zweifach oder stärkere Expressionsinduktion. 73,6% davon waren auch nach Silbernitratbehandlung verstärkt exprimiert. 41% der *B.c.*-Transkripte zeigten das gleiche Verhalten wie die UV-C-behandelten Proben. Auf Silbernitrat-Belastung reagierten 4791 Transkripte mit einer mind. zweifach stärkeren Expressionsrate. Davon zeigten 66,5% der Transkripte nach UV-C Stress und 40,2% nach Pathogeninfektion ebenfalls eine zweifach oder höhere Induktion.

Der große Überlapp der hochregulierten Transkripte nach abiotischem Stress (mehr als 60%) deutet auf eine redundante Reaktion der Pflanze unabhängig vom Stressor hin. Nach Pathogenbefall scheint eine leicht veränderte Abwehrantwort ausgelöst zu werden. In diesem Fall wurde ein geringerer Prozentsatz gleich reagierender Transkripte ermittelt (ca. 40%). Auffällig war auch die generelle Induktionsrate. Das am stärksten exprimierte Gen nach UV-C-Behandlung (*EsSOT12*) wies eine ca. 12500-fach höhere Expression auf als die Mock-behandelte Kontrolle. Nach Silbernitratbehandlung war maximal eine Induktionsrate von ca. 3800-fach detektierbar (*EsBGLU28*). Nach Pathogeninfektion betrug die stärkste Induktion im Vergleich zur Kontrolle ca. 223-fach (*EsBGLU3*).



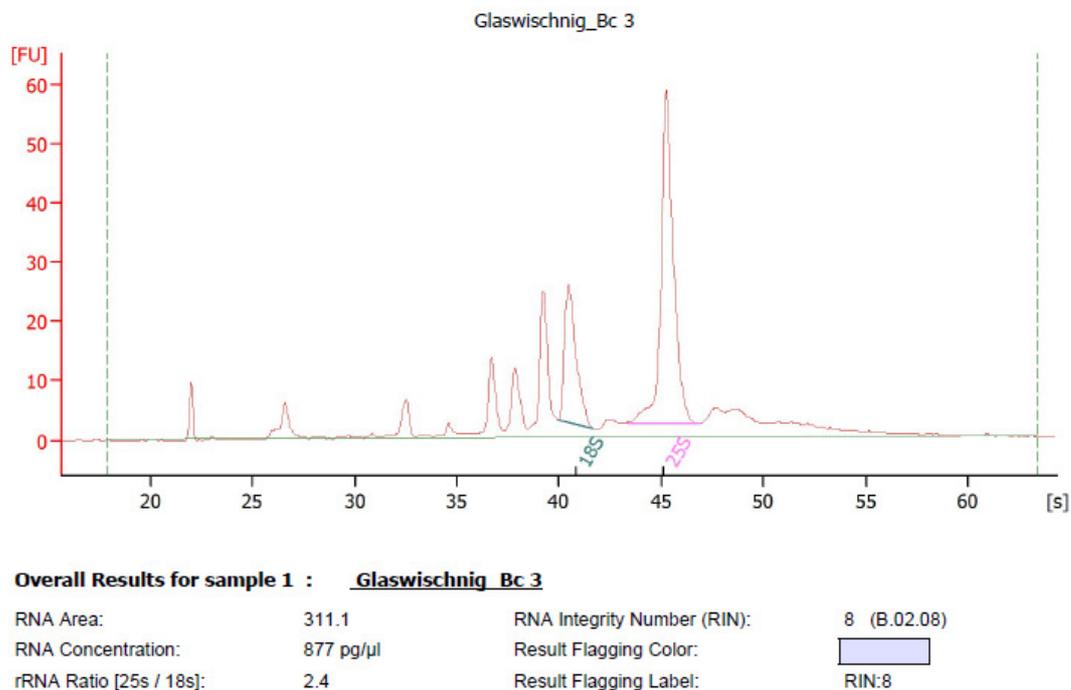
**Abbildung 4.31 Venn-Diagramm der überlappenden Transkripte im RNAseq.**

Analysiert wurde die Wiederfindungsrate einzelner Transkripte in den verschiedenen cDNA-Bibliotheken. Berücksichtigt wurden Transkripte, die nur einem Hit im Referenztranskriptom zugeordnet werden konnten. Ca. 90% aller Transkripte konnte in allen vier Proben identifiziert werden (FDR  $p < 0.05$ ).

Als unabhängige Methode der Transkriptomanalyse wurden mit gleich behandelten Pflanzenproben (UV-C-, Silbernitratbehandlung, *B. cinerea*-Infektion) Microarray-Analysen

durchgeführt (OakLabs GmbH). Das experimentelle Design entsprach der Arbeit von Lee *et al.* (2013). Es wurden je vier biologische Replikate analysiert.

Als Qualitätskontrolle wurde die *RNA integrity number* (RIN) aller Proben bestimmt. Mit Hilfe dieses Faktors kann der Grad der Degradation ermittelt werden. Der RIN Faktor kann Werte zwischen 1 und 10 annehmen. Wobei der Wert 10 vollständig intakte, nicht degradierte RNA beschreibt und der Wert 1 für vollständig degradierte RNA steht (Schroeder *et al.*, 2006). OakLabs GmbH empfiehlt einen RIN Faktor größer 6 für Microarray Analysen (Fleige und Pfaffl, 2006). Mit Hilfe eines Bioanalyzers (Agilent Technologies) wurde die RNA Integrität ermittelt. In Abbildung 4.32 ist exemplarisch die Qualitätsbestimmung einer *B. cinerea*-infizierten Probe dargestellt. Im Chromatogramm waren deutliche Peaks für die 18S und 25S rRNA zu erkennen. Dies war ein erstes Indiz für qualitativ hochwertige RNA (im Falle einer Degradation wären diese Peaks niedriger oder nicht trennbar). Anhand des erstellten Chromatogramms wurde das 25S/18S rRNA Verhältnis bestimmt. Der Quotient für diese Probe betrug 2,4. Gemäß Fleige und Pfaffl (2006) deuten Quotienten  $\geq 2$  auf degradationsfreie RNA hin. Auch der berechnete RIN-Faktor (RIN: 8) war ein Hinweis darauf, dass die RNA dieser Probe von guter Qualität war und sich für Microarray Analysen eignete.



**Abbildung 4.32 Exemplarische Darstellung der RNA-Qualitätskontrolle von OakLabs GmbH.**

Zur Bestimmung der RNA-Integrität wurde mit Hilfe des Bioanalyzers (Agilent Technologies) der RIN-Faktor bestimmt. Ab einem Wert von 6 ist die Qualität der RNA geeignet für MicorArray Analysen. Zusätzlich wurde das Verhältnis zwischen 18S und 25S rRNA ermittelt. Ein Verhältnis größer 1 sollte erreicht werden. Werte größer 2 weisen auf qualitativ hochwertige RNA hin.

In Tabelle 4.9 sind Qualitätsmerkmale aller für den Microarray verwendeten Proben zusammengefasst. Zusätzlich zum 25S/18S Verhältnis und dem RIN-Faktor wurden auch das 260/280 – und 260/230 Verhältnis bestimmt. Anhand dieser Werte können Kontaminationen durch Proteine (gemessen bei 280 nm) und niedermolekularer Substanzen, wie Salze oder Phenole, identifiziert werden. Ein 260/280 Verhältnis von ca. 2 und ein 260/230 Verhältnis größer 2 gibt an, dass die RNA einen hohen Reinheitsgrad hat. Wie in Tabelle 4.9 zu erkennen ist, entsprach die Qualität der verwendeten Proben in allen gemessenen Parametern den Richtlinien.

**Tabelle 4.9 Bestimmung verschiedener Qualitätsmerkmale der für den Microarray verwendeten RNA.**

Für den Microarray wurden pro Behandlungsart (UV, AgNO<sub>3</sub>, B.c. und n.i.) je vier biologische Wiederholungen verwendet. Für jede dieser Proben wurde die Qualität der RNA analysiert. Das Verhältnis von 260 nm zu 280 nm und von 260 nm zu 230 nm gibt den Grad der Verunreinigung von Proteinen (280 nm) oder niedermolekularen Stoffen (230 nm) an. Das 25S/18S Verhältnis und der RIN Faktor sind ein Maß der rRNA Degradation. Alle Proben erfüllen sie Richtlinien und können für Micorarray Analysen verwendet werden.

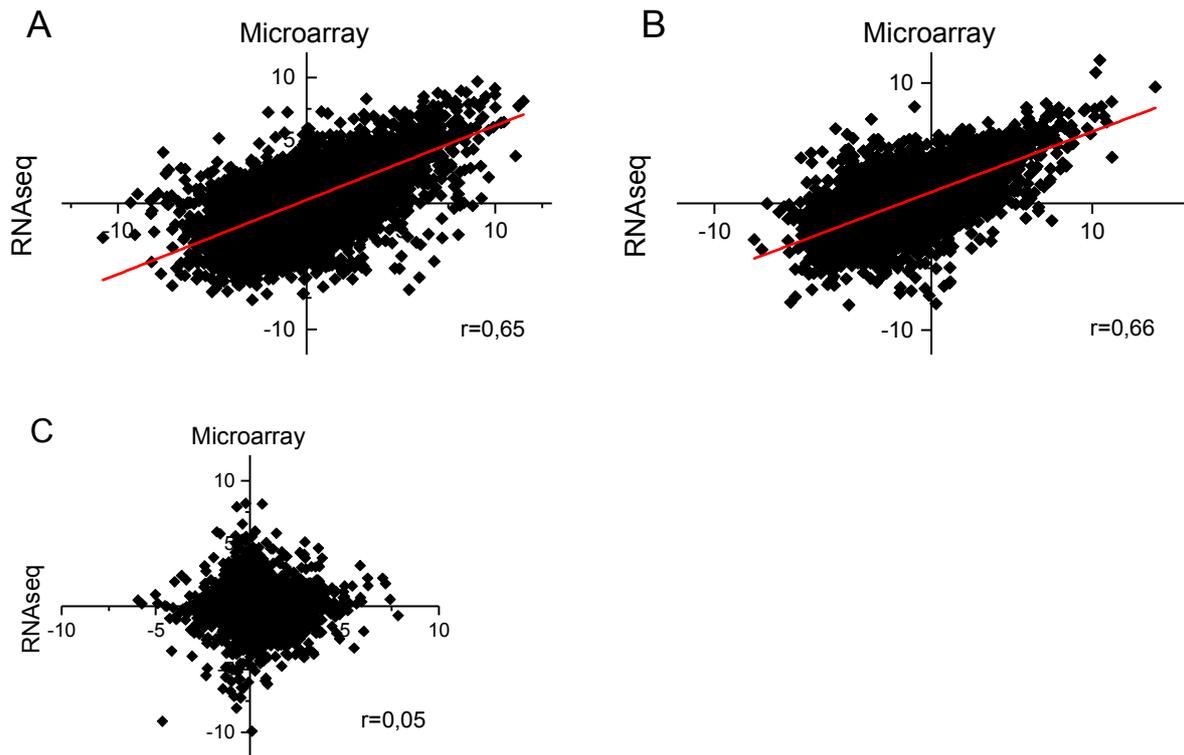
| <b>Probe</b>              | <b>260/280</b> | <b>260/230</b> | <b>25S/18S Ratio</b> | <b>RIN Faktor</b> |
|---------------------------|----------------|----------------|----------------------|-------------------|
| <b>UV 1</b>               | 2              | 2,3            | 2                    | 7,7               |
| <b>UV 2</b>               | 2,1            | 2              | 2,8                  | 7,9               |
| <b>UV 3</b>               | 2,1            | 2,3            | 1,9                  | 6,3               |
| <b>UV 4</b>               | 2,1            | 2,2            | 2,2                  | 6,9               |
| <b>AgNO<sub>3</sub> 1</b> | 2,1            | 2,1            | 1,7                  | 7,4               |
| <b>AgNO<sub>3</sub> 2</b> | 2,1            | 2,1            | 2                    | 7,6               |
| <b>AgNO<sub>3</sub> 3</b> | 2,1            | 2,3            | 2,1                  | 7,7               |
| <b>AgNO<sub>3</sub> 4</b> | 2,1            | 1,9            | 2                    | 7,5               |
| <b>B.c. 1</b>             | 2              | 2,1            | 2,5                  | 8                 |
| <b>B.c. 2</b>             | 2,1            | 2,1            | 2,4                  | 8                 |
| <b>B.c. 3</b>             | 2,1            | 1,8            | 2,4                  | 8                 |
| <b>B.c. 4</b>             | 2,1            | 2,1            | 2,5                  | 8,1               |
| <b>n.i. 1</b>             | 2,1            | 2,3            | 2,3                  | 8,2               |
| <b>n.i. 2</b>             | 2,1            | 2,1            | 2                    | 8,1               |
| <b>n.i. 3</b>             | 2,1            | 2,3            | 2                    | 8,1               |
| <b>n.i. 4</b>             | 2,1            | 2,3            | 2,1                  | 8                 |

Anschließend wurden die entsprechenden cDNAs an Agilent 8x60k Microarrays hybridisiert. Die bioinformatische Auswertung wurde erneut von Dr. Dirk Walther und Dr. Dirk Hinchä übernommen. Für 42930 Oligonukleotide konnte nach UV-C-, Silbernitrat- und *B. cinerea*-Behandlung eine veränderte Expression detektiert werden. Die Reproduzierbarkeit der vier Replikate innerhalb einer Behandlung war hoch, was hoch signifikante Aussagen über die ermittelten Daten erlaubt.

Im Vergleich zu nicht induzierten Pflanzen waren nach UV-C-Belastung 28% aller Transkripte signifikant erhöht und 27% stark reduziert vorhanden. Nach Silbernitratbehandlung waren 36% verstärkt und 28% niedriger exprimiert. In *B. cinerea*-infizierten Pflanzen konnten 4,9% hochregulierte bzw. 4,6% abregulierte Transkripte identifiziert werden (t-test,  $p$ -Wert < 0,01). Für UV-C- und Silbernitrat-belastete Proben konnte eine maximale Induktionsrate von ca. 3700 bzw. 3280-fach detektiert werden. Nach *B. cinerea*-Infektion war maximal eine 553-fache Induktion messbar. Im Vergleich zu den RNAseq-Daten waren die maximalen Induktionslevel im Microarray niedriger. Auch die Transkripte mit den höchsten Expressionsraten waren im RNAseq und Microarray verschieden (*EsSOT12*, *EsBGLU28*, *EsBGLU3* im RNAseq und Gene ohne Arabidopsis-Ortholog im Microarray).

Um detaillierte Aussagen über differenziell regulierte Gene nach Stressinduktion treffen zu können, wurden RNAseq- und Microarray-Daten miteinander verglichen und für nachfolgende Studien zusammengefasst. Dabei wurden alle Hits eliminiert, die in der jeweilig anderen Methode nicht nachweisbar waren. Wurden mehrere Transkripte eines Genes im RNAseq identifiziert, die im Microarray nicht repräsentiert waren, wurde das Transkript mit der höchsten Abundanz für weitere Studien verwendet. 14706 Transkripte konnten in beiden Analyseverfahren identifiziert werden.

In Abbildung 4.33 ist die Korrelation der Transkriptomdaten nach Fusion der Probenets dargestellt. Nach abiotischem Stress konnte eine positive Korrelation der beiden Transkriptomanalysen hergestellt werden (Pearson Koeffizient= 0,66 nach UV-C-Bestrahlung und 0,65 nach Silbernitratbelastung). Für *B. cinerea*-infizierte Proben war keine Korrelation zwischen RNAseq und Microarray erkennbar (Pearson Koeffizient= 0,05). Aufgrund der schlechten Vergleichbarkeit der *B. cinerea*-Daten in den beiden Analyseverfahren wurden im weiteren Verlauf nur Werte der UV-C- und Silbernitratbehandlung betrachtet.

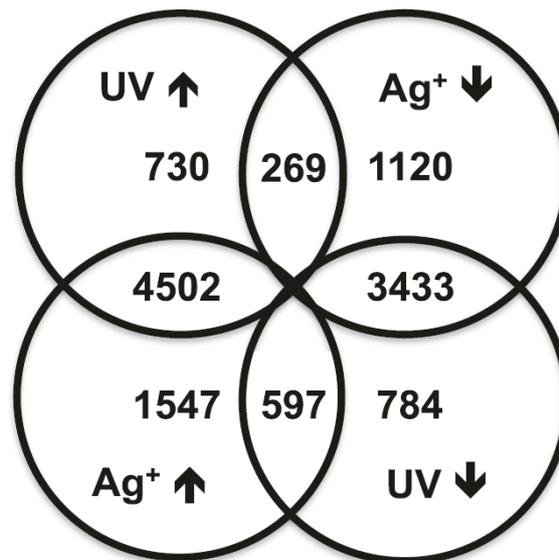


**Abbildung 4.33 Vergleich Microarray und RNAseq nach Zusammenfassung der Daten.**

Korreliert wurden Microarray- und RNAseq-Daten nach Silbernitrat- (A), UV-C- (B) oder *B. cinerea*-Behandlung (C) (Log<sub>2</sub>-fach veränderte Expression). Einbezogen wurden die 14706 ermittelten Transkripte nach Fusion der Datensets. Der Pearson-Koeffizient betrug für das UV-C-induzierte Probenstet 0,66; für das Silbernitrat-behandelte Set 0,65 und für das *B. cinerea* Set 0,05. Microarray und RNAseq korrelieren gut für abiotisch gestresste Proben. Keine Korrelation wurde für das *B. cinerea*-Set detektiert.

Von den 14706 Transkripten, die in beiden Analysemethoden identifiziert werden konnten, wiesen 88% eine signifikant veränderte Expressionsrate auf (FDR  $p$ -Wert < 0,05). In Abbildung 4.34 ist die Verteilung der differentiell regulierten Gene nach UV-C- und Silbernitratstress dargestellt. 31% der signifikant unterschiedlich abundanten Transkripte zeigten nach beiden Behandlungen ein erhöhtes Expressionslevel. 23% der Transkripte wurden durch Stressapplikation abreguliert.

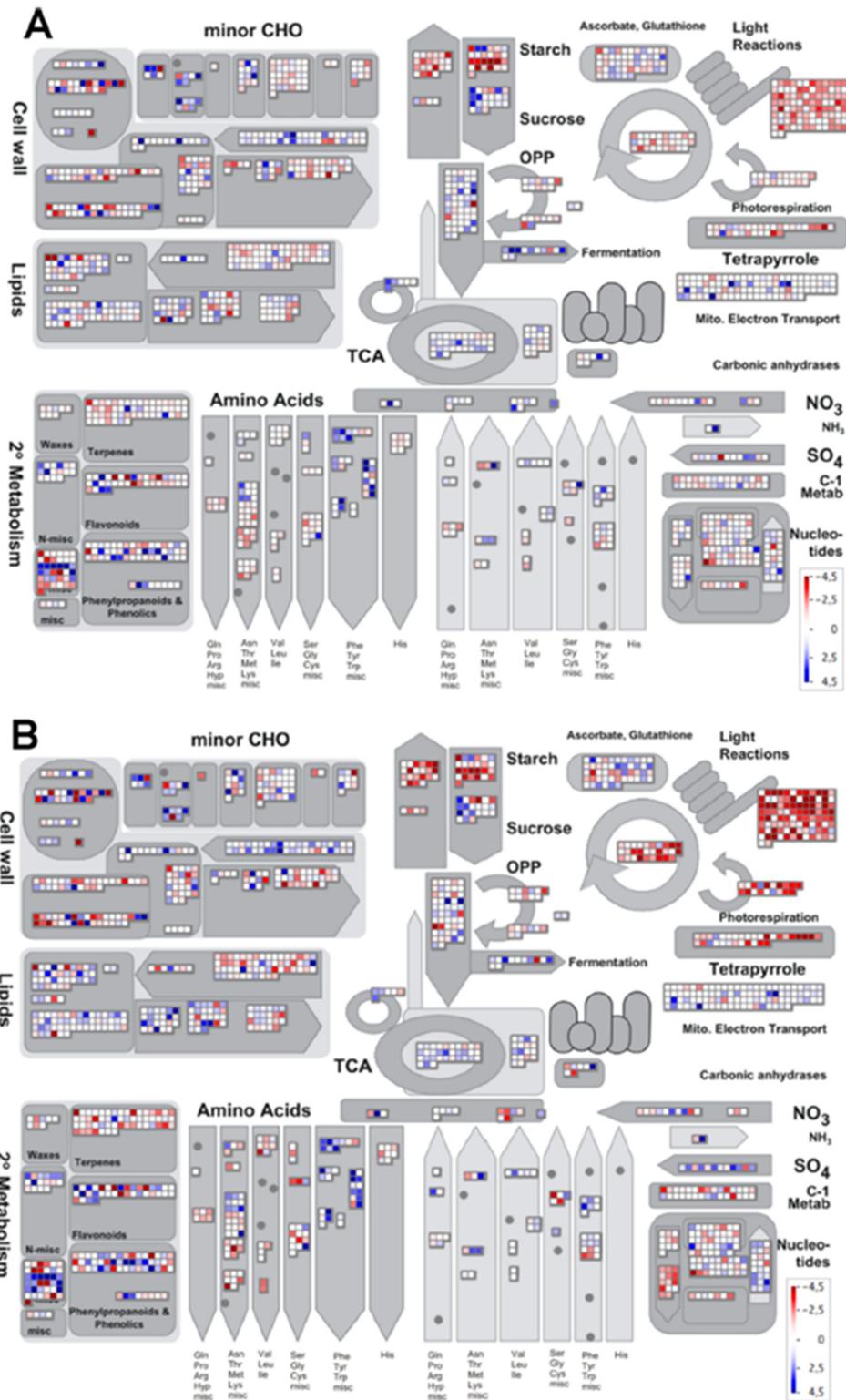
Die Mehrheit der Transkripte wies die gleiche Expressionsadaption nach UV-C- und Silbernitratstress auf. Die transkriptionelle Anpassung ausgelöst durch UV-C- und Silbernitratbehandlung scheint zu großen Teilen unabhängig von der Art des Stressors zu erfolgen.



**Abbildung 4.34 Vergleich signifikant unterschiedlich exprimierter Gene nach UV-C- und Silbernitratstress.** Nach Zusammenführung der RNAseq- und Microarray-Daten wurde das Set von 14706 Genen auf gleiche transkriptionelle Regulation untersucht. Die Mehrheit der Transkripte wiesen eine ähnliche Reaktion auf UV-C- und Silbernitratstress auf. 31% der Transkripte wurden durch beide Stressoren verstärkt exprimiert. 23% zeigten eine geringere Abundanz im Vergleich zu ungestressten Pflanzen (FDR  $p$ -Wert < 0,05). (entnommen aus Mucha *et al.* (2015))

#### 4.3.3.2. Adaptierte Genexpression in verschiedenen Stoffwechselwegen als Reaktion auf Stress

Als Reaktion auf Stress reagieren Pflanzen mit einer umfassenden transkriptionellen Umprogrammierung. Im Rahmen des in dieser Studie durchgeführten RNAseqs und Microarrays wurde dies für *E. salicigineum* genauer analysiert. In Abbildung 4.35 ist die transkriptionelle Antwort auf UV-C-Bestrahlung (A) bzw. Silbernitratbehandlung (B) schematisch abgebildet. Zur Visualisierung der Daten wurde die Software MapMan verwendet (Usadel *et al.*, 2005). Mit Hilfe dieses Programms wurden veränderte Expressionsmuster in verschiedenen Stoffwechselwegen grafisch dargestellt. Blaue Markierungen signalisieren hochregulierte Genexpression im entsprechenden Netzwerk. Rote Markierungen stehen für abregulierte Gene.



**Abbildung 4.35 MapMan Analyse der Microarray-Daten.**

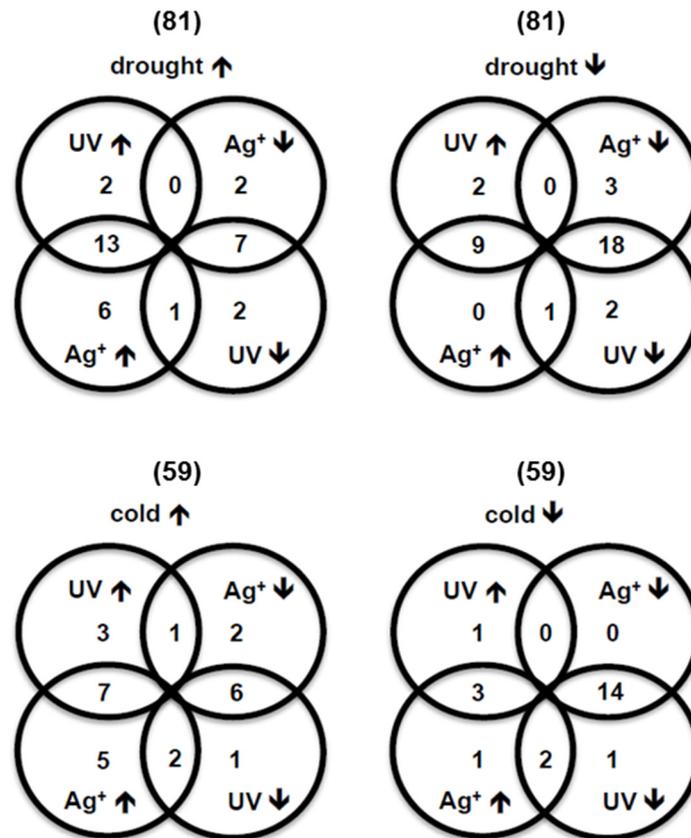
Dargestellt sind veränderte Expressionsmuster in verschiedenen Stoffwechselprozessen nach UV-C- (A) bzw. Silbernitratbelastung (B). Rote Markierungen deklarieren abregulierte Gene, blaue Markierungen stehen für hochregulierte Gene. Induktionsraten sind als  $\log_2$ -fache Expressionsänderung angeben. (Usadel *et al.*, 2005) (Mucha *et al.*, 2015)

Stark reduziert lagen Transkripte von Photosynthesegenen vor. Auch die Produktion von Stärke als Speicherstoff war drastisch reduziert nach UV-C- und Silbernitratbelastung.

Dahingegen waren zahlreiche Gene, die an der Synthese oder Modifikation von Phytohormonen beteiligt sind, stark hochreguliert. *EsSOT12* war eines der am stärksten induzierten Gene. Nach UV-C-Belastung wurde im RNAseq eine Induktionsrate vom 12417-fach und im Microarray von 815-fach detektiert (im Vergleich zu nicht gestressten Pflanzen). Das Arabidopsis-Ortholog codiert für die cytosolische Sulfotransferase 12 (*At2g03760*) und ist für die Sulfonierung von Salicylsäure (SA) verantwortlich. Nach Pathogenbefall ist *AtSOT12* essentiell für die Akkumulation von SA in der Zelle und führt zu erhöhter Resistenz. Weiterhin fungiert sulfoniertes SA als Signalmolekül für systemische Resistenzen (SAR) (Baek *et al.*, 2010). Für *AtSOT12* konnte ebenfalls eine UV-C-Induktion festgestellt werden (Ulm *et al.*, 2004). Stark induziert wurde auch *EsSOT1/EsST2a* (2132-fach induziert nach UV-C Bestrahlung bzw. 2152-fach nach Silbernitratbehandlung). Das Ortholog in *A. thaliana* *AtSOT1/AtST2a* (*AT5G07010*) codiert ebenfalls für eine Sulfotransferase, die im Gegensatz zu *AtSOT12* allerdings 11- und 12-Hydroxyjasmonsäure (JA) sulfoniert (Gidda *et al.*, 2003). Erhöhte Expressionslevel wurden auch für *EsACS2* (1-amino-cyclopropane-1-carboxylate Synthase 2, max. 1139-fach nach UV-C Induktion im RNAseq) und *EsUGT85A1* (Cytokinin-O-glucosyltransferase 2, max. 500-fach nach Silbernitratbehandlung im RNAseq) festgestellt. *AtACS2* stellt in *A. thaliana* das Schlüsselenzym während der Ethylenbiosynthese dar (Tsuchisaka und Theologis, 2004), während *AtUGT85A1* die O-Glucosylierung von trans-Zeatin und Dihydrozeatin katalysiert (Cytokinin Metabolismus)(Hou *et al.*, 2004).

Neben hormonellen Veränderungen zeigten auch Gene des halophytischen Lebensstils von *E. salsugineum* eine deutliche Reaktion auf die Applikation von UV-C- und Silbernitratstress. *EsHKT1* (Ali *et al.*, 2013) und *EsERF1* (Ellouzi *et al.*, 2014), beide codierend für Natriumtransporter, wiesen eine signifikante Induktion auf (*EsERF1* 156-fach nach UV-C-Belastung bzw. 78-fach nach Silbernitratbehandlung, im RNAseq).

Wong *et al.* (2006) untersuchten die transkriptionelle Antwort von *E. salsugineum* auf Trocken-, Kälte- und Salzstress. Sie fanden heraus, dass lediglich eine kleine Zahl der differentiell regulierten Gene auf alle drei Stressoren gleich reagierten. Vergleicht man die Studie von Wong und Kollegen (2006) mit den Ergebnissen der in dieser Arbeit durchgeführten Transkriptomanalysen fällt auf, dass UV-C- und Schwermetallbehandlung ebenfalls andere Transkriptomantworten auslösten als die zuvor getesteten abiotischen Stressoren (siehe Abbildung 4.36). Nur vereinzelt zeigten Gene nach UV-C- und Silberbehandlung die gleiche Expressionsänderung wie nach Trocken- oder Kältetestress. *E. salsugineum* weist offenbar eine differenzierte Reaktion auf verschiedene Stressoren auf.



**Abbildung 4.36** Überlappung differentiell regulierter Gene mit anderen Studien.

Verglichen wurde die Transkriptomantwort von *E. salsugineum* nach UV-C- bzw. Silbernitratstress mit Kälte- bzw. Trockenstress (Wong *et al.*, 2006). Nur eine geringe Anzahl der Gene reagierte auf alle Stressoren gleich. (aus Mucha *et al.* (2015))

Um die pflanzliche Abwehr zu induzieren, werden Gene des Citratzyklus verstärkt transkribiert (siehe Abbildung 4.35). Die im Citratzyklus gebildeten Produkte dienen anschließend als Ausgangsstoffe für Aminosäurebiosynthese und Lipidbiosynthese (Berg *et al.*, 2002). Auch diese Stoffwechselwege wurden durch abiotischen Stress stark aktiviert. Besonders eindeutig war die Induktion der aromatischen Aminosäuren (z.B. nach UV-C-Belastung: *EsASA1*: 30-fache Induktion, *EsTrp3*: 20-fache Induktion, *EsPAL2*: 23-fache Induktion; ähnliche Induktionsraten nach Silbernitratbehandlung). Als Abwehrreaktion wurden weiterhin die Lipidbiosynthese und viele Biosynthesewege des Sekundärmetabolismus aktiviert (Phenylpropanoide, Terpene und Glucosinolate). In Abschnitt 4.3.3.3 wird genauer auf die Modifizierung der Glucosinolatbiosynthese eingegangen.

## 4.3.3.3. Analyse der Transkription von an der Pflanzenabwehr beteiligten Genen

Wie bereits in Abschnitt 4.3.3.2 beschrieben, wurde die Expression zahlreicher biosynthetischer Gene des Sekundärstoffwechsels durch UV-C- und Silbernitratstress induziert.

Tryptophan als Produkt des Primärstoffwechsels ist gleichzeitig auch Substrat für die Biosynthese indolischer Glucosinolate und Phytoalexine in *A. thaliana* (Rauhut und Glawischnig, 2009). In Arabidopsis ist die Expression von Tryptophan-biosynthetischen Genen stark mit der Camalexinbiosynthese koreguliert (Zhao und Last, 1996, Rauhut *et al.*, 2009). In *E. salsugineum* konnte ebenfalls eine Induktion der typischen Tryptophan-Biosynthesegene nach UV-C- bzw. Silbernitrat detektiert werden (siehe Abschnitt 4.3.2 und Abschnitt 4.3.3). In Tabelle 4.10 ist zusammenfassend die Expressionsänderung verschiedener Gene, die an der Bildung von Abwehrstoffen beteiligt sind, dargestellt. Tryptophan-Biosynthesegene zeigten eine signifikant erhöhte Expression. *EsASA1*, als Schlüsselenzym bei der Tryptophanbiosynthese (Niyogi und Fink, 1992, Radwanski und Last, 1995), wies eine 28-fache Induktion nach UV-C-Belastung auf. Nach Silbernitratbehandlung betrug die Induktionsrate das 40-fache von nicht induzierten Pflanzen. Weiterhin wurde die Expression von *EsTSA1*, *EsTSB2* (*E. salsugineum* scheint mind. drei Kopien für dieses Gen zu besitzen), *EsPAT1* und *EsIGPS* signifikant durch abiotischen Stress aktiviert. Auch diese Enzyme sind essentiell an der Tryptophanbiosynthese beteiligt (Zhao und Last, 1996). Im Gegensatz zu *EsTSB2* (17-fache Induktion nach UV-C Behandlung), zeigte *EsTSBtype2* nach UV-C- eine signifikante Expressionsreduktion (2,5-fach reduzierte Expression im Vergleich zur Kontrolle nach UV-C).

CYP79B2 und CYP79B3 katalysieren in *A. thaliana* und wahrscheinlich auch in *E. salsugineum* den essentiellen Schritt beim Übergang vom Tryptophan- zum Indolglucosinolatstoffwechsel (Pedras und Yaya, 2010). In dem in dieser Arbeit durchgeführten RNAseq wurde eine drastische Induktion beider Synthesegene detektiert. *EsCYP79B2* zeigte eine 33-fach bzw. 42-fach erhöhte Expression nach UV-C- bzw. Silbernitratstress. *EsCYP79B3* wies eine Induktionsrate von 61-fach nach UV-C-Belastung und 33-fach nach Silbernitratbehandlung auf. Beide Gene sind auch in *E. salsugineum* an der Stressantwort beteiligt. Dies zeigte sich auch in den durchgeführten Expressionsanalysen (siehe Abschnitt 4.3.2).

In Arabidopsis ist die Biosynthese der aliphatischen und indolischen Glucosinolate gut untersucht (Sonderby *et al.*, 2010). Im *E. salsugineum*-Transkriptom konnten Orthologe für alle essentiellen Biosynthesegene identifiziert werden (siehe Tabelle 4.10). Die, für die Ausbildung der Kernstruktur indolischer Glucosinolate verantwortlichen, Gene *EsSUR1*, *EsGGP1* und *EsUGT74B1* wiesen unabhängig vom Stressor eine stark erhöhte Expressionsrate auf. Auch

verstärkt lagen Transkripte von *EsCYP83B1*, *EsSOT16*, *EsIGMT1/2/5* und *EsCYP81F1/F4* vor. Dies spricht für eine Rolle von 1-Methoxy-3-Indolylmethylglucosinolate (Pang *et al.*, 2009) als Intermediat der Phytoalexinbiosynthese in *E. salsugineum* (siehe Abschnitt 1.4.2). MYB51 reguliert in *A. thaliana* die Produktion von Indolglucosinolaten. Als Transkriptionsfaktor aktiviert es die Promotoren verschiedener für die Synthese wichtiger Gene (u.a. *ASA1*, *CYP79B2/B3*, *CYP83B1* und *SOT16*) (Gigolashvili *et al.*, 2007). In *E. salsugineum* existiert ein Ortholog zu diesem Regulator. *EsMYB51* zeigte im durchgeführten RNAseq eine deutliche erhöhte Expressionsrate (51,3-fach nach UV-C- bzw. 19,8-fach nach Silbernitratbehandlung).

Im Gegensatz zur Synthese indolischer Glucosinolate wurde die Biosynthese aliphatischer Glucosinolate in *E. salsugineum* durch UV-C- bzw. Silbernitratbehandlung reprimiert. Lediglich modifizierende Enzyme, wie *EsFMO GS-OX4* oder *EsFMO GS-OX5*, waren transkriptionell induziert. Auch *EsSOT18* wurde verstärkt exprimiert. In *A. thaliana* katalysiert das Enzym den finalen Schritt der aliphatischen Glucosinolatbiosynthese (Piotrowski *et al.*, 2004). Ob *EsSOT18* auf Grund des unterschiedlichen Expressionsmusters eine andere Funktion übernimmt als das Ortholog in *A. thaliana* müsste in weiteren Studien untersucht werden.

In Arabidopsis werden neben indolischen und aliphatischen Glucosinolaten auch Phenylpropanoide, wie zum Beispiel Flavonoide, Lignine oder Zimtsäuren, als Reaktion auf Stress gebildet (Dixon *et al.*, 2002c). Identifizierte Orthologe in *E. salsugineum* zeigten eine deutlich erhöhte Expression. *EsPAL1* und *EsPAL2* waren nach UV-C Stress 23,3 bzw. 20-fach stärker exprimiert als in unbehandelten Pflanzen. In Arabidopsis katalysieren die Enzyme den ersten Schritt im Phenylpropanoidmetabolismus, die Umwandlung von Phenylalanin zu Zimtsäure (Fraser und Chapple, 2011). *EsCYP73A5* (Ortholog der Zimsäure-4-hydroxylase) wies ein 22,2-fach höheres Expressionslevel nach UV-C-Belastung auf. Nach Silbernitratstress betrug die Induktionsrate 15,1-fach. Das *E. salsugineum*-Ortholog zu *CAD5*, in Arabidopsis an der Ligninbiosynthese beteiligt (Fraser und Chapple, 2011), lag nach Applikation von abiotischem Stress ca. 30-fach erhöht vor. Tronchet *et al.* (2010) postulierten zusätzlich in *A. thaliana* eine Beteiligung von *CAD5* an der Pflanzenabwehr nach Pathogenbefall.

Neben Genen der Ligninbiosynthese konnten auch Orthologe zu Flavonoidbiosynthesegenen identifiziert werden (Flavonoidbiosynthese in *A. thaliana* wurde von Winkel-Shirley (2001) detailliert beschrieben). Die zugehörigen *E. salsugineum*-Orthologe wiesen ein deutlich reduziertes Expressionslevel auf. Besonders auffällig ist die drastische Abregulation von *EsTT4* nach UV-C Bestrahlung. Das Transkript liegt in 16,4-fach geringerer Menge vor als in der nicht gestressten Kontrolle. In Arabidopsis wird *TT4* durch UV-C Licht stark hochreguliert (Kusano *et al.*, 2011). Offenbar induziert *E. salsugineum* eine von *A. thaliana* abweichende Reaktion auf abiotischen Stress.

## Ergebnisse

**Tabelle 4.10 Expressionsanalyse von *E. saslugineum* Genen, die an der Biosynthese von Abwehrstoffen beteiligt sind.**

Untersucht wurde die Reaktion verschiedener biosynthetischer Gene auf UV-C und Silbernitratstress. Dabei wurde die Synthese von Tryptophan, Glucosinolaten und Phenylpropanoiden betrachtet. Zu jedem *E. saslugineum*-Transkript wurde das identifizierte Arabidopsis-Ortholog, die generelle Reaktion auf die beiden Stressoren, die genaue Induktionsrate (im Vergleich zu nicht induzierten Pflanzen, n.i.) und der *p*-Wert angegeben. + entspricht einer erhöhten Transkriptmenge, - entspricht einer reduzierten Transkriptmenge. (übersetzt und modifiziert aus Mucha *et al.* (2015))

| Transkript                                    | Ath Ortholog | Symbol         | Annotierung                          | UV-C | AgNO <sub>3</sub> | Induktion log <sub>2</sub> -fach (UV/n.i.) | FDR <i>p</i> -Wert | Induktion log <sub>2</sub> -fach (Ag/n.i.) | FDR <i>p</i> -Wert |
|---|--------------|----------------|--------------------------------------|------|-------------------|--|--------------------|--|--------------------|
| <b>Tryptophan Biosynthese</b>                 |              |                |                                      |      |                   |  |                    |  |                    |
| Thhalv10013041m                               | AT5G05730.1  | ASA1,TRP5,WEI2 | Anthranilat-Synthase 1               | +    | +                 | 4,83                                       | 0,000              | 5,31                                       | 0,000              |
| Thhalv10010558m                               | AT3G54640.1  | TRP3,TSA1      | Tryptophan-Synthase alpha-Kette      | +    | +                 | 4,34                                       | 0,000              | 3,76                                       | 0,000              |
| Thhalv10013439m                               | AT4G27070.1  | TSB2           | Tryptophan-Synthase 2                | +    | +                 | 4,07                                       | 0,000              | 3,13                                       | 0,000              |
| Thhalv10025097m                               | AT4G27070.1  | TSB2           | Tryptophan-Synthase 2                | +    | +                 | 3,37                                       | 0,000              | 2,47                                       | 0,000              |
| Thhalv10013857m                               | AT5G17990.1  | PAT1,TRP1      | Tryptophan-Biosynthese 1             | +    | +                 | 2,26                                       | 0,000              | 3,26                                       | 0,000              |
| Thhalv10014630m                               | AT4G27070.1  | TSB2           | Tryptophan-Synthase 2                | +    | +                 | 1,67                                       | 0,002              | 1,11                                       | 0,002              |
| Thhalv10002557m                               | AT2G04400.1  | IGPS           | Indol-3-Glycerol-Phosphatsynthase    | +    | +                 | 1,16                                       | 0,000              | 1,40                                       | 0,000              |
| Thhalv10016377m                               | AT2G29690.1  | ASA2           | Anthranilat-Synthase 2               | -    | -                 | -0,20                                      | 0,356              | -0,43                                      | 0,004              |
| Thhalv10027732m                               | AT5G38530.1  | TSBtype2       | Tryptophan-Synthase 2                | -    | -                 | -1,47                                      | 0,000              | -1,40                                      | 0,000              |
| <b>Biosynthese aliphatischer Glucosinolat</b> |              |                |                                      |      |                   |  |                    |  |                    |
| Thhalv10023453m                               | AT1G62570.1  | FMO GS-OX4     | Glucosinolat-S-Oxygenase 4           | +    | +                 | 4,12                                       | 0,001              | 3,92                                       | 0,001              |
| Thhalv10007582m                               | AT1G12140.1  | FMO GS-OX5     | Glucosinolat-S-Oxygenase 5           | +    | +                 | 2,12                                       | 0,000              | 1,48                                       | 0,000              |
| Thhalv10018813m                               | AT1G74090.1  | ATST5B,SOT18   | Sulfotransferase. 18                 |      |                   | 2,12                                       | 0,000              | 1,75                                       | 0,000              |
| Thhalv10007073m                               | AT1G18500.1  | IPMS1,MAML-4   | Methylthioalkylmalat-Synthase-like 4 |      |                   | 0,31                                       | 0,084              | 0,32                                       | 0,165              |
| Thhalv10004037m                               | AT5G23010.1  | IMS3,MAM1      | Methylthioalkylmalat-Synthase 1      |      | -                 | -0,60                                      | 0,055              | -2,92                                      | 0,000              |
| Thhalv10017125m                               | AT2G43100.1  | ATLEUD1,IPMI2  | Isopropylmalat-Isomerase 2           | -    |                   | -0,97                                      | 0,002              | -1,22                                      | 0,003              |
| Thhalv10013695m                               | AT5G14200.1  | IMD1           | Isopropylmalat-Dehydrogenase 1       | -    | -                 | -1,97                                      | 0,000              | -1,91                                      | 0,000              |
| Thhalv10028851m                               | AT4G12030.2  | BASS5,BAT5     | Gallensäuretransporter 5             | -    | -                 | -2,05                                      | 0,007              | -4,56                                      | 0,000              |
| Thhalv10024982m                               | AT4G13770.1  | CYP83A1,REF2   | CYP83F1                              | -    | -                 | -2,79                                      | 0,000              | -3,97                                      | 0,000              |
| Thhalv10007301m                               | AT1G16410.1  | CYP79F1        | CYP79F1                              | -    | -                 | -2,92                                      | 0,005              | -5,72                                      | 0,000              |
| Thhalv10013952m                               | AT5G07690.1  | MYB29          | Transkriptionsfaktor MYB29           | -    | -                 | -3,22                                      | 0,002              | -4,35                                      | 0,000              |
| Thhalv10004406m                               | AT5G61420.2  | MYB28,HAG1     | Transkriptionsfaktor MYB28           | -    | -                 | -5,60                                      | 0,000              | -6,10                                      | 0,001              |

## Ergebnisse

### Allgemeine und indolische Glucosinolat Biosynthese

|                 |             |                |                              |   |   |       |       |      |       |
|-----------------|-------------|----------------|------------------------------|---|---|-------|-------|------|-------|
| Thhalv10007957m | AT1G21100.1 | IGMT1          | O-Methyltransferase          | + | + | 5,97  | 0,000 | 4,54 | 0,001 |
| Thhalv10000114m | AT2G22330.1 | CYP79B3        | CYP79B3                      | + | + | 5,92  | 0,000 | 5,05 | 0,000 |
| Thhalv10008152m | AT1G18570.1 | AtMYB51,HIG1   | Transkriptionsfaktor MYB51   | + | + | 5,68  | 0,000 | 4,31 | 0,000 |
| Thhalv10024861m | AT4G39950.1 | CYP79B2        | CYP79B2                      | + | + | 5,06  | 0,000 | 5,38 | 0,000 |
| Thhalv10007964m | AT1G21120.1 | IGMT2          | O-Methyltransferase          | + | + | 4,93  | 0,000 | 2,70 | 0,001 |
| Thhalv10018795m | AT1G74100.1 | ATST5A,SOT16   | Sulfotransferase 16          | + | + | 4,54  | 0,000 | 4,45 | 0,000 |
| Thhalv10024979m | AT4G37410.1 | CYP81F4        | CYP81F4                      | + | + | 4,52  | 0,000 | 5,27 | 0,000 |
| Thhalv10008073m | AT1G18590.1 | ATST5C,SOT17   | Sulfotransferase 17          | + | + | 4,07  | 0,000 | 2,59 | 0,002 |
| Thhalv10026067m | AT4G30530.1 | GGP1           | Gamma-glutamyl peptidase 1   | + | + | 3,31  | 0,000 | 3,55 | 0,000 |
| Thhalv10001994m | AT2G20610.1 | SUR1,ALF1,RTY1 | <i>Superroot 1</i>           | + | + | 3,22  | 0,000 | 2,48 | 0,000 |
| Thhalv10018739m | AT1G76790.1 | IGMT5          | O-Methyltransferase          | + | + | 2,63  | 0,001 | 3,03 | 0,000 |
| Thhalv10007574m | AT1G24100.1 | UGT74B1        | UDP-Glucosyltransferase 74B1 | + | + | 2,44  | 0,000 | 2,15 | 0,000 |
| Thhalv10024981m | AT4G37430.1 | CYP81F1        | CYP81F1                      |   | + | 1,99  | 0,002 | 4,94 | 0,000 |
| Thhalv10004064m | AT4G31500.1 | CYP83B1,SUR2   | CYP83B1                      | + | + | 1,70  | 0,001 | 2,06 | 0,000 |
| Thhalv10027443m | AT4G37400.1 | CYP81F3        | CYP81F3                      |   | + | -3,97 | 0,000 | 1,14 | 0,043 |

### Phenylpropanoid Biosynthese

|                 |             |              |                                 |   |   |       |       |       |       |
|-----------------|-------------|--------------|---------------------------------|---|---|-------|-------|-------|-------|
| Thhalv10025563m | AT4G34230.1 | CAD5         | Cinnamoylalkoholdehydrogenase 5 | + | + | 4,90  | 0,000 | 4,92  | 0,000 |
| Thhalv10016314m | AT2G37040.1 | PAL1         | PHE Ammoniumlyase 1             | + | + | 4,54  | 0,000 | 4,32  | 0,000 |
| Thhalv10010153m | AT3G53260.1 | ATPAL2,PAL2  | PHE Ammoniumlyase 2             | + | + | 4,47  | 0,000 | 4,08  | 0,000 |
| Thhalv10016545m | AT2G30490.1 | C4H,CYP73A5  | Zimtsäure-4-Hydroxylase         | + | + | 4,47  | 0,000 | 3,92  | 0,000 |
| Thhalv10018849m | AT1G80820.1 | CCR2         | Cinnamoyl-CoA-Reduktase         | + | + | 4,38  | 0,000 | 3,95  | 0,000 |
| Thhalv10016544m | AT2G30490.1 | CYP73A5,REF3 | Zimtsäure-4-Hydroxylase         | + | + | 4,34  | 0,000 | 4,28  | 0,000 |
| Thhalv10020406m | AT3G21230.1 | 4CL5         | 4-Coumarat-CoA-Ligase 5         | + | + | 2,86  | 0,000 | 1,30  | 0,000 |
| Thhalv10001440m | AT2G43820.1 | SGT1,UGT74F2 | UDP-Glucosyltransferase 74F2    | + | + | 2,58  | 0,001 | 4,45  | 0,000 |
| Thhalv10004662m | AT5G08640.1 | FLS1         | Flavonol-Synthase 1             | + | + | 2,41  | 0,003 | 0,80  | 0,026 |
| Thhalv10016538m | AT2G40890.1 | CYP98A3      | CYP98A3                         | + | + | 2,32  | 0,001 | 2,10  | 0,000 |
| Thhalv10011357m | AT1G51680.3 | 4CL1         | 4-Coumarat-CoA-Ligase 1         | + | + | 1,85  | 0,002 | 1,35  | 0,000 |
| Thhalv10010658m | AT3G55120.1 | A11,CFI,TT5  | Chalcon-Flavanon-Isomerase      | + | + | 1,76  | 0,001 | 2,04  | 0,000 |
| Thhalv10024928m | AT4G36220.1 | CYP84A1,FAH1 | ferulic acid 5-hydroxylase 1    | + | + | 1,51  | 0,002 | 1,83  | 0,000 |
| Thhalv10026028m | AT4G34050.1 | CCoAOMT1     | SAM-dependent methyltransferase | + |   | 0,99  | 0,010 | 0,04  | 0,779 |
| Thhalv10000324m | AT3G21230.1 | 4CL5         | 4-coumarate:CoA ligase 5        |   | + | 0,85  | 0,021 | 0,75  | 0,001 |
| Thhalv10008111m | AT1G15950.1 | CCR1         | cinnamoyl coa reductase 1       | + |   | 0,76  | 0,008 | 0,15  | 0,447 |
| Thhalv10000513m | AT3G21230.1 | 4CL5         | 4-coumarate:CoA ligase 5        |   |   | 0,27  | 0,533 | -0,03 | 0,957 |
| Thhalv10018769m | AT1G72680.1 | CAD1         | cinnamyl-alcohol dehydrogenase  |   | - | -0,15 | 0,461 | -0,23 | 0,050 |
| Thhalv10022462m | AT1G65060.1 | 4CL3         | 4-coumarate:CoA ligase 3        |   | - | -0,25 | 0,141 | -0,55 | 0,004 |

## Ergebnisse

|                 |             |                 |                               |   |   |       |       |       |       |
|-----------------|-------------|-----------------|-------------------------------|---|---|-------|-------|-------|-------|
| Thhalv10020439m | AT3G21230.1 | 4CL5            | 4-coumarate:CoA ligase 5      | - | - | -0,83 | 0,015 | -0,93 | 0,004 |
| Thhalv10027317m | AT4G36220.1 | CYP84A1,FAH1    | Ferulasäure-5-hydroxylase 1   |   |   | -0,98 | 0,338 | -1,38 | 0,170 |
| Thhalv10013289m | AT5G07990.1 | CYP75B1,TT7     | CYP75B1                       |   |   | -1,26 | 0,080 | -1,16 | 0,084 |
| Thhalv10004668m | AT5G08640.1 | ATFLS1,FLS,FLS1 | Flavonol-Synthase 1           | - | - | -1,43 | 0,005 | -2,38 | 0,002 |
| Thhalv10005442m | AT1G43620.1 | TT15,UGT80B1    | UDP-Glycosyltransferase 80B1  | - | + | -1,72 | 0,000 | 0,34  | 0,008 |
| Thhalv10014054m | AT5G08640.1 | FLS1            | Flavonol-Synthase 1           | - |   | -2,67 | 0,000 | -2,92 | 0,001 |
| Thhalv10013745m | AT5G13930.1 | CHS,TT4         | Chalcon- und Stilben-Synthase | - | - | -4,04 | 0,000 | -3,32 | 0,005 |

In *A. thaliana* werden nach Pathogenbefall gebildete Glucosinolate durch  $\beta$ -Glucosidasen (Myrosinasen) aktiviert. Im nicht gestressten Zustand sind Glucosinolate und  $\beta$ -Glucosidasen in getrennten Zelltypen oder Zellkompartimenten gespeichert (Thangstad *et al.*, 2004, Nakano *et al.*, 2017). Durch Verwundung des Gewebes (z.B. Frassschäden) gelangen Enzym und Substrat zusammen und durch Hydrolyse entsteht ein hoch reaktives Aglycon, was zu zahlreichen toxischen Produkten umgewandelt wird (z.B. Isothiocyanate und Nitrile) (Lambrix *et al.*, 2001b). Die Spaltung von Indolglucosinolaten wird bevorzugt durch Pen2 katalysiert (Bednarek *et al.*, 2009, Clay *et al.*, 2009). Auch in *E. salsugineum* wurden zahlreiche  $\beta$ -Glucosidasen identifiziert (siehe Tabelle 4.11). Einige zeigten eine deutliche erhöhte Expressionsrate nach UV-C- bzw.- Silbernitratstress. Darunter waren *EsPen2*, *EsBGLU18-1*, *EsBGLU18-2*, *EsBGLU27*, *EsBGLU28*, *ESBGLU32* und *EsBGLU46*. *EsBGLU18-1* und *EsBGLU18-2* (in *E. salsugineum* wurden zwei Orthologe identifiziert) wiesen eine deutliche Transkriptzunahme nach Silbernitratbehandlung auf (40-fach bzw. 613-fach Induktion). Die Expression von *EsPen2* wurde durch UV-C-Bestrahlung 5,3-fach und nach Silbernitratbehandlung 8,6-fach induziert. Beide *EsBGLU18*-Orthologe wiesen nach Silbernitratstress stark erhöhte Expressionslevel auf (39,7-fach bzw. 613,1-fach). *EsBGLU18-2* zeigte auch nach UV-C-Belastung eine 3-fache Induktion. Im Vergleich zu *EsBGLU18-1* war das Expressionslevel äußerst gering. Im nicht gestressten Zustand wurden nur zwei *reads* detektiert. Nach UV-C-Induktion wurden sechs *reads* identifiziert (3-fach Induktion). Das Transkript von *EsBGLU18-1* lag auch in nicht gestressten Pflanzen vor (4823 *reads*). Die Expression wurde durch Stress zusätzlich aktiviert (195299 *reads* nach Silbernitratbehandlung).

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden potentielle Kandidatengene ausgewählt und auf ihre Beteiligung an der Wasalexinbiosynthese untersucht.

## Ergebnisse

**Tabelle 4.11 Expressionsanalyse von  $\beta$ -Glucosidasen in *E. saslugineum*.**

Untersucht wurde die Reaktion verschiedener  $\beta$ -Glucosidasen auf UV-C und Silbernitratbehandlung. Zu jedem *E. saslugineum* Transkript wurde das identifizierte Arabidopsis-Ortholog, die generelle Reaktion auf die beiden Stressoren, die genaue Induktionsrate (im Vergleich zu nicht induzierten Pflanzen, n.i.) und der *p*-Wert angegeben + beschreibt erhöhte Transkriptmenge, - beschreibt verringerte Transkriptmenge. (modifiziert aus Mucha et al. (2015))

| Transkript      | Ath Ortholog | Symbol       | UV-C | AgNO <sub>3</sub> | Induktion log <sub>2</sub> -<br>fach (UV/n.i.) | FDR <i>p</i> -Wert | Induktion log <sub>2</sub> -<br>fach (UV/n.i.) | FDR <i>p</i> -Wert |
|-----------------|--------------|--------------|------|-------------------|--|--------------------|--|--------------------|
| Thhalv10006515m | AT4G27830.1  | BGLU10       | +    |                   | 1,80   | 0,001              | -1,56  | 0,000              |
| Thhalv10006510m | AT4G27830.1  | BGLU10       | +    |                   | 1,42   | 0,000              | -1,94  | 0,000              |
| Thhalv10005908m | AT4G27830.1  | BGLU10       | -    |                   | -2,08  | 0,000              | -1,85  | 0,000              |
| Thhalv10001447m | AT2G44450.1  | BGLU15       | +    | +                 | 1,14   | 0,003              | 2,08   | 0,000              |
| Thhalv10011384m | AT1G52400.1  | BGLU18       | -    | +                 | -0,93  | 0,000              | 5,31   | 0,000              |
| Thhalv10011385m | AT1G52400.1  | BGLU18       | +    | +                 | 1,74   | 0,000              | 9,26   | 0,000              |
| Thhalv10020508m | AT3G09260.1  | BGLU23,PYK10 |      | +                 | 0,18   | 0,650              | 1,20   | 0,045              |
| Thhalv10020496m | AT3G03640.1  | BGLU25,GLUC  |      | +                 | -0,13  | 0,582              | 1,46   | 0,001              |
| Thhalv10001354m | AT2G44490.1  | BGLU26,PEN2  | +    | +                 | 2,36   | 0,000              | 3,11   | 0,000              |
| Thhalv10005886m | AT3G60120.1  | BGLU27       | +    | +                 | 6,77   | 0,000              | 7,98   | 0,000              |
| Thhalv10001756m | AT2G44460.1  | BGLU28       | +    | +                 | 3,48   | 0,005              | 11,91  | 0,000              |
| Thhalv10002501m | AT4G22100.1  | BGLU3        | -    | -                 | -1,19  | 0,036              | -0,22  | 0,547              |
| Thhalv10004297m | AT4G22100.1  | BGLU3        | -    | -                 | -1,30  | 0,000              | -2,00  | 0,000              |
| Thhalv10028552m | AT4G22100.1  | BGLU3        | -    | -                 | -1,85  | 0,000              | -1,19  | 0,000              |
| Thhalv10002493m | AT4G22100.1  | BGLU3        | -    |                   | -2,57  | 0,000              | -1,31  | 0,001              |
| Thhalv10005858m | AT3G60140.1  | BGLU30,SRG2  |      | +                 | 0,50   | 0,566              | 6,19   | 0,000              |
| Thhalv10018387m | AT5G24550.1  | BGLU32       | +    | +                 | 5,96   | 0,000              | 6,62   | 0,000              |
| Thhalv10002474m | AT5G26000.1  | BGLU38,TGG1  |      |                   | -0,37  | 0,529              | -0,38  | 0,598              |
| Thhalv10004165m | AT5G26000.1  | BGLU38,TGG1  |      |                   | -0,68  | 0,303              | -0,73  | 0,375              |
| Thhalv10003954m | AT5G26000.1  | BGLU38,TGG1  |      |                   | -1,29  | 0,085              | -0,88  | 0,219              |
| Thhalv10007404m | AT1G26560.1  | BGLU40       | +    | +                 | 2,11   | 0,000              | 2,54   | 0,000              |
| Thhalv10027734m | AT5G36890.1  | BGLU42       | -    |                   | -1,09  | 0,000              | 0,24   | 0,001              |
| Thhalv10020536m | AT3G18080.1  | BGLU44       |      |                   | 1,81   | 0,002              | 1,01   | 0,006              |
| Thhalv10023411m | AT1G61820.1  | BGLU46       | +    | +                 | 2,81   | 0,005              | 7,02   | 0,000              |

4.3.3.4. Potentielle Kandidatengene für die Wasalexinbiosynthese (qPCR)

Anhand der durchgeführten Transkriptomanalysen wurden Kandidatengene ausgewählt, die an der Wasalexinbiosynthese beteiligt sein könnten. Zunächst wurde der Fokus auf Methyltransferasen und  $\beta$ -Glucosidasen gelegt. Bei der Auswahl wurden Gene berücksichtigt, die im nicht induzierten Zustand kaum transkribiert, nach Stressapplikation allerdings sehr stark exprimiert wurden und Gene, die bereits im ungestressten Zustand eine hohe Transkriptmenge aufwiesen und deren Expression durch Stress weiter aktiviert wurde (siehe Tabelle 4.12). Zu sehen ist, dass in *E. salsugineum* drei Orthologe der *IGMT1* von *A. thaliana* identifiziert wurden. Alle drei wiesen eine induzierte Transkription nach UV-C- bzw. Silbernitratbehandlung auf, wobei *EsIGMT1.3* (Thhalv10002019m) vergleichsweise wenig transkribiert wurde. Zusätzlich zu den *IGMTs* wurden vier weitere O-Methyltransferasen anhand ihres Expressionsmusters in weitere Tests eingeschlossen. At1G33030 zeigte in Arabidopsis eine starke Koregulation zu Camalexin-spezifischen Enzymen (Pearson Korrelation zu CYP71B15=0,6; zu CYP71A13=0,52). Möglicherweise spielt das orthologe Enzym auch während der Wasalexinbiosynthese eine Rolle. Das Verhalten verschiedener  $\beta$ -Glucosidasen wurde bereits in Abschnitt 4.3.3.4 beschrieben. Auch in diesem Fall wurden Kandidaten gewählt, die eine deutliche Expressionsinduktion nach UV-C- bzw. Silbernitratbehandlung zeigten. Weiterhin wurde der Transkriptionsfaktor *EsWRKY33* in die folgende Analyse einbezogen. In Arabidopsis bindet WRKY33 direkt an den Promotor von *CYP71B15* und aktiviert die Transkription (Qiu *et al.*, 2008). Ob *EsWRKY33* direkt an Gene der Phytoalexinbiosynthese bindet, muss noch untersucht werden.

**Tabelle 4.12 Zusammenfassung der potentiell an der Wasalexinbiosynthese beteiligten Gene.**

Ausgewählt wurden Methyltransferasen und  $\beta$ -Glucosidasen anhand ihres Expressionsmusters. Angegeben sind die tatsächlich ermittelten *reads* in Kontrollpflanzen (n.i.), UV-C- oder mit Silbernitrat behandelten Pflanzen und das zugehörige *A. thaliana* Ortholog.

|                           | n.i. | UV-C  | AgNO <sub>3</sub> | Ath Ortholog              |
|---------------------------|------|-------|-------------------|---------------------------|
| <b>Methyltransferasen</b> |      |       |                   |                           |
| Thhalv10018739m           | 1747 | 42057 | 94252             | IGMT5                     |
| Thhalv10007964m           | 434  | 9009  | 9298              | IGMT2                     |
| Thhalv10007957m           | 165  | 10234 | 6500              | IGMT1                     |
| Thhalv10007945m           | 438  | 20212 | 13750             | IGMT1                     |
| Thhalv10002019m           | 13   | 6     | 95                | IGMT1                     |
| Thhalv10008040m           | 53   | 1777  | 1400              | AT1G33030                 |
| Thhalv10010557m           | 4    | 717   | 742               | AT3G54150                 |
| Thhalv10018786m           | 26   | 3122  | 6523              | kein eindeutiges Ortholog |
| Thhalv10018220m           | 5253 | 27889 | 25075             | AT1G78240, TSD2           |

**Glucosidasen**

|                 |      |       |        |              |
|-----------------|------|-------|--------|--------------|
| Thhalv10011384m | 4823 | 2272  | 195299 | BGLU18       |
| Thhalv10011385m | 2    | 6     | 1246   | BGLU18       |
| Thhalv10018387m | 729  | 31451 | 52650  | BGLU32       |
| Thhalv10005886m | 65   | 6386  | 16702  | BGLU27       |
| Thhalv10001354m | 2401 | 11117 | 21129  | BGLU26, PEN2 |
| Thhalv10001756m | 1    | 10    | 3901   | BGLU28       |
| Thhalv10023411m | 1    | 157   | 964    | BGLU46       |

**Transkriptionsfaktoren**

|                 |   |     |    |        |
|-----------------|---|-----|----|--------|
| Thhalv10008985m | 2 | 112 | 68 | WRKY33 |
|-----------------|---|-----|----|--------|

Nach erfolgter Identifizierung der Kandidatengene wurden diese erneut gezielt auf ihr Expressionsverhalten nach Stress untersucht. Dies erfolgte mit Hilfe von RT-qPCR. Entsprechend den MIQE-Richtlinien wurden für die Normalisierung der Daten drei Referenzgene ausgewählt und zur einem geometrischen Mittel zusammengefasst (Vandesompele *et al.*, 2002, Bustin *et al.*, 2009). Die Wahl erfolgte anhand des innerhalb dieser Arbeit durchgeführten RNAseq. Es wurde darauf geachtet, dass die gewählten Gene in allen Belastungsarten eine annähernd gleichbleibende Expressionsstärke zeigten. Für *EsProtein Phosphatase 2A Untereinheit A2 (EsPP2A2, Thhalv10003886m)*, *EsYellow-Leaf-Specific Gene 8 (EsYLS8, Thhalv10014963m)* und *EsActin1 (EsACT1, Thhalv10016809m)* konnte dies bestätigt werden (siehe Tabelle 4.13).

**Tabelle 4.13 Übersicht über verwendete Referenzgene für RT-qPCR.**

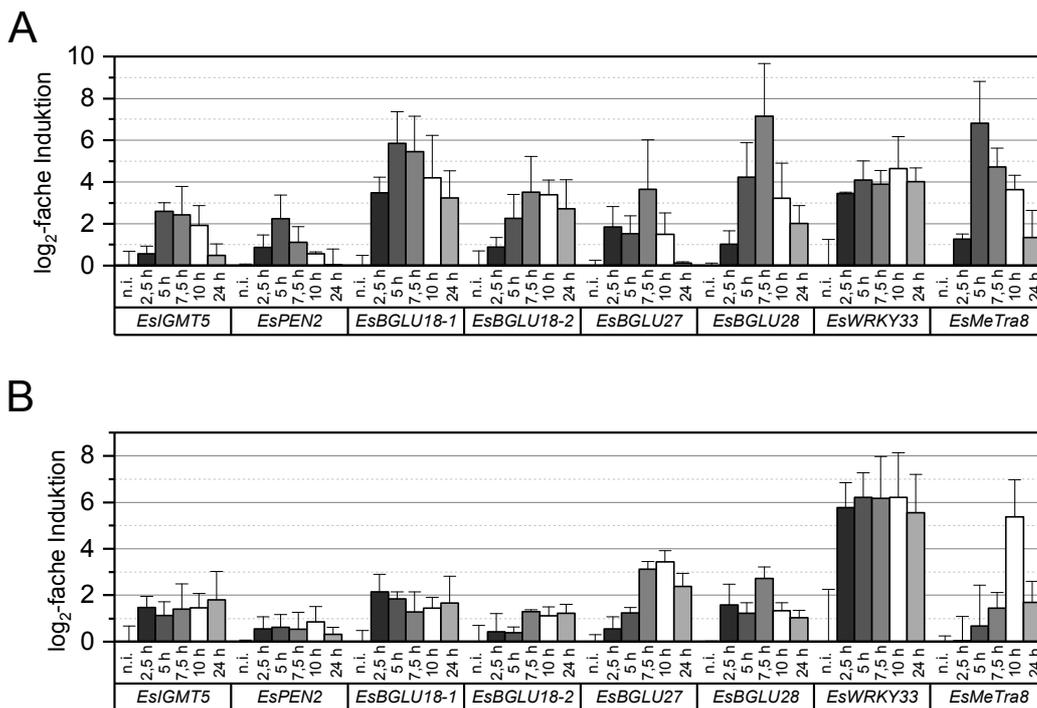
Gewählt wurden drei Referenzgene, die im durchgeführten RNAseq für alle Bedingungen gleich starke Expression zeigten. Dies war der Fall bei *EsProtein Phosphatase 2A Untereinheit A2 (EsPP2A2, Thhalv10003886m)*, *EsYellow-Leaf-Specific Gene 8 (EsYLS8, Thhalv10014963m)* und *EsActin1 (EsACT1, Thhalv10016809m)*. Für alle drei Gene wurden die tatsächlich detektierten reads aufgelistet.

|                        | n.i. | UV   | B.c. | AgNO <sub>3</sub> | At Nummer   | Name   |
|------------------------|------|------|------|-------------------|-------------|--------|
| <b>Thhalv10003886m</b> | 4045 | 3352 | 3857 | 5044              | AT3G25800.1 | PP2AA2 |
| <b>Thhalv10014963m</b> | 378  | 239  | 444  | 363               | AT5G08290.1 | YLS8   |
| <b>Thhalv10016809m</b> | 2227 | 1204 | 1691 | 1395              | AT2G37620.1 | ACT1   |

Analysiert wurden jeweils drei biologische und zwei technischen Wiederholungen. Nicht alle untersuchten Kandidatengene zeigten in diesem Experiment erneut eine differenzielle Expression nach UV-C- bzw. Silbernitratstress. In Abbildung 4.37 ist die Induktion der Transkription nach Silbernitrat- (A) und UV-C-Belastung (B) für positiv getestete Gene dargestellt. *E. salsugineum*-Orthologe von *IGMT5*, *PEN2*, *BGLU18-1*, *BGLU18-2*, *EsBGLU27*,

*EsBGLU28* und *WRKY33* und *EsMeTra8* wiesen eine transkriptionelle Induktion auf. Durch Silbernitratstress wurde die Expression aktiviert und erreichte nach 5 h bis 7,5 h ihr Maximum. Diese Beobachtung könnte auf eine Beteiligung an der Phytoalexinbiosynthese hinweisen, da auch die Expression von *EsASA1* und *EsCYP79B2* als koregulierte Gene nach 7,5 h ihren Höhepunkt erreicht (siehe Abschnitt 4.3.2). Tendenziell war die Induktion durch Silbernitrat stärker und eindeutiger als durch UV-C. Die stärkste Induktion wies allerdings der Transkriptionsfaktor *EsWRKY33* nach UV-C-Belastung auf. Das Transkript lag 74-fach erhöht vor.

Nachdem die differentielle Expression für die sieben Kandidatengene bestätigt werden konnte, sollte *in planta* eine potentielle Beteiligung an der Wasalexinbiosynthese näher untersucht werden. Besondere Aufmerksamkeit wurde dabei auf das Gen *Thhalv10018786m* (im Folgenden als *EsMeTra8* bezeichnet) gerichtet, da hierfür kein eindeutiges Ortholog in *A. thaliana* identifiziert werden konnte. Da die Biosynthese von Wasalexin von der Camalexinsynthese abweicht, könnte *EsMeTra8* eine Schlüsselrolle einnehmen.



**Abbildung 4.37 RT-qPCR Analyse der Kandidatengene.**

Blätter von *E. sanguineum* wurden mit 5 mM Silbernitratlösung besprüht (A) oder mit UV-C-Licht bestrahlt (B). Anschließend wurde mit Hilfe von RT-qPCR das Expressionslevel nach 0 h; 2,5 h; 5h; 7,5 h und 24 h analysiert. Alle Werte wurden auf das geometrische Mittel von drei Referenzgenen normalisiert (*EsActin1*, *EsYLS8* und *EsPP2AA2*) (Vandesompele *et al.*, 2002). Dargestellt ist die Expressionsinduktion im Vergleich zu Kontrollpflanzen (n.i.). Standardabweichungen ergaben sich aus drei biologischen und zwei technischen Wiederholungen.

#### 4.3.4. Gezielte Generierung von *knock-out*-Mutanten mittels der CRISPR/Cas9-Methode und Evaluierung des „*floral dips*“ zur Transformation von *E. salsugineum*

Zur Analyse der *in vivo*-Funktion eines Proteins in einem Stoffwechselweg werden üblicherweise *knock-out*- und Überexpressionspflanzen analysiert. Nachdem die Generierung von RNAi-Konstrukten für die in Abschnitt 4.3.3.4 ermittelten Kandidatengene nicht erfolgreich war, wurde das CRISPR/Cas-9-System von Wang *et al.* (2015) etabliert. Die pCAMBIA basierenden Vektoren (pHEE401) enthielten einen Eizellen-spezifischen Promotor mit dem es möglich war, bereits in der T1-Generation homozygot-mutierte Pflanzen zu erzeugen. Im Vergleich zu anderen Methoden ist auch die Mutationsrate in der T1-Generation deutlich höher. Es wurden zunächst für vier Kandidatengene Konstrukte erzeugt (*EsWRKY33*, *EsPen2*, *EsCYP81F4* und *EsMetra8*, jeweils zwei DNA-Zielsequenzen pro Gen – insgesamt acht Konstrukte).

Die Transformation mit Hilfe von *Floral Dip* erwies sich als äußerst ineffektiv. Im Zuge einer Optimierung der Methode wurde mit einem bereits vorhandenen Konstrukt (*pCambia330035Su:CYP71B6*) verschiedene Modifikationen untersucht (siehe Tabelle 4.14) (angelehnt an Clough und Bent (1998)). Standardmäßig wurden die Blüten für zwei Minuten in eine Agrobakterienlösung mit 0,01% Silwet getaucht. In dem durchgeführten Test wurden Blüten von jeweils 10 Pflanzen für 5 min, 1 min oder 30 sec in eine Agrobakteriensuspension mit 0,01% oder 0,05% Silwet inkubiert. Zusätzlich wurde versucht, die Pflanzen durch besprühen der Blüten mit der Agrobakteriensuspension zu transformieren. Tendenziell wurden durch Verwendung von 0,05% Silwet und längere Tauchzeiten der Blüten etwas mehr positive Transformanden detektiert. Durch Vakuuminfiltration und Besprühen der Pflanzen konnten keine BASTA®-resistente Pflanzen erzeugt werden. Keine der Versuchsansätze brachte allerdings eine signifikante Verbesserung der Transformationsrate. Insgesamt wurden ca. 290'000 Samen untersucht. 13 davon erwiesen sich als BASTA®-resistent und enthielten offenbar das Konstrukt. Dies entspricht einer Transformationseffizienz von 0,005%. Im Vergleich dazu veröffentlichten Ghedira *et al.* (2013) für *A. thaliana* eine Transformationseffizienz von 0,76% bis 1,57%. Clough und Bent (1998) postulierten eine Transformationsrate von 0,5% bis 3% für *A. thaliana*.

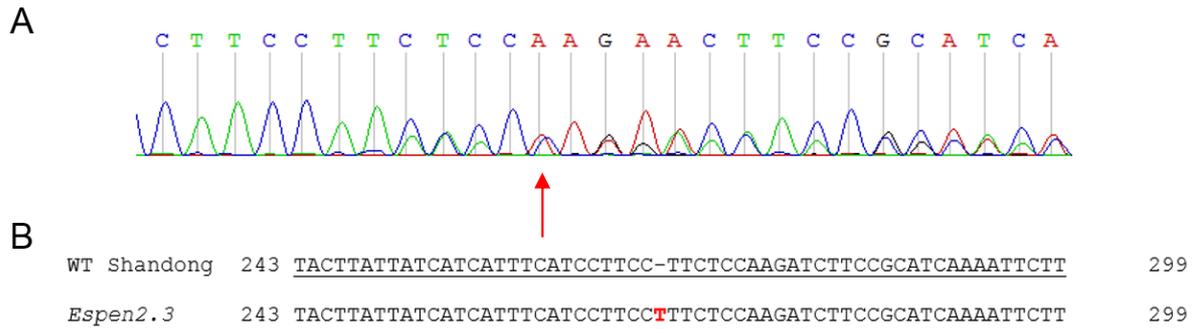
**Tabelle 4.14 Bestimmung der Transformationseffizienz in *E. salsugineum*.**

Transformiert wurde CYP71B6 in pCAMBIA330035Su in *E. salsugineum* via *Floral Dip*. Zur Optimierung des Verfahrens wurden verschiedene Tauchzeiten und verschiedene Silwetkonzentrationen getestet. Es ließ sich keine deutliche Verbesserung in der Transformationseffizienz erzielen. Der Versuch wurde zwei mal wiederholt. Die Selektion positiver Transformanden erfolgte über BASTA® (Bayer CropScience AG). Die angegebene Zahl entspricht der Anzahl Konstrukt-tragender Pflanzen.

| <b>Zeit/Silwetkonz.</b> | <b>0,01%</b> | <b>0,05%</b> |
|-------------------------|--------------|--------------|
| <b>5 min</b>            | 3            | 4            |
| <b>1 min</b>            | 1            | 2            |
| <b>30 sec</b>           | 1            | 2            |
| <b>Vakuum</b>           | 0            | 0            |
| <b>Sprühen</b>          | 0            | 0            |

Da die Optimierung des *Floral Dips* keine eindeutige Verbesserung der Transformationseffizienz erbrachte, wurde jedes der acht generierten CRISPR/Cas9-Konstrukte in 60 *E. salsugineum* Pflanzen eingebracht und die T1-Pflanzen auf Hygromycinresistenz überprüft. Dabei wurden drei resistente Pflanzen für *EsPen2*, zwei Pflanzen für *EsCYP81F4* und eine für *EsWRKY33* gefunden. Mit diesem Vektorsystem (pHEE401) war die Transformationseffizienz nochmals niedriger als mit dem für die Optimierung verwendeten Vektor (*pCAMBIA330035Su:CYP71B6*). Von insgesamt 480 transformierten Pflanzen wurden ca. 22 Mio. Samen getestet. Davon waren sechs resistent gegen Hygromycin. Dies entspricht einer Transformationseffizienz von  $2,7 \times 10^{-7}$ . Zukünftig werden transgene *E. salsugineum*-Pflanzen via Kalluskulturen in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Li an der *Chinese Academy of Sciences* in Guangzhou erzeugt (Li *et al.*, 2007). Die in dieser Studie generierten Hygromycin-resistenten Pflanzen wurden anschließend auf die Einführung einer Mutation im entsprechenden Gen überprüft. Cas9 induziert in unmittelbarer Umgebung zum PAM-Motiv (*protospacer adjacent motif*) einen Doppelstrangbruch, der anschließend durch NHEJ (*Non-homologous end joining*) zusammengefügt wird. Dabei kommt es häufig zu Mutationen (Xing *et al.*, 2014).

In einer Pflanze konnte eine heterozygote Mutation im *EsPen2*-Gen nachgewiesen werden. In Abbildung 4.38 A ist das Chromatogramm der *Espen2*-Sequenz zu sehen. Gut zu erkennen ist die Entstehung einer Doppelsequenz nach dem Mutationsevent (roter Pfeil). Es liegen die wildtypische und die durch T-Insertion um ein Nukleotid verschobene Sequenz übereinander. Ein Alignment beider Sequenzen (Abbildung 4.38 B) zeigt deutlich, dass in der *Espen2*-Mutante ein zusätzliches Thymin-Nukleotid vorhanden war. In den restlichen fünf Primärtransformanden konnten keine Mutationsevents nachgewiesen werden.



**Abbildung 4.38 Chromatogram von *Espen2* (A) und Alignment mit *E. salsugineum* Wildtyp (WT) Shandong (B).**

Nach Einbringen des Konstruktes in Pflanze konnte in einer Primärtransformante eine T-Insertion nachgewiesen werden. Eindeutig ist die Verschiebung der Sequenz im Chromatogram zu erkennen (A). Die Insertionsstelle ist mit einem roten Pfeil gekennzeichnet. In der T1-Generation lag die Mutation heterozygot vor und ist anhand der Doppelsequenz nach dem Mutationsevent erkennbar. Das Alignment mit der wildtypischen (WT) *E. salsugineum*-Sequenz (B) bestätigt die Insertion eines Thymin-Nukleotids.

Da das CRISPR/Cas9-Konstrukt auch in der T2-Generation noch enthalten war, konnte Cas9 erneut aktiv werden und neue Doppelstrangbrüche induzieren. Es bestand folglich die Möglichkeit weitere Mutationen zu erzeugen. Neben Pflanzen mit homozygoter T-Insertion wurde auch eine Pflanze mit einer transheterozygoten Mutation identifiziert. Ein Allel trug eine Adenin (A)-Insertion. Auf dem zweiten Allel befand sich eine 10 bp Deletion. In Abbildung 4.39 sind die drei verschiedenen Mutationen im Vergleich zur wildtypischen *E. salsugineum*-Sequenz dargestellt. Dabei ist anzumerken, dass *Espen2.3-1* und *Espen2.3-3* noch transheterozygot in einer Pflanze vorliegen und in nachfolgenden Pflanzengenerationen auf Homozygotie überprüft werden müssen.

|                    |     |  |     |
|--------------------|-----|--|-----|
| WT Shandong        | 243 | TACTTATTATCATCATTTTCATCCTTCC-TTCTCCAAGATCTTCCGCATCAAAATTCTT          | 299 |
| <i>Espen2.3 -1</i> | 243 | TACTTATTATCATCATTTTCATCCTTCC <b>A</b> TTCTCCAAGATCTTCCGCATCAAAATTCTT | 299 |
| <i>Espen2.3 -2</i> | 243 | TACTTATTATCATCATTTTCATCCTTCC <b>T</b> TTCTCCAAGATCTTCCGCATCAAAATTCTT | 299 |
| <i>Espen2.3 -3</i> | 243 | TACTTATTATCATCATTTTCATC-----CCAAGATCTTCCGCATCAAAATTCTT               | 299 |

**Abbildung 4.39 Zusammenfassung der Mutationen der T2 Generation.**

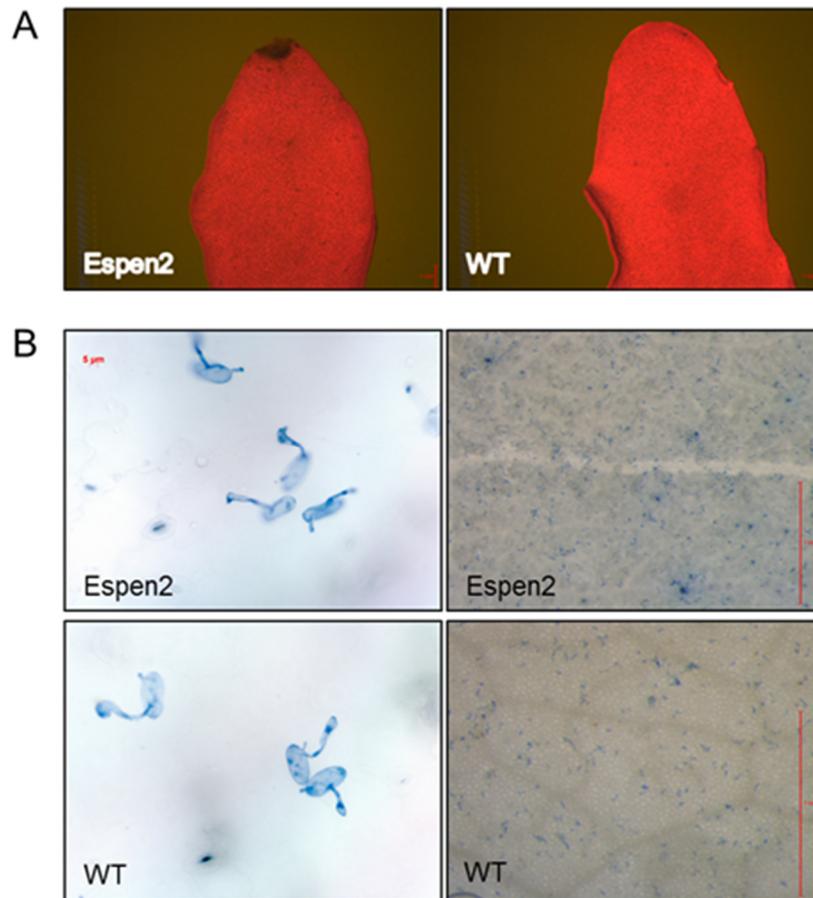
Nach Segregation der heterozygoten *Espen2.3*-Linie in der T2-Generation, entstanden Pflanzen mit homozygoter T-Insertion. Zusätzlich wurde ein weiteres Mutationsevent detektiert. Eine Pflanze wies transheterozygot eine A-Insertion und 10 bp Deletion auf. Dargestellt ein Alignment aller drei Mutationen im Vergleich zur Wildtyp-Sequenz.

Mit den erzeugten homozygoten *knock-out*-Pflanzen wurden anschließend Phänotypisierungsanalysen durchgeführt.

#### 4.3.5. Analyse der Relevanz von EsPen2 bei der Pflanzenabwehr

In *A. thaliana* spielt Pen2 eine wichtige Rolle bei der Abwehr von Mehltauerregern. Das Enzym katalysiert die Hydrolyse von Glucosinolaten, wodurch toxische Metabolite entstehen (z.B. Isothiocyanate) (Lambrix *et al.*, 2001b). Lipka *et al.* (2005) untersuchten den Einfluss von Pen2 auf die generelle Abwehrreaktion von Arabidopsis. In *pen2 knock-out*-Pflanzen konnten sie einen Befall von den Nicht-Wirtspathogenen *Erysiphe pisi* und *Blumeria graminis f. sp. hordei* beobachten (positiv Kontrolle: *Golovinomyces orontii* als angepasstes Pathogen). Im wildtypischen Zustand ist *A. thaliana* nicht anfällig gegenüber einer *E. pisi*- und *B. graminis*-Kolonisation, wohingegen *G. orontii* die Pflanze erfolgreich infizieren kann (Lipka *et al.*, 2005). Durch das Ausschalten von *EsPen2* werden die oben beschriebenen Abwehrstoffe nicht mehr gebildet und die *NHR* (*non host resistance*, Nicht-Wirtsresistenz) von Arabidopsis kann durchbrochen werden, weshalb auch *E. pisi* und *B. graminis* die Pflanze befallen konnten (Lipka *et al.*, 2005).

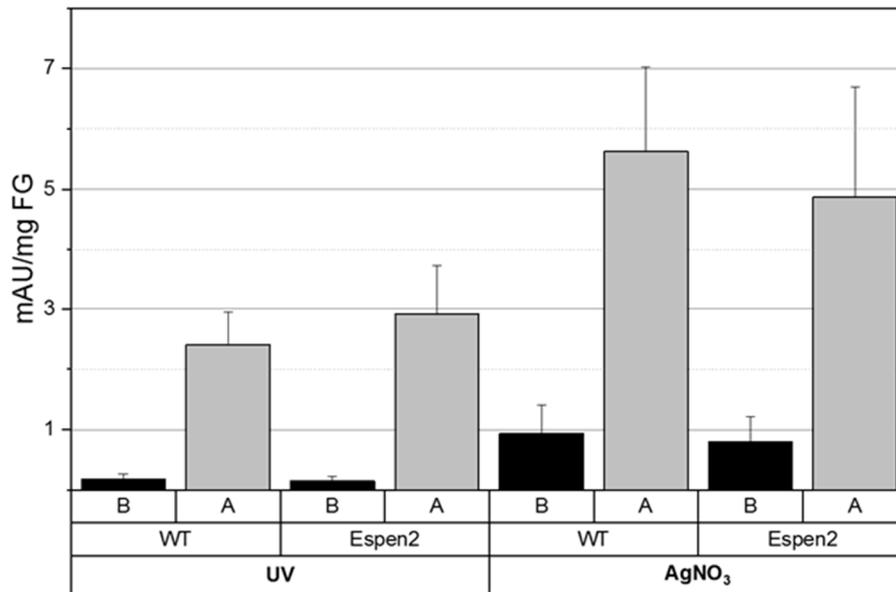
Ob *EsPen2* eine ähnliche Funktion übernimmt, sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden. Dafür wurden gemäß Lipka *et al.* (2005) *E. salsugineum* Wildtyp- und *Espen2*-Pflanzen angezogen und mit *B. graminis* inokuliert. Die Analysen wurde in Zusammenarbeit mit Christopher McCollum und Stefan Engelhardt vom Lehrstuhl für Phytopathologie (TU München) durchgeführt. Nach zwei bzw. sieben Tagen Inkubationszeit wurde die Autofluoreszenz der Blätter (auf Grund von Seneszenz) und die Kolonisation des Blattes durch den Pilz untersucht (siehe Abbildung 4.40). Es konnte kein Unterschied zwischen wildtypischen und *Espen2*-Pflanzen beobachtet werden. In beiden Fällen scheint *B.graminis* *E. salsugineum* nicht infizieren zu können. Der Pilz ist zwar in der Lage Appressorien auszubilden, kann anschließend aber nicht in die pflanzliche Zelle eindringen um Haustorien zu bilden. *EsPen2* scheint, anders als das Ortholog in *A. thaliana*, nicht essentiell an der generellen Abwehrantwort von *E. salsugineum* beteiligt zu sein.



**Abbildung 4.40** Kolonisation von *E. salsugineum*-Blättern durch *B. graminis*.

Untersucht wurde die Fähigkeit von *B. graminis* *E. salsugineum* Wildtyp- und *Espen2*-Blätter zu infizieren. Als Marker für eine erfolgreiche Kolonisation gelten Autofluoreszenz der Blätter (ausgelöst durch Seneszenz) (A) und die Ausbildung von Haustorien (B). In drei unabhängigen Wiederholungen konnte kein Unterschied zwischen wildtypischen und *Espen2*-Pflanzen festgestellt werden. Die Analyse erfolgte in Zusammenarbeit mit Christopher McCollum und Stefan Engelhardt (Lehrstuhl für Phytopathologie, TU München)

*EsPen2* wurde auch als potentielles Enzym der Wasalexinbiosynthese in Betracht gezogen (siehe Abschnitt 4.3.3.4). Wäre *EsPen2* ein biosynthetisches Enzym von Wasalexin, wäre in *knock-out*-Pflanzen ein reduzierter Wasalexingehalt zu erwarten. Wie in Abbildung 4.41 zu erkennen ist, zeigten Pflanzen ohne *EsPen2*-Expression keinen eindeutig veränderten Wasalexinphänotyp. Das Enzym scheint nicht an der Wasalexinbiosynthese beteiligt zu sein.



**Abbildung 4.41 Wasalexingehalt in *E. salsugineum*-Pflanzen.**

Zur Überprüfung der Beteiligung von Espen2 an der Wasalexinbiosynthese wurden wiltypische und *knock-out* Espen2-Pflanzen mit UV-C-Strahlung und Silbernitrat behandelt, Wasalexin extrahiert und der Gehalt an Wasalexin A (grau) und B (schwarz) mittels HPLC-Analyse ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei biologischen und je fünf technischen Replikaten. Es konnte kein eindeutiger Unterschied zwischen den zwei Genotypen festgestellt werden. Espen2 scheint nicht an der Wasalexinsynthese beteiligt zu sein.

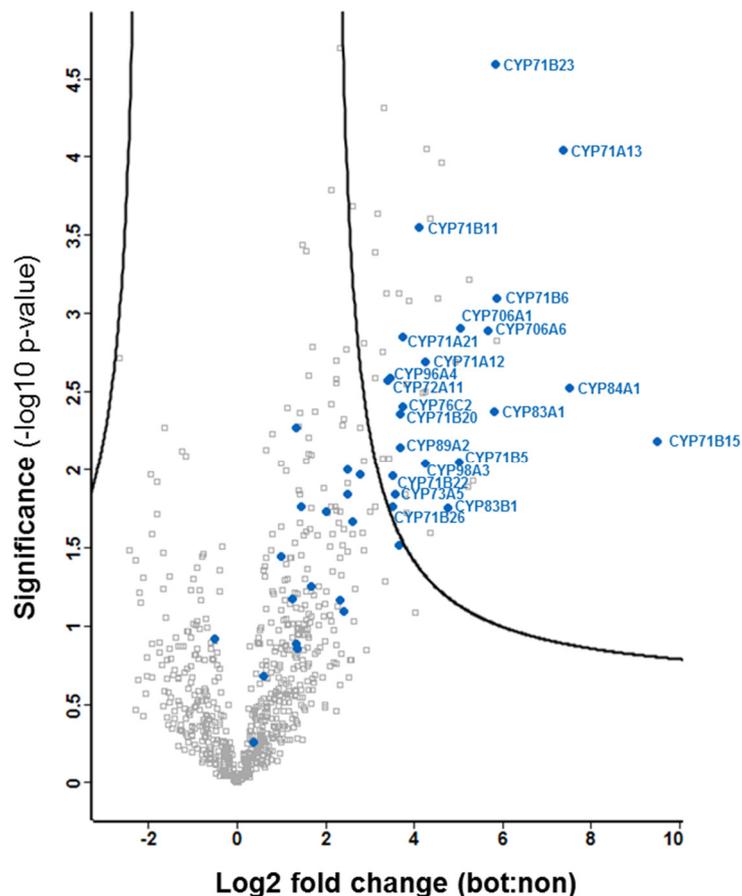
Da sich die Generierung von transgenen *E. salsugineum*-Linien als schwierig herausstellte und in Folge dessen nur für ein Gen ein *Knock-out* erzeugt werden konnte, war es nicht möglich ein umfassendes Bild der Wasalexinbiosynthese zu erzeugen. Espen2 scheint keine essentielle Rolle bei der Pflanzenabwehr oder Wasalexinbiosynthese zu spielen. In Zukunft müssten weitere  $\beta$ -Glucosidasen näher charakterisiert werden.

## 5. Diskussion

### 5.1. Enzyme der Camalexinbiosynthese bilden ein Metabolon für effektives Substratchanneling

Membranproteine stellen ca. 20% des gesamten Arabidopsisproteoms dar (Krogh *et al.*, 2001). Weiterhin repräsentieren sie ca. 50% aller Bestandteile einer zellulären Membran (Alberts *et al.*, 2002). Dementsprechend kommen verschiedenste Enzyme immer wieder in physischen Kontakt zueinander. Einerseits geschieht dies zufällig und ist ohne biologische Relevanz (Levy *et al.*, 2012, Landry *et al.*, 2013), andererseits existieren stabile und langlebige Komplexe zwischen zwei oder mehr Proteinen, die entscheidende Reaktionen innerhalb der Zelle vermitteln. Von großer Bedeutung sind ebenfalls kurzzeitige, transiente und hochspezifische Interaktionen zwischen Proteinen, da sie oft kritische Prozesse steuern (Perkins *et al.*, 2010). Die Vorteile einer Komplexbildung für die Zelle sind vielfältig. Durch die lokale Anreicherung von Enzymen eines Biosyntheseweges kann ein effektives *channeling* gewährleistet werden. So wird eine Akkumulation von toxischen Intermediaten vermieden und gleichzeitig der metabolische Fluss erhöht. Zusätzlich wird eine Feinabstimmung zwischen konkurrierenden Synthesewegen ermöglicht (Winkel, 2004). Ziel der hier vorliegenden Arbeit war zu überprüfen, ob auch Enzyme der Camalexinbiosynthese Komplexe ausbilden und ob sich dies auf die Aktivität der Einzelenzyme auswirken würde.

Mit Hilfe von ungerichteter Co-IP wurde in vorangegangenen Studien ein Überblick über mögliche Komplexbildner generiert (persönliche Kommunikation E. Glawischnig). Dabei wurde in zwei unabhängigen experimentellen Ansätzen CYP71B15-GFP exprimiert, als *bait* an GFP-Trap\_A Beads gebunden, potentielle Interaktionspartner kopräzipitiert und mittels MS identifiziert. Zahlreiche CYPs und andere an der Abwehr beteiligte Enzyme konnten detektiert werden. Darunter erwies sich CYP71A13 unabhängig von der Expressionsart (konstitutiv unter 35S-Promoter oder induzierbar unter CYP71B15-Promoter), der Induktionsweise (ca. 8-fach stärker nach UV-C oder *B. cinerea* Behandlung, im Vergleich zu nicht induzierten Proben) oder des Expressionsorganismus (*A. thaliana* oder *N. benthamiana*) als eines der am stärksten angereicherten Proteine. In stabilen Linien wurde auch CYP79B2 nach UV-C- und Pathogenbehandlung nachgewiesen (ca. 9-fach stärker nach UV-C Behandlung, ca. 5-fach stärker nach *B. cinerea* Infektion; im Vergleich zu nicht induzierten Proben). Auch die für die Aktivität von CYPs in *A. thaliana* essentielle ATR1 lag sowohl nach UV-C- als auch *B. cinerea*-Induktion verstärkt vor (ca. 5-fach). In Abbildung 5.1 ist exemplarisch ein Volcano-Plot der signifikant verändert vorliegenden *A. thaliana* Proteine nach *B. cinerea* Infektion gezeigt ( $p$ -Wert < 0,05).



**Abbildung 5.1 Signifikant induzierte Gene nach *B. cinerea*-Infektion.**

Dargestellt ist ein Volcano-Plot aus Co-IP/Proteomics-Daten von Ms. Manisha. CYP71B15:GFP Protein wurde unter der Kontrolle des CYP71B15-eigenen Promoters stabil in *A. thaliana* eingebracht. Homozygote Pflanzen wurden mit *B. cinerea*-Sporen infiziert und auf veränderte Proteinmengen mittels MS-Analysen untersucht. Als Kontrolle dienten Pflanzen ohne das *bait*-Protein. Unter den signifikant ( $p$ -Wert $<0,05$ ) angereicherten Proteinen befinden sich zahlreiche CYPs (blau markiert) und andere für die Abwehr relevante Enzyme. CYP71A13 als Camalexin-spezifisches Enzym ist ca. 8-fach induziert. Die Messungen wurden durchgeführt von Stephanie Heinzlmeir, Daten erhoben von Erich Glawischnig und Ms. Manisha (unpublished).

Diese Analysen bildeten die Grundlage für die in dieser Arbeit durchgeführten Interaktionsstudien. Mit Hilfe von FRET-FLIM und gerichteter Co-IP konnten Interaktionen zwischen verschiedenen Camalexin-spezifischen Enzymen nachgewiesen werden (Zusammenfassung der Interaktionsstudien siehe Tabelle 5.1). Dabei wurden auch Unterschiede in der Robustheit der Interaktionen sichtbar. Durch die mehrstufige Behandlung der Proben und die Verwendung von Detergenzien während der Co-IP werden schwache und transiente Bindungen meist aufgelöst und können in diesem experimentellen Ansatz nicht mehr nachgewiesen werden. Um auch diese Art an Interaktionen detektieren zu können, wurden zusätzlich FRET-FLIM-Messungen im transienten Expressionssystem *N.*

*benthamiana* durchgeführt (siehe Abschnitt 4.1.4). FRET-FLIM-Analysen entwickelten sich in den letzten Jahren zur Methode der Wahl für Interaktionsstudien. Da im Unterschied zu herkömmlichen FRET-Bestimmungen (*sensitized emission* und *acceptor photobleaching*) nur die Lebenszeit des Donors bestimmt wird, haben Konzentrationsunterschiede zwischen Donor- und Akzeptorprotein innerhalb einer Probe und zwischen verschiedenen Proben keinen Einfluss auf die Messungen. Bei den in dieser Arbeit durchgeführten FRET-Bestimmungen mit Hilfe der *sensitized emission*-Methode erwies sich dies als Problem, da reines ER-lokalisiertes CFP eine sehr viel höhere Expressionsrate hatte als der zugehörige Akzeptor. Dies führte zu einer artifiziellen Erhöhung der FRET-Effizienz und es wurde deutlich, dass klassische FRET-Methoden für die hier vorliegende Fragestellung ungeeignet sind (siehe Abschnitt 4.1.3). Weiterhin sind FRET-FLIM-Messungen unsensibel gegenüber Änderungen in der Anregungsintensität, *Photobleaching* (bis zu einem gewissen Maß), Intensitätsänderungen auf Grund von „Durchbluten“ von Signalen in den Akzeptorkanal und dem Einfluss des verwendeten Gerätes (Lalonde *et al.*, 2008, Becker, 2012, Sun *et al.*, 2012a). Auch diese Beobachtung konnte in den durchgeführten Experimenten bestätigt werden. FRET-FLIM-Messungen wurden in Kooperation mit Verena Kriechbaumer von der Oxford Brookes University durchgeführt. Später wurde am Campus Weihenstephan der TU-München ein FLIM-fähiges konfokales Laser-Scanning-Mikroskop eingeführt. Nach eingehender Methodenetablierung wurden für einige Proteinkombinationen (CYP71A13-GFP/CYP71B15-RFP; CYP71A12-GFP/CYP71B15-RFP und CYP71A13-GFP/AtGSTU4-RFP) erneut FLIM durchgeführt und es konnten exakt die gleichen Fluoreszenzlebensdauern ermittelt werden, was die Echtheit der ermittelten Interaktionspaare unterstreicht (siehe Abschnitt 4.1.4). In Tabelle 5.1 sind die detektierten Interaktionen zwischen Camalexin-spezifischen Enzymen zusammengefasst. Von robusten Interaktionen kann ausgegangen werden, wenn alle drei angewandten Methoden (Kokalisation, FRET-FLIM und Co-IP) ein positives Ergebnis zeigten. Wurde eine Bindung zweier Proteine nur durch FRET-FLIM gezeigt, wird eine schwächere, evtl. transiente Interaktion postuliert.

**Tabelle 5.1 Zusammenfassung der Interaktionsstudien.**

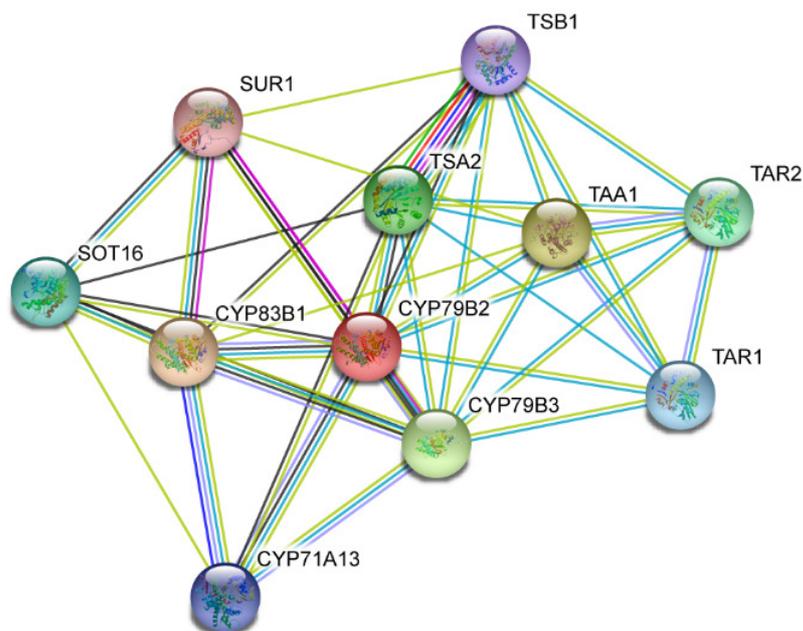
Die in der Camalexinbiosynthese involvierten Enzyme wurden auf Kolo­kalisierung überprüft und mittels FRET-FLIM und Co-IP auf Protein-Protein-Interaktion untersucht. Kolo­kalisier­ten zwei Enzyme und wurde eine Bindung zwischen ihnen sowohl in FRET-FLIM-Studien als auch in Co-IP-Versuchen nachgewiesen, kann von einer robusten und starken Interaktion gesprochen werden. Wurde eine Interaktion nur in FRET-FLIM-Analysen gezeigt, scheint die Bindung eher schwach ausgeprägt und transient vorzuliegen. Es wurde ersichtlich, dass CYP79B2, CYP71A13, CYP71A12 und CYP71B15 in gegenseitige Interaktion zu einander treten. Für ATR1 und AtGSTU4 konnte in den durchgeführten Studien nur eine Interaktion mit CYP71A13 nachgewiesen werden. Es kann zusammenfassend festgestellt werden, dass die Camalexin-spezifischen Enzyme ein Metabolon ausbilden.

✓- Interaktion gezeigt; ✗- keine Interaktion gezeigt; n.a.- nicht analysiert

| Kombination       | Kolo­kalisierung | FRET-FLIM | Co-IP |
|-------------------|------------------|-----------|-------|
| CYP71A13/CYP71B15 | ✓                | ✓         | ✓     |
| CYP71A12/CYP71B15 | ✓                | ✓         | ✓     |
| CYP71A12/CYP79B2  | ✓                | ✓         | ✓     |
| CYP71A13/CYP79B2  | ✓                | ✓         | ✗     |
| CYP71B15/CYP71B15 | ✓                | ✗         | ✗     |
| CYP71A12/CYP71A12 | n.a.             | ✗         | n.a.  |
| GGP1/CYP71A13     | ✓                | ✓         | ✗     |
| GGP1/CYP71A12     | ✓                | n.a.      | ✗     |
| ATR1/CYP71A13     | n.a.             | n.a.      | ✓     |
| ATR1/CYP71B15     | n.a.             | n.a.      | ✗     |
| ATR1/79B2         | n.a.             | n.a.      | ✗     |
| AtGSTU2/CYP71A13  | ✗                | ✗         | ✗     |
| AtGSTU4/CYP71A13  | ✓                | ✓         | ✓     |

Eine Interaktion konnte für CYP79B2 mit CYP71A13, CYP71A12 und mit CYP71B15 detektiert werden. CYP71A13 und CYP71A12 interagieren zusätzlich auch mit CYP71B15. Da in Co-IP-Experimenten für CYP79B2 neben der Interaktion mit CYP71A13 keine Interaktion mit anderen biosynthetischen Enzymen nachgewiesen werden konnte, wurde deutlich, dass dieses Enzym lediglich schwach mit Camalexin-spezifischen Enzymen verbunden ist. In FRET-FLIM-Studien konnte eine Interaktion von CYP79B2 mit dem in der Synthese nachfolgendem Enzym CYP71A13 und dem letzten Enzym der Synthesekaskade CYP71B15 gezeigt werden. Die Reduktion der Fluoreszenzlebensdauern betragen 0,1 ns, was ebenfalls für eine schwache, transiente Bindung spricht. Ab einer Reduktion von 0,2 ns kann von einer stabilen Interaktion ausgegangen werden (Stubbs *et al.*, 2005, Schoberer und Botchway, 2014, Kriechbaumer *et al.*, 2015). CYP79B2 katalysiert die Umwandlung von Tryptophan zu

IAOx, das anschließend mit Hilfe weiterer CYPs zu Camalexin umgewandelt wird (siehe Abbildung 1.8). IAOx stellt allerdings auch ein Intermediat bei der Indolglucosinolatbiosynthese dar (Hull *et al.*, 2000a, Mikkelsen *et al.*, 2000b) und ist möglicherweise unter spezifischen Bedingungen eine Vorstufe der Auxinbiosynthese in *Brassicaceae* (Brumos *et al.*, 2014, Tivendale *et al.*, 2014). CYP79B2 nimmt folglich eine Schlüsselrolle beim Übergang vom Primär- zum Sekundärstoffwechsel ein und hat möglicherweise eine regulatorische Bedeutung bei der Steuerung der verschiedenen Biosynthesen. Zum Beispiel induziert Gewebeerstörung durch Frassfeinde bevorzugt die Glucosinolatbiosynthese (Rask *et al.*, 2000, Lambrix *et al.*, 2001a, Wittstock und Burow, 2010). Dahingegen wird nach Befall durch nekrotrophe Pilze (z.B. *A. brassicicola* oder *B. cinerea*) die Camalexinbiosynthese signifikant aktiviert (Thomma *et al.*, 1999, Glawischnig, 2007). In Abbildung 5.2 ist ein Netzwerk putativer Interaktionspartner von CYP79B2 dargestellt. Die vier Synthesewege, welche über CYP79B2 (und das Homolog CYP79B3) miteinander verknüpft sind, sind deutlich erkennbar (Tryptophan-, Camalexin-, Indolglucosinolat- und möglicherweise Auxinbiosynthese). CYP79B2 nimmt entstehendes Tryptophan auf und vermittelt, je nach aufgetretenem Reiz, die entsprechenden Reaktionen. Eine schwache und kurzlebige Interaktion, wie sie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, würde eine schnelle Anpassung der verschiedenen Synthesen an sich ändernde Umweltreize ermöglichen.



**Abbildung 5.2 Netzwerk putativer Interakteure von CYP79B2.**

Dargestellt sind sowohl biologisch bestätigte als auch vorhergesagte Interaktionspartner von CYP79B2 (rot, mittig). Verschiedene Proteine sind mit farbigen Kugeln verdeutlicht, deren Interaktionen untereinander durch Verbindungslinien dargestellt sind. Verschiedene Farben dieser Verbindungslinien geben Auskunft über die Datenquelle der angedeuteten Interaktion. Türkis – aus kuratierten Datenbanken; pink – experimentell ermittelt; grün – Gen-Nachbarschaft; rot – Gen-Fusion; Blau – gemeinsames Auftreten; gelbgrün – *Text Mining*; schwarz – Koexpression; lila – Homologie auf Proteinebene

Für CYP79B2 und CYP71A13 wurde eine putative Interaktion auf Basis von Koexpressionsdaten, aus Datenbanken, mit Hilfe von *Text Mining* und auf Grund von Homologien vorhergesagt. Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurde eine Interaktion auch experimentell nachgewiesen. Weiterhin besteht eine klare Verbindung zwischen CYP79B2 und den Enzymen der Tryptophanbiosynthese (TSB1, TSA2) sowie zur Indolglucosinolatbiosynthese (CYP83B1, SUR1, SOT16). Auch gibt es Hinweise auf eine Verknüpfung mit Enzymen der Auxinbiosynthese (TAA1, TAR1, TAR2). (Abbildung generiert über die Software STRING, <https://string-db.org/cgi/network.pl?taskId=GzCs0bv0lqQf>, Stand 02.08.2017)

Viele weitere der bekannten CYP79-Enzyme bilden, wie CYP79B2, eine Schnittstelle zwischen Primär- und Sekundärmetabolismus. Im Allgemeinen vermitteln sie die Reaktion von einer Aminosäure zu dem entsprechenden Oxim. So katalysieren zum Beispiel CYP79F1 bzw. CYP79F2 den ersten Schritt der aliphatischen Glucosinolatbiosynthese (Hogge *et al.*, 1988, Bak *et al.*, 2011) und CYP79A1 die Umsetzung von Tyrosin zu Hydroxyphenylacetaldoxim während der Synthese des cyanogenen Glycosids Dhurrin (Koch *et al.*, 1995, Kristensen *et al.*, 2005). Für letzteren Biosyntheseweg konnte bereits die Ausbildung eines Proteinkomplexes nachgewiesen werden (Nielsen *et al.*, 2008, Laursen *et al.*, 2016). Die Vorgehensweise gleicht zu großen Teilen dem für die Identifizierung eines potentiellen Camalexinmetabolons angewandten Ansatz. Zunächst konnten durch Kopräzipitation von POR-assoziierten Proteinen die Dhurrin-spezifischen Enzyme detektiert werden (CYP79A1, CYP71E1 und UGT85B1). Diese Interaktionen wurden durch Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) und FRET-FLIM-Messungen in heterolog exprimierenden *N. benthamiana*-Blättern bestätigt. Neben Homomerbildung aller drei Enzyme wurde eine Interaktion von CYP79A1 und CYP71E1 detektiert. Diese Bindung erfolgt unabhängig von UGT85B1. UGT85B1 wiederum wird durch die Interaktion der beiden CYPs vom Cytosol an die ER-Membran rekrutiert und interagiert dann mit ebendiesen (Laursen *et al.*, 2016). Möglicherweise gilt das gleiche Prinzip auch für die cytosolischen Komponenten der Camalexinbiosynthese, GST und GGP1. Eine Interaktion der drei Camalexin-spezifischen Enzyme CYP79B2, CYP71A13 und CYP71B15 konnte über Co-IP und/oder FRET-FLIM nachgewiesen werden. Die Stärke der Interaktion zwischen CYP71A13 und CYP71B15 scheint vergleichbar zu der CYP79A1-CYP71E1 Interaktion zu sein (ca. 3,5-fach erhöhte FRET-Effizienz für CYP79A1-GFP/CYP71E1-RFP in Laursen *et al.* (2016) und ca. 2,5-fach erhöhte Effizienz für CYP71A13-CFP/CYP71B15-YFP, beide Angaben im Vergleich zur Negativkontrolle). Möglicherweise rekrutiert dieses

Interaktionspaar die cytosolischen Enzyme GGP1 und GST (für genauere Informationen bezüglich Spezifität siehe Abschnitt 4.1.1 und Abschnitt 4.2) zur ER-Membran. Ein ähnliches Phänomen wurde auch bereits für Enzyme der Ligninbiosynthese beobachtet (Bassard *et al.*, 2012). Mit Hilfe der *Tandem Affinity Purification* (TAP)-Methode wurde eine Interaktion zwischen CYP98A3 mit CYP73A5 nachgewiesen. Interessanterweise wurde auch CYP71B15 als Interaktionspartner detektiert. Weiterhin wurde durch FRAP-Analysen (*Fluorescence Recovery after Photobleaching*) eine Rekrutierung der cytosolischen Hydroxyzimtsäure-Transferase (HCT) durch CYP98A3 an die ER-Membran gezeigt. Die Relokalisation der cytosolischen Enzyme zur ER-Membran erhöhte sich weiter drastisch nach Verwundung der infiltrierten Blätter (von 20% auf 50% Relokalisationsevents nach Verwundung). FRET-Messungen ergaben keine Interaktion zwischen CYP98A3 und HCT. Erst durch gleichzeitige Koexpression von CYP73A5 und 4-Cumarat-CoA-Ligase (4-CL) wurde die Interaktion ermöglicht (von 0% FRET-Effizienz auf 18% FRET-Effizienz). Nach Verwundung der Blätter wurde die Interaktionsstärke zwischen den CYPs und den löslichen Enzymen nicht weiter erhöht. Die Interaktion zwischen HCT und 4-CL erhöhte sich allerdings um das 6-fache. Dies könnte durch die verstärkte Kolokalisation begründet werden (Bassard *et al.*, 2012). Sowohl das Modell der Dhurrinbiosynthese als auch der Ligninbiosynthese könnte auf die in dieser Arbeit untersuchten Interaktionen zwischen Camalexin-spezifischen Enzymen übertragen werden. Die membranständigen CYPs stehen in Interaktion miteinander und ziehen unter Umständen die cytosolischen Komponenten der Biosynthesekaskade in Richtung des ER. Im Falle der AtGSTU4 konnte dies anhand einer veränderten Lokalisation gezeigt werden (siehe Abbildung 4.5). Da die Interaktionen zwischen CYPs und GGP1 bzw. AtGSTU4 lediglich schwach ausgeprägt sind (nur in FRET-FLIM-Messungen detektierbar) könnte die Hypothese aufgestellt werden, dass diese Interaktion *in vivo* unter Stressbedingungen verstärkt vorliegt und der Substratfluss optimiert wird.

Auch diese Frage sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden. Durch heterologe Expression verschiedener Camalexin-spezifischer Enzyme in *S. cerevisiae* mit anschließenden Enzymtests wurde evaluiert, ob sich die Coexpression und Interaktion zweier CYPs eines Syntheseweges positiv auf die Substratumsetzung auswirkt. ATR1 als Elektronendonator wurde ebenfalls im gleichen Hefestamm exprimiert (siehe Abschnitt 4.2.1). Dabei wurden zwei Abschnitte während der Camalexinbiosynthese betrachtet: zum einen CYP79B2 mit CYP71A13 bei der Umwandlung von Tryptophan zu IAOx und weiterführend zu IAN bzw. Cys(IAN) und zum anderen CYP71A13 mit CYP71B15 während der Reaktion von IAN zu Cys(IAN) und anschließender Umwandlung zu Dihydrocamalexinsäure (DHCA) bzw. Camalexin. Die bestimmten  $K_M$ -Werte von einzeln exprimierten CYPs entsprachen mit  $K_M^{\text{CYP79B2}} \sim 25 \mu\text{M}$  und  $K_M^{\text{CYP71A13}} \sim 4,5 \mu\text{M}$  weitgehend der Literatur ( $K_M^{\text{CYP79B2}} = 21 \mu\text{M}$  (Mikkelsen *et al.*, 2000b);  $K_M^{\text{CYP71A13}} = 5 \mu\text{M}$  (Müller *et al.*, 2015)). Der ermittelte  $K_M^{\text{CYP71B15}}$  von

ca. 66  $\mu\text{M}$  erwies sich dahingegen als deutlich höher als in den Literaturangaben ( $K_M^{\text{CYP71B15}} = 29 \mu\text{M}$  (Schuhegger *et al.*, 2006);  $K_M^{\text{CYP71B15}} = 27 \mu\text{M}$ ). Möglicherweise wurde das (R)-Enantiomer von DHCA für die durchgeführten Experimente verwendet. Das (R)-DHCA-Enantiomer weist im Vergleich zum (S)-Enantiomer lediglich 36% katalytische Aktivität auf (Schuhegger *et al.*, 2006). Mögliche Effekte durch Koexpression oder Interaktion zweier CYPs wären allerdings nicht durch die Wahl des weniger aktiven DHCA-Enantiomers beeinträchtigt. Wurden CYP79B2 und CYP71A13 gemeinsam in Hefe exprimiert war es bei Anwesenheit von Glutathion möglich die Umwandlung von Tryptophan zu GS-IAN zu detektieren. Dies beweist, dass beide Enzyme aktiv waren und ein *channeling* des Substrates möglich war (siehe Abschnitt 4.1.6). Der  $K_M$ -Wert von CYP79B2 für Tryptophan sank um 36,5%. Im Gegensatz dazu blieb die Michaeliskonstante von CYP71A13 konstant. Die Anwesenheit von CYP71A13 scheint sich positiv auf die Affinität von CYP79B2 zu Tryptophan durch auszuwirken. Das Substratchanneling scheint effektiver ablaufen zu können. Die Ursache dieser positiven Wechselwirkung konnte bisher noch nicht geklärt werden. Verschiedene Möglichkeiten können in Betracht gezogen werden. Unter Annahme der Hypothese, dass CYP79B2 als Schlüsselenzym (Hub) den Fluss von Tryptophan in die verschiedenen Biosynthesewege reguliert (siehe oben) könnte eine Koexpression und Interaktion mit CYP71A13 dazu führen, dass eine „Zugkraft“ entsteht und Tryptophan bevorzugt in Richtung der Camalexinbiosynthese fließt. Solch ein Effekt wurde bereits für Enzyme der Flavonoidbiosynthese beschrieben (Crosby *et al.*, 2011). Mit Hilfe von FRET-FLIM-Messungen wurde eine Interaktion zwischen der Chalcon-Synthase (CHS) und der Flavonol-Synthase (FLS1) bzw. zwischen CHS und der Dihydroflavonol-4-Reduktase (DFR) nachgewiesen. FLS1 und DFR stehen dabei in Konkurrenz zueinander. Liegt ein Komplex von CHS und DFR vor, wird die Synthese von Anthocyanen begünstigt. FLS1 kann durch Bindung an CHS die Interaktion zu DFR stören. Auch dies wurde in FRET-FLIM-Analysen deutlich gezeigt. Die FRET-Effizienz zwischen dem Interaktionspaar DFR-YFP/CHS-mCherry sank bei zusätzlicher Expression des Konkurrenzzyms FLS1-CFP von 11,8% auf 3,2%. Es wird vermutet, dass diese drastische Änderung mit einer Reorganisation des Metabolons einhergeht und zu einer verstärkten Flavonolbiosynthese führt (Crosby *et al.*, 2011). Über die Interaktion von CHS mit FLS1 oder DFR kann folglich die Biosynthese von Anthocyanen und Flavonolen reguliert werden. Unterstützt wird diese Beobachtung dadurch, dass in *fls1-knock-out* Linien im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen die annähernd doppelte Menge an Anthocyanen akkumuliert, was darauf hindeutet, dass die Flavonolbiosynthese der Anthocyanbiosynthese bevorzugt wird (Stracke *et al.*, 2009). Indolglucosinolate werden, als Phytoanticipine (Pedras *et al.*, 2009b), konstitutiv in der Pflanze exprimiert (VanEtten *et al.*, 1994). Demzufolge liegt die Vermutung nahe, dass CYP79B2 bevorzugt vorhandenes Tryptophan in diesen Biosyntheseweg leitet. Eine Interaktion von CYP83B1 und CYP79B2 wurde experimentell noch nicht bestätigt. Beide

Enzyme sind allerdings stark koexprimiert und koreguliert (Pearson Koeffizient = 0,75; von [http://www-ibmp.u-strasbg.fr/~CYPedia/CYP79B2/CoExpr\\_CYP79B2\\_Stress.html](http://www-ibmp.u-strasbg.fr/~CYPedia/CYP79B2/CoExpr_CYP79B2_Stress.html); Stand 07.08.2017). Nach Pathogenbefall wird die Bildung von Camalexin-spezifischen Enzymen induziert (Schuhegger *et al.*, 2006, Nafisi *et al.*, 2007, Klein *et al.*, 2013), CYP71A13 interagiert mit CYP79B2 und erhöht den Substratfluss in Richtung Camalexin. Ob diese Bindung, wie im Fall von CHS, DFR und FLS1, eine konkurrierende Reaktion ist, oder ob CYP71A13 und CYP83B1 gleichzeitig an CYP79B2 binden können müsste in nachfolgenden Analysen genauer untersucht werden. Der *Knock-out SUPERROOT 1 (SUR1)*, des nachfolgenden Enzyms in der Biosynthese von Indolglucosinolaten, führt zu einer Akkumulation von Camalexin (Glawischnig *et al.*, 2004). Die Synthese von Camalexin könnte daher eine „artifizielle“ Reaktion auf den *sur1*-Phänotyp sein (Stepanova *et al.*, 2005) oder aber durch Regulation der CYP79B2-Aktivität ausgelöst werden.

Unabhängig von möglichen Konkurrenzreaktionen zwischen Enzymen der Camalexin- und Indolglucosinolatbiosynthese könnte die erhöhte Substrataffinität von CYP79B2 während der Interaktion mit CYP71A13 auf veränderte sterische Eigenschaften zurückgeführt werden. Möglicherweise wird durch die Ausbildung eines Heterodimers eine Konformationsänderung des CYPs herbeigeführt, was dann zu der höheren Affinität gegenüber Tryptophan führt. Im humanen System ist solch ein Effekt für Cytochrom b5 (*Cytb5*) bekannt. *Cytb5* interagiert mit dem humanen CYP17A1, was zu einer Strukturänderung des CYPs führt. Dies wiederum ermöglicht eine stärkere Bindung zwischen der Reduktase und dem CYP. Mehr Elektronen stehen zur Verfügung und katalytische Reaktionen laufen effizienter ab (Bassard *et al.*, 2017, Bhatt *et al.*, 2017). Durch Kristallisation von CYP79B2 allein und in Kombination mit CYP71A13 könnten solche Strukturänderungen detektiert werden. Dieser Vorgang gestaltet sich allerdings für membranständige Proteine problematisch, da sie auf Grund ihrer amphipatischen Eigenschaften in wässriger Lösung meist Aggregate ausbilden (Ostermeier und Michel, 1997). Bisher wurden kaum Kristallstrukturen von pflanzlichen CYPs veröffentlicht. Eine Ausnahme stellt das für atypische P450-Enzym CYP74A1 dar (Lee *et al.*, 2008). CYP74 Enzyme katalysieren die Umwandlung von Lipidhydroperoxide in andere Oxylipine und sind plastidär lokalisiert. CYP74A1 besitzt außerdem keine klassische Transmembrandomäne, sondern eine Art *membrane-binding-loop*. Das Enzym ist daher kaum als Vergleichsstruktur für andere CYPs geeignet. Für CYP73A1 (Zimtsäure-4-Hydroxylase aus *Helianthus tuberosus*) konnte durch Modifikation des hydrophoben N-Terminus eine Kristallstruktur generiert werden (Schoch *et al.*, 2003). Der Membrananker wurde durch die PD1-Peptidsequenz ersetzt. PD1 ist eine amphipatische Helix von 25 Aminosäuren und wird häufig eingesetzt um Proteine frei von Detergenzien und stabil in Lösung halten zu können (Schafmeister *et al.*, 1993, Schoch *et al.*, 2003). In Anlehnung an das Vorgehen bei der Kristallisation von CYP73A1 (Ortholog zu CYP73A5 in *A. thaliana*) wurden eigene Versuche

zur Strukturanalyse des multifunktionellen Enzym CYP71B15 unternommen. Diese scheiterten allerdings bereits an dem Schritt das Enzym in löslicher Form zu exprimieren. Es wurden verschiedenste Expressionsorganismen, Expressionsstämme und Expressionsmethoden ausprobiert. Durch entfernen des Membranankers konnte in keinem Fall ein korrekt gefaltetes, aktives Protein gebildet bzw. detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Auf Grund der fehlenden Vergleichsstrukturen können folglich keine Aussagen über mögliche Interaktionsflächen zwischen CYP79B2 und CYP71A13 und daraus folgenden Konformationsänderungen getroffen werden.

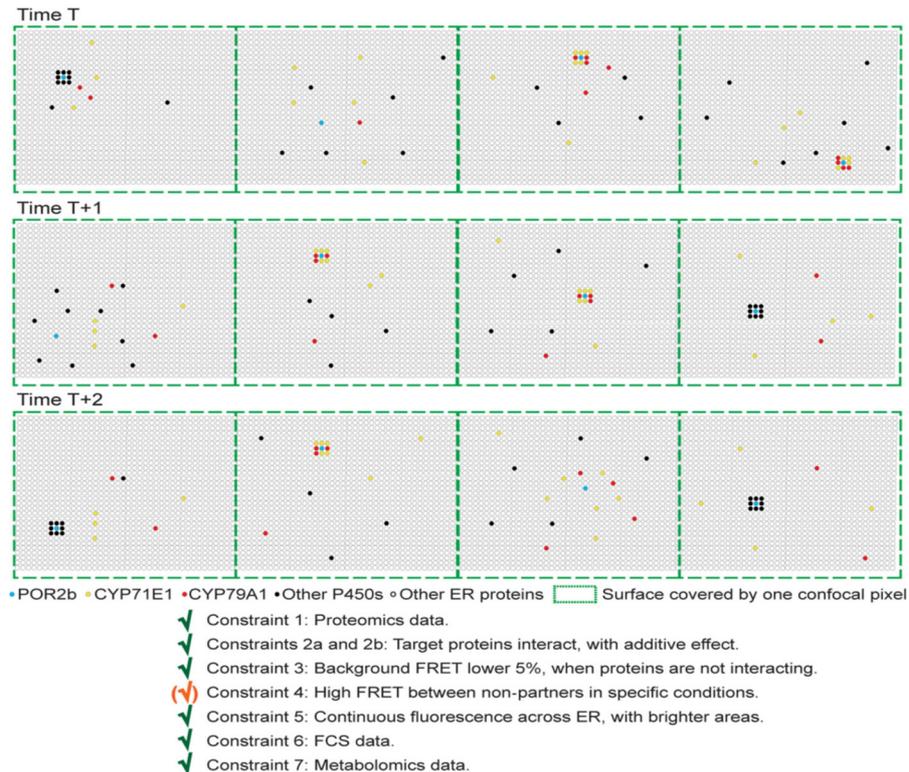
Eine dritte Hypothese für die erhöhte Aktivität von CYP79B2 in Anwesenheit von CYP71A13 wäre eine *feedback*-regulatorische Funktion von CYP71A13. Solch eine Aktivität wurde für die Zimtsäure-4-Hydroxylase (C4H) aus Luzerne (*Medicago sativa*) bereit gezeigt. In transgenen Tabaklinien konnte durch Expression von *sense*- und *antisense*-Konstrukten von C4H eine direkte Abhängigkeit der Phenylalanin-Ammonjak-Lyase (PAL)-Aktivität von C4H nachgewiesen werden (Blount *et al.*, 2000). In Pflanzen mit reduzierter C4H-Expression wurde eine deutlich geringere PAL-Aktivität detektiert und umgekehrt. Selbst in PAL-überexprimierenden Linien konnte eine inhibitorische Wirkung nachgewiesen werden, wenn C4H abreguliert vorlag. Ein weiteres Indiz dafür, dass C4H als Sensor für den Substratfluss während der Phenylpropanoidsynthese fungiert, ist der fehlende Einfluss von PAL auf die Aktivität von C4H. C4H scheint lediglich bei der Expression und Aktivität von PAL von Bedeutung zu sein. Das Enzym hat keinen Einfluss auf die Aktivität des in der Synthese nachfolgenden Enzyms CHS (Blount *et al.*, 2000). Diese Beobachtungen lassen sich auf die Enzyme der Camalexinbiosynthese übertragen. In Anwesenheit von CYP71A13 ist die Substrataffinität von CYP79B2 auf Tryptophan um 36,5% erhöht. CYP71A13 scheint als positiver Regulator auf den Tryptophanfluss zu fungieren. CYP79B2 wiederum hat keinen Einfluss auf die Aktivität von CYP71A13 (siehe Abschnitt 4.1.6). Auf Grund der transienten Interaktion dieser beiden Enzyme wäre es denkbar, dass CYP79B2 eher als Schlüsselenzym bei der Regulation des Tryptophanflusses in die verschiedenen, durch CYP79B2 katalysierten, Reaktionen eine Rolle spielt (siehe oben) und CYP71A13 unter Auftreten des entsprechenden Reizes die Reaktion in Richtung von Camalexin verstärkt. Zwischen CYP71A13 und CYP71B15 wiederum wurde eine starke und robuste Interaktion detektiert (siehe Abschnitt 4.1.4 und Abschnitt 4.1.5). Ein wechselseitiger Einfluss auf Substrataffinitäten konnte allerdings nicht bestätigt werden (siehe Abschnitt 4.1.6). Diese Beobachtung steht im Einklang mit den Ergebnissen von Blount *et al.* (2000). Ob auf posttranslationaler Ebene eine Regulation stattfindet, zum Beispiel durch CYP71A13, kann nicht vollständig ausgeschlossen werden. CYP71A13 und CYP71B15 sind keine direkt aufeinanderfolgenden Enzyme im Camalexinbiosyntheseweg (anders als CYP79B2 und CYP71A13). Für die Umwandlung von IAN zu Cys(IAN) werden mind. zwei cytosolische Enzyme, GGP1 und eine GST, benötigt

(Dixon *et al.*, 2010, Geu-Flores *et al.*, 2011, Su *et al.*, 2011, Klein *et al.*, 2013). Zur Bestimmung der  $K_m$ -Werte wurden die zwei zu untersuchenden Enzyme (und die für Aktivität essentielle ATR1) heterolog in *S. cerevisiae* exprimiert. Möglicherweise ist dieser experimentelle Ansatz nicht ideal gewählt, um einen regulatorischen Einfluss von CYP71A13 auf CYP71B15 (oder *vice versa*) detektieren zu können. Es wäre denkbar, dass die fehlenden Komponenten für eine regulatorische Funktion *in planta* von entscheidender Bedeutung sind. Um abschließend klären zu können, ob CYP71B15 posttranslational von CYP71A13 reguliert wird, oder ob wie im Fall der Phenylpropanoidbiosynthese, kein Einfluss vorliegt, müssten weitere Analysen vorgenommen werden. Zum Beispiel könnte *N. benthamiana* als pflanzliches Expressionssystem genutzt werden, oder GGP1 und evtl. eine GST zusätzlich in Hefe exprimiert werden, wobei anzumerken ist, dass hierfür bisher keine spezifische AtGST ermittelt werden konnte (siehe Abschnitt 4.2 und Abschnitt 5.2).

In diversen Studien wurde immer wieder gezeigt, dass die meisten CYPs auf Reduktasen als Elektronendonatoren angewiesen sind (Werck-Reichhart und Feyereisen, 2000, Paine *et al.*, 2005). Folglich liegt die Vermutung nahe, dass dieses Enzym auch in Interaktion mit CYPs tritt. Dies wurde sowohl für die Cytochrome-P450-Reduktase während der Dhurrinbiosynthese (Møller, 2010) als auch für die NADPH-Cytochrome *b5*-Reduktase der Ligninbiosynthese (Bassard *et al.*, 2012) gezeigt. In beiden Fällen wurden die Interaktionen mit Hilfe von ungerichteten Co-IPs detektiert. Auch die Reduktase ATR1 von *A. thaliana* wurde in einer ungerichteten Co-IP mit CYP71B15 als *bait* nachgewiesen. Das Protein lag nach *B. cinerea* ca. 5-fach verstärkt vor (im Vergleich zu nicht induzierten Pflanzen; persönliche Kommunikation, E. Glawischnig). In der vorliegenden Arbeit wurde die Interaktion von ATR1 mit CYP71A13 und CYP71B15 mit Hilfe von gerichteter Co-IP überprüft. Die Bindung mit CYP71A13 konnte bestätigt werden, eine Interaktion mit CYP71B15 ließ sich nicht reproduzieren. Es kann also davon ausgegangen werden, dass die Komplexbildung zwischen ATR1 und CYP71A13 stabil vorliegt, wohingegen die putative Interaktion mit CYP71B15 transient und schwach wäre. Da auch CYP71B15 für eine erfolgreiche katalytische Aktivität ATR1 als Elektronendonator benötigt (Böttcher *et al.*, 2009), wäre es überraschend, wenn diese beiden Enzyme keine Bindung eingehen sollten. Mit Hilfe von FRET-FLIM-Analysen oder FCS könnte auch eine transiente Interaktion detektiert werden. Denkbar wäre auch, dass erst eine stabile Interaktion von CYP71A13 mit CYP71B15 die Affinität von CYP71B15 zur ATR1 soweit erhöht, dass eine Interaktion nachweisbar wäre. Solch eine Art Rekrutierung wurde das cytosolische Enzym UGT85B1 nachgewiesen (Nielsen *et al.*, 2008). In tierischen Systemen wurde gezeigt, dass die Affinität eines CYPs zur Reduktase sowohl von der Anwesenheit weiterer CYPs als auch von dem Vorhandensein des passenden Substrates abhängig ist (Hazai *et al.*, 2005). Möglicherweise wurden in den durchgeführten Analysen nicht

die richtigen Bedingungen gewählt, um eine Interaktion von CYP71B15 und ATR1 zu ermöglichen und folglich zu detektieren.

Bassard *et al.* (2017) diskutieren am Beispiel des Dhurrinmetabolons verschiedene Möglichkeiten wie sich Proteinkomplexe innerhalb der ER-Membran ausbilden könnten. Dabei betrachten sie sieben Bedingungen die für ein gültiges Model erfüllt sein sollten (siehe Abbildung 5.3). Bedingung 1 beschreibt die statistische Häufigkeit der an der Biosynthese beteiligten Enzyme im ER. Diese Angaben beziehen sich auf vorhandene quantitative Proteome. Im Falle der Dhurrinbiosynthese entsprechen weniger als 0,8% der Gesamtproteinmenge im ER den Dhurrin-spezifischen Enzymen. Die zweite Anforderung besteht darin, dass hohe FRET-Effizienzen eindeutig auf Interaktion von Proteinen zurückgeführt werden können. Wird die Interaktionsstärke durch die Anwesenheit eines dritten Proteins weiter verstärkt, erhöht sich die Wertigkeit dieser Bedingung zusätzlich. Nicht interagierende Proteine sollten eine signifikant niedrigere FRET-Effizienz aufweisen, was die dritte Anforderung an ein stichhaltiges Interaktionsmodel darstellt. Die vierte Anforderung beschreibt die Möglichkeit, dass unter spezifischen Bedingungen zwei nicht-interagierende Proteine in räumliche Nähe zueinander gelangen und auf die Weise indirektes FRET gemessen werden könnte. Dies wäre für die Enzyme FLS1 und DFR der Flavonoidsynthese denkbar. Beide interagieren mit CHS und stehen in Konkurrenz zueinander (Crosby *et al.*, 2011). Möglicherweise könnte indirekter FRET zwischen diesen beiden Enzymen entstehen. In der fünften Anforderung an ein Metabolon-Model wird davon ausgegangen, dass fluoreszenzmarkierte Proteine sich gleichmäßig im ER verteilen, was zu einer gleichmäßigen Emission innerhalb der Membran führt. Gleichzeitig wären durch *clustering* der interagierenden Enzyme hellere Spots erkennbar. Wenn durchführbar, wäre in Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS)-Analysen eine verringerte Diffusionsgeschwindigkeit eines markierten Enzyms detektierbar, wenn dieses mit einem oder mehreren weiteren Enzymen interagiert. Dies würde die sechste Bedingung an ein gültiges Model von Enzymkomplexen widerspiegeln. Durch Nachweis eines effektiven Substratchannelings innerhalb des putativen Metabolons wäre auch die letzte Bedingung erfüllt (Bassard *et al.*, 2017). Für das Beispiel der Dhurrinbiosynthese ergab sich unter Einbeziehung sämtlicher Daten (Nielsen *et al.*, 2008, Laursen *et al.*, 2016) und unter Voraussetzung der beschriebenen Anforderungen an ein Interaktions-Model folgendes Bild (siehe Abbildung 5.3): die für einen Syntheseweg spezifischen CYPs arrangieren sich in einem dynamischen Komplex um die Cytochrome-P450-Reduktase POR. POR dient als „Elektronen-Ladestation“ für CYPs, was zu Konkurrenz zwischen CYPs verschiedener Synthesewege führt. In der Folge kommt es zu Verdrängungsreaktionen (bereits gezeigt für Enzyme der Flavonoidsynthese (Crosby *et al.*, 2011)) und es entsteht ein kontinuierlicher Prozess von Assoziation und Dissoziation der kompetitiven Komplexe an der Reduktase (Bassard *et al.*, 2017).



### Abbildung 5.3 Model eines Dhurrin-Metabolons

Basierend auf den Daten von Laursen *et al.* (2016) wurde ein Model zur Ausbildung eines dynamischen Metabolons entwickelt. Unter Berücksichtigung der sieben Anforderungen (Constraint 1-7) an ein allgemeingültiges Model eines Metabolons innerhalb der ER-Membran konnte folgende Hypothese aufgestellt werden: Die Reduktase POR steht im Zentrum und CYPs und andere Enzyme eines Biosyntheseweges arrangieren sich darum. Konkurrierende Enzyme eines anderen Syntheseweges unterbrechen die bestehende Interaktion zur Reduktase, um anschließend selbst einen Komplex mit dem Enzym auszubilden. Es entsteht ein kontinuierlicher Prozess der Assoziation und Dissoziation von Proteinen entlang der POR (Time T bis TimeT+2). (Abbildung aus Bassard *et al.* (2017))

Unter der Voraussetzung, dass CYP71B15 (und evtl. auch CYP79B2) mit der ATR1 in Interaktion treten (müsste durch entsprechende Analysen überprüft werden, siehe oben), könnte dieses Modell eines Metabolons auch auf die Camalexin-spezifischen Enzyme übertragen werden. Anhand der Proteomdaten der ungerichteten Co-IP (Daten erhoben von Ms. Manisha und E. Glawischnig, analysiert von Stephanie Heinzlmeir) kann abgeschätzt werden, dass, ca. 2% aller detektierten Proteine Enzymen der Camalexinbiosynthese waren. In den durchgeführten FRET-, Co-IP und FRET-FLIM-Messungen wurde deutlich die Interaktion der Camalexin-spezifischen Enzymen gezeigt (siehe Abschnitt 4.1.3, Abschnitt 4.1.4 und Abschnitt 4.1.5). In FRET-Analysen wurden Effizienzen von ca. 30% für das Interaktionspaar CYP71A13/CYP71B15 bestimmt. Im Vergleich dazu lag die Effizienz der Negativkontrolle bei ca.15%. In FLIM-Messungen wurden Reduktionen von bis zu 0,2 ns in der Fluoreszenzlebensdauer nachgewiesen. Diese Erkenntnisse können als zuverlässig angesehen werden, da in Co-IP-Versuchen keine Interaktion zwischen Enzymen der

Camalexinsynthese und CYP73A5 und CYP98A3 der Ligninbiosynthese (Zimtsäure-4-Hydroxylase bzw. Coumarsäure-3-Hydroxylase aus *A. thaliana* (Bassard *et al.*, 2012)) detektiert wurden. Damit können Nr.2 und Nr.3 der aufgestellten Bedingungen als bestätigt angesehen werden (Bassard *et al.*, 2017). Die vierte Anforderung der erhöhten FRET-Effizienz zwischen Enzymen konkurrierender Synthesewege ist nur bedingt erfüllbar. In den in dieser Arbeit durchgeführten Analysen konnte keine unspezifische Interaktion in Co-IP Experimenten gezeigt werden. In vorrangigen Studien der ungerichteten Co-IP mit CYP71B15 als *bait*-Protein hingegen wurden auch CYPs anderer Biosynthesen (z.B. CYP71B6, CYP83A1, CYP83B1) oder CYPs von unbekannter Funktion detektiert. In zuvor durchgeführten Analysen konnte in einigen Fällen ebenfalls eine Interaktion zwischen Camalexin-spezifischen Enzymen und CYP73A5 und CYP98A3 gezeigt werden (Chapman, 2014). In umgekehrter Weise wurde in TAP-Experimenten mit CYP98A3 ebenfalls CYP71B15 kopräzipitiert (Bassard *et al.*, 2012). Offenbar können CYP71A13 oder CYP71B15 unter gewissen, bisher nicht genauer definierten Bedingungen auch unspezifische Interaktionen eingehen. Allerdings sind diese vermutlich nur schwach ausgeprägt und von kurzer Dauer. Ob solche unspezifischen Bindungen für die Ausbildung eines komplexen Interaktionsnetzwerkes von Camalexin-spezifischen Enzymen von Bedeutung sind, müsste eingehend untersucht werden. Als fünfte Anforderung an ein gültiges Metabolon-Model wurde eine gleichmäßige Fluoreszenz markierter Proteine entlang der ER-Membran gefordert. Auch dies konnte für Enzyme der Camalexinbiosynthese beobachtet werden. GFP-markiertes CYP71A13 konnte unter Anwendung von konfokaler Mikroskopie im gesamten ER-Netzwerk nachgewiesen werden. Bei genauerer Betrachtung der Lokalisation fiel auf, dass sich kleine punktförmige Akkumulationen innerhalb der Membran ausbildeten (siehe Abbildung 4.4). Dies könnte auf ein *clustering* des Proteins in bestimmten Bereichen hindeuten. Nähere Untersuchungen in koexprimierenden Linien müssten folgen, um diese Hypothese genauer zu überprüfen. Auch FCS-Daten liegen bisher noch nicht vor, weshalb keine Evaluierung der sechsten Anforderung an einen Camalexin-Komplex erfolgen kann. Wie auch für Enzyme des Dhurrinsyntheseweges, konnte allerdings die letzte von Bassard *et al.* (2017) vorgeschlagene Eigenschaft eines Metabolons erfüllt werden. Für CYP79B2 und CYP71A13 konnte effizientes Substrat-*channeling* nachgewiesen werden. CYP79B2 hat bei Anwesenheit von CYP71A13 eine deutlich höhere Affinität zu Tryptophan (siehe oben und Abschnitt 4.1.6).

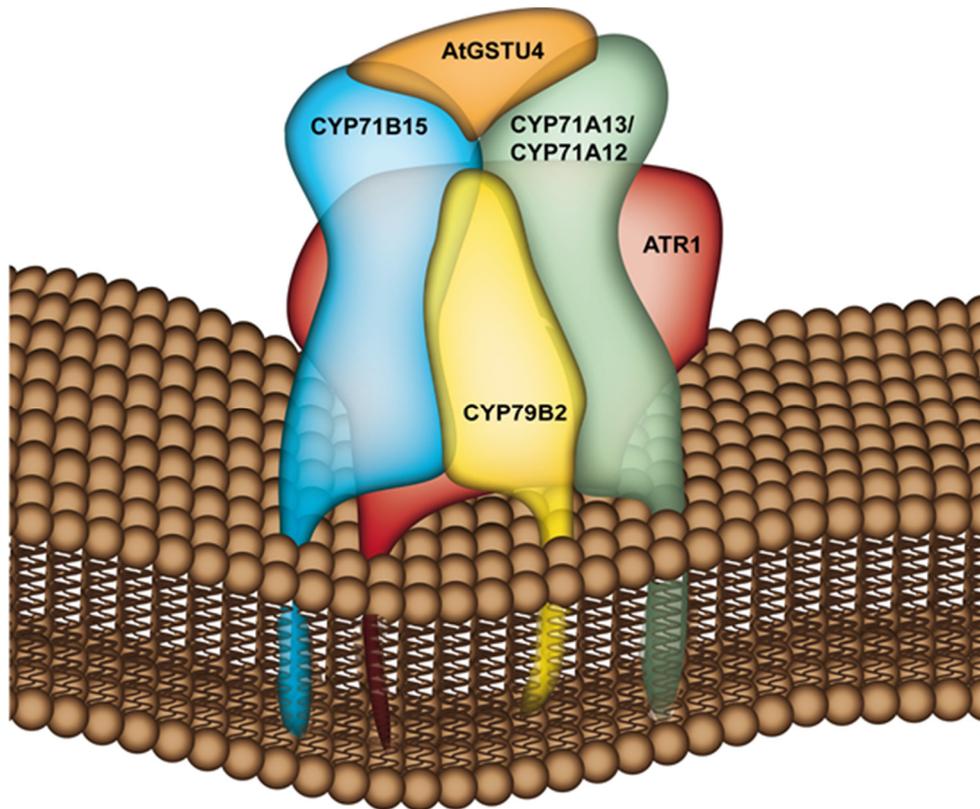
Da fast alle Anforderungen die an einen Komplex der Dhurrin-spezifischen Enzyme gestellt wurden auch auf die Enzyme der Camalexinbiosynthese zutreffen kann folglich festgestellt werden, dass auch diese Proteine einen Komplex ausbilden könnten, bei dem die ATR1 als Elektronendonator im Zentrum steht. Eine abschließende Beurteilung kann allerdings nicht erfolgen, da weitere Analysen nötig wären, um zweifelsfrei diese komplexe Formation nachzuweisen.

Diese Betrachtungen basieren allerdings auf der Annahme, dass eine Interaktion von CYP71B15 und ATR1 existiert und lediglich mit den verwendeten Methoden nicht nachweisbar war. Prinzipiell besteht allerdings durchaus auch die Möglichkeit, dass CYP71B15 zwar mit CYP71A13, aber nicht mit ATR1 interagiert. In diesem Fall könnte trotzdem ein Komplex zwischen den Camalexin-spezifischen Enzymen ausgebildet werden. In diesem würde nicht die Reduktase sondern CYP71A13 im Zentrum stehen. Die nachgewiesene Interaktion zwischen CYP71A13 und ATR1 (siehe Abbildung 4.13) könnte so stark sein, dass bei gleichzeitiger Interaktion von CYP71A13 mit CYP71B15 auch CYP71B15 und CYP79B2 mit Elektronen versorgt werden könnten. Unter Einbeziehung von Literaturangaben und der in dieser Arbeit generierten Daten ist dieses Modell eines Metabolons als eher unwahrscheinlich zu betrachten.

ATR1 ist (zusammen mit ATR2 (Mizutani und Ohta, 1998)) für die Aktivität sämtlicher CYPs in *A. thaliana* von Bedeutung. Dieses Enzym als Kern von biosynthetischen Komplexen und folglich als „Ladestation“ zu betrachten, erscheint aus energetischer Sicht sinnvoll. Enzymkomplexe der verschiedenen Biosynthesen (Indolglucosinolate, cyanogene Glycoside, Camalexin etc.) binden für die Dauer der Reaktionen an die Reduktase und lösen sich im Anschluss erneut aus dem Verband.

Zusätzlich unterstützt wird das Modell der dynamischen Metabolonbildung dadurch, dass auch Intermediate eines Syntheseweges als pflanzlicher Abwehrstoff fungieren können. So weisen Oxime selbst auch eine fungizide Wirkung auf (Drumm *et al.*, 1995). Abhängig davon, ob eine Enzymkomplex ausgebildet wird (oder nicht) erfolgt somit eine noch feinere Regulation der pflanzlichen Abwehrantwort gegen diverse Pathogene und Schädlinge.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass Camalexin-spezifische Enzyme ein Metabolon ausbilden (siehe Abbildung 5.4) und somit ein effektives Substratchanneling ermöglicht wird.



**Abbildung 5.4 Modell eines Camalexin-Metabolons.**

Anhand der gewonnenen Ergebnisse bezüglich der Protein-Protein-Interaktionen zwischen Camalexin-spezifischen Enzymen könnte folgendes Modell generiert werden: Als Elektronendonator steht ATR1 als zentrales Protein im Komplex. CYP79B2, CYP71A13 (bzw. CYP71A12) und CYP71B15 treten sowohl in Interaktion miteinander als auch wahrscheinlich mit ATR1. AtGSTU4 bindet als cytosolische Komponente an CYP71A13 und CYP71B15. Die Interaktion von CYP79B2 zu CYP71A13 bzw. CYP71B15 liegt nur transient vor, um eine schnelle Anpassung der Abwehrantwort auf verschiedene Elicitoren zu ermöglichen. Die Bindung der restlichen biosynthetischen Enzyme untereinander liegt dahingegen robust vor, um ein effektives *channeling* der Substrate zu ermöglichen. AtGSTU4 interagiert ebenfalls klar mit Camalexin-spezifischen Enzymen. Die biologische Relevanz dieser Bindung nicht noch nicht eindeutig geklärt und sollte Bestandteil weiterer Studien sein.

## 5.2. AtGSTU4 beeinflusst indirekt die Camalexinbiosynthese

Während der Camalexinbiosynthese erfolgt nach Aktivierung des IANs durch ein CYP eine Glutathionylierung. Es entsteht GS-IAN, welches weiter zu Cys(IAN) prozessiert wird. Der Schritt der Glutathionylierung wird höchstwahrscheinlich durch eine GST katalysiert. Nach Etablierung eines Hefeassays (siehe Abschnitt 4.2.1) wurde deutlich, dass CYP71A13 in *S. cerevisiae* spezifisch an der Umwandlung von IAN zu GS-IAN beteiligt ist. Das Enzym akzeptiert im Gegensatz zu CYP71B15 und CYP71B20 keine Hefe-eigenen GSTs. Diese Beobachtung unterstreicht die Erkenntnisse von Klein *et al.* (2013) und Müller *et al.* (2015), dass CYP71A13 neben der Umwandlung von IAOx zu IAN auch die Reaktion zu Cys(IAN) katalysiert. Da die Expression von drei CYPs (CYP79B2, CYP71A13 und CYP71B15) ausreichend ist um Camalexin transient in *N. benthamiana* zu bilden, liegt die Vermutung nah, dass CYP71A13 als Hauptenzym die Reaktion von IAN zu Cys(IAN) vermittelt.

Weiterhin wurde im durchgeführten Hefeassay deutlich, dass AtGSTU2 wichtig für den Glutathionylierungsschritt sein könnte. Dies konnte allerdings in nachfolgenden Pflanzenstudien nicht bestätigt werden. Su *et al.* (2011) postulierten AtGSTF6 als Camalexin-spezifisches Enzym. In früheren detaillierten Mutantanalysen von AtGSTF2, AtGSTF3, AtGSTF6 und AtGSTF7 konnte nach Silbernitrat-Induktion bzw. *P. syringae* DC3000/*avrRPM1* Infektion kein verändertes Camalexinmuster festgestellt werden. Das gleiche Ergebnis ergab die Analyse von AtGSTF9 und AtGSTF10. Auch diese zwei Enzyme scheinen nicht an der Camalexinbiosynthese beteiligt zu sein (Rauhut, 2009). In dieser Arbeit wurde, mit Hilfe des Hefeassays und anschließenden Pflanzenstudien, versucht 54 AtGSTs bezüglich ihrer Beteiligung an der Camalexinsynthese näher zu charakterisieren. Es konnte kein Enzym identifiziert werden, welches spezifisch die Umsetzung von IAN zu GS-IAN katalysiert. Durch hohe Redundanz innerhalb der Familie der GSTs ist es möglich, dass der Ausfall eines einzelnen Enzyms durch andere Mitglieder der Familie ausgeglichen wird.

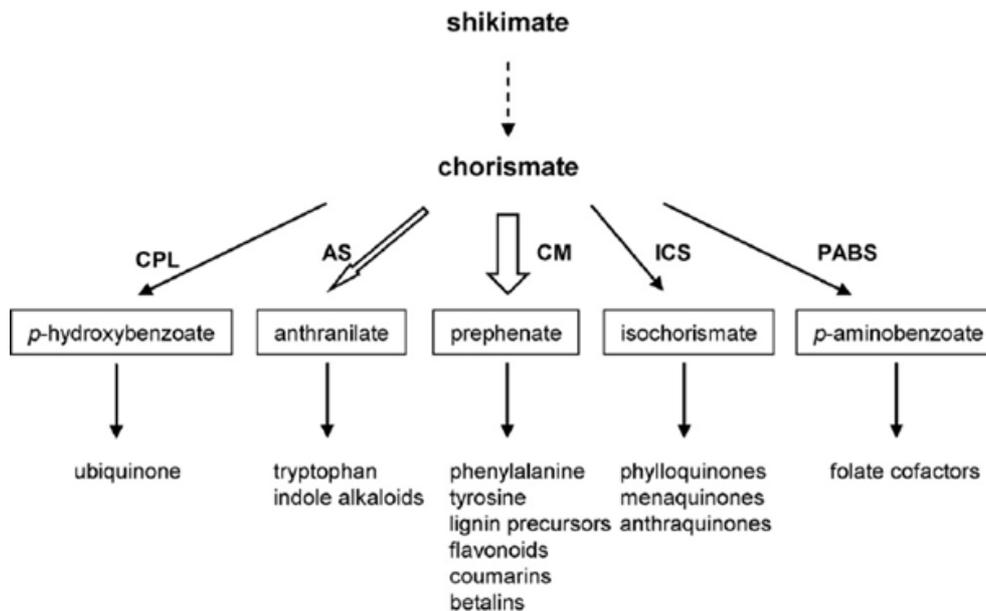
Da GSTs eine hohe Promiskuität aufweisen, besteht die Möglichkeit, dass nicht ein einzelnes Enzym die Glutathionylierung von IAN katalysiert, sondern mehrere Mitglieder der Familie IAN als Substrat akzeptieren. Diese Vielfalt an akzeptierten Substraten von einem einzelnen Enzym kann durch strukturelle Flexibilität und Konformationsänderungen im aktiven Zentrum erklärt werden. (Labrou *et al.*, 2015). Für die Detoxifizierung von Herbiziden in *A. thaliana* ist dies bereits beschrieben. So wird das Fungizid Anilazin von diversen AtGSTs *in vitro* umgesetzt (unter anderem von AtGSTF2, AtGSTF4, AtGSTU5 und AtGSTU25) (Krajewski *et al.*, 2013). Auch das humane Enzym GSTA1-1 ist ein bekannter Vertreter der stark promiskuen Enzyme. Im menschlichen Körper dient es der Entgiftung zahlreicher Hydroperoxide, wie zum

Beispiel Lipidhydroperoxid (Zhao *et al.*, 1999) und schützt damit vor Zellschäden durch oxidativen Stress (Wijeratne *et al.*, 2005).

Eine dritte Erklärung für die bisher erfolglose Identifizierung einer spezifischen GST als Katalysator der Reaktion von IAN zu Cys(IAN) wäre die Vernachlässigung einer dritten Komponente bei bisherigen Analysen. GSTs agieren als Homo- oder Heterodimere (Dixon *et al.*, 1999). Diese Dimerisierung wirkt sich auf die Stabilität des Proteins aus, erhöht die Effektivität und beeinflusst das Substratspektrum (Sommer und Böger, 1999, Wang und Yang, 2011). Dies wurde zum Beispiel für GSTII aus *Zea mays* gezeigt. GSTII stellt ein Heterodimer aus GST27 und GST29 dar (Anmerkung: nicht vergleichbar mit der Nomenklatur der AtGSTs). Da beide Untereinheiten unabhängig voneinander funktionell sind, sollten entsprechend der Theorie von Sommer und Böger (1999) die Umsatzraten von Substraten nach Dimerisierung nicht signifikant von der Umsatzrate der Monomere abweichen. Dies konnte in Enzymtests für die Umsetzung von CDNB, Cumolhydroperoxid und tert-Butylhydroperoxid nicht bestätigt werden. Es wurde ein additiver Effekt in der Glutathionierungsreaktion beobachtet. Für ein anderes Substrat wurde sogar eine Hemmung der Aktivität detektiert (Sommer und Böger, 1999). Im Falle der Spezifität einer GST während der Camalexinbiosynthese könnte daher erst durch Ausbildung eines Heterodimers die nötige Substratspezifität für IAN erreicht werden. In allen bisherigen Studien bezüglich des IAN-Glutathionierungsschrittes wurden einzelne GSTs heterolog exprimiert und analysiert, was lediglich die Bildung von Homodimeren zulässt. Mögliche synergistische Effekte können auf diese Weise nicht zustandekommen und eine potentielle Spezifität eines GST-Heterodimers nicht detektiert werden. In dem in dieser Arbeit etablierten Hefeassay könnte für die Untersuchung von verschiedenen Heterodimeren genutzt werden. Da nicht alle GSTs mit Genen der Camalexinbiosynthese koexprimiert sind, wäre es sinnvoll zunächst Kombinationen solcher GSTs zu überprüfen, die mit *CYP71A13* koexprimiert sind. Dazu zählen neben der in dieser Arbeit untersuchten *AtGSTU4* die Gene *AtGSTU3*, *AtGSTU10*, *AtGSTF2* und *ATGSTF3* ([http://www-ibmp.u-strasbg.fr/~CYPedia/CYP71A13/CoExpr\\_CYP71A13\\_Stress.html](http://www-ibmp.u-strasbg.fr/~CYPedia/CYP71A13/CoExpr_CYP71A13_Stress.html), Stand 01.08.2017). Auch Kombinationen mit *AtGSTU7*, *AtGSTU8*, *AtGSTU9* und *AtGSTF7* sollten berücksichtigt werden, da diese Enzyme im durchgeführten Hefeassay eine vergleichsweise hohe Umsatzrate aufwiesen (siehe Abbildung 4.21). Möglicherweise wird die Aktivität der Enzyme durch Ausbildung des korrekten Heterodimers potenziert.

*AtGSTU4* wies in den durchgeführten Studien keinen direkten Einfluss auf die Camalexinbiosynthese auf, interagiert allerdings zweifelsfrei mit *CYP71A13* (siehe Abschnitt 4.2.3). Um ein besseres Verständnis für die Rolle von *AtGSTU4* zu entwickeln, wurden erste MS-Analysen mit *knock-out* und Überexpressionspflanzen durchgeführt. Es zeigte sich, dass zusätzlich zum veränderten Camalexinphänotyp, 4-Amino-4-deoxychorismat in *AtGSTU4*-überexprimierenden Linien angereichert wurde. Diese Verbindung stellt ein Intermediat der

Folsäurebiosynthese dar. Essentielle Schritte, die Umwandlung von Chorismat zu 4-Amino-4-deoxychorismat und weiter zu *p*-Aminobenzoat, finden dabei im Chloroplasten statt (Hanson und Gregory III, 2011). Chorismat wiederum ist unter anderem ein Intermediat bei der Synthese von Ubiquinon, Phylloquinone (Vitamin K1 (Shearer, 1995)), aromatischer Aminosäuren, verschiedener Phenylpropanoide, Tryptophan, Indolglucosinolate und Camalexin (siehe Abbildung 5.5).



**Abbildung 5.5 Biosynthesewege des Sekundärmetabolismus ausgehend von Chorismat.**

Dargestellt sind die fünf Biosynthesewege, welche Chorismat als Intermediat nutzen. CPL: Chorismat-Pyruvat-Lyase; AS: Anthranilat-Synthase; CM: Chorismat-Mutase; ICS: Isochorismat-Synthase; PABS: *p*-Aminobenzoat-Synthase (aus Verberne *et al.* (2007))

Wie bereits erwähnt akkumuliert sich 4-Amino-4-deoxychorismat in *AtGSTU4*-Überexpressionspflanzen. Eine Koexpression des entsprechenden Gens mit Genen der Folsäurebiosynthese konnte allerdings nicht bestätigt werden. Generell wurde in der vorhandenen Literatur bisher kein Zusammenhang zwischen der GST und diesem Syntheseweg beschrieben. Es erscheint unwahrscheinlich, dass *AtGSTU4* (unabhängig von der Art und Weise) den Fluss des Chorismates in Richtung von Folsäure verstärkt und folglich die Synthese von Tryptophan und allen nachfolgenden Verbindungen stört. Gegen diese Hypothese spricht auch eine klare Koexpression von *AtGSTU4* mit Genen der Tryptophanbiosynthese und Camalexinbiosynthese unter biotischem Stress (siehe Tabelle 5.2 (gewählt wurde *B. cinerea*-Infektion, um die Vergleichbarkeit zu eigenen Daten zu erhöhen))

**Tabelle 5.2 Koexpressionsbestimmung von AtGSTU4 mit Genen der Tryptophanbiosynthese.**

Analysiert wurde AtGSTU4 bezüglich koexprimierter Gene nach *B. cinerea*-Infektion. Abgebildet ist der Rang und jeweilige Pearson-Korrelationskoeffizient eines koexprimierten Gens. Es ist zu sehen, dass Gene der Tryptophanbiosynthese unter den ersten zehn Hits aufgelistet werden und eine starke Korrelation aufweisen. Die Daten wurden mit Hilfe der Datenbank *Expression Angler 2016* (<http://bar.utoronto.ca/ExpressionAngler/>, Stand 31.07.2017) unter Auswahl des *B. cinerea*-Datensets erhoben.

| Rang | Pearson-Korrelation | Locus     | Name     |
|------|---------------------|-----------|----------|
| 1    | 1.000               | At2g29460 | AtGSTU4  |
| 2    | 0.894               | At4g35630 | PSAT1    |
| 3    | 0.878               | At5g05730 | ASA1     |
| 10   | 0.860               | At5g17990 | TRP1     |
| 23   | 0.847               | At3g26830 | CYP71B15 |

Ein regulatorischer Einfluss des Enzyms auf den Tryptophanmetabolismus wäre denkbar. Auf Grund unzureichender Datenlage kann hier allerdings keinerlei zuverlässige Aussage getroffen werden, sondern lediglich Mutmaßungen angestellt werden. Zu überprüfen wäre, ob auch der Gehalt an anderen Tryptophan-abhängigen Metaboliten, wie zum Beispiel Indolglucosinolate, IAN, IAOx oder auch Tryptophan selbst, in AtGSTU4-Überexprimierern reduziert vorliegen. Dass solch ein Effekt in *knock-out*-Pflanzen deutlich schlechter detektierbar wäre, kann mit der starken Redundanz von pflanzlichen GSTs erklärt werden und ist nicht überraschend. Gesetzt dem Falle, dass sich die Reduktion der verschiedenen Metabolite bestätigen sollte und unter der Einbeziehung der starken Koexpression von AtGSTU4 mit den Genen der Tryptophanbiosynthese und Camalexinbiosynthese, könnte die Hypothese der negativen Rückkopplung und damit einhergehender Regulation der Camalexinbiosynthese durch AtGSTU4 aufgestellt werden. Wie dieser Prozess abläuft, ist ebenfalls unklar. Bekannt ist, dass die Aktivität von ASA1 durch Tryptophan in einer negativen *Feedback*-Hemmung reguliert wird (Niyogi und Fink, 1992). Das Enzym besteht aus zwei Untereinheiten mit jeweils einem katalytischen Zentrum, das eine dient der Chorismatbindung und der Umsetzung zu Anthranilat und die zweite stellt die regulatorischen Domäne mit einer Bindestelle für Tryptophan dar (Kanno *et al.*, 2005). Abhängig von der Tryptophankonzentration wird die Expression und die Aktivität von ASA1 reprimiert. Auch die nachfolgenden Biosynthesegene werden durch hohe Tryptophankonzentrationen in ihrer Expression gehemmt (Niyogi und Fink, 1992). Eine zusätzliche Feinregulation der Aktivität von ASA1 durch AtGSTU4 erscheint unwahrscheinlich, da die Tryptophanbiosynthese im Chloroplasten stattfindet, wohingegen die GST im Komplex mit CYP71A13 am ER lokalisiert vorliegt. Eine Regulation auf der Ebene von CYP79B2 erscheint realistischer. Es könnte die Hypothese aufgestellt werden, dass bei überschüssiger Camalexinproduktion ein Signal durch AtGSTU4 an CYP79B2 abgegeben wird, welches das *channeling* in Richtung des

Phytoalexins drosselt (zur Schlüsselfunktion von CYP79B2 siehe Abschnitt 5.1). Eine Überexpression von AtGSTU4 würde zu einer deutlich verringerten Camalexinsynthese führen, was in den durchgeführten Analysen gezeigt werden konnte (siehe Abbildung 4.25). Auch könnte es durch die artifizielle Reduktion des Camalexinweges zu einem Rückstau von Intermediaten kommen. Dies wurde tendenziell in *cyp71a12/cyp71a13* Mutanten beobachtet. Deutlich sichtbar ist eine Akkumulation von Tryptophan, wenn die Gene der Schlüsselenzyme CYP79B2 und CYP79B3 nicht mehr exprimiert werden (Müller *et al.*, 2015). Solch eine Anreicherung der Vorläuferverbindungen könnte dann zu einer Verschiebung des *channelings* auf Ebene von Chorismat führen. „Überschüssiges“ Chorismat könnte in einen weniger stark regulierten Syntheseweg geleitet werden – möglicherweise in die Folsäurebiosynthese mit 4-Amino-4-deoxychorismat als erstes Intermediat, wie in ersten MS-Analysen beobachtet wurde. In Koexpressionsanalysen mit *ADCS* (*Aminodeoxychorismat-Synthase*; erstes Enzym im Folsäurebiosyntheseweg, wandelt Chormismat zu 4-Amino-4-Deoxychorismat um) wurden keine klar koexprimierten Gene identifiziert (Expression Angler, Stand: 22.08.2017). Auch mit Hilfe der *epIant*-Datenbank konnte keine eindeutige Induktion oder Regulation von *ADCS* durch Elicitoren oder Stressoren nachgewiesen werden. Die biosynthetischen Gene Folsäurebiosynthese scheinen konstitutiv exprimiert zu sein. Ein Fluss von Chorismat in Richtung der Folsäure wäre folglich denkbar.

In einer weiteren höchst spekulativen Hypothese könnte AtGSTU4 freies IAN binden, sich aus dem Komplex der Camalexin-spezifischen Enzyme lösen und IAN gezielt zu einem Detoxifizierungsenzym oder Organell transportieren. Auch in diesem Fall wäre eine Interaktion mit CYP71A13 nötig, da das CYP die Reaktion von IAOx zu GS(IAN) katalysiert. In neueren Studien von Teresa M. Müller wird die Hypothese vertreten, dass in der pflanzlichen Zelle kein freies IAN vorliegt. Entstandenes IAN wäre folglich ein Produkt von fehlerhaft ablaufenden Prozessen und müsste entgiftet werden. Entsprechend des Modells von Bassard *et al.* (2017) sind Enzymkomplexe dynamisch in ihrer Zusammensetzung. AtGSTU4 könnte freies IAN binden, sich aus dem Camalexin-Komplex lösen und anschließend zu CYP71B6 (oder zu einem unbekanntem Detoxifizierungsenzym bzw. Organell) transportieren. Ein aktiver Transport von Metaboliten ist für GSTs bereits beschrieben. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass AtGSTF12 (TT19) Flavonoide bindet und vom Ort ihrer Synthese (Cytosol) zur Vakuole transportiert (Kitamura *et al.*, 2004). Ähnliches ist auch für AN9, eine GST aus *Petunia hybrida* (Garten-Petunie) bekannt. Mit Hilfe von Equilibrium-Dialyse-Experimenten, Aktivitätsbestimmungen gegenüber CDNB und Tryptophan-Quencing konnte in diesem Fall eine Bindung von Anthocyanen an AN9 und ein Transport vom Cytosol zur Vakuole nachgewiesen werden (Mueller *et al.*, 2000). Durch Überexpression von AtGSTU4 würde die Reaktion von CYP71A13 artifiziell in Richtung des freien IANs gelenkt werden und es würde

weniger Camalexin gebildet werden. Mit dieser Hypothese kann allerdings nicht die beobachtete Akkumulation von 4-Amino-4-Deoxychorismat erklärt werden.

Eine dritte und plausibelste Erklärung für die beschriebenen Effekte ist ein negativer Einfluss von AtGSTU4 auf CYP71A13. Eine inhibitorische Wirkung auf die Aktivität eines Enzyms durch eine GST konnte bereits im humanen System für die Jun N-terminale Kinase (JNK) gezeigt werden. Die GST Pi bindet als Monomer an JNK und hemmt damit die Phosphorylierungsaktivität von JNK. Nach UV- oder H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung oligomerisiert die GST, JNK liegt frei vor und kann folglich Transkriptionsfaktoren aktivieren (Adler *et al.*, 1999). Auch AtGSTU4 könnte als Monomer die Aktivität von CYP71A13 hemmen und wäre damit an der Feinregulation der Camalexinbiosynthese beteiligt. Ob eine Dimerisierung durch Pathogenbefall ausgelöst wird ist noch nicht untersucht. Da GSTs der Tau-Klasse allerdings häufig dimerisiert vorliegen (Dixon *et al.*, 1999), wäre solch ein Prozess denkbar. Durch Dissoziation der AtGSTU4 von CYP71A13 nach Pathogenbefall würde das CYP in freier Form vorliegen und könnte so eine volle Aktivität gewährleistet werden. Durch ein artifiziell erhöhtes Vorkommen der GST würde CYP71A13 dauerhaft inhibiert vorliegen und es würde zu einer Reduktion des Camalexingehaltes kommen. Im gegenteiligen Fall würde zu wenig AtGSTU4 exprimiert werden und CYP71A13 wäre dauerhaft aktiv und Camalexin würde sich akkumulieren. Durch die artifizielle Störung des Metabolismus würde es auch in diesem Fall zu einem Rückstau der Vorläuferverbindungen kommen und es könnte eine Umschichtung des Chorismat-Pools in einen anderen Syntheseweg stattfinden. Wie diese postulierte Hemmung der CYP71A13-Aktivität auf molekularer Ebene stattfindet ist ungeklärt. Denkbar wäre eine Störung durch sterische Effekte. In diesem Modell könnte auch die Spezifität von GSTs bei der Camalexinbiosynthese selbst berücksichtigt werden. AtGSTU4 ist zwar selbst nicht an der Synthese beteiligt, könnte aber zu einer erfolgreichen Heterodimerbildung beitragen, was anschließend die Spezifität definieren würde (Ausführlicheres zu der Hypothese der Dimerbildung siehe 5.2).

Weitere Experimente sind nötig um die genannten Hypothesen bestätigen oder verwerfen zu können. Dazu zählt zum Beispiel die Untersuchung von zwei gleichzeitig exprimierten AtGSTs im etablierten Hefeassay zur weiteren Analyse der Spezifität von AtGSTs während der Camalexinbiosynthese, komplexere MS-Analysen zur besseren Charakterisierung von *Atgstu4*-Mutanten und Überexpressionslinien, untargeted Co-IP-Versuche zur Identifizierung von weiteren Interaktionspartnern oder Mutagenese von AtGSTU4 zur Störung der Interaktion zwischen CYP71A13 und AtGSTU4 und folglich einer Aufklärung einer regulatorischen Funktion von AtGSTU4.

### **5.3. Als Reaktion auf Stress findet in *E. salsugineum* eine umfangreiche Umprogrammierung statt**

Phytoalexine sind in verschiedensten Pflanzenfamilien zu finden (siehe Tabelle 1.1) und strukturell stark divers (siehe Abbildung 1.2) für strukturelle Vielfalt von Phytoalexinen der *Brassicaceae*). Nichtsdestotrotz haben alle eine ähnliche Funktion *in planta* – als generelle Abwehrantwort nach Pathogenbefall. Der genaue Wirkmechanismus der jeweiligen Verbindungen ist allerdings kaum verstanden.

Am Beispiel von Camalexin aus *A. thaliana* und Wasalexin aus *E. salsugineum* könnten erste Rückschlüsse zur Klärung dieser Fragen gezogen werden. Beide Pflanzenspezies sind als Modellsysteme etabliert und bekannte molekularbiologische Methoden können angewendet werden. Die Entwicklung der beiden *Brassicaceae*-Spezies trennte sich vor ca. 43 Mio. Jahren (Yang *et al.*, 2013) und auch die chemische Struktur der gebildeten Phytoalexine unterscheidet sich voneinander (siehe Abbildung 1.2).

Für beide Substanzen wurde eine antimikrobielle Wirkung beschrieben (Glazebrook und Ausubel, 1994, Glawischnig, 2007, Pedras *et al.*, 2009a). Damit eignen sich die beiden Modelnpflanzen gut, um die Evolution der Biosynthesewege genauer zu betrachten. Um dies zu ermöglichen ist es Voraussetzung, die Biosynthese von Wasalexin zu verstehen. Dafür wurden intensive Transkriptomanalysen via RNAseq und Microarray nach Stressapplikation durchgeführt (siehe Abschnitt 4.3.3). In UV-C-, Silbernitrat- und *B. cinerea*-behandelten Pflanzen wurde eine umfassende transkriptionelle Änderung festgestellt. So wurde die Expression von Photosynthese- und Stärke-assoziierten Genen stark reprimiert. Dahingegen wurden Synthesen, die für die Abwehr von Bedeutung sind, aktiviert. Dazu zählen unter anderem die Produktion von Zellwandbausteinen und die vermehrte Bildung von Aminosäuren über den Citratzyklus, welche als Vorstufen sekundärer Pflanzenstoffe essentiell sind. Ressourcen werden umgeschichtet und der pflanzliche Stoffwechsel wird auf „Abwehr“ umprogrammiert. Stark induziert war auch die Expression von Seneszenz- und Zelltod-assoziierten Genen, was ein weiteres, unkontrolliertes Ausbreiten von Pathogenen im Gewebe verhindern könnte. Auch die Hormonantwort wurde durch Pathogenbefall adaptiert. Sowohl die Expression von Genen der Salicylsäure biosynthese (ET) als auch der Cytokinin- (CK), Salicylsäure- (SA) und Jasmonsäurebiosynthese (JA) wurde unter Stress stark induziert. Die Abscisinsäure (ABA)-Biosynthese war allerdings unverändert. ABA dient zur Anpassung an abiotischen Stress. Unter Trockenheit, Kälte oder Salzstress wird vermehrt ABA gebildet. Dies führt unter anderem zur Schließung der Stomata (Zhang *et al.*, 1987) und unter langanhaltendem Stress zum Wachstumsstopp (Creelman *et al.*, 1990). Wie in Abschnitt 4.3.3.2 ausgeführt, war die transkriptionelle Umprogrammierung, ausgelöst durch Kälte oder Trockenheit, zu der in dieser Arbeit ermittelten transkriptionellen Adaption nach UV-C- und

Silbernitratbehandlung (und *B. cinerea* Infektion) stark unterschiedlich. Lediglich vereinzelt zeigten Gene die gleiche Expressionsänderung (siehe Abbildung 4.36). Die in dieser Arbeit verwendeten Stressoren induzieren keinen Wassermangel in der Pflanze, was zu einer verstärkten ABA-Synthese und induziertem Stomataschluss führen würde. Naheliegenderweise wurden ABA-spezifische Gene nicht in ihrer Transkriptionsrate beeinflusst. Die Expression von SA-, JA-, ET- und CK-assoziierte Genen wurde dahingegen stark induziert. Diese Pflanzenhormone sind direkt an der Abwehr von potentiellen Feinden beteiligt. SA dient unter anderem als Signalmolekül für *systemic acquired resistance* (SAR) und induzierten Zelltod als Reaktion auf einen Befall durch biotrophe Pathogene (Vlot *et al.*, 2009). JA und ET sind an der Abwehr von nekrotrophen Pathogenen und Herbivoren beteiligt. JA kann zudem als Elicitor für die Produktion von Phytoalexinen fungieren. Weiterhin wurde gezeigt, dass JA die Indolglucosinolatbiosynthese in verschiedenen *Brassicaceae*-Arten induziert (Bodnaryk, 1994, Brader *et al.*, 2001). In *E. salsugineum* wurde der Einfluss von Phytohormonen auf die durch Phytoalexinen-vermittelte Resistenz noch nicht untersucht. Da die Synthese von Wasalexin allerdings über den Indolglucosinolatsyntheseweg verläuft, wäre es möglich, dass in *E. salsugineum* Phytohormone an der Regulation der Phytoalexinproduktion beteiligt sind.

Wie auch *A. thaliana* reagierte *E. salsugineum* auf die applizierten Stressoren deutlich und reproduzierbar mit einer induzierten Expression von Abwehr-spezifischen Genen. Dazu zählen Gene des Phenylpropanoidmetabolismus (z.B. Lignin als Zellwandbestandteil und als physische Barriere), des Tryptophanstoffwechsels zur Bereitstellung von Vorläuferverbindung diverser Sekundärmetabolite und der Indolglucosinolatbiosynthese. Auffällig war, dass die Synthese von aliphatischen Glucosinolaten reprimiert wurde. Transkripte der biosynthetischen Enzyme, wie zum Beispiel *EsCYP79F1* oder *EsCYP83A1* lagen drastisch reduziert vor. In *E. salsugineum* scheint eine Verschiebung von der Produktion aliphatischer- zu Indolglucosinolaten stattgefunden zu haben. In *A. thaliana* wird durch das Gleichgewicht zwischen indolischen und aliphatischen Glucosinolaten eine adäquate Abwehrantwort auf einen Befall durch verschiedene Herbivore gesteuert. So führt zum Beispiel der komplette Verlust von Indolglucosinolaten zu einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber Blattäusen (*Myzus persicae*) wohingegen ein Fehlen von aliphatischen Glucosinolaten einen Befall durch den Tabakswärmer (*M. sexta*) begünstigt (Kim und Jander, 2007). Ist die Synthese aller Glucosinolate unterbunden führt dies zu einem signifikant besserem Wachstum von Larven des Eulenfalters *Spodoptera exigua* (Müller *et al.*, 2010). Auch in anderen *Brassicaceae*-Arten sind sowohl aliphatische als auch indolische Glucosinolate an der Abwehrantwort beteiligt (Cole, 1997). In der vorliegenden Arbeit wurde allerdings nicht die Transkriptomantwort von *E. salsugineum* auf einen Befall von Herbivoren untersucht. Es wäre denkbar, dass die verwendeten Stressoren (UV-C-, Silbernitrat- und *B. cinerea*-Behandlung) eine bisher

unbekannte Reaktion auslösen. Zwar existieren Studien bezüglich der physiologischen Bedeutung von Glucosinolaten während abiotischem Stress (del Carmen Martínez-Ballesta *et al.*, 2013), diese beinhalten allerdings nicht die in dieser Arbeit genutzten Stressoren. Es kann folglich keine generelle Aussage über eine induzierte oder reprimierte Glucosinolatsynthese unter abiotischen Stress getroffen werden. Um ein detaillierteres Verständnis bezüglich der beobachteten metabolischen Verschiebung von der Produktion aliphatischer Glucosinolate zu Indolglucosinolaten in *E. salsugineum* zu erlangen, wären weitere Analysen nötig.

Obwohl die meisten Gene der aliphatischen Glucosinolatbiosynthese abreguliert vorlagen, zeigten sich einige Ausnahmen. So ergab sich eine erhöhte Expression von *EsFMO GS-OX4* und *EsFMO GS-OX5*. In *A. thaliana* sind beide an der Modifikation von aliphatischen Glucosinolaten beteiligt (Oxygenierung von Methylthioalkylglucosinolat zu Methylsulfinylalkylglucosinolat) (Kong *et al.*, 2016). Die Expression des Homologs zu *SOT17* (*Thhalv10008073m*), in *A. thaliana* an der Biosynthese von aliphatischen Glucosinolaten beteiligt (Sonderby *et al.*, 2010), gleicht in *E. salsugineum* interessanterweise der Expression von Indolglucosinolatbiosynthesegenen. Auf Proteinebene gleichen sich die Orthologe zu mehr als 93% (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>, Stand 21.08.2017). Eine differenzielle Funktion auf Grund von Strukturunterschieden erscheint per se unwahrscheinlich. Nichtsdestotrotz gibt es Hinweise darauf, dass auch geringe Änderungen in der Aminosäuresequenz eine veränderte Funktion des Proteins verursachen können (Studer und Robinson-Rechavi, 2010, Gharib und Robinson-Rechavi, 2011). Möglicherweise trifft dies auch auf *EsSOT17* zu und es entwickelten nach der evolutiven Trennung von *A. thaliana* und *E. salsugineum* unterschiedliche Substratspezifitäten, weshalb das Enzym in *E. salsugineum* in der Indolglucosinolatbiosynthese involviert sein könnte (funktionale Divergenz). Dieser Effekt müsste allerdings näher untersucht und nachgewiesen werden. Mit Hilfe von *Domain-swapping*-Analysen könnte geklärt werden, welche Strukturbereiche für eine putativ veränderte Aktivität verantwortlich sein könnten.

Neben der generellen Analyse der Transkriptomantwort von *E. salsugineum* auf Stress, wurden auch potentielle Kandidaten für die Wasalexinbiosynthese analysiert. Zunächst lag der Fokus hierbei auf Methyltransferasen und  $\beta$ -Glucosidasen (siehe Abschnitt 4.3.3.4). Für *EsIGMT5*, *EsPen2*, *EsBGLU18-1*, *EsBGLU18-2*, *EsBGLU27* und *EsBGLU28* konnte in qRT-PCR-Analysen eine differentielle Expression bestätigt werden. Auch für *EsMeTra8* (*Thhalv10018786*), eine Methyltransferase ohne eindeutiges Ortholog in *A. thaliana*, wurde eine erhöhte Expression nach Stressapplikation gezeigt (siehe Abbildung 4.37). Da *A. thaliana* kein Wasalexin bildet liegt die Vermutung nahe, dass an der Biosynthese ein Enzym beteiligt ist, welches keine oder zumindest eine andere Funktion in *A. thaliana* übernimmt. Dies trifft auf *EsMeTra8* zu. *EsMeTra8* könnte deshalb eine Schlüsselrolle in der Biosynthese von Wasalexin einnehmen. Bekräftigt wird die Hypothese durch die Arbeiten von Klein und Sattely

(2017) in denen sie eine Methyltransferase in *Brassica rapa* (Dithiocarbamat-S-methyltransferase DTCMT.a) identifizierten, welche die finale Reaktion der Brassininbiosynthese katalysiert (Klein und Sattely, 2017). Da EsMetra8 auf Proteinebene zu 96% identisch zu DTCMT.a ist, könnten die Enzyme auch funktionell ortholog zu einander sein. Durch heterologe Expression des Enzyms oder Mutantenanalyse müsste zunächst eine Beteiligung an der Wasalexinbiosynthese überprüft werden.

Mit Hilfe des CRISPR/Cas9-Systems wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, *knock-out*-Mutanten von diversen Kandidatengen zu generieren (darunter auch *EsMetra8*, siehe Abschnitt 4.3.4). Dabei stellte sich heraus, dass die Transformationseffizienz von *E. salsugineum* mit  $2,7 \times 10^{-7}$  um ein Vielfaches geringer ist als in *A. thaliana* (0,5% bis 3% (Clough und Bent, 1998). Deshalb konnte lediglich für *EsPen2* erfolgreich eine Mutantenlinie identifiziert werden. In *A. thaliana* hydrolysiert Pen2 Indolglucosinolate zu Isothiocyanaten und ist an der *nonhost resistance* gegenüber *Blumeria graminis* beteiligt (Lipka *et al.*, 2005, Bednarek *et al.*, 2009, Clay *et al.*, 2009). Es sollte die Frage geklärt werden, ob *EsPen2* ebenfalls an der Abwehr von Pathogenen beteiligt ist. Entsprechend Lipka *et al.* (2005) wurde die Infektionsanfälligkeit von mutierten und wildtypischen *E. salsugineum*-Pflanzen gegenüber *B. graminis* analysiert. Es konnte kein Unterschied zwischen den Genotypen detektiert werden. Weder zeigte sich eine erhöhte Autofluoreszenz durch ausgelösten Zelltod, noch wurde die Ausbildung von Appressorien an der Blattoberfläche beobachtet (siehe Abbildung 4.40). Auch wenn in *A. thaliana* der *Knock-out* von *Pen2* allein ausreicht, um die Anfälligkeit der Pflanze gegenüber *B. graminis* zu erhöhen, ist nicht auszuschließen, dass in *E. salsugineum* redundante Enzyme existieren, welche die gleiche Funktion übernehmen können. In den durchgeführten Transkriptomanalysen lagen zahlreiche  $\beta$ -Glucosidasen induziert vor. Denkbar wäre auch, dass die an *A. thaliana* durch Pen2 katalysierten Reaktionen in *E. salsugineum* von einem unabhängigen Enzym vermittelt wird. Auch die zwei Orthologe von *BGLU18* (*Thhalv10011384m* und *Thhalv10011385m*), *BGLU27* und *BGLU28* zeigten eine differenzielle Expression nach Induktion in qRT-PCR-Analysen (siehe Abbildung 4.37). Es wäre ratsam, diese Enzyme ebenfalls auf eine potentielle Rolle während der Abwehrreaktion und Phytoalexinsynthese zu untersuchen. Weiterhin konnte in den in dieser Arbeit durchgeführten Metabolitanalysen in *E. salsugineum* kein veränderter Wasalexingehalt in *EsPen2*-Pflanzen detektiert werden (siehe Abbildung 4.41). *EsPen2* scheint daher nicht essentiell an der Phytoalexinbiosynthese selbst beteiligt zu sein. Möglicherweise existieren redundante Enzyme, wie z.B. *EsBLGU27* oder *EsBGLU28* als nah verwandte Proteine.

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Li an der *Chinese Academy of Sciences* in Guangzhou (Li *et al.*, 2007) sollen in Zukunft weitere *knock-out* Linien generiert werden. Die in dieser Arbeit generierten CRISPR/Cas9-Konstrukte und Samen von *E. salsugineum* (Ökotyp Shandong, Wildtyp) wurden bereits versendet und erste Ergebnisse werden in naher

Zukunft erwartet. Mit den so erzeugten Linien können dann weitere Metabolitanalysen und Infektionstests mit verschiedenen Pathogenen durchgeführt werden. Entsprechend der Angaben aus Li *et al.* (2007) können mit Hilfe des in Prof. Dr Li Meiru's Labor etablierten Protokolls transgene Linien innerhalb von 2 Monaten aus Kalluskulturen generiert werden. Mit einer postulierten Transformationseffizienz von 26% wäre es möglich, innerhalb kurzer Zeit zahlreiche *knock-out*-Pflanzen zu produzieren, was die Aufklärung des Wasalexinbiosyntheseweges deutlich vereinfachen würde.

Auch wenn für *EsPen2* keine Beteiligung an der Phytoalexinbiosynthese oder der generellen Pflanzenabwehr nachgewiesen werden konnte, ist anzumerken, dass diese generierte stabile Pflanzenlinie eine der ersten beschriebenen *knock-out*-Linien ist, die mit Hilfe von CRISPR/Cas9 in einer Arabidopsis-unabhängigen Spezies erzeugt wurde. Bisher ist die erfolgreiche Anwendung des Systems außerhalb von *A. thaliana* nur für wenige Spezies bekannt. Dazu zählt der erfolgreiche *knock-out* eines Gens aus Reis (Nieves-Cordones *et al.*, 2017).

## 6. Literaturverzeichnis

- Adler, V., et al.** (1999). "Regulation of JNK signaling by GSTp." *The EMBO journal* 18(5): 1321-1334.
- Adrian, M., et al.** (1997). "Biological Activity of Resveratrol, a Stilbenic Compound from Grapevines, Against *Botrytis cinerea*, the Causal Agent for Gray Mold." *Journal of Chemical Ecology* 23(7): 1689-1702.
- Agati, G., et al.** (2012). "Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance." *Plant Science* 196: 67-76.
- Agerbirk, N. und Olsen, C. E.** (2012). "Glucosinolate structures in evolution." *Phytochemistry* 77: 16-45.
- Akatsuka, T., et al.** (1985). "Novel Phytoalexins (Oryzalexins A, B and C) Isolated from Rice Blast Leaves Infected with *Pyricularia oryzae*. Part I: Isolation, Characterization and Biological Activities of Oryzalexins Part II: Structural Studies of Oryzalexins." *Agricultural and Biological Chemistry* 49(6): 1689-1701.
- Alberts, B., et al.** (2002). *Membrane proteins. Molecular Biology of the Cell*. New York: Garland Science. 4th edition.
- Ali, A., et al.** (2013). "Role of HKT1 in *Thellungiella salsuginea*, a model extremophile plant." *Plant Signal Behav* 8(8).
- Allen, E. H. und Thomas, C. A.** (1971). "Trans-trans-3, 11-tridecadiene-5, 7, 9-triene-1, 2-diol, an antifungal polyacetylene from diseased safflower (*Carthamus tinctorius*)." *Phytochemistry* 10(7): 1579-1582.
- Amin, M., et al.** (1988). "Carrot phytoalexin alters the membrane permeability of *Candida albicans* and multilamellar liposomes." *Microbiology* 134(1): 241-246.
- Amtmann, A.** (2009). "Learning from evolution: *Thellungiella* generates new knowledge on essential and critical components of abiotic stress tolerance in plants." *Molecular Plant* 2(1): 3-12.
- Amtmann, A., et al.** (2005). "Abiotic stress and plant genome evolution. Search for new models." *Plant Physiology* 138(1): 127-130.
- Andersen, O. M. und Markham, K. R.** (2005). *Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications*, CRC press.
- Aoki, Y., et al.** (2016). "ATTED-II in 2016: A Plant Coexpression Database Towards Lineage-Specific Coexpression." *Plant Cell Physiol* 57(1): e5.
- Arabidopsis Interactome Mapping, C.** (2011). "Evidence for network evolution in an Arabidopsis interactome map." *Science* 333(6042): 601-607.
- Athar, M., et al.** (2007). "Resveratrol: a review of preclinical studies for human cancer prevention." *Toxicology and applied pharmacology* 224(3): 274-283.
- Axarli, I., et al.** (2009). "Crystal structure of Glycine max glutathione transferase in complex with glutathione: investigation of the mechanism operating by the Tau class glutathione transferases." *Biochemical Journal* 422(2): 247-256.
- Baayen, R., et al.** (1996). "Compartmentalization of decay in carnations resistant to *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*." *Phytopathology* 86(10): 1018-1031.
- Bach, T. J. und Lichtenthaler, H. K.** (1983). "Inhibition by mevinolin of plant growth, sterol formation and pigment accumulation." *Physiologia Plantarum* 59(1): 50-60.
- Baek, D., et al.** (2010). "A stress-inducible sulphotransferase sulphonates salicylic acid and confers pathogen resistance in Arabidopsis." *Plant Cell Environ* 33(8): 1383-1392.
- Bak, S., et al.** (2011). "Cytochromes p450." *Arabidopsis Book* 9: e0144.
- Bak, S., et al.** (2006). "Cyanogenic glycosides: a case study for evolution and application of cytochromes P450." *Phytochemistry Reviews* 5(2-3): 309-329.
- Ballhorn, D., et al.** (2010). "Comparing responses of generalist and specialist herbivores to various cyanogenic plant features." *Entomologia Experimentalis et Applicata* 134(3): 245-259.
- Bartram, S., et al.** (2006). "Dynamic pathway allocation in early terpenoid biosynthesis of stress-induced lima bean leaves." *Phytochemistry* 67(15): 1661-1672.
- Bassard, J. E., et al.** (2017). "Assembly of Dynamic P450-Mediated Metabolons-Order Versus Chaos." *Curr Mol Biol Rep* 3(1): 37-51.
- Bassard, J. E., et al.** (2012). "Protein-Protein and Protein-Membrane Associations in the Lignin Pathway." *Plant Cell* 24(11): 4465-4482.
- Bassham, J., et al.** (1953). "Isotope studies in photosynthesis." *J. chem. Educ* 30(6): 274.

- Bechinger, C., et al.** (1999). "Optical measurements of invasive forces exerted by appressoria of a plant pathogenic fungus." *Science* 285(5435): 1896-1899.
- Becker, W.** (2012). "Fluorescence lifetime imaging—techniques and applications." *Journal of microscopy* 247(2): 119-136.
- Bednarek, P., et al.** (2009). "A glucosinolate metabolism pathway in living plant cells mediates broad-spectrum antifungal defense." *Science* 323(5910): 101-106.
- Bednarek, P., et al.** (2011). "Conservation and clade-specific diversification of pathogen-inducible tryptophan and indole glucosinolate metabolism in *Arabidopsis thaliana* relatives." *New Phytol* 192(3): 713-726.
- Bending, G. D. und Lincoln, S. D.** (2000). "Inhibition of soil nitrifying bacteria communities and their activities by glucosinolate hydrolysis products." *Soil Biology and Biochemistry* 32(8): 1261-1269.
- Bennett, R. N. und Wallsgrove, R. M.** (1994). "Secondary Metabolites in Plant Defense-Mechanisms." *New Phytologist* 127(4): 617-633.
- Berg, J., et al.** (2002). *Amino Acids Are Made from Intermediates of the Citric Acid Cycle and Other Major Pathways.* Biochemistry. New York.
- Bhatt, M. R., et al.** (2017). "Role of cytochrome b5 in the modulation of the enzymatic activities of cytochrome P450 17 $\alpha$ -hydroxylase/17,20-lyase (P450 17A1)." *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 170: 2-18.
- Bieza, K. und Lois, R.** (2001). "An *Arabidopsis* Mutant Tolerant to Lethal Ultraviolet-B Levels Shows Constitutively Elevated Accumulation of Flavonoids and Other Phenolics." *Plant Physiology* 126(3): 1105-1115.
- Bloch, K.** (1965). *The biological synthesis of cholesterol*, Nobel Foundation.
- Blount, J. W., et al.** (2000). "Altering expression of cinnamic acid 4-hydroxylase in transgenic plants provides evidence for a feedback loop at the entry point into the phenylpropanoid pathway." *Plant Physiology* 122(1): 107-116.
- Bodnaryk, R. P.** (1994). "Potent effect of jasmonates on indole glucosinolates in oilseed rape and mustard." *Phytochemistry* 35(2): 301-305.
- Boehm, R. v.** (1920). *Curare und Curarealkaloide. 1. Hälfte*, Springer: 179-248.
- Bonello, P., et al.** (2003). "Systemic effects of *Heterobasidion annosum* on ferulic acid glucoside and lignin of presymptomatic ponderosa pine phloem, and potential effects on bark-beetle-associated fungi." *J Chem Ecol* 29(5): 1167-1182.
- Bones, A. M. und Rossiter, J. T.** (1996). "The myrosinase-glucosinolate system, its organisation and biochemistry." *Physiologia Plantarum* 97(1): 194-208.
- Bostock, R. M., et al.** (1981). "Eicosapentaenoic and arachidonic acids from *Phytophthora infestans* elicit fungitoxic sesquiterpenes in the potato." *Science* 212(4490): 67-69.
- Böttcher, C., et al.** (2009). "The multifunctional enzyme CYP71B15 (PHYTOALEXIN DEFICIENT3) converts cysteine-indole-3-acetonitrile to camalexin in the indole-3-acetonitrile metabolic network of *Arabidopsis thaliana*." *Plant Cell* 21(6): 1830-1845.
- Bouizgarne, B., et al.** (2006). "Early physiological responses of *Arabidopsis thaliana* cells to fusaric acid: toxic and signalling effects." *New Phytologist* 169(1): 209-218.
- Brader, G., et al.** (2001). "Jasmonate-dependent induction of indole glucosinolates in *Arabidopsis* by culture filtrates of the nonspecific pathogen *Erwinia carotovora*." *Plant Physiology* 126(2): 849-860.
- Bradford, M. M.** (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Analytical biochemistry* 72(1-2): 248-254.
- Bressan, R. A., et al.** (2001). "Learning from the *Arabidopsis* experience. The next gene search paradigm." *Plant Physiology* 127(4): 1354-1360.
- Broun, P. und Somerville, C.** (2001). "Progress in plant metabolic engineering." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(16): 8925-8927.
- Brown, D. E., et al.** (2001). "Flavonoids act as negative regulators of auxin transport in vivo in *Arabidopsis*." *Plant Physiology* 126(2): 524-535.
- Browne, L. M., et al.** (1991). "The camalexins: New phytoalexins produced in the leaves of *Camelinasativa* (cruciferae)." *Tetrahedron* 47(24): 3909-3914.
- Brumos, J., et al.** (2014). "Genetic aspects of auxin biosynthesis and its regulation." *Physiologia Plantarum* 151(1): 3-12.
- Burow, M., et al.** (2006). "Altered glucosinolate hydrolysis in genetically engineered *Arabidopsis thaliana* and its influence on the larval development of *Spodoptera littoralis*." *Journal of Chemical Ecology* 32(11): 2333-2349.

- Buskov, S., et al.** (2002). "Effects of intact glucosinolates and products produced from glucosinolates in myrosinase-catalyzed hydrolysis on the potato cyst nematode (*Globodera rostochiensis* cv. Woll)." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(4): 690-695.
- Bustin, S. A., et al.** (2009). "The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments." *Clin Chem* 55(4): 611-622.
- Callaway, A., et al.** (1996). "Characterization of cauliflower mosaic virus (CaMV) resistance in virus-resistant ecotypes of *Arabidopsis*." *MPMI-Molecular Plant Microbe Interactions* 9(9): 810-818.
- Calvin, M. und Benson, A. A.** (1948). The path of carbon in photosynthesis, US Atomic Energy Commission, Technical Information Division.
- Cardoso, A. P., et al.** (1998). "Cyanogenic potential of cassava flour: field trial in Mozambique of a simple kit." *International journal of food sciences and nutrition* 49(2): 93-99.
- Cartwright, D. W., et al.** (1981). "Isolation and characterization of two phytoalexins from rice as momilactones A and B." *Phytochemistry* 20(3): 535-537.
- Chalutz, E., et al.** (1969). "Ethylene-induced isocoumarin formation in carrot root tissue." *Plant Physiology* 44(2): 235-241.
- Chalutz, E. und Stahmann, M.** (1969). "Induction of pisatin by ethylene." *Phytopathology*.
- Chapman, A.** (2014). Phytoalexin biosynthesis in *Arabidopsis*: protein interaction and metabolic engineering. Lehrstuhl für Genetik. Freising, TU-München. Master of Science.
- Chapple, C.** (1998). "Molecular-genetic analysis of plant cytochrome P450-dependent monooxygenases." *Annual review of plant biology* 49(1): 311-343.
- Chen, H. C., et al.** (2011). "Membrane protein complexes catalyze both 4- and 3-hydroxylation of cinnamic acid derivatives in monolignol biosynthesis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(52): 21253-21258.
- Clay, N. K., et al.** (2009). "Glucosinolate metabolites required for an *Arabidopsis* innate immune response." *Science* 323(5910): 95-101.
- Clough, S. J. und Bent, A. F.** (1998). "Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*." *Plant J* 16(6): 735-743.
- Cole, R.** (1997). "The relative importance of glucosinolates and amino acids to the development of two aphid pests *Brevicoryne brassicae* and *Myzus persicae* on wild and cultivated brassica species." *Entomologia Experimentalis et Applicata* 85(2): 121-133.
- Collinson, E. J. und Grant, C. M.** (2003). "Role of yeast glutaredoxins as glutathione S-transferases." *J Biol Chem* 278(25): 22492-22497.
- Condon, P., et al.** (1963). "Production of 3-methyl-6-methoxy-8-hydroxy-3, 4-dihydroisocoumarin by carrot root tissue." *Phytopathology* 53(11): 1244-&.
- Conn, E.** (1981). "Cyanogenic glycosides." *The Biochemistry of Plants: A Comprehensive Treatise* 7: 479-500.
- Conn, E. E.** (1969). "Cyanogenic glycosides." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 17(3): 519-526.
- Coxon, D. T., et al.** (1980). "Identification of three hydroxyflavan phytoalexins from daffodil bulbs." *Phytochemistry* 19(5): 889-891.
- Creelman, R. A., et al.** (1990). "Water deficit and abscisic acid cause differential inhibition of shoot versus root growth in soybean seedlings analysis of growth, sugar accumulation, and gene expression." *Plant Physiology* 92(1): 205-214.
- Crosby, K. C., et al.** (2011). "Förster resonance energy transfer demonstrates a flavonoid metabolon in living plant cells that displays competitive interactions between enzymes." *FEBS Lett* 585(14): 2193-2198.
- Crouse, R., et al.** (1962). "Inhibition of growth of hair by mimosine." *Nature* 194(4829): 694-695.
- Cruickshank, I.** (1962). "Studies on phytoalexins IV. The antimicrobial spectrum of pisatin." *Australian Journal of Biological Sciences* 15(1): 147-159.
- Cruickshank, I. und Perrin, D. R.** (1968). "The isolation and partial characterization of monilicolin A, a polypeptide with phaseollin-inducing activity from *Monilinia fructicola*." *Life Sciences* 7(10): 449-458.
- Cruickshank, I. A. M. und Perrin, D. R.** (1960). "Isolation of a Phytoalexin from *Pisum sativum* L." *Nature* 187(4739): 799-800.
- Dastmalchi, M., et al.** (2016). "Twin anchors of the soybean isoflavonoid metabolon: evidence for tethering of the complex to the endoplasmic reticulum by IFS and C4H." *Plant J* 85(6): 689-706.
- del Carmen Martínez-Ballesta, M., et al.** (2013). "The physiological importance of glucosinolates on plant response to abiotic stress in Brassica." *International journal of molecular sciences* 14(6): 11607-11625.

- Dixon, D. P., et al.** (1999). "Dimerisation of maize glutathione transferases in recombinant bacteria." *Plant molecular biology* 40(6): 997-1008.
- Dixon, D. P., et al.** (2000). "Characterisation of a zeta class glutathione transferase from *Arabidopsis thaliana* with a putative role in tyrosine catabolism." *Archives of biochemistry and biophysics* 384(2): 407-412.
- Dixon, D. P., et al.** (2002a). "Functional divergence in the glutathione transferase superfamily in plants identification of two classes with putative functions in redox homeostasis in *Arabidopsis thaliana*." *Journal of biological Chemistry* 277(34): 30859-30869.
- Dixon, D. P., et al.** (2009). "Enzyme activities and subcellular localization of members of the *Arabidopsis* glutathione transferase superfamily." *Journal of experimental botany* 60(4): 1207-1218.
- Dixon, D. P., et al.** (2002b). "Plant glutathione transferases." *Genome biology* 3(3): reviews3004. 3001.
- Dixon, D. P., et al.** (2011). "The *Arabidopsis* phi class glutathione transferase AtGSTF2: binding and regulation by biologically active heterocyclic ligands." *Biochemical Journal* 438(1): 63-70.
- Dixon, D. P., et al.** (2010). "Roles for glutathione transferases in plant secondary metabolism." *Phytochemistry* 71(4): 338-350.
- Dixon, R., et al.** (1994). "Early events in the activation of plant defense responses." *Annual review of phytopathology* 32(1): 479-501.
- Dixon, R. A.** (1986). "The phytoalexin response: elicitation, signalling and control of host gene expression." *Biological Reviews* 61(3): 239-291.
- Dixon, R. A., et al.** (2002c). "The phenylpropanoid pathway and plant defence—a genomics perspective." *Mol Plant Pathol* 3(5): 371-390.
- Dominguez-Bello, M. G. und Stewart, C. S.** (1990). "Effects of feeding *Canavalia ensiformis* on the rumen flora of sheep, and of the toxic amino acid canavanine on rumen bacteria." *Systematic and applied microbiology* 13(4): 388-393.
- Dosselaere, F. und Vanderleyden, J.** (2001). "A metabolic node in action: chorismate-utilizing enzymes in microorganisms." *Critical reviews in microbiology* 27(2): 75-131.
- Dreze, M., et al.** (2010). "High-Quality Binary Interactome Mapping." 470: 281-315.
- Drumm, J. E., et al.** (1995). *Oxime Fungicides: Highly Active Broad-Spectrum Protectants*, ACS Publications.
- Durst, F. und Nelson, D. R.** (1995). "Diversity and evolution of plant P450 and P450-reductases." *Drug metabolism and drug interactions* 12(3-4): 189-206.
- Ebuenga, M., et al.** (1979). "Inhibition of pathogens of field legumes of mimosine." *Philippine Phytopathology* 15(1): 58-61.
- Edwards, R. und Dixon, D. P.** (2000). "The role of glutathione transferases in herbicide metabolism." *Herbicides and their mechanisms of action* 8: 38-71.
- Edwards, R. und Dixon, D. P.** (2005). "Plant glutathione transferases." *Methods in enzymology* 401: 169-186.
- Eisenreich, W., et al.** (2004). "Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway." *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 61(12): 1401-1426.
- Eisenreich, W., et al.** (1998). "The deoxyxylulose phosphate pathway of terpenoid biosynthesis in plants and microorganisms." *Chemistry & Biology* 5(9): R221-R233.
- Ellouzi, H., et al.** (2014). "A comparative study of the early osmotic, ionic, redox and hormonal signaling response in leaves and roots of two halophytes and a glycophyte to salinity." *Planta* 240(6): 1299-1317.
- Facchini, P. J.** (2001). "Alkaloid biosynthesis in plants: biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering applications." *Annual review of plant biology* 52(1): 29-66.
- Fellermeier, F.** (2011). *Die Bedeutung der CYP71B-Familie für die Biosynthese indolischer Sekundärstoffe bei *Arabidopsis thaliana**. Lehrstuhl für Genetik. Freising, TU-München. M.Sc. .
- Fleige, S. und Pfaffl, M. W.** (2006). "RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance." *Mol Aspects Med* 27(2-3): 126-139.
- Fraser, C. M. und Chapple, C.** (2011). "The phenylpropanoid pathway in *Arabidopsis*." *Arabidopsis Book* 9: e0152.
- Frehner, M. und Conn, E. E.** (1987). "The linamarin  $\beta$ -glucosidase in Costa Rican wild lima beans (*Phaseolus lunatus* L.) is apoplasmic." *Plant Physiology* 84(4): 1296-1300.
- Gasser, C. S. und Guerinot, M. L.** (1999). "Plant secondary metabolism: out of the evolutionary abyss." *Geiger, J., et al.* (1973). "Two phytoalexins from sugarbeet (*Beta vulgaris*) leaves." *Tetrahedron* 29(18): 2703-2706.
- Geu-Flores, F., et al.** (2011). "Cytosolic gamma-glutamyl peptidases process glutathione conjugates in the biosynthesis of glucosinolates and camalexin in *Arabidopsis*." *Plant Cell* 23(6): 2456-2469.

- Geu-Flores, F., et al.** (2007). "USER fusion: a rapid and efficient method for simultaneous fusion and cloning of multiple PCR products." *Nucleic Acids Res* 35(7): e55.
- Gharib, W. H. und Robinson-Rechavi, M.** (2011). "When orthologs diverge between human and mouse." *Briefings in bioinformatics* 12(5): 436-441.
- Ghedira, R., et al.** (2013). "The Efficiency of Arabidopsis thaliana Floral Dip Transformation Is Determined Not Only by the Agrobacterium Strain Used but Also by the Physiology and the Ecotype of the Dipped Plant." *Molecular Plant-Microbe Interactions* 26(7): 823-832.
- Gidda, S. K., et al.** (2003). "Biochemical and molecular characterization of a hydroxyjasmonate sulfotransferase from Arabidopsis thaliana." *J Biol Chem* 278(20): 17895-17900.
- Gietz, D., et al.** (1992). "Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells." *Nucleic acids research* 20(6): 1425.
- Gigolashvili, T., et al.** (2007). "The transcription factor HIG1/MYB51 regulates indolic glucosinolate biosynthesis in Arabidopsis thaliana." *Plant J* 50(5): 886-901.
- Glawischnig, E.** (2007). "Camalexin." *Phytochemistry* 68(4): 401-406.
- Glawischnig, E., et al.** (2004). "Camalexin is synthesized from indole-3-acetaldoxime, a key branching point between primary and secondary metabolism in Arabidopsis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(21): 8245-8250.
- Glazebrook, J. und Ausubel, F. M.** (1994). "Isolation of phytoalexin-deficient mutants of Arabidopsis thaliana and characterization of their interactions with bacterial pathogens." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91(19): 8955-8959.
- Glazebrook, J., et al.** (1997). "Phytoalexin-deficient mutants of Arabidopsis reveal that PAD4 encodes a regulatory factor and that four PAD genes contribute to downy mildew resistance." *Genetics* 146(1): 381-392.
- Gong, Q., et al.** (2005). "Salinity stress adaptation competence in the extremophile *Thellungiella halophila* in comparison with its relative Arabidopsis thaliana." *The Plant Journal* 44(5): 826-839.
- Götz, C.** (2012). Enzymatische Charakterisierung der CYP71A-Unterfamilie im Indolstoffwechsel von Arabidopsis thaliana. Lehrstuhl für Genetik. Freising, TU-München. Bachelor of Science.
- Graham, S. E. und Peterson, J. A.** (1999). "How similar are P450s and what can their differences teach us?" *Archives of biochemistry and biophysics* 369(1): 24-29.
- Gust, A. A. und Felix, G.** (2014). "Receptor like proteins associate with SOBIR1-type of adaptors to form bimolecular receptor kinases." *Current opinion in plant biology* 21: 104-111.
- Hadwiger, L. A. und Schwochau, M. E.** (1971). "Ultraviolet light-induced formation of pisatin and phenylalanine ammonia lyase." *Plant Physiology* 47(4): 588.
- Hanson, A. D. und Gregory III, J. F.** (2011). "Folate biosynthesis, turnover, and transport in plants." *Annual review of plant biology* 62: 105-125.
- Harborne, J. B.** (1999). "Classes and functions of secondary products from plants." *Chemicals from plants*: 1-25.
- Harding, V. und Heale, J.** (1981). "The accumulation of inhibitory compounds in the induced resistance response of carrot root slices to *Botrytis cinerea*." *Physiological Plant Pathology* 18(1): 7-15.
- Hargreaves, J. und Bailey, J.** (1978). "Phytoalexin production by hypocotyls of *Phaseolus vulgaris* in response to constitutive metabolites released by damaged bean cells." *Physiological Plant Pathology* 13(1): 89-100.
- Hartmann, G. und Nienhaus, F.** (1974). "The Isolation of Xanthoxylin from the Bark of *Phytophthora*- and *Hendersonula*-infected Citrus limon and its Fungitoxic Effect." *Journal of phytopathology* 81(2): 97-113.
- Hartmann, T.** (2007). "From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism." *Phytochemistry* 68(22-24): 2831-2846.
- Hazai, E., et al.** (2005). "Association of cytochrome P450 enzymes is a determining factor in their catalytic activity." *Journal of computer-aided molecular design* 19(4): 271-285.
- Hegnauer, R.** (1988). "Biochemistry, distribution and taxonomic relevance of higher plant alkaloids." *Phytochemistry* 27(8): 2423-2427.
- Hogge, L., et al.** (1988). "HPLC separation of glucosinolates from leaves and seeds of Arabidopsis thaliana and their identification using thermospray liquid chromatography/mass spectrometry." *Journal of Chromatographic Science* 26(11): 551-556.
- Hou, B., et al.** (2004). "N-glucosylation of cytokinins by glycosyltransferases of Arabidopsis thaliana." *J Biol Chem* 279(46): 47822-47832.
- Huang, C.-H., et al.** (2015). "Resolution of Brassicaceae phylogeny using nuclear genes uncovers nested radiations and supports convergent morphological evolution." *Molecular biology and evolution* 33(2): 394-412.

- Hudgins, J., et al.** (2004). "Induction of anatomically based defense responses in stems of diverse conifers by methyl jasmonate: a phylogenetic perspective." *Tree Physiology* 24(3): 251-264.
- Hull, A. K., et al.** (2000a). "Arabidopsis cytochrome P450s that catalyze the first step of tryptophan-dependent indole-3-acetic acid biosynthesis." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97(5): 2379-2384.
- Hull, A. K., et al.** (2000b). "Arabidopsis cytochrome P450s that catalyze the first step of tryptophan-dependent indole-3-acetic acid biosynthesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(5): 2379-2384.
- Hylin, J. W. und Lichton, I. J.** (1965). "Production of reversible infertility in rats by feeding mimosine." *Biochemical pharmacology* 14(7): 1167-1169.
- Inan, G., et al.** (2004). "Salt cress. A halophyte and cryophyte Arabidopsis relative model system and its applicability to molecular genetic analyses of growth and development of extremophiles." *Plant Physiology* 135(3): 1718-1737.
- Iqbal, Z., et al.** (2002). "Allelopathy of buckwheat: assessment of allelopathic potential of extract of aerial parts of buckwheat and identification of fagomine and other related alkaloids as allelochemicals." *Weed Biology and Management* 2(2): 110-115.
- Ishimaru, K., et al.** (1987). "Tannins and Related Compounds. LV. Isolation and Characterization of Acutissimins A and B, Novel Tannins from *Quercus* and *Castanea* Species." *CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN* 35(2): 602-610.
- Jeandet, P., et al.** (2013). "Modulation of phytoalexin biosynthesis in engineered plants for disease resistance." *International journal of molecular sciences* 14(7): 14136-14170.
- Jeandet, P., et al.** (2014). "Deciphering the role of phytoalexins in plant-microorganism interactions and human health." *Molecules* 19(11): 18033-18056.
- Jimenez, L. D., et al.** (1997). "Phytoalexins produced in the leaves of *Capsella bursa-pastoris* (shepherd's purse)." *Phytoprotection* 78(3): 99-103.
- Johnson, C., et al.** (1973). "Xanthotoxin: a phytoalexin of *Pastinaca sativa* root." *Phytochemistry* 12(12): 2961-2962.
- Kagale, S., et al.** (2014). "Polyploid Evolution of the Brassicaceae during the Cenozoic Era." *The Plant Cell* 26(7): 2777-2791.
- Kahn, R. A. und Durst, F.** (2000). "Function and evolution of plant cytochrome P450." *Recent advances in phytochemistry* 34: 151-190.
- Kanno, T., et al.** (2005). "Structure-based in vitro engineering of the anthranilate synthase, a metabolic key enzyme in the plant tryptophan pathway." *Plant Physiol* 138(4): 2260-2268.
- Kappers, I. F., et al.** (2005). "Genetic engineering of terpenoid metabolism attracts bodyguards to Arabidopsis." *Science* 309(5743): 2070-2072.
- Karimi, M., et al.** (2005). "Modular cloning in plant cells." *Trends Plant Sci* 10(3): 103-105.
- Kaufer, N. F., et al.** (1983). "Cycloheximide resistance in yeast: the gene and its protein." *Nucleic Acids Res* 11(10): 3123-3135.
- Keen, N. und Littlefield, L.** (1979). "The possible association of phytoalexins with resistance gene expression in flax to *Melampsora lini*." *Physiological Plant Pathology* 14(3): 265-280.
- Kello, M., et al.** (2014). "ROS-dependent antiproliferative effect of brassinin derivative homobrassinin in human colorectal cancer Caco2 cells." *Molecules* 19(8): 10877-10897.
- Kendra, D. F. und Hadwiger, L. A.** (1984). "Characterization of the smallest chitosan oligomer that is maximally antifungal to *Fusarium solani* and elicits pisatin formation in *Pisum sativum*." *Experimental mycology* 8(3): 276-281.
- Kim, J. H. und Jander, G.** (2007). "*Myzus persicae* (green peach aphid) feeding on Arabidopsis induces the formation of a deterrent indole glucosinolate." *The Plant Journal* 49(6): 1008-1019.
- Kim, Y.-S. und Sano, H.** (2008). "Pathogen resistance of transgenic tobacco plants producing caffeine." *Phytochemistry* 69(4): 882-888.
- Kim, Y.-S., et al.** (2006). "Transgenic tobacco plants producing caffeine: a potential new strategy for insect pest control." *Transgenic research* 15(6): 667-672.
- Kitamura, S., et al.** (2004). "TRANSPARENT TESTA 19 is involved in the accumulation of both anthocyanins and proanthocyanidins in Arabidopsis." *The Plant Journal* 37(1): 104-114.
- Klein, A. P., et al.** (2013). "Minimum set of cytochromes P450 for reconstituting the biosynthesis of camalexin, a major Arabidopsis antibiotic." *Angew Chem Int Ed Engl* 52(51): 13625-13628.
- Klein, A. P. und Sattely, E. S.** (2017). "Biosynthesis of cabbage phytoalexins from indole glucosinolate." *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Kliebenstein, D., et al.** (2002). "Comparative analysis of quantitative trait loci controlling glucosinolates, myrosinase and insect resistance in Arabidopsis thaliana." *Genetics* 161(1): 325-332.
- Klingenberg, M.** (1958). "Pigments of rat liver microsomes." *Archives of biochemistry and biophysics* 75(2): 376-386.

- Knaggs, A. R.** (2003). "The biosynthesis of shikimate metabolites." *Natural product reports* 20(1): 119-136.
- Koch, B. M., et al.** (1995). "The Primary Sequence of Cytochrome P450<sup>tyr</sup>, the Multifunctional N-Hydroxylase Catalyzing the Conversion of L-Tyrosine to p-Hydroxyphenylacetaldehyde Oxime in the Biosynthesis of the Cyanogenic Glucoside Dhurrin in *Sorghum bicolor* (L.) Moench." *Archives of biochemistry and biophysics* 323(1): 177-186.
- Kodama, O., et al.** (1992). "Oryzalexin S, a novel stemarane-type diterpene rice phytoalexin." *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 56(6): 1002-1003.
- Kokubun, T. und Harborne, J. B.** (1995). "Phytoalexin induction in the sapwood of plants of the Maloideae (Rosaceae): biphenyls or dibenzofurans." *Phytochemistry* 40(6): 1649-1654.
- Kong, W., et al.** (2016). "Two Novel Flavin-Containing Monooxygenases Involved in Biosynthesis of Aliphatic Glucosinolates." *Frontiers in Plant Science* 7.
- Kono, Y., et al.** (1984). "Absolute configuration of oryzalexin A and structures of its related phytoalexins isolated from rice blast leaves infected with *Pyricularia oryzae*." *Agricultural and Biological Chemistry* 48(1): 253-255.
- Kossel, A.** (1891). "Ueber die chemische Zusammensetzung der Zelle." *Du Bois-Reymond's Archiv/Arch Anat Physiol Physiol Abt*: 181-186.
- Kowalski, N. A.** (2016). Charakterisierung der Glutathiontransferasen aus *Arabidopsis thaliana*. Lehrstuhl für Botanik. Freising, TU-München. Dissertation.
- Krajewski, M. P., et al.** (2013). "Analysis of *Arabidopsis* glutathione-transferases in yeast." *Phytochemistry* 91: 198-207.
- Kriechbaumer, V., et al.** (2015). "Reticulomics: Protein-Protein Interaction Studies with Two Plasmodesmata-Localized Reticulon Family Proteins Identify Binding Partners Enriched at Plasmodesmata, Endoplasmic Reticulum, and the Plasma Membrane." *Plant Physiol* 169(3): 1933-1945.
- Kristensen, C., et al.** (2005). "Metabolic engineering of dhurrin in transgenic *Arabidopsis* plants with marginal inadvertent effects on the metabolome and transcriptome." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(5): 1779-1784.
- Krogh, A., et al.** (2001). "Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes." *Journal of molecular biology* 305(3): 567-580.
- Kuc, J.** (1991). "Phytoalexins: perspectives and prospects." *Mycotoxins and Phytoalexins*, CRC Press, Boca Raton, FL: 595-603.
- Kuc, J.** (1995). "Phytoalexins, stress metabolism, and disease resistance in plants." *Annual review of phytopathology* 33(1): 275-297.
- Kusano, M., et al.** (2011). "Metabolomics reveals comprehensive reprogramming involving two independent metabolic responses of *Arabidopsis* to UV-B light." *Plant J* 67(2): 354-369.
- Kutchan, T. M.** (1995). "Alkaloid biosynthesis [mdash] the basis for metabolic engineering of medicinal plants." *The Plant Cell* 7(7): 1059.
- Labrou, N. E., et al.** (2015). "Plant GSTome: structure and functional role in xenome network and plant stress response." *Current opinion in biotechnology* 32: 186-194.
- Lallement, P.-A., et al.** (2014). "The still mysterious roles of cysteine-containing glutathione transferases in plants." *Frontiers in pharmacology* 5.
- Lalonde, S., et al.** (2008). "Molecular and cellular approaches for the detection of protein-protein interactions: latest techniques and current limitations." *Plant J* 53(4): 610-635.
- Lambrix, V., et al.** (2001a). "The *Arabidopsis* epithiospecifier protein promotes the hydrolysis of glucosinolates to nitriles and influences *Trichoplusia ni* herbivory." *The Plant Cell Online* 13(12): 2793-2807.
- Lambrix, V., et al.** (2001b). "The *Arabidopsis* epithiospecifier protein promotes the hydrolysis of glucosinolates to nitriles and influences *Trichoplusia ni* herbivory." *Plant Cell* 13(12): 2793-2807.
- Landry, C. R., et al.** (2013). "Extracting insight from noisy cellular networks." *Cell* 155(5): 983-989.
- Langcake, P. und McCarthy, W.** (1979). "The relationship of resveratrol production to infection of grapevine leaves by *Botrytis cinerea*." *Vitis* 18: 244-253.
- Langcake, P. und Pryce, R.** (1976). "The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury." *Physiological Plant Pathology* 9(1): 77-86.
- Lange, B. M. und Ghassemian, M.** (2003). "Genome organization in *Arabidopsis thaliana*: a survey for genes involved in isoprenoid and chlorophyll metabolism." *Plant molecular biology* 51(6): 925-948.
- Laursen, T., et al.** (2016). "Characterization of a dynamic metabolon producing the defense compound dhurrin in sorghum." *Science* 354(6314): 890-893.

- Lee, D.-S., et al. (2008). "Structural insights into the evolutionary paths of oxylipin biosynthetic enzymes." *Nature* 455(7211): 363.
- Lee, Y. P., et al. (2013). "Transcriptome sequencing and microarray design for functional genomics in the extremophile *Arabidopsis* relative *Thellungiella salsuginea* (*Eutrema salsugineum*)." *BMC Genomics* 14: 793.
- Levy, E. D., et al. (2012). "Cellular crowding imposes global constraints on the chemistry and evolution of proteomes." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109(50): 20461-20466.
- Li, H. Q., et al. (2007). "Establishment of an efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated leaf disc transformation of *Thellungiella halophila*." *Plant Cell Rep* 26(10): 1785-1789.
- Li, J., et al. (1993). "Arabidopsis Flavonoid Mutants Are Hypersensitive to UV-B Irradiation." *Plant Cell* 5(2): 171-179.
- Li, Q., et al. (2000). "Feeding and growth of *Plutella xylostella* and *Spodoptera eridania* on *Brassica juncea* with varying glucosinolate concentrations and myrosinase activities." *Journal of Chemical Ecology* 26(10): 2401-2419.
- Lichtenthaler, H. K., et al. (1997). A Novel Mevalonate-Independent Pathway for the Biosynthesis of Carotenoids, Phytol and Prenyl Chain of Plastoquinone-9 in Green Algae and Higher Plants. *Physiology, Biochemistry and Molecular Biology of Plant Lipids*. J. P. Williams, M. U. Khan and N. W. Lem. Dordrecht, Springer Netherlands: 177-179.
- Liebrand, T. W., et al. (2013). "Receptor-like kinase SOBIR1/EVR interacts with receptor-like proteins in plant immunity against fungal infection." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110(24): 10010-10015.
- Lipka, V., et al. (2005). "Pre- and Postinvasion Defenses Both Contribute to Nonhost Resistance in *Arabidopsis*." *Science* 310(5751): 1180-1183.
- LO, S.-C. C., et al. (1999). "Accumulation of 3-deoxyanthocyanidin phytoalexins and resistance to *Colletotrichum sublineolum* in sorghum." *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55(5): 263-273.
- López-Meyer, M. und Nessler, C. L. (1997). "Tryptophan decarboxylase is encoded by two autonomously regulated genes in *Camptotheca acuminata* which are differentially expressed during development and stress." *The Plant Journal* 11(6): 1167-1175.
- Lozano-Mena, G., et al. (2014). "Maslinic acid, a natural phytoalexin-type triterpene from olives—a promising nutraceutical?" *Molecules* 19(8): 11538-11559.
- Lynen, F. (1964). "The pathway from "activated acetic acid" to the terpenes and fatty acids." *Proc. Royal Caroline Institute*: 103-138.
- Manici, L. M., et al. (1997). "In vitro fungitoxic activity of some glucosinolates and their enzyme-derived products toward plant pathogenic fungi." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45(7): 2768-2773.
- Martin, J. (1964). "Role of cuticle in the defense against plant disease." *Annual review of phytopathology* 2(1): 81-100.
- Martin, S. F. (1987). "The amaryllidaceae alkaloids." *The Alkaloids: Chemistry and Pharmacology* 30: 251-376.
- McGarvey, D. J. und Croteau, R. (1995). "Terpenoid metabolism." *The Plant Cell* 7(7): 1015.
- Mercier, J., et al. (1993). "Effect of UV-C on Phytoalexin Accumulation and Resistance to *Botrytis cinerea* in Stored Carrots." *Journal of phytopathology* 139(1): 17-25.
- Mert-Turk, F., et al. (2003). "Quantification of camalexin in several accessions of *Arabidopsis thaliana* following inductions with *Peronospora parasitica* and UV-B irradiation." *Phytoparasitica* 31(1): 81-89.
- Mert-Türk, F., et al. (2003). "Camalexin accumulation in *Arabidopsis thaliana* following abiotic elicitation or inoculation with virulent or avirulent *Hyaloperonospora parasitica*." *Physiological and Molecular Plant Pathology* 62(3): 137-145.
- Meunier, B., et al. (2004). "Mechanism of oxidation reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes." *Chemical reviews* 104(9): 3947-3980.
- Mikkelsen, M. D., et al. (2000a). "Cytochrome P450 CYP79B2 from *Arabidopsis* catalyzes the conversion of tryptophan to indole-3-acetaldoxime, a precursor of indole glucosinolates and indole-3-acetic acid." *J Biol Chem* 275(43): 33712-33717.
- Mikkelsen, M. D., et al. (2000b). "Cytochrome P450 CYP79B2 from *Arabidopsis* catalyzes the conversion of tryptophan to indole-3-acetaldoxime, a precursor of indole glucosinolates and indole-3-acetic acid." *Journal of biological Chemistry* 275(43): 33712-33717.
- Millet, Y. A., et al. (2010). "Innate immune responses activated in *Arabidopsis* roots by microbe-associated molecular patterns." *The Plant Cell* 22(3): 973-990.

- Mithöfer, A., et al.** (2004). "Biotic and heavy metal stress response in plants: evidence for common signals." *FEBS letters* 566(1-3): 1-5.
- Mizutani, M. und Ohta, D.** (1998). "Two Isoforms of NADPH: Cytochrome P450 Reductase in *Arabidopsis thaliana* Gene Structure, Heterologous Expression in Insect Cells, and Differential Regulation." *Plant Physiology* 116(1): 357-367.
- Moldrup, M. E., et al.** (2013). "De novo genetic engineering of the camalexin biosynthetic pathway." *J Biotechnol* 167(3): 296-301.
- Møller, B. und Conn, E.** (1980). "The biosynthesis of cyanogenic glucosides in higher plants. Channeling of intermediates in dhurrin biosynthesis by a microsomal system from *Sorghum bicolor* (Linn) Moench." *Journal of biological Chemistry* 255(7): 3049-3056.
- Møller, B. L.** (2010). "Dynamic metabolons." *Science* 330(6009): 1328-1329.
- Møller, B. L.** (2015). "A RECYCLING PATHWAY FOR CYANOGENIC GLYCOSIDES EVIDENCED BY THE COMPARATIVE METABOLIC PROFILING IN THREE CYANOGENIC PLANT SPECIES."
- Morant, A. V., et al.** (2008). " $\beta$ -Glucosidases as detonators of plant chemical defense." *Phytochemistry* 69(9): 1795-1813.
- Mosca, P., et al.** (1992). "The plant amino acid mimosine may inhibit initiation at origins of replication in Chinese hamster cells." *Molecular and cellular biology* 12(10): 4375-4383.
- Moes, K.** (1955). "Physiology of Alkaloids." *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 6: 393-432.
- Mucha, S., et al.** (2015). "Substantial reprogramming of the *Eutrema salsugineum* (Thellungiella salsuginea) transcriptome in response to UV and silver nitrate challenge." *BMC Plant Biol* 15: 137.
- Mueller, L. A., et al.** (2000). "AN9, a petunia glutathione S-transferase required for anthocyanin sequestration, is a flavonoid-binding protein." *Plant Physiology* 123(4): 1561-1570.
- Müller, K.** (1956). "Einige einfache versuche zum nachweis von phytoalexinen." *Phytopathol. Z* 27: 237-254.
- Müller, K.** (1958). "Studies on phytoalexins I. The formation and the immunological significance of phytoalexin produced by *Phaseolus vulgaris* in response to infections with *Sclerotinia fructicola* and *Phytophthora infestans*." *Australian Journal of Biological Sciences* 11(3): 275-300.
- Müller, K. und Berger, H.** (1940). "Experimentelle Untersuchungen über die Phytophthora Resistenz der Kartoffel zugleich ein Beitrag zum Problem der «Erworbenen resistenz» in Pflanzenreich." *Arb. aus der Biologischen Reichsanstalt f. Land-und Forst-Wirtschaft*, H 2: 189.
- Müller, R., et al.** (2010). "Differential effects of indole and aliphatic glucosinolates on lepidopteran herbivores." *Journal of Chemical Ecology* 36(8): 905-913.
- Müller, T. M., et al.** (2015). "Transcription activator-like effector nuclease-mediated generation and metabolic analysis of camalexin-deficient *cyp71a12 cyp71a13* double knockout lines." *Plant Physiology* 168(3): 849-858.
- Mumm, R., et al.** (2008). "Formation of simple nitriles upon glucosinolate hydrolysis affects direct and indirect defense against the specialist herbivore, *Pieris rapae*." *Journal of Chemical Ecology* 34(10): 1311.
- Nafisi, M., et al.** (2007). "*Arabidopsis* cytochrome P450 monooxygenase 71A13 catalyzes the conversion of indole-3-acetaldoxime in camalexin synthesis." *The Plant Cell* 19(6): 2039-2052.
- Nakajima, N., et al.** (2001). "Plant Growth Inhibitory Activity of L-Canavanine and Its Mode of Action." *Journal of Chemical Ecology* 27(1): 19-31.
- Nakano, R. T., et al.** (2017). "PYK10 myrosinase reveals a functional coordination between endoplasmic reticulum bodies and glucosinolates in *Arabidopsis thaliana*." *The Plant Journal* 89(2): 204-220.
- Ncube, B. und Van Staden, J.** (2015). "Tilting Plant Metabolism for Improved Metabolite Biosynthesis and Enhanced Human Benefit." *Molecules* 20(7): 12698-12731.
- Nelson, D.** (2009a). "Cytochrome P450 Homepage." Retrieved 02.07.2017, 2017.
- Nelson, D. und Werck-Reichhart, D.** (2011). "A P450-centric view of plant evolution." *The Plant Journal* 66(1): 194-211.
- Nelson, D. R.** (2006). "Cytochrome P450 Nomenclature, 2004." *METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY-CLIFTON THEN TOTOWA-* 320: 1.
- Nelson, D. R.** (2009b). "The cytochrome p450 homepage." *Human genomics* 4(1): 59.
- Neuefeind, T., et al.** (1997). Crystal structure of herbicide-detoxifying maize glutathione S-transferase-I in complex with lactoylglutathione: evidence for an induced-fit mechanism, Elsevier.
- Nielsen, K. A., et al.** (2008). "Metabolon formation in dhurrin biosynthesis." *Phytochemistry* 69(1): 88-98.

- Nieves-Cordones, M., et al.** (2017). "Production of low-Cs<sup>+</sup> rice plants by inactivation of the K<sup>+</sup> transporter OsHAK1 with the CRISPR-Cas system." *The Plant Journal*.
- Niyogi, K. K. und Fink, G. R.** (1992). "Two anthranilate synthase genes in Arabidopsis: defense-related regulation of the tryptophan pathway." *Plant Cell* 4(6): 721-733.
- Nour-Eldin, H. H., et al.** (2006). "Advancing uracil-excision based cloning towards an ideal technique for cloning PCR fragments." *Nucleic acids research* 34(18): e122-e122.
- Oke, O.** (1980). "Toxicity of cyanogenic glycosides." *Food Chemistry* 6(2): 97-109.
- Omura, T. und Sato, R.** (1962). "A new cytochrome in liver microsomes." *Journal of biological Chemistry* 237(4): PC1375-PC1376.
- Omura, T. und Sato, R.** (1964). "The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes I. Evidence for its hemoprotein nature." *Journal of biological Chemistry* 239(7): 2370-2378.
- Ostermeier, C. und Michel, H.** (1997). "Crystallization of membrane proteins." *Current opinion in structural biology* 7(5): 697-701.
- Otomo, K., et al.** (2004). "Diterpene cyclases responsible for the biosynthesis of phytoalexins, momilactones A, B, and oryzalexins A–F in rice." *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 68(9): 2001-2006.
- Padmavati, M., et al.** (1997). "Differential sensitivity of rice pathogens to growth inhibition by flavonoids." *Phytochemistry* 46(3): 499-502.
- Paine, M., et al.** (2005). "Electron transfer partners of cytochrome P450." *Cytochrome P450*: 115-148.
- Pang, Q., et al.** (2009). "Characterization of glucosinolate–myrosinase system in developing salt cress *Thellungiella halophila*." *Physiol Plant* 136(1): 1-9.
- Paquette, S. M., et al.** (2000). "Intron–exon organization and phylogeny in a large superfamily, the paralogous cytochrome P450 genes of *Arabidopsis thaliana*." *DNA and cell biology* 19(5): 307-317.
- Park, H. L., et al.** (2013). "Transcriptomic analysis of UV-treated rice leaves reveals UV-induced phytoalexin biosynthetic pathways and their regulatory networks in rice." *Phytochemistry* 96: 57-71.
- Patton, C. A., et al.** (1997). "Natural pest resistance of *Prunus* taxa to feeding by adult Japanese beetles: role of endogenous allelochemicals in host plant resistance." *Journal of the American Society for Horticultural Science* 122(5): 668-672.
- Paxton, J.** (1980). "A new working definition of the term "Phytoalexin"." *Plant Dis* 64: 734.
- Pedras, M. S. und Adio, A. M.** (2008). "Phytoalexins and phytoanticipins from the wild crucifers *Thellungiella halophila* and *Arabidopsis thaliana*: rapalexin A, wasalexins and camalexin." *Phytochemistry* 69(4): 889-893.
- Pedras, M. S. und Yaya, E. E.** (2010). "Phytoalexins from Brassicaceae: news from the front." *Phytochemistry* 71(11-12): 1191-1197.
- Pedras, M. S., et al.** (2011). "The phytoalexins from cultivated and wild crucifers: chemistry and biology." *Nat Prod Rep* 28(8): 1381-1405.
- Pedras, M. S., et al.** (2010). "Unveiling the phytoalexin biosynthetic puzzle in salt cress: unprecedented incorporation of glucobrassicin into wasalexins A and B." *Org Biomol Chem* 8(22): 5150-5158.
- Pedras, M. S. und Zheng, Q. A.** (2010). "Metabolic responses of *Thellungiella halophila/salsuginea* to biotic and abiotic stresses: metabolite profiles and quantitative analyses." *Phytochemistry* 71(5-6): 581-589.
- Pedras, M. S., et al.** (2009a). "Photochemical dimerization of wasalexins in UV-irradiated *Thellungiella halophila* and in vitro generates unique cruciferous phytoalexins." *Phytochemistry* 70(17-18): 2010-2016.
- Pedras, M. S. C., et al.** (2003). "Phytoalexins from *Thlaspi arvense*, a wild crucifer resistant to virulent *Leptosphaeria maculans*: structures, syntheses and antifungal activity." *Phytochemistry* 64(5): 949-956.
- Pedras, M. S. C., et al.** (2002). "Chemical defenses of crucifers: elicitation and metabolism of phytoalexins and indole-3-acetonitrile in brown mustard and turnip." *Phytochemistry* 59(6): 611-625.
- Pedras, M. S. C., et al.** (2000). "Phytoalexins from crucifers: synthesis, biosynthesis, and biotransformation." *Phytochemistry* 53(2): 161-176.
- Pedras, M. S. C., et al.** (2009b). "The biosynthetic pathway of crucifer phytoalexins and phytoanticipins: De novo incorporation of deuterated tryptophans and quasi-natural compounds." *Phytochemistry* 70(9): 1129-1138.
- Pedras, M. S. C., et al.** (1999). "Wasalexins A and B, new phytoalexins from wasabi: isolation, synthesis, and antifungal activity." *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 9(20): 3015-3020.

- Pedras, M. S. C., et al.** (2007). "The first naturally occurring aromatic isothiocyanates, rapalexins A and B, are cruciferous phytoalexins." *Chemical Communications*(4): 368-370.
- Pedras, M. S. C. und Zheng, Q.** (2016). "12 Phytoalexins." *Biology and Breeding of Crucifers*: 249.
- Peres, V., et al.** (2000). "Tetraoxygenated naturally occurring xanthenes." *Phytochemistry* 55(7): 683-710.
- Periasamy, A. und Clegg, R. M.** (2009). *FLIM microscopy in biology and medicine*, CRC Press.
- Perkins, J. R., et al.** (2010). "Transient protein-protein interactions: structural, functional, and network properties." *Structure* 18(10): 1233-1243.
- Perrin, D. R. und Cruickshank, I.** (1965). "Studies on Phytoalexins VII. Chemical Stimulation of Pisatin Formation in *Pisum Sativum* L." *Australian Journal of Biological Sciences* 18(4): 803-816.
- Piotrowski, M., et al.** (2004). "Desulfoglucosinolate sulfotransferases from *Arabidopsis thaliana* catalyze the final step in the biosynthesis of the glucosinolate core structure." *Journal of Biological Chemistry* 279(49): 50717-50725.
- Pirker, K. F., et al.** (2006). "Are the biological properties of kaempferol determined by its oxidation products?" *Free Radic Res* 40(5): 513-521.
- Poloni, A. und Schirawski, J.** (2014). "Red card for pathogens: phytoalexins in sorghum and maize." *Molecules* 19(7): 9114-9133.
- Prasad, M. und Subhashini, P.** (1994). "Mimosine-inhibited seed germination, seedling growth, and enzymes of *Oryza sativa* L." *Journal of Chemical Ecology* 20(7): 1689-1696.
- Qiu, J. L., et al.** (2008). "Arabidopsis MAP kinase 4 regulates gene expression through transcription factor release in the nucleus." *Embo Journal* 27(16): 2214-2221.
- Quideau, S.** (2006). "Flavonoids. Chemistry, Biochemistry and Applications. Edited by Øyvind M. Andersen and Kenneth R. Markham." *Angewandte Chemie International Edition* 45(41): 6786-6787.
- Quideau, S.** (2009). *Chemistry and biology of ellagitannins: an underestimated class of bioactive plant polyphenols*, World Scientific.
- Radwanski, E. R. und Last, R. L.** (1995). "Tryptophan biosynthesis and metabolism: biochemical and molecular genetics." *Plant Cell* 7(7): 921-934.
- Rask, L., et al.** (2000). *Myrosinase: gene family evolution and herbivore defense in Brassicaceae. Plant molecular evolution*, Springer: 93-113.
- Ratzka, A., et al.** (2002). "Disarming the mustard oil bomb." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99(17): 11223-11228.
- Rauhut, T.** (2009). *Die Regulation der Camalexinbiosynthese in Arabidopsis thaliana*. Lehrstuhl für Genetik. Freising, TU-München. Dissertation.
- Rauhut, T. und Glawischnig, E.** (2009). "Evolution of camalexin and structurally related indolic compounds." *Phytochemistry* 70(15-16): 1638-1644.
- Rauhut, T., et al.** (2009). "Inducible expression of a Nep1-like protein serves as a model trigger system of camalexin biosynthesis." *Phytochemistry* 70(2): 185-189.
- Reigosa, M. J. und Malvido-Pazos, E.** (2007). "Phytotoxic effects of 21 plant secondary metabolites on *Arabidopsis thaliana* germination and root growth." *J Chem Ecol* 33(7): 1456-1466.
- Robertson, W., et al.** (1985). "Modification of the outer surface of *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* by the phytoalexin rishitin." *Canadian journal of microbiology* 31(12): 1108-1112.
- Rogers, E. E., et al.** (1996). "Mode of action of the *Arabidopsis thaliana* phytoalexin camalexin and its role in *Arabidopsis*-pathogen interactions." *Molecular Plant Microbe Interactions* 9: 748-757.
- Rosenthal, G.** (2001). "L-Canavanine: a higher plant insecticidal allelochemical." *Amino acids* 21(3): 319-330.
- Sachs, J.** (1874). *Lehrbuch der Botanik nach dem gegenwärtigen Stand der Wissenschaft*, W. Engelmann.
- Sappl, P. G., et al.** (2009). "The *Arabidopsis* glutathione transferase gene family displays complex stress regulation and co-silencing multiple genes results in altered metabolic sensitivity to oxidative stress." *Plant J* 58(1): 53-68.
- Saunders, J. A., et al.** (1977). "Subcellular localization of the cyanogenic glucoside of Sorghum by autoradiography." *Plant Physiology* 59(4): 647-652.
- Savouret, J. F. und Quesne, M.** (2002). "Resveratrol and cancer: a review." *Biomedicine & Pharmacotherapy* 56(2): 84-87.
- Schafmeister, C. E., et al.** (1993). "Structure at 2.5 Å of a Designed Peptide That Maintains Solubility of Membrane Proteins." *SCIENCE-NEW YORK THEN WASHINGTON-* 262: 734-734.
- Schlaeppli, K., et al.** (2010). "Disease resistance of *Arabidopsis* to *Phytophthora brassicae* is established by the sequential action of indole glucosinolates and camalexin." *The Plant Journal* 62(5): 840-851.

- Schmelz, E. A., et al.** (2014). "Biosynthesis, elicitation and roles of monocot terpenoid phytoalexins." *The Plant Journal* 79(4): 659-678.
- Schoberer, J. und Botchway, S. W.** (2014). "Investigating protein-protein interactions in the plant endomembrane system using multiphoton-induced FRET-FLIM." *Methods Mol Biol* 1209: 81-95.
- Schoch, G. A., et al.** (2003). "Engineering of a water-soluble plant cytochrome P450, CYP73A1, and NMR-based orientation of natural and alternate substrates in the active site." *Plant Physiol* 133(3): 1198-1208.
- Schroeder, A., et al.** (2006). "The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements." *BMC Mol Biol* 7: 3.
- Schuhegger, R., et al.** (2006). "CYP71B15 (PAD3) catalyzes the final step in camalexin biosynthesis." *Plant Physiol* 141(4): 1248-1254.
- Schuhegger, R., et al.** (2007). "Regulatory variability of camalexin biosynthesis." *J Plant Physiol* 164(5): 636-644.
- Schuler, M. A. und Werck-Reichhart, D.** (2003). "Functional genomics of P450s." *Annual review of plant biology* 54(1): 629-667.
- Schwender, J., et al.** (1997). "Incorporation of 1-deoxy-d-xylulose into isoprene and phytol by higher plants and algae." *FEBS letters* 414(1): 129-134.
- Sekido, H. und Akatsuka, T.** (1987). "Mode of action of oryzalexin D against *Pyricularia oryzae*." *Agricultural and Biological Chemistry* 51(7): 1967-1971.
- Shaik, S., et al.** (2005). "Theoretical perspective on the structure and mechanism of cytochrome P450 enzymes." *Chemical reviews* 105(6): 2279-2328.
- Sharkey, T. D.** (1995). "Why plants emit isoprene." *Nature* 374: 769.
- Sharp, J. K., et al.** (1984). "Comparison of the structures and elicitor activities of a synthetic and a mycelial-wall-derived hexa (beta-D-glucopyranosyl)-D-glucitol." *Journal of biological Chemistry* 259(18): 11341-11345.
- Shearer, M.** (1995). "Vitamin k." *The Lancet* 345(8944): 229-234.
- Sibbesen, O., et al.** (1995). "Cytochrome P-450TYR is a multifunctional heme-thiolate enzyme catalyzing the conversion of L-tyrosine to p-hydroxyphenylacetaldehyde oxime in the biosynthesis of the cyanogenic glucoside dhurrin in *Sorghum bicolor* (L.) Moench." *Journal of biological Chemistry* 270(8): 3506-3511.
- Siipola, S. M., et al.** (2015). "Epidermal UV-A absorbance and whole-leaf flavonoid composition in pea respond more to solar blue light than to solar UV radiation." *Plant Cell Environ* 38(5): 941-952.
- Sitton, D. und West, C. A.** (1975). "Casbene: An anti-fungal diterpene produced in cell-free extracts of *Ricinus communis* seedlings." *Phytochemistry* 14(9): 1921-1925.
- Skadhauge, B., et al.** (1997). "The role of the barley testa layer and its flavonoid content in resistance to *Fusarium* infections." *Hereditas* 126(2): 147-160.
- Smith, A. P., et al.** (2003). "Arabidopsis AtGSTF2 is regulated by ethylene and auxin, and encodes a glutathione S-transferase that interacts with flavonoids." *The Plant Journal* 36(4): 433-442.
- Smith, B., et al.** (2014). "Camalexin-induced apoptosis in prostate cancer cells involves alterations of expression and activity of lysosomal protease cathepsin D." *Molecules* 19(4): 3988-4005.
- Smith, D. A.** (1982). "Toxicity of phytoalexins." *Phytoalexins/general editors, JA Bailey and JW Mansfield*.
- Smith, I. und Fowden, L.** (1966). "A study of mimosine toxicity in plants." *Journal of experimental botany* 17(4): 750-761.
- Sommer, A. und Böger, P.** (1999). "Characterization of Recombinant Corn GlutathioneS-Transferase Isoforms I, II, III, and IV." *Pesticide biochemistry and physiology* 63(3): 127-138.
- Sonderby, I. E., et al.** (2010). "Biosynthesis of glucosinolates--gene discovery and beyond." *Trends Plant Sci* 15(5): 283-290.
- Stauber, E. J., et al.** (2012). "Turning the 'mustard oil bomb' into a 'cyanide bomb': aromatic glucosinolate metabolism in a specialist insect herbivore." *PLoS One* 7(4): e35545.
- Stepanova, A. N., et al.** (2005). "A link between ethylene and auxin uncovered by the characterization of two root-specific ethylene-insensitive mutants in *Arabidopsis*." *The Plant Cell* 17(8): 2230-2242.
- Stracke, R., et al.** (2009). "Metabolomic and genetic analyses of flavonol synthesis in *Arabidopsis thaliana* support the in vivo involvement of leucoanthocyanidin dioxygenase." *Planta* 229(2): 427-445.
- Strickland, B.** (2017). *Phytoalexin biosynthesis in Brassicaceae: Verification of protein interaction by Co-IP and coexpression in yeast, as well as identification of stable mutations after genome editing.* Lehrstuhl für Botanik. Freising, TU-München. Bachelor of Science.

- Stubbs, C. D., et al.** (2005). "The use of time-resolved fluorescence imaging in the study of protein kinase C localisation in cells." *Bmc Cell Biology* 6(1): 22.
- Studer, R. A. und Robinson-Rechavi, M.** (2010). "Large-scale analysis of orthologs and paralogs under covarion-like and constant-but-different models of amino acid evolution." *Molecular biology and evolution* 27(11): 2618-2627.
- Stumpe, M., et al.** (2006). "Biosynthesis of C9-aldehydes in the moss *Physcomitrella patens*." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* 1761(3): 301-312.
- Su, T. B., et al.** (2011). "Glutathione-Indole-3-Acetonitrile Is Required for Camalexin Biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*." *Plant Cell* 23(1): 364-380.
- Sun, Y., et al.** (2012a). "Monitoring protein interactions in living cells with fluorescence lifetime imaging microscopy." *Methods in enzymology* 504: 371.
- Sun, Y., et al.** (2012b). "Arabidopsis TT19 Functions as a Carrier to Transport Anthocyanin from the Cytosol to Tonoplasts." *Molecular Plant* 5(2): 387-400.
- Sunilkumar, G., et al.** (2006). "Engineering cottonseed for use in human nutrition by tissue-specific reduction of toxic gossypol." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(48): 18054-18059.
- Swain, E., et al.** (1992). "Tissue and subcellular localization of enzymes catabolizing (R)-amygdalin in mature *Prunus serotina* seeds." *Plant Physiology* 100(1): 291-300.
- Taji, T., et al.** (2004). "Comparative genomics in salt tolerance between *Arabidopsis* and *Arabidopsis*-related halophyte salt cress using *Arabidopsis* microarray." *Plant Physiology* 135(3): 1697-1709.
- Takasugi, M., et al.** (1979). "Structures of moracins E, F, G, and H, new phytoalexins from diseased mulberry." *Tetrahedron Letters* 20(48): 4675-4678.
- Tanz, S. K., et al.** (2013). "SUBA3: a database for integrating experimentation and prediction to define the SUBcellular location of proteins in *Arabidopsis*." *Nucleic Acids Res* 41(Database issue): D1185-1191.
- Thangstad, O. P., et al.** (2004). "Cell specific, cross-species expression of myrosinases in *Brassica napus*, *Arabidopsis thaliana* and *Nicotiana tabacum*." *Plant Mol Biol* 54(4): 597-611.
- Thom, R., et al.** (2002). "Structure of a Tau Class Glutathione S-Transferase from Wheat Active in Herbicide Detoxification." *Biochemistry* 41(22): 7008-7020.
- Thomma, B. P., et al.** (1999). "Deficiency in phytoalexin production causes enhanced susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to the fungus *Alternaria brassicicola*." *The Plant Journal* 19(2): 163-171.
- Tierens, K. F.-J., et al.** (2001). "Study of the role of antimicrobial glucosinolate-derived isothiocyanates in resistance of *Arabidopsis* to microbial pathogens." *Plant Physiology* 125(4): 1688-1699.
- Tivendale, N. D., et al.** (2014). "The shifting paradigms of auxin biosynthesis." *Trends in plant science* 19(1): 44-51.
- Treutter, D.** (2005). "Significance of flavonoids in plant resistance and enhancement of their biosynthesis." *Plant biology* 7(06): 581-591.
- Tronchet, M., et al.** (2010). "Cinnamyl alcohol dehydrogenases-C and D, key enzymes in lignin biosynthesis, play an essential role in disease resistance in *Arabidopsis*." *Mol Plant Pathol* 11(1): 83-92.
- Tsuchisaka, A. und Theologis, A.** (2004). "Unique and overlapping expression patterns among the *Arabidopsis* 1-amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase gene family members." *Plant Physiology* 136(2): 2982-3000.
- Tsuji, J., et al.** (1992). "Phytoalexin accumulation in *Arabidopsis thaliana* during the hypersensitive reaction to *Pseudomonas syringae* pv *syringae*." *Plant Physiology* 98(4): 1304-1309.
- Tsuji, J., et al.** (1993). "Evidence that tryptophan is not a direct biosynthetic intermediate of camalexin in *Arabidopsis thaliana*." *Physiological and Molecular Plant Pathology* 43(3): 221-229.
- Turelli, M., et al.** (1984). "Effects of capsidiol on the lipid and protein content of isolated membranes of *Phytophthora capsici*." *Physiological Plant Pathology* 24(2): 211-221.
- Ulm, R., et al.** (2004). "Genome-wide analysis of gene expression reveals function of the bZIP transcription factor HY5 in the UV-B response of *Arabidopsis*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(5): 1397-1402.
- Uritani, I., et al.** (1960). "Similar metabolic alterations induced in Sweet Potato by poisonous chemicals and by *Ceratostomella fimbriata*." *Phytopathology* 50(1).
- Usadel, B., et al.** (2005). "Extension of the visualization tool MapMan to allow statistical analysis of arrays, display of corresponding genes, and comparison with known responses." *Plant Physiol* 138(3): 1195-1204.
- van Rheenen, J., et al.** (2004). "Correcting confocal acquisition to optimize imaging of fluorescence resonance energy transfer by sensitized emission." *Biophys J* 86(4): 2517-2529.

- Vandesompele, J., et al.** (2002). "Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes." *Genome Biol* 3(7): RESEARCH0034.
- VanEtten, H. D., et al.** (1994). "Two Classes of Plant Antibiotics: Phytoalexins versus Phytoanticipins." *The Plant Cell* 6(9): 1191.
- Verberne, M. C., et al.** (2007). "Vitamin K 1 accumulation in tobacco plants overexpressing bacterial genes involved in the biosynthesis of salicylic acid." *Journal of Biotechnology* 128(1): 72-79.
- Vickers, C. E., et al.** (2009). "A unified mechanism of action for volatile isoprenoids in plant abiotic stress." *Nature Chemical Biology* 5(5): 283-291.
- Vlot, A. C., et al.** (2009). "Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease." *Annual review of phytopathology* 47: 177-206.
- Voinnet, O., et al.** (2003). "Retracted: an enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus." *The Plant Journal* 33(5): 949-956.
- Wainhouse, D., et al.** (1990). "The role of lignin as a defence against the spruce bark beetle *Dendroctonus micans*: effect on larvae and adults." *Oecologia* 85(2): 257-265.
- Walhout, A. J. und Vidal, M.** (2001). "High-throughput yeast two-hybrid assays for large-scale protein interaction mapping." *Methods* 24(3): 297-306.
- Wang, C. L. und Yang, H. L.** (2011). "Conserved Residues in the Subunit Interface of tau Glutathione S-transferase Affect Catalytic and Structural Functions." *Journal of integrative plant biology* 53(1): 35-43.
- Wang, Z. P., et al.** (2015). "Egg cell-specific promoter-controlled CRISPR/Cas9 efficiently generates homozygous mutants for multiple target genes in *Arabidopsis* in a single generation." *Genome Biol* 16: 144.
- Ward, E., et al.** (1975). "Loroglossol: an orchid phytoalexin." *Phytopathology*.
- Ward, H. M.** (1902). "On the relations between host and parasite in the bromes and their brown rust, *Puccinia dispersa* (Erikss)." *Annals of Botany* 16(62): 233-315.
- Webber, J., et al.** (1985). "Cyanide poisoning of goats from sugar gums (*Eucalyptus cladocalyx*)." *Australian veterinary journal* 62(1): 28-28.
- Werck-Reichhart, D. und Feyereisen, R.** (2000). "Cytochromes P450: a success story." *Genome biology* 1(6): reviews3003. 3001.
- Wheeler, J., et al.** (1990). "Factors affecting the hydrogen cyanide potential of forage sorghum." *Crop and Pasture Science* 41(6): 1093-1100.
- Wijeratne, S. S., et al.** (2005). "Hydrogen peroxide induced oxidative stress damage and antioxidant enzyme response in Caco-2 human colon cells." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(22): 8768-8774.
- Williams, D. H., et al.** (1989). "Why are secondary metabolites (natural products) biosynthesized?" *J Nat Prod* 52(6): 1189-1208.
- Wink, M.** (1983). "Inhibition of seed germination by quinolizidine alkaloids." *Planta* 158(4): 365-368.
- Wink, M.** (2003). "Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective." *Phytochemistry* 64(1): 3-19.
- Wink, M.** (2010). "Introduction: biochemistry, physiology and ecological functions of secondary metabolites." *Annual Plant Reviews Volume 40: Biochemistry of Plant Secondary Metabolism, Second Edition*: 1-19.
- Wink, M. und Latz-Brüning, B.** (1995). *Allelopathic properties of alkaloids and other natural products*, ACS Publications.
- Winkel-Shirley, B.** (2001). "Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology." *Plant Physiol* 126(2): 485-493.
- Winkel, B. S.** (2004). "Metabolic channeling in plants." *Annu Rev Plant Biol* 55: 85-107.
- Wittstock, U., et al.** (2004). "Successful herbivore attack due to metabolic diversion of a plant chemical defense." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(14): 4859-4864.
- Wittstock, U. und Burow, M.** (2010). "Glucosinolate breakdown in *Arabidopsis*: mechanism, regulation and biological significance." *The Arabidopsis Book*: e0134.
- Wong, C. E., et al.** (2006). "Transcriptional profiling implicates novel interactions between abiotic stress and hormonal responses in *Thellungiella*, a close relative of *Arabidopsis*." *Plant Physiol* 140(4): 1437-1450.
- Wortman, J. R., et al.** (2003). "Annotation of the *Arabidopsis* genome." *Plant Physiology* 132(2): 461-468.

- Wouters, F. S., et al.** (1998). "FRET microscopy demonstrates molecular association of non-specific lipid transfer protein (nsL-TP) with fatty acid oxidation enzymes in peroxisomes." *EMBO J* 17(24): 7179-7189.
- Wróbel-Kwiatkowska, M., et al.** (2007). "Lignin deficiency in transgenic flax resulted in plants with improved mechanical properties." *Journal of Biotechnology* 128(4): 919-934.
- Wu, F. und Minter, S.** (2015). "Krebs cycle metabolon: structural evidence of substrate channeling revealed by cross-linking and mass spectrometry." *Angew Chem Int Ed Engl* 54(6): 1851-1854.
- Wu, H. J., et al.** (2012). "Insights into salt tolerance from the genome of *Thellungiella salsuginea*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(30): 12219-12224.
- Xing, H. L., et al.** (2014). "A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants." *BMC Plant Biol* 14: 327.
- Xu, L., et al.** (2011). "Lignin metabolism has a central role in the resistance of cotton to the wilt fungus *Verticillium dahliae* as revealed by RNA-Seq-dependent transcriptional analysis and histochemistry." *Journal of experimental botany* 62(15): 5607-5621.
- Xu, Z., et al.** (2009). "Comparative genome analysis of lignin biosynthesis gene families across the plant kingdom." *BMC Bioinformatics* 10(11): S3.
- Yang, L., et al.** (2009). "Sorghum 3-deoxyanthocyanins possess strong phase II enzyme inducer activity and cancer cell growth inhibition properties." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(5): 1797-1804.
- Yang, R., et al.** (2013). "The Reference Genome of the Halophytic Plant *Eutrema salsugineum*." *Front Plant Sci* 4: 46.
- Yanofsky, C. und Rachmeler, M.** (1958). "The Exclusion of Free Indole as an Intermediate in the Biosynthesis of Tryptophan in *Neurospora-Crassa*." *Biochimica Et Biophysica Acta* 28(3): 640-641.
- Yaya, E.** (2014). Phytoalexins and other antifungal metabolites from crucifers: isolation, synthesis and biosynthesis.
- Zagobelny, M., et al.** (2008). "Cyanogenesis in plants and arthropods." *Phytochemistry* 69(7): 1457-1468.
- Zagobelny, M. und Möller, B. L.** (2011). "Cyanogenic glucosides in the biological warfare between plants and insects: The Burnet moth-Birdsfoot trefoil model system." *Phytochemistry* 72(13): 1585-1592.
- Zalokar, M.** (1960). "Cytochemistry of centrifuged hyphae of *Neurospora*." *Experimental Cell Research* 19(1): 114-132.
- Zhang, J., et al.** (1987). "Control of stomatal behaviour by abscisic acid which apparently originates in the roots." *Journal of experimental botany* 38(7): 1174-1181.
- Zhang, Z., et al.** (2006). "The gene controlling the quantitative trait locus EPITHIOSPECIFIER MODIFIER1 alters glucosinolate hydrolysis and insect resistance in *Arabidopsis*." *The Plant Cell* 18(6): 1524-1536.
- Zhao, J. und Last, R. L.** (1996). "Coordinate regulation of the tryptophan biosynthetic pathway and indolic phytoalexin accumulation in *Arabidopsis*." *Plant Cell* 8(12): 2235-2244.
- Zhao, J., et al.** (1998). "Induction of *Arabidopsis* tryptophan pathway enzymes and camalexin by amino acid starvation, oxidative stress, and an abiotic elicitor." *The Plant Cell* 10(3): 359-370.
- Zhao, T., et al.** (1999). "The role of human glutathione S-transferases hGSTA1-1 and hGSTA2-2 in protection against oxidative stress." *Archives of biochemistry and biophysics* 367(2): 216-224.
- Zhao, Y., et al.** (2002). "Trp-dependent auxin biosynthesis in *Arabidopsis*: involvement of cytochrome P450s CYP79B2 and CYP79B3." *Genes & development* 16(23): 3100-3112.
- Zhou, N., et al.** (1999). "*Arabidopsis* PAD3, a gene required for camalexin biosynthesis, encodes a putative cytochrome P450 monooxygenase." *The Plant Cell* 11(12): 2419-2428.
- Zook, M. und Hammerschmidt, R.** (1997). "Origin of the Thiazole Ring of Camalexin, a Phytoalexin from *Arabidopsis thaliana*." *Plant Physiology* 113(2): 463-468.
- Zook, M., et al.** (1998). "Camalexin accumulation in *Arabis lyrata*." *Phytochemistry* 49(8): 2287-2289.

## 7. Anhang

**Tabelle 7.1 Übersicht über verwendete Agrobakterienstämme.**

Aufgelistet sind sämtliche in der Arbeit verwendete Agrobakterien-Stämme inkl. Resistenz und Verwendungsart.

| <b>Palsmid/Resistenz</b>               | <b>Insert</b> | <b>Verwendung</b>                      |
|--|---------------|--|
| <b>pEarlyGate101 (35S:Insert:YFP)</b>  | CYP71A12      | Kolokalisation, FRET, FRET-FLIM, Co-IP |
| <b>Kanamycin (50µg/ml)</b>             | CYP71A13      |  |
|  | CYP71B15      |  |
|  | CYP79B2       |  |
|  | ATR1          |  |
|  | CYP73A5       |  |
|  | GGP1          |  |
|  | GSTU4         |  |
|  | GSTU2         |  |
|  | SOBIR1        |  |
| <b>pEarlyGate102 (35S:Insert:CFP)</b>  | CYP71A12      | Kolokalisation, FRET                   |
| <b>Kanamycin (50µg/ml)</b>             | CYP71A13      |  |
|  | CYP71B15      |  |
|  | SOBIR1        |  |
| <b>pB7FWG2 (35S:Insert:GFP)</b>        | CYP71A12      | Kolokalisation, FRET-FLIM, Co-IP       |
| <b>Spectinomycin (50 µg/ml)</b>        | CYP71A13      |  |
|  | CYP71B15      |  |
|  | CYP79B2       |  |
|  | GGP1          |  |
|  | GSTU4         |  |
|  | GSTU2         |  |
|  | SOBIR1        |  |
| <b>pB7RWG2 (35S:Insert:RFP)</b>        | CYP71A12      | Kolokalisation, FRET-FLIM              |
| <b>Spectinomycin (50 µg/ml)</b>        | CYP71A13      |  |
|  | CYP71B15      |  |
|  | CYP79B2       |  |
|  | GGP1          |  |
|  | GSTU4         |  |
|  | GSTU2         |  |
|  | SOBIR1        |  |
| <b>pEarlyGate202 (35S:Insert:FLAG)</b> | CYP71A12      | Co-IP                                  |
| <b>Kanamycin (50µg/ml)</b>             | CYP71A13      |  |
|  | CYP71B15      |  |
|  | ATR1          |  |
|  | GGP1          |  |

| CYP79B2                             |             |  |
|-------------------------------------|-------------|--|
| <b>pBI101, Kanamycin (50µg/ml)</b>  | mGFP        | Co-IP                                      |
| <b>pHEE401, Kanamycin (50µg/ml)</b> | EsWRKY33.1  | Generierung von <i>knock-out</i> -Pflanzen |
|                                     | EsWRKY33.2  | in <i>E.salsugineum</i>                    |
|                                     | EsPen2.1    |  |
|                                     | EsPen2.2    |  |
|                                     | EsCYP81F4.1 |  |
|                                     | EsCYP81F4.2 |  |
|                                     | EsMetra8.1  |  |
|                                     | EsMetra8.2  |  |

**Tabelle 7.2** Verwendete *S. cerevisiae*-Stämme zur Analyse der Substrataffinitäten von CYP79B2, CYP71A13 und CYP71B15.

Die in Abschnitt 4.1.6 beschriebenen Analysen bezüglich der Substrataffinitäten von in Interaktion-stehender CYPs wurden mit den hier aufgelisteten *S. cerevisiae*-Stämmen durchgeführt. Alle Hefen enthielten immer alle drei Plasmide. Wurde die Aktivität eines einzelnen CYPs untersucht, wurde das original pSH61-Plasmid inseriert. So wurden Vektor-Effekte ausgeschlossen.

| Interne Nummer | pSH62    | pYeDP60  | pGREG505 |
|----------------|----------|----------|----------|
| 1              | Leer     | CYP71B15 | ATR1     |
| 2              | Leer     | CYP97B2  | ATR1     |
| 3              | Leer     | Leer     | ATR1     |
| 4              | CYP71A13 | CYP71B15 | ATR1     |
| 5              | CYP71A13 | Leer     | ATR1     |
| 6              | CYP71B15 | CYP71A13 | ATR1     |
| 7              | CYP71A13 | CYP97B2  | ATR1     |
| 8              | Leer     | CYP71A13 | ATR1     |

**Tabelle 7.3 Übersicht über verwendete *S. cerevisiae*-Stämme für *Yeast-two-Hybrid*-Experimente.**

Aufgelistet sind die für den gerichteten (im Stamm AH109) und ungerichteten (im Stamm Y8800 bzw. Y8930) genutzten Konstrukte.

| <b>Yeast-two-Hybrid</b> | <b>Gal4-BD</b>                | <b>Gal4-AD</b>                        |
|-------------------------|-------------------------------|---------------------------------------|
| gerichteter             | pBridge™:ADH1p-CYP71A12-ADH1t | pGAD424:ADH1p-CYP71B15-ADH1t          |
|                         | pBridge™:ADH1p-CYP71B15-ADH1t | pGAD424:ADH1p-CYP71A12-ADH1t          |
|                         | pBridge™:ADH1p-CYP71A13-ADH1t | pGAD424:ADH1p-CYP71B15-ADH1t          |
|                         | pBridge™:ADH1p-CYP71B15-ADH1t | pGAD424:ADH1p-CYP71A13-ADH1t          |
|                         | pBridge™:ADH1p-CYP71A12-ADH1t | Leer                                  |
|                         | pBridge™:ADH1p-CYP71B15-ADH1t | Leer                                  |
|                         | pBridge™:ADH1p-CYP71A13-ADH1t | Leer                                  |
| ungerichteter           | pDEST-AD-CYP71A12             | / (AD-Pool) (siehe Abschnitt 4.1.2.1) |
|                         | pDEST-AD-CYP71A13             | / (AD-Pool) (siehe Abschnitt 4.1.2.1) |
|                         | pDEST-AD-CYP71B15             | / (AD-Pool) (siehe Abschnitt 4.1.2.1) |

**Tabelle 7.4 Auflistung aller für die Analyse von AtGSTs verwendeten *S. cerevisiae*-Stämme.**

Dargestellt ist eine Übersicht von allen Hefestämmen, die für die Analyse von GST-Spezifitäten während der Camalexinbiosynthese genutzt wurden (siehe Abschnitt 4.2). Aufgeführt sind die verwendeten Stämme (siehe Tabelle 3.5) und die inserierten Konstrukte. Die AtGST-Plasmide wurden von Natalie Kowalski (Lehrstuhl für Botanik, TU-München) zur Verfügung gestellt.

| <b>Stamm</b>          | <b>pSH62</b> | <b>pYeDP60</b>               | <b>pGREG505</b> |
|-----------------------|--------------|------------------------------|-----------------|
| <b>#1506 (BY4741)</b> | AtGSTF6      | CYP71B20                     | ATR1            |
|                       | AtGSTF6      | Leer                         | ATR1            |
| <b>#2542</b>          | AtGSTF6      | CYP71B20                     | ATR1            |
|                       | AtGSTF6      | Leer                         | ATR1            |
| <b>#5085</b>          | AtGSTF6      | CYP71B20                     | ATR1            |
|                       | AtGSTF6      | Leer                         | ATR1            |
| <b>#5322</b>          | AtGSTF6      | CYP71B20                     | ATR1            |
|                       | AtGSTF6      | Leer                         | ATR1            |
| <b>#5085</b>          | Leer         | CYP71B20/ CYP71A13/ CYP71B15 | ATR1            |
|                       | AtGSTF2      | CYP71B20/ CYP71A13/ CYP71B15 | ATR1            |
|                       | AtGSTF3      | CYP71B20/ CYP71A13/ CYP71B15 | ATR1            |
|                       | AtGSTF4      | CYP71B20/ CYP71A13/ CYP71B15 | ATR1            |
|                       | AtGSTF5      | CYP71B20/ CYP71A13/ CYP71B15 | ATR1            |
|                       | AtGSTF6      | CYP71B20/ CYP71A13/ CYP71B15 | ATR1            |
|                       | AtGSTF7      | CYP71B20/ CYP71A13/ CYP71B15 | ATR1            |
|                       | AtGSTF8      | CYP71B20/ CYP71A13/ CYP71B15 | ATR1            |
|                       | AtGSTF9      | CYP71B20/ CYP71A13/ CYP71B15 | ATR1            |
|                       | AtGSTF10     | CYP71B20/ CYP71A13/ CYP71B15 | ATR1            |
|                       | AtGSTF11     | CYP71B20/ CYP71A13/ CYP71B15 | ATR1            |

---

Anhang

---

|            |                              |      |
|------------|------------------------------|------|
| AtGSTF12   | CYP71B20/ CYP71A13/ CYP71B15 | ATR1 |
| AtGSTF13   | CYP71B20/ CYP71A13/ CYP71B15 | ATR1 |
| AtGSTF14   | CYP71B20/ CYP71A13/ CYP71B15 | ATR1 |
| AtGSTU1    | CYP71B20/ CYP71A13/ CYP71B15 | ATR1 |
| AtGSTU2    | CYP71B20/ CYP71A13/ CYP71B15 | ATR1 |
| AtGSTU3    | CYP71B20/ CYP71A13/ CYP71B15 | ATR1 |
| AtGSTU4    | CYP71B20/ CYP71A13/ CYP71B15 | ATR1 |
| AtGSTU5    | CYP71B20/ CYP71A13/ CYP71B15 | ATR1 |
| AtGSTU6    | CYP71B20/ CYP71A13/ CYP71B15 | ATR1 |
| AtGSTU7    | CYP71B20/ CYP71A13/ CYP71B15 | ATR1 |
| AtGSTU8    | CYP71B20/ CYP71A13/ CYP71B15 | ATR1 |
| AtGSTU9    | CYP71B20/ CYP71A13/ CYP71B15 | ATR1 |
| AtGSTU10   | CYP71B20/ CYP71A13/ CYP71B15 | ATR1 |
| AtGSTU11   | CYP71B20/ CYP71A13/ CYP71B15 | ATR1 |
| AtGSTU12   | CYP71B20/ CYP71A13/ CYP71B15 | ATR1 |
| AtGSTU13   | CYP71B20/ CYP71A13/ CYP71B15 | ATR1 |
| AtGSTU14   | CYP71B20/ CYP71A13/ CYP71B15 | ATR1 |
| AtGSTU15   | CYP71B20/ CYP71A13/ CYP71B15 | ATR1 |
| AtGSTU16   | CYP71B20/ CYP71A13/ CYP71B15 | ATR1 |
| AtGSTU17   | CYP71B20/ CYP71A13/ CYP71B15 | ATR1 |
| AtGSTU18   | CYP71B20/ CYP71A13/ CYP71B15 | ATR1 |
| AtGSTU19   | CYP71B20/ CYP71A13/ CYP71B15 | ATR1 |
| AtGSTU20   | CYP71B20/ CYP71A13/ CYP71B15 | ATR1 |
| AtGSTU21   | CYP71B20/ CYP71A13/ CYP71B15 | ATR1 |
| AtGSTU22   | CYP71B20/ CYP71A13/ CYP71B15 | ATR1 |
| AtGSTU23   | CYP71B20/ CYP71A13/ CYP71B15 | ATR1 |
| AtGSTU24   | CYP71B20/ CYP71A13/ CYP71B15 | ATR1 |
| AtGSTU25   | CYP71B20/ CYP71A13/ CYP71B15 | ATR1 |
| AtGSTU26   | CYP71B20/ CYP71A13/ CYP71B15 | ATR1 |
| AtGSTU27   | CYP71B20/ CYP71A13/ CYP71B15 | ATR1 |
| AtGSTU28   | CYP71B20/ CYP71A13/ CYP71B15 | ATR1 |
| AtGSTT1    | CYP71B20/ CYP71A13/ CYP71B15 | ATR1 |
| AtGSTT2    | CYP71B20/ CYP71A13/ CYP71B15 | ATR1 |
| AtGSTT3    | CYP71B20/ CYP71A13/ CYP71B15 | ATR1 |
| AtGSTZ1    | CYP71B20/ CYP71A13/ CYP71B15 | ATR1 |
| AtGSTUZ2   | CYP71B20/ CYP71A13/ CYP71B15 | ATR1 |
| AtGSTTCHQD | CYP71B20/ CYP71A13/ CYP71B15 | ATR1 |
| AtGSTL1    | CYP71B20/ CYP71A13/ CYP71B15 | ATR1 |
| AtGSTL2    | CYP71B20/ CYP71A13/ CYP71B15 | ATR1 |
| AtGSTL3    | CYP71B20/ CYP71A13/ CYP71B15 | ATR1 |
| AtGSTDHAR1 | CYP71B20/ CYP71A13/ CYP71B15 | ATR1 |
| AtGSTDHAR2 | CYP71B20/ CYP71A13/ CYP71B15 | ATR1 |
| AtGSTDHAR3 | CYP71B20/ CYP71A13/ CYP71B15 | ATR1 |

**Tabelle 7.5 Übersicht über sämtliche verwendete Primer.**

Aufgeführt sind alle in dieser Arbeit verwendeten Primer inklusive der DNA-Sequenz und der etablierten Annealing-Temperatur.

| Primer              | Sequenz (5' → 3')       | Annealing-Temperatur |
|---------------------|-------------------------|----------------------|
| DT1-BsF EsWRKY33.1  | ATTGTGATAAGAGCTCCTGTGGT | 55°C                 |
| DT2-BsR EsWRKY33.1  | AAACACCACAGGAGCTCTTATCA | 55°C                 |
| DT1-BsF EsWRKY33.2  | ATTGGAACCATGATGATCAAGGC | 55°C                 |
| DT2-BsR EsWRKY33.2  | AAACGCCTTGATCATCATGGTTC | 55°C                 |
| DT1-BsF EsPen2.1    | ATTGGGAAGATCTTGAGAAGGA  | 55°C                 |
| DT2-BsR EsPen2.1    | AAACTCCTTCTCCAAGATCTTCC | 55°C                 |
| DT1-BsF EsPen2.2    | ATTGAACATGCTTCTAGCTCAGC | 55°C                 |
| DT2-BsR EsPen2.2    | AAACCGTGAGCTAGAAGCATGTT | 55°C                 |
| DT1-BsF EsCyp81F4.1 | ATTGCAGTGGTCACCGTAAGGCG | 55°C                 |
| DT2-BsR EsCyp81F4.1 | AAACCGCCTTACGGTGACCACTG | 55°C                 |
| DT1-BsF EsCyp81F4.2 | ATTGGTGTGTTTTGGCGAGTCGG | 55°C                 |
| DT2-BsR EsCyp81F4.2 | AAACCCGACTCGCCAAAACACAC | 55°C                 |
| DT1-BsF MeTra#8.1   | ATTGCACGGCCGAAGAAAGACCC | 55°C                 |
| DT2-BsR MeTra#8.1   | AAACGGGTCTTTCTTCGGCCGTG | 55°C                 |
| DT1-BsF MeTra#8.2   | ATTGCACCTTCGTACACGATGGC | 55°C                 |
| DT2-BsR MeTra#8.2   | AAACGCCATCGGTACGAAGGTG  | 55°C                 |
| TsPen2.1_seq_f      | GAAGGTTACTGGCCTTATTGAT  | 55°C                 |
| TsPen2.1_seq_r      | GCAGTTCCAAAGAGAAAAGCCT  | 55°C                 |
| hygroB fw           | AGACCTGCCTGAAACCGAAC    | 55°C                 |
| hygroB rev          | GATGCCTCCGCTCGAAGTAG    | 55°C                 |
| TsYLS8_for          | GCGATTCTGGCTGAGGAAGA    | 54°C                 |
| TsYLS8_rev          | CTTCCTTGCACCACGGTAGA    | 54°C                 |
| Thhalv10018739m for | AGTGCCAAGTCGTTGATGGT    | 54°C                 |
| Thhalv10018739m rev | TTGATACCCTTGATGTTTGGGA  | 54°C                 |
| Thhalv10007964m for | TTCCCAATGGTTCTCAAAGC    | 54°C                 |
| Thhalv10007964m rev | TCACAACAGCGATGGTGAAT    | 54°C                 |
| Thhalv10007957m for | AACCCCAAACCCAAATTGT     | 54°C                 |
| Thhalv10007957m rev | CCTCCCTCTAGCACGACATC    | 54°C                 |
| Thhalv10007945m for | AGCCCTAAAACCCCAATTGTC   | 54°C                 |
| Thhalv10002019m for | CGAGTTCCTCACACCTTTCG    | 54°C                 |
| Thhalv10002019m rev | TCCCACATCAACCAACACAT    | 54°C                 |
| Thhalv10008040m for | GCCCTTCTTGTTCCCTCTCT    | 54°C                 |
| Thhalv10008040m rev | AATCGATCCATCTCCACCAC    | 54°C                 |
| Thhalv10010557m for | CTGAAGCTTATCTCGACGCA    | 54°C                 |
| Thhalv10010557m rev | CAATCTCAGGCGAGATAATGA   | 54°C                 |
| Thhalv10018786m for | GAGTTCGGGGTCTTTCTTC     | 54°C                 |
| Thhalv10018786m rev | GTGAAACACCCGTTGTCCTT    | 54°C                 |

## Anhang

|                     |   |      |
|---------------------|---|------|
| Thhalv10018220m for | CCCATTGAAGGCAGGACAAG  | 54°C |
| Thhalv10018220m rev | TGTCTGCGTG TACCAGATCA                                       | 54°C |
| Thhalv10011384m for | AGAGGACCTTGGAGACCTTC  | 54°C |
| Thhalv10011384m rev | AGTTCTTCCCTCACTA ACTTGGA                                    | 54°C |
| Thhalv10011385m for | CCTACTCGTGCTCTACTGGA  | 54°C |
| Thhalv10011385m rev | TCCCGGCTTAAGGAAATCAGA                                       | 54°C |
| Thhalv10018387m for | TGACTCGAGCACAGAACCTT  | 54°C |
| Thhalv10018387m rev | GGGTCATTGTGAAGCTGGTG  | 54°C |
| Thhalv10005886m for | GTGGCTGGAGAATCTGGTCT  | 54°C |
| Thhalv10005886m rev | GCTTCTTTGATTGGGCTGCT  | 54°C |
| Thhalv10001354m for | CCAACAGGACTCAGAAACGT  | 54°C |
| Thhalv10001354m rev | GCAGTGACAACGAACAAGCT  | 54°C |
| Thhalv10001756m for | TCCGCTATCGAGCCTTATATTG                                      | 54°C |
| Thhalv10001756m rev | AGGGTCAACGTGAGGAAGAT  | 54°C |
| Thhalv10023411m for | ACATGCAAAGGCTGTTCAAA  | 54°C |
| Thhalv10023411m rev | ATTTAAGCGCGAATCCTTCA  | 54°C |
| Thhalv10016809m for | TGAAGCTCAATCGAAACGTG  | 54°C |
| Thhalv10016809m rev | GTAACCACGCTCGGTTAGGA  | 54°C |
| Thhalv10024813m for | AGTTGGTTTTCCGTGAACGTC                                       | 54°C |
| Thhalv10024813m rev | ACCAGCTCCAAACAAACCAG  | 54°C |
| Thhalv10003886m for | TGCTGAAGATAGGCACTGGA  | 54°C |
| Thhalv10003886m rev | CATTGAATTTGATGTTGGGAAC                                      | 54°C |
| U6-26p-F            | TGTCCCAGGATTAGAATGATTAGGC                                   | 55°C |
| U6-29p-R            | AGCCCTCTTCTTTGATCCATCAAC                                    | 55°C |
| B15p-gateway-f      | GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCTTATACTGTG<br>GCTATATATG      | 55°C |
| B15p-gateway-r      | GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTCTTGCCCT<br>GTTCTTGTG        | 55°C |
| cyp79b2f-gateway    | ggggacaagttgtacaaaaaagcaggcttcatgaacactttac                 | 60°C |
| cyp79b2r-gateway    | ggggaccactttgtacaagaagctgggtcccactcaccgt                    | 60°C |
| attB_GSTU2_f        | GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGCGAA<br>GAAAGAAGAGAGT    | 60°C |
| attB_GSTU2_r        | GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTCGAACGT<br>AGACTTAGCTCT     | 60°C |
| attB_GSTU4_f        | GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGCGGA<br>GAAAGAAGAGGATGTG | 60°C |
| attB_GSTU4_r        | GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTCGGCTGA<br>TTTGATTCTTTCTACC | 60°C |
| CYP71A12/A13B1Fw    | GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGAGCAAT<br>ATCAAGAAATGGA   | 60°C |
| CYP71A12B2Rev       | GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTGAATAACG<br>GAAGATGGAAATGC  | 60°C |
| CYP71A13B2Rev       | GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTCCACAAC<br>CGAAGATGGAAATG   | 55°C |
| Cyp71B15_EcroRI_f   | GAATTCATGTCGGTTTTCTCTGTTTC                                  | 55°C |
| 71B15_BamHI_r       | GGATCCTCAGTGGTGAAGA ACTTGAAAGA                              | 55°C |
| A13_EcoRI_f         | GAATTCATGAGCAATATTCAAGAAATGG                                | 55°C |

## Anhang

|                 |  |      |
|-----------------|--|------|
| A13_BamHI_r     | GGATCCTTACACAACCGAAGATGGAA                                   | 55°C |
| 79B2_EcoRI_f    | GAATTCATGAACACTTTTACCTCAA                                    | 55°C |
| 79B2_BamHI_r    | GGATCCTCACTTCACCGTCGGGTAG                                    | 55°C |
| sobir1_EcorRI_f | GAATTCATGGCTGTTCCACGGGA                                      | 55°C |
| sobir1_BamHI_r  | GGATCCCTAGTGCTTGATCTGGGAC                                    | 55°C |
| ggp1_EcorRI_f   | GAATTCATGGTGGAGCAAAAGAGAT                                    | 55°C |
| ggp1_BamHI_r    | GGATCCCTAGTTAGTTGGAAGCTCTGC                                  | 55°C |
| A12_EcoRI_f     | GAATTCATGAGCAATATTCAAGAAATG                                  | 55°C |
| A12_BamHI_r     | GGATCCTTAAATAACGGAAGATGGAAA                                  | 55°C |
| ATR1f           | GCGGCCGCATGACTTCTGCTTTGTAT                                   | 55°C |
| ATR1r           | CAGCTGTCACCAGACATCTCTGAGG                                    | 55°C |
| 79B2_EcoRI_f    | GAATTCATGAACACTTTTACCTCAA                                    | 54°C |
| 79B2_BamHI_r    | GGATCCTCACTTCACCGTCGGGTAG                                    | 54°C |
| sobir1_EcoRI_f  | GAATTCATGGCTGTTCCACGGGA                                      | 54°C |
| sobir1_BamHI_r  | GGATCCCTAGTGCTTGATCTGGGAC                                    | 54°C |
| ggp1_EcoRI_f    | GAATTCATGGTGGAGCAAAAGAGAT                                    | 54°C |
| ggp1_BamHI_f    | GGATCCCTAGTTAGTTGGAAGCTCTGC                                  | 54°C |
| A12_Sall_f      | GTCGACTCATGAGCAATATTCAAGAAATG                                | 54°C |
| A12_Sall_r      | GTCGACTCTTAAATAACGGAAGATGGAAA                                | 54°C |
| A13_Sall_f      | GTCGACTCATGAGCAATATTCAAGAAATGG                               | 54°C |
| A13_Sall_r      | GTCGACTCTTACACAACCGAAGATGGAA                                 | 54°C |
| GST U2_EcoRI_f  | GAATTCATGGCGAAGAAAGAAGAGAGT                                  | 54°C |
| GST U2_BamHI_r  | GGATCCTTAGAACGTAGACTTAGCTCTCT                                | 54°C |
| GST U4_EcoRI_f  | GAATTCATGGCGGAGAAAGAAGAG                                     | 54°C |
| GST U4_BamHI_r  | GGATCCTTAGGCTGATTTGATTCTTTCT                                 | 54°C |
| T7              | TAATACGACTCACTATAGGG   | 54°C |
| Sp6             | ATTTAGGTGACACTATAG   | 54°C |
| TsPen2.1_seq_f  | GAAGGTTACTGGCCTTATTGAT                                       | 54°C |
| TsPen2.1_seq_r  | GCAGTTCCAAAGAGAAAAGCCT                                       | 54°C |
| 35S-TsWRKY33-f  | GGCTTAAUATCTCTTTC  | 54°C |
| TsWrkx33 rev2   | TGGAGAAGCAAGAACCTGCA   | 54°C |
| TsCyp81F4 for   | TTGCTCTCCTTGTCATTGC  | 54°C |
| TsCyp81F4 rev   | TCGACCTCACTGCTGATGAG   | 54°C |
| B15-RTf4        | GGAATGATCTCGGACATATTTGTAG                                    | 54°C |
| B15-RTr4        | TGGACATATTCTCCTACCAG   | 54°C |
| A13-RT-F        | TATGATCTTGGATATGTTTATCGGAGG                                  | 54°C |
| A13-RT-R        | ATTGATTATCACCTCTGTCCCTG                                      | 54°C |
| ATR1B1Fw        | GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGACTTCT<br>GCTTTGTATGCTTCC  | 55°C |
| ATR1B2 RevN     | GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCTATCACCA<br>GACATCTCTGAGGTATC | 55°C |
| Y2H-Dbfor       | ggcttcagtggagactgatatgacctc                                  | 59°C |
| Y2H-term        | ggagacttgaccaaacctctggcg                                     | 59°C |
| nptII fw        | AGAGGCTATTTCGGCTATGACTG                                      | 54°C |
| nptII rev       | ACTCGTCAAGAAGGCGATAGAA                                       | 54°C |

## Anhang

---

|         |                      |      |
|---------|----------------------|------|
| bar fw  | GAAGTCCAGCTGCCAGAAAC | 54°C |
| bar rev | GCACCATCGTCAACCACTAC | 54°C |

---

## 8. Danksagung

**Vielen Dank an,**

Prof. Erich Glawischnig für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe meine Doktorarbeit anfertigen zu dürfen und die Freiheit mich wissenschaftlich, durch Teilnahme an verschiedenen Konferenzen und Fortbildungen, entfalten zu dürfen.

Prof. Poppenberger-Sieberer und Prof. Hückelhoven dafür, dass sie sich die Zeit genommen haben meine Arbeit zu begutachten.

Unseren Kollaborationspartnern Verena Kriechbaumer, Dirk Walther, Dirk Hinch, Christopher McCollum und Stefan Engelhardt für ihre tatkräftige Unterstützung bei verschiedenen Projekten.

Prof. Erwin Grill dafür, der AG Glawischnig eine neue Herberge geboten zu haben und die Möglichkeit mich im Anschluss an die Promotion weiter im Bereich der Forschung betätigen zu können.

Stefan Lenk, Laura Hannemann, Ottilie Peis, Regina Hüttl und allen Mitarbeitern der ehemaligen Genetik für die schöne Arbeitsatmosphäre in den ersten Jahren meiner Promotion.

Den gesamten „*Botany ALLSTARS and Friends*“ für die aufregende und tolle gemeinsame Zeit in Freising. Ohne euch wäre es sehr langweilig geworden.

Natalie Kowalski für ihre tatkräftige Hilfe bei allen GST-Fragen und dafür, sie als Freundin bezeichnen zu dürfen. Deine Wärme und Zuversichtlichkeit hat mich aus so manchen Krisen geholt.

Sebastian Scholz, meinem liebsten Boulder-Partner. Nur auf dein Kommando kann ich springen! Danke dir für deine unermüdliche Unterstützung als Freund und als wandelndes Lexikon.

Teresa Müller für die wunderbare Zeit als meine direkte Labor- und Büronachbarin und dafür, dass sie sich mit mir durch die diversen Höhen und Tiefen des Laborlebens der letzten 4 Jahre geschlagen hat. Ich danke dir dafür, dass du mit deiner fränkischen Geduld all meine Launen und mentalen Krisen (auch außerhalb der Arbeit) ertragen hast. Mit dir im Rücken war das Tabak-infiltrieren viel weniger langweilig!

Franziska Mayer und ihre kleine Familie für all die Böhnchen-Nachmittage und Wochenenden. Ich danke euch für eure langjährige Freundschaft. Ihr seid mein Rückzugsort und meine zweite Familie. Zusätzlich danke ich Franziska natürlich für ihre unermüdliche Ausdauer beim „Kommasetzen“ um 5 Uhr morgens.

Moritz Ruschhaupt als besten „Köpfchen-Streichler“ der Welt. Ob am Berg, auf Arbeit oder privat - Du sorgst dafür, dass ich nicht auf den letzten Metern stehen bleibe, sondern sogar über mich hinauswachse. Ohne dich wäre die Welt manchmal ziemlich dunkel.

Zum Schluss danke ich auch meiner Familie. Durch sie bin ich der Mensch geworden der ich bin. Ein besonderer Dank geht an meine Großeltern. Ihr habt so unendlich viel zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

## 9. Lebenslauf

### persönliche Angaben

---

Name: Stefanie Mucha  
Geburtsdatum: 13.06.1988  
Geburtsort: Hoyerswerda, Deutschland

### Ausbildung und Studium

---

- seit 04/2012                    **Promotion an der Technischen Universität München**  
Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt, Lehrstuhl für Botanik, AG Prof. Glawischnig.  
Titel der Doktorarbeit: „*Phytoalexinbiosynthese in Brassicaceen: Interaktion Camalexin-spezifischer Enzyme und Etablierung von Eutrema salsugineum als Modellsystem.*“
- 10/2006 - 11/2011            **Studium der Biologie an der Technischen Universität Dresden**  
Institut für Botanik, Professur für Pflanzenphysiologie,  
Prof. Dr. Ludwig-Müller  
Titel der Diplomarbeit „*Charakterisierung von GH3-Genen während der Pflanzenkrankheit Kohlhernie*“
- 02/2010 - 03/2010            **Praktikum im Laboratorium für Bakteriologie und Lebensmittelhygiene**  
Dr. Günther Jeschke, Dresden  
Thema: „*Analyse von Lebensmittelproben und Keimidentifikation*“
- 10/2009 - 01/2010            **Forschungsaufenthalt an der Oxford Brookes University**  
School of Life Science, Oxford, United Kingdom  
Thema der Forschungsarbeit: „*Analyse von humanen  $\alpha\beta 2$  Nikotin-Acetylcholinrezeptoren mittels Radioliganden-Studien und Mutagenese*“
- 06/2006                         **Abitur am Leon-Foucault-Gymnasium, Hoyerswerda**

### Publikationen

---

**Franklin, M., Bermudez, I., Mucha, S., Singewald, N., Gaburro, S. & Murck, H. 2010.** *Time defining effects of tryptophan depletion on hormone secretion and brain 5-HT<sub>2</sub> binding in the rat.* European Neuropsychopharmacology, 20, 357.

**Jahn, L., Mucha, S., Bergmann, S., Horn, C., Staswick, P., Steffens, B., Siemens J. & Ludwig-Müller, J. (2013).** *The clubroot pathogen (Plasmodiophora brassicae) influences auxin signaling to regulate auxin homeostasis in Arabidopsis.* Plants, 2(4), 726-749.

**Mucha, S., Walther, D., Müller, T. M., Hinch, D. K., & Glawischnig, E. (2015).** *Substantial reprogramming of the Eutrema salsugineum (Thellungiella salsuginea) transcriptome in response to UV and silver nitrate challenge.* BMC plant biology, 15(1), 137.