Max Planck Institut
für chemische Ökologie

Ernst-Abbe-Fachhochschule Jena
Hochschule für angewandte Wissenschaften

Abwehrstoffe in *Zea mays* - Charakterisierung von Enzymen der DIM_2BOA-Glc Biosynthese

Bachelorarbeit

vorgelegt an der Ernst-Abbe-Fachhochschule Jena
Fachbereich Medizintechnik/Biotechnologie
Studiengang Biotechnologie

Hochschulbetreuer: Prof. Dr. rer. nat. habil. Thomas Munder

Betrieblicher Betreuer: Dr. Tobias Köllner
Institut: Max-Planck-Institut für chemische Ökologie, Jena

Bearbeitet von: Selina Seçinti
Martrikelnummer: 634925
Studiengang: Biotechnologie

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung **4**
1.1 Allgemeines . . . 4
1.2 Benzoxazinoide: Sekundäre Pflanzenstoffe in Mais . . . 5
1.3 Biosynthese der Benzoxazinoide in Pflanzen . . . 6
1.4 Biosynthese der Benzoxazinoide in Mais . . . 7
1.5 Dioxygenasen und Methyltransferasen . . . 8
1.6 Zielstellung . . . 9

2 Material und Methoden **10**
2.1 Materialien . . . 10
2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterial . . . 10
2.1.2 Chemikalien . . . 12
2.1.3 Synthetische Oligonukleotide/Primer . . . 13
2.1.4 Vektoren . . . 14
2.1.5 Bakterienstämme . . . 14
2.2 Methoden . . . 15
2.2.1 Gensynthese . . . 15
2.2.2 Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Vermehrung der Genkonstrukte . 15
2.2.3 Präparative Agarosegelelektrophorese und Gelextraktion . . . 15
2.2.4 Ligation und Transformation des amplifizierten Gens mit dem Expressionsvektor . . . 16
2.2.5 Überprüfung der Klonierung . . . 16
2.2.6 Plasmidpräparation . . . 16
2.2.7 Kontrollverdau . . . 16
2.2.8 Sequenzierung der klonierten Dioxygenasen und *O*-Methyltransferasen aus Mais . . . 17
2.2.9 Heterologe Expression der Dioxygenase- und *O*-Methyltransferasegene in *E. coli* BL21 . . . 17
2.2.10 Zellaufschluss . . . 17
2.2.11 Proteinreinigung . . . 18
2.2.12 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) . . 18
2.2.13 Enzymassays . . . 18
2.2.14 Chromatographie . . . 19
2.2.15 Triple Quadrupol-Experimente . . . 20

2.2.16 TRIMBOA-Glc Präparation für NMR-Analyse 21

3 Ergebnisse **22**
3.1 2-Oxoglutarat-abhängige Dioxygenasen BX6 und BX11 22
3.1.1 Klonierung 22
3.1.2 Heterologe Expression 24
3.1.3 Optimierung der Assaybedingungen 26
3.1.4 Substratspezifität der 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen BX6 und BX11 27
3.1.5 Aktivitätsbestimmung der verkürzten BX11-Variante 28
3.2 *O*-Methyltransferasen 29
3.2.1 Klonierung 29
3.2.2 Heterologe Expression 31
3.2.3 Aktivitätsbestimmung der *O*-Methyltransferasen BX12 und ZRP4 . . . 31
3.3 Verifizierung der TRIMBOA-Glc-Struktur mittels NMR-Spektroskopie 33

4 Diskussion **34**
4.1 Die Substratspezifität der 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen BX6 und BX11 konnte bestätigt werden 34
4.2 Verkürzte Variante von BX11 ist enzymatisch inaktiv 35
4.3 *O*-Methyltransferasen BX12 und ZRP4 sind möglicherweise in der Lage DIM_2BOA-Glc zu bilden 36
4.4 Strukturbestimmung von TRIMBOA-Glc mittels NMR-Spektroskopie 37

5 Zusammenfassung **38**

6 Literaturverzeichnis **39**

7 Anhang **42**

Danksagung **46**

Selbstständigkeitserklärung **47**

1 Einleitung

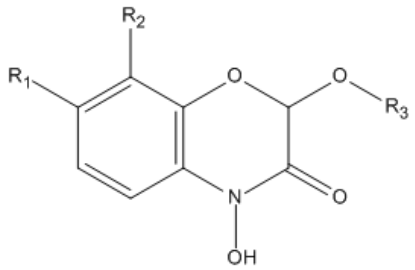
1.1 Allgemeines

Mais (*Zea mays*) ist eine der wichtigsten Kulturpflanzen weltweit. Er dient nicht nur Menschen und Tieren als wertvolle Nahrungsquelle sondern auch als wichtiger Modellorganismus in der Grundlagenforschung (Schnable et al., 2012). Der moderne Mais ist durch Domestizierung vor etwa 10.000 Jahren aus dem aus Mexiko stammenden Gras Teosinte hervorgegangen. Durch intensive Züchtung sind die heute weit verbreiteten Hybridmaissorten entstanden. Dadurch ist es möglich auch in gemäßigten Breiten großflächig Mais anzubauen und die Ernte um bis zu 60 % gegenüber den reinen Sorten zu steigern (Schnable et al., 2009). Ohne den Mais in seiner heutigen Form wären viele Produkte, beispielsweise Bindemittel oder biologisch abbaubare Kunststoffe aus Maisstärke, so nicht mehr denkbar. Grund genug sich eingehender mit dieser für Wissenschaft und Wirtschaft unverzichtbaren Pflanze zu beschäftigen.
Wie Weizen, Roggen, Gerste und Hirse gehört Mais zur Familie der Süßgräser (*Poaceae*). Die einjährige Pflanze erreicht in der Regel eine Höhe von 1,5 bis 2 Metern und einen Durchmesser der markhaltigen Sprossachse von etwa 5 cm. Endständig bildet sich eine 50 cm lange Rispe mit den männlichen Blüten, die weiblichen Blüten hingegen sind an der Sprossachse im Bereich der Blattansätze zu finden. Mais gehört zu den Fremdbefruchtern und blüht von Juli bis September (www.natur-lexikon.com).
Das Genom der Maislinie B73 ist vollständig sequenziert. Auf zehn strukturell sehr unterschiedlichen Chromosomen verteilen sich über 32.000 Gene mit insgesamt 2,3 Mrd. Basenpaaren (bp) Länge. Etwa 80 % des Genoms besteht aus repetetiven Sequenzen, welche Transposons genannt werden (Schnable et al., 2012). Diese auch 'springende Gene' genannten DNA-Abschnitte verändern ihre Position im Genom. Transposons sind in der Regel durch Methylierung inaktiviert; können aber durch abiotische Faktoren wie Temperaturschwankungen und biotische Faktoren wie Bakterien- und Pilzinfektionen aktiviert werden (Lisch, 2009). Dann werden die Abschnitte demethyliert und die Transposons zufällig an anderer Stelle im Genom wieder eingebaut. Unter anderem dadurch kommt die extrem hohe phäno- und genotypische Diversität zustande.
Mais gehört wie auch Zuckerrohr und Hirse zu den sogenannten C4-Pflanzen. Diese nutzen, anders als gewöhnliche C3-Pflanzen, Phosphoenolpyruvat als Kohlenstoffdioxidakzeptor. Dieser Stoff hat eine deutlich höhere Affinität zu Kohlenstoffdioxid, wodurch Mais auch an Standorten mit geringerem Luft-Kohlenstoffdioxid-Gehalt und hoher Sonneneinstrahlung überleben kann. Doch nicht nur dieser Mechanismus ist für die Maispflanze vorteilhaft. Wie andere Pflanzen auch bilden Gräser neben den sogenannten Primärmetaboliten, welche für das Überleben der Pflanze essentiell sind, auch Sekundärmetabolite oder spezialisierte Substanzen, die teils

charakteristisch für die verschiedenen Familien sind und die Pflanzen beispielsweise vor abiotischem Stress schützen (Gierl und Frey, 2001). Bis heute sind tausende solcher spezialisierten Substanzen bekannt (Jonczyk et al., 2008). Doch was genau sind Sekundärmetabolite und welchen Nutzen zieht eine Pflanze aus der Bildung einer so großen Menge verschiedenster Substanzen?
Für das reine Überleben der Pflanzen sind sie nicht notwendig; eher bieten sie ihnen einen evolutionären Vorteil im Kampf um begrenzte Ressourcen, beispielsweise gegen Fressfeinde wie Raupen und Käfer oder gegen pathogene Pilze und Bakterien (Gierl und Frey, 2001; Meihls et al., 2013). Je nach geographischer Lage der Pflanzen müssen diese sich gegen die unterschiedlichsten Arten von Feinden zur Wehr setzen und entwickelten so verschiedene Profile an Abwehrsoffen (Meihls et al., 2013).

1.2 Benzoxazinoide: Sekundäre Pflanzenstoffe in Mais

Maispflanzen müssen sich gegen eine Vielzahl verscheidener Angreifer verteidigen. Dazu sind unterschiedliche Abwehrstoffe notwendig, die unter anderem Sekundärmetabolite sein können. Auch die Benzoxazinoide, welche in den 60er Jahren des vergangenen Jahrhunderts erstmals beschrieben wurden, zählen zu diesen Sekundärmetaboliten (Niemeyer, 2008).



R1	R2	R3	Kürzel
H	H	H	DIBOA
H	H	Glc	DIBOA-Glc
CH_3O	H	H	DIMBOA
CH_3O	H	Glc	DIMBOA-Glc
CH_3O	CH_3O	H	DIM_2BOA-Glc
CH_3O	CH_3O	Glc	DIM_2BOA-Glc
OH	H	H	TRIMBOA
OH	H	Glc	TRIMBOA-Glc

Abbildung 1.1: **Grundstruktur der Benzoxazinoide nach Niemeyer, 2008.** Die Grundstruktur aller untersuchten Benzoxazinoide ist eine Hydroxamsäure. Derivate mit verschiedenen Substituenten an den Positionen 3, 7 und 8 wurden nachgewiesen

Bis heute wurden die meisten Enzyme der Benzoxazinoidbiosynthese identifiziert und charakterisiert. Ihre Aktivität wurde zuerst in einer mutierten Maislinie nachgewiesen, welche deutlich weniger DIMBOA-Glc (2,4-Dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-on-glucosid) produziert als andere bekannte Linien. Diese Mutante wird als *benzoxazinless (bx)* bezeichnet, da sie die für die Benzoxazinoidbiosynthese notwendigen Enzyme nicht exprimiert (Hamilton, 1964). So werden alle an der Synthese beteiligten Enzyme als Benzoxazinless (BX) und einer Nummer, entsprechend der Reihenfolge der von ihnen katalysierten Zwischenschritte, bezeichnet. Die

chemische Grundstruktur der untersuchten Benzoxazinoide bildet eine zyklische Hydroxamsäure. Diese kann an unterschiedlichen Positionen verschiedene Substituenten tragen (Abbildung 1.1 auf Seite 5). Je nachdem welche Substituenten an welcher Position zu finden sind, verändert sich die Reaktivität der Verbindungen (Niemeyer, 2008). So sind die Aglycone reaktiver als die glycosylierte Verbindung, weshalb Benzoxazinoide in der weniger reaktiven glycosylierten Form in der Vakuole gespeichert werden. Sobald das Pflanzengewebe durch äußere Einflüsse beschädigt wird, werden durch Hydrolyse aus den glycosylierten Verbindungen, vermittelt durch β-Glucosidasen, die aktiven Aglycone gebildet, welche der Pflanze letztendlich als Abwehrstoffe unter anderem gegen Blattläuse dienen (Meihls et al., 2013).
Vor allem in jungen Maispflanzen werden Benzoxazinoide synthetisiert. Die gemessene Benzoxazinoidkonzentration variiert aber stark in den verschiedenen Pflanzengeweben und mit dem Alter der Pflanzen. So ist die Konzentration in jungen Blättern immer höher als die in der restlichen Pflanze, unabhängig von dem Alter der gesamten Pflanze (Cambier et al., 2000). Sowohl in den oberirdischen Teilen als auch in den Wurzeln steigt die Benzoxazinoidkonzentration bis etwa zwei Tage nach der Keimung an und sinkt danach stark ab. Trotzdem werden die Komponenten bis etwa 10 Tage nach der Keimung weiter synthetisiert. Danach sinkt die Konzentration noch stärker ab, was durch Umwandlung, Freisetzung oder Abbau der Stoffe zu erklären ist (Cambier et al., 2000).

1.3 Biosynthese der Benzoxazinoide in Pflanzen

Neben Mais kommen Benzoxazinoide auch in Weizen (*Titicum aestivum*), Roggen (*Secale cereale*) und wilder Gerste (*Hordeum lechleri*) vor (Niemeyer, 2008). Auch in einigen Vertretern der Familien der Akanthusgewächse (*Acanthaceae*), Hahnenfußgewächse (*Ranunculaceae*), Braunwurzgewächse (*Scrophulariaceae*) und Lippenblütler (*Lamiaceae*) sind Benzoxazinoide nachgewiesen worden (Frey et al., 2009). Die Benzoxazinoidkonzentration in den Wildtyp-Pflanzen liegt bei allen Arten deutlich über der Benzoxazinoidkonzentation in den kultivierten Pflanzen (Niemeyer, 2008). Die für die Biosynthese der Benzoxazinoide benötigten Enzyme in Mais werden von Genen codiert, welche auf dem kurzen Arm des Mais-Chromosoms 4 *clustern* (Gierl und Frey, 2001). Auch in Weizen und Roggen sind ähnlich Gencluster vorhanden, jedoch ist das *Clustering* weniger eng im Vergleich zu Mais. Der Syntheseweg ist in allen Gräsern ähnlich, jedoch akkumulieren unterschiedliche Hauptkomponenten, welche zur Abwehr in der Vakuole gespeichert werden. In Roggen ist die Hauptkomponente 2,4-Dihydroxy-1,4-benzoxazin-3-on-glucosid (DIBOA-Glc), in Weizen und Mais das 7-Methoxy-Derivat DIMBOA-Glc. Aufgrund der ähnlichen Stoffwechselwege und Metabolite kann von einem gemeinsamen Ursprung der Benzoxazinoidbiosynthese in Monokotyledonen ausgegangen werden. Phylogenetische Analysen bestätigen einen monophyletischen Ursprung des Synthesewegs in Gräsern (Frey et al., 2009). Allerdings wurden in den übrigen Pflanzenfamilien mit Benzoxazinoiden keine homologen Gene entdeckt, wodurch ein polyphyletischer Ursprung für Ein- und Zweikeimblättrige Pflanzen anzunehmen ist.
Die Konzentration an Benzoxazinoiden kann durch verschiedene Umweltfaktoren wie Tempe-

ratur, die Verfügbarkeit von Wasser, der Lichtintensität und der eintreffenden UV-Strahlung beeinflusst werden. In Weizen wurden außerdem saisonale Unterschiede in der Benzoxazinoidkonzentration nachgewiesen (Niemeyer, 2008). Benzoxazinoide sind vor allem in den Wurzeln präsent, kommen aber, wenn auch in geringeren Konzentrationen, auch in allen oberirdischen Pflanzenteilen vor. Wie in Mais sinkt auch in den anderen Pflanzen die Konzentration an Benzoxazinoiden einige Tage nach der Keimung ab (Niemeyer, 2008).

1.4 Biosynthese der Benzoxazinoide in Mais

Indol-3-glyzerinphosphat (IGP), Ausgangsstoff des Tryptophanstoffwechsels, dient auch als Vorläufer für die Benzoxazinoidbiosynthese. Durch das Enzym BX1, welches funktionell identisch zu der Indol-3-glycerinphosphat Lyase (IGL) und der Tryptophansyntase α (TSA) ist, wird in den Chloroplasten aus IGP freies Indol gebildet (Gierl und Frey, 2001; Jonczyk et al., 2008). Dieses ist einerseits flüchtig und kann von der Pflanze als Duftstoff abgegeben oder andererseits weiter in Benzoxazinoide umgewandelt werden (Gierl und Frey, 2001).
Zur Bildung von DIMBOA-Glc müssen vier Sauerstoffatome in das Indol-Grundgerüst eingebracht werden. Für diese Reaktion sind vier ähnliche Enzyme verantwortlich, die BX2 bis BX5 genannt werden und zur Klasse der Cytochrom P450 abhängigen Monooxygenasen gehören (Gierl und Frey, 2001). Durch BX2 wird das Intermediärprodukt Indolin-2-on gebildet. Dieses wird in einem weiteren Schritt durch BX3 zu 3-Hydroxyindolin-2-on umgewandelt. BX4 katalysiert anschließend die Ringerweiterung und somit die Bildung von 2-Hydroxy-1,4-benzoxazin-3-on (HBOA). Die Hydroxylierung des Stickstoffs wird durch BX5 katalysiert. Dadurch entsteht 2,4-Dihydroxy-1,4-benzoxazin-3-on (DIBOA). Diese Enzyme weisen eine extrem hohe Substratspezifität auf und katalysieren ausschließlich die eben beschriebenen Schritte (Gierl und Frey, 2001).Die Cytochrom P450 Enzyme sind hauptsächlich in der äußeren Membran des endoplasmatischen Retikulums lokalisiert (Gierl und Frey, 2001; Glawischnig et al., 1999). Mit der Einführung der Sauerstoff-Atome wird die Polarität von DIBOA erhöht, wodurch dessen Transport von dem eher hydrophoben endoplasmatischen Retikulum in das hydrophilere Cytosol ermöglicht wird (Frey et al., 2003; Niemeyer, 2008). Dort wird DIBOA durch die UDP-Glycosyltransferase BX8 glycosyliert. Das entstandene DIBOA-Glc dient dann der 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenase BX6 als Substrat für eine Hydroxylierung an der C-7 Position. Daraus geht 2,4,7-Trihydroxy-1,4-benzoxazin-3-on-glucosid (TRIBOA-Glc) hervor. Durch eine Methylierung an der gleichen Position durch das Enzym BX7 entsteht DIMBOA-Glc (Jonczyk et al., 2008; Niemeyer, 2008), welches zur Speicherung in die Vakuole transportiert wird. Darüber hinaus existieren Benzoxazinoide mit weiteren funktionellen Gruppen wie beispielsweise HDMBOA-Glc (2-Hydroxy-4,7-dimethoxy-1,4-benzoxazin-3-on-glucosid), HDM_2BOA-Glc (2-Hydroxy-4,7,8-trimethoxy-1,4-benzoxazin-3-on-glucosid) oder DIM_2BOA-Glc (2,4-Dihydroxy-7,8-dimethoxy-1,4-benzoxazin-3-on-glucosid). Es wird angenommen, dass diese Stoffe aus DIMBOA-Glc hervorgehen. Unlängst wurde nachgewiesen, dass drei *O*-Methyltransferasen (BX10 a-c) DIMBOA-Glc zu HDMBOA-Glc methylieren (Abbildung 1.2 auf Seite 8)(Meihls et al., 2013). Die Enzyme, welche die Bildung der

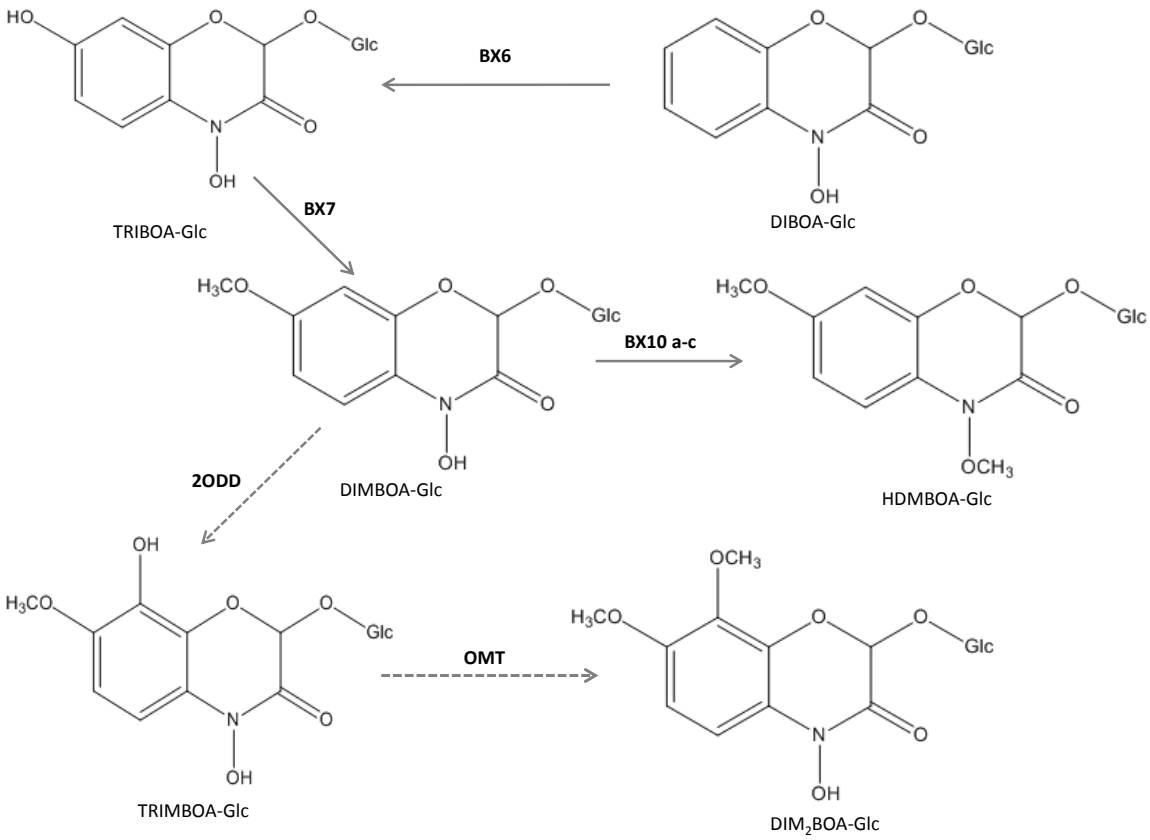


Abbildung 1.2: **Finaler Abschnitt des Synthesewegs der Benzoxazinoide mit den an den einzelnen Schritten beteiligten Enzymen ausgehend vom Intermediärprodukt DIBOA-Glc.** Dieses wird durch die Enzyme BX6 und BX7 zu DIMBOA-Glc umgewandelt. Die für die Bildung von DIM_2BOA-Glc verantwortliche 2-Oxoglutarat-abhängige Dioxygenase (2ODD) und *O*-Methyltransferase (OMT) sind bisher unbekannt

übrigen Benzoxazinoide katalysieren, sind bislang unbekannt.

1.5 Dioxygenasen und Methyltransferasen

Die in dieser Arbeit untersuchten Enzyme zählen zu den Klassen der Oxidoreduktasen (BX6 und BX11) und der Transferasen (BX12 und ZRP4). Die Enzymklasse der Oxidoreduktasen gliedert sich weiter in Unterklassen wie Dehydrogenasen, Oxidasen, Reduktasen oder Oxygenasen. Allen Unterklassen liegt der gleiche Reaktionsmechanismus zugrunde: sie katalysieren Oxidations- bzw. Reduktionsreaktionen indem sie Elektronen von einem Donator- auf ein Ak-

zeptormolekül übertragen (Christian et al., 2006; Berg et al., 2007). BX6 und BX11 gehören beide zur Unterklasse der Oxygenasen, genauer den 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen. Dies bedeutet, dass Oxoglutarat als Elektronendonator fungiert um den molekularen Sauerstoff auf das Substrat zu übertragen. Die Aktivität der Dioxygenasen ist abhängig von Eisen. Für die Katalyse ist Eisen mit der Oxidationsstufe II notwendig, welches im aktiven Zentrum der Enzyme gebunden wird. Erst wenn die Fe(II)-Ionen gebunden haben sind diese Dioxygenasen in der Lage enzymatische Reaktionen zu katalysieren.
Enzyme der Klasse der Transferasen übertragen funktionelle Gruppen wie Phosphat- oder Methylgruppen. BX12 und auch ZRP4 gehören zu den Alkyltransferasen, welche Methylgruppen von einem Donor auf das jeweilige Substrat überträgt (Christian et al., 2006; Berg et al., 2007). Der Donor ist S-Adenosylmethionin (SAM); der Akzeptor ein Sauerstoffmolekül.

1.6 Zielstellung

Die Benzoxazinoidbiosynthese in Mais ist weitgehend aufgeklärt. Das Hauptabwehrstoff genutzte Metabolit ist DIMBOA-Glc. Jedoch gibt es darüber hinaus weitere Benzoxazinoide von denen angenommen wird, dass sie eine Rolle bei der Pflanzenabwehr spielen. Gegenstand der Arbeit war es zu klären, welche Enzyme an der Bildung von DIM_2BOA-Glc beteiligt sind. Mögliche Kandidaten wären die *O*-Methyltransferasen BX12 und ZRP4. ZRP4 wurde bereits im Zusammenhang mit der Ligninbiosynthese gebracht, das Substrat konnte bis heute aber nicht identifiziert werden. Das Gen AC209819.3_FG005, welches für BX12 kodiert, wurde in genetischen Untersuchungen in Zusammenhang mit der DIM_2BOA-Glc Biosynthese gebracht. Während der Praxisphase sollten durch heterologe Genexpression in *Escherichia coli* die 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen BX6 und BX11 sowie die *O*-Methyltransferasen BX12 und ZRP4 heterolog exprimiert werden. Mittels Enzymaktivitätsassays sollen dann die Substratspezifität und Aktivität der jeweiligen Enzyme eindeutig geklärt werden.
Zusätzlich wurde eine verkürzte Variante des *Bx11*-Gens exprimiert und das entstandene Produkt auf Aktivität untersucht. Ebenfalls soll mit dieser Arbeit die TRIMBOA-Glc-Struktur verifiziert werden. Dazu sollte das Produkt aufgereinigt und dann mittels NMR-Spektroskopie untersucht werden. Die Verifizierung sollte zudem die Substratspezifität von BX11 bestätigen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterial

Die für diese Arbeit notwendigen Geräte und (Verbrauchs-)Materialien sind in den folgenden Tabellen nach den Einsatzgebieten geordnet aufgeführt.

Klonierung

Tabelle 2.1: Für die Klonierungsschritte genutzten Geräte nud Verbrauchsmaterialien

Geräte/Verbrauchsmaterial	Hersteller
Thermocycler peqStar 2x Gradient	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Thermocycler MWG Biotech Primus 96 Plus	Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg
Zentrifuge 5414R	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge 5810	Eppendorf AG, Hamburg

Heterologe Expression und Proteinreinigung

Tabelle 2.2: Auflistung aller für die heterologe Expression und Proteinreinigung genutzten Geräte und Verbrauchsmaterialien

Geräte/Verbrauchsmaterial	Hersteller
Inkubator Heraeus kelvitron t	Heraeus GmbH, Hanau
Hitzesterilisator function Line T6	Heraeus GmbH, Hanau
Homogenisator Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Inc., Bohemia, NY, USA
Photometer Septronic 20 Genesys	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA

SDS Gele Mini PROTEAN® TGX Gels 15 well comb 15 µl	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
SDS Gele Mini PROTEAN® TGX Gels 12 well comb 20 µl	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Ultraschallhomogenisator Sonopuls HD 2070 mit Mikrospitze MS72	Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin
Zentrifuge Aventis J 25	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Zentrifuge Avanti J-20 XP	Beckman Coulter GmbH, Krefeld

Chromatographie und (massen-)spektrometrische Analyse

Tabelle 2.3: Auflistung aller für Chromatographie und Massenspektrometrie sowie für die Probenvorbereitung genutzten Geräte und Verbrauchsmaterialien

Geräte/Verbrauchsmaterial	Hersteller
Chromatographiesäule XDB-C18 (4,6 x 50 mm, 1,8µm)	Agilent Technologies GmbH, Böblingen
Chromatographiesystem 1200 Infinity	Agilent Technologies GmbH, Böblingen
Chromatographiesystem 1290 Infinity	Agilent Technologies GmbH, Böblingen
Glasvials Short Thread 1,5 ml KGW-Flaschen	VWR International GmbH, Darmstadt
Konzentratorröhrchen Vivaspin 4	Sartorius GmbH, Göttingen
Massenspektrometer API 3000 LC/MS/MS System	AB SCIEX Germany GmbH, Darmstadt
Massenspektrometer API 5000 LC/MS/MS System	AB SCIEX Germany GmbH, Darmstadt
Spektrophotometer peqLab Nanodrop 2000c	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA

Herstellung von Lösungen und Puffer

Tabelle 2.4: Für die Herstellung von Puffern und Lösungen genutzten Geräte und Verbrauchsmaterialien

Geräte/Verbrauchsmaterial	Hersteller
pH-Meter pH526 Multical	WTW GmbH, Weilheim
Präzisionswaage BP 3109	Sartorius AG, Göttingen
Wasseraufbereitungsanlage Milli-Q Synthesis A10	Millipore Corporation, Billerica, MA, USA

2.1.2 Chemikalien

Tabelle 2.5: Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Ameisensäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ampicillin, 50 mg/ml Stammlösung	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
L(+)Ascorbinsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
BSA (Bovines Serum Albumin)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
DIMBOA-Glc, 0,5 mg/ml Stammlösung	gereinigt und bereitgestellt durch Gaetan Glauser, Biologische Fakultät, Universität Neuchâtel
dNTP Mix 10mM	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethanol, vergällt	Merck KGaA, Darmstadt
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethylacetat	VWR International GmbH, Darmstadt

GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Glycerin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Imidazol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) 1 M Stammlösung	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
2-Oxoglutarat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
PageRuler Prestaind Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Roti-Blue 5x Konzentrat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
SAM (S-Adenosylmethionin)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Salzsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
S.O.C. Medium	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

2.1.3 Synthetische Oligonukleotide/Primer

Die in der folgenden Tabelle aufgeführten Primer wurden sowohl für PCR, Kolonie-PCR als auch für Sequenzieransätze genutzt. Die verwendeten genspezifischen Primer wurden alle von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen) bezogen. Die vektorspezifischen T7-Primer (pET100) von Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA) wurden für die Sequenzierungsansätze genutzt.

Tabelle 2.6: Auflistung aller für diese Arbeit genutzten Primer mit Sequenz in 5'→3' Richtung

Name	Länge	Sequenz (5'→3')
Bx6 forward Primer Bx6synth.pET200_fwd	29	CACCATGGCGCCCACA ACGGCCACGAAAG
Bx6 reversed Primer Bx6synth.pET200_rev	29	TTACAGAVGAAAGTGG TCAAGGGCACGGC
Bx11 forward Primer AC148152.3_FG005.fwd	25	CACCATGGCTCCGACC GCCGCCAAG
Bx11 reversed Primer AC148152.3_FG005.rev	29	CTAGACGTGGTGTGCA GGAGCAGCAAGAC
Bx11 verkürzt forward Primer AC148152.3_FG005.alt	25	CACCATGGCCAGCATG CTCGCGGG
Bx11 verkürzt reversed Primer AC148152.3_FG005	29	CTAGACGTGGTGTGCA GGAGCAGCAAGAC
Bx12 forward Primer AC209819.3_pET100.fwd	22	CACCATGGCACTCGCC GGCATC
Bx12 reversed Primer AC209819.3_pET100.rev	29	TCACATTAGAGAAACT GGAATGCTTATGG
invitrogen T7 promotor Primer	20	TAATACGACTCACTAT AGGG
invitrogen T7 reverse Sequencing Primer	20	TAGTTATTGCTCAGCG GTGG

2.1.4 Vektoren

Alle zu exprimierenden Gene wurden mit dem Champion pET100 Directional TOPO Expression Kit (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) in den pET100 Vektor umkloniert.

2.1.5 Bakterienstämme

Die Genkonstrukte wurden in *Escherichia coli* NEB 10-beta High Efficiency Competent Cells (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main) und OneShot TOP10 Chemically Competent Cells (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) vermehrt. Zur heterologen Expression der Gene wurde der *E. coli*-Stamm BL21 (OneShot BL21 Star(DE3) Chemically Competent Cells, Invitrogen GmbH, Karlsruhe) genutzt, da dieser Stamm rekombinante Proteine vermehrt exprimieren kann ohne dass das Protein oder die Zellen beschädigt werden.

2.2 Methoden

Alle molekularbiologischen Arbeiten wurden auf Eis (0 °C) und mit doppelt destilliertem, autoklaviertem Wasser durchgeführt. Die transformierten Zellen wurden, wenn nicht anders beschrieben, bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Alle Zentrifugationsschritte liefen, soweit nicht anders beschrieben, bei 25 °C ab.

2.2.1 Gensynthese

Die Gensequenz für *Bx6* wurde durch Eurofins Genomics GmbH (Ebersberg) optimiert und synthetisiert (vollständige Sequenz siehe Anhang). Die cDNA für die 2-Oxoglutarat-abhängige Dioxygenase BX11 sowie die der *O*-Methyltransferase ZRP4 stammt aus der Maislinie P39 (vollständige Sequenz siehe Anhang).

2.2.2 Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Vermehrung der Genkonstrukte

Die PCR nutzt das Prinzip der Vermehrung von Template-DNA durch zyklische Temperaturänderungen, sodass schnell große Mengen DNA synthetisiert werden können. Jeder Zyklus gliedert sich in drei Schritte: die Denaturierung der Template-DNA, dem Annealing der Primer und der Elongation durch DNA-Polymerasen.
Für die PCR zur Vermehrung der Vektoren mit den inserierten Genen *Bx6* und *Bx12* wurde die Q5® High Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main) genutzt. Der Reaktionsansatz wurde nach Herstellerangaben hergestellt. Zur Initialisierung wurde die Temperatur für 30 Sekunden auf 98 °C erhöht. Es folgten 35 Zyklen, wobei die Annealingtemperatur 65 °C betrug. Abschließend wurde die Temperatur auf 72 °C eingestellt um alle begonnenen Elongationsereignisse zu beenden.

2.2.3 Präparative Agarosegelelektrophorese und Gelextraktion

Durch die Verwendung präparativer Agarosegele ist es möglich, Nukleinsäureströnge entsprechend ihrer Größe aufzutrennen und anschließend die gewünschten Fragmente aus dem Gel zu isolieren.
Für die präparative Agarosegelelektrophoerse wurden 1,5 %ige (w/v) Agarosegele verwendet. Die Elektrophoresedauer betrug 16 Minuten bei 135 Volt. Zur Aufreinigung der PCR-Produkte aus dem Agarosegel wurde das NucleoSpin Gel and PCR Clean up Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren) verwendet. Alle Schritte wurden wie in der beiligenden Anleitung beschrieben durchgeführt.

2.2.4 Ligation und Transformation des amplifizierten Gens mit dem Expressionsvektor

Für den Ligationsansatz wurde das pET100 Champion Kit verwendet. Der Ansatz wurde nach Anleitung hergestellt und für mindestens 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Transformation wurde die Hitzeschockmethode angewandt. Dazu wurde der Ligationsansatz mit tiefgefrorenen chemisch-kompetenten Zellen für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Durch kurzfristige Temperaturerhöhung auf 42 °C soll die Zellmembran destabilisiert werden, sodass die Zellen freie DNA aufnehmen können. Zur Regeneration der Zellen wird 100 µl S.O.C-Medium zugegeben und die Zellen für 1 Stunde inkubiert. Anschließend wurden die transformierten Zellen mit Glasperlen auf LB-Agar mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und für etwa 16 Stunden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

2.2.5 Überprüfung der Klonierung

Zur Überprüfung des Klonierungserfolgs wurden sowohl eine Kolonie-PCR als auch ein analytisches Gel genutzt. Die Kolonie-PCR dient zur Vermehrung des Expressionsvektors in den *E.coli* Zellen. Durch das analytische Gel können die mittels Kolonie-PCR vermehrten DNA-Fragment entsprechend ihrer Länge aufgetrennt werden. Durch den Vergleich mit Fragmenten bekannter Länge ist es möglich, Aussagen über den Klonierungserfolg zu treffen.
Für die Kolonie-PCR wurde die GoTaq® DNA Polymerase (Promega GmbH, Mannheim) verwendet. Der Reaktionsansatz wurde nach den Vorgaben des Herstellers erstellt und dann mit Zellmaterial ausgewählter Kolonien versetzt. Zur Initialisierung der PCR wurde die Temperatur für 10 Minuten auf 94 °C eingestellt. Anschließend erfolgten 35 Zyklen. Die Annealingtemperatur betrug 63 °C. Abschließend wurde die Temperatur für 5 Minuten bei 72 °C gehalten um alle Elongationsschritte zu beenden. Für das analytische Gel wurden die Reaktionsansätze für 16 Minuten bei 135 Volt aufgetrennt. Das Gel hatte einen Agaroseanteil von 1,5 % (w/v).

2.2.6 Plasmidpräparation

Zur Plasmidpräparation wurde das NucleoSpin Plasmid Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren) verwendet. Alle Schritte wurden genau nach der dem Kit beliegenden Anleitung durchgeführt. Die Plasmidpräparation wurde mit allen Kolonien durchgeführt, die im analytischen Gel für das entsprechende Gen positiv waren.

2.2.7 Kontrollverdau

Zur weiteren Absicherung wurden die Genkonstrukte für *Bx6* und *Bx12* zusätzlich mit dem Restriktionsenzym FastDigest *Sac*I (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) verdaut. Für dieses sind in dem Genkonstrukt zwei Schnittstellen vorhanden, eine im Gen und eine im Plasmid. Nur wenn das Plasmid das gewünschte Gen enthält kann das Restriktionsenzym zweimal schneiden und zwei Fragmente erzeugen. Ist das gewünschte Gen nicht im Plasmid

enthalten, dann schneidet das Enzym nur einmal und das Plasmid würde linearisiert werden. Als Template-DNA dienten die zuvor als positiv getesteten Plasmide aus der Plasmidpräparation. Der Reaktionsansatz wurde nach Herstellerangaben angesetzt. Der Ansatz wurde 1 Stunde inkubiert und die Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt. Es wurde ein 1,5 %iges (w/v) Agarosegel genutzt.

2.2.8 Sequenzierung der klonierten Dioxygenasen und *O*-Methyltransferasen aus Mais

Für die Sequenzierung wurde die Kettenabbruchmethode nach Sanger genutzt. Diese beruht auf dem Prinzip des Kettenabbruchs durch Inkorporation von Didesoxynukleotiden durch die DNA-Polymerase während *in vitro* DNA-Replikation.
Zur Sequenzierung wurde das BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) genutzt. Der Reaktionsansatz wurde nach Herstellerangaben erstellt. Die Sequenzierung erfolgte sowohl in 5'- als auch in 3'-Richtung.

2.2.9 Heterologe Expression der Dioxygenase- und *O*-Methyltransferasegene in *E. coli* BL21

Nach der Umklonierung der Gensequenzen in den Zielvektor und der Bestätigung, dass die gewünschte Sequenz sich im Zielvektor befindet wurde dieser mittels Hitzeschockmethode in den Expressionsstamm *E. coli* BL21 transformiert. Um Zellmasse zu gewinnen wurden Vorkulturen aller positiven Klone angesetzt und für etwa 16 Stunden bei 37 °C inkubiert. Für die Hauptkultur wurden 100 ml LB-Medium mit dem entsprechendem Antibiotikum in Erlenmeyerkolben überführt und mit der Vorkultur beimpft. Nach Erreichen einer optischen Dichte (OD_{600}) zwischen 0,5 und 0,7 wurde die Expression mit 100 µl IPTG 1 M induziert und die Temperatur auf 18 °C reduziert. Die Expression erfolgte über Nacht.

2.2.10 Zellaufschluss

Für den Zellaufschluss wurden die Expressionskulturen in Zentrifugenbecher überführt und für 10 Minuten bei 16000×g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 4 ml Proteinextraktionspuffer gelöst (Endkonzentrationen: 50mM Tris/HCl pH7, 500 mM NaCl, 10 % (v/v) Glycerin, 20 mM Imidazol, 50 mM β-Mercaptoethanol). Die Suspension wurde dann in 15 ml Kulturröhrchen überführt und mittels Ultraschall aufgeschlossen. Der Aufschluss erfolgte für 30 Sekunden mit kurzen Abkühlintervallen. Insgesamt wurde der Vorgang viermal wiederholt. Die homogeniesierten Zellen wurden dann auf 2 ml Reaktionsgefäße aliquotiert und für 30 Minuten bei 4 °C und 16100×g zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand mit der Proteinfraktion in frische 2 ml Reaktionsgefäße überführt.

2.2.11 Proteinreinigung

Die Reinigung der Expressionsprodukte erfolgte mit dem Ni-NTA Spin Column Purification Kit (Quiagen GmbH, Hilden). Dieses auf Affinitätschromatographie beruhende Prinzip macht sich die Tatsache zu nutze, dass die heterologen Proteine am C-terminalen Ende einen 6×His-Tag tragen.
Die Säulenmatrix besteht aus Ni-NTA-Komplexen, welche eine starke Affinität zu Histidin zeigen, wodurch die getaggten Proteine bevorzugt an die Säulenmatrix binden. Die Säulen wurden zunächst mit Lysepuffer (Endkonzentrationen: 50 mM Tris/HCl pH7, 500 mM NaCl, 20mM Imidazol, 1% (v/v) Tween 20, 10 % (v/v) Glycerin, 5 mM β-Mercaptoethanol) equillibriert. Anschließend wurde die Probe mit den getaggten Proteinen aufgetragen. Diese binden an die Säule. Durch das Spülen der Säule mit dem Waschpuffer (Endkonzentration: 50 mM Tris/HCl pH 7, 500 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 10 % (v/v) Glycerin, 5 mM β-Mercaptoethanol) sollten alle unerwünschten Fraktionen abgetrennt werden. Zur Elution der Proteine wurde ein Elutionspuffer (Endkonzentration: 50 mM Tris/HCl pH 7, 500 mM NaCl, 250 mM Imidazol, 10 % (v/v) Glycerin, 5 mM β-Mercaptoethanol) genutzt welcher hohe Konzentrationen an Imidazol enthält. Dieses verdrängt die Proteine von der Säulenmatrix, wodurch sie ausgewaschen wurden. Entgegen den Herstellerempfehlungen wurden die Zentrifugationsgeschwindigkeiten leicht von 890×g und 290×g auf 900×g und 300×g angehoben.

2.2.12 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die heterologe Expression wurde mit Hilfe der SDS-PAGE überprüft. Dafür wurden die aufgereinigten Proteine mit Ladepuffer versetzt und für 5 Minuten bei 95 °C im Thermo-Schüttler inkubiert. Anschließend wurden 15 µl Probe auf das Gel aufgetragen und für 35 Minuten bei 150 Volt elektrophoretisch aufgetrennt. Für die weitere Untersuchung wurden die Gele etwa 24 Stunden in Färbelösung gefärbt und dann in Entfärbelösung entfärbt. Zur Aufbewahrung wurden die Gele mit Glycerinlösung behandelt und in Cellophanfolie verpackt.

2.2.13 Enzymassays

Alle Assays wurden in Glasvials angesetzt. Die Ansätze wurden etwa 16 Stunden bei 25 °C und 300 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Reaktionen mit 5 µl 99%iger Ameisensäure abgestoppt. Der Ansatz wurde für 5 Minuten bei 4000 rpm zentrifugiert und anschließend der Überstand für weitere Untersuchungen in Glasinserts überführt. Der Dioxygenasepuffer (2ODD-Puffer) hatte folgende Zusammensetzung (Endkonzentration in Lösung): 100 mM Tris/HCl pH 7, 5 mM β-Mercaptoethanol, 5 mM 2-Oxoglutarat, 1 mM Ascorbat, 0,5 mM Fe(II). Für die Synthese von TRIMBOA-Glc wurde ein Phosphatpuffer (Endkonzentrationen: 50 mM NaH_2PO_4 pH 7, 10 % (v/v) Glycerin, 5 mM 2-Oxoglutarat, 1 mM Ascorbat, 0,5 mM Fe(II), 5 mM β-Mercaptoethanol) genutzt.

Dioxygenaseassay

Mit Hilfe des Dioxygenaseassays sollte die Substratspezifität der 2-Oxoglutarat abhängigen Dioxygenase BX6 untersucht werden. Diese Enzyme benötigen 2-Oxoglutarat als Cofaktor, andernfalls wären sie nicht enzymatisch aktiv. Sie nutzen molekularen Sauerstoff um Oxidationsreaktionen zu katalysieren. Für den Assay wurden pro Ansatz 46 µl 2ODD Puffer, 2 µl BSA 0,5 g/ml, 10 µl DIMBOA-Glc 0,5 mg/ml, 10 µl aqua bidest. und je 40 µl BX11 oder BX6 in Glasvials überführt und wie oben beschrieben weiterbehandelt.

Aktivitätsassay mit verkürztem BX11

Der Aktiviätsassay für die verkürzte Variante von BX11 wurde durchgefürt, um die enzymatische Inaktivität dieser Variante zu zeigen. Für den Assay wurden 46 µl 2ODD Puffer, 2 µl BSA 0,5 g/ml, 2 µl DIMBOA-Glc 0,5 mg/ml, 10 µl aqua bidest. und 40 µl des verkürzten Enzyms in ein Glasvial gegeben und wie oben beschrieben inkubiert.

Aktivitätsassay BX12 und ZRP4

Dieser Assay sollte zeigen, welche Enzyme an der Bildung von DIM_2BOA-Glc beteiligt sind. Dabei wurden die Hydroxylierung und Methylierung in einem Ansatz durchgeführt. Für die Hydroxylierungsreaktion wurden 46 µl 2ODD Puffer, 2 µl BSA 0,5 g/ml, 2 µl DIMBOA-Glc 0,5 mg/ml, 10 µl aqua bidest. und 40 µl BX11 in Glasvials gegeben. Der Ansatz wurde wie oben beschrieben inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurde statt Ameisensäure EDTA 10 mM verwendet. Anschließend wurde der Ansatz für 10 Minuten schüttelnd bei 300 rpm inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurde die Methylierungsreaktion gestartet. Dazu wurden je 40 µl Rohextrakt von BX12 und ZRP4 zu je drei Ansätzen zugegeben. Die Ansätze wurden dann wie zu Beginn beschrieben weiterbehandelt.

TRIMBOA-Glc Synthese

Für die Strukturanalyse von TRIMBOA-Glc durch NMR-Spektroskopie muss dieses zunächst aus DIMBOA-Glc synthetisiert werde. Dafür wurden pro Ansatz 46 µl $P0_4$-Assay-Puffer, 5 µl BSA 100 mg/ml, 2 µl DIMBOA-Glc 0,5 mg/ml und 40 µl BX11 in Glasvials gegeben und für etwa 16 Stunden bei 25 °C und 300 rpm inkuiert.

2.2.14 Chromatographie

Die Chromatographie ist eine Methode zur Trennung von Stoffgemischen. Das Trennprinzip beruht auf den unterschiedlich starken Wechselwirkungen der Einzelkomponenten mit mobiler und stationärer Phase. Sie dient dazu die in der Probe enthaltenen Substanzen aufzutrennen sodass diese dann durch den Einsatz der Massenspektrometrie identifiziert werden können. Die Proben wurden über eine XDB-C18 Säule (4,6 x 50 mm, Partikelgröße 1,8 µm) aufgetrennt. Als Elutionsmittel diente ein Methanol-Wasser-Gemisch. Das Wasser war mit 0,05 % Ameisensäure

(v/v) versetzt. Das Injektionsvolumen betrug 5 µl. Die zur Elution genutzte Methode wies einen nichtlinearen Gradienten auf.
Der Anteil des Lösungsmittels B (Methanol) wurde hierfür nach einminütiger Equilibrierung von 10 % auf 21 % erhöht. Anschließend wurde Lösungsmittel B anteilig nach 9, 1 und weiteren 2 Minuten von 21 % auf 24, 50 und letzendlich 100 % erhöht. Nach 13,02 Minuten wurden die Ausgangsbedingungen wiederhergestellt (90 % Lösungsmittel A, 10 % Lösungsmittel B). Die Flussrate betrug 0,8 ml/min und die Säulentemperatur 25 °C. Diese Trennmethode war an MRM-Experimente (negativer Modus) gekoppelt.

2.2.15 Triple Quadrupol-Experimente

Mit Hilfe von Ionenfallenexperimenten können durch das Anlegen von elektrischen und magnetischen Feldern gezielt bestimmte Ionen selektiert werden. Ionenfallenexperimente wurden mit einem LC/MS/MS System durchgeführt (Tandem-Massenspektrometer), welches mit einer ESI-Quelle ausgestattet war. Die Messungen erfolgten im negativen Modus. Geräteeinstellungen und die Prozessüberwachung wurden mittels der Firmensoftware Analyst 1.5 ® (AB SCIEX Germany GmbH, Darmstadt) vorgenommen. Für den negativen Modus betrugen die Quelleneinstellugen 25 psi Blendengasdruck, -4500 Volt Ionensprayspannung, 5 psi Sprühgasdruck und 500 °C Quellentemperatur.
MRM (multiple reaction monitoring)-scans sind eine massenspektrometrische Methode zur Analyse kleiner Moleküle, welche mit Triple-Quadrupol-Massenspektrometern durchgeführt werden kann. Dafür müssen die Massen der Ausgangsionen sowie die der möglichen Fragmente bekannt sein. Dann können anhand dieser Informationen mögliche Übergänge erstellt werden. Durch die doppelte Selektion der Ionen im ersten und dritten Quadrupol können die Proben deutlich genauer untersucht werden. Die für die Analyse der Enzymassays verwendeten Übergänge und Geräteeinstellungen sind in der folgenden Tabelle aufgelistet:

Tabelle 2.7: **Auflistung der für die MRM-Scans genutzten Übergänge und Geräteeinstelllungen** für Detektionsspannung (DP), Eintrittsspannung (EP), Kollisionsspannung(CE) und Austrittsspannung (CXP)

Substanz	Retentionszeit [min]	Übergang (Q1 / Q3)	DP [V]	EP [V]	CE [V]	CXP [V]
DIMBOA-Glc	9,05	418/372	-22	-4	-18	-5
TRIMBOA-Glc	4,11	434/388	-22	-4	-18	-5
TRIMBOA-Glc II	4,12	388/208	-30	-4	-20	-3
DIM_2BOA-Glc	8,85	448/402	-22	-4	-18	-5
DIM_2BOA-Glc II	8,82	402/194	-22	-4	-18	-5

2.2.16 TRIMBOA-Glc Präparation für NMR-Analyse

Um das aus dem Assay gewonnene TRIMBOA-Glc mittels NMR untersuchen zu können musste dieses zunächst aufgereinigt werden. Dazu wurden je 20 Assayansätze in einem Reagenzglas vereint. Die Lösung wurde mit Ethylacetat überschichtet, gemischt und nachdem die Phasen sich wieder vollständig getrennt hatten wurde die organische Phase mittels Pasteurpipette abgenommen und in frische Reagenzgläser überführt. Dieser Vorgang wurde mehrmals wiederholt und die vereinigte organische Phase getrocknet. Für die weitere Analyse wurden die Proben in die NMR-Abteilung gegeben und von Dr. Bernd Schneider untersucht.

3 Ergebnisse

3.1 2-Oxoglutarat-abhängige Dioxygenasen BX6 und BX11

3.1.1 Klonierung

Das Gen für die 2-Oxoglutarat-abhängige Dioxygenase BX6 wurde durch Gensynthese erhalten. Für die Expression von *Bx6* musste dieses zunächst in den Zielvektor pET100 übertragen werden. Die Gene für die 2-Oxoglutarat-abhängige Dioxygenase BX11 sowie dessen verkürzte Variante wurde vom Betreuer mittels cDNA-Synthese aus der Maislinie P39 amplifiziert und waren bereits erfolgreich in den Zielvektor pET100 kloniert. Dieser Vektor trägt ein Ampicillin-Resistenz-Gen, wodurch später die Selektion der positiven Klone möglich ist.

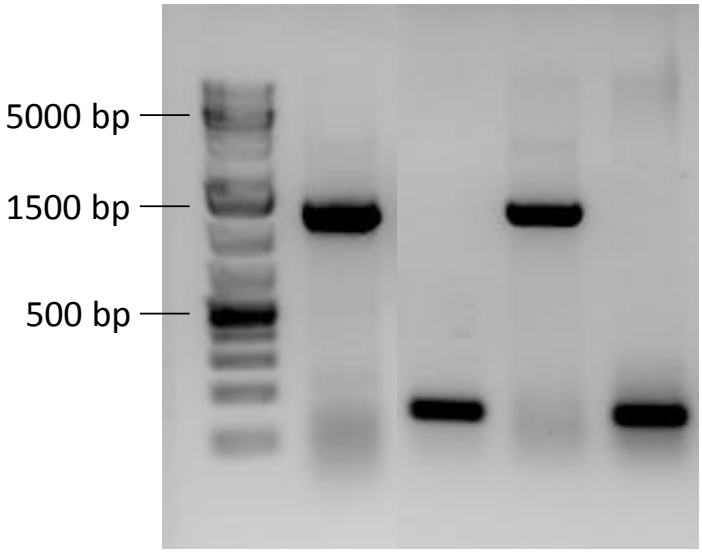


Abbildung 3.1: **Gelelektrophoretische Analyse der Kolonie-PCR Produkte für *Bx6*.** Zwei der vier Proben die Banden im gewünschten Bereich von etwa 1400 bp.

Zur Überprüfung des Klonierungserfolgs der Gene für *Bx6*, *Bx11* und des verkürzten *Bx11* wurden Kolonien gepickt, in PCR Puffer resuspendiert und eine PCR mit vektorspezifischen Primern durchgeführt. Das Kolonie-PCR Produkt wurde auf ein Agarosegel aufgetragen und

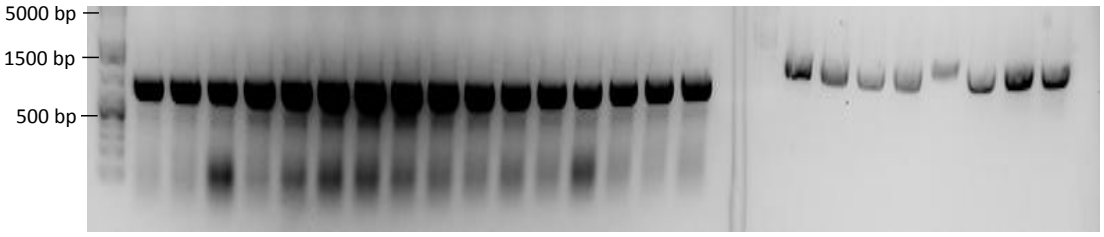


Abbildung 3.2: **Auftrennung des Kolonie-PCR Produkts für das verkürzte *Bx11*.** Alle Proben zeigten Banden im Berich von 1100 bp. Dies entspricht ungefähr der Genlänge des verkürzten *Bx11*-Gens mit etwa 800 bp und den flankierenden Primersequenzen des Vektors von etwa 300 bp.

elektrophoretisch getrennt. Zwei von vier Proben zeigten ausgeprägte Banden im Bereich von etwa 1400 bp (Abbildung 3.1 auf Seite 22). Dies stimmte mit der erwarteten Länge für die optimierte Gensequenz von *Bx6* und den flankierenden Vektorsequenzen überein. Somit kann davon ausgegangen werden, dass bei diesen Proben die Umklonierung des Gens in den Zielvektor erfolgreich war. Die anderen zwei Proben zeigten Banden im Bereich von etwa 100 bp. Diese entstanden durch Primer-Dimere und sind für die weitere Auswertung irrelevant. Das verkürzte *Bx11* Gen hat eine Länge etwa 800 bp. Im Agarosegel waren bei allen 24 Proben teils sehr stark ausgeprägte Banden bei etwa 1100 bp sichtbar (Abbildung 3.2 auf Seite 23). Dies entspricht der Genlänge mit den flankierenden Primersequenzen des Vektors und spricht für eine erfolgreiche Umklonierung des verkürzten *Bx11* Gens in den Zielvektor pET100.

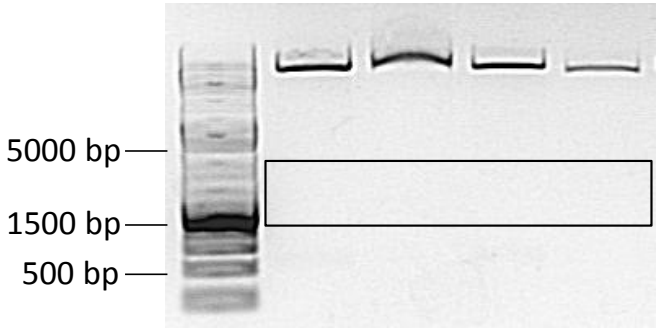


Abbildung 3.3: **Auftrennung der durch den Kontrollverdau mit dem Restriktionsenzym *Sac*I entstandenen Fragment des Genkonstruktes für *Bx6*.** Alle Proben zeigen eine deutlich Bande die dem gesamten Konstrukt entspricht. Die Markierung zeigt den Bereich, in dem das zweite Fragment zu erwarten ist. Die positiven Proben wurden für die Transformation in den Expressionsstamm BL21 genutzt.

Zusätzlich wurde für das *Bx6*-Genkonstrukt ein Kontrollverdau mit dem Restriktionsenzym *Sac*I durchgeführt. Für den Fall der erfolgreichen Umklonierung sollten nach dem Verdau mit

*Sac*I zwei Fragmente entstanden sein, da eine Schnittstelle im Vektor und eine im inserierten Gen vorliegt. Sollte die Umklonierung nicht erfolgreich gewesen sein, würde lediglich ein Fragment entstehen.
Abbildung 3.3 auf Seite 23 zeigt das Gelbild der verdauten Genkonstrukte von *Bx6*. Alle vier Proben zeigten eine Bande im Bereich der Ladetasche. Zwei der vier Proben zeigten außerdem eine zweite Bande bei etwa 5000 bp, was für den Klonierungserfolg spricht.
Die zur Überprüfung der klonierten Gensequenz durchgeführten Sequenzierungen waren für alle Proben erfolgreich (Daten nicht gezeigt).

3.1.2 Heterologe Expression

Für die heterologe Expression wurden diejenigen Kolonien ausgewählt, die bei den oben genannten Überprüfungsschritten positive Ergebnisse zeigten. Die Enzyme BX6, BX11 und das verkürzte BX11 wurden mit einem C-terminalen His-Tag exprimiert. Zur Überprüfung der Expression wurde mit dem, mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie gereinigten Enzym, eine SDS-PAGE durchgeführt.

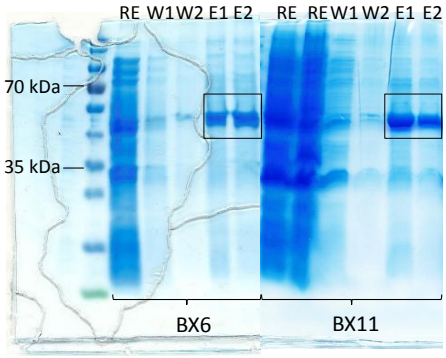


Abbildung 3.4: **Auftrennung der gereinigten 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen BX6 und BX11 durch SDS-PAGE.** Die erste Tasche neben den Marker enthält jeweils die Proben des Enzym-Rohextraktes (RE). Anschließend folgen zwei Proben der Wasch- und Reinigungsschritte (W1 und W2). Die jeweils letzten Fraktionen stammen von dem aufgereinigten Enzym (E1 und E2). Die Markierung zeigt die Überexpressionsbanden für die gereinigten Enzyme BX6 und BX11.

Neben den gereinigten Enzymen wurden auch Proben der einzelnen Wasch- und Reinigungsschritte gesammelt und mittels SDS-PAGE überprüft. Für BX6 konnten in der Fraktion mit gereinigtem Enzym deutliche Banden bei etwa 40 kDa ausgemacht werden (Abbildung 3.4 auf Seite 24). Diese sprechen aufgrund der Übereinstimmung mit dem Molekülgewicht von BX6 (etwa 41 kDa) für eine erfolgreiche Expression des Gens. Auch das Gen für BX11 konnte erfolgreich exprimiert werden. Die Probe zeigte deutliche Banden bei etwa 40 kDa (Abbildung 3.4 auf Seite 24), was mit dem Molekülgewicht für BX11 von etwa 42 kDa übereinstimmt.

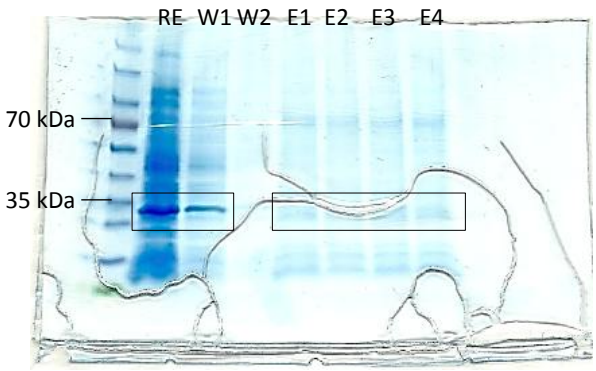


Abbildung 3.5: **Auftrennung des gereinigten verkürzten BX11 Enzyms durch SDS-PAGE.** Die erste Tasche neben dem Marker enthält jeweils die Proben des Enzym-Rohextraktes (RE). Anschließend folgen zwei Proben der Wasch- und Reinigungsschritte (W1 und W2). Die letzten vier Fraktionen stammen von dem aufgereinigten Enzym (E1 bis E4). Die Markierungen zeigen die Überexpressionsbanden für das verkürzte Enzym BX11 sowohl in der gereinigten Enzymfraktion als auch in dem Rohextrakt.

Abbildung 3.5 auf Seite 25 zeigt das Gelbild der mittels SDS-PAGE aufgetrennnten Proben des verkürzten BX11 Enzyms. In den vier Proben mit aufgereinigtem Enzym sind schwache Banden bei etwa 70 kDa und 35 kDa zu erkennen. Die Molekülmasse des verkürzen BX11 Enzyms beträgt etwa 38 kDA, weshalb die untere Bande im Gel wohl vom heterologen Protein stammt. Außerdem sind in der ersten Waschfraktion sowie dem Rohextrakt deutliche Überexpressionsbanden bei etwa 35 kDa zu erkennen, welche dem verkürzten BX11 Enzym zugeordnet werden können. Somit kann für die Enzyme BX6, BX11 und dem verkürzten BX11 von einer erfolgreichen Genexpression ausgegangen werden.

3.1.3 Optimierung der Assaybedingungen

Für das Enzym BX11 konnte bereits vom Betreuer eine Enzymaktivität mit dem Substrat DIMBOA-Glc nachgewiesen werden.

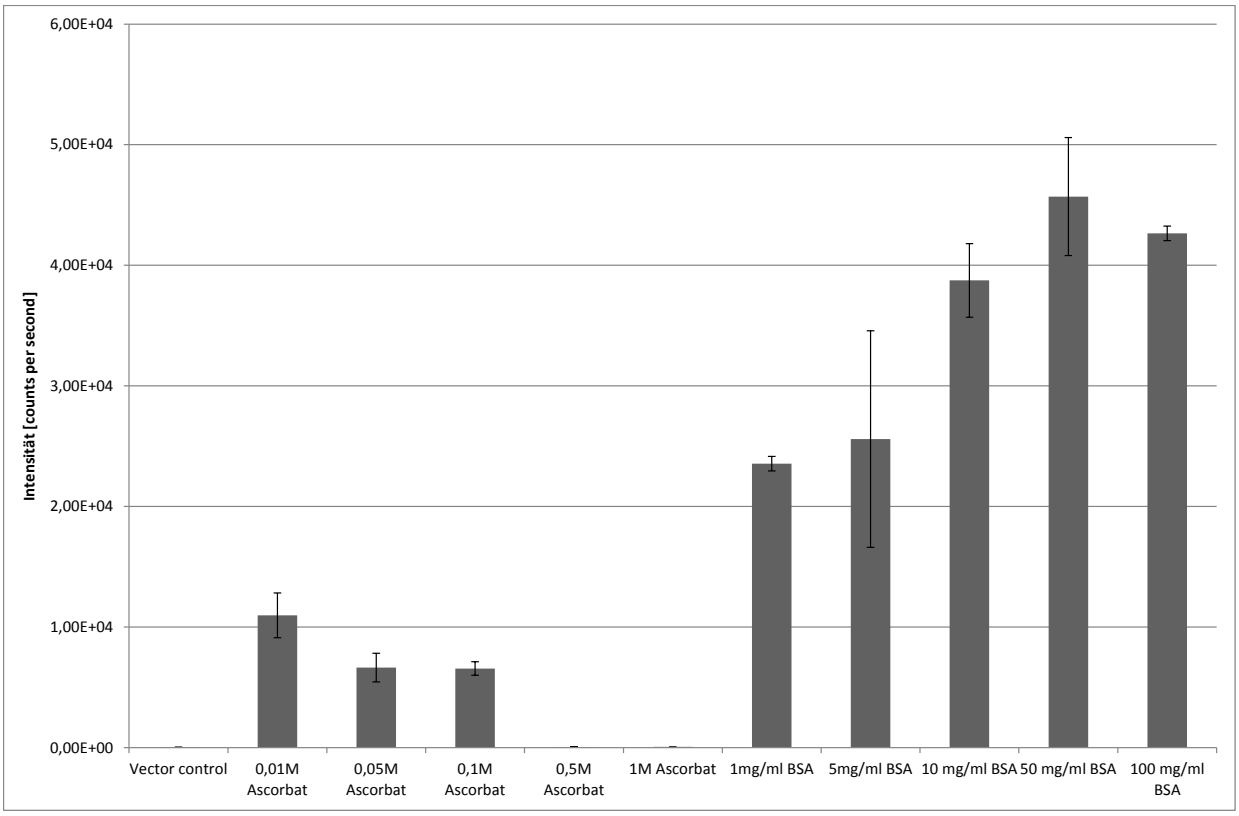


Abbildung 3.6: **Bildung von TRIMBOA-Glc durch BX11 unter Zugabe von verschiedenen Konzentrationen von BSA und Ascorbat.** Um die Enzyme zu stabilisiern und deren Aktvität zu steigern, wurden verschiedene Konzentrationen an BSA (1 mg/ml - 100 mg/ml) und Ascorbat (0,01 M- 1 M) zugegeben. Als Substrat diente DIMBOA-Glc, welches von den Enzym BX11 zu TRIMBOA-Glc umgesetzt wird. Die Identifizierung von TRIMBOA-Glc erfolgte über LC/MS/MS. Pro Konzentration wurden vier Ansätze gemessen und die Mittelwerte in counts per second (cps) angegeben. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardfehlern.

Um den Einfluss stabilisierender Substanzen auf die Dioxygenaseaktivität zu untersuchen wurden im Rahmen dieser Arbeit Assays mit verschiedenen Konzentrationen an BSA und Ascorbat durchgeführt. Diese dienten zur Optimierung der Bedingungen der nachfolgenden Assays. Als Substrat wurde DIMBOA-Glc eingesetzt, welches von BX11 zu TRIMBOA-Glc umgesetzt werden kann. Je Konzentration wurden vier Assays angesetzt. Die Stammlösung BSA hatte eine Konzentration von 100 mg/ml. Zur Herstellung der unterschiedlich konzentrierten Zusätze wurde das folgende Verdünungsschema genutzt:

$$100\ \text{mg/ml} \xrightarrow{1:2} 50\ \text{mg/ml} \xrightarrow{1:5} 10\ \text{mg/ml} \xrightarrow{1:2} 5\ \text{mg/ml} \xrightarrow{1:5} 1\text{mg/ml}$$

Für Ascorbat wurde das gleiche Schema genutzt, die Ausgangskonzentration war hier 1 M. Abbildung 3.6 auf Seite 26 zeigt das Ergebnis der Assaymessungen. Sowohl BSA als auch Ascorbat zeigten einen Einfluss auf die Menge an gebildetem TRIMBOA-Glc. Mit zunehmender BSA Konzentration stieg die Menge an gebildetem TRIMBOA-Glc. Für einige Proben sind jedoch starke Messwertschwankungen zu erkennen.
Auch geringe Ascorbat-Konzentrationen erhöhten die Ausbeute von TRIMBOA-Glc, jedoch kann die Ausbeute nicht auf das gleiche Niveau gebracht werden wie es durch Zugabe von BSA möglich ist.

3.1.4 Substratspezifität der 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen BX6 und BX11

BX6 katalysiert im Benzoxazinoidstoffwechsel die Umsetzung von TRIBOA-Glc zu DIMBOA-Glc, welches durch BX11 mittels Hydroxylierung an der C-8 Position in TRIMBOA-Glc umgewandelt wird. Nun sollte getestet werden, ob BX6 auch in der Lage ist DIMBOA-Glc in TRIMBOA-Glc umzuwandeln und damit DIMBOA-Glc als Substrat zu nutzen. Sowohl für BX6 als auch für BX11 wurden drei Ansätze mit je vier Proben erstellt. Neben den Enzymrohextrakten wurden auch die gereinigten Enzyme genutzt. Außerdem wurden in einem Probenset Imidazol zugesetzt um dessen Wirkung auf die Enzymaktivität zu untersuchen.
Wie erwartet zeigten die Chromatogramme der BX11 Assays einen deutlichen Peak bei 9 Minuten, welcher dem Substrat DIMBOA-Glc zugeordnet werden kann, und einen kleineren Peak bei etwa 4 Minuten der eindeutig zu TRIMBOA-Glc gehört Abbildung 3.7 auf Seite 28. Die Kontrollprobe zeigt erwartungsgemäß nur den DIMBOA-Glc-Peak bei 9 Minuten; ein Peak für TRIMBOA-Glc wurde nicht detektiert. Auch in den Chromatogrammen der BX6 Assays konnte kein Peak für TRIMBOA-Glc festgestellt werden Abbildung 3.7 auf Seite 28.

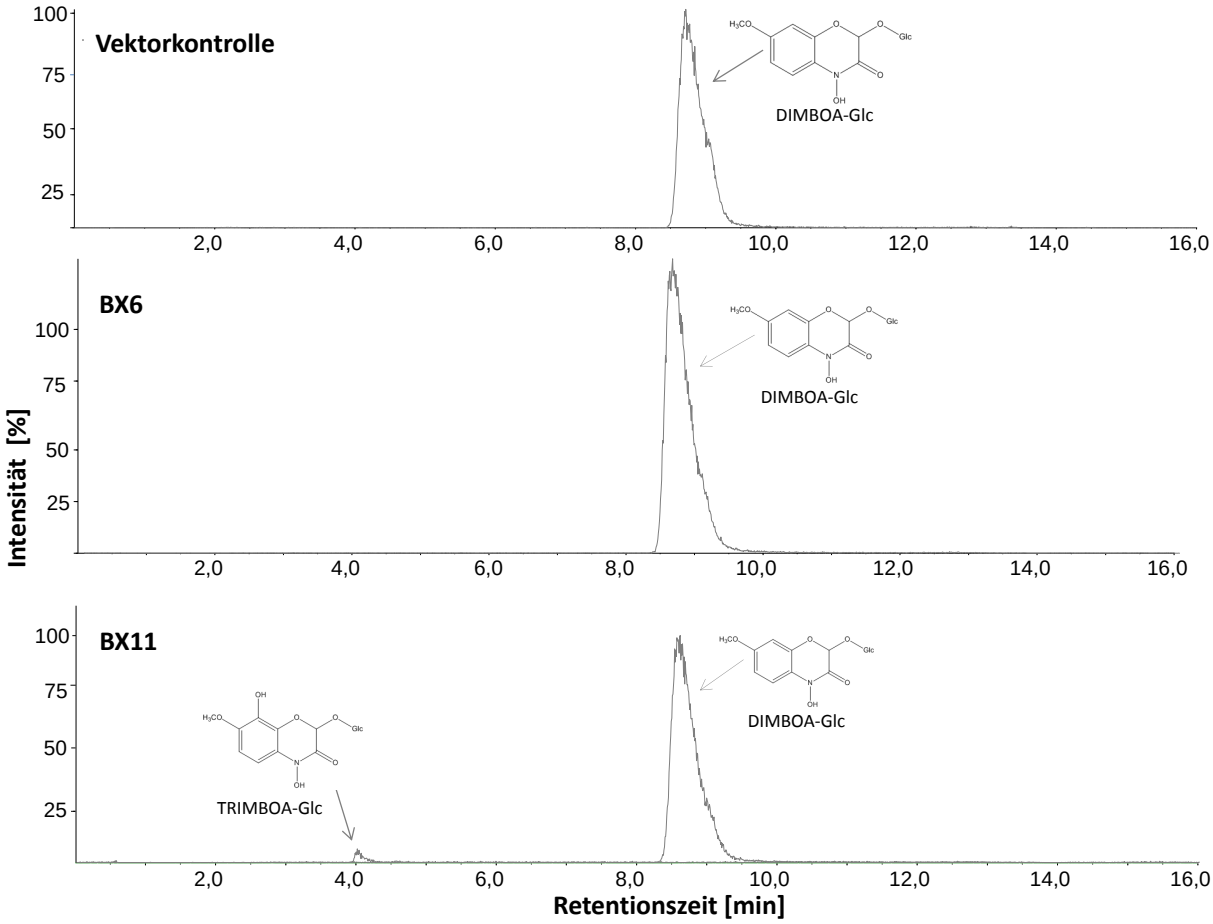


Abbildung 3.7: **Produkte der Dioxygenaseassays.** Die Produkte der Assays wurden mit LC/MS/MS analysiert und identifiziert.Sowohl in der Kontrolle als auch in den Assayproben für BX6 konnte lediglich das Substrat DIMBOA-Glc identifiziert werden. In dem Assay mit BX11 konnte zusätzlich TRIMBOA-Glc nachgewiesen werden.

3.1.5 Aktivitätsbestimmung der verkürzten BX11-Variante

Mit der Maislinie OH43 ist eine Linie bekannt, welche nicht in der Lage ist DIM_2BOA-Glc zu produzieren. Eine mögliche Ursache für dieses Phänomen könnte eine mutierte Variante des BX11 Enzyms sein. Zur Aktivitätsbestimmung des verkürzten BX11 Enzyms wurden Enzymassays durchgeführt. Das Enzym wurde einmal als Rohextrakt und einmal als aufgereinigtes Enzym getestet. Abermals wurde der Einfluss von Imidazol auf die Enzymaktivität untersucht. Als Substrat diente DIMBOA-Glc. Es wurden jeweils vier Assays angesetzt.
In der Kontrollprobe zeigte sich lediglich bei etwa 9 Minuten der Substratpeak für DIMBOA-Glc Abbildung 3.8 auf Seite 29. In den Chromatogrammmen aller Assayansätze mit dem verkürzten BX11 wurde ebenfalls nur das Signal für das Substrat detektiert Abbildung 3.8 auf Seite 29.

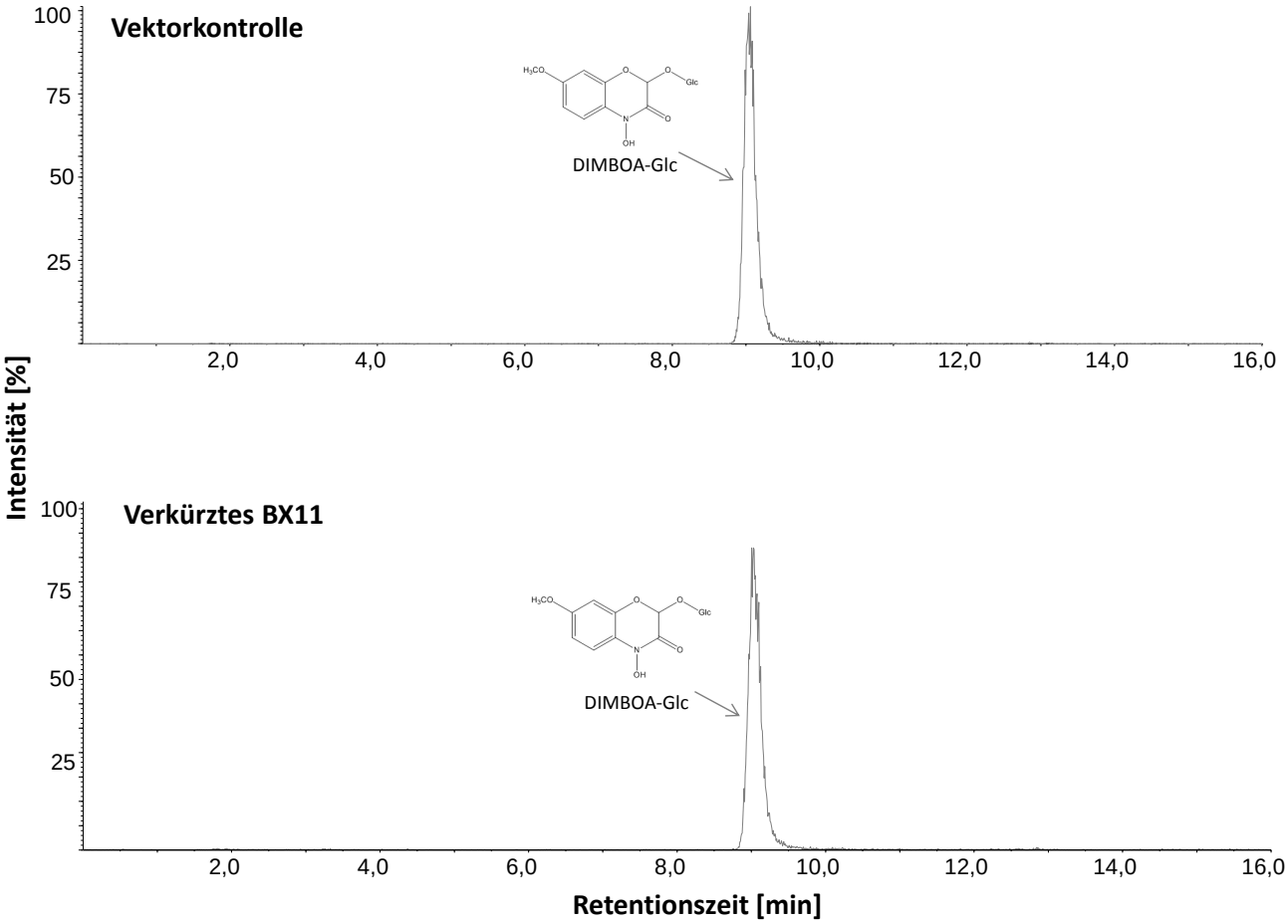


Abbildung 3.8: **Chromatogramme der Aktivitätsassays für das verkürzte BX11 Enzym.** Die Proben wurden mittels LC/MS/MS analysiert und die Komponenten identifiziert. Sowohl in Kontrolle als auch in den Proben mit verkürzten BX11 konnte lediglich ein DIMBOA-Glc Peak bei einer Retentionszeit von etwa 9 Minuten identifiziert werden. TRIMBOA-Glc konnte nicht nachgewiesen werden.

Imidazol hatte keinen Einfluss auf die Enzymaktivität (Daten nicht gezeigt).

3.2 *O*-Methyltransferasen

3.2.1 Klonierung

Zur Aufklärung der finalen Schritte der Benzoxazinoidbiosynthese sollten die Gene *Bx12* und *Zrp4* heterolog exprimiert werden. Die Enzyme BX12 und ZRP4 stehen im Verdacht das In-

termediat TRIMBOA-Glc zu DIM_2BOA-Glc umzusetzen zu können.

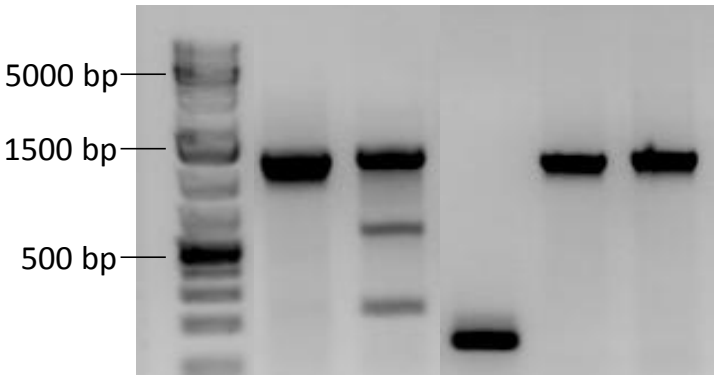


Abbildung 3.9: **Gelelektrophoretische Analyse der Kolonie-PCR Produkte für *Bx12*.** Vier der fünf Proben zeigen Banden im Bereich von etwa 1400 bp. Dies entspricht der Länge des Gens für *Bx12* und den flankierenden Primersequenzen.

Die Gene für *Bx12* und *Zrp4* wurden bereits vom Betreuer in den Expressionsvektor pET100 umkloniert und *Zrp4* in den Expressionsstamm BL21 inseriert. Zur Kontrolle der Konstrukte sollte im Rahmen dieser Arbeit für *Bx12* eine Kontroll-PCR durchgeführt werden. Von insgesamt sechs *Bx12* Proben zeigten vier im Agarosegel Banden bei etwa 1400 bp (Abbildung 3.9 auf Seite 30). Unter Beachtung der flankierenden Vektorsequenzen von etwa 300 bp stimmt dies mit den erwarteten Längen von 1095 bp für *Bx12* überein. Der Kontrollverdau für *Bx12* mit dem Enzym *Sac*I ergab für drei Proben das vorausgesagte Muster (Abbildung 3.10 auf Seite 30). Die zusätzlich durchgeführten Sequenzierungen konnten den Klonierungserfolg bestätigen (Daten nicht gezeigt).

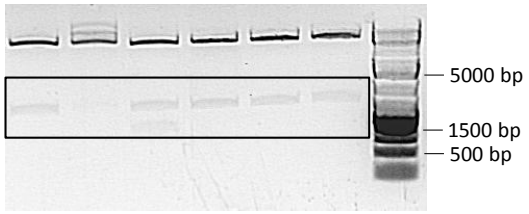


Abbildung 3.10: **Auftrennung der durch den Kontrollverdau mit dem Restriktionsenzym *Sac*I entstandenen Fragment des Genkonstruktes für *Bx12*.** Alle Proben zeigen eine deutlich Bande die dem gesamten Konstrukt entspricht. Die Markierung zeigt den Bereich in dem das durch den Verdau mit *Sac*I entstandene zweite Fragment zu erwarten ist.

3.2.2 Heterologe Expression

Alle Kolonien, die in den oben genannten Überprüfungschritten positive Ergebnisse zeigten wurden in den Expressionsstamm BL21 inseriert. Zur Kontrolle der Expression sowie der Enzymreinigung wurde eine SDS-PAGE durchgeführt. Auch hier wurden neben den gereinigten Enzymen die Waschfraktionen untersucht. Abbildung 3.11 auf Seite 31 zeigt für ZRP4 deutliche Banden bei etwa 40 kDa in der Fraktion mit den gereinigten Enzymen. Diese konnte ZRP4 (44 kDa) zugeordnet werden. Auch für BX12 konnten im Gel Banden ausgemacht werden. Diese liegen bei etwa 40 kDa und passen zu dem Molekülgewicht von etwa 39 kDa für BX12.

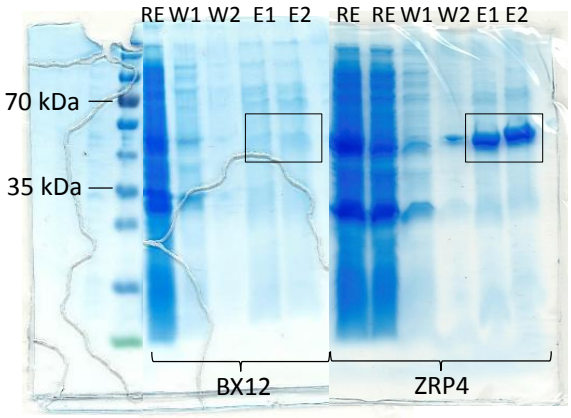


Abbildung 3.11: **Auftrennung der gereinigten *O*-Methyltransferasen BX12 und ZRP4 durch SDS-PAGE.** Die Markierung zeigt die Überexpressionsbanden in der gereinigten Enzymfraktion für die Enzyme BX12 und ZRP4. Die erste Tasche neben den Marker enthält jeweils Proben des Enzym-Rohextraktes (RE). Anschließend folgen zwei Proben der Wasch- und Reinigungsschritte (W1 und W2). Die jeweils letzten Fraktionen stammen von dem aufgereinigten Enzym (E1 und E2).

3.2.3 Aktivitätsbestimmung der *O*-Methyltransferasen BX12 und ZRP4

Mit dem Methyltransferase-Assay sollte die Methylierungsreaktion von TRIMBOA-Glc zu DIM_2BOA-Glc untersucht werden. In diesem Assay wurden die Hydroxylierung und Methylierung in einem Ansatz durchgeführt.
Insgesamt wurden 9 Assays durchgeführt. Allen Ansätzen wurde BX11 zugesetzt. Anschließend wurden die 9 Ansätze auf 3 Probensets aufgeteilt. Ein Probenset dient als Kontrolle (n=3), einem wurde BX12 (n=3) zugesetzt und das dritte enthielt das Enzym ZRP4 (n=3).

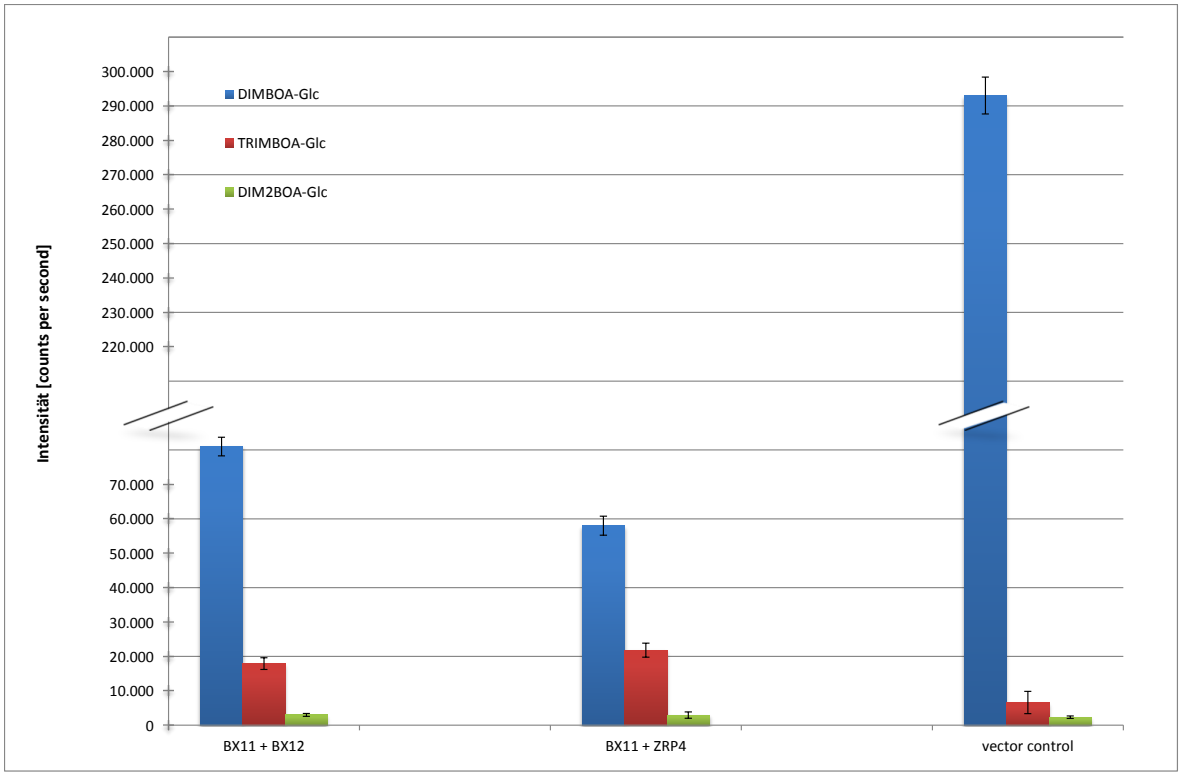


Abbildung 3.12: **Qualitativer Benzoxazinoidgehalt in den verschiedenen Assayansätzen.** Die Identifizierung der einzelnen Benzoxazinoide erfolgte mittels LC/MS/MS. Pro Set wurden drei Ansätze gemessen. Im Diagramm sind die Mittelwerte der Messungen dargestellt. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardfehlern. Dargestellt ist die Intensität von DIMBOA-Glc, TRIMBOA-Glc und DIM_2BOA-Glc in den drei Probensets (Vektor Kontrolle, BX12 und ZRP4).

Als Substrat wurde DIMBOA-Glc eingesetzt, welches vom zugesetzten BX11 hydroxyliert wird. Dadurch entsteht TRIMBOA-Glc, welches wiederum als Substrat für die Methylierung durch BX12 bzw. ZRP4 dient.
Unter den optimierten Assaybedingungen zeigte sich in den Chromatogrammen aller Proben Peaks, die DIMBOA-Glc (Retentionszeit etwa 9 Minuten), TRIMBOA-Glc (Retentionszeit etwa 4 Minuten) und DIM_2BOA-Glc (Retentionszeit etwa 8,8 Minuten) (Daten nicht gezeigt).
Abbildung 3.12 auf Seite 32 zeigt die am Massenspektrometer gemessenen Intensitäten der Komponenten DIMBOA-Glc, TRIMBOA-Glc und DIM_2BOA-Glc. In den BX12- und ZRP4-

haltigen Assays ist ein unverkennbarer Rückgang von DIMBOA-Glc zu erkennen. Im Vergleich mit den Kontrollproben sind bei den BX12-Proben im Schnitt 34,8 % und bei den ZRP4-Proben im Durchschnitt 42,7 % weniger DIMBOA-Glc enthalten.
Die gemessenen Intensitäten für DIM_2BOA-Glc waren in allen Ansätzen sehr niedrig. Trotzdem konnte sowohl in den Proben mit BX12- als auch in denen mit ZRP4 eine geringfügige Steigerung von DIM_2BOA-Glc gegenüber den Kontrollproben ausgemacht werden. Für das BX12-Probenset betrug die durchschnittliche Steigerung 27 % , für das ZRP4 Probenset durchschnittlich 25 %.
Dies zeigt, dass sowohl BX12 als auch ZRP4 in der Lage zu sein scheinen TRIMBOA-Glc an C-8 zu methylieren und somit DIM_2BOA-Glc zu bilden.

3.3 Verifizierung der TRIMBOA-Glc-Struktur mittels NMR-Spektroskopie

In dieser Arbeit sollte die enzymatische Hydroxylierung an der C-8 Position durch BX11 und somit die bekannte Struktur verifiziert werden. Zur Strukturbestimmung wurden die aufkonzentrierten Proben an die NMR-Abteilung weitergegeben.
Dem DIMBOA-Glc Standard konnten ein Signal im NMR-Spektrum zugeordnet werden. Signale für TRIMBOA-Glc wurden jedoch nicht detektiert. Allerdings wurden starke Verunreinigungen festgestellt. Dabei handelt es sich womöglich um Glykoside (Daten nicht gezeigt). Die TRIMBOA-Glc Struktur konnte somit vorerst nicht bestätigt werden.

4 Diskussion

Benzoxazinoide sind als Abwehrstoffe in Süßgräsern (*Poaceae*) wie Mais und Hirse bekannt. Aus Indol-3-glyzerolphosphat werden über einen größtenteils linearen Stoffwechselweg die verschiedenen Derivate DIMBOA-Glc, DIM_2BOA-Glc und auch HDMBOA-Glc synthetisiert. Der Syntheseweg der Benzoxazinoide ist fast vollständig aufgeklärt und die Enzyme, welche die einzelnen Reaktionsschritte katalysieren, sind bekannt (Frey et al., 2009). Durch Beschädigung des Pflanzengewebes werden die in der Vakuole gespeicherten Benzoxazinoide freigesetzt und durch β-Glycosidasen in die reaktiven Aglycone umgewandelt. Diese werden von den Fressfeinden aufgenommen, entfalten ihre Wirkung und schützen so die Pflanzen vor weiteren Beschädigungen durch Fraß.

4.1 Die Substratspezifität der 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen BX6 und BX11 konnte bestätigt werden

Die untersuchte 2-Oxoglutarat-abhängige Dioxygenase BX11 weist Ähnlichkeiten in der Sequenzabfolge mit dem bereits bekannten Enzym BX6 (Jonczyk et al., 2008) auf, welches eine DIMBOA-Glc-Vorstufe bildet. Ein Alignment der Gensequenzen beider Enzyme zeigte eine Identität beider Sequenzen von 69,7 %. Deshalb kann angenommen werden, dass BX11 ein strukturell ähnliches Substrat wie BX6 nutzt.
In dieser Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass die Hydroxylierung von DIMBOA-Glc an der C-8 Position, der erste und bestimmende Schritt für die Bildung von DIM_2BOA-Glc, durch BX11 katalysiert wird. Daneben wurde auch die Substratspezifität von BX6 untersucht. Hier sollte überprüft werden, ob BX6 ebenfalls die Hydroxylierung von DIMBOA-Glc an der C-8 Position katalysieren kann und damit eventuell auch für die Biosynthese von DIM_2BOA-Glc verantwortlich ist.
Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass DIMBOA-Glc kein Substrat für BX6 ist (siehe Abschnitt 3.1.4) und dieses Enzym somit nicht in der Lage ist die Umsetzung von DIMBOA-Glc zu TRIMBOA-Glc zu katalysieren. Dies stimmt mit der bisher bekannten Linearität der an der Benzoxazinoidbiosynthese beteiligten Enzyme überein. Alle bisher charakterisierten Enzyme des Benzoxazinoidstoffwechsels (BX1 bis BX10) katalysieren jeweils nur eine Reaktion in diesem Stoffwechselweg (Frey et al., 2009, Niemeyer, 2009). Auch unter verschiedenen Assaybedingungen wie beispielsweise unterschiedlichen BSA-/Ascorbat-Konzentrationen ist die Substrats-

pezifität von BX6 und BX11 immer gegeben (siehe Abschnitt 3.1.3). Getestet wurde zudem, ob die Aufreinigung Einfluss auf Aktivität und Substratspezifität hat. Es konnte aber kein Unterschied zwischen Rohextrakt und aufgereinigtem Enzym festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Dies zeigt, dass tatsächlich auch das exprimierte Enzym die Reaktion katalysierte und diese nicht etwa durch *E. coli*-eigene Enzyme aus dem Rohextrakt beeinflusst wird.

4.2 Verkürzte Variante von BX11 ist enzymatisch inaktiv

Von den Pflanzen der Maislinie OH43 ist bekannt, dass in ihnen kein DIM_2BOA-Glc gebildet wird (Meihls et al., 2013). Da angenommen wird, dass nur BX11 und BX12 an der DIM_2BOA-Glc Bildung beteiligt sind, muss dieses Phänomen durch eine Dysfunktion oder das Fehlen eines dieser Enzyme hervorgerufen werden.
Die Sequenz für BX11 in der Maislinie OH43 trägt eine Mutation im Startcodon für eben dieses Enzym. Dadurch verschiebt sich der open reading frame (ORF) zum nächsten ATG-Codon etwa 300 bp in Richtung des 5'-Endes. Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, führt diese Mutation zu einem inaktiven Enzym (siehe Abschnitt 3.1.5). Möglicherweise liegen in dem deletierten Bereich Informationen, die für die Aktivität und Spezifität der Dioxygenase wichtig sind und deren Fehlen die Inaktivität bedingen. Es konnten aber keine Publikation gefunden werden, welche diese Annahme bestätigen oder widerlegen.
In keinem der durchgeführten Assays konnte TRIMBOA-Glc nachgewiesen werden (siehe Abschnitt 3.1.5). Pflanzen der Maislinie OH43 haben somit ein Defizit einer der wichtigen Abwehrsubstanzen. DIM_2BOA-Glc ist in Pflanzen der Linie OH43 mengenmäßig im Vergleich zu den anderen als Hauptabwehrkomponenten zählenden Benzoxazinoiden DIMBOA-Glc und HDMBOA-Glc nicht vorhanden (Meihls et al., 2013). Neuere Studien haben gezeigt, dass HDMBOA-Glc nach Herbivorie das am stärksten induzierte Sekundärmetabolit in der Maispflanze ist (Glauser et al., 2011). Dessen Konzentration steigt stark an während die von DIMBOA-Glc und auch DIM_2BOA-Glc leicht abnehmen (Glauser et al., 2011). Somit scheint der Verlust der Fähigkeit DIM_2BOA-Glc synthetisieren zu können für die Pflanze eher marginal zu sein, da sie mit HDMBOA-Glc einen anderen und wahrscheinlich sogar effektiveren Abwehrstoff bilden kann. Auf der anderen Seite sind aber auch Maislinien wie beispielsweise P39 bekannt, die deutlich höhere Konzentrationen an DIM_2BOA-Glc im Gewebe akkumulieren. Letztendlich ist bis heute unklar, welche Funktion DIM_2BOA-Glc im Abwehrverhalten der Maispflanzen hat. Möglicherweise lässt sich die Mutation in OH43 nutzen um den Effekt auf Herbivorie festzustellen.
In Weizenpflanzen konnte vor kurzem eine Korrelation zwischen Schädlingsresistenz und Benzoxazinoidkonzentration nachgewiesen werden (Søltoft et al., 2008). Einige Weizenlinien sind bekannt für ihre hohe Resistenz gegen FHB (Fusarium Head Blight = partielle Taubährigkeit), eine Pilzinfektion, welche durch verschiedene Arten der Gattung *Fusarium* ausgelöst wird und zu erheblichen Ernteverlusten und gesundheitlichen Problemen führt. In Pflanzen dieser Linien wurden die höchsten DIM_2BOA-Glc-Konzentrationen gemessen (Søltoft et al., 2008). Auch diese Studien aus Weizen sprechen für die Wichtigkeit von DIM_2BOA-Glc als Abwehr-

stoff. Für die Maislinie OH43 konnte ein solcher Zusammenhang zwischen Benzoxazinoid- bzw. DIM_2BOA-Glc-Konzentration und Schädlingsresistenz noch nicht nachgewiesen werden.

4.3 *O*-Methyltransferasen BX12 und ZRP4 sind möglicherweise in der Lage DIM_2BOA-Glc zu bilden

Bis heute ist noch nicht eindeutig geklärt, welche Enzyme die finalen Schritte der Benzoxazinoidbiosynthese durchführen. Die untersuchte *O*-Methyltransferase BX12 ist strukturell ähnlich zu der *O*-Methyltransferase BX7, welche die Methylierung von TRIBOA-Glc zu DIMBOA-Glc katalysiert (Jonczyk et al., 2008). Möglicherweise ist *Bx12* durch Duplikation aus *Bx7* hervorgegangen. Ein Alignment beider Sequenzen ergibt eine Identität von 51,2 %. Auch diese Ähnlichkeit spricht dafür, dass BX12 Teil des Benzoxazinoidstoffwechsels ist und möglicherweise die Umsetzung von TRIMBOA-Glc zu DIM_2BOA-Glc katalysieren könnte.
Die Ergebnisse dieser Arbeit geben Hinweise auf eine mögliche Beteiligung von BX12 an der Bildung von DIM_2BOA-Glc. Nach Hydroxylierung von DIMBOA-Glc durch die 2-Oxoglutarat-abhängige Dioxygenase BX11 wird TRIMBOA-Glc gebildet, welches dann scheinbar durch BX12 zu DIM_2BOA-Glc methyliert wird. Wie bereits in Abschnitt 3.2.3 beschrieben wurde, ist die durch BX12 gebildete Menge an DIM_2BOA-Glc nicht signifikant höher als in der Kontrollprobe. Der, wenn auch geringe, Anstieg von durchschnittlich 27 % der DIM_2BOA-Glc Konzentration im Vergleich zur Kontrolle ist trotzdessen ein Hinweis darauf, dass BX12 in der Lage ist DIM_2BOA-Glc zu bilden. Wie die Ergebnisse der Enzymassays zeigen, scheint auch *O*-Methyltransferase ZRP4 in der Lage zu sein DIM_2BOA-Glc zu bilden, da in diesen Proben ebenfalls im Durchschnitt ein Anstieg von 25 % der DIM_2BOA-Glc Konzentration im Vergleich zur Kontrollprobe gemessen wurde (siehe Abschnitt 3.2.3). Für einen eindeutigen Nachweis der Beteiligung beider Enzyme an der Bildung von DIM_2BOA-Glc reichen diese Daten nicht aus. Jedoch könnte durch die Verbesserung der Reaktionsbedingungn und eine höhere Anzahl an Replikaten dieser Nachweis geführt werden.
Das Enzym ZRP4 akkumuliert bevorzugt in jungen Wurzeln und dort vor allem im Bereich der Endodermis (Held et al., 1993). Bisher war das Substrat von ZRP4 jedoch nicht bekannt. Es wurde angenommen, dass es für die Methylierung von Suberinvorläufern verantwortlich ist. Suberin ist ein komplexer Biopolymer aus aliphatischen und aromatischen Domänen, welcher in Zellwänden eingelagert wird und dort für Stabilität sorgt (Held et al., 1993). ZRP4 wird vor allem in den Wurzeln, insbesondere in den Wurzelspitzen, stark exprimiert. Wie auch die anderen an der Benzoxazinoidbiosynthese beteiligten Enzyme findet sich das Gen für ZRP4 auf Chromosom 4 des Maisgenoms (Held er at., 1993). Zudem konnte bereits eine große Ähnlichkeit (vor allem am Carboxylende) von ZRP4 und anderen pflanzlichen *O*-Methyltransferasen nachgewiesen werden (Held et al., 1993). Die durch ein Alignment der Sequenzen ermittelte Identität von 63,9 % für BX12 und ZRP4 und der von 54,8 % für BX7 und ZRP4 zeigt die hohe Sequenzähnlichkeit dieser Enzyme zueinander. Enzyme mit ähnlichen Sequenzen katalysieren oft ähnlich Reaktionen. Dies würde also für eine mögliche Beteiligung von ZRP4 an der DIM_2BOA-Glc-Synthese sprechen. Da angenommen wird, dass ZRP4 auch phenolische Ver-

bindungen als Substrat nutzt, ist die Annahme, dass es auch DIM_2BOA-Glc bilden kann nicht ausgeschlossen. Gegen diese Möglichkeit spricht allerdings die bisher bekannte hohe Spezifität der pflanzlichen *O*-Methyltransferasen. So sind sich beispielsweise Phenolpropanoide und Flavonoide strukturell sehr ähnlich. Trotzdem ist keine Methyltransferase bekannt, die beide Stoffe als Substrat nutzen kann (Ibrahim et al., 1998). Sollte dies für alle pflanzlichen *O*-Methyltransferasen gelten, dann sollte ZRP4 eher nicht in der Lage sein TRIMBOA-Glc als Substrat zu nutzen und DIM_2BOA-Glc zu bilden. Um eine mögliche Beteiligung von BX12 und ZRP4 an der DIM_2BOA-Glc-Biosynthese zu bestätigen oder auszuschließen sollten die Assays in jedem Fall unter optimierten Bedingungen wiederholt werden.

4.4 Strukturbestimmung von TRIMBOA-Glc mittels NMR-Spektroskopie

Die TRIMBOA-Glc Struktur, genauer die enzymatische Hydroxylierung an der C-8 Position, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht eindeutig verifiziert werden. Die NMR-spektrometrische Untersuchungen benötigen großer Mengen an TRIMBOA-Glc. Mit dem bestehenden System war es nicht möglich die erforderliche Menge zu generieren.
Von 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen, zu denen auch BX11 gehört, ist bekannt, dass sie im aufgereinigtem Zustand stark an Aktivität einbüßen. Dies ist möglicherweise durch die Entfernung der als Cofaktor benötigten Fe(II)-Ionen bzw. durch die Änderung der Oxidationsstufe bedingt (Mantri et al., 2012). Um eine höhere TRIMBOA-Glc-Ausbeute zu erreichen, sollte der Aktivitätsverlust minimiert werden. Ein möglicher Ansatz ist das Komplexieren von Eisenionen, die als Cofaktor für die Reaktion benötigt werden, zu unterbinden, oder die Erhöhung der Konzentration der Fe(II)-Ionen im eingesetzten Puffer. Eine andere Möglichkeit wäre die Zugabe von hohen BSA-Konzentrationen, welche im Rahmen dieser Arbeit als ein enzymstabilisierender Faktor bestätigt wurden und zu einer gesteigerten TRIMBOA-Glc Ausbeute führten (siehe Abschnitt 3.1.3). Möglicherweise könnte auch die Verwendung von Enzym-Rohextrakt statt der aufgereinigten Enzyme zu einer Aktivitätssteigerung führen.
Von 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen ist außerdem bekannt, dass sie in Pflanzen ubiquitär vorkommen und ein breites Spektrum an Substanzen als Substrat nutzen können. Doch diese Flexibilität macht sie auch anfällig für oxidative Schäden (Mantri et al., 2012). Es ist außerdem bekannt, dass diese Enzyme anfällig für Autooxidation sind (Mantri et al., 2012). Dabei wandern aromatische Teile des Enzyms zum aktiven Zentrum und werden dort hydroxyliert. In den Proben sind außerdem große Verunreinigungen, wahrscheinlich Glycoside, aufgetreten, die eine eindeutige Identifizierung des TRIMBOA-Glc Signals nicht zugelassen haben. Daher sollte für weitere Untersuchungen vor allem auch die Extraktions- bzw. Aufreinigungsmethode deutlich verbessert werden.

5 Zusammenfassung

Benzoxazinoide kommen als Sekundärmetabolite in fast allen Gräsern wie Weizen, Reis und Mais vor. Dort dienen sie vor allem jungen Pflanzen als Abwehrstoffe gegen Herbivorie durch Raupen und Angriffe durch Pathogene. Der Syntheseweg der Hauptkomponente, 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one-glucosid (DIMBOA-Glc), konnte in vorherigen Untersuchungen vollständig aufgeklärt werden. Gegenstand der Arbeit war es zu klären, welche Enzyme an der Bildung von DIM_2BOA-Glc beteiligt sind.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen BX6 und BX11 heterolog in *E. coli* exprimiert. Mittels Enzymaktivitätsassays konnte dann deren Substratspezifität eindeutig geklärt werden. So konnte gezeigt werden, dass das Enzym BX11 die Umsetzung von DIMBOA-Glc zu TRIMBOA-Glc katalysiert. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die 2-Oxoglutarat-abhängige Dioxygenase BX6 nicht in der Lage ist diese Reaktion zu katalysieren. Dies bestätigt auch die bisher bekannte Linearität des Benzoxazinoidstoffwechsels in dem immer ein Enzym einen Reaktionsschritt katalysiert.

Außerdem wurden durch heterologe Genexpression in *E. coli* die *O*-Methyltransferasen BX12 und ZRP4 synthetisiert und mittles Enzymassays deren Substratspezifität bestimmt. Es scheint, dass sowohl BX12 als auch ZRP4 in der Lage sind an der C-8-Position von TRIMBOA-Glc eine CH_3-Gruppe einzuführen und somit die Bildung von DIM_2BOA-Glc zu katalysieren.

Zusätzlich wurde die Aktivität einer verkürzten Variante von BX11 untersucht, welche durch eine Mutation im Startcodon des BX11-Gens verursacht wird. Diese tritt in der Maislinie OH43 auf, welche nicht in der Lage ist DIM_2BOA-Glc zu bilden. Nun sollte untersucht werden ob dieses Phänomen mit der verkürzten BX11-Variante zusammenhängt. Durch Enzymassays konnte die Inaktivität der verkürzten BX11-Variante gezeigt werden.

Ebenfalls sollte mit dieser Arbeit die TRIMBOA-Glc-Struktur verifiziert werden. Dazu wurde TRIMBOA-Glc aufgereinigt und mittels NMR-Spektroskopie analysiert. Die Struktur von TRIMBOA-Glc konnte jedoch nicht festgestellt werden.

6 Literaturverzeichnis

Wissenschaftliche Publikationen:

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

Frey, M., Huber, K., Park, W., Sicker, D., Lindberg, P., Meeley, R., Simmons, C., Yalpani, N., Gierl, A., 2003. *A 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase is integrated in DIMBOA-biosynthesis*. Phytochemistry 62, 371-376.

Frey, M., Schullehner, K., Dick, R., Fiesselmann, A.,Gierl, A., 2009. *Benzoxazinoid biosynthesis, a model for evolution of secondary metabolic pathways in plants*. Phytochemistry 70, 1645-1651.

Gierl, A., Frey, M., 2001.*Evolution of benzoxazinone biosynthesis and indole production in maize*. Planta 213, 493-498.

Glauser, G., Marti, G., Villard N., Doyen, G.A., Wolfender J-L., Turlings, T.C., Erb, M., 2011. *Induction and detoxification of maize 1,4-benzoxazin-3-ones by insect herbivores*. The Plant Journal 68, 901-911.

Glawischnig, E., Grün, S., Frey, M., Gierl, A., 1999. *Cytochrome P450 monooxygenases of DIBOA biosynthesis: Specifity and conservation among grasses*. Phytochemistry 50, 925-930.

Hamilton, R.A., 1964. *A corn mutant deficient in 2,4-Dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one with an altered tolerance of Atrazin*. Weeds 12. 27-30.

Held, B.M., Wang, H., John, I., Wurtele, E. S., Colbert, J. T., 1993. *An mRNA putatively codung for an O-methyltransferase accumulates preferentially in maize roots and is located predominantly in the region of the endodermis*. Plant Physiology 102, 1001-1008.

Ibrahim, R.K., Bruneau, A., Bantignies, B., 1998. *Plant O-methyltransferases: molecular analysis, common signature and classification*. Plant Molecular Biology 36, 1-10.

Jonczyk, R., Schmidt, H., Osterrieder, A., Fiesselmann, A.,Schullehner, K., Haslbeck, M., Si-

cker, D., Hofmann, D., Yalpani, N., Simmons, C., Frey, M., Gierl, A., 2008. *Elucidation of the Final Reaction of DIMBOA-Glucoside Biosynthesis in Maize: Charakterization of Bx6 and Bx7*. Plant Physiologie 146, 1053-1063.

Lisch, D., 2009 *Epigenetic Regulation of Transposable Elements in Plants*. Annual Review of Plant Biology 60, 43-66.

Mantir, M., Zhang, Z., McDonough, M., Schofield, C.J., 2012. *Autocatalysed oxidative modifications to 2-Oxoglutarate dependent oxygenases*. FEBS Journal 279, 1563-1575.

Meihls, L.N., Handrick, V., Glauser, G., Barbier, B., Kaur, H., Haribal, M., Lipka, A., Gershenzon, J., Buckler, E., Erb, M., Köllner, T.G.,Jander, G., 2013. *Natural Variation in Maize Aphid Resistance is Associated with 2,4-Dihydroxy-7-Methoxy-1,4-Benzoxazin-3-One Glucoside Methyltransferase Activity*. The Plant Cell 25, 2341-2355.

Niemeyer, H.M., 2009. *Hydroxamic Acids Derived From 2-Hydroxy-2H-1,4-Benzoxazin-3(4H)-One: Key Defense Chemicals of Cereals*. Journal of Agricultural an Food Chemistry 57, 1677-1696.

Schnabele P.S., et al., 2009. *The B73 Maize Genome: Complexity, Diversity and Dynamics*. Science 326, 1112-1115.

Søltoft, M., Jørgensen, L.N., Svensmark, B., Fomsgaard, I.S., 2008.*Benzoxazinoid concentrations show correlation with Fusarium Head Blight resistance in Danish wheat varieties*. Biochemical Systematics and Ecology 36, 245-259.

Internetquellen:

http://www.natur-lexikon.com/Texte/MZ/003/00224-Mais/MZ00224-mais.html, 02.07.14

Bücher:

Christian, A., Mackensen-Friedrichs, I., Wendel, C., Westendorf-Bröring, E. (2006): *Grüne Reihe Materialien SII Stoffwechselphysiologie*. Schroedel-Verlag, Braunschweig

Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L. (2007): *Biochemie*. Elsevier Spektrum Akademischer Verlag, München

7 Anhang

Optimierte Sequenz ZmBx6

ATGGCGCCCACAACGGCCACGAAAGATGATAGCGGTTATGGCGATGAACGTC
GGCGCGAGCTTCAAGCTTTCGACGACACCAAACTGGGCGTGAAAGGACTGGT
CGATAGTGGTGTGAAAAGCATTCCTAGTATCTTTCACCATCCTCCGGAAGCG
TTGTCGGACATCATCAGTCCGGCACCGTTACCAAGCAGTCCGCCGTCTGGCG
CTGCCATTCCGGTGGTGGATCTGTCCGTTACTCGCCGCGAAGATTTAGTCGA
ACAGGTACGCCATGCAGCCGGTACCGTGGGTTTCTTCTGGTTGGTCAACCAT
GGTGTTGCCGAAGAGTTAATGGGCGGCATGTTGCGCGGTGTACGCCAGTTTA
ACGAAGGGCCAGTTGAGGCAAAACAGGCGCTGTATTCCCGTGATCTGGCGCG
TAACCTTCGGTTTGCGTCGAATTTCGACCTGTTTAAAGCCGCAGCTGCGGAT
TGGCGCGATACCCTGTTTTGCGAGGTAGCGCCGAATCCACCGCCTCGCGAGG
AATTACCCGAACCTTTGCGCAATGTGATGCTGGAATATGGTGCAGCGGTTAC
CAAGCTGGCCCGTTTTGTCTTTGAACTGCTGTCAGAAAGCCTGGGTATGCCG
AGCGACCACCTCTACGAGATGGAGTGCATGCAGAACCTCAATGTGGTTTGCC
AGTACTATCCGCCATGTCCGGAACCGCATCGTACGGTGGGCGTTAAACGCCA
TACGGATCCAGGGTTCTTCACCATTCTGCTGCAGGATGGCATGGGTGGCCTC
CAAGTCCGTCTGGGCAACAATGGGCAAAGCGGCGGTTGTTGGGTGGATATTG
CACCCCGTCCTGGGGCTCTGATGGTAAATATCGGAGACTTACTCCAGCTTGT
CACCAATGATCGCTTTCGCTCCGTGGAACACCGTGTTCCGGCTAACAAGAGC
TCTGACACTGCGCGCGTTTCGGTCGCGTCATTCTTTAACACAGATGTACGCC
GCTCAGAACGGATGTACGGACCAATTCCGGATCCGTCGAAACCGCCCCTGTA
TCGCTCTGTGCGTGCCCGTGACTTCATCGCGAAGTTTAACACCATTGGCCTG
GATGGCCGTGCCCTTGACCACTTTCGTCTGTAA

Sequenz BX11 Datenbank Nr. AC148152.3_FG005

ATGGCTCCGACCGCCGCCAAGGACAGTGGCTCCGCCGATCGCTGGCGCGAG
GTGCAGGCGTTCGAGGACAGCAAGCTGGGTGTGAAGGGCCTGGTCGACTCC
GGCGTCAAGTCCATCCCGGCCATGTTCCACCACCCGCCGGAGTCCCTCAAG
GATGTCATTTCTCCACCAGCTCTGCCCTCCTCCGACGATGCGCCGGCCATC
CCAGTGGTGGACCTGTCCGTGGCGCGGCGCGAGGATCTGGTGGCCCAGGTG
AAGCACGCGGCCGGGACGGTGGGCTTCTTCTGGGTGGTGAACCACGGCGTG
CCGGAGGAGCTGATGGCCAGCATGCTCAGCGGGGTGCGCCAGTTCAACGAG
GGCTCTCTGGAGGCCAAGCAGGCGCTCTACTCACGGGACCCCGCTCGCAAC

GTGCGCTTCGCTTCCAACTTCGACCTCTTCGAGTCCGCGGCGGCCGACTGG
CGCGACACGCTCTACTGCAAGATTGCGCCGGATCCGGCGCCGCGGGAGCTC
GTGCCGGAGCCTCTCCGGAACGTGATGATGGAATACGGCGAGGAACTGACG
AAGCTGGCGCGGTCCATGTTCGAGCTGCTGTCGGAGTCCCTCGGCATGCCC
AGCGACCACCTGCACAAGATGGAGTGCATGCAGCAGCTCCACATCGTGTGC
CAGTACTACCCGCCATGCCCGGAGCCGCACCTCACCATCGGCGTCAGGAAG
CACTCGGACACCGGTTTCTTCACCATCCTCCTGCAGGACGGCATGGGCGGC
CTGCAGGTGCTAGTCGATCGCGGAGGCGGCCGCCAGACGTGGGTGGACGTC
ACTCCCCGACCTGGGGCACTCATGGTCAACATGGGCAGCTTTCTTCAGCTT
GTGACGAATGACCGGTACAAGAGCGTGGATCACCGGGTGCCGGCTAACAAG
AGCAGTGACACGGCGAGGGTCTCGGTAGCTGCCTTCTTCAACCCCGACGAG
AAGAGAACCGAGAGGCTGTATGGCCCCATTCCAGACCCCAGCAAGCCTCCG
CTGTACAGGAGCGTCACGTTCCCGGACTTCATCGCCAAGTTCAACAGCATC
GGACTGGACGGTCGCGTGCTCGACCACTTCCGGTTGGAGGACGACGGCCCT
ACTCGTCTTGCTGCTCCTGCACACCACGTCTAG

Sequenz BX11 kurz

ATGTTCCACCACCCGCCGGAGTCCCTCAAGGATGTCATTTCTCCACCAGCT
CTGCCCTCCTCCGACGATGCGCCGGCCATCCCAGTGGTGGACCTGTCCGTG
GCGCGGCGCGAGGATCTGGTGGCCCAGGTGAAGCACGCGGCCGGGACGGTG
GGCTTCTTCTGGGTGGTGAACCACGGCGTGCCGGAGGAGCTGATGGCCAGC
ATGCTCAGCGGGGTGCGCCAGTTCAACGAGGGCTCTCTGGAGGCCAAGCAG
GCGCTCTACTCACGGGACCCCGCTCGCAACGTGCGCTTCGCTTCCAACTTC
GACCTCTTCGAGTCCGCGGCGGCCGACTGGCGCGACACGCTCTACTGCAAG
ATTGCGCCGGATCCGGCGCCGCGGGAGCTCGTGCCGGAGCCTCTCCGGAAC
GTGATGATGGAATACGGCGAGGAACTGACGAAGCTGGCGCGGTCCATGTTC
GAGCTGCTGTCGGAGTCCCTCGGCATGCCCAGCGACCACCTGCACAAGATG
GAGTGCATGCAGCAGCTCCACATCGTGTGCCAGTACTACCCGCCATGCCCG
GAGCCGCACCTCACCATCGGCGTCAGGAAGCACTCGGACACCGGTTTCTTC
ACCATCCTCCTGCAGGACGGCATGGGCGGCCTGCAGGTGCTAGTCGATCGC
GGAGGCGGCCGCCAGACGTGGGTGGACGTCACTCCCCGACCTGGGGCACTC
ATGGTCAACATGGGCAGCTTTCTTCAGCTTGTGACGAATGACCGGTACAAG
AGCGTGGATCACCGGGTGCCGGCTAACAAGAGCAGTGACACGGCGAGGGTC
TCGGTAGCTGCCTTCTTCAACCCCGACGAGAAGAGAACCGAGAGGCTGTAT
GGCCCCATTCCAGACCCCAGCAAGCCTCCGCTGTACAGGAGCGTCACGTTC
CCGGACTTCATCGCCAAGTTCAACAGCATCGGACTGGACGGTCGCGTGCTC
GACCACTTCCGGTTGGAGGACGACGGCCCTACTCGTCTTGCTGCTCCTGCA
CACCACGTCTAG

Sequenz BX12 AC209819.3_FG005

ATGGCACTCGCCGGCATCACCAACCAGGACTTGCTCGACGCACAGGTTGAGC
TATGGCACAGCACCTTCGCCTACATCAAATCCATGGCACTCAAGTCCGCCTT
GGACCTTGGCCTCGCCGACGCCATCTACCACCACGGCGGCAGCGCCACGCTG
CCGCAGATAGTTGACAGGGTCACGCTCCACCCGTCCAAGACCCTCCACCTGC
GTCGCCTCATGCGCGTGCTCGCCACCACGGGCGTGTTCAGCGTCCAGCACCC
ATCGCCGTTGGGTGACGACAGCAGCAGTGCCAGTGACAGTGAGCCTGTCTAC
AAGCTCACAGCAGTGTCCGCCCTCCTGGTCGGCCCGCGCCGCAGCCACGTCC
CGCTCGCCGCCTTTGTCGTCGACCCGGCCCTCGTCACGCCCTTCTTCGAGCT
CGGCAAATGGCTCCAGCGCGAGCTTCCCGGCCCGTGCATCTTCGAGCACGCG
CACGGCCAGACCATCTGGGAGCACGCCAACGGTGACGCGGCCTTCAACGCGC
TCCTCAACGACGGGATGCTCTCGGACAGCCACTTCATCATGGACATCGCCAG
CAAGGAGTGCGCGCACGTCTTCCAGGGGATAAGCTCCCTGGTCGACGTCGGC
GGAGGTCTCGGCGCGGCCGCGCAGGCCATCTCGCTGGCGTTCCCGGGCGTCA
AGTGCAGCGTGCTAGACCTCGACCACGTCGTTGCCAAGGCTCCCAGTGACAC
TCAAGTGAGCTACATCGGCGGCGACATGTTCGAGTCTGTACCGCCGGCAGAT
GCCATGTTCCTCAAGTGGGTTCTGCATGACTGGGGCCACGAGGAGTGCGTGA
AGATACTGAGGAACTGCAGGAAGGCCATCCCTCCGAGGGAAGGAGGAGGGAA
GGTGATAATCATCGACATGGTGGTCGGGGCTGGGCCGGCGGACCCGAGGCAC
AGGGAGATGCAGGCCCTGTTCGACCTCTACATCATGGTCGTCAACGGCATGG
AGCGGGACGAGCAGGAGTGGAAGCGGATCTTCGTCGAGGCCGGGTTCACCGA
CTACAGAGTCACGCCGGTCCTCGGCGTCCGCTCCATCATCGAGGTGTACCCT
TGA

Sequnez ZRP4 NP_001105689

GAGAAAGTAGCAGTATCAGCATGGAGCTCAGCCCCAACAACAGCACGGACCA
GAGCTTGCTCGATGCGCAGCTCGAGCTCTGGCACACCACCTTCGCGTTCATG
AAGTCCATGGCGCTCAAGTCCGCAATACACCTCCGAATTGCCGATGCCATCC
ACCTCCATGGCGGTGCCGCCAGCCTATCCCAGATACTAAGCAAGGTCCATCT
CCACCCGTCCAGAGTTTCCAGCCTCCGTCGCCTGATGCGCGTGCTAACAACC
ACCAATGTCTTCGGCACCCAGCCGCTGGGTGGTGGCAGTGACGACGACAGTG
AGCCCGTCTACACTCTCACTCCAGTGTCTCGCCTCCTCATCGGCTCACAGTC
GTCGCAGCTGGCCCAGACTCCGTTGGCGGCCATGGTGCTCGATCCAACCATC
GTCTCCCCCTTCTCCGAGCTCGGCGCGTGGTTCCAGCACGAGCTCCCAGACC
CGTGCATCTTCAAGCACACGCACGGCCGAGGCATCTGGGAGTTGACCAAAGA
TGACGCGACCTTCGACGCCCTAGTCAACGACGGGTTGGCTTCCGACAGCCAA
CTCATCGTCGACGTTGCCATCAAGCAGAGCGCAGAGGTCTTCCAGGGGATAA
GCTCGCTCGTCGACGTCGGTGGGGGCATCGGTGCGGCGGCCCAAGCCATCTC
AAAGGCGTTCCCGCACGTCAAGTGTAGCGTGCTGGACCTTGCCCACGTCGTT
GCGAAGGCTCCAACTCACACGGACGTGCAATTTATCGCTGGCGACATGTTTG
AGAGCATTCCACCAGCAGACGCCGTACTGTTGAAGTCGGTCTTGCATGATTG

GGACCATGACGACTGCGTGAAGATACTGAAGAATTGCAAAAAGGCTATTCCT
CCAAGAGAAGCCGGTGGAAAGGTGATAATAATAAACATGGTAGTTGGAGCTG
GGCCATCTGACATGAAGCACAAAGAGATGCAGGCCATATTCGATGTCTATAT
CATGTTCATCAATGGCATGGAACGAGATGAGCAGGAGTGGAGCAAGATTTTC
TCCGAAGCTGGATATAGCGATTACAGAATAATACCGGTCTTAGGTGTTCGGT
CTATAATCGAGGTCTATCCATAACCATTTGTGTAAGATGGTTCATATATAGT
GGCATGGATCGGAGCTTGTGTGGTGTGGACATGTAATCTAAATAAGTGGGTA
CCCCGCTGTGATGCTGATCTATATCGTGCTCTCTGTCGAGATATCTATTCAG
TAAACGTATATTCTATATGC

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich zuerst bei Herrn Dr. Tobias Köllner bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat dieses interessante Thema am Max-Planck-Institut für chemische Ökologie bearbeiten zu dürfen. Außerdem bedanke ich mich bei ihm für die stetige Unterstützung, vor allem während der Schreibphase, und konstruktive Anregungen.

Ganz besonderen Dank schulde ich Vinzenz Handrick, der mich während meiner gesamten Praxis- und Schreibphase mit viel Geduld betreut hat.
Danke, dass du dein Wissen mit mir geteilt hast und auch die anstrengensten Fragen immer mit Gelassenheit über dich hast ergehen lassen. Danke auch für die vielen hilfreichen Anregungen zur Verbesserung meiner Arbeit, sowohl im Labor als auch beim Schreiben. Ohne deine Hilfe wäre die Arbeit wohl nur halb so gut geworden.

Außerdem möchte ich allen meinen Kollegen der Biochemie-Abteilung für die wunderbare Zusammenarbeit, die netten Gespräche und die angenehme Arbeitsatmosphäre danken. Jeder einzelne von euch hat seinen Teil dazu beigetragen die Zeit zu etwas besonderem zu machen.

Abschließend möchte ich meinem Hochschulbetreuer Herrn Prof. Dr. Thomas Munder danken, der die Betreuung dieser Arbeit übernommen hat und mir bei allen noch so kleinen Fragen helfend zur Seite stand.

Selbstständigkeitserklärung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Bachelorarbeit selbstständig verfasst und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt, nur die angegebenen Quellen genutzt und die in den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe. Die Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner andern Prüfungsbehörde vorgelegen.

Ort, Datum

Unterschrift (Selina Seçinti)