

Friedrich-Schiller-Universität Jena
Biologisch-Pharmazeutische Fakultät
Max-Planck-Institut für chemische Ökologie
Abteilung Biochemie
Arbeitsgruppe Biosynthese und Funktion flüchtiger
Stoffe in Gehölzpflanzen und Gräsern



seit 1558

Identifizierung und Charakterisierung von Aldoxim-
produzierenden P450 Enzymen im Mais

Diplomarbeit

zur Erlangung des Grades eines

Diplom-Biochemikers

vorgelegt von

Philipp Zeltner

aus Jena

Jena, im Februar 2014

Gutachter:

Dr. Tobias G. Köllner

Prof. Dr. Jonathan Gershenzon

Abkürzungsverzeichnis

2-/3-MBA	2-/3-Methylbutyraldoxim
2-MNB	2-Methylnitrobutan
2-MPA	2-Methylpropyraldoxim
ACT1	Actin 1
AS	Aminosäure
BC	Benzylcyanid
cDNA	<i>copy DNA</i>
CPR	NADPH-Cytochrom P450-Oxidoreduktase
C-Terminus	Carboxyl-Terminus
C _q	<i>critical quantification cycle</i>
CYP	Cytochrom P450 Monooxygenase
DMNT	4,8-Dimethyl-1,3,7-nonatrien
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTPs	Desoxyribonukleotidtriphosphate
dsDNA	<i>double strand DNA</i>
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FAD	Flavinadenindinukleotid
FG	Frischgewicht
FID	Flammenionisierungsdetektor
FMN	Flavinmononukleotid
fwd	<i>forward</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
GLV	<i>green leaf volatiles</i>
HG	<i>house keeping gene</i>
HTS	<i>halt transfer signal</i>
IAA	Indol-3-essigsäure
IAO _x	Indol-3-acetaldoxim
IS	Interner Standard n-Nonylacetat
JA	Jasmonsäure

LB	Luria-Bertani
LC	Flüssigchromatographie
LUG	Transkriptionsrepressor Leunig
MEP	Membran-Protein PB1A10.07c
K_M	Michaelis-Menten-Konstante
MRM	<i>multiple reaction monitoring</i>
N-Terminus	Amino-Terminus
NAD(P)H	Nicotinamidadeninukleotid(phosphat)
ORF	<i>open reading frame</i>
P450	Cytochrom P450 Monooxygenase
PAOx	Phenylacetaldoxim
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
qRT-PCR	quantitative „ <i>Realtime-PCR</i> “
rev	<i>reverse</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
Rpb1	RNA-Polymerase Untereinheit B1
rpm	<i>rotations per minute</i>
SC	<i>synthetic complete</i>
SRS	<i>substrate recognition site</i>
BLAST	<i>basic local alignment search tool</i>
TIC	<i>total ion chromatogram</i>
TMD	Transmembrandomäne
TMTT	4,8,12-Trimethyltrideca-1,3,7,11-tetraen

INHALT

1	Einleitung	1
1.1	Chemische Verteidigungsmechanismen in Pflanzen.....	1
1.2	Cytochrom P450 Monooxygenasen in der Biosynthese pflanzlicher Naturstoffe	1
1.3	Struktur pflanzlicher Cytochrom P450 Monooxygenasen.....	3
1.4	Kofaktoren von Cytochrom P450 Monooxygenasen.....	4
1.5	Aldoxime – Struktur, Biosynthese und Funktion in Pflanzen.....	5
1.6	Ziel der Arbeit	7
2	Material und Methoden	9
2.1	Chemikalien	9
2.2	Pflanzenmaterial <i>Zea mays</i>	9
2.3	<i>Spodoptera littoralis</i> (Boisd.) [Lepidoptera: Noctuidae].....	9
2.4	Mikrobiologische Methoden	9
2.4.1	Medien	9
2.4.2	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	10
2.4.3	Transformation von <i>Escherichia coli</i>	10
2.4.4	Kultivierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10
2.4.5	Transformation von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	11
2.5	Isolierung von RNA und DNA	11
2.5.1	Isolierung von RNA aus Pflanzenmaterial.....	11
2.5.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i>	12
2.6	DNA Techniken	12
2.6.1	Oligonukleotide.....	12
2.6.2	Vektoren.....	13
2.6.3	cDNA-Synthese	13
2.6.4	PCR.....	14
2.6.5	Agarose-Gelelektrophorese.....	18
2.6.6	Gelextraktion von DNA	18

2.6.7	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	19
2.6.8	Restriktionsverdau von DNA.....	19
2.6.9	Ligation in pCR® Blunt-II TOPO®	20
2.6.10	Ligation in pESC-Leu2d	20
2.7	Proteinbiochemische Methoden.....	21
2.7.1	Proteinexpression in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	21
2.7.2	Mikrosomenextraktion	21
2.7.3	Aktivitätsbestimmung	22
2.8	Chemische Analytik.....	22
2.8.1	Induktion von <i>Zea mays</i> durch Herbivorie und mechanische Verwundung	22
2.8.2	Aminosäurefütterung	23
2.8.3	Duftsammlung von <i>Zea mays</i>	23
2.8.4	Gaschromatographische Analyse des Duftprofils mit GC-MS und GC-FID	24
2.8.5	Extraktion von Aldoximen.....	24
2.8.6	Analyse der Pflanzenextrakte und Enzymassays mit LC-MS/MS.....	24
2.9	Computergestützte Analytik	25
2.9.1	Genidentifikation, DNA- und Proteinsequenzanalyse	25
2.9.2	Statistische Auswertung.....	26
3	Ergebnisse und Auswertung.....	27
3.1	<i>Zea mays</i> var. Delprim emittiert stickstoffhaltige Duftstoffe	27
3.2	Induzierte Keimlinge der Maislinie Delprim produzieren nicht-volatile aromatische Aldoxime.....	30
3.3	Volatile Aldoxime und andere potentielle Aminosäurederivate im Duftprofil von <i>Zea mays</i> nach Aminosäurefütterung.....	30
3.4	Aromatische Aldoxime im Pflanzenmaterial von <i>Zea mays</i> nach Aminosäurefütterung	32
3.5	Das Genom der Maislinie Delprim enthält vier potentielle <i>CYP79</i> -Gene	33
3.6	Sequenzmotive und phylogenetische Analyse von <i>CYP79</i> -Enzymen der Maislinie Delprim	34

3.7	Enzymatische Aktivität heterolog exprimierter CYP79	37
3.8	Funktionelle Charakterisierung von CYP79-1 aus <i>Zea mays</i> var. Delprim.....	38
3.9	Quantitative „Realtime-PCR“-Analyse der Expression des <i>CYP79-1</i> -Gens in <i>Zea mays</i> var. Delprim	39
4	Diskussion.....	42
4.1	Die Maislinie Delprim emittiert nach Herbivorie ein komplexes Duftbouquet, das auch volatile aliphatische Aldoxime und Nitroverbindungen beinhaltet.....	42
4.2	Die in Maispflanzen identifizierten aromatischen Aldoxime Phenylacetaldoxim und Indol-3-acetaldoxim könnten in verschiedensten Stoffwechselwegen eine Rolle spielen	45
4.3	Das Enzym CYP79-1 der Maislinie Delprim zeigt <i>in vitro</i> funktionelle Aktivität und weist als einziges der vier identifizierten Enzyme alle CYP79-spezifischen Sequenzmotive auf	47
4.4	Heterolog exprimiertes CYP79-1 katalysiert die Bildung von Phenylacetaldoxim und Indol-3-acetaldoxim <i>in vitro</i>	49
4.5	CYP79-1 aus Mais ist nahe mit anderen CYP79-Enzymen verwandt, die aromatische Aminosäuren als Substrate akzeptieren, besitzt aber eine breitere Substratspezifität	50
4.6	Die Analyse der Expression von <i>CYP79-1</i> in Mais durch quantitative „Realtime-PCR“ und die Ergebnisse der Aminosäurefütterung deuten auf eine Rolle von CYP79-1 in der Bildung von PAOx und IAOx <i>in vivo</i> hin	51
4.7	Ausblick	52
5	Zusammenfassung.....	54
6	Danksagung.....	55
7	Literaturverzeichnis.....	56
8	Selbstständigkeitserklärung.....	67
9	Anhang	68
9.1	Daten der Duftsammlungen	68
9.2	Daten der MeOH/H ₂ O-Extrakte.....	70
9.3	DNA-Sequenzen	71

1 Einleitung

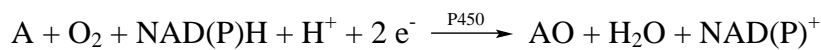
1.1 Chemische Verteidigungsmechanismen in Pflanzen

Pflanzen waren im Verlauf ihrer Evolution stets einem massiven Druck durch Herbivoren und Pathogene ausgesetzt. Doch Pflanzen verfügen nicht über die Fähigkeit der freien Ortsbewegung. Stattdessen entwickelte sich die Produktion sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe (=Naturstoffe) als die wichtigste pflanzliche Verteidigungsstrategie gegen diese Fressfeinde. Bis heute sind mehr als 200.000 pflanzliche Naturstoffe identifiziert worden. Die wichtigsten Gruppen dieser Naturstoffe bilden die Phenole, die Terpenoide und die stickstoffhaltigen Naturstoffe (Wu & Chappell, 2008). Pflanzliche Naturstoffe können in der direkten Verteidigung beispielsweise als Gifte oder Abwehrstoffe (Repellantien) wirken (Bernasconi et al., 1998, De Moraes et al., 2001). Alternativ können sie in der indirekten Verteidigung im Rahmen tritrophischer Interaktionsbeziehungen als Signalstoffe für Predatoren dienen (Turlings et al., 1990; Takabayashi et al., 1995; Degenhardt, 2009; Unsicker et al., 2009). Die Biosynthese und Emission dieser Naturstoffe erfolgt in vielen Fällen nicht konstitutiv, sondern wird erst durch die Präsenz von Herbivoren induziert (Gouinguene et al., 2003; Smith & Boyko, 2007). Verantwortlich dafür sind Substanzen, die von Herbivoren oder Pathogenen produziert und durch die Pflanze erkannt werden, sogenannte Elicitoren (Frey et al., 2000; Lawrence & Novak, 2004). Diese aktivieren die Expression von Genen, deren Produkte dann für die Biosynthese pflanzlicher Abwehrstoffe verantwortlich sind. So induziert beispielsweise Raupenfrass an Mais (*Zea mays*) die Transkription von Genen, die an der Terpenbiosynthese und der weiterer volatiler Naturstoffe beteiligt sind (Schnee et al., 2002, Gouinguene et al., 2003). Die Vermittlung dieser von Elicitoren ausgelösten Signale in der Pflanze verläuft häufig über das Pflanzenhormon Jasmonsäure (JA), das die Expression einer Vielzahl pflanzlicher Gene kontrolliert, die in der Verteidigung eine Rolle spielen (Krumm et al., 1995; Reymond & Farmer, 1998).

1.2 Cytochrom P450 Monooxygenasen in der Biosynthese pflanzlicher Naturstoffe

Cytochrom P450 Monooxygenasen (CYP, P450) kommen in allen Domänen des Lebens vor und spielen eine wichtige Rolle in verschiedensten anabolen und katabolen Stoffwechselwegen wie der Biosynthese von Steroidhormonen, Naturstoffen pro- und eukaryotischen Ursprungs oder auch bei Entgiftungsreaktionen hydrophober Toxine (Nielsen & Møller, 2005; Miller & Auchus, 2011; Podust & Sherman, 2012). In Pflanzen katalysieren diese oxidativen Hämproteine eine Vielzahl stereo- und/oder regiospezifischer

Oxygenierungsreaktionen des Sekundärmetabolismus und tragen dadurch maßgeblich zur strukturellen Diversität pflanzlicher Naturstoffe bei (Morant et al., 2003; Hrycay & Bandiera, 2012). Dazu binden und reduzieren P450 molekularen Sauerstoff am zentralen Eisenion ihres prosthetischen Häms. In typischen Reaktionen von P450 wird eines der Sauerstoffatome in Form von Wasser freigesetzt und das zweite auf ein (meist) hydrophobes Substrat übertragen (daher der Term „Monooxygenase“). Die Gleichung dieser Reaktionen lässt sich zur folgenden Formel zusammenfassen:



Dabei repräsentiert A das Substrat und AO das monooxygenierte Substrat. (Hrycay & Bandiera, 2012). Abhängig von der jeweiligen P450 werden dabei beispielsweise Hydroxylierungen, Epoxygenierungen oder C-C-Bindungsspaltungen sowie eine Vielzahl anderer Reaktionen katalysiert (Halkier, 1996; Schuler & Rupasinghe, 2011; Podust & Sherman, 2012).

Die historisch bedingte Bezeichnung „Cytochrom P450“ ist darauf zurückzuführen, dass Kohlenmonoxid-Bindung an das reduzierte Fe^{II}-Ion der Hämgruppe in einer für alle P450 charakteristischen Verschiebung des Absorptionsmaximums (des so genannten Soret-Peaks) zu einer Wellenlänge von 450 nm resultiert. Anhand dessen wurden die ersten P450 als CO-bindende Pigmente – ohne Kenntnis ihrer Funktion – in Mikrosomen der Rattenleber identifiziert (Klingenberg, 1958; Omura & Sato, 1964).

P450 stellen eine der größten Superfamilien von Genen in Pflanzengenomen dar und machen ca. 1 % der in Pflanzen identifizierten Gene aus (Nelson et al., 2008). Circa 5.100 der 14.000 zum jetzigen Zeitpunkt bekannten Sequenzen von P450 stammen aus Pflanzen – mehr als aus jeder anderen Domäne des Lebens (Nelson, 2011). Zur Zeit werden die pflanzlichen P450 in 127 Familien eingeteilt, die 11 phylogenetischen Clans zugeordnet werden (Hamberger & Bak, 2013). Ursprünglich wurde angenommen, dass die Monooxygenasen des Clans CYP71 (der früheren A-Typ-P450) in den für Pflanzen spezifischen Stoffwechselwegen wie beispielsweise der Biosynthese der Lignine, Flavanoide oder cyanogenen Glykoside involviert sind, während die P450 der anderen Clans (die früheren Nicht-A-Typ-P450) Reaktionen in eher basalen Stoffwechselwegen wie der Biosynthese von Sterolen oder der Lipidoxygenierung katalysieren (Durst & Werck-Reichhardt, 1995; Durst & Nelson, 1995). Durch eine steigende Anzahl von Beispielen, in denen P450 anderer Clans für den

pflanzenspezifischen Metabolismus rekrutiert wurden, ist inzwischen aber gezeigt worden, dass diese vereinfachende Sichtweise nicht mehr haltbar ist (Hamberger & Bak, 2013)

1.3 Struktur pflanzlicher Cytochrom P450 Monooxygenasen

Eukaryotische Cytochrom P450 Monooxygenasen sind an mikrosomale Membranen gebundene ~ 50-70 kDa große Hämproteine. Der extreme N-Terminus weist einen Abschnitt hydrophober Aminosäuren auf, der als Membrananker der P450 fungiert – die Transmembrandomäne (TMD) (Williams et al., 2000). Dahinter liegt ein Lys- und Arg-reicher Abschnitt, der als „halt transfer signal“ (HTS), also zum Stop der Translokation und damit der Membraninsertion dient (Sakaguchi et al., 1984). Dieser N-terminale Bereich wird durch eine Pro-reiche Sequenz, die oft das Motiv PPXP aufweist, mit dem C-terminalen, katalytisch aktiven Teil des Enzyms verbunden (Halkier, 1996).

Der katalytisch aktive, im Cytoplasma lokalisierte Teil besteht aus zwei Domänen, die anhand ihrer Sekundärstrukturen als α - und β -Domäne bezeichnet werden (Werck-Reichhardt & Feyereisen, 2000).

Die β -Domäne ist in der Substraterkennung und -bindung involviert und relativ schwach konserviert (Werck-Reichhardt & Feyereisen, 2000). Die Substraterkennung durch eukaryotische P450 wird vornehmlich durch sechs Regionen – so genannte substrate recognition sites (SRS) – vermittelt (Gotoh, 1992; Halkier, 1996). Diese liegen über die gesamte Primärsequenz verteilt.

Die α -Domäne enthält das vor allem aus α -Helices aufgebaute aktive Zentrum des Enzyms, in dem einen Protoporphyrin-IX-Ring mit zentralem Eisenion als prosthetische Gruppe gebunden ist (Werck-Reichhardt & Feyereisen, 2000). Deren Bindung an das Apoprotein wird durch ein hochkonserviertes Cysteinat vermittelt, das als fünfter, axialer Ligand des Eisenions dient. Dieses Cysteinat liegt in der sogenannten Hämbindedomäne („heme binding loop“). Die Konsensussequenz PFGXGRRXCXG dieser Schlaufe stellt das charakteristischste Sequenzmotiv der P450 Monooxygenasen dar (Bak et al., 2006). Daneben finden sich in den Sequenzen von P450-Enzymen, die ansonsten nur eine geringe Sequenzidentität (10-30%) zeigen, noch drei weitere konservierte Motive (Halkier, 1996). Stromaufwärts der Hämbindedomäne liegt das so genannte PERF-Motiv, das wahrscheinlich an der Substratbindung und -orientierung beteiligt ist (Bak, 2006).

Desweiteren findet man das absolut konservierte EXXR-Motiv in, das über elektrostatische Interaktionen zur Stabilisierung des aktiven Zentrums beiträgt (Hasemann et al., 1995). Das zweite Motiv ist die so genannte „P450 Signatur“ (Halkier, 1996; Werck-Reichhardt &

Feyereisen, 2000). Diese weist die Konsensussequenz (A/G)GC(D/E)T(T/S) mit dem in den meisten Familien hochkonservierten Thr auf (Furuya et al., 1989; Imai & Nakamura, 1989; Halkier, 1996). Es wird vermutet, dass diese Sequenz die Furche für den Protonentransfer auf der distalen Seite des Häms bildet und an der Spaltung des molekularen Sauerstoffs beteiligt ist (Werck-Reichardt & Feyereisen, 2000).

1.4 Kofaktoren von Cytochrom P450 Monooxygenasen

Für viele typische Oxidationsreaktionen benötigen P450 molekularen Sauerstoff und zwei Elektronen (Hannemann et al., 2007). Die Elektronen werden dabei durch Flavoproteine oder andere Eisen-Schwefel-Proteine von der jeweiligen Elektronenquelle auf das Eisenion der Hämfunktion der P450 übertragen.

P450 werden anhand dessen, ob und welche Komponenten am Transfer der für die Reduktion benötigten Elektronen auf das aktive Zentrum beteiligt sind, in neun Klassen eingeteilt (Hannemann et al., 2007). Pflanzliche P450 gehören fast ausschließlich zu den mikrosomalen P450-Systemen der Klasse II, die aus zwei integralen Membranproteinen, einer P450 und einer NADPH-Cytochrom P450-Oxidoreduktase (CPR) bestehen (Jensen & Møller, 2010). CPR sind ~70-80 kDa große Flavoproteine und bestehen aus einer N-terminalen FMN-

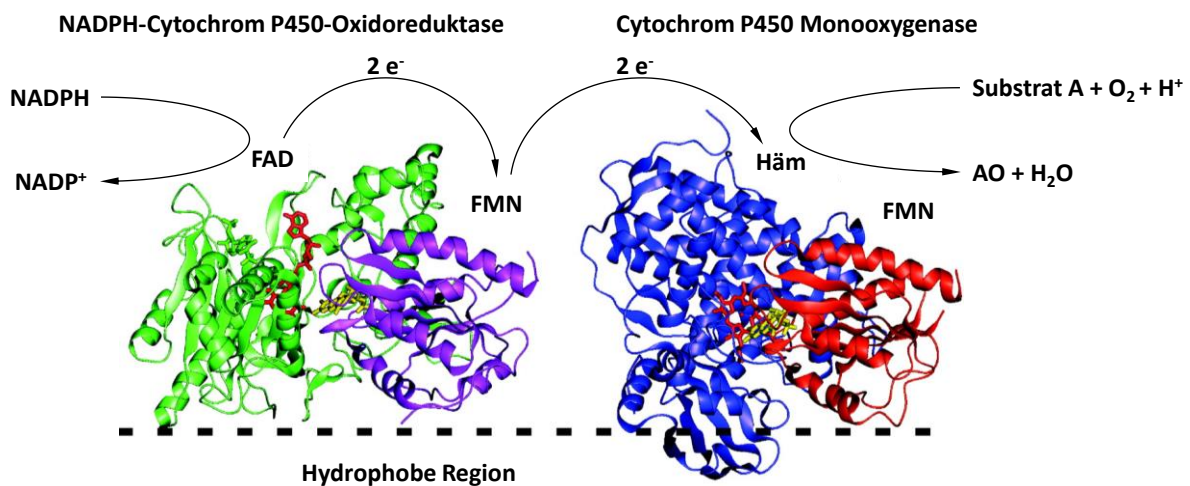


Abbildung 1.1: Elektronentransport von NADPH über die NADPH-Cytochrom P450-Oxidoreduktase (CPR) auf das aktive Zentrum der P450 Monooxygenase (P450). NADPH wird an der NADPH- und FAD-Bindedomäne (grün) der CPR oxidiert und die Elektronen über FAD (rot) auf das FMN (gelb) der N-terminalen FMN-Bindedomäne (violett bzw. rot) übertragen. Diese Domäne (rechts in rot) interagiert mit der P450 (blau) und überträgt die Elektronen auf die Häm-Bindedomäne (rot) im aktiven Zentrum der P450. Dort werden die Elektronen in zwei Schritten auf den gebundenen Sauerstoff übertragen. Eines der Sauerstoffatome wird in Form von Wasser freigesetzt, das zweite auf ein (meist hydrophobes) Substrat A übertragen. Da in dieser Abbildung Kristallstrukturen von CPR und P450 gezeigt sind, fehlen die hydrophoben Membrananker von CPR und P450. In den nativen Proteinen befänden sie sich auf der gezeigten hydrophoben Seite. Abbildung verändert nach Bayburt & Sligar, 2002. (NADPH – Nicotinamidadenindinukleotidphosphat, FAD – Flavinadenindinukleotid, FMN – Flavinmononukleotid)

Bindedomäne und einer C-terminalen NADPH- und FAD-Bindedomäne. Sie binden und oxidieren NADPH an ihrer C-terminalen Domäne und übertragen die Elektronen über ihre FAD-Domäne und die FMN-Domäne auf das Eisen der Hämfunktion in P450. Die korrekte Positionierung der CPR zur Interaktion mit der P450 wird dadurch gewährleistet, dass der N-Terminus der CPR einen hydrophoben Abschnitt enthält, der der Membranverankerung dient (Bonina et al., 2005). In Pflanzen existieren je nach Spezies ein bis drei paraloge CPR, die ihrerseits mit diversen P450 interagieren können (Koopmann & Hahlbrock, 1997; Ohta & Mizutani, 1998; Ro et al., 2002).

1.5 Aldoxime – Struktur, Biosynthese und Funktion in Pflanzen

Aldoxime sind N-hydroxylierte Aldimine und werden in Pflanzen durch P450 der Familie 79 (CYP79) aus den korrespondierenden Aminosäuren synthetisiert (Hamberger & Bak, 2013). Die Hydroxylfunktion kann dabei in (*E*)- oder (*Z*)-Konformation angeordnet sein. Sie spielen sowohl in der direkten als auch der indirekten pflanzlichen Verteidigung eine wichtige Rolle. Zunächst stellt die Synthese von Aldoximen durch CYP79 den initialen Schritt in der Biosynthese vieler Substanzklassen dar, die der direkten Abwehr von Herbivoren dienen (Bak et al., 1998; Halkier & Wittstock, 2000; Halkier et al., 2003; Naur et al., 2003; Forslund et al., 2004; Bak et al., 2006; Halkier & Gershenzon, 2006).

Die prominenteste dieser Klassen bilden die cyanogenen Glykoside (α -Hydroxynitril- β -glucoside). Diese wurden bereits in über 2.650 Pflanzenarten aus 130 Familien der Pteridophyten (Farne), der Gymnospermen (Nacktsamer) und der Angiospermen (Bedecktsamer) nachgewiesen (Bak et al., 2006). Cyanogene Glykoside sind als Phytoanticipine klassifiziert. Sie werden in den Vakuolen der Pflanzenzelle gespeichert und bei Gewebeschädigung durch β -Glykosidasen und α -Hydroxynitrilasen degradiert. Dies resultiert in der Freisetzung von toxischer Blausäure, einem Aldehyd oder Keton sowie Glucose (Bak et al., 2006; Morant et al., 2008).

Die erste für den initialen Schritt der Biosynthese eines cyanogenen Glykosids verantwortliche P450, die identifiziert wurde, ist die multifunktionale, atypische CYP79A1 aus der Mohrenhirse (*Sorghum bicolor* L. Moench) (Sibbesen et al., 1994) Es katalysiert die Umwandlung von L-Tyr zu *p*-Hydroxyphenylacetaldoxim (Koch et al., 1995; Sibbesen et al., 1995). Dies ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Biosynthese des in *S. bicolor* prominenten cyanogenen Glykosids Dhurrin (Møller & Conn, 1980; Halkier & Møller, 1989). Das Aldoxim wird dann von einer weiteren atypischen, multifunktionalen P450, CYP71E1, zum *p*-Hydroxymandelonitril, einem instabilen α -Hydroxynitril, umgewandelt und durch die

lösliche UDPG-Glukosyltransferase UGT85B1 zum Dhurrin glucosyliert (Halkier et al., 1989; Kahn et al., 1997; Jones et al., 1999; Møller et al., 1999; Hansen et al., 2003). Da in *S. bicolor* keine Intermediate dieses Stoffwechselweges detektierbar sind, wird angenommen, dass die beteiligten Enzyme einen Proteinkomplex, ein so genanntes Metabolon, bilden. Dieses sorgt für eine Weiterleitung der für die Pflanze sonst teilweise toxischen Intermediate (Møller & Conn, 1980; Møller, 2010).

Neben dem vom L-Tyr abgeleiteten Dhurrin finden sich in Pflanzen auch von anderen Aminosäuren abgeleitete cyanogene Glykoside, die ebenfalls durch CYP79-Enzyme gebildet werden (Møller & Nielsen, 1999; Andersen et al., 2000; Forslund et al., 2004). Beispielsweise katalysieren CYP79D3 und CYP79D4 in *Lotus japonicus* die Umwandlung von L-Val und L-Ile in das korrespondierende 2-Methylpropyl- bzw. 2-Methylbutyraldoxim (2-MPA und 2-MBA) (Forslund et al., 2004). Diese Reaktion stellt den ersten Schritt der Bildung der aliphatischen cyanogenen Glykoside Linamarin und Lotaustralin sowie der nicht cyanogenen Rhodocyanoside A und D dar (Forslund et al., 2004; Saito et al., 2012).

Die Biosynthese der Glucosinolate, der wichtigsten Abwehrstoffe in Brassicaceen, verläuft ebenfalls über einen durch CYP79 katalysierten Schritt (Wittstock & Halkier, 2000; Halkier et al., 2003; Naur et al., 2003). Das Auftreten von CYP79-Homologen deutet auf evolutionäre Konservierung der Bildung von Aldoximen durch CYP79 in der Biosynthese von cyanogenen Glykosiden und Glucosinolaten hin (Bak et al., 1998). Das in *Arabidopsis thaliana* durch CYP79B2 und CYP79B3 aus L-Trp gebildete Indol-3-acetaldoxim (IAOx) stellt dabei nicht nur ein Intermediat der Biosynthese von Indolglucosinolaten dar (Mikkelsen et al., 2000). Auch das Phytoalexin Camalexin wird über IAOx als Intermediat gebildet (Hull et al., 2000; Mikkelsen et al., 2000). Daneben ist IAOx auch eine der möglichen Zwischenstufen der Biosynthese des Auxins Indol-3-essigsäure (IAA) (Zhao et al., 2002; Pollmann et al., 2006). Aldoxime sind also Intermediate nicht nur des Sekundär- sondern auch des Primärmetabolismus.

Abgesehen von ihrer Rolle als biosynthetische Zwischenstufen von Abwehrstoffen besitzen auch die Aldoxime selbst toxische Eigenschaften sowohl für Pilze als auch für Mammalia (Drumm et al., 1995; Møller, 2010; Bartosova et al., 2006). Erst vor kurzem konnte demonstriert werden, dass das von *Populus trichocarpa* gebildete Phenylacetaldoxim (PAOx) fals Frassgift bei Raupen des Schwammspinners (*Lymantria dispar*) zu signifikant verringerten Überlebensraten und einer verlangsamten Entwicklungsgeschwindigkeit führt (Irmisch et al., 2013).

Desweiteren werden volatile Aldoxime von verschiedenen Pflanzen als Duftkomponenten abgegeben (eine Übersicht findet sich bei Knudsen et al., 2006). Die Blüten vieler nachtblühender Pflanzen, die durch Motten bestäubt werden, setzen aliphatische und aromatische Aldoxime als Duftstoffe frei (Kaiser, 1993; Raguso, 2003). Es wird angenommen, dass diese volatilen Aldoxime als attraktive Signalstoffe für Bestäuber dienen (Vergara et al., 2011).

Die Infektion mit Pathogenen oder Herbivorie durch Insekten resultiert bei einigen Pflanzen auch in der Freisetzung volatiler Aldoxime aus vegetativen Organen (van den Boom et al., 2004; Zhang & Hartung, 2005). Eine Infektion der Blätter mit dem Bakterium *Xanthomonas axonopodis* cv. citri, dem Verursacher des Zitruskrebses, führt bei der Grapefruit (*Citrus x paradisi*) zur Emission von Phenylacetaldehyd-O-methyloxim (Zhang & Hartung, 2005). Der Befall mit Spinnmilben (*Tetranychidae*) löst bei einer Reihe von Pflanzen die Emission aliphatischer Aldoxime aus (Takabayashi et al., 1991, 1994; van den Boom et al., 2004). Die westliche Balsampappel (*Populus trichocarpa*) und die Schwarzpappel (*Populus nigra*) synthetisieren ebenfalls aliphatische und aromatische volatile Aldoxime, deren Produktion und Emission durch Herbivorie von Raupen des Schwammspinners (*Lymantria dispar*) signifikant induziert werden (Irmisch et al., 2013, 2014). Irmisch et al. (2013) konnten hier zum ersten Mal nachweisen, dass die Biosynthese volatiler Aldoxime ebenfalls durch CYP79 katalysiert wird.

1.6 Ziel der Arbeit

Aufgrund der vielfältigen Rollen von Aldoximen in der chemischen Verteidigung von Pflanzen sind Untersuchungen zu ihrem Vorkommen und ihrer Biosynthese in Nutzpflanzen wie Mais nicht nur von akademischem Interesse. Denn trotz des massiven Einsatzes von chemischen Pestiziden entstehen im Maisanbau jährliche Ertragsminderungen von über 30 % weltweit – maßgeblich verursacht durch Herbivoren, Pathogene und kompetitive Wildpflanzen (Oerke et al., 2006). Gleichzeitig wird die Verwendung von Pestiziden aufgrund von Folgeschäden für Mensch und Umwelt zunehmend eingeschränkt. Daher ist man dazu übergegangen, intensiv nach integrativen Konzepten des Nutzpflanzenschutzes zu suchen (Birch et al., 2011). Im Rahmen solcher Konzepte spielt der biologische Pflanzenschutz eine zentrale Rolle, für den endogene chemische Verteidigungs-mechanismen der Pflanzen wie die Biosynthese von Aldoximen genutzt werden sollen.

In der Literatur ist jedoch nur unzureichend untersucht, ob *Zea mays* ebenfalls dazu in der Lage ist, Aldoxime und von diesen abgeleitete Naturstoffe zu bilden. Hinweise auf das

Auftreten von Aldoximen und Nitrilen in Maispflanzen finden sich bislang nur bei Takabayashi und bei Turlings (Takabayashi et al., 1995; Turlings et al., 1998). Takabayashi et al. (1995) beschreiben die Detektion O-methylierter aliphatischer Aldoxime und Nitrile im Duft von *Zea mays* des Cultivars „Royal Dent“ nach Herbivorie durch die asiatische Reiseule *Pseudaletia separata*. Allerdings wurden diese nicht anhand synthetischer Standards sondern nur über den Abgleich der erhaltenen Massenspektren mit Datenbanken identifiziert. Turlings et al. (1998) beschreiben „unbekannte, Stickstoff-haltige Substanzen“ („unknown nitrogen-containing compounds“) im Duftbouquet von Maispflanzen der Linie LG11 nach Herbivorie durch Raupen des Maiszünslers (*Ostrinia nubilalis*) und machen damit keine nähere Aussage zur chemischen Natur dieser Substanzen.

Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob der Mais Aldoxime produziert und der mögliche genetische und enzymatische Hintergrund ihrer Biosynthese aufgeklärt werden. Damit sollte einer der vielen Beiträge zum detaillierten Verständnis pflanzlicher Abwehrmechanismen auf molekularer Ebene geleistet werden, mit deren Hilfe möglicherweise zukünftig biologischer Pflanzenschutz betrieben werden kann.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von der Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

2.2 Pflanzenmaterial *Zea mays*

Für die Untersuchungen an *Zea mays* subsp. *mays* wurden Pflanzen der Hybridlinie Delprim (DSP1387C[Dent] x DSP1743A[Flint]; DSP AG, Delley, Schweiz) verwendet.

Die Maispflanzen wurden in Tonsubstrat (Klasmann GmbH, Groß-Hesepe, Deutschland) angezogen. Die Kultivierung erfolgte 7 bzw. 14 Tage in Klimakammern (York International, York, USA) mit einer Tagphase von 16 h (1 mmol/m²/s Lichtstärke, Temperatur 24°C, 60 % relative Luftfeuchtigkeit) und einer Nachtphase von 8 h (Temperatur 20°C, 60 % relative Luftfeuchtigkeit).

2.3 *Spodoptera littoralis* (Boisd.) [Lepidoptera: Noctuidae]

Für die Induktion der Maispflanzen durch Herbivorie wurden Raupen von *S. littoralis* (Baumwolleule) verwendet. Die Eier wurden von Aventis (Frankfurt a.M., Deutschland) oder Syngenta (Basel, Schweiz) geliefert. Die geschlüpften Raupen wurden für 10-15 Tage bei 22°C und einer Lichtstärke von 750 µmol/m²/s auf Weizenkeimextrakt (Heliothis Mix, Stonefly Industries, Bryan, USA) in Kunststoffgefäßen angezogen.

2.4 Mikrobiologische Methoden

2.4.1 Medien

LB-Medium: 25 g LB-Medium (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) / 1 l *aqua dest.*

LB-Agar: 32 g LB-Agar (GibcoBrl, Karlsruhe, Deutschland) / 1 l *aqua dest.*

SOC-Medium 2% (m/v) Trypton, 0,5% (m/v) Hefeextrakt, 20 mM Glucose, 10 mM NaCl, 2,55 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)

YPGA-Medium 7 g Hefeextrakt (Sigma Aldrich, Taufkirchen), 7 g Bactopepton / 1 l *aqua dest.*, pH 7,3; mit 20 g/l Glucose (YPGA(Glc)) bzw. 20 g/l Galaktose (YPGA(Gal))

YPGA(Glc)-Agar YPGA(Glc)-Medium, 15 g Agar (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)

SC-Leu-Medium 6,9 g Hefe-Stickstoff-Basismedium ohne Aminosäuren, 10 mg „Yeast synthetic drop-out medium supplements“ (enthält je 76 mg L-Ala, L-

Arg, L-Asn, L-Asp, L-Cys, L-Gln, L-Glu, L-Gly, L-His, *myo*-Inositol, L-Ile L-Lys, L-Met, L-Phe, L-Pro, L-Ser, L-Thr, L-Trp, L-Tyr, Uracil, L-Val, 18 mg Adenin, 8 mg *p*-Aminobenzoesäure) (beide Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland), 5 g Glucose / 1 l *aqua dest.*,

SC-Leu-Agar SC-Leu-Medium, 15 g Agar (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)

2.4.2 Kultivierung von *Escherichia coli*

Für alle Klonierungsexperimente wurde der *Escherichia coli*-Stamm OneShot® TOP10 (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland,) verwendet, der den Genotyp F *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *araD139* Δ (*ara-leu*)7697 *galU galK rpsL* (Str^R) *endA1 nupG* besitzt. Die Kultivierung erfolgte auf LB-Agar-Platten bei 37°C im Brutschrank bzw. in flüssigem LB-Medium im Schüttelinkubator bei 37°C und 220 rpm. Dem Medium wurden 100 µg/ml Ampicillin bzw. 50 µg/ml Kanamycin (beide Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) zugesetzt. Die Kultivierungsdauer betrug 12-16 h.

2.4.3 Transformation von *Escherichia coli*

Die Transformation chemisch kompetenter *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) Zellen wurde mittels Hitzeschock durchgeführt. Dabei wurden 25 µl kompetente Zellen nach Zugabe von 0,5 - 5 µl Plasmid oder Ligationsansatz 20 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 45 Sekunden. Nach Abkühlung für 1 Minute auf Eis wurden 100 µl SOC-Medium zugegeben und die Zellen für 45 Minuten bei 37°C und 220 rpm geschüttelt. Anschließend wurde die Zellsuspension auf LB-Agarplatten ausplattiert und bei 37°C über Nacht (ca. 16 h) im Brutschrank kultiviert.

2.4.4 Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae*

Die heterologe Expression der pflanzlichen CYP79 erfolgte in *S. cerevisiae* W_{AT} (zur Verfügung gestellt durch Prof. Daniele Werck-Reichhardt). Dieser Stamm besitzt das Gen *AtCPR2*, das für eine pflanzliche Cytochrom P450 Reduktase (CPR) aus *Arabidopsis thaliana* kodiert (Urban et al., 1997). Die Hefen wurden zu Selektionszwecken auf SC-Leu-Agarplatten bzw. in flüssigem SC-Leu-Medium kultiviert. Für Zellvermehrung und Expressionsexperimente wurde *S. cerevisiae* W_{AT} in flüssigem YPGA-Vollmedium oder auf YPGA(Glc)-Agarplatten kultiviert. Die Kultivierung im Brutschrank erfolgte bei 28°C, die Kultivierung im Schüttelinkubator bei 28°C und 180 rpm.

2.4.5 Transformation von *Saccharomyces cerevisiae*

Für die Hefetransformation wurden zunächst 30 ml YPGA(Glc)-Medium mit *S. cerevisiae* W_{AT} angeimpft und über Nacht bei 28°C und 180 rpm angezogen. Diese Vorkulturen wurden zur Inokulation der Hauptkulturen mit einem Zielvolumen von 50 ml YPGA(Glc) und einer Ziel-OD₆₀₀ von 0,4 verwendet. Die Hauptkulturen wurden für 4 h bei 28°C und 180 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Zellsuspensionen für 5 Minuten bei 4,300 xg und 4°C zentrifugiert und in 30 ml *aqua bidest.* resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation für 5 Minuten bei 4,300 xg und 4°C wurden die Zellen in 1 ml *aqua bidest.* aufgenommen und in 2 ml-Eppendorfgefäße transferiert. Sie wurden für 30 Sekunden bei 16,100 xg und 4°C zentrifugiert, erneut in 1 ml *aqua bidest.* resuspendiert und 150 µl-Aliquote gebildet. Alle Schritte wurden, soweit nicht anders angegeben, bei 0°C durchgeführt. Die gesamte Transformation erfolgte unter sterilen Bedingungen.

Die Aliquote wurden für 30 Sekunden bei 16,100 xg und 4°C zentrifugiert, der Überschuss dekantiert und der Transformationsansatz (Tab. 2.1) zugegeben. Nach Mischen wurden die Zellen für 40 Minuten bei 42°C inkubiert. Anschließend wurde die Suspension für 30 Sekunden bei 16,100 xg zentrifugiert, in 1 ml *aqua bidest.* resuspendiert und 100/300 µl auf SC-Leu-Agarplatten ausplattiert. Diese wurden für 72 h bei 28°C im Brutschrank inkubiert. Gewachsene Kolonien wurden auf YPGA(Glc)-Agarplatten erneut ausgestrichen und weitere 72 h bei 28°C im Brutschrank kultiviert. Anschließend wurden die Platten bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

Tabelle 2.1: Transformationsansatz der Hefetransformation

	Volumen (µl)
PEG 3500 (50% w/v)	240
1 M Lithiumacetat	36
Erhitzte Träger-DNA (salmon sperm DNA 2 mg/ml)	50
1 µg Plasmid + <i>aqua bidest.</i> (steril)	34

2.5 Isolierung von RNA und DNA

2.5.1 Isolierung von RNA aus Pflanzenmaterial

Die Isolierung von RNA aus Pflanzenmaterial von *Zea mays* subsp *mays* Delprim erfolgte mithilfe des „RNeasy Plant Mini Kit“ (QIAGEN, Hilden, Deutschland). Das Pflanzenmaterial wurde in flüssigem Stickstoff gemörsert. ~70 mg des erhaltenen Materials wurden für die RNA-Extraktion eingesetzt, die nach Protokoll des Herstellers durchgeführt wurde.

2.5.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

Plasmid-DNA wurde aus über Nacht (ca. 16 h) inkubierten 3,5 ml-Flüssigkulturen mithilfe des „NukleoSpin® Plasmid“ Kit (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) gewonnen. Die Isolierung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die DNA-Konzentration wurde anschließend unter Verwendung des NanoDrop® 2000c (Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland) bestimmt (Abs. 2.6.7).

2.6 DNA Techniken

2.6.1 Oligonukleotide

Alle für diese Arbeit verwendeten Oligonucleotide wurden von der Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland) bezogen. Ihre jeweilige Bezeichnung, Sequenz und das Zielgen können Tabelle 2.2 entnommen werden.

Tabelle 2.2: Verwendete Oligonukleotid-Primer

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	Zielgen(e)
Klonierung in pCR Blunt-II TOPO		
48 fwd	ATGGTTTCCTCTCCGCAAGCA	<i>CYP79-1</i>
48 rev	CTACTTACAAAGCAAGATCCCG	<i>CYP79-1</i>
56 fwd	ATGGCGCTAGCACCTAGCCAT	<i>CYP79-2/3/4</i>
56 rev	CTAGCCAGACGCATAGAGATG	<i>CYP79-2</i>
51 rev	TTAACCGGACGCCGCATAGAG	<i>CYP79-3/4</i>
Sequenzierung und Kolonie-PCR		
M13 fwd (-20)	GTAAAACGACGGCCAG	<i>lacZ</i> (TOPO)
M13 rev	CAGGAAACAGCTATGAC	<i>lacZ</i> (TOPO)
GAL10 fwd	GGTGGTAATGCCATGTAATATG	<i>gal10</i> (pESC)
GAL10 rev	GGCAAGGTAGACAAGCCGACAAC	<i>gal10</i> (pESC)
Klonierung in pESC leu2d (Schnittstellen unterstrichen)		
79-1-NotI fwd	AAGCGGCCGCAATGGTTTCCTCTCCGCAAGCAAAT	<i>CYP79-1</i>
79-1-BglII rev	TTAGATCTCTACTTACAAAGCAAGATCCCGG	<i>CYP79-1</i>
79-2/3/4-NotI fwd	AAGCGGCCGCAATGGCGCTAGCACCTAGCCAT	<i>CYP79-2/3/4</i>
79-2-SacI rev	TTGAGCTCCTAGCCAGACGCATAGAGATG	<i>CYP79-2</i>
79-3/4-SacI rev	TTGAGCTCTTAACCGGACGCCGCATAGAG	<i>CYP79-3/4</i>
Quantitative Realtime-PCR		
qPCR-79-1 fwd	TACTGCGGGAATGTCTGTC	<i>CYP79-1</i>
qPCR-79-1 rev	GGAGACACAGAAGGAGTAGAG	<i>CYP79-1</i>
HG-GAPDH fwd	ACTGTTTCATGCCATCACTGC	<i>GAPDH</i>
HG-GAPDH rev	GAGGACAGGAAGCACTTTGC	<i>GAPDH</i>
HG-LUG fwd	TCCAGTGCTACAGGGAAGGT	<i>LUG</i>

HG-LUG rev	GTTAGTTCTTGAGCCCACGC	<i>LUG</i>
HG-MEP fwd	TGTACTCGGCAATGCTCTTG	<i>MEP</i>
HG-MEP rev	TTTGATGCTCCAGGCTTACC	<i>MEP</i>
HG-Act fwd	CCATGAGGCCACGTACAACCT	<i>Actin</i>
HG-Act rev	GGTAAAACCCCACTGAGGA	<i>Actin</i>
HG-Rbp1-1 fwd	GCTGGATGATGAGAATTGGAGACC	<i>Rbp1</i>
HG-Rbp1-1 rev	GCTTGAGGTTACAGGCATAGG	<i>Rbp1</i>
HG-Rbp1-2 fwd	AGGCGTTCCGTGACACCATC	<i>Rbp1</i>
HG-Rbp1-2 rev	CTGGCAACTTCTTCGGCTTCC	<i>Rbp1</i>

2.6.2 Vektoren

Alle verwendeten Vektoren sind in Tabelle 2.3 angegeben. Aufgeführt sind Name, Verwendungszweck, Resistenz sowie der jeweilige Hersteller.

Tabelle 2.3: Verwendete Vektoren

Name	Verwendungszweck	Resistenz	Hersteller
pCR® Blunt-II TOPO®	Subklonierung, Sequenzierung	Kanamycin	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
pESC leu2d	Expression	Ampicillin	zur Verfügung gestellt durch Prof. D. Werck-Reichhardt

2.6.3 cDNA-Synthese

Für die Synthese von cDNA wurden zunächst ~750 ng extrahierte RNA mit DNaseI (Promega, Mannheim, Deutschland) für 30 Minuten verdaut. Anschließend wurde der Verdau mit EDTA versetzt und für 10 Minuten bei 65°C inkubiert. Die cDNA-Synthese erfolgte in zwei Schritten. Im ersten Schritt wurden die Oligo(dT)₁₂₋₁₈-Primer (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) und die dNTPs zugegeben und dieser Ansatz für 5 Minuten auf 65°C erhitzt (Tab. 2.4). Im zweiten Schritt wurden „5x first strand buffer®“, „RNase out®“, DTT und die reverse Transkriptase „Superscript III®“ (alle Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) addiert (Tab. 2.5) und die cDNA-Synthese in einem „peqSTAR® 2X Gradient Thermocycler“ (PEQLAB, Erlangen, Deutschland) mit dem in Tabelle 2.6 angegebenen Programm durchgeführt.

Tabelle 2.4: Ansatz des 1. Schrittes der cDNA-Synthese

	Volumen (μl)
RNA (750 ng)	1
Oligo(dT)12-18 Primer (50 μM)	1
dNTPs (je 10 mM)	1
<i>aqua bidest.</i>	10

Tabelle 2.5: Ansatz des 2. Schrittes der cDNA-Synthese

	Volumen (μl)
5x first strand buffer	4
0,1 M DTT	1
RNase Out®	1
SuperscriptIII® (200 U/ μl)	1

Tabelle 2.6: Reaktionsbedingungen der cDNA-Synthese

Temperatur	Zeit
25°C	5'
50°C	60'
70°C	15'

2.6.4 PCR

DNA-Abschnitte von Plasmiden oder aus cDNA wurden mithilfe der Polymerasekettenreaktion spezifisch amplifiziert. Dafür wurde ein „peqSTAR® 2X Gradient Thermocycler“ (PEQLAB, Erlangen, Deutschland) eingesetzt.

2.6.4.1 PCR mit der „Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase“

Spezifische DNA-Fragmente aus cDNA oder Plasmiden wurden zu preparativen Zwecken mithilfe der „Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase“ (Phusion) (New England Biolabs, Frankfurt a.M., Deutschland), die „blunt-end“-PCR-Produkte erzeugt, unter Verwendung des zugehörigen Puffersystems amplifiziert. Daneben wurde die PCR auch zur Primer-dirigierten Einführung spezifischer Schnittstellen eingesetzt, um eine gerichtete Klonierung in den Expressionsvektor pESC-leu2d zu erlauben. Zusammensetzung und Programm der standardisierten PCR-Reaktion sind in den Tabellen 2.7 und 2.8 angegeben.

Tabelle 2.7: Ansatz der „Phusion“-PCR-Reaktion

	Volumen (µl)
5x Phusion® HF buffer	5
dNTPs (je 10 mM)	1
Forward-Primer (10 µM)	2,5
Reverse-Primer (10 µM)	2,5
Template-DNA (cDNA/50 ng/µl Plasmid)	1
Phusion® Polymerase (2 U/µl)	0,5
<i>aqua bidest.</i>	32,5

Tabelle 2.8: Standardprogramm der „Phusion“-PCR

Phase	Temperatur	Zeit	
Initiales Aufschmelzen der dsDNA-Matrize	98°C	30''	
Aufschmelzen der dsDNA	98°C	10''	} 36x
Primeranlagerung *	55-60°C	30''	
Elongation der Tochterstränge	72°C	45''	
Terminale Elongation	72°C	5'	

*Die jeweilige Temperatur variierte in Abhängigkeit von der Schmelztemperatur der verwendeten DNA-Primer und wurde jeweils 4-5°C unter dieser gewählt.

2.6.4.2 Kolonie-PCR

Die analytische Kolonie-PCR wurde zur Identifikation korrekter Transformanten und zur Größenbestimmung von Inserts verwendet. Dazu wurden Zellen der zu testenden Kolonien in den PCR-Ansatz transferiert. Zur Amplifikation wurde die „GoTaq® DNA Polymerase“ (Promega, Hilden, Deutschland) mit zugehörigem Puffer verwendet (Tab. 2.9). Die verlängerte initiale Phase des PCR-Programms diente der Desintegration der transferierten Bakterienzellen (Tab. 2.10). Zur Identifikation von auf dem pCR® Blunt-II TOPO® Vektor basierenden Plasmiden wurde das Primerpaar M13(-20) fwd/M13 rev eingesetzt, für pESC-leu2d-Konstrukte das Primerpaar Gal10 fwd/rev. Die Größe der amplifizierten DNA-Fragmente wurde anschließend durch Agarosegelelektrophorese (Abs. 2.5.5) determiniert.

Tabelle 2.9: Ansatz der Kolonie-PCR-Reaktion

	Volumen (µl)
5x GoTaq® Green buffer	5
dNTPs (je 10 mM)	0,5
Forward-Primer (10 µM)	0,5
Reverse-Primer (10 µM)	0,5
Template	gepickte Kolonie
GoTaq® DNA Polymerase (5 U/µl)	0,125
<i>aqua bidest.</i>	18,375

Tabelle 2.10: Programm der Kolonie-PCR

Phase	Temperatur	Zeit	
Initiales Aufschmelzen der dsDNA-Matrize/Zellintegration	94°C	10'	
Aufschmelzen der dsDNA	94°C	30''	} 36x
Primeranlagerung	55°C	30''	
Elongation der Tochterstränge	72°C	90''	
Terminale Elongation	72°C	5'	

2.6.4.3 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA wurde nach der Sanger-Methode mit fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden („dye terminator sequencing“) durchgeführt. Dazu wurde das „BigDye® terminator v1.1 cycle sequencing kit“ (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Abhängig von dem jeweiligen Plasmid zugrundeliegenden Vektor wurden die Primer M13(-20) fwd/M13 rev (für pCR® Blunt-II TOPO® Plasmide) beziehungsweise Gal10 fwd/Gal10 rev (für pESC-leu2d Plasmide) eingesetzt (Abs. 2.5.1). Die Zusammensetzung eines Standard-Sequenzierungsansatzes ist in Tabelle 2.11 angegeben, das entsprechende PCR-Programm in Tabelle 2.12. Die DNA wurde anschließend mit dem „DyeEx® Spin column“ Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Protokoll des Herstellers aufgereinigt. Die Analyse der Sequenzen erfolgte über Kapillargelelektrophorese und Fluoreszenzdetektion auf einem ABI Prism®-Gen-Analysator 3130xl (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland).

Tabelle 2.11: Ansatz der Sequenzierungsreaktion

	Volumen (µl)
BigDye®	2
5x BigDye® sequencing buffer	2
Plasmid (100ng/µl)	2
Primer (10 µM)	1
<i>aqua bidest.</i>	3

Tabelle 2.12: Programm der Sequenzierungs-PCR

Phase	Temperatur	Zeit	
Initiales Aufschmelzen der dsDNA-Matrize	96°C	5'	
Aufschmelzen der dsDNA	96°C	10''	} 36x
Primeranlagerung	50°C	20''	
Elongation der Tochterstränge	60°C	4'	
Terminale Elongation	60°C	5'	

2.6.4.4 Transkript-Quantifizierung von *CYP79* in Mais mittels quantitativer „Realtime-PCR“

Die quantitative „Realtime-PCR“ (qRT-PCR) wurde zur vergleichenden Analyse der Expression von *CYP79-1* in Blattmaterial Herbivorie-induzierter *Zea mays* var. Delprim und nichtinduzierter Maispflanzen verwendet.

Als Matrize diente aus isolierter Gesamt-RNA der Maispflanzen synthetisierte, 1:3 verdünnte cDNA (Abs. 2.5.3). Die Oligonukleotide für *CYP79-1* wurden so konstruiert, dass ein 146 bp langes Fragment amplifiziert wurde. Die Spezifität dieser Amplifikation wurde mittels Klonierung und Sequenzierung dieses Fragments überprüft. Als konstitutiv exprimierte Normalisierungsgene wurden *Actin (ACT1)*, *RNA-Polymerase Untereinheit B1 (Rbp1)*, *Glycerinaldehyd-3-Dehydrogenase (GAPDH)*, *Membran-Protein PB1A10.07c (MEP)* und *Transkriptionsrepressor Leunig (LUG)* geprüft (Jiang et al., 2011; Manoli et al., 2012; V. Handrick, persönliche Kommunikation). Alle Messungen wurden in Triplikaten angesetzt. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 2.2 (Abs 2.6.1) angegeben, die Zusammensetzung des Ansatzes der qRT-PCR in Tabelle 2.13 und das verwendete PCR-Programm in Tabelle 2.14. Nach jedem PCR-Zyklus wurde die amplifizierte DNA-Menge über die Fluoreszenz des in doppelsträngige DNA interkalierenden Farbstoffs SYBR green detektiert, der im eingesetzten „ultra-fast SYBR green III® Master-Mix“ (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) enthalten war. Im Anschluß an jede PCR wurde anhand einer Schmelzkurve (55-

95°C) die spezifische Bindung der Primer geprüft. Jeder Reaktion wurde ROX (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) als Referenzfarbstoff zugesetzt. Alle Experimente wurden in einem Stratagene Mx3000P System (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) durchgeführt.

Tabelle 2.13: Ansatz der qRT-PCR-Reaktion

	Volumen (µl)
SYBR green III®	10
ROX (1:500 verd.)	0,3
Primer (10 µM) fwd	1
Primer (10 µM) rev	1
cDNA (1:3 verd.)	1
<i>aqua bidest.</i>	6,7

Tabelle 2.14: Programm der qRT-PCR

Phase	Temperatur	Zeit	
Initiales Aufschmelzen der dsDNA-Matrize	95°C	5'	
Aufschmelzen der dsDNA	95°C	10''	} 40x
Primeranlagerung und Elongation	60°C	20''	

2.6.5 Agarose-Gelelektrophorese

Sowohl preparative als auch analytische Gelelektrophorese zur Separation von DNA-Fragmenten anhand der Größe wurden in 1,5%igen Agarosegelen (1,5% [m/v] Agarose Broad Range, 0,5 µg/ml Ethidiumbromid, 0,5xTAE-Puffer [20 mM Tris-HCl, 9,5 mM Essigsäure, 50 mM EDTA, pH ~7,7]) durchgeführt. Dazu wurden die DNA-Lösungen mit „6x Orange Loading Dye“ (10 mM Tris-HCl (pH 7,6), 0,15% orange G, 0,03% Xylencyanol FF, 60% Glycerol, 60 mM EDTA [Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland]) versetzt. Als Größenstandard wurde „Generuler® 1 kB DNA Ladder plus“ (Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte in „Mupid®-One“ Gelkammern (Eurogenetec, Köln, Deutschland) in 0,5x TAE-Puffer bei 135 V und 20-25 min Laufzeit.

2.6.6 Gelextraktion von DNA

Für die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurden Gelstücke, die das gewünschte DNA-Fragment enthielten, unter UV (~260 nm) ausgeschnitten. Die Gelextraktion erfolgte entweder mit dem „NucleoSpin® Extract II“ Kit (Macherey-Nagel,

Düren, Deutschland) oder dem „QIAQuick® Gel Extraction Kit“ (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Angaben des jeweiligen Herstellers.

2.6.7 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die DNA- und RNA-Konzentration in wässriger Lösung wurde mit dem NanoDrop® 2000c UV-VIS Spektrophotometer (PEQLAB, Erlangen, Deutschland) bestimmt. Die Nukleinsäurekonzentration wurde dabei vom Gerät anhand der Absorption bei 260 nm mittels des Lambert-Beer'schen Gesetzes berechnet. Dabei entspricht 1 A_{260} 50 ng/ μ l dsDNA beziehungsweise 40 ng/ μ l RNA. Zusätzlich ermittelte das Gerät mit Hilfe der Absorption bei 280 nm den Quotienten $A_{260/280}$. Dieser erlaubte eine Aussage über die Reinheit der jeweils gemessenen Nukleinsäure. Ein Wert von $\sim 1,8$ entsprach reiner dsDNA, ein Wert von $\sim 2,0$ reiner RNA. Niedrigere Werte zeigten eine Kontamination mit Proteinen, im Falle der RNA mit DNA oder anderen Verunreinigungen mit hoher Absorption bei 280 nm an. Ein erhöhter $A_{260/280}$ für dsDNA-Messungen indizierte eine Kontamination mit RNA.

2.6.8 Restriktionsverdau von DNA

DNA wurde sowohl für die Klonierung in den pESC-Leu2d Hefeexpressionsvektor als auch für die Analyse hergestellter Plasmide mit Restriktionsenzymen verdaut, die spezifische Schnittstellen erkennen und schneiden. Für den preparativen Restriktionsverdau und den analytischen Verdau der pESC-Leu2d-basierten Plasmide wurden die FastDigest® Enzyme NotI, BglII und SacI (Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland) verwendet, für die Analyse von TOPO®-Konstrukten wurde das Enzym EcoRI (New England Biolabs, Frankfurt a.M., Deutschland) genutzt. Die Enzyme wurden im vom jeweiligen Hersteller bereitgestellten Puffersystem eingesetzt. Die Zusammensetzung der jeweiligen Restriktionsansätze ist in den Tabellen 2.15 und 2.16 angegeben. Der analytische Verdau erfolgte für 30 min bei 37°C im Brutschrank, der preparative Verdau wurde für 3 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde der Verdau mittels Agarosegelelektrophorese (Abs. 2.5.5) analysiert beziehungsweise aufgereinigt.

Tabelle 2.15: Ansatz des Restriktionsverdaus mit FastDigest® Enzymen

	Volumen (µl) preparativ	Volumen (µl) analytisch
10x FastDigest® buffer	5	1
FastDigest® NotI	1	0,05
FastDigest® BglII/SacI	1	0,05
Plasmid	43	3
<i>aqua bidest.</i>	-	5,9

Tabelle 2.16: Ansatz des Restriktionsverdaus mit EcoRI

	Volumen (µl)
10x EcoRI buffer	1
EcoRI	0,3
Plasmid	3
<i>aqua bidest.</i>	5,7

2.6.9 Ligation in pCR® Blunt-II TOPO®

Der pCR® Blunt-II TOPO®-Vektor (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) liegt in linearisierter Form vor. An beide 3'-Phosphate ist eine DNA Topoisomerase I aus dem *Vaccinia*-Virus über einen Tyrosinrest kovalent gebunden. Dadurch wird die Energie der Phosphodiesterbindung konserviert. Bei Inkubation mit DNA-Molekülen greifen diese beide 3'-Enden des Vektors mit ihrer jeweiligen freien 5'-OH-Gruppe an, Daraus resultiert die Zirkularisierung des entstandenen Vektor-Insert-Konstrukts und die gebundene Topoisomerase I wird freigesetzt. Die Zusammensetzung des Ligationsansatzes ist in Tabelle 2.17 angegeben. Die Inkubationsdauer betrug 30 min bei Raumtemperatur und wurde bei niedriger Klonierungseffizienz auf bis zu 12 h ausgeweitet.

Tabelle 2.17: Ansatz der TOPO®-Ligationsreaktion

	Volumen (µl)
pCR® Blunt-II TOPO®-Vektor (10 ng/µl)	0,5
„Salt solution“ (1,2 M NaCl, 0,06 M MgCl ₂)	0,5
Gereinigtes PCR-Produkt (~20-50 ng/µl)	0,5
<i>aqua bidest.</i>	1,5

2.6.10 Ligation in pESC-Leu2d

Mit NotI/BglII beziehungsweise NotI/SacI verdaute und über Gelelektrophorese gereinigte DNA-Fragmente wurden unter Verwendung von T4 DNA-Ligase (New England Biolabs,

Frankfurt a.M., Deutschland) mit dem jeweils analog behandelten pESC-leu2d Hefeexpressionsvektor (zur Verfügung gestellt durch Prof. Daniele Werck-Reichhardt) gerichtet ligiert. Das molare Insert/Vektor-Verhältnis wurde auf 5:1 eingestellt. Die Zusammensetzung des Ligationsansatzes ist Tabelle 2.18 zu entnehmen. Die Ligation wurde für 16 h bei 12°C durchgeführt. Zur Inaktivierung und Ablösung der Ligase von der DNA wurden die Ansätze im Anschluss für 10 min bei 65°C inkubiert.

Tabelle 2.18: Ansatz der pESC-Leu2d-Ligationsreaktion

	Volumen (µl) NotI/BglIII	Volumen (µl) NotI/SacI
pESC-Leu2d Vektor (~100 ng)	0,6	1,4
Insert	2,5	4,5
10x T4 Ligation buffer	2	2
T4 DNA-Ligase	1	1
<i>aqua bidest.</i>	13,2	11,1

2.7 Proteinbiochemische Methoden

2.7.1 Proteinexpression in *Saccharomyces cerevisiae*

Die Expression der in den pESC-leu2d Vektor klonierten *CYP79* erfolgte im *S. cerevisiae* W_{AT}-Stamm in Flüssigkultur unter sterilen Bedingungen. Dazu wurden zunächst als Vorkultur 30 ml SC-Leu-Medium mit Plasmid-tragenden Hefezellen beimpft. Diese Suspension wurde für 20 h bei 28°C und 180 rpm im Schüttelinkubator kultiviert. Anschließend wurden je 100 ml YPGA(Glc)-Flüssigmedium als Hauptkulturen mit 1/OD₆₀₀ ml der Vorkulturen inokuliert und bei 28°C und 180 rpm für ca. 16 h bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,4-0,5 im Schüttelinkubator angezogen. Die Zellen wurden im Anschluss 5 min bei 5.000 xg und 16°C zentrifugiert und das Zellpellet in 100 ml YPGA(Gal)-Medium resuspendiert, da der pESC-leu2d-Vektor über einen Galaktose-sensitiven GAL10-Promotor verfügt. Die Proteinexpression erfolgte für ~18 h bei 25°C und 160 rpm im Schüttelinkubator.

2.7.2 Mikrosomenextraktion

Mit Hilfe der Mikrosomenextraktion wurde die Membranproteinfraction vom Gesamtproteingehalt der zur Expression genutzten Hefezellen getrennt. Dazu wurden zunächst die Expressionskulturen (Abs. 2.6.1) per Zentrifugation für 10 min bei 7.500 xg pelletiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 30 ml TEK-Puffer (50 mM Tris-HCL pH 7,5, 1 mM EDTA, 100 mM KCl) resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation für 10 min

bei 7.500 xg und Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen in 2 x 1 ml TES-Puffer (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA, 600 mM Sorbitol) wiederaufgenommen und die Zellsuspension mit Glasperlen (Ø 0,6-1 mm) aufgefüllt. Der Zellaufschluss erfolgte durch fünfmaliges manuelles Schütteln für 1 min und alternierende Inkubation auf Eis für je 1 min. Die Kugeln wurden mit 4 x 5 ml TES-Puffer gewaschen, der Überstand abgenommen und für 10 min bei 7.500 xg zentrifugiert. Der so von überführten Glaskugeln und Zelltrümmern separierte Überstand wurde für 90 min bei 100.000 xg in einer Optima® L-100K Ultrazentrifuge mit Ti70-Rotor (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland) zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde zunächst mit 5 ml TES-Puffer und mit 5 ml TEG-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA, 30 % Glycerol) gewaschen. Anschließend wurde es in 2 ml TEG-Puffer resuspendiert und im Potter homogenisiert. Die erhaltene Membranprotein-Suspension wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Die Zentrifugationsschritte wurden bei einer Temperatur von 4°C durchgeführt, alle anderen Arbeitsschritte auf Eis.

2.7.3 Aktivitätsbestimmung

Zur Bestimmung der Enzymaktivität wurden 10 µl Mikrosomensuspension, die die jeweilige in *S. cerevisiae* W_{AT} heterolog exprimierte CYP79 enthielt, mit 225 µl 100 mM NaPi-Puffer (pH 7,4), 30 µl Aminosäure-Lösung als Substrat und 32 µl *Aqua bidest.* angesetzt. Die Enzymreaktion wurde durch die Zugabe von 3 µl 1 mM NADPH gestartet und erfolgte üblicherweise für 30 min bei 25°C und 400 rpm in 2 ml Glasröhrchen. Zum Abstoppen der Reaktion wurden 300 µl Methanol zugegeben, die Proben 1 h auf Eis gehalten und anschließend für 15 min bei 4.300 xg und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bis zur Analyse mittels LC-MS/MS (Abs. 2.7.4) bei -20°C gelagert. Als Substrate wurden die Aminosäuren L-Phe, L-Trp, L-Ile, L-Leu und L-Tyr getestet. Die Zeitabhängigkeit der Reaktion wurde für einen Zeitraum von 10-180 min bestimmt. Das pH-Optimum wurde durch Testen der Enzymaktivität für den Bereich pH 5,5 bis pH 8,5 ermittelt. Die Abhängigkeit von der Konzentration des jeweiligen Substrats wurde durch Variation der Substratkonzentration von 0,05 µM bis 8 mM gemessen.

2.8 Chemische Analytik

2.8.1 Induktion von *Zea mays* durch Herbivorie und mechanische Verwundung

14-tägige *Zea mays* var. Delprim (20-30 cm Höhe, 4-5 Blätter, Abs 2.2) wurden durch Herbivorie von *Spodoptera littoralis* (Abs. 2.2) im dritten Larvenstadium über Nacht (16 h) induziert. Dazu wurden drei Raupen auf jeder der Pflanzen platziert und diese in

Kunststofftüten verpackt. Die mechanische Verwundung 14-tägiger Maispflanzen wurde durch Schnitte und Abtragen von ca. 1 cm² Blattoberfläche an drei Blättern pro Pflanze gesetzt. Für die zusätzliche Jasmonsäure-Induktion mechanisch verwundeter Pflanzen wurden je 10 µl 100 µM Jasmonsäure (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) pro cm² beschädigter Blattfläche aufgetragen. Mechanische Verwundung und Jasmonsäureauftrag wurden nach 16 h wiederholt. Die Pflanzen wurden anschließend für die Duftsammlung (Abs 2.8.3) verwendet.

7-tägige *Zea mays* var. Delprim (15-20 cm Höhe, 2-3 Blätter) wurden über Nacht (16 h) durch je drei *S. littoralis*-Larven im dritten Larvenstadium pro Pflanze induziert, die in Käfigen auf drei Blättern platziert wurden. Anschließend wurden die Pflanzen geerntet, das Frischgewicht bestimmt, das Blattmaterial in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zu weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.8.2 Aminosäurefütterung

14-tägige *Zea mays* var. Delprim (20-30 cm Höhe, 4-5 Blätter, Abs. 2.2.) wurden am Hypokotyl abgetrennt und über Nacht (16 h) in Falcon-Gefäßen mit 20 ml Aminosäure-Lösungen inkubiert. Diese Lösungen enthielten 20 mM L-Phe, L-Trp, L-Leu oder L-Ile, gelöst in H₂O oder 100 µM JA/H₂O. Die jeweiligen Kontrollpflanzen wurden in H₂O bzw. 100 µM JA/H₂O inkubiert. Die Pflanzen wurden anschließend für die Duftsammlung (Abs 2.8.3) verwendet.

2.8.3 Duftsammlung von *Zea mays*

Die Messung der Duftstoffemission von Maispflanzen erfolgte mit der so genannten „closed loop collection“-Methode (Donath & Boland, 1995). Dazu wurden die 14-tägigen Maispflanzen aus Abs. 2.8.1 und 2.8.2 sowie unbehandelte Kontrollpflanzen in Exsikkatoren mit einem Fassungsvermögen von 3 l platziert. Durch ein geschlossenes Pumpensystem wurde kontinuierlich Luft aus dem Exsikkator abgesaugt, über Filter mit 30 mg Porapak-Q (ARS, Florida, USA) geleitet und wieder in den Exsikkator zurückgeführt. Die Dauer der Duftsammlung betrug 4 h. Anschließend wurde das Frischgewicht der oberirdischen Pflanzenteile bestimmt, diese in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Die Filter wurden mit 200 µl Dichlormethan, das 10 ng/µl n-Nonylacetat als internen Standard enthielt, eluiert und die Zusammensetzung und der Gehalt an Duftstoffen mittels GC-MS und GC-FID analysiert (Abs. 2.8.4).

2.8.4 Gaschromatographische Analyse des Duftprofils mit GC-MS und GC-FID

Die Separierung und Analyse der Duftgemische erfolgte in einem Gaschromatographen Modell 6890 (Hewlett-Packard, PaloAlto, USA), gekoppelt mit einem Massenspektrometer Modell 5973 (Hewlett-Packard). Dabei diente Helium (1 ml/min) als Trägergas. Als Chromatographiesäule wurde eine DB5-MS-Säule (Länge 30 m, Durchmesser 0,25 mm, Filmdicke 0,25 µl; J&W Scientific, Folsom, USA) verwendet. Das Injektionsvolumen betrug 1 µl, die Injektortemperatur lag bei 220°C. Die Anfangstemperatur der Säule betrug 40°C (konstant für 3 min) und wurde dann kontinuierlich (5°C/min) auf 240°C erhöht. Die gekoppelte massenspektrometrische Analyse erfolgte unter folgenden Bedingungen: Transferline-Temperatur: 230°C, Quelle: 230°C, Quadrupol-Temperatur: 150°C, Ionisierungspotential: 70 eV, Scann-Bereich: 30-400 Atommasseneinheiten.

Die Auswertung der durch die GC separierten Duftkomponenten wurde mit dem Programm „Data Analysis“ der GC-MS Firmensoftware (HP ChemStation Software, Hewlett-Packart) durchgeführt. Die Identifikation der verschiedenen Duftstoffe erfolgte über den Vergleich mit den Massenspektrenbibliotheken „Nist98“ und „Wiley275“ (Hewlett-Packard).

Quantifiziert wurden die Duftstoffe mittels GC und gekoppeltem Flammenionisationsdetektor (FID). Dabei wurden die Proben in einem Gaschromatographen Modell 6890 (Hewlett-Packart) unter denselben für die GC-MS angegebenen Bedingungen und Einstellungen getrennt und anschließend im gekoppelten FID (Detektortemperatur: 250°C) analysiert. Als Trägergas wurde 2 ml/min Wasserstoff verwendet. Zur Auswertung der FID-Daten wurde ebenfalls das Programm „Data Analysis“ (HP ChemStation Software, Hewlett-Packart) genutzt.

2.8.5 Extraktion von Aldoximen

Zur Extraktion von Aldoximen aus Pflanzenmaterial von *Zea mays* wurden 100 mg Material mit 300 µl einer 0,25 % Formsäure enthaltenden MeOH/H₂O-Lösung (v/v 1:1) versetzt und für 2 h bei 25°C und 800 rpm geschüttelt. Nach anschließender Zentrifugation für 15 min bei 4,300 xg und 4°C wurden Materialrückstände im Überstand über Rotilabo®-Spritzenfilter (Ø 25 mm, Poren-Ø 0,22 µm; Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) entfernt und die erhaltenen Proben mittels LC-MS/MS (Abs. 2.8.6) analysiert.

2.8.6 Analyse der Pflanzenextrakte und Enzymassays mit LC-MS/MS

Der Nachweis der Metabolite in Extrakten und Assays erfolgte mittels Flüssigchromatographie (LC) und gekoppelter massenspektrometrischer Analyse (MS/MS).

Dazu wurde ein „ultra high performance liquid chromatography“ (UHPLC)-System Modell 1260 infinity (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) mit gekoppeltem API 5000® Triple Quadrupol MS/MS-System (AB SCIEX Germany GmbH, Darmstadt) eingesetzt. Als Säule für die LC wurde eine XDB-RP18 Säule (1.8 µm Partikelgröße, 4.6 x 50 mm) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) verwendet. Als Lösungsmittel fungierten 0,2 % Formsäure/H₂O (A) und Acetonitril (ACN) (B). Die Flussrate lag bei 0,8 ml/min. Das Elutionsprofil ist in Tabelle 2.20 angegeben. Es wurden 5 µl Pflanzenextrakt bzw. Enzymassay injiziert. Zur Quantifizierung des Phenylacetaldoxims (PAOx) und des Indol-3-acetaldoxims (IAOx) wurden Eichkurven mit den entsprechenden Standards über einen Konzentrationsbereich von 3 ng/ml bis 1 µg/ml erstellt.

Das gekoppelte Massenspektrometer wurde im „multiple reaction monitoring“ (MRM) Modus mit positiver Ionisierung betrieben. Die Selektion von PAOx erfolgte über die Masse des [M+H⁺]⁺-Ions bei 136,1 m/z und die Detektion anhand des Tochterions bei 119,1 m/z, die Selektion von IAOx über eine Masse von 175,1 m/z und die Detektion anhand des Ions bei 158,1 m/z.

Tabelle 2.20: Lösungsmittelgradient der UHPLC für die Aldoximanalyse

t (min)	ACN (%)
0,0-0,5	30
0,5-3,0	30-66
3,0-3,1	66-100
3,1-4,0	100
4,0-4,1	100-0
4,1-7,0	0

2.9 Computergestützte Analytik

2.9.1 Genidentifikation, DNA- und Proteinsequenzanalyse

Die Analyse und Bearbeitung der erhaltenen Sequenzdaten erfolgte mit dem Programm „SeqMan“ (DNASTAR Inc., Madison, USA). Die finalen DNA-Sequenzen wurden mit dem Programm „EditSeq“ (DNASTAR Inc., Madison, USA) gespeichert und in Proteinsequenzen translatiert. Diese wurden mithilfe des Programms „BioEdit“ (Hall, 1999) mittels ClustalW-Alignment (Thompson et al., 1994) verglichen. Die Internetdatenbanken des „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov) und der Universität von Kalifornien in Berkeley (phytozome.org) wurden zur Identifikation potentieller *CYP79*-Gene, zur Datenbankrecherche und für Sequenzvergleiche mit bereits annotierten Sequenzen

genutzt. Die Identifikation von *CYP79*-Genen im Genom der sequenzierten Maislinie B73 erfolgte dabei durch TBLASTN mit der Aminosäuresequenz von CYP79A1 aus *S. bicolor* L. Moench. Phylogenetische und molekularevolutionäre Analysen erfolgten mit dem Programm „MEGA Version 5“ (Tamura et al., 2011) Der Phylogenetische Baum wurde dabei mit Hilfe der „neighbour-joining“-Methode auf Basis eines MUSCLE-Alignments erstellt (Edgar, 2004). Verwendet wurden die Aminosäuresequenzen aller bislang annotierten CYP79-Enzyme. Das anschließende „Bootstrapping“-Verfahren wurde mit 1000 Wiederholungen durchgeführt.

2.9.2 Statistische Auswertung

Statistische Analysen der verschiedenen Versuchsdaten wurden mit dem Programm SigmaPlot v12.5 (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA) durchgeführt. Dabei wurden die GC-FID-Daten der Duftsammlungen und die LC-MS/MS-Daten der MeOH/H₂O-Extrakte mittels einfaktorieller „Analysis of Variance“ (ANOVA) mit einem Konfidenzintervall von $\alpha = 0,05$ analysiert. Der anschließende Gruppenvergleich erfolgte mit der Holm-Sidak-Methode. Daten, die in nur zwei verschiedene Gruppen gegliedert waren, wurden stattdessen mit dem studentischen *t*-Test ($\alpha = 0,05$) auf Signifikanz getestet.

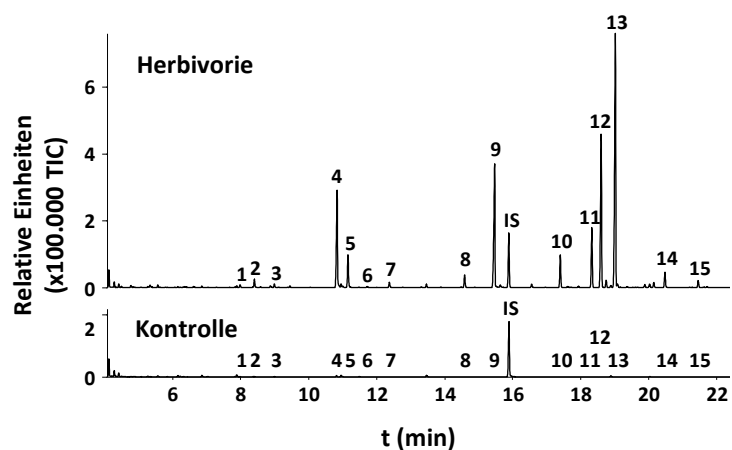
3 Ergebnisse und Auswertung

3.1 *Zea mays* var. Delprim emittiert stickstoffhaltige Duftstoffe

Duftprofile von *Zea mays* var. Delprim nach Herbivorie sind in der Literatur bereits ausführlich beschrieben (Schnee et al., 2002; Gouinguene et al., 2003; Köllner et al., 2004). Das Vorkommen, die Funktion und Biosynthese stickstoffhaltiger Duftstoffe sind jedoch – vom Indol abgesehen – bislang sehr unzureichend untersucht. Aldoxime und Nitrile als Herbivorie-induzierte Duftstoffe im Mais wurden bislang nur von Takabayashi et al. (1995) und Turlings et al. (1998) dokumentiert.

Daher wurden die emittierten Duftstoffe 14-tägiger, durch Herbivorie induzierter und nicht induzierter Keimlinge der Maislinie Delprim gesammelt und mittels GC-MS/FID hinsichtlich der Präsenz stickstoffhaltiger Duftstoffe analysiert (Abs. 2.2; 2.8.1; 2.8.3; 2.8.4) Die Maisvariante Delprim wurde aufgrund ihrer guten Induzierbarkeit verwendet.

Das Duftprofil induzierter Maispflanzen unterschied sich qualitativ und quantitativ von dem nicht induzierter Pflanzen (Abb. 3.1). Im Gegensatz zu einer geringen Zahl und Menge an Stoffen im Duftprofil der Kontrollpflanzen emittierten die Herbivorie-induzierten Mais-



pflanzen eine Vielzahl an Duftstoffen (Tab. 9.1 im Anhang) Die dominantesten Substanzen waren, wie bereits in der Literatur beschrieben, Monoterpene wie z.B. Linalool und Sesquiterpene wie z.B. (*E*)- α -Bergamoten und (*E*)- β -Farnesen (Schnee et al., 2002; Gouinguene et al., 2003). Daneben

Abbildung 3.1: Duftprofil von *Zea mays* var. Delprim nach Herbivorie durch *Spodoptera littoralis*. Gezeigt sind die GC-MS-Chromatogramme der Duftprofile einer Pflanze nach Herbivorie (oben) und einer Pflanze der unbehandelten Kontrollgruppe (unten) Die Induktion erfolgte durch *S. littoralis*-Fraß für 16 h. Anschließend wurde der Duft für 4 h gesammelt. Quantitativ bedeutsame und/oder stickstoffhaltige Duftstoffe sind nummeriert. β -Myrcen (1), 3-Hexenol-1-acetat (2), Limonen (3), Linalool (4), (*E*)-4,8-Dimethyl-1,3,7-nonatrien (DMNT) (5), Benzylcyanid (6), Phenyl-methylacetat (7), 2-Phenylethylacetat (8), Indol (9), Interner Standard n-Nonylacetat (IS), Geranylacetat (10), (*E*)- β -Caryo-phyllen (11), (*E*)- α -Bergamoten (12), (*E*)- β -Farnesen (13), β -Sesquiphellandren (14), 4,8,12-Trimethyltrideca-1,3,7,11-tetraen (TMTT) (15) (TIC – „total ion chromatogram“).

fanden sich auch andere Substanzklassen wie GLV, Alkohole, Aldehyde und Ester im Duft der induzierten Maispflanzen. Zusätzlich wurden auch stickstoffhaltige Duftstoffe detektiert.

Neben Indol ließen sich im Duft Spuren von Benzylcyanid nachweisen, dessen Biosynthese in *Populus trichocarpa* bereits beschrieben ist und dort über PAOx verläuft (Irmisch et al., 2013). Die flüchtigen aliphatischen Aldoxime 2- und 3-MBA konnten nur im Duft einer Herbivorie-induzierten und einer nicht induzierten Maispflanze detektiert werden (Abb. 3.2).

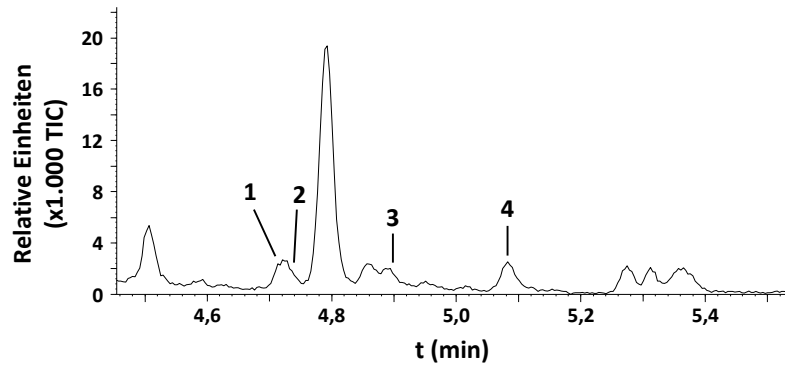


Abbildung 3.2: Vergrößerter Ausschnitt des Duftprofils von *Zea mays* var. *Delprim* nach Herbivorie durch *Spodoptera littoralis*. Gezeigt ist der Bereich des GC-MS-Chromatogramms, in dem Spuren von 2- und 3-Methylbutyraldoxim detektiert werden konnten. (*E*)-3-Methylbutyraldoxim (1), (*E*)-2-Methylbutyraldoxim (2), (*Z*)-2-Methylbutyraldoxim (3), (*Z*)-3-Methylbutyraldoxim (4) (TIC – „total ion chromatogram“).

Neben der Induktion durch *Spodoptera littoralis* und der unbehandelten Kontrollgruppe wurden auch Pflanzen vor der Duftsammlung mechanisch verwundet. Bei einem Teil dieser Pflanzen wurde JA auf die verwundeten Areale gegeben. Dadurch sollten sowohl mögliche Unterschiede zwischen artifizieller und durch Raupenfraß bedingter Induktion als auch die Abhängigkeit der Duftemission nach mechanischer Verwundung von der Präsenz des Pflanzenhormons JA analysiert werden.

Die quantitative Analyse der Duftsammlungen zeigte, dass die Duftstoffemission der mechanisch verwundeten, JA-induzierten Pflanzen (MJ) derjenigen der Herbivorie-Pflanzen (H) ähnelte (Abb. 3.3). Mono- und Sesquiterpene waren die dominierenden Komponenten des JA-induzierten Duftspektrums und auch Benzylcyanid wurde emittiert. Insgesamt fiel die Emission von Duftstoffen durch die Zugabe von Jasmonsäure jedoch quantitativ deutlich geringer aus als bei der durch Herbivorie hervorgerufenen Duftemission.

Ohne die Applikation von JA ähnelte das Duftprofil mechanisch verwundeter Maispflanzen (M) hingegen dem der Kontrollpflanzen (K). Es waren nur Spuren von Terpenen und Indol nachweisbar. Im Unterschied zu den Kontrollpflanzen fanden sich im Duft der mechanisch verwundeten Maispflanzen jedoch „green leaf volatiles“ (GLV) wie z.B. 3-Hexenol-1-acetat. Darüber hinaus ließ sich auch hier Benzylcyanid in Spuren nachweisen.

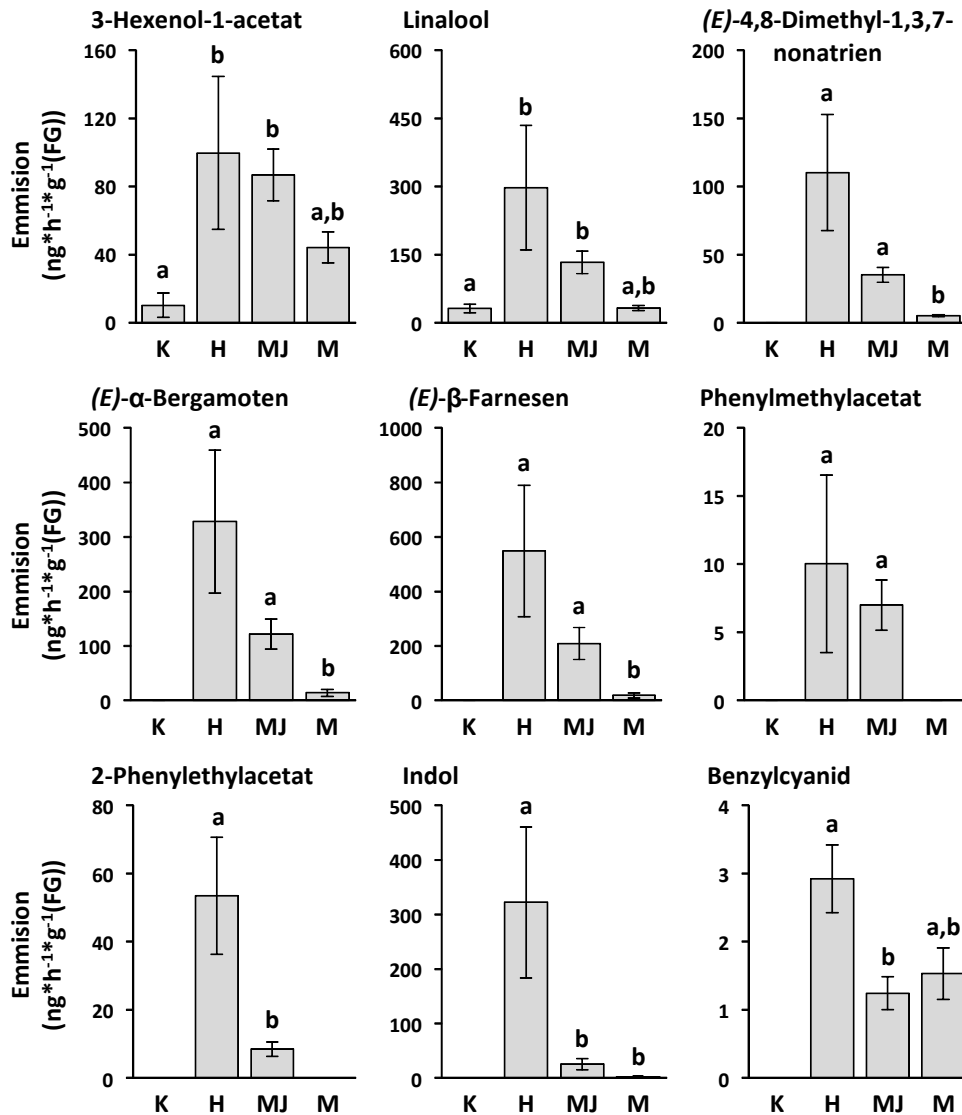


Abbildung 3.3: Emission ausgewählter Duftstoffe von *Zea mays* var. Delprim. Der Duft der durch Herbivorie von *S. littoralis* (H, 4 Replikate), mechanische Verwundung ohne (M, 5 Replikate) bzw. mit zusätzlicher JA-Applikation (MJ, 4 Replikate) induzierten Pflanzen sowie der unbehandelten Kontrollgruppe (K, 6 Replikate) wurde gesammelt und anschließend mittels GC-MS analysiert. Die Quantifizierung der Stoffe erfolgte mittels GC-FID über den internen Standard n-Nonylacetat. Es sind jeweils repräsentative Vertreter der „green leaf volatiles“ (3-Hexenol-1-acetat), der Monoterpene (Linalool und (*E*)-4,8-Dimethyl-1,3,7-nonatrien), der aromatischen Ester (Phenylmethylacetat und 2-Phenylethylacetat), der Sesquiterpene ((*E*)- α -Bergamoten und (*E*)- β -Farnesen) und der stickstoffhaltigen Duftstoffe (Benzylcyanid und Indol) gezeigt. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte und Standardfehler. Um auf Signifikanz zu testen, wurde eine One-Way-ANOVA mit anschließendem Gruppenvergleich durch die Holm-Sidak-Methode durchgeführt, im Falle der aromatischen Ester, bei denen in nur zwei Gruppen Duftstoffe detektierbar waren, wurde stattdessen der studentische *t*-Test verwendet.

3.2 Induzierte Keimlinge der Maislinie Delprim produzieren nicht-volatile aromatische Aldoxime

Im Anschluss an die Analyse der Duftemission wurde das Blattmaterial der Maispflanzen auf das Vorkommen von Aldoximen getestet. Dazu wurden MeOH/H₂O-Extrakte des homogenisierten Pflanzenmaterials mittels LC-MS/MS analysiert (Abs. 2.8.5; 2.8.6).

In den unbehandelten Kontrollpflanzen (K) konnten nur Spuren von (*E/Z*)-Phenylacetaldoxim (PAOx) nachgewiesen werden (Abb. 3.4. Tab. 9.3 im Anhang). In den Maispflanzen nach mechanischer Verwundung (M), mechanischer Verwundung und JA-Applikation (MJ) oder nach Herbivorie durch *S. littoralis* wurden signifikant höhere Gehalte an (*E/Z*)-PAOx (*E:Z*, 1:1) detektiert. Die Art der Behandlung (M, MJ oder H) hatte keinen signifikanten Einfluss auf den PAOx-Gehalt. Andere Aldoxime waren in den Maispflanzen nicht nachweisbar.

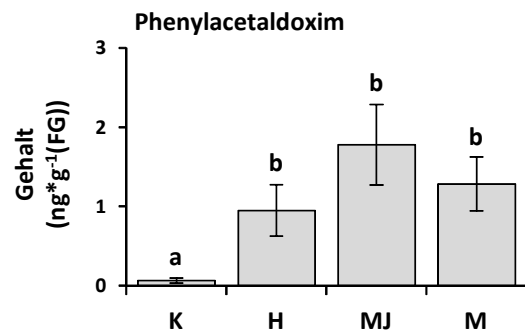


Abbildung 3.4: (*E/Z*)-Phenylacetaldoxim-Gehalt in Pflanzenmaterial von *Zea mays* var. Delprim. Bestimmt wurde der PAOx-Gehalt mittels LC-MS/MS in MeOH/H₂O-Extrakten der 14-tägigen, für die Duftsammlung (Abschnitt 3.1) verwendeten Pflanzen. Die Induktion erfolgte, wie beschrieben, durch Herbivorie mit *Spodoptera littoralis* (H), mechanische Verwundung und Applikation von 100 µM Jasmonsäure (MJ) sowie durch rein mechanische Verwundung (M) (Abschnitt 2.1). Als Kontrollgruppe wurden die Extrakte nicht-induzierter *Zea mays* verwendet (K). Abgebildet sind Mittelwerte und Standardfehler der verschiedenen Gruppen in ng*g⁻¹ Frischgewicht (FG). Mithilfe von One-Way-ANOVA und anschließender Holm-Sidak-Methode wurde auf Signifikanz getestet.

3.3 Volatile Aldoxime und andere potentielle Aminosäurederivate im Duftprofil von Zea mays nach Aminosäurefütterung

Aldoxime sind, wie in der Literatur beschrieben (Hamberger, 2013; Irmisch et al., 2013), von Aminosäuren abgeleitete Metabolite. Um eine mögliche Abhängigkeit der Produktion und Emission von Aldoximen in Mais von der Verfügbarkeit der möglichen Aminosäuresubstrate zu überprüfen, wurden 14-tägige Maispflanzen in aminosäurehaltigen Lösungen inkubiert und durch Zugabe von JA induziert. Anschließend wurde der Duft gesammelt und mittels GC-MS/FID analysiert (Abs. 2.2; 2.8.2; 2.8.3; 2.8.4).

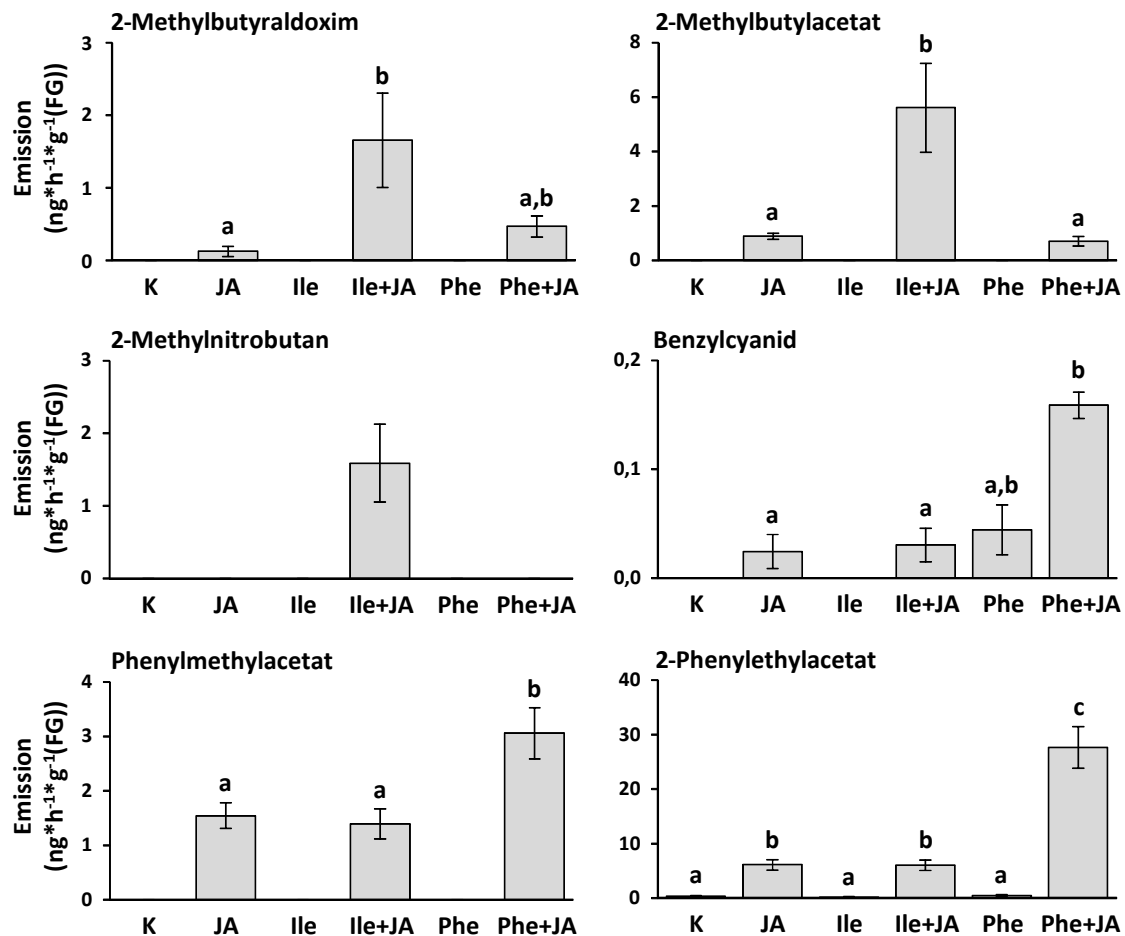


Abbildung 3.5: Isoleucin- und Phenylalanin-abgeleitete Duftstoffe von *Zea mays* var. Delprim nach Aminosäure-Fütterung und JA-Induktion. Die Pflanzen wurden 14 Tage angezogen, am Hypokotyl abgetrennt und für 16 h in der jeweiligen Lösung inkubiert (Abschnitt 2.2.1). Der Duft wurde 4 h gesammelt und die Zusammensetzung mittels GC-MS analysiert. Die Quantifizierung erfolgte mittels GC-FID über den internen Standard n-Nonylacetat. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler der in Wasser inkubierten Kontrollgruppe (K, 4 Replikate), der mit 100 μ M JA induzierten Pflanzen (JA, 6 Replikate), sowie der in 10 mM wässrigen AS-Lösungen inkubierten Maispflanzen ohne (Ile, 5 Replikate; Phe, 6 Replikate) beziehungsweise mit zugesetzter 100 μ M JA (Ile+JA, 7 Replikate; Phe+JA, 5 Replikate). Die Daten wurden mittels One-Way-ANOVA und anschließender Holm-Sidak-Methode auf Signifikanz geprüft.

Im Duft JA-induzierter Maispflanzen (JA) waren die potentiell von Isoleucin abgeleiteten Duftstoffe (*E/Z*)-2-Methylbutyraldoxim (*E:Z*, 2:1) und 2-Methylbutylacetat und die potentiell von Phenylalanin abgeleiteten Stoffe Benzylcyanid, Phenylmethylacetat und 2-Phenylethylacetat nachweisbar (Abb. 3.5, Tab. 8.4 im Anhang). Diese Duftstoffe konnten in der Kontrollgruppe nicht detektiert werden. Bei gleichzeitiger JA-Induktion und AS-Fütterung (Ile+JA, Phe+JA) konnte die Emission der jeweiligen Substanzen nochmals verstärkt werden. Interessanterweise war nach L-Ile-Fütterung und JA-Induktion auch 2-Methylnitrobutan (2-MNB) im Duftprofil detektierbar. Nach Inkubation der Maispflanzen in AS-haltigen Lösungen ohne JA-Induktion ähnelte das Duftprofil der Maispflanzen (Ile, Phe) demjenigen der nichtinduzierten Kontrollpflanzen. Mit Ausnahme von Benzylcyanid-Spuren

in den mit L-Phe gefütterten Pflanzen waren keine der oben beschriebenen Duftstoffe nachweisbar. In Maispflanzen, die in JA-haltigen Lösungen der AS L-Leu und L-Trp, fanden sich keine der oben gezeigten Duftstoffe. Das Duftprofil ähnelte hier weitgehend dem der nur mit JA induzierten Pflanzen.

3.4 Aromatische Aldoxime im Pflanzenmaterial von *Zea mays* nach Aminosäurefütterung

Auch das Pflanzenmaterial der in AS-Lösungen inkubierten und mit JA induzierten Maispflanzen wurde auf das Vorkommen von Aldoximen getestet. Dazu wurden MeOH/H₂O-Extrakte des Blattmaterials mittels LC-MS analysiert (Abs. 2.8.3 & 2.8.4).

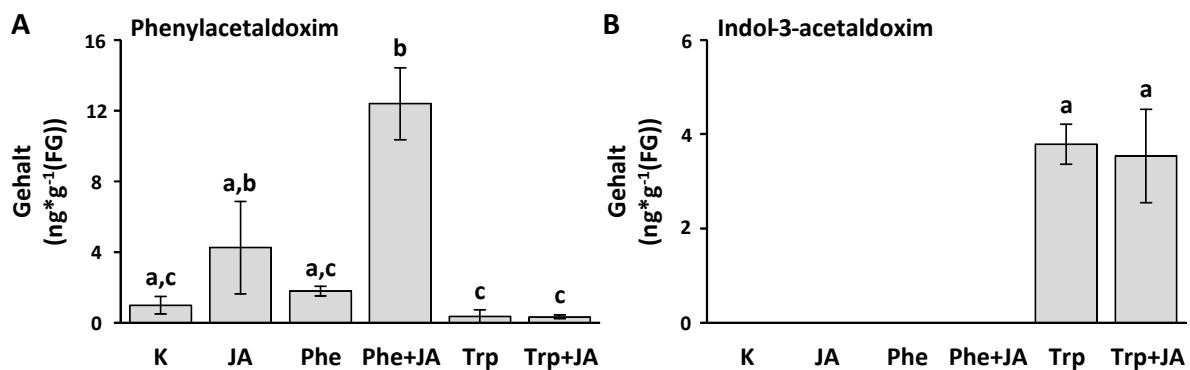


Abbildung 3.6: Aldoximgehalt in *Zea mays* var. Delprim nach Aminosäurefütterung und JA-Induktion. Die Maispflanzen wurden 14 Tage angezogen, am Hypokotyl abgetrennt und für 16 h in den angegebenen Lösungen inkubiert. Der PAOx- (A) und IAOx-Gehalt (B) wurde in MeOH/H₂O-Extrakten des in flüssigem Stickstoff eingefrorenen und homogenisierten Pflanzenmaterials bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler der in Wasser inkubierten Kontrollgruppe (K, 5 Replikate), der mit 100 µM JA induzierten Pflanzen (JA, 5 Replikate) sowie der in 10 mM AS-Lösungen (Phe oder Trp) inkubierten und mit zugesetzter 100 µM JA induzierten Maispflanzen (Phe+JA, 5 Replikate; Trp+JA, 5 Replikate). Die nichtinduzierten Kontrollgruppen, die in wässrigen 10 mM AS-Lösungen inkubiert wurden, sind ebenfalls gezeigt (Phe, 5 Replikate; Trp, 4 Replikate). Um auf Signifikanz zu testen, wurde eine One-Way-ANOVA mit anschließendem Gruppenvergleich durch die Holm-Sidak-Methode durchgeführt.

PAOx war im Blattmaterial aller Maispflanzen mindestens in Spuren nachweisbar (Abb. 3.6 A, Tab. 9.4 im Anhang). Die gebildete Menge war dabei in den mit L-Phe gefütterten, JA-induzierten Pflanzen (Phe+JA) signifikant größer als in den unbehandelten Kontrollpflanzen (K) und den nichtinduzierten, mit L-Phe gefütterten Maispflanzen (Phe). Es konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den PAOx-Gehalten der Phe+JA-Pflanzen und der JA-induzierten Pflanzen (JA) festgestellt werden. Die in L-Trp-Lösung inkubierten Pflanzen (Trp und Trp+JA) wiesen die niedrigsten Gehalte an PAOx auf.

In den L-Trp-gefütterten Maispflanzen (Trp und Trp+JA) konnte auch Indol-3-Acetaldoxim (IAOx) detektiert werden (Abb. 3.6 B, Tab. 9.4 im Anhang). Die produzierte IAOx-Menge in

JA-induzierten und nichtinduzierten Pflanzen unterschied sich nicht voneinander. In allen anderen untersuchten Pflanzengruppen war kein IAOx nachweisbar.

3.5 Das Genom der Maislinie Delprim enthält vier potentielle *CYP79*-Gene

Aldoxime werden in Pflanzen – soweit bisher bekannt – durch Cytochrom P450 Monooxygenasen der Familie 79 (*CYP79*) synthetisiert (Sibbesen et al., 1995; Andersen et al., 2000; Møller & Nielsen, 2000; Forslund et al., 2004; Irmisch et al., 2013; Hamberger & Bak, 2013). Daher wurde das Genom von *Zea mays* ebenfalls auf das Vorhandensein von *CYP79*-Genen hin untersucht.

Mittels TBLASTN wurden im Genom der sequenzierten Maislinie B73 vier potentielle *CYP79*-Gene identifiziert (Abs. 2.9.1; Tab. 3.1). Als Suchsequenz wurde dabei die Proteinsequenz von *CYP79A1* aus *S. bicolor* L. Moench verwendet.

Tabelle 3.1: Potentielle *CYP79*-Gene aus *Zea mays* var. B73 in der Datenbank „phytozome.org“

Datenbankeintrag	Name	Offener Leserahmen	AS-Sequenzidentität mit <i>CYP79A1</i>
GRMZM2G138248	<i>CYP79-1 (B73)</i>	1659 bp (552 AS)	76,2 %
GRMZM2G011156	<i>CYP79-2 (B73)</i>	1641 bp (546 AS)	55,0 %
GRMZM2G178351	<i>CYP79-3 (B73)</i>	1653 bp (550 AS)	55,8 %
GRMZM2G105185	<i>CYP79-4 (B73)</i>	1680 bp (559 AS)	53,7 %

Auf Basis der *CYP79*-Sequenzen der Linie B73 wurden Primer entwickelt, mit deren Hilfe vier cDNAs mit einer Länge von 1500-1700 bp aus der Gesamt-RNA Herbivorie-induzierter Delprim-Pflanzen amplifiziert und kloniert werden konnten (Abs. 2.6).

Die Sequenzierung dieser vier cDNAs identifizierte zwei Sequenzen, die die größte Übereinstimmung mit den Genen *CYP79-1* und *CYP79-2* der Linie B73 zeigten. Die anderen zwei cDNAs wiesen die höchste Sequenzhomologie mit *CYP79-3* aus der Maislinie B73 auf. Anhand dieser Homologien erfolgte die Bezeichnung der cDNAs als *CYP79-1*, *CYP79-2*, *CYP79-3v1* und *CYP79-3v2* (Tab 3.2).

Tabelle 3.2 *CYP79*-kodierende cDNAs aus *Zea mays* var. Delprim

Name	Homologe B73-Sequenz	Offener Leserahmen	Molekulargewicht in kDa (kalkuliert)
<i>CYP79-1</i>	<i>CYP79-1 (B73)</i>	1659 bp (552 AS)	61,4
<i>CYP79-2</i>	<i>CYP79-2 (B73)</i>	1341 bp (446 AS)	49,4
<i>CYP79-3v1</i>	<i>CYP79-3 (B73)</i>	1653 bp (550 AS)	61,0
<i>CYP79-3v2</i>	<i>CYP79-3 (B73)</i>	1083 bp (361 AS)	40,2

3.6 Sequenzmotive und phylogenetische Analyse von CYP79-Enzymen der Maislinie Delprim

Die Struktur der von den sequenzierten *CYP79*-Genen abgeleiteten Aminosäuresequenzen stimmte mit der anderer P450 generell überein (Abb. 3.7). Alle AS-Sequenzen besaßen im N-terminalen Bereich die der Membranverankerung dienende Transmembrandomäne (TMD), das Stop-Transfer-Signal (HTS) und eine Prolin-reiche Gelenkregion mit der Sequenz PPXP, die den N-Terminalen Membrananker mit dem katalytisch aktiven Kern der CYP79 verbindet (Sakaguchi et al., 1984; Williams et al., 2000; Werck-Reichhardt & Feyereisen, 2000). In der abgeleiteten Sequenz von *CYP79-3v2* fehlten jedoch alle für CYP79 charakteristischen Sequenzmotive, da das Stoppcodon auf dem nicht gespleißten Intron zum vorzeitigen Abbruch der AS-Sequenz führte.

Die von *CYP79-1*, *CYP79-2* und *CYP79-3v1* der Maislinie Delprim abgeleiteten AS-Sequenzen CYP79-1, CYP79-2 und CYP79-3v1 wiesen ebenfalls nur zum Teil die für CYP79-Enzyme typischen Sequenzmotive auf (Bak et al., 1998; Bak et al., 2006). Die Hämbindedomäne stimmte nur für CYP79-1 mit der für CYP79 charakteristischen Konsensussequenz (S/T)F(S/T)TGRRGCX(A/G) überein (Bak et al., 2006). CYP79-2 und CYP79-3v1 hingegen wiesen mehrere AS-Substitutionen auf. Das konservierte EXXR-Motiv war jedoch in allen drei Sequenzen vorhanden (Werck-Reichhardt & Feyereisen, 2000). Ebenso enthielten sie das für CYP79 charakteristische PERH-Motiv und die CYP79-Konsensussequenz (A/G)XX(D/E)NP der "P450 Signatur". In dieser ist das eigentlich hochkonservierte T(S/T)-Motiv durch NP substituiert (Bak et al., 2006).

In den Sequenzen von CYP79-1 und CYP79-3v1 konnten vier der sechs in der Literatur beschriebenen, putativen Substraterkennungsregionen (SRS) identifiziert werden, die SRS 3 und SRS 6 waren jedoch nicht vorhanden (Gotoh et al, 1992). Bei CYP79-2 fehlten zusätzlich die SRS 2 und SRS 4.

CYP79-1	-----	1
CYP79-2	-----	1
CYP79-3v1	-----	1
CYP79-3v2	-----	1
CYP79A1	-----	1
CYP71E1	MDSIGKCMDPQLPLEISVPGVPRDRRTNTNTNPNRGREPASSYIMPTNHTQQSEAKQA	60

		-----TMD-----	
CYP79-1	-----MVSSPQANKFELRKQISSPSSSCMAPHVLVVLVILLYL		38
CYP79-2	-----MALAPSHA---LVVAPFTALCAFLAL-ALLFL		28
CYP79-3v1	-----MALAPSHAHASLAVAPFTVLCFALVALLFL		32
CYP79-3v2	-----MALAPSHAHASLAVAPFTVLCFALVALLFL		32
CYP79A1	-----MATMEVEAAAATVLAAPLLSSAIIKLLLFVVTLSYL		37
CYP71E1	ELEAAHTPHSSRPAIPQKGQGHGQLTMATTATPQLLGGSVPPQWQTCLLVLPVLLVSY		120

	-----HTS-----	PPxP	
CYP79-1	VRTLRLPWRSR---RNSTCCTP-----SLPPGPVWPVVGNIPEMMLSDKPAFHWHH		87
CYP79-2	YSKAT----SSSK-KTQQL-----LPPGPAGLPIIGSL-HCVVSKRPVFRWVHG		71
CYP79-3v1	HRYRR----SNARPSKTRQ-----LPPGPAGLPIIGSL-HCLVSKKPVFRWVHG		77
CYP79-3v2	HRYRR----SNARPSKTRQ-----LPPGPAGLPIIGSL-HCLVSKKPVFRWVHG		77
CYP79A1	ARALRRPRKSTTKCSSTTCASPAGVGNPPLPPGPVWPVVGNIPEMLLN-KPAFRWHHQ		96
CYP71E1	LLTSRSRNRSSRSGKLGGAAPR-----LPPGPAQLPIIGSL-HLLGLPLPHKNLRE		167

	-----SRS 1-----	
CYP79-1	IMKEAGTDIACIKLGGVHVIPISCPKIALLEVLSNQDANFASRPLTFASKTFSTGYRDAAM	147
CYP79-2	LLKDMNTINVLCRFGAVHVVVVACPEIAREVVRTNDAVLASRPEIVASALFSFGYKGSIL	131
CYP79-3v1	LLKDMNTKILCLRFGAVHVVVVACPEIAREVLRRTNDAAALASRPEIDACELFSLGYKGAIL	137
CYP79-3v2	LLKDMNTKILCLRFGAVHVVVVACPEIAREVLRRTNDAAALASRPEIDACELFSLGYKGTIL	137
CYP79A1	MMREMGTDIACVKLGGVHVVSITCPEIAREVLRKQDANFISRELTTFASETFSGGYRNAVL	156
CYP71E1	LARRYG-PVMQLRLGTVPTVVVSSAEAREVLRKVDVCCSREASPGPKRLSYDLKNVGF	226

CYP79-1	SHCGDHWKKMRVRLASEIIVCPSRHRWLHDKRADEADNLTRYVYNLATKAGS-----S	199
CYP79-2	TPYGEQWKKMRVRLSSEIILSASMEQRIQRRRAQEADYLVGFLYSQCSASAAACCCSA---	188
CYP79-3v1	SPYGEQWRKMRVRLTSEIILSASMEQRRRAQEADYLVASLYSQCCSSASAAASSAASS	197
CYP79-3v2	SPYGEQWRKMRVRLTSEIILSASMEQRRRAQEADYLVASLYSQCCSSASAAASSAASS	197
CYP79A1	SPYGDQWKKMRVRLTSEIICPSRHWLHDKRTDEADNLTRYVYNLATKAATG-----D	209
CYP71E1	APYGEYWRMRKLFALFLLSMRRVKAACYAREQEMDRLVADLDRAAASKAS-----D	277

	---SRS 2---	
CYP79-1	GAVDVRHIARHYCGNVVRLMENTRYFGKQPDSGGPPELVQHV-DAVFTSLGLLYSFCV	258
CYP79-2	--VDVRHVARHFVCGNMIRTLVFGKRHFS---VAAG-----	218
CYP79-3v1	AVVDIRHVARHFVFCNMIRSLVFGKRHFG---AGAGPGPEEVAHV-DTLFALLNYIYIFSV	253
CYP79-3v2	AVVDVRHVARHFVFCNMIRSLVFGKRHFG---AGAGPGPEEVAHV-DTLFALLNYIYIFSV	253
CYP79A1	VAVDVRHVARHYCGNVIRRLMENRRYFGEPAQDGGPGPEVLMH-DAVFTSLGLLYAFV	268
CYP71E1	--IVLNDHVFAITDGIIGTVAITGNIYAS---KQFAHKERFQHVLDAMDMMMA---SFA	328

	----SRS 2-----	
CYP79-1	SDYLP-----WLLGLD--LDGHEKMKVKEANERVTRLHDAVIDERWR-----LWKSGERRE	306
CYP79-2	-----GEVG-----TRIH-----	226
CYP79-3v1	SDYVPAAWRMVAGLD--LGGDREAGRSVMRTLRLHDPITIRERIR-EWDGLRERGEKRE	310
CYP79-3v2	SDYVPAAWRMVAGLD--LGGDREAGRSVMRTLRLHDPITIRERIR-EWDGLRERGEKRE	310
CYP79A1	SDYLP-----WLRGLD--LDGHEKIVKEANVAVNRLHDTVDDRWR-----QWKSGERQE	316
CYP71E1	EDFFFN-----AAGRLADRLSGFLARRERIFNELDVVFEKVIDQHMDP-----ARPVPDN	377

	---SRS 4---	A D GXXENP	
CYP79-1	LEDFLDVLIMLKDAEAGRPVLSIEEVKALLMDITFASMDNPSNAVEWALAEMVNNPTMLK	366	
CYP79-2	-----VQEMMFATIDNPSNTVEWALAEMMNRPEVMH	257	
CYP79-3v1	VRDFLDALVSLVDSQ-GRPFLSFDEIKAQTAEMMFATIDNPSNAVEWALAEMMNRPEVMK	369	
CYP79-3v2	VRDFLDALVSLVDSQ-GRPLLSFDEIKAQTA VRSDMHLKELS-CMCFALFII -----	361	
CYP79A1	MEDFLDVLITLKDAQ-GNPLLTIEEVKAQSQDITFAAVDNPSNAVEWALAEMVNNPEVMA	375	
CYP71E1	GGDLVDVLINLCKEHDGTLRFTRDHVKAIVLDTFIGAIDTSSVTIILWAMSELMRKPOVLR	437	

	EXXR ---SRS 5---	
CYP79-1	KAVDEIDSIVGQERL-VQEHDIPLNLYTKACIREAFRLHPVAPFNVPHVAVADATVAGYR	425
CYP79-2	KAMEELDTPVVGKDR-LVQEPDIPRLNLYLKACVREAFRHPHYAFNPPHVATEDAIVSGYL	316
CYP79-3v1	KAMEELDAVVGKDR-LVQESDIPGLNLYLKACVREAFRLHPYHALNLPHVAMEDTVVSGYL	428
CYP79-3v2	-----	361
CYP79A1	KAMEELDRVVGRERL-VQESDIPKLNLYVTKACIREAFRLHPVAPFNVPHVALADTTIAGYR	434
CYP71E1	KAQAEVRAAVGDDKPRVNSEDAAKIPYLMKVVKETLRLHPPATLLVRETMRDITICGYD	497

	D PERH	S TF	
CYP79-1	IPKGSHVILSRITGLGRNFDVWDDPLRFDPERHPLSPEME-----VSLVERDLRFISF	478	
CYP79-2	IPKGSHVLLSRVGLGRNFDVWDAPLQFRPERHLMNENDDVDDRYHHVVLTEPDLRFISF	376	
CYP79-3v1	VFKGSHVLLSRALGRNFDVWDEPLQFRPERHLLVNDGD-----VVLTEPDLRFISF	479	
CYP79-3v2	-----	361	
CYP79A1	VFKGSHVILSRITGLGRNFRVWDEPLRFYPPDRHLAT-AASD-----VALTENDLRFISF	486	
CYP71E1	VEANTRVFNVAWAIGRDFASWPAPDENPDRFVGSVDVYYS-----SHFELIPE	547	

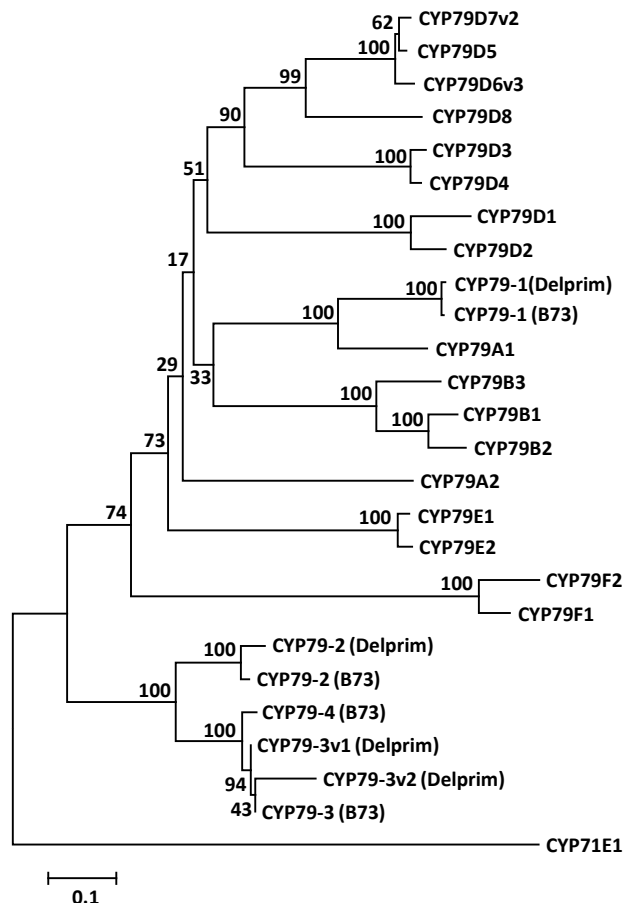
	S	A	
	TTGRRGCXG		
CYP79-1	STGRRGCIAAALGTDMTIMLFGRLIQGFSWSKMTGVAAIDLSESRH-NTFMARPLVLQAK		537
CYP79-2	SAGRRGCPGVSLSGSSVTMMLFARLLQGF TWTKPPGVRAIRLQESST-SLALAEPLLLQAO		435
CYP79-3v1	SAGRRGCPGVSLSGSSITMMLFARLLQGF AFSKPPGVRAIRLEESSA-SLALAEPLLLQAO		538
CYP79-3v2	-----		361
CYP79A1	STGRRGCIAAALGTAASVMLFGRLIQGF TWSKPAGVEAVDLSESKS-DTFMATPLVLHAE		545
CYP71E1	GAGRRICPGLTMGETNVTFTLANLLYCYDWALPGAMKPEDVSMEETGALTFHRKTPLVVV		607
CYP79-1	PRLPAHLYPGILLCK		552
CYP79-2	PRLPVHLYASG----		446
CYP79-3v1	PRLPVHLYAASG---		550
CYP79-3v2	-----		361
CYP79A1	PRLPAHLYPSISI--		558
CYP71E1	PTKYKNRRAA-----		617

Abbildung 3.7: Vergleich der Aminosäuresequenzen der in Zea mays var. Delprim identifizierten CYP79 mit CYP79A1. Das ClustelW-Alignment aller in der Maislinie Delprim identifizierten CYP79-Sequenzen wurde mithilfe des Programms „BioEdit“ erstellt. Als CYP79-Referenz wurde die Sequenz von CYP79A1 aus *S. bicolor* verwendet, als Fremdgruppen-Referenz die ebenfalls aus *S. bicolor* stammende Sequenz von CYP71E1. Schwarz hinterlegte AS sind in allen 6 Sequenzen, hellgraue in 4 Sequenzen und dunkelgraue in 5 Sequenzen identisch. Der auf dem Intron codierte Abschnitt der AS-Sequenz von CYP79-3v2 ist kursiv dargestellt. Wichtige konservierte Sequenzmotive und die putativen Substraterkennungsregionen sind gekennzeichnet. (HTS – „halt transfer signal“, SRS – “substrate recognition site”, TMD – “transmembrane domain”)

Die phylogenetische Analyse der in der Literatur beschriebenen und der in Mais identifizierten CYP79-Sequenzen zeigte, dass CYP79-1 die engste Verwandtschaft zu CYP79A1 aus *S. bicolor* zeigt (Abs. 2.9.1; Abb. 3.8; Sibbesen et al., 1995). Auch die CYP79-Enzyme der CYP79B-Unterfamilie sind relativ nahe verwandt zu CYP79-1. Im Vergleich mit dem in der Linie B73 kodierten CYP79-1 wies die Sequenz der Maislinie Delprim drei Punktmutationen auf, die im Austausch von Aminosäuren resultierten (S25A, G158R, A500G).

CYP79-2, CYP79-3 und CYP79-4 bildeten

Abbildung 3.8: Phylogenetische Analyse der CYP79 aus Mais. Der phylogenetische Baum wurde durch das Programm MEGA Version 5 (Tamura et al., 2011) mit dem „Neighbor-Joining“-Algorithmus unter Verwendung eines MUSCLE-Alignments erstellt. Das Bootstrap-Verfahren erfolgte mit 1000 Iterationen. Verwendet wurden die Proteinsequenzen putativer CYP79 aus Mais und charakterisierte CYP79 aus anderen Pflanzen sowie CYP71E1 aus *S. bicolor*, das als Fremdgruppen-Referenz diente. Die AS-Sequenzen der CYP79 aus der Maislinie B73 wurden der Datenbank entnommen.



ein eigenes Cluster, das keine enge Verwandtschaft zu den bislang charakterisierten CYP79 zeigte.

3.7 Enzymatische Aktivität heterolog exprimierter CYP79

Zur Aktivitätsbestimmung der membrangebundenen CYP79 wurden diese im W_{AT}-Stamm von *Saccharomyces cerevisiae* exprimiert, da durch die Verwendung der Hefe der korrekte Einbau der membrangebundenen P450 gewährleistet wird. Darüber hinaus enthielt dieser Stamm das *CPR2*-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und damit einen funktionellen Interaktionspartner für die CYP79-Enzyme enthielt. Daher wurden die Sequenzen von *CYP79-1*, *CYP79-2* und *CYP79-3v1* über angefügte Restriktionsschnittstellen in den Hefeexpressionsvektor pESC leu2d kloniert, heterolog exprimiert, über Mikrosomenextraktion partiell aufgereinigt und in Aktivitätsassays mit den potentiellen AS-Substraten getestet (Abs. 2.6.8; 2.6.10; 2.7). Der Umsatz der Substrate wurde mittels LC-MS/MS analysiert (Abs. 2.8.6). CYP79-1 setzte L-Phe zu PAOx und L-Trp zu IAOx um. Für CYP79-2 und CYP79-3v1 konnte jedoch keine Produktbildung nachgewiesen werden (Abb. 3.9). Bei einer Substratkonzentration von 1 mM war die Konversion von L-Phe zu PAOx mit $118,3 \pm 3,7 \text{ ng} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{V}_{\text{Assay}}^{-1}$ ~25-fach stärker als diejenige von L-Trp zu IAOx mit $4,7 \pm 0,1 \text{ ng IAOx} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{V}_{\text{Assay}}^{-1}$. Für die ebenfalls getesteten potentiellen Substrate L-Ile, L-Leu und L-Tyr konnte keine Produktbildung observiert werden (nicht gezeigt).

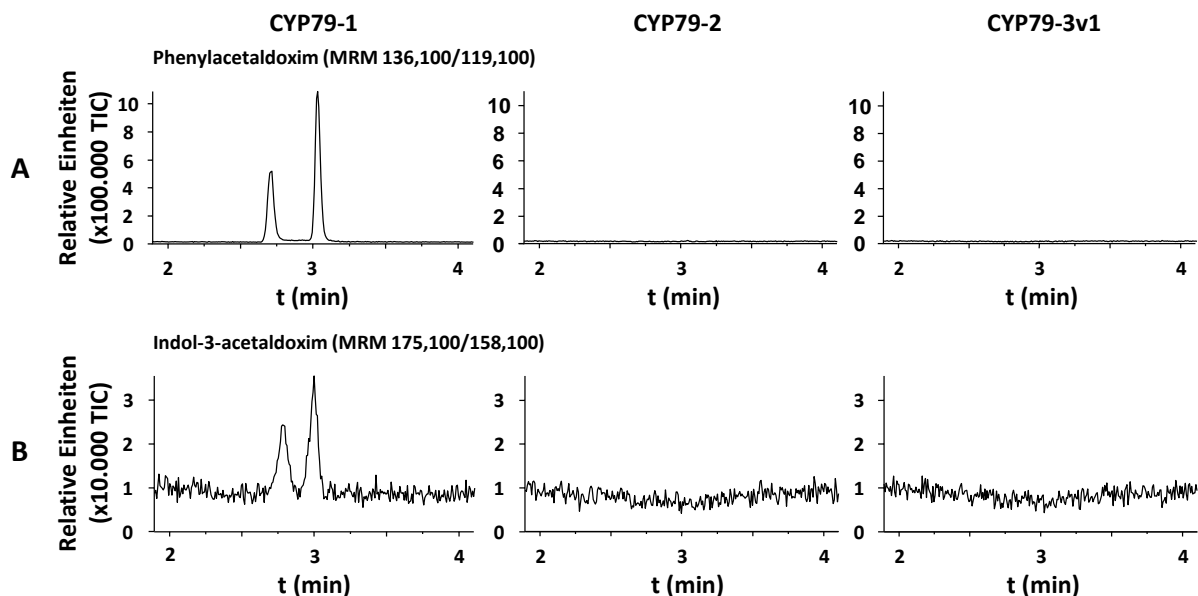


Abbildung 3.9: Bildung von Phenylacetaldoxim (A) und Indol-3-acetaldoxim (B) durch CYP79 aus *Zea mays* var. Delprim. Die CYP79 wurden in *S. cerevisiae* W_{AT} heterolog exprimiert, Hefemikrosomen präpariert und *in vitro* auf Aktivität getestet. Die Analyse der Enzymassays erfolgte mittels LC-MS/MS. Die verwendeten MRM waren 136,1/119,1 m/z für PAOx und 175,1/158,1 m/z für IAOx. (TIC – „total ion chromatogram“; MRM – „multiple reaction monitoring“)

3.8 Funktionelle Charakterisierung von CYP79-1 aus *Zea mays* var. Delprim

Zur Bestimmung der kinetischen Parameter des in Hefe heterolog exprimierten, funktionell aktiven CYP79-1 aus der Maislinie Delprim sollten zunächst geeignete Inkubationsparameter (Reaktionszeit und pH-Wert) ermittelt werden (Abs. 2.7.3.). Die Linearität der Produktbildung sollte geprüft werden, weshalb zunächst die Bildung von PAOx und IAOx in Abhängigkeit von der Reaktionszeit gemessen wurde. Es ließ sich für die Substrate L-Phe und L-Trp zeigen, dass eine Reaktionszeit von 30 min bei Substratkonzentrationen von 100 μ M und 1 mM im linearen Bereich der Produktbildung lag (Abb. 3.10). Des Weiteren wurde der optimale pH-Wert für die Bildung von PAOx und IAOx durch CYP79-1 ermittelt. Für die Bildung von PAOx lag dieser bei pH 7,0 (Abb. 3.11 A). Die optimale Bildung von IAOx konnte bei pH 7,2 detektiert werden (Abb. 3.11 B). Die Enzymassays wurden aufgrund dieser Ergebnisse bei einer Inkubationszeit von 30 min und einem pH-Wert von 7,0 durchgeführt und mittels LC-MS/MS analysiert. Aus diesen Daten wurden mittels hyperbolischer Regression die Michaelis-Menten-Konstanten (K_M) von CYP79-1 für beide Substrate bestimmt. K_M ist diejenige Substratkonzentration, bei der das Enzym mit halbmaximaler Geschwindigkeit arbeitet und stellt damit ein Maß für die Substrataffinität des Enzyms dar. Die K_M lag für L-Phe bei $117,2 \pm 6,0 \mu$ M und für L-Trp bei $150,2 \pm 9,2 \mu$ M.

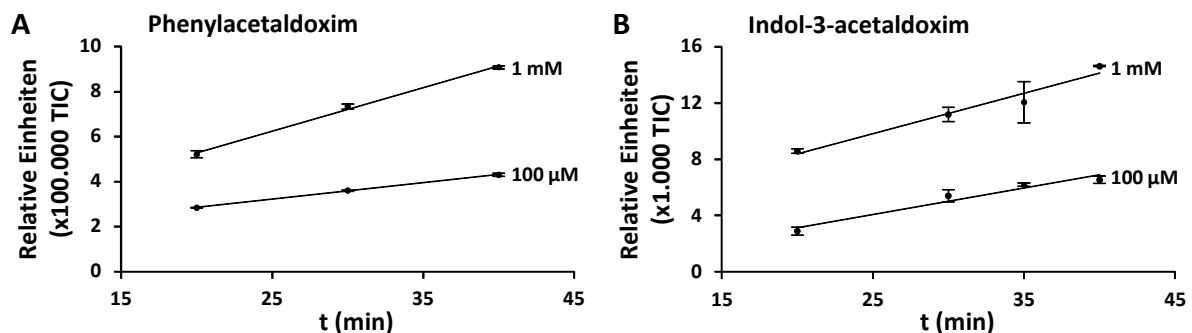


Abbildung 3.10: Bildung von Phenylacetaldoxim (A) und Indol-3-Acetaldoxim (B) durch CYP79-1 in Abhängigkeit von der Reaktionszeit. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardfehler der Messungen im Zeitraum von 20-40 min bei einer Substratkonzentration von 100 μ M bzw. 1 mM L-Phe (A) oder L-Trp (B). Die PAOx- und IAOx-Bildung wurden mittels LC-MS/MS detektiert. Die verwendeten MRM waren 136,1/119,1 m/z für PAOx und 175,1/158,1 m/z für IAOx. (TIC – „total ion chromatogram“; MRM – „multiple reaction monitoring“)

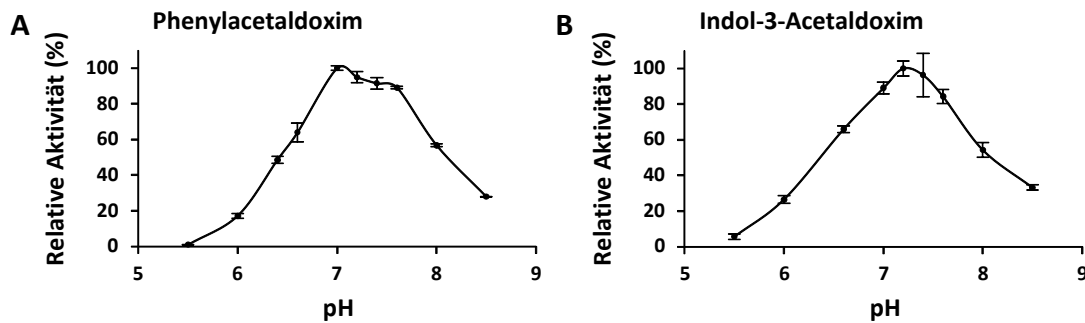


Abbildung 3.11: Bildung von Phenylacetaldoxim (A) und Indol-3-acetaldoxim (B) durch CYP79-1 in Abhängigkeit vom pH-Wert. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardfehler der Messungen relativ zur jeweiligen Maximalaktivität. Die PAOx- und IAOx-Bildung wurden mittels LC-MS/MS analysiert. Die verwendeten MRM waren 136,1/119,1 m/z für PAOx und 175,1/158,1 m/z für IAOx. (TIC – „total ion chromatogram“; MRM – „multiple reaction monitoring“)

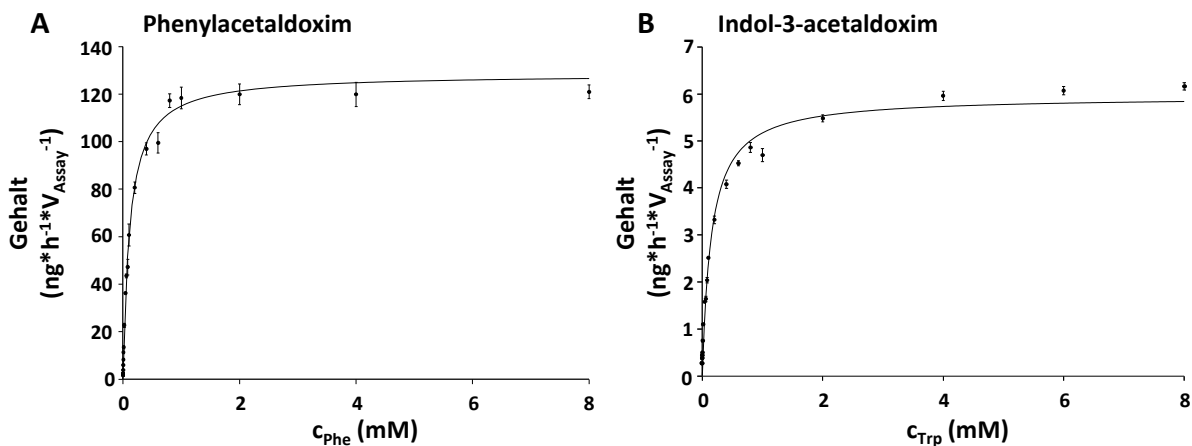


Abbildung 3.12: Bildung von Phenylacetaldoxim (A) und Indol-3-acetaldoxim (B) durch CYP79-1 in Abhängigkeit von der Substratkonzentration. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardfehler der Messungen in $\text{ng} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{V}_{\text{Assay}}^{-1}$. Die PAOx- und IAOx-Bildung wurden mittels LC-MS/MS analysiert. Die verwendeten MRM waren 136,1/119,1 m/z für PAOx und 175,1/158,1 m/z für IAOx. (TIC – „total ion chromatogram“; MRM – „multiple reaction monitoring“)

3.9 Quantitative „Realtime-PCR“-Analyse der Expression des *CYP79-1*-Gens in *Zea mays* var. Delprim

Die Expression vieler Gene, die eine Rolle in der Verteidigung von *Zea mays* spielen, sind durch Herbivorie induzierbar (Lawrence & Novak, 2004; Degenhardt, 2009; Signoretti et al., 2012; Köllner et al., 2013). Um zu prüfen, ob dies für das *CYP79-1*-Gens ebenfalls gilt, sollte dessen Expression in *Zea mays* var. Delprim durch quantitative „Realtime-PCR“ (qRT-PCR) untersucht werden (Abs. 2.6.4.4). Analysiert wurde hierzu cDNA, welche aus RNA 7-tägiger durch Herbivorie induzierter sowie nichtinduzierter Maispflanzen synthetisiert wurde (Abs. 2.2-2.5). Hierfür sollten zunächst unter den Versuchsbedingungen stabil exprimierte Haushaltsgene ermittelt werden. Dazu wurde die Expression von in der Literatur bereits

beschriebenen Haushaltsgenen in Herbivorie-induzierten und nichtinduzierten *Zea mays* var. Delprim mittels qRT-PCR analysiert (Jiang et al., 2011, Manoli et al., 2012). Es zeigte sich, dass die bei Jiang et al. (2011) beschriebenen Haushaltsgene *GAPDH*, *ACT1* und *Rbp1* in unseren Experimenten hohen Schwankungen unterworfen waren Sowohl der Standardfehler der C_q -Werte (Abb. 3.13 A) als auch die Differenz der C_q -Werte zwischen Herbivorie-induzierten Mais-pflanzen und nichtbehandelten Kontrollpflanzen (Abb. 3.13 B) waren für diese drei Gene hoch (C_q – „critical quantification cycle“; der C_q -Wert repräsentiert den PCR-Zyklus, bei dem die detektierte Fluoreszenz einen kritischen Schwellenwert überschreitet). Deutlich stabiler war die Expression der bei Manoli et al. (2012) beschriebenen Normalisierungsgene *MEP* und *LUG*. Beide wiesen sehr geringe Schwankungen des C_q -Werts auf und auch die Differenz der Epressionsstärke zwischen Herbivorie- und Kontrollgruppe war für beide Gene sehr gering.

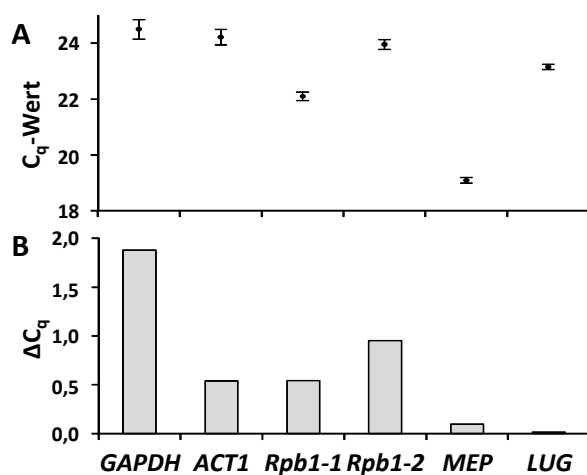


Abbildung 3.13: C_q -Werte von Normalisierungsgenen in *Zea mays* var. Delprim nach Herbivorie. Gezeigt sind (A) mittlere C_q -Werte und Standardfehler der getesteten Normalisierungsgene in Herbivorie-induzierten Maispflanzen (7 Replikate) und unbehandelten Kontrollpflanzen (6 Replikate) sowie (B) die Differenz der C_q -Werte zwischen Herbivorie-induzierter Gruppe und Kontrollgruppe.

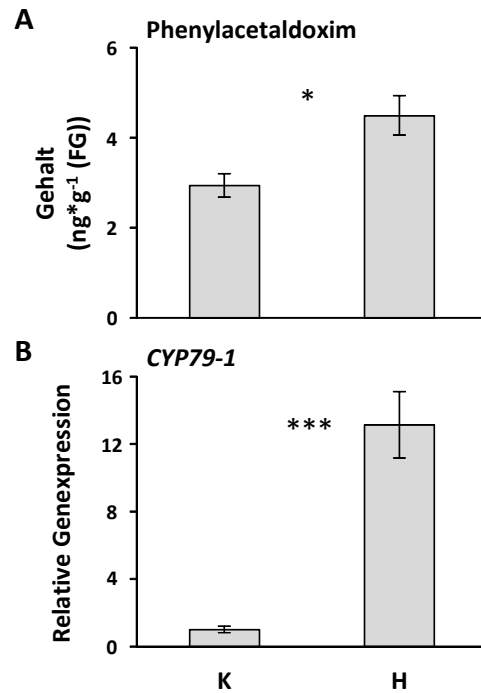
Die Maispflanzen wurden 7 Tage angezogen und durch *S.littoralis*-Herbivorie induziert. Die aus dem Pflanzenmaterial extrahierte RNA isoliert. Die daraus synthetisierte cDNA wurde für die qRT-PCR verwendet. Die getesteten Haushaltsgene waren *GAPDH* (Glycerinaldehyd-3-Dehydrogenase), *ACT1* (Actin), *Rpb1-1* (RNA-Polymerase Untereinheit B1, Primerpaar 1), *Rpb1-2* (RNA-Polymerase Untereinheit B1, Primerpaar 2), *MEP* (Membran-protein PB1A10.07c) und *LUG* (Transkriptionsrepressor Leunig).

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde *LUG* als Normalisierungsgen für die Expressionsanalyse von *CYP79-1* mittels qRT-PCR eingesetzt. Mittels qRT-PCR konnte gezeigt werden, dass nach Herbivorie in Maisblättern eine signifikante Akkumulation des *CYP79-1*-Transkripts im Vergleich zu den Kontrollblättern erfolgt (Abb. 3.14 B).

Neben der Veränderung der Genexpression wurde auch der Aldoximgehalt in den Blättern der verwendeten Maispflanzen bestimmt. Dazu wurden MeOH/H₂O-Extrakte des Blattmaterials mittels LC-MS/MS analysiert (Abs. 2.8.1: 2.8.5-6). PAOx war in den Blättern der Kontrollpflanzen (K) und den durch *S. littoralis*-Herbivorie induzierten Blättern (H)

nachweisbar (Abb. 3.14 A). Der PAOx-Gehalt in den Blättern induzierter Pflanzen war gegenüber dem PAOx-Gehalt der Kontrollgruppe signifikant erhöht. Andere Aldoxime waren nicht nachweisbar.

Abbildung 3.14: Phenylacetaldoxim (A) und *CYP79-1*-Expression (B) in Pflanzenmaterial 7-tägiger *Zea mays* var. *Delprim*. (A) Bestimmt wurde der PAOx-Gehalt in MeOH/H₂O-Extrakten der Blätter durch *S.littoralis*-Herbivorie induzierter Pflanzen (H, 7 Replikate) und nichtinduzierter Kontrollpflanzen (K, 7 Replikate) mittels LC-MS/MS. Abgebildet sind Mittelwerte und Standardfehler der PAOx-Menge in ng*g⁻¹ Frischgewicht (FG). (B) RNA von nicht induzierten und induzierten Maisblättern wurde in cDNA umgeschrieben. Mittels qRT-PCR wurde die relative Genexpression von *CYP79-1* bestimmt. Als Normalisierungsgen wurde *LUG* verwendet. Mit dem studentischen *t*-Test wurde auf Signifikanz geprüft.



4 Diskussion

4.1 Die Maislinie Delprim emittiert nach Herbivorie ein komplexes Duftbouquet, das auch volatile aliphatische Aldoxime und Nitroverbindungen beinhaltet

Maispflanzen produzieren nach Herbivorie ein komplexes Duftbouquet, das in der Maislinie Delprim bereits eingehend untersucht worden ist und dessen Komponenten in der direkten und indirekten Verteidigung gegen Herbivoren involviert sind (Turlings et al., 1990; Takabayashi et al., 1995; Bernasconi et al., 1998; Schnee et al., 2002; Gouinguene et al., 2003; Köllner et al., 2004; D'Allesandro et al., 2006). Dabei stimmt das in der vorliegenden Studie im Duft juveniler Maispflanzen nach Herbivorie gefundene, für die indirekte Verteidigung wichtige Terpenspektrum mit dem in früheren Arbeiten beschriebenen weitestgehend überein (Abb. 3.1; Schnee et al., 2002; Gouinguene et al., 2003). Auch hier waren die prominenten Terpenoide das Monoterpen Linalool, die Sesquiterpene (*E*)- α -Bergamoten, (*E*)- β -Farnesen und β -Caryophyllen sowie das irreguläre azyklische Terpenoid DMNT. Gleichzeitig unterscheidet es sich teilweise stark von demjenigen juveniler Pflanzen anderer Maiskultivare (Turlings et al., 1998). So emittieren beispielsweise die Linien „Royal Dent“ und „Iona sweet corn“ nach Herbivorie nur Spuren von β -Caryophyllen (Turlings et al., 1990; Takabayashi et al., 1995). Doch auch das Terpenspektrum adulter Pflanzen der Linie Delprim weicht von demjenigen juveniler Pflanzen stark ab (Köllner et al., 2004). Die dort dominanten Sesquiterpene sind anstatt der oben genannten Sesquithujen und β -Bisabolen.

Abgesehen von den Terpenoiden fanden sich vor allem aromatische Ester und die Produkte des Lipxygenase-Wegs, die „green leaf volatiles“, im Gegensatz zu den bisherigen Publikation von Schnee et al. (2002) und Gouinguene et al. (2003) an der Linie Delprim aber auch das stickstoffhaltige Indol (Abb. 3.1; 3.3). Die Emission dieser Duftstoffe ließ sich durch Zugabe des Pflanzenhormons Jasmonsäure, wie in der Literatur beschrieben, ähnlich wie durch Herbivorie von *S. littoralis* induzieren (Abb. 3.3; Abb. 3.5; Krumm et al., 1995; Van den Boom et al., 2004). Mechanische Verwundung hingegen führte nur zur Emission der „green leaf volatiles“ (Abb. 3.3). Diese Feststellung stimmt mit früheren Literaturberichten überein (Lawrence & Novak, 2004).

Neben den bereits beschriebenen Verbindungen ließen sich im Duftbouquet induzierter Delprim-Keimlinge auch Spuren der volatilen aliphatischen 2- und 3-Methylbutyraldoxime (2-/3-MBA; Abb. 3.2; 4.1) nachweisen. 2- und 3-MBA sind als Bestandteile des Duftprofils Herbivorie-induzierter Pflanzen bereits für verschiedene Arten beschrieben worden, beispielsweise für Goldregen (*Laburnum anagyroides*) und Robinie (*Robinia pseudoacacia*), aber auch Tabak (*Nicotiana tabacum*), Soja (*Glycine max*), Aubergine (*Solanum melongena*)

und Gurke (*Cucumis sativus*) (Takabayashi et al., 1991, 1994; van den Boom et al., 2004). Herbivorie durch die Larven der Minierfliegenarten *Liriomyza sativae* und *Liriomyza huidobrensis* an Limabohnenpflanzen (*Phaseolus vulgaris* L.) induziert ebenfalls die Emission aliphatischer Aldoxime (Wei et al., 2006). Und auch im Duftbouquet Herbivorie-induzierter *P. trichocarpa* nach Befall durch *Lymantria dispar* wurden 2- und 3-MBA nachgewiesen (Irmisch et al., 2013). Für Mais ist die Emission von 2- und 3-MBA nach Herbivorie bislang allerdings nicht dokumentiert. Hinweise auf das Vorkommen von Aldoximen und Nitrilen im Duft von Maispflanzen finden sich in der Literatur nur bei Takabayashi et al. (1995) und Turlings et al. (1998). Takabayashi et al. (1995) beschreiben jedoch aliphatische, O-methylierte Aldoxime im Duft Herbivorie-induzierter Maispflanzen der Linie „Royal Dent“, die im Duftbouquet der Linie Delprim nicht detektiert werden konnten. Allerdings wurden diese Aldoxime sowohl in der Publikation von Takabayashi et al. (1995) als auch derjenigen von Turlings et al. (1998) nicht eindeutig anhand synthetischer Standards identifiziert.

Die Emission von Duftstoffen nach Herbivorie kann in Mais in der direkten Verteidigung eine Rolle spielen. So konnten Bernasconi et al. (1998) zeigen, dass Maispflanzen nach Befall mit der Blattlaus *Rhopalosiphum maidis* ein komplexes Duftbouquet freisetzen, das abstoßend auf *Rhopalosiphum maidis* wirkt. Im Duftspektrum der dort untersuchten Pflanzen fanden sich jedoch keine Hinweise auf Aldoxime. Sollten die volatilen aliphatischen Aldoxime der Linie Delprim eine Rolle in der direkten Verteidigung spielen, so ist diese aufgrund der nur schwachen Emission von 2- und 3-MBA zumindest als Antwort auf Herbivorie durch *S. littoralis* als relativ gering einzuschätzen. Denn selbst bei L-Ile-Fütterung und systemischer JA-Induktion setzten die Maispflanzen nur ca. $1,5 \text{ ng} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}(\text{FG})$ 2-MBA frei (Abs. 3.3; Abb. 3.5). In *Populus x canescens* beispielsweise ist die Emission von 2-MBA (ca. $3 \text{ ng} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}(\text{FG})$) und 3-MBA (ca. $2,5 \text{ ng} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}(\text{FG})$) nach Herbivorie durch *Lymantria dispar* auch ohne Zugabe der Aminosäuresubstrate deutlich stärker. (Irmisch et al., 2013). Allerdings konnte dort von den Autoren kein direkter Einfluß dieser Aldoxime auf das Verhalten von *Lymantria dispar* festgestellt werden. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass die Aldoxime in der indirekten Verteidigung als Lockstoffe für Predatoren und Parasitoide dienen. In Maispflanzen der Linie Delprim ist aber auch diese Variante unwahrscheinlich, da die Emission von 2- und 3-MBA keine Korrelation mit Herbivorie durch *S. littoralis* aufwies. In anderen Maiskultivaren und/oder bei der direkten oder indirekten Verteidigung gegen andere Herbivoren könnten Aldoxime aber von größerer Bedeutung sein, da sowohl bei Takabayashi

et al. (1995) als auch bei Turlings et al. (1998) der Anteil von Aldoximen im Duftspektrum deutlich höher war.

Die Nitroverbindung 2-Methylnitrobutan (2-MNB) war neben den volatilen aliphatischen Aldoximen im Duftbouquet L-Ile-gefütterter, JA-induzierter Pflanzen ebenfalls nachweisbar (Abb 3.5; 4.1). Korrespondierende Nitroverbindungen von Aldoximen werden in der Literatur als Intermediate und Nebenprodukte der Biosynthese cyanogener Glykoside und Glucosinolate beschrieben (Matsuo et al., 1972; Halkier & Møller, 1990). Das *aci*-Tautomer des 1-Nitro-2-Phenylethan stellt ein Intermediat der Biosynthese von Benzylglucosinolat in der großen Kapuzinerkresse (*Tropeolum majus* L.) dar, dass aus PAOx gebildet wird (Matsuo et al. 1972). Aus diesem Tautomer entsteht durch prototropische Verschiebung 1-Nitro-2-Phenylethan als Nebenprodukt. Auch im Duftprofil von *P. trichocarpa* konnte 1-Nitro-2-Phenylethan detektiert werden (Irmisch et al., 2013). In welchem Zusammenhang diese Nitroverbindung mit dem korrespondierenden Aldoxim PAOx steht, ist jedoch bislang ungeklärt. Halkier & Møller (1990) beschreiben 1-Nitro-2-*p*-Hydroxyphenylethan als Nebenprodukt der Bildung von *p*-Hydroxyphenylacetaldoxim aus L-Tyr durch CYP79A1 in der Biosynthese von Dhurrin in *S. bicolor*. 2-MNB in der Maislinie Delprim könnte also, der Situation in *S. bicolor* entsprechend, ein Nebenprodukt der Biosynthese von 2-MBA sein oder aber, wie in *Tropeolum majus*, aus diesem gebildet werden. Ob die Produktion von 2-MBA und 2-MNB in Mais ursächlich zusammenhängen, bleibt jedoch zum jetzigen Zeitpunkt unklar. Allerdings wird die Annahme eines gemeinsamen biosynthetischen Ursprungs beider Substanzen dadurch gestützt, dass die Nitroverbindung nur im Duft der L-Ile-gefütterten, durch JA systemisch induzierten Pflanzen nachweisbar war, in denen auch die Emission von 2-MBA am stärksten war (Abb. 3.5).

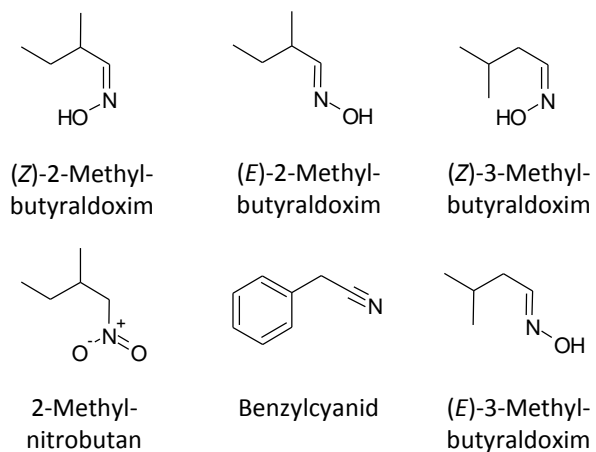


Abbildung 4.1: Volatile aliphatische Aldoxime und weitere stickstoffhaltige Duftstoffe im Duftbouquet von *Zea mays* var. Delprim.

4.2 Die in Maispflanzen identifizierten aromatischen Aldoxime Phenylacetaldoxim und Indol-3-acetaldoxim könnten in verschiedensten Stoffwechselwegen eine Rolle spielen

In dieser Arbeit konnten in Maispflanzen zum ersten Mal auch die nicht volatilen aromatischen Aldoxime Phenylacetaldoxim (PAOx) und – nach L-Trp-Fütterung – Indol-3-acetaldoxim (IAOx) sowie das aromatische Nitril Benzylcyanid (BC) nachgewiesen werden (Abb. 3.4; 3.6; 3.14; 4.1; 4.2). Die Produktion von PAOx erfolgte in jüngeren Pflanzen konstitutiv und wurde durch Herbivorie verstärkt (Abb. 3.14), in älteren erfolgte sie erst durch Herbivorie, die mechanische Verwundung der Pflanzen oder durch JA-Induktion (Abb. 3.4; 3.6). Die PAOx-Bildung in Mais kann also über JA-abhängige und -unabhängige Mechanismen induziert werden. Rückschlüsse auf die Stärke der Induktion der Aldoxim-Biosynthese unter verschiedenen Bedingungen ermöglicht diese Feststellung jedoch nicht. Denn es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Produktion von PAOx durch Herbivorie von *S. littoralis* zwar stärker induziert wurde als bei mechanischer Verwundung, gleichzeitig mögliche nachgeschaltete Stoffwechselwege aber ebenfalls hochreguliert wurden, so dass effektiv annähernd gleiche PAOx-Gehalte gemessen wurden.

Ein Produkt dieser Stoffwechselwege könnte das Nitril BC sein, das im Duft von *Zea mays* var *Delprim* sowohl nach Herbivorie durch *S. littoralis* als auch nach mechanischer Verwundung mit und ohne Applikation von JA detektiert werden konnte (Abb. 3.3). Für *P. trichocarpa* ist inzwischen belegt, dass emittiertes BC aus dem korrespondierenden PAOx gebildet wird (S. Irmisch, persönliche Kommunikation). Daneben finden sich Nitrile in Pflanzen auch als von Aldoximen abgeleitete Intermediate der Biosynthese (nicht)cyanogener Glykoside und des Camalexins (Halkier et al., 1989; Nafisi et al., 2007; Saito et al., 2012). Für Mais ist jedoch zur Zeit noch nicht geklärt, ob das im Duft detektierte BC biosynthetisch aus PAOx gebildet wird, da die Emission von BC nicht direkt mit dem PAOx-Gehalt im Pflanzenmaterial korreliert. Stattdessen wäre auch eine thermisch bedingte Dehydratisierung von PAOx im GC-Injektor denkbar (Ouédraogo et al., 2009).

Unabhängig davon fällt auf, dass die Emission von BC in den L-Phe-gefütterten JA-induzierten Pflanzen (Abb. 3.5) um den Faktor 10-20 niedriger war als die BC-Emission von Maispflanzen, die durch Herbivorie oder mechanische Verwundung induziert wurden (Abb. 3.3), obwohl der gemessene PAOx-Gehalt durch die Fütterung von L-Phe deutlich anstieg (Abb. 3.4; 3.6). Dieser Umstand impliziert, dass die Emission von BC nicht durch JA induziert, sondern durch mechanische Verwundung ausgelöst wird. Dies wurde in der Literatur auch schon für andere Stoffwechselwege des Sekundärmetabolismus wie etwa die

Terpenbiosynthese in *Abies grandis* beschrieben, für deren Induktion mechanische Verwundung ebenfalls ausreicht (Bohlmann et al., 1998). Die stärkere Emission von BC in Herbivorie-induzierten und mechanischen verwundeten Pflanzen (Abb. 3.3) könnte also durch die jeweilige Versuchsanordnung bedingt sein, da die Pflanzen des Aminosäurefütterungsexperiments nicht mechanisch verwundet, sondern nur in JA-Lösung platziert wurden.

Die Bildung von PAOx nach Herbivorie wurde auch schon für andere Spezies beschrieben, etwa für *P. trichocarpa* und *P. nigra* (Irmisch et al., 2013; 2014). In Herbivorie-induzierten Blättern von *P. trichocarpa* akkumuliert PAOx und erreicht dort Konzentrationen von bis zu $\sim 3 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (FG), also etwa das 1000-fache der in Mais bestimmten Konzentration (Irmisch et al., 2013). Dort konnte gezeigt werden, dass PAOx toxisch auf den Herbivor *Lymantria dispar* wirkt. Toxische Wirkung ist jedoch aufgrund des niedrigen PAOx-Gehalts im Mais nicht anzunehmen.

Daneben stellt PAOx eine Zwischenstufe der Biooythese der cyanogenen Glykoside Prunasin und Amygdalin in *Prunus persica* dar (Ben-Yehoshua & Conn, 1964; Tapper & Butler, 1971). PAOx könnte also – analog der von Halkier et al. (1989) gezeigten Funktion von *p*-Hydroxyphenylacetaldoxim als Zwischenstufe der Dhurrin-Biosynthese in der nahe verwandten Spezies *S. bicolor* – als Intermediat der Biosynthese möglicher cyanogener Glykoside in Mais dienen. Das Vorkommen solcher cyanogenen Glykoside in Mais ist in der Literatur jedoch nicht eindeutig geklärt. Zwar finden sich in mehreren Publikationen Hinweise auf die cyanogene Natur von Maispflanzen (Brunnich, 1903; Lehmann et al., 1979; Erb et al., 1981; Jones, 1998). Allerdings zeigten diesen Studien, dass das cyanogene Potential von Mais starken zeitlichen Schwankungen unterworfen ist und auch zwischen verschiedenen Kultivaren deutlich variiert (Brunnich, 1903; Erb et al., 1981). Eine neuere Untersuchung von Hay-Roe et al. (2011) beispielsweise konnte in adulten Pflanzen der Maislinie „Truckers Favourite“ nur Spuren von Blausäure nachweisen. Zum jetzigen Zeitpunkt finden sich in der Literatur auch keinerlei Hinweise auf die Struktur möglicher cyanogener Glykoside in Mais. Die Identifikation von PAOx, aber auch von 2-MBA, der Vorstufe des cyanogenen Glykosids Lotaustralin in *Lotus japonicus* und *Manihoc esculenta*, in der Maislinie Delprim könnte ein erster Hinweis darauf sein, dass es sich um die von L-Phe abgeleiteten Glykoside Prunasin, Amygdalin und Sambunigrin oder das von L-Ile abgeleitete Lotaustralin handeln könnte (Tapper & Butler, 1971; Andersen et al., 2000; Forslund et al., 2004). Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass ein ursprünglich existenter Stoffwechselweg für cyanogene Glykoside durch den Verlust der verantwortlichen Gene im

Laufe von Evolution und Züchtung in Mais nur noch trunkiert vorliegt und bei PAOx bzw. 2-MBA abbricht.

PAOx und IAOx sind auch Zwischenstufen der Biosynthese von Glucosinolaten und des Phytoalexins Camalexin (Hull et al., 2000; Halkier & Wittstock, 2000; Mikkelsen et al., 2000; Nauer et al., 2003). Allerdings ist die Bildung von Glucosinolaten nur in Familien der Ordnung Brassicales sowie der Gattung *Drypetes* dokumentiert und es existieren in der Literatur keine Hinweise auf ein Vorkommen von Glucosinolaten in Mais oder nahe verwandten Arten (Rodman et al., 1998). Das Vorkommen des von IAOx abgeleiteten Camalexins und verwandter Indolderivate ist sogar nur auf Brassicaceen beschränkt (Rauhut & Glawischnig, 2009).

In *Arabidopsis thaliana* verläuft auch ein möglicher Weg der Biosynthese des Auxins Indol-3-essigsäure (IAA) über IAOx (Hull et al., 2000; Mikkelsen et al., 2000). Dabei wird das aus L-Trp gebildete IAOx durch P450 der CYP83-Familie zum Indol-3-acetonitril (IAN) dehydratisiert und dieses durch Nitrilasen oxidativ zu IAA desaminiert (Hull et al., 2000; Mikkelsen et al., 2000; Bak & Feyereisen, 2001; Vorwerk et al., 2001; Sugawara et al., 2009). Für Mais wurde bereits gezeigt, dass die Nitrilase ZmNIT2 IAN zu IAA umsetzt (Kriechbaumer et al., 2007). Die Feststellung, dass Maispflanzen auch IAOx bilden, könnte also darauf hindeuten, dass sie ebenfalls über einen IAOx-abhängigen Weg der Auxinbiosynthese verfügen. Es wurden jedoch zum jetzigen Zeitpunkt noch keine Homologen zu CYP83 in Mais identifiziert, die die Bildung von IAN aus IAOx katalysieren könnten. Daher bleibt eine mögliche Beteiligung des IAOx an der Biosynthese von IAA unklar.

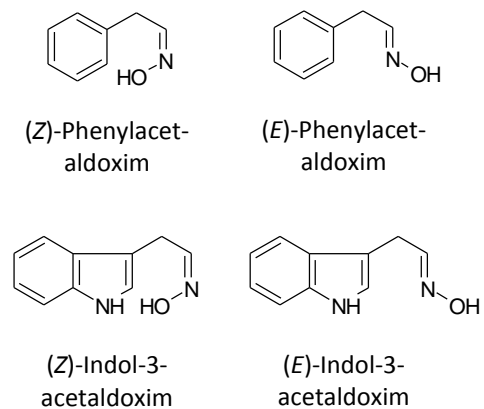


Abbildung 4.2: Aromatische Aldoxime im Blattmaterial von *Zea mays* var. Delprim.

4.3 Das Enzym CYP79-1 der Maislinie Delprim zeigt *in vitro* funktionelle Aktivität und weist als einziges der vier identifizierten Enzyme alle CYP79-spezifischen Sequenzmotive auf

Die Struktur und Funktion von CYP79-Enzymen ist bereits für eine Vielzahl pflanzlicher Biosynthesewege beschrieben worden (Hamberger & Bak, 2013). In allen dokumentierten Fällen katalysieren sie die Reaktion von Aminosäuren zu ihren korrespondierenden Aldoximen. In Maispflanzen waren jedoch bislang keine CYP79-Enzyme bekannt. Im

Rahmen dieser Arbeit konnten aus der Maislinie Delprim erstmals vier transkribierte *CYP79*-Sequenzen isoliert und heterolog exprimiert werden. Nur eines der entsprechenden Proteine (*CYP79-1*, *CYP79-2*, *CYP79-3v1* und *CYP79-3v2*), das *CYP79-1* (GRMZM2G138248) zeigte funktionelle Aktivität *in vitro*, die zwei anderen getesteten Produkte der Gene *CYP79-2* und *CYP79-3v1* hingegen nicht (Abb. 3.9). Dies ist höchstwahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass nur die Sequenz von *CYP79-1* der anderer *CYP79*-Enzyme im Detail entspricht (Abb. 3.7; Bak et al., 2006).

Schon die kalkulierte molekulare Masse der *CYP79*-Enzyme aus Mais von 40-60 kDa deckt sich nur für die beiden langen AS-Sequenzen *CYP79-1* (61,4 kDa) und *CYP79-3v1* (61,0 kDa) mit derjenigen anderer *CYP79* (Koch et al, 1995; Møller & Nielsen, 2000). Die Sequenzen von *CYP79-2* (49,4 kDa) und *CYP79-3v1* (40,2 kDa) sind für *CYP79* hingegen ungewöhnlich kurz. Darüber hinaus wies nur *CYP79-1* die von Bak (2006) beschriebene *CYP79*-charakteristische Sequenz (S/T)F(S/T)TGRRGCG der Hämbindedomäne auf (Abb. 3.7); in *CYP79-2* und *CYP79-3v1* hingegen war das Thr der oben gezeigten Sequenz durch ein Ala substituiert. Diese AS-Substitution direkt im aktiven Zentrum könnte für den Funktionsverlust dieser beiden *CYP79*-Enzyme mitverantwortlich sein (Abb 3,7; 3.9). *CYP79-1* enthält auch das für *CYP79* charakteristische PERH-Motiv und die *CYP79*-Konsensussequenz (A/G)XX(D/E)NP der "P450 Signatur" (Bak et al., 2006). Die Substitution des in anderen *CYP*-Familien konservierten Thr mit Gln führt nicht zum Aktivitätsverlust. Dies hatten auch schon vorherige Studien gezeigt (Sibbesen et al., 1995; Halkier, 1996). Der Hintergrund der Substitutionen apolarer mit polaren AS-Resten in der Hämbindedomäne und dem PERH-Motiv in *CYP79* ist bislang nicht exakt verstanden. Da beide Sequenzabschnitte Teile des aktiven Zentrums darstellen, wird jedoch vermutet, dass diese Substitutionen mit der atypischen katalytischen Funktion von *CYP79* oder der hydrophilen Natur ihrer Aminosäuresubstrate zusammenhängen (Bak et al., 2006).

In *CYP79-1* und *CYP79-3v1* konnten nur vier der sechs von Gotoh et al. (1992) vorhergesagten SRS identifiziert werden (Abb 3.7). Dies entspricht allerdings der Situation in der Sequenz des ebenfalls gezeigten, funktionell aktiven *CYP79A1* aus *S. bicolor* (Sibbesen et al., 1995). Und auch in P450 aus dem Stoffwechsel der Phenylpropanoide in *Arabidopsis thaliana* konnten nicht alle sechs SRS vorhergesagt werden (Schuler et al., 2003). Davon abgesehen muss auch berücksichtigt werden, dass Gotoh et al (1992) ihre Untersuchungen an tierischen P450 durchgeführt haben. In *CYP79-2* der Linie Delprim fehlen aufgrund der Deletion von 100 AS-Resten nach dem Gly-218 im Vergleich mit der korrespondierenden Sequenz der Linie B73 allerdings zusätzlich die SRS2 und Teile der SRS4 (Tab 3.1; Abb.

3.7). Der Aktivitätsverlust von CYP79-2 könnte also neben der Substitution in der Hämbindedomäne auch durch diese Deletion bedingt sein. Die genauen Gründe der nicht vorhandenen Aktivität von CYP79-2 und CYP79-3v1 bleiben aber trotz der hier beschriebenen Sequenzabweichungen unklar.

4.4 Heterolog exprimiertes CYP79-1 katalysiert die Bildung von Phenylacetaldoxim und Indol-3-acetaldoxim *in vitro*

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die heterologe Expression von CYP79-Enzymen aus Mais im W_{AT}-Stamm von *Saccharomyces cerevisiae*, der die Cytochrom P450-Reduktase AtCPR2 aus *Arabidopsis thaliana* exprimiert, ein funktionell aktives P450-CPR-System liefert. Dies bestätigt die Untersuchung der funktionellen Koexpression des pflanzlichen CYP73A5 mit der AtCPR1 und AtCPR2 in Hefe von Urban et al. (1997).

Das mikrosomale System bestehend aus CYP79-1 (GRMZM2G138248) und AtCPR2 katalysierte nach Zugabe des Kosubstrats NADPH die Bildung von PAOx und IAOx aus den entsprechenden Aminosäuren L-Phe und L-Trp *in vitro* (Abb. 3.9). Die Substrataffinität (K_M) war mit $117,2 \pm 6,0 \mu\text{M}$ (L-Phe) beziehungsweise $150,2 \pm 9,2 \mu\text{M}$ (L-Trp) den K_M -Werten anderer CYP79 vergleichbar (Abs. 3.8; Abb. 3.12; Andersen et al., 2000; Forslund et al., 2004; Irmisch et al., 2013). Normalerweise wird angenommen, dass CYP79-Enzyme hohe K_M -Werte im großen dreistelligen mikromolaren bis millimolaren Bereich aufweisen, um einem Mangel an freien Aminosäuren in der Pflanze vorzubeugen (Andersen et al., 2000). Dies konnte auch für CYP79-1 bestätigt werden. Auffallend war daneben, dass die Umsatzgeschwindigkeit von L -Phe gegenüber der von L-Trp etwa 25-fach größer war (Abs. 3.7). Dies korrelierte mit den in den Maispflanzen detektierten PAOx- und IAOx-Gehalten (Abb. 3.4; 3.6).

Da CYP79-1 hohe Sequenzidentität (76,2 %) mit CYP79A1 aus *S. bicolor* aufweist, ist anzunehmen, dass der der Bildung von PAOx und IAOx zugrundeliegende Reaktionsmechanismus im Wesentlichen demjenigen von CYP79A1 bei der Bildung von *p*-Hydroxyphenylacetaldoxim aus L-Tyr entspricht. Derselbe Mechanismus ist inzwischen auch für die Bildung von Aldoximen durch andere CYP79-Enzyme vorhergesagt worden (Andersen et al., 2000; Møller & Nielsen, 2000). Die in Analogie zu CYP79A1 für CYP79-1 angenommene Reaktion verlief mehrstufig, beginnend mit einer zweifachen Hydroxylierung der Aminofunktion (Abb. 4.3). Darauf folgen die spontan ablaufenden Schritte der Dehydratisierung der C-N-Bindung und der abschließenden C_α-Decarboxylierung (Sibbesen et al., 1995).

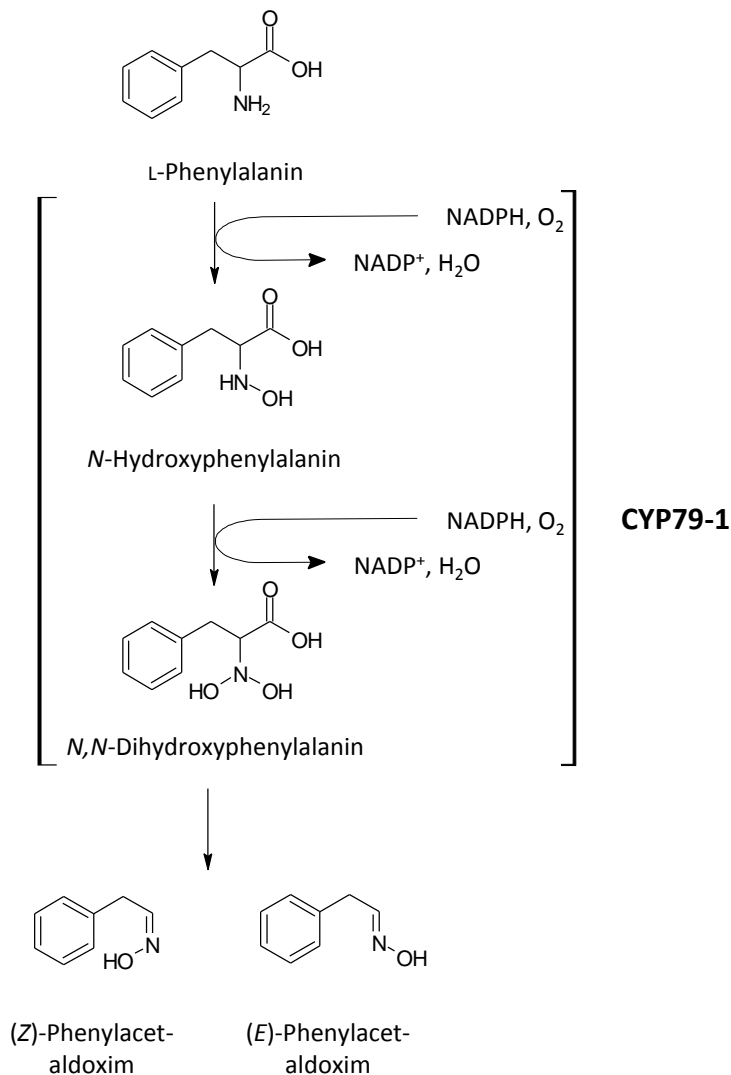


Abbildung 4.3: Putativer Reaktionsmechanismus von CYP79-1 aus *Zea mays* var. Delprim. Gezeigt ist die Umwandlung von L-Phenylalanin zu (*E/Z*)-Phenylacetaldoxim in Analogie zum vorhergesagten Reaktionsmechanismus von CYP79A1 aus *S. bicolor* (Sibbesen et al., 1995; Møller et al., 1999). Vermutlich katalysiert CYP79-1 die beiden initialen Hydroxylierungen der Aminofunktion zum *N,N*-Dihydroxyphenylalanin. Die anschließende Dehydratisierung und Decarboxylierung erfolgt könnte dann, wie bei CYP79A1 auch, spontan erfolgen und damit die beiden Produkte (*E*)- und (*Z*)-Phenylacetaldoxim liefern, die im Blattmaterial der Maispflanzen detektiert wurden.

4.5 CYP79-1 aus Mais ist nahe mit anderen CYP79-Enzymen verwandt, die aromatische Aminosäuren als Substrate akzeptieren, besitzt aber eine breitere Substratspezifität

Das Enzym CYP79-1 der Maislinie Delprim ist phylogenetisch nah verwandt mit den CYP79-Enzymen der CYP79A- und CYP79B-Unterfamilien, die ebenfalls alle aromatische Aminosäuren als Substrate akzeptieren (Abb. 3.8; Sibbesen et al., 1995; Møller et al., 1999; Halkier & Wittstock, 2000; Hull et al., 2000; Mikkelsen et al., 2000; Naur et al., 2003). Die bislang in der Literatur beschriebenen P450 der Familie CYP79 besitzen jedoch in der Regel eine engere Substratspezifität. Meist akzeptieren sie nur eine einzige aromatische oder aliphatische Aminosäure. Beispielsweise katalysiert das am nächsten verwandte CYP79A1 nur die Bildung von *p*-Hydroxyphenylacetaldoxim aus L-Tyr (Sibbesen et al., 1995, Kahn et al., 1999). Interessanterweise akzeptiert CYP79-1 allerdings im Gegensatz zu CYP79A1 kein

L-Tyr, es diskriminiert also über einen bislang unbekanntem Mechanismus zwischen dem relativ apolaren L-Phe und dem durch die Hydroxylfunktion der Seitenkette polareren L-Tyr. Auch die ebenfalls nahe verwandten CYP79B1 aus *Sinapis alba* und CYP79A2, CYP79B2 und CYP79B3 aus *Arabidopsis thaliana*, die den ersten Schritt der Biosynthese aromatischer Glucosinolate und – im Falle von CYP79B2 und CYP79B3 – auch den ersten Schritt der Biosynthese des Auxins IAA und des Phytoalexins Camalexin katalysieren, haben eine engere Substratspezifität als CYP79-1 (Halkier & Wittstock, 2000; Hull et al., 2000; Mikkelsen et al., 2000; Naur et al., 2003). Das CYP79A2 etwa wandelt nur L-Phe zu PAOx in der Biosynthese von Benzylglucosinolat um (Halkier & Wittstock, 2000). Die drei Enzyme der CYP79B-Unterfamilie dagegen weisen alle Substratspezifität für L-Trp auf (Hull et al., 2000; Mikkelsen et al., 2000; Naur et al., 2003). Die einzigen bislang beschriebenen CYP79-Enzyme mit extrem breiter Substratspezifität stellen die CYP79 aus *Populus trichocarpa* dar, die dort für die Produktion volatiler Aldoxime verantwortlich sind (Irmisch et al., 2013). Das CYP79D7v2 aus der Pappel akzeptiert nämlich sowohl die aromatischen Aminosäuren L-Phe und L-Trp als auch die aliphatischen Aminosäuren L-Ile und L-leu und bildet daraus die jeweils korrespondierenden Aldoxime. Eine weitere Substratspezifität weist, soweit bekannt, nur noch das ebenfalls aus *Populus trichocarpa* stammende CYP79D6v3 auf, das neben den zuvor genannten Aminosäuren auch L-Tyr akzeptiert.

CYP79-1 nimmt also hinsichtlich seiner Substratspezifität eine Zwischenstellung zwischen den nahe verwandten P450 der CYP79A- und CYP79B-Unterfamilien auf der einen und den CYP79 aus *Populus trichocarpa* auf der anderen Seite ein, da es zwar nicht nur eine, sondern zwei der aromatischen Aminosäuren als Substrate akzeptiert, im Gegensatz zu den Enzymen der Pappel aber keine aliphatischen Aminosäuren in Aldoxime umwandelt. Dies konnte neben der Charakterisierung *in vitro* auch durch heterologe Expression von CYP79-1 in *Nicotiana benthamiana* belegt werden, da im Duft von mit CYP79-1 transformierten Tabakpflanzen zwar PAOx und IAox, nicht aber 2- und 3-MBA nachweisbar waren (S. Irmisch, nicht publizierte Daten).

4.6 Die Analyse der Expression von CYP79-1 in Mais durch quantitative „Realtime-PCR“ und die Ergebnisse der Aminosäurefütterung deuten auf eine Rolle von CYP79-1 in der Bildung von PAOx und IAox *in vivo* hin

Die Resultate der quantitativen “Realtime-PCR”-Analyse (qRT-PCR) demonstrieren, dass die Transkription des *CYP79-1*-Gens in 7-tägigen Maiskeimlingen nach Herbivorie durch *S. littoralis* stark induziert war (Abb. 3.14). Dies korrelierte mit einem signifikanten Anstieg der

PAOx-Konzentration in diesen Pflanzen (Abb. 3.14). Dies kann als ein Hinweis gedeutet werden, dass das Enzym CYP79-1, das PAOx *in vitro* bildet, auch für die Biosynthese dieses Aldoxims *in vivo* verantwortlich ist. Gleichzeitig weist die Induzierbarkeit der Genexpression von CYP79-1 durch Herbivorie auch darauf hin, dass diese P450 eine Rolle in der direkten oder indirekten Verteidigung von Maispflanzen gegen Fressfeinde spielen könnte. Dies konnte beispielsweise für CYP79D6v3 und CYP79D7v2 von *Populus trichocarpa* gezeigt werden (Irmisch et al., 2013).

Die Annahme, dass CYP79-1 *in vivo* die PAOx-Bildung katalysiert, wird neben der Analyse der Genexpression durch die qRT-PCR auch durch die Ergebnisse der Aminosäurefütterung unterstützt. Dort sank der PAOx-Gehalt JA-induzierter Pflanzen bei Fütterung von L-Trp nämlich signifikant ab (Abb. 3.6). Dies ließe sich durch kompetitive Inhibition der PAOx-Synthese durch L-Trp erklären, was impliziert, dass dasselbe Enzym die Bildung von PAOx und IAOx aus L-Phe bzw. L-Trp *in vivo* katalysieren müsste. Da CYP79-1 beide Substrate *in vitro* akzeptiert, liegt die Vermutung nahe, dass es auch *in vivo* für die Biosynthese von PAOx und IAOx verantwortlich ist. Eindeutig belegen lässt sich diese Vermutung zum jetzigen Zeitpunkt allerdings nicht, da ein sicherer Beweis nur durch „Knock-Out“ und Überexpression des *CYP79-1*-Gens in der Maislinie Delprim und damit korrelierende Änderungen des PAOx-Gehalts erbracht werden könnte.

4.7 Ausblick

Mit CYP79-1 konnte eine funktionell aktive P450, die die Bildung der aromatischen Aldoxime Phenylacetaldoxim und Indol-3-acetaldoxim katalysiert, identifiziert und *in vitro* charakterisiert werden. Die Ergebnisse der Expressionsanalyse dieses Gens mit Hilfe der qRT-PCR deuten darauf hin, dass dieses Enzym auch *in vivo* für die Bildung dieser Aldoxime verantwortlich ist. Der nächste Schritt wäre , mittels “Knock-out“- oder RNAi-vermittelter “Knock-down“-Experimente die Transkription von *CYP79-1* in Herbivorie-induzierten Maispflanzen der Linie Delprim auszuschalten. Damit könnte der Beweis erbracht werden, dass CYP79-1 auch *in vivo* die Bildung aromatischer Aldoxime katalysiert.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte kein Enzym identifiziert werden, das die Bildung der volatilen aliphatischen Aldoxime 2- und 3-Methylbutyraldoxim sowie der Nitroverbindung 2-Methylnitromethan und des Nitrils Benzylcyanid katalysierte, die im Duftbouquet der Maispflanzen detektiert wurden. Um diese Enzyme zu identifizieren, müssten zunächst Bedingungen gefunden werden, bei denen die Biosynthese der entsprechenden Naturstoffe stärker induziert ist. Die Experimente von Turlings et al. (1998) deuten darauf hin, dass die

Maislinie LG11 nach Herbivorie durch *Ostrinia nubilalis* große Mengen stickstoffhaltiger Duftstoffe emittiert, die von den Autoren als putative Aldoxime beschrieben werden. Dieses System scheint demnach geeignet, um für die Bildung volatiler Aldoxime verantwortliche CYP79-Enzyme identifizieren zu können.

Des Weiteren könnte versucht werden, durch die Fütterung radioaktiv markierter Aldoxime zu prüfen, ob die Aldoxime im Mais Intermediate möglicher konsekutiver Biosynthesen darstellen. Interessant wäre in diesem Zusammenhang vor allem, ob in Maispflanzen cyanogene Glykoside gebildet werden oder aber, ob die IAox-Synthese in vergleichbarer Weise zur Auxin-Homöostase beiträgt, wie dies für *Arabidopsis thaliana* gezeigt wurde (Sugawara et al., 2009).

Darüber hinaus könnte durch die Fütterung radioaktiv markierte Aldoxime überprüft werden, ob die Biosynthese des 2-Methylnitrobutans und des Benzylcyanids wie vermutet über ein Aldoxim-Intermediat verläuft.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Normalisierungsgene für die qRT-PCR-Analyse geprüft. Die von Manoli et al. (2012) beschriebenen Normalisierungsgene *MEP* und *LUG* wiesen dabei sehr stabile Expressionsraten auf. Demnach könnten diese Gene für weitere qRT-PCR-Analysen in Maispflanzen nach Herbivorie eingesetzt werden.

5 Zusammenfassung

Maispflanzen setzen nach Herbivorie ein breites Spektrum volatiler Duftstoffe frei. Mittels GC-MS- und GC-FID-Analyse des Duftbouquets konnte gezeigt werden, dass die Maislinie Delprim unter anderem auch Spuren der aliphatischen 2- und 3-Methylbutyladoxime sowie der Nitroverbindung 2-Methylnitrobutan und des Nitrils Benzylcyanid emittiert. In MeOH/H₂O-Extrakten des Blattmaterials konnten durch LC-MS/MS darüber hinaus auch die aromatischen, nicht volatilen Aldoxime Phenylacetaldoxim und Indolacetaldoxim detektiert werden.

Für die Aldoxim-Biosynthese in Pflanzen sind in bislang allen bekannten Fällen Cytochrom P450 Monooxygenasen der Familie 79 verantwortlich. In dieser Arbeit wurden vier putative *CYP79*-Gene aus cDNA Herbivorie-induzierter Maispflanzen isoliert. Die Aminosäuresequenz von drei der vier isolierten Gene, *CYP79-2*, *CYP79-3v1* und *CYP79-3v2*, wies erhebliche Unterschiede gegenüber anderen *CYP79*-Enzymen auf. Die einzige Aminosäuresequenz eines *CYP79*-Gens aus *Zea mays* var. Delprim, die alle für *CYP79* charakteristischen Sequenzmotive enthielt, war *CYP79-1*. Diese zeigte die größte Sequenzübereinstimmung mit *CYP79A1* aus der mit *Zea mays* verwandten Art *Sorghum bicolor*. Zur funktionellen Charakterisierung wurden die *CYP79*-Gene heterolog im *Saccharomyces cerevisiae* W_{AT}-Stamm exprimiert, partiell gereinigt und die Enzymprodukte nach der Inkubation mit den potentiellen Substraten L-Phe, L-Trp, L-Leu, L-Ile und L-Tyr mittels LC-MS/MS analysiert. Dabei konnte mit *CYP79-1* zum ersten Mal ein funktionell aktives *CYP79*-Enzym aus Mais identifiziert werden, das die Bildung von Phenylacetaldoxim aus L-Phe und von Indol-3-acetaldoxim aus L-Trp *in vitro* katalysiert. Die putativen *CYP79*-Enzyme *CYP79-2*, *CYP79-3v1* und *CYP79-3v2* wiesen dagegen keinerlei Aktivität auf.

Mittels qRT-PCR konnte gezeigt werden, dass die Expression des aktiven Enzyms *CYP79-1* in Maispflanzen durch Herbivorie signifikant induziert wurde. Dieser Anstieg korrelierte mit einem Anstieg des Phenylacetaldoxim-Gehaltes in den Herbivorie-induzierten Pflanzen. Aufgrund der Aktivität *in vitro* und der Korrelation zwischen Expressionsinduktion und Produktakkumulation in Herbivorie-induzierten *Zea mays* var. Delprim ist zu vermuten, dass *CYP79-1* auch das für die Phenylacetaldoxim-Bildung verantwortliche Enzym *in vivo* ist.

6 Danksagung

Hiermit danke ich allen, die mir diese Arbeit ermöglicht haben, allen voran natürlich meinen Gutachtern Dr. Tobias G. Köllner und Prof. Jonathan Gershenzon. Daneben gilt mein Dank vor allem meiner direkten Betreuerin Sandra Irmisch, die mir auch bei Schwierigkeiten und Rückschlägen jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand. Desweiteren gilt mein Dank Michael Reichelt, der mir immer wieder geduldig bei technischen Fragen und Problemen der LC-MS/MS-Analyse half. Darüber hinaus danke ich allen Mitgliedern der Abteilung Biochemie des Max-Planck-Instituts für chemische Ökologie für die schönen Gespräche und die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre. Und auch Ulrike, Sebastian und Lenya gilt mein besonderer Dank für die vielseitige Unterstützung vor allem in der Endphase der Arbeit.

7 Literaturverzeichnis

- Andersen, M.D., Møller, B.L., Busk, P.K., and Svendsen, I.** (2000). Cytochromes P-450 from cassava (*Manihot esculenta* Crantz) catalyzing the first steps in the biosynthesis of the cyanogenic glucosides linamarin and lotaustralin - Cloning, functional expression in *Pichia pastoris*, and substrate specificity of the isolated recombinant enzymes. *Journal of Biological Chemistry* 275, 1966-1975.
- Bak, S., and Feyereisen, R.** (2001). The involvement of two P450 enzymes, CYP83B1 and CYP83A1, in auxin homeostasis and glucosinolate biosynthesis. *Plant Physiology* 127, 108-118.
- Bak, S., Nielsen, H.L., and Halkier, B.A.** (1998). The presence of CYP79 homologues in glucosinolate-producing plants shows evolutionary conservation of the enzymes in the conversion of amino acid to aldoxime in the biosynthesis of cyanogenic glucosides and glucosinolates. *Plant Molecular Biology* 38, 725-734.
- Bak, S., Paquette, S.M., Morant, M., Morant, A.V., Saito, S., Bjarnholt, N., Zagrobelny, M., Jørgensen, K., Osmani, S., Simonsen, H.T., Pérez, R.S., Heeswijck, T.B., Jørgensen, B., and Møller, B.L.** (2006). Cyanogenic glycosides: a case study for evolution and application of cytochromes P450. *Phytochemistry Reviews* 5, 309-329.
- Bartosova, L., Kuca, K., Kunesova, G., and Jun, D.** (2006). The acute toxicity of acetylcholinesterase reactivators in mice in relation to their structure. *Neurotoxicity Research* 9, 291-296.
- Bayburt, T.H. and Sligar, S.G.** (2002). Single-molecule height measurements on microsomal cytochrome P450 in nanometer-scale phospholipid bilayer disks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 6725-6730.
- Ben-Yehoshua, S., and Conn, E.E.** (1964). Biosynthesis of Prunasin, the cyanogenic glucoside of peach. *Plant Physiology* 39, 331-333.
- Bernasconi, M.L., Turlings, T.C.J., Ambrosetti, L., Bassetti, P., and Dorn, S.** (1998). Herbivore-induced emissions of maize volatiles repel the corn leaf aphid, *Rhopalosiphum maidis*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 87, 133-142.
- Birch, A.N.E., Begg, G.S., and Squire, G.R.** (2011). How agro-ecological research helps to address food security issues under new IPM and pesticide reduction policies for global crop production systems. *The Journal of Experimental Botany* 62, 3251-3261.

- Bonina, T.A., Gilep, A.A., Estabrook, R.W., and Usanov, S.A.** (2005). Engineering of proteolytically stable NADPH-cytochrome P450 reductase. *Biochemistry (Moscow)* 70, 357-365.
- Brunnich, J.C.** (1903). LXXXII.-Hydrocyanic acid in fodder-plants. *Journal of the Chemical Society, Transactions* 83, 788-796.
- D'Alessandro, M., Held, M., Triponez, Y., and Turlings, T.C.J.** (2006). The role of indole and other shikimic acid derived maize volatiles in the attraction of two parasitic wasps. *Journal of chemical ecology* 32, 2733-2748.
- De Moraes, C.M., Mescher, M.C., and Tumlinson, J.H.** (2001). Caterpillar-induced nocturnal plant volatiles repel conspecific females. *Nature* 410, 577-580.
- Degenhardt, J.** (2009). Indirect defense responses to herbivory in grasses. *Plant Physiology* 149, 96-102.
- Donath, J., and Boland, W.** (1995). Biosynthesis of acyclic homoterpenes: enzyme selectivity and absolute configuration of the nerolidol precursor. *Phytochemistry* 39, 785-790.
- Drumm, J.E., Adams, J.B., Brown, R.J., Campbell, C.L., Erbes, D.L., Hall, W.T., Hartzell, S.L., Holliday, M.J., Kleier, D.A., Martin, M.J., Pember, S.O., and Ramsey, G.R.** (1995). Oxime fungicides – highly-active broad-spectrum protectants. In *Synthesis and Chemistry of Agrochemicals IV*, D.R. Baker, J.G. Fenyes, and G.S. Basarab, eds (Washington: American Chemical Society), pp. 396-405.
- Durst, F., and Werck-Reichhart, D.** (1995). Biosynthesis of phenolic compounds: Involvement of cytochrome P450 enzymes. *Polyphenols* 94 69, 57-66.
- Durst, F., and Nelson, D.R.** (1995). Diversity and evolution of plant P450 and P450-reductases. *Drug Metabolism and Drug Interactions* 12, 189-206.
- Edgar, Robert C.** (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32, 1792-1797.
- Erb, N., Zinsmeister, H., Lehmann, G., and Michely, D.** (1981). Der Blausäuregehalt von Getreidearten gemäßiger Klimazonen. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung* 173, 176-179.
- Forslund, K., Morant, M., Jorgensen, B., Olsen, C.E., Asamizu, E., Sato, S., Tabata, S., and Bak, S.** (2004). Biosynthesis of the nitrile glucosides rhodiocyanoside A and D and the cyanogenic glucosides lotaustralin and linamarin in *Lotus japonicus*. *Plant Physiology* 135, 71-84.

- Frey, M., Stettner, C., Pare, P.W., Schmelz, E.A., Tumlinson, J.H., and Gierl, A.** (2000). An herbivore elicitor activates the gene for indole emission in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 14801-14806.
- Furuya, H., Shimizu, T., Hirano, K., Hatano, M., Fujii-Kuriyama, Y., Raag, R., and Poulos, T.L.** (1989). Site-directed mutageneses of rat liver cytochrome P-450: catalytic activities toward benzphetamine and 7-ethoxycoumarin. *Biochemistry* 28, 6848-6857.
- Gotoh, O.** (1992). Substrate recognition sites in cytochrome-P450 family-2 (CYP2) proteins inferred from comparative analyses of amino-acid and coding nucleotide-sequences. *Journal of Biological Chemistry* 267, 83-90.
- Gouinguene, S., Alborn, H., and Turling, T.C.** (2003). Induction of volatile emissions in maize by different larval instars of *Spodoptera littoralis*. *Journal of Chemical Ecology* 29, 145-162.
- Halkier, B.A.** (1996). Catalytic reactivities and structure/function relationships of cytochrome P450 enzymes. *Phytochemistry* 43, 1-21.
- Halkier, B.A., and Møller, B.L.** (1989). Biosynthesis of the cyanogenic glucoside dhurrin in seedlings of *Sorghum bicolor* (L.) Moench and partial purification of the enzyme system involved. *Plant physiology* 90, 1552-1559.
- Halkier, B.A., and Møller, B.L.** (1990). The biosynthesis of cyanogenic glucosides in higher plants – identification of three hydroxylation steps in the biosynthesis of dhurrin in *Sorghum bicolor* L. Moench and the involvement of 1-*aci*-nitro-2-*p*-hydroxyphenylethane as an intermediate. *Journal of Biological Chemistry* 265, 21114-21121.
- Halkier, B.A., and Wittstock, U.** (2000). Cytochrome P450CYP79A2 from *Arabidopsis thaliana* L. catalyzes the conversion of L-phenylalanine to phenylacetaldoxime in the biosynthesis of benzylglucosinolate. *Journal of Biological Chemistry* 275, 14659-14666.
- Halkier, B.A., and Gershenzon, J.** (2006). Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annual Review of Plant Biology* 57, 303-333.
- Halkier, B.A., Olsen, C.E., and Møller, B.L.** (1989). The Biosynthesis of cyanogenic glucosides in higher plants - the (E)-isomers and (Z)-isomers of para-hydroxyphenylacetaldehyde oxime as intermediates in the biosynthesis of dhurrin in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Journal of Biological Chemistry* 264, 19487-19494.

- Halkier, B.A., Chen, S.X., Glawischnig, E., Jorgensen, K., Naur, P., Jorgensen, B., Olsen, C.E., Hansen, C.H., Rasmussen, H., and Pickett, J.A.** (2003). CYP79F1 and CYP79F2 have distinct functions in the biosynthesis of aliphatic glucosinolates in *Arabidopsis*. *Plant Journal* 33, 923-937.
- Hall, Thomas A.** (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41, 95-98.
- Hamberger, B., and Bak, S.** (2013). Plant P450s as versatile drivers for evolution of species-specific chemical diversity. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 368, 20120426.
- Hannemann, F., Bichet, A., Ewen, K.M., and Bernhardt, R.** (2007). Cytochrome P450 systems - biological variations of electron transport chains. *Biochimica et Biophysica Acta* 1770, 330-344.
- Hansen, K.S., Kristensen, C., Tattersall, D.B., Jones, P.R., Olsen, C.E., Bak, S., and Møller, B.L.** (2003). The *in vitro* substrate regiospecificity of recombinant UGT85B1, the cyanohydrin glucosyltransferase from *Sorghum bicolor*. *Phytochemistry* 64, 143-151.
- Hasemann, C.A., Kurumbail, R.G., Boddupalli, S.S., Peterson, J.A., and Deisenhofer, J.** (1995). Structure and function of cytochromes P450: a comparative analysis of three crystal structures. *Structure* 3, 41-62.
- Hay-Roe, M.M., Meagher, R.L., and Nagoshi, R.N.** (2011). Effects of cyanogenic plants on fitness in two host strains of the fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*). *Journal of Chemical Ecology* 37, 1314-1322.
- Hrycay, E.G., and Bandiera, S.M.** (2012). The monooxygenase, peroxidase, and peroxygenase properties of cytochrome P450. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 522, 71-89.
- Hull, A.K., Vij, R., and Celenza, J.L.** (2000). *Arabidopsis* cytochrome P450s that catalyze the first step of tryptophan-dependent indole-3-acetic acid biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 2379-2384.
- Imai, Y., and Nakamura, M.** (1989). Point mutations at threonine-301 modify substrate specificity of rabbit liver microsomal cytochromes P-450 (laurate (ω -1)-hydroxylase and testosterone 16 α -hydroxylase). *Biochemical and Biophysical Research Communications* 158, 717-722.

- Irmisch, S., Unsicker, S.B., Gershenzon, J., and Köllner, T.G.** (2014). Identification and characterization of CYP79D6v4, a cytochrome P450 enzyme producing aldoximes in black poplar (*Populus nigra*). *Plant Signaling and Behaviour* 8.
- Irmisch, S., Clavijo McCormick, A., Boeckler, G.A., Schmidt, A., Reichelt, M., Schneider, B., Block, K., Schnitzler, J.P., Gershenzon, J., Unsicker, S.B., and Köllner, T.G.** (2013). Two herbivore-induced cytochrome P450 enzymes CYP79D6 and CYP79D7 catalyze the formation of volatile aldoximes involved in poplar defense. *The Plant Cell* 25, 4737-4754.
- Jensen, K., and Møller, B.L.** (2010). Plant NADPH-cytochrome P450 oxidoreductases. *Phytochemistry* 71, 132-141.
- Jiang, T.B., Zhou, B.R., Luo, M., Abbas, H.K., Kemerait, R., Lee, R.D., Scully, B.T., and Guo, B.Z.** (2011). Expression analysis of stress-related genes in kernels of different maize (*Zea mays* L.) inbred lines with different resistance to aflatoxin contamination. *Toxins* 3, 538-550.
- Jones, D.A.** (1998). Why are so many food plants cyanogenic? *Phytochemistry* 47, 155-162.
- Jones, P.R., Møller, B.L., and Hoj, P.B.** (1999). The UDP-glucose:p-hydroxymandelonitrile-O-glucosyltransferase that catalyzes the last step in synthesis of the cyanogenic glucoside dhurrin in *Sorghum bicolor*. Isolation, cloning, heterologous expression, and substrate specificity. *The Journal of Biological Chemistry* 274, 35483-35491.
- Kahn, R.A., Bak, S., Svendsen, I., Halkier, B.A., and Møller, B.L.** (1997). Isolation and reconstitution of cytochrome P450ox and in vitro reconstitution of the entire biosynthetic pathway of the cyanogenic glucoside dhurrin from sorghum. *Plant Physiology* 115, 1661-1670.
- Kaiser, R.A.J.** (1993). On the scent of orchids. *Bioactive Volatile Compounds from Plants* 525, 240-268.
- Klingenberg, M.** (1958). Pigments of rat liver microsomes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 75, 376-386.
- Koch, B.M., Sibbesen, O., Halkier, B.A., Svendsen, I., and Møller, B.L.** (1995). The primary sequence of cytochrome P450_{tyr}, 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, 177-186.

- Köllner, T.G., Schnee, C., Gershenzon, J., and Degenhardt, J.** (2004). The variability of sesquiterpenes emitted from two *Zea mays* cultivars is controlled by allelic variation of two terpene synthase genes encoding stereoselective multiple product enzymes. *The Plant Cell* 16, 1115-1131.
- Köllner, T.G., Lenk, C., Schnee, C., Kopke, S., Lindemann, P., Gershenzon, J., Degenhardt, J.** (2013).). Localization of sesquiterpene formation and emission in maize leaves after herbivore damage. *BMC Plant Biology* 13, 15.
- Koopmann, E., and Hahlbrock, K.** (1997). Differentially regulated NADPH:cytochrome P450 oxidoreductases in parsley. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 14954-14959.
- Kriechbaumer, V., Park, W.J., Piotrowski, M., Meeley, R.B., Gierl, A., and Glawischnig, E.** (2007). Maize nitrilases have a dual role in auxin homeostasis and beta-cyanoalanine hydrolysis. *The Journal of Experimental Botany* 58, 4225-4233.
- Krumm, T., Bandemer, K., and Boland, W.** (1995). Induction of volatile biosynthesis in the lima bean (*Phaseolus lunatus*) by leucine- and isoleucine conjugates of 1-oxo- and 1-hydroxyindan-4-carboxylic acid: evidence for amino acid conjugates of jasmonic acid as intermediates in the octadecanoid signalling pathway. *FEBS Letters* 377, 523-529.
- Lawrence, S.D., and Novak, N.G.** (2004). Maize genes induced by herbivory and volicitin. *Journal of Chemical Ecology* 30, 2543-2557.
- Lehmann, G., Zinsmeister, H.D., Erb, N., and Neunhoeffer, O.** (1979). Content of hydrocyanic acid in corn and cereal products. *Zeitschrift für Ernährungswissenschaft* 18, 16-22.
- Manoli, A., Sturaro, A., Trevisan, S., Quaggiotti, S., and Nonis, A.** (2012). Evaluation of candidate reference genes for qPCR in maize. *Journal of Plant Physiology* 169, 807-815.
- Matsuo, M., Kirkland, D.F., and Underhill, E.W.** (1972). 1-Nitro-2-phenylethane, a possible intermediate in the biosynthesis of benzylglucosinolate. *Phytochemistry* 11, 697-701.
- Mikkelsen, M.D., Hansen, C.H., Wittstock, U., and Halkier, B.A.** (2000). Cytochrome P450 CYP79B2 from *Arabidopsis* catalyzes the conversion of tryptophan to indole-3-acetaldoxime, a precursor of indole glucosinolates and indole-3-acetic acid. *Journal of Biological Chemistry* 275, 33712-33717.

- Miller, W.L., and Auchus, R.J.** (2011). The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocrine Reviews* 32, 81-151.
- Møller, B.L.** (2010). Plant science. Dynamic metabolons. *Science* 330, 1328-1329.
- Møller, B.L., and Conn, E.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. *The Journal of Biological Chemistry* 255, 3049-3056.
- Møller, B.L., and Nielsen, J.S.** (2000). Cloning and expression of cytochrome P450 enzymes catalyzing the conversion of tyrosine to p-hydroxyphenylacetaldoxime in the biosynthesis of cyanogenic glucosides in *Triglochin maritima*. *Plant Physiology* 122, 1311-1321.
- Møller, B.L., Kahn, R.A., Fahrendorf, T., and Halkier, B.A.** (1999). Substrate specificity of the cytochrome P450 enzymes CYP79A1 and CYP71E1 involved in the biosynthesis of the cyanogenic glucoside dhurrin in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 363, 9-18.
- Morant, A.V., Bjarnholt, N., Kragh, M.E., Kjaergaard, C.H., Jorgensen, K., Paquette, S.M., Piotrowski, M., Imberty, A., Olsen, C.E., Møller, B.L., and Bak, S.** (2008). The β -glucosidases responsible for bioactivation of hydroxynitrile glucosides in *Lotus japonicus*. *Plant Physiology* 147, 1072-1091.
- Morant, M., Bak, S., Møller, B.L., and Werck-Reichhart, D.** (2003). Plant cytochromes P450: tools for pharmacology, plant protection and phytoremediation. *Current Opinion in Biotechnology* 14, 151-162.
- Nafisi, M., Goregaoker, S., Botanga, C.J., Glawischnig, E., Olsen, C.E., Halkier, B.A., and Glazebrook, J.** (2007). Arabidopsis cytochrome P450 monooxygenase 71A13 catalyzes the conversion of indole-3-acetaldoxime in camalexin synthesis. *The Plant Cell* 19, 2039-2052.
- Naur, P., Hansen, C.H., Bak, S., Hansen, B.G., Jensen, N.B., Nielsen, H.L., and Halkier, B.A.** (2003). CYP79B1 from *Sinapis alba* converts tryptophane to indole-3-acetaldoxime. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 409, 235-241.
- Nelson, D.R., Ming, R., Alam, M., and Schuler, M.** (2008). Comparison of cytochrome P450 genes from six plant genomes. *Tropical Plant Biology* 1, 216-235.
- Nelson, D.R.** (2011). Progress in tracing the evolutionary paths of cytochrome P450. *Biochimica et Biophysica Acta* 1814, 14-18.

- Nielsen, J.S., and Møller, B.L.** (1999). Biosynthesis of cyanogenic glucosides in *Triglochin maritima* and the involvement of cytochrome P450 enzymes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 368, 121-130.
- Nielsen, K., and Møller, B.** (2005). Cytochrome P450s in plants. In *Cytochrome P450*, P. Ortiz de Montellano, eds. (Springer US), pp. 553-583.
- Oerke, E.-C.** (2006). Crop losses to pests. *The Journal of Agricultural Science* 144, 31-43.
- Ohta, D., and Mizutani, M.** (1998). Two isoforms of NADPH : cytochrome P450 reductase in *Arabidopsis thaliana* - gene structure, heterologous expression in insect cells, and differential regulation. *Plant Physiology* 116, 357-367.
- Omura, T., and Sato, R.** (1964). The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its heme protein nature. *The Journal of Biological Chemistry* 239, 2370-2378.
- Ouedraogo, I.W., Boulvin, M., Flammang, R., Gerbaux, P., and Bonzi-Coulibaly, Y.L.** (2009). Conversion of natural aldehydes from *Eucalyptus citriodora*, *Cymbopogon citratus*, and *Lippia multiflora* into oximes: GC-MS and FT-IR analysis. *Molecules* (Basel, Switzerland) 14, 3275-3285.
- Podust, L.M., and Sherman, D.H.** (2012). Diversity of P450 enzymes in the biosynthesis of natural products. *Natural Product Reports* 29, 1251-1266.
- Pollmann, S., Muller, A., and Weiler, E.W.** (2006). Many roads lead to "auxin": of nitrilases, synthases, and amidases. *Plant Biology* 8, 326-333.
- Raguso, R.A., Levin, R.A., Foose, S.E., Holmberg, M.W., and McDade, L.A.** (2003). Fragrance chemistry, nocturnal rhythms and pollination "syndromes" in *Nicotiana*. *Phytochemistry* 63, 265-284.
- Rauhut, T., and Glawischnig, E.** (2009). Evolution of camalexin and structurally related indolic compounds. *Phytochemistry* 70, 1638-1644.
- Reymond, P., and Farmer, E.E.** (1998). Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Current Opinion in Plant Biology* 1, 404-411.
- Ro, D.K., Ehltling, J., and Douglas, C.J.** (2002). Cloning, functional expression, and subcellular localization of multiple NADPH-cytochrome P450 reductases from hybrid poplar. *Plant Physiology* 130, 1837-1851.
- Rodman, J.E., Soltis, P.S., Soltis, D.E., Sytsma, K.J., and Karol, K.G.** (1998). Parallel evolution of glucosinolate biosynthesis inferred from congruent nuclear and plastid gene phylogenies. *American Journal of Botany* 85, 997-1006.

- Saito, S., Motawia, M.S., Olsen, C.E., Møller, B.L., and Bak, S.** (2012). Biosynthesis of rhodiocyanosides in *Lotus japonicus*: rhodiocyanoside A is synthesized from (Z)-2-methylbutanaloxime via 2-methyl-2-butenenitrile. *Phytochemistry* 77, 260-267.
- Sakaguchi, M., Mihara, K., and Sato, R.** (1984). Signal recognition particle is required for co-translational insertion of cytochrome P-450 into microsomal membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81, 3361-3364.
- Schnee, C., Köllner, T.G., Gershenzon, J., and Degenhardt, J.** (2002). The maize gene terpene synthase 1 encodes a sesquiterpene synthase catalyzing the formation of (E)-beta-farnesene, (E)-nerolidol, and (E,E)-farnesol after herbivore damage. *Plant Physiology* 130, 2049-2060.
- Schuler, M.A., and Rupasinghe, S.G.** (2011). Molecular and structural perspectives on cytochrome P450s in plants. *Advances in Botanical Research*, Vol 60 60, 263-307.
- Schuler, M.A., Rupasinghe, S., and Baudry, J.** (2003). Common active site architecture and binding strategy of four phenylpropanoid P450s from *Arabidopsis thaliana* as revealed by molecular modeling. *Protein Engineering* 16, 721-731.
- Sibbesen, O., Koch, B., Halkier, B.A., and Møller, B.L.** (1994). Isolation of the heme-thiolate enzyme cytochrome P-450(tyr), which catalyzes the committed step in the biosynthesis of the cyanogenic glucoside dhurrin in *Sorghum bicolor* (L) Moench. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 9740-9744.
- Sibbesen, O., Koch, B., Halkier, B.A., and Møller, B.L.** (1995). Cytochrome P-450-TYR 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, 3506-3511.
- Signoretti, A. G. C.; Penaflor, Mfgv; Moreira, L. S. D.; Noronha, N. C. and Bento, J. M. S.** (2012). Diurnal and nocturnal herbivore induction on maize elicit different innate response of the fall armyworm parasitoid, *Campoletis flavicincta*. *Journal of Pest Science* 85, 101-107.
- Smith, C.M., and Boyko, E.V.** (2007). The molecular bases of plant resistance and defense responses to aphid feeding: current status. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 122, 1-16.

- Steele, C.L., Katoh, S., Bohlmann, J., and Croteau, R.** (1998). Regulation of oleoresinosis in grand fir (*Abies grandis*). Differential transcriptional control of monoterpene, sesquiterpene, and diterpene synthase genes in response to wounding. *Plant Physiology* 116, 1497-1504.
- Sugawara, S., Hishiyama, S., Jikumaru, Y., Hanada, A., Nishimura, T., Koshiba, T., Zhao, Y., Kamiya, Y., and Kasahara, H.** (2009). Biochemical analyses of indole-3-acetaldoxime-dependent auxin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 5430-5435.
- Takabayashi, J., Dicke, M., and Posthumus, M.** (1991). Variation in composition of predator-attracting allelochemicals emitted by herbivore-infested plants: Relative influence of plant and herbivore. *Chemoecology* 2, 1-6.
- Takabayashi, J., Takahashi, S., Dicke, M., and Posthumus, M.A.** (1995). Developmental stage of herbivore *Pseudaletia separata* affects production of herbivore-induced synomone by corn plants. *Journal of Chemical Ecology* 21, 273-287.
- Takabayashi, J., Dicke, M., Takahashi, S., Posthumus, M.A., and Vanbeek, T.A.** (1994). Leaf age affects composition of herbivore-induced synomones and attraction of predatory mites. *Journal of Chemical Ecology* 20, 373-386.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S.** (2011). MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28, 2731-2739.
- Tapper, B.A., and Butler, G.W.** (1971). Oximes, nitriles and 2-hydroxynitriles as precursors in biosynthesis of cyanogenic glucosides. *Biochemical Journal* 124, 935.
- Thompson, J. D.; Higgins, D.G. and Gibson T.J.** (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22, 4673-4680.
- Turlings, T.C.J., Tumlinson, J.H., and Lewis, W.J.** (1990). Exploitation of herbivore-induced plant odors by host-seeking parasitic wasps. *Science* 250, 1251-1253.
- Turlings, T.C.J., Bernasconi, M., Bertossa, R., Bigler, F., Caloz, G., and Dorn, S.** (1998). The induction of volatile emissions in maize by three herbivore species with different feeding habits: Possible consequences for their natural enemies. *Biological Control* 11, 122-129.

- Unsicker, S.B., Kunert, G., and Gershenzon, J.** (2009). Protective perfumes: the role of vegetative volatiles in plant defense against herbivores. *Current Opinion in Plant Biology* 12, 479-485.
- Urban, P., Mignotte, C., Kazmaier, M., Delorme, F., and Pompon, D.** (1997). Cloning, yeast expression, and characterization of the coupling of two distantly related *Arabidopsis thaliana* NADPH-Cytochrome P450 reductases with P450 CYP73A5. *Journal of Biological Chemistry* 272, 19176-19186.
- Van Den Boom, C.E.M., Van Beek, T.A., Posthumus, M.A., De Groot, A., and Dicke, M.** (2004). Qualitative and quantitative variation among volatile profiles induced by *Tetranychus urticae* feeding on plants from various families. *Journal of Chemical Ecology* 30, 69-89.
- Vergara, R.C., Torres-Araneda, A., Villagra, D.A., Raguso, R.A., Arroyo, M.T.K., and Villagra, C.A.** (2011). Are eavesdroppers multimodal? Sensory exploitation of floral signals by a non-native cockroach *Blatta orientalis*. *Current Zoology* 57, 162-174.
- Vorwerk, S., Biernacki, S., Hillebrand, H., Janzik, I., Muller, A., Weiler, E.W., and Piotrowski, M.** (2001). Enzymatic characterization of the recombinant *Arabidopsis thaliana* nitrilase subfamily encoded by the NIT2/NIT1/NIT3-gene cluster. *Planta* 212, 508-516.
- Wei, J.N., Zhu, J.W., and Kang, L.** (2006). Volatiles released from bean plants in response to agromyzid flies. *Planta* 224, 279-287.
- Werck-Reichhart, D., and Feyereisen, R.** (2000). Cytochromes P450: a success story. *Genome Biology* 1, 1-9.
- Williams, P.A., Cosme, J., Sridhar, V., Johnson, E.F., and McRee, D.E.** (2000). Mammalian microsomal cytochrome P450 monooxygenase: Structural adaptations for membrane binding and functional diversity. *Molecular Cell* 5, 121-131.
- Wu, S., and Chappell, J.** (2008). Metabolic engineering of natural products in plants; tools of the trade and challenges for the future. *Current Opinion in Biotechnology* 19, 145-152.
- Zhao, Y., Hull, A.K., Gupta, N.R., Goss, K.A., Alonso, J., Ecker, J.R., Normanly, J., Chory, J., and Celenza, J.L.** (2002). Trp-dependent auxin biosynthesis in *Arabidopsis*: involvement of cytochrome P450s CYP79B2 and CYP79B3. *Genes & Development* 16, 3100-3112.

8 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Diplomarbeit „Identifizierung und Charakterisierung von Aldoxim-produzierenden P450 Enzymen im Mais“ selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Jena, den 17.02.2014

(Philipp Zeltner)

Zeltner, Philipp

Identifizierung und Charakterisierung von Aldoxim-produzierenden P450 Enzymen im Mais

Friedrich-Schiller Universität Jena, 17.02.2014

9 Anhang

9.1 Daten der Duftsammlungen

Tab. 9.1: Daten der Duftsammlung von *Zea mays* var. Delprim nach Herbivorie und mechanischer Verwundung in $\text{ng}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ (FG)

	Herbivorie durch <i>S.littoralis</i> (H)	Mechanische Verwundung & JA-Applikation (MJ)	Mechanische Verwundung (M)	Kontrolle (K)
3-Methylbutyraldoxim*	-	-	-	-
2-Methylbutyraldoxim*	-	-	-	-
(E)-2-Hexenal	31,23 ± 17,96	15,79 ± 5,35	26,78 ± 5,86	-
n-Butanal	13,51 ± 6,95	13,17 ± 3,44	12,12 ± 5,39	8,7 ± 6,95
Ethenylbenzen	18,88 ± 2,97	10,7 ± 5,78	13,39 ± 3,66	11,56 ± 2,59
2-Methyl-2,4-pentandiol	119,80 ± 62,33	-	-	78,35 ± 46,62
6-Methyl-5-hepten-2-on	13,21 ± 2,35	3,28 ± 0,86	6,83 ± 1,67	10,73 ± 2,45
β-Myrcen	16,76 ± 4,06	11,7 ± 0,63	4,22 ± 0,58	2,90 ± 1,30
3-Hexenol-1-acetat	99,77 ± 44,86	86,87 ± 15,1	44,24 ± 9,07	10,33 ± 7,13
Limonen	21,32 ± 2,50	9,06 ± 4,81	9,74 ± 2,25	13,88 ± 3,81
Phenylmethanol	22,72 ± 3,76	8,73 ± 3,15	2,02 ± 2,02	10,08 ± 3,25
Linalool	297,5 ± 136,96	133,54 ± 24,61	32,83 ± 6,19	31,99 ± 9,20
n-Nonanal	37,30 ± 6,72	18,41 ± 9,35	12,34 ± 2,65	27,34 ± 3,10
Phenylethanol	9,07 ± 0,94	0,68 ± 0,40	4,26 ± 1,15	-
(E)-4,8-Dimethyl-1,3,7-nonatrien	110,29 ± 42,52	35,26 ± 5,46	5,17 ± 0,67	-
Benzylcyanid	2,92 ± 0,50	1,25 ± 0,24	1,53 ± 0,38	-
Phenylmethylacetat	10,02 ± 6,51	7,00 ± 1,84	-	-
n-Dodecan	1,96 ± 1,96	3,85 ± 0,34	2,52 ± 1,02	3,48 ± 1,98
n-Decanal	24,97 ± 3,71	12,22 ± 6,99	10,22 ± 2,42	20,74 ± 1,25
2-Phenylethylacetat	53,49 ± 17,13	8,54 ± 2,13	-	-
Indol	322,5 ± 138,45	25,51 ± 10,44	0,35 ± 0,35	-
Geranylacetat	41,50 ± 29,19	24,69 ± 9,42	-	-
(E)-β-Caryophyllen	110,36 ± 54,02	26,73 ± 5,79	3,07 ± 1,53	-
(E)-α-Bergamoten	328,65 ± 131,12	122,16 ± 27,56	14,29 ± 6,68	-
(E)-β-Farnesen	548,44 ± 240,71	209,4 ± 58,79	18,56 ± 8,98	-
β-Sesquiphellandren	26,05 ± 12,82	11,88 ± 3,82	0,51 ± 0,51	-

*2- und 3-MBA waren nur in nicht quantifizierbaren Spuren detektierbar, vgl. Abs. 3.1.

Tab. 9.2: Daten der Duftsammlung von *Zea mays* nach Aminosäurefütterung in ng*h⁻¹*g⁻¹ (FG)

	Kontrolle H ₂ O	Kontrolle JA	Ile + H ₂ O
(<i>E</i>)-2-Methylbutyraldoxim	-	0,08 ± 0,04	-
(<i>Z</i>)-2-Methylbutyraldoxim	-	0,05 ± 0,03	-
3-Methylbutylacetat	-	0,32 ± 0,04	-
2-Methylbutylacetat	-	0,89 ± 0,10	-
2-Methylnitrobutan	-	-	-
n-Decan	7,44 ± 1,25	6,73 ± 0,92	6,25 ± 1,41
3-Hexenol-1-acetat	0,59 ± 0,11	1,07 ± 0,08	0,55 ± 0,12
4-Methyldecan	2,26 ± 0,35	1,88 ± 0,17	2,02 ± 0,31
2,4-Dimethylheptan	3,75 ± 0,30	2,93 ± 0,31	3,54 ± 0,60
5-Ethyl-2-methyloctan	1,43 ± 0,17	1,07 ± 0,15	1,33 ± 0,24
n-Nonanal	1,38 ± 0,08	1,94 ± 0,17	1,55 ± 0,31
(<i>E</i>)-4,8-Dimethyl-1,3,7-nonatrien	-	10,61 ± 2,06	0,19 ± 0,08
Benzylcyanid	-	0,02 ± 0,02	-
Phenylmethylacetat	-	1,54 ± 0,24	-
n-Dodecan	6,10 ± 0,63	7,73 ± 1,13	6,42 ± 1,36
n-Decanal	1,52 ± 0,10	2,00 ± 0,19	1,64 ± 0,30
2-Phenylethylacetat	0,30 ± 0,11	6,09 ± 0,98	0,14 ± 0,10
Indol	0,21 ± 0,12	7,60 ± 2,11	0,07 ± 0,05
Geranylacetat	-	0,52 ± 0,2	-
(<i>E</i>)-β-Caryophyllen	0,72 ± 0,26	28,25 ± 6,18	0,77 ± 0,09
(<i>E</i>)-α-Bergamoten	0,23 ± 0,09	11,20 ± 2,12	0,29 ± 0,05
(<i>E</i>)-β-Farnesen	0,30 ± 0,12	23,48 ± 6,38	0,51 ± 0,08
α-Humulen	0,16 ± 0,09	0,99 ± 0,35	-
β-Bisabolen	-	1,28 ± 0,1	-
β-Sesquiphellandren	-	1,28 ± 0,22	-

	Ile + JA	Phe + H ₂ O	Phe + JA
(<i>E</i>)-2-Methylbutyraldoxim	1,13 ± 0,48	-	0,27 ± 0,08
(<i>Z</i>)-2-Methylbutyraldoxim	0,52 ± 0,17	-	0,20 ± 0,06
3-Methylbutylacetat	0,44 ± 0,20	-	0,60 ± 0,10
2-Methylbutylacetat	5,62 ± 1,63	-	0,70 ± 0,18
2-Methylnitrobutan	1,59 ± 0,54	-	-
n-Decan	8,82 ± 2,43	6,27 ± 2,94	4,72 ± 0,43
3-Hexenol-1-acetat	1,27 ± 0,25	0,87 ± 0,52	2,13 ± 0,38
4-Methyldecan	2,90 ± 1,17	2,06 ± 0,79	1,69 ± 0,28
2,4-Dimethylheptan	4,62 ± 1,59	3,55 ± 1,47	2,70 ± 0,31
5-Ethyl-2-methyloctan	1,76 ± 0,59	1,24 ± 0,58	0,94 ± 0,06
n-Nonanal	1,82 ± 0,34	2,01 ± 0,53	1,63 ± 0,22

(E)-4,8-Dimethyl-1,3,7-nonatrien	10,89 ± 2,61	0,13 ± 0,09	17,23 ± 3,74
Benzylcyanid	0,03 ± 0,02	0,04 ± 0,02	0,16 ± 0,01
Phenylmethylacetat	1,40 ± 0,28	-	3,06 ± 0,47
n-Dodecan	10,60 ± 3,65	6,38 ± 2,92	6,12 ± 0,79
n-Decanal	2,06 ± 0,43	1,88 ± 0,62	1,68 ± 0,23
2-Phenylethylacetat	6,01 ± 0,97	0,43 ± 0,16	27,63 ± 3,82
Indol	8,02 ± 4,18	0,41 ± 0,22	20,49 ± 2,47
Geranylacetat	0,78 ± 0,35	0,01 ± 0,01	1,36 ± 0,29
(E)-β-Caryophyllen	26,50 ± 6,6	0,28 ± 0,18	39,32 ± 3,84
(E)-α-Bergamoten	11,01 ± 2,31	0,32 ± 0,09	30,38 ± 4,19
(E)-β-Farnesen	19,95 ± 5,19	0,47 ± 0,19	111,41 ± 60,81
α-Humulen	1,83 ± 0,53	0,18 ± 0,07	0,53 ± 0,30
β-Bisabolen	2,42 ± 0,68	-	1,40 ± 0,20
β-Sesquiphellandren	1,53 ± 0,42	-	3,71 ± 0,50

9.2 Daten der MeOH/H₂O-Extrakte

Tab. 9.3: Phenylacetaldoxim-Gehalt in *Zea mays* var. Delprim nach Herbivorie und mechanischer Verwundung in ng*g⁻¹ (FG)

	Herbivorie durch <i>S.littoralis</i> (H)	Mechanische Verwundung & JA-Applikation (MJ)	Mechanische Verwundung (M)	Kontrolle (K)
Phenylacetaldoxim	0,95 ± 0,32	1,78 ± 0,51	1,28 ± 0,34	0,07 ± 0,03

Tab. 9.4: Phenylacetaldoxim- und Indol-3-acetaldoximgehalt in *Zea mays* var. Delprim nach Aminosäurefütterung in ng*g⁻¹ (FG)

	Kontrolle H ₂ O (K)	Kontrolle JA (JA)	Phe + H ₂ O
Phenylacetaldoxim	0,99 ± 0,50	4,26 ± 2,60	1,79 ± 0,28
Indol-3-acetaldoxim	-	-	-
	Phe + JA	Trp + H ₂ O	Trp + JA
Phenylacetaldoxim	12,39 ± 2,04	0,37 ± 0,37	0,32 ± 0,10
Indol-3-acetaldoxim	-	3,79 ± 0,42	3,54 ± 0,98

9.3 DNA-Sequenzen

CYP79-1, cDNA-Sequenz

ATGGTTTTCCTCTCCGCAAGCAAATAAATTTCTCTCCGCAAGCAAATTTCTCGCCCTCCTCTTCGTGCATGGCT
CCTCATGTGCTATTAGTCCTAGTGATTCTCCTGTACCTCGTCAGAACCCTCAGGCCGTGGCGGAGCCGGAGGAAC
AGCACATGCTGCACCCCTTCGCTCCCGCCGGGGCCTGTGCCATGGCCCGTTCGTTGGCAACCTGCCGGAGATGATG
CTGAGCGACAAGCCGGCGTTTCCACTGGATCCACCATATCATGAAGGAGGCGGGAACCGACATCGCCTGCATCAAA
CTGGGCGGTGTCCACGTTCATCCCATCAGCTGCCCAAGATCGCGCTCGAGGTGCTAAGCAACCAGGATGCCAAC
TTCGCTTCTCGCCCGCTCACCTTCGCCTCCAAGACCTTCAGCACAGGCTACAGGGACGCTGCAATGTCCACTGC
GGCGACCACTGGAAGAAGATGCGCCGCGTGTGGCCTCCGAGATCGTCTGCCCTCCCGTACAGGTGGCTCCAC
GACAAGCGTGCCGACGAGGCAGACAACCTCACCCGGTACGTCTACAACCTCGCGACGAAGGCGGGTTCGTCCGGC
GCCGTTGACGTTAGGCATATTGCGCGCCACTACTGCGGGAATGTCTGTCGCGCCCTCATGTTCAACACGCGCTAC
TTTGGCAAGCCACAGCCTGACAGTGGGCCTGGTCCACTGGAGGTACAGCATGTGGACGCCGTCTTTACCTCCCTC
GGCCTTCTCTACTCCTTCTGTGTCTCCGACTATCTCCCGTGGCTGTGGGCCTCGACCTAGACGGCCACGAGAAG
ATGGTCAAGGAGGCCAATGAGAGGGTGACCAGGCTGCACGACGCGGTTCATCGACGAGCGGTGGAGGCTGTGGAA
AGCGGCGAGAGGCGGGAGCTCGAGGACTTCTAGACGTGCTCATCATGCTCAAGGACGCCGAGGCCGGCAGACCG
GTGCTCAGCATCGAGGAGTCAAAGCTCTGCTAATGGATATCACGTTTCGCGTCCATGGACAACCCGTCGAATGCA
GTGGAGTGGGCTCTGGCCGAGATGGTGAACAACCCGACGATGCTTAAGAAGGCAGTGGACGAGATCGACAGCGCT
GTTGGCCAGGAACGGCTAGTGCAGGAGCACGACATCCACGGCTAAACTACACCAAGCCATCCGCGAGGGC
TTCCGCCTGCACCCTGTAGCGCCTTTCAACGTTCCCCACGTTCGCTGTCGCGGACGCCACTGTTGCCGGCTACCGC
ATCCCCAAGGGCAGCCACGTTCATCCTCAGTCGCACTGGCCTTGGACGCAACCCTGATGTCTGGGACGACCCCTCTT
CGCTTCGACCCCCGAACGCCACATCCCTTTGAGCCCCGAGATGGAGGTCTCACTCGTTGAGCGTGATCTACGGTTT
ATCTCCTTACGACTGGTTCGTCGCGGCTGCATCGCTGCAGCTCTTGGCACTGATATGACCATCATGCTCTTCGGT
AGGCTCCTGCAGGGTCTCTTGGAGCAAGATGACCGGGGTGGCGGCCATCGACCTTAGCGAGTCCAGGCACAAC
ACTTTCATGGCACGGCCACTCGTGCTACAGGCTAAGCCACGGCTTCAGCGCACCTTACCCGGGATCTTGCTT
TGTAAGTAG

CYP79-2, cDNA-Sequenz

ATGGCGCTAGCACCTAGCCATGCACCTCGTCGTCGCTCCGTTTCACAGCACTCTGCGCCTTCCTTGCCCTCGCTTTA
TTATTTCTGTATAGCAAAGCAACGTCGTCGTCGAAGAAAACACAGCAGCTGCTGCCGCCGGGGCCGGCTGGGCTT
CCGATCATCGGCAGCCTGCACCTGCGTGGTGTCAAAAAGGCCGGTGTTCGGTGGATTACCGCCTTCTCAAGGAC
ATGGACACCAACGTCCTGTGCCTCCGCTTCGGGGCCGTCCATGTCTGTAGTAGTCGCTGCCAGAGACAGCCCGT
GAGGTTGTGAGAACGAACGACGCTGTCTGGCGTCTCGCCCGGAGACAGTGGCCTCCGCACTGTTTCAGCTTCGGG
TACAAGGGCTCCATCCTGACGCCCTACGGGGAGCAGTGGAAAGAAGATGAGGCGGGTCTCAGCTCCGAGATCCTG
TCGGCGTCAATGGAGCAGCGGCTGCAGCGCCGGCGAGCACAGGAGGCCACTACCTCGTCGGTTCCTGTACAGC
CAGTGCAGCGCATCTGCAGCTGCCTGCTGCTGCAGCGCCGTTGATGTACGCCATGTTGCACGGCATTCTGCGGC
AACATGATACGGACACTCGTGTTCGGCAAGCGACACTTCTCCGTTGCTGCCGGCGGAGAAGTGGGCACTCGCATA
CATGTTTCAGGAGATGATGTTTGAACCTATTGACAACCCATCAAACACGGTTCGAGTGGGCACTCGCGGAGATGATG
AACAGACCGGAGGTTCATGCACAAAGCGATGGAGGAGCTGGACACCGTTCGTTGGCAAGGACAGGCTCGTCCAAGAA
CCCGACATCCCTCGCCTCAACTATCTGAAGGCGTGCCTGCGGGAGGCCCTTCCGCATGCACCCCTACCACGCGTTC
AACCCGCCCCACGTCGCAACGGAAGACGCCATCGTTTCCGGCTACCTCATTCCCAAGGGCAGCCATGTACTCCTC
AGCCGGGTGGGGCTTGGCCGGAACCCTGACGTCTGGGACGCTCCTCTCCAGTTCCGGCCAGAGCGACATCTGATG
ATGAACGAGAACGACGACGTCGACGATAGGTACCACCATGTGGTTCTCACCGAACAGATCTTCGGTTCATCTCG
TTCAGCGCAGGACAGGAGGGGATGCCCGGGGGTCTCACTCGGCAGCTCCGTTACGATGATGCTGTTTCGAAGGCTT
CTCCAAGGTTTACATGGACCAAGCCTCCTGGCGTTCGTGCAATCAGGCTCCAGGAATCCAGCACAAGTCTCGCA
CTGGCTGAGCCACTCCTCTTACAAGCTCAGCCTCGTTTGGCGGTGCATCTCTATGCGTCTGGCTAG

CYP79-3v1, cDNA-Sequenz

ATGGCGCTAGCACCTAGCCATGCCATGCATCACTTGGCGTTCGCTCCATTCACGGTACTTTGCACCTTCCTTGCC
CTTGTTGCCTTATTGTTTCTGCATCGATATCGTCGAAGCAACGCAAGGCCATCGAAGAAAACACGGCAGCTGCCG
CCAGGCCCGGGCGGGTTCGCGATCATCGGCAGCCTGCACCTGCTGGTGTGCAAAAAGCCGGTGTTCGGTGGGTT
CACGGCCTTCTCAAGGACATGAACACCAAGATCCTATGCCTCCGCTTCGGGGCCGTGCACGTCGTGGTAGTCGCC
TGCCCGGAGATAGCCCGCGAGGTTCTCAGGACGAACGACGCCGCCCTGGCGTCTCGCCCGGAGACGGACGCCCTGC
GAGCTGTTTCAGCCTCGGGTACAAGGGCACCATCCTGTGCGCCTACGGGGAGCAGTGGAGGAAGATGCGGCGGGTC

CTCACCTCCGAGATCCTGTCCGCGTCGATGGAGCAGCGGCAGCAGCGGGCGGCGAGCGCAGGAGGCCACTACCTC
GTCGCTTCCCTGTACAGCCAGTGTCTGCAGCAGCGCCAGCGCAGCCGCATCGTTCGGCTGCTAGCTCCGCCGTCGTG
GACGTACGCCATGTGGCCCGCCACTTCTCCTGCAACATGATCCGGAGCCTCGTGTTCGGCAAGCGGCCACTTCGGC
GCCGGCGCCGGCCCGGGTCTTGAGGAGGTGGCGCACGTGGACACGCTCTTCGCGCTGCTCAACTACATATACATC
TTCTCCGTCTCGGATTACGTCCCCGCTGCGTGGAGGTGGATGGTTGCTGGCCTCGACCTTGGCGGCGACAGGGAG
GCTGGCAGGAGCGTGATGAGGACTCTGAGCAGGCTGCATGATCCCATCATAACGGGAGAGGATCCGTGAGTGGGAC
GGCCTTCGCGAACCGCGCGAGAAGAGAGAGGTGAGGGATTTCCCTTGACGCGCTCGTCTCTCTCGTGGATTTCGAG
GGGCGGCCTTTATTGTCTGTTTCGACGAGATAAAAAGCGCAGACAGCGGAGATGATGTTGCAACCATTGACAACCCA
TCGAACCGGTTGGAGTGGGCGCTGGCGGAGATGATGAACAGGCCGCGAGGTGATGAAGAAAAGCAATGGAGGAGCTG
GACGCGGTGGTTCGGCAAGGACAGGCTGGTGCAGGAGTCGGACATCCCGGGCCTCAACTACCTGAAGGCGTGGCTG
CGGGAGGCCTTCGGCTGCACCCGTACCACGCTCTGAACCTGCCGCACGTCGCCATGGAAGACACCGTGGTCTCC
GGCTACCTGGTCCCCAAGGGCAGCCACGTGCTGCTGAGCCGGCTGGCGCTTGGGCGGAACCCCGACGCTCTGGGAC
GAGCCTCTCCAGTTCGGCGCGGAGCGACATCTGGTGAACGACGGCGACGTGGTTCTCACGGAGCCGGACCTTCGG
TTCATCTCGTTCAGCGCGGGCAGGAGGGGGTGCCTGGGGTGTCACTCGGCAGCTCCATTACGATGATGCTGTTT
GCAAGGCTCCTCCAAGGGTTCGCGTGGAGCAAGCCTCCTGGCGTCCGTGCGATCAGGCTCGAGGAATCCAGCGCA
AGCCTCGCACTGGCTGAGCCGCTCCTCTTACAAGCTCAGCCTCGTTTGCCGGTGCATCTCTATGCGTCTGGCTAG

CYP79-3v2, cDNA-Sequenz

ATGGCGCTAGCACCTAGCCATGCCATGCATCACTTGGCGTCCGCTCCATTACGGTACTTTGCACCTTCCTTGCC
CTTGTTGCCTTATTGTTTCTGCATCGATATCGTTCGAAGCAACGCAAGGCCATCGAAGAAAAACCGCAGCTGCCG
CCAGGCCCGGCCGGTTGCCGATCATCGGCAGCCTGCACTGCCTGGTGTTCGAAAAAGCCGGTGTTCGGTGGGTT
CACGGCCTTCTCAAGGACATGAACACCAAGATCCTATGCCTCCGCTTCGGGGCCGTGCACGTCGTGGTAGTCGCC
TGCCCGGAGATAGCCCGCGAGGTTCTCAGGACGAACGACGCCGCCCTGGCGTCTCGCCCGGAGACGGACGCCCTGC
GAGCTGTTTCAGCCTCGGGTACAAGGGCACCATCCTGTGCGCCTACGGGGAGCAGTGGAGGAAGATGCGGGGGGTC
CTCACCTCCGAGATCCTGTCCGCGTCGATGGAGCAGCGGCAGCAGCGGGCGGCGAGCGCAGGAGGCCACTACCTC
GTCGCTTCCCTGTACAGCCAGTGTCTGCAGCAGCGCCAGCGCAGCCGCATCGTTCGGCTGCTAGCTCCGCCGTCGTG
GACGTACGCCATGTGGCCCGCCACTTCTCCTGCAACATGATCCGGAGCCTCGTGTTCGGCAAGCGGCCACTTCGGC
GCCGGCGCCGGCCCGGGTCTTGAGGAGGTGGCGCACGTGGACACGCTCTTCGCGCTGCTCAACTACATATACATC
TTCTCCGTCTCGGATTACGTCCCCGCTGCGTGGAGGTGGATGGTTGCTGGCCTCGACCTTGGCGGCGACAGGGAG
GCTGGCAGGAGCGTGATGAGGACTCTGAGCAGGCTGCATGATCCCATCATAACGGGAGAGGATCCGTGAGTGGGAC
GGCCTTCGCGAACCGCGCGAGAAGAGAGAGGTGAGGGATTTCCCTTGACGCGCTCGTCTCTCTCGTGGATTTCGAG
GGGCGGCCTTTATTGTCTGTTTCGACGAGATAAAAAGCGCAGACAGCGGTAAGATCAGATATGCATCTAAAAGAATTA
AGCTGTATGTGTTTTGCATTATTCATCATCATCTAACGTTGTGCCATTTCATGCATGCATTGTTTTTTTTGCAGGAG
ATGATGTTTGCAACCATGACAACCCATCGAACCGGTTGGAGTGGGCGCTGGCGGAGATGATGAACAGGCCGGAG
GTGATGAAGAAAAGCAATGGAGGAGCTGGACGCGGTGGTTCGGCAAGGACAGGCTGGTGCAGGAGTCGGACATCCCC
GGCCTCAACTACCTGAAGGCGTGCCTGCGGGAGGCCTTCCGGCTGCACCCGTACCACGCTCTGAACCTGCCGCAC
GTCGCCATGGAAGACACCGTGGTCTCCGGCTACCTGGTCCCCAAGGGCAGCCACGTGCTGCTGAGCCGGCTGGCG
CTTGGGCGGAACCCCGACGCTCTGGGACGAGCCTCTCCAGTTCCGGCCGGAGCGACATCTGGTGAACGACGGCGAC
GTGGTTCTCACGGAGCCGGACCTTCGGTTCATCTCGTTTCAGCGCGGGCAGGAGGGGGTGGCCGGGGGTGTCACATC
GGCAGCTCCATTACGATGATGCTGTTTCGCAAGGCTCCTCCAAGGGTTTCGCGTGGAGCAAGCCTCCTGGCGTCCGT
GCGATCAGGCTCGAGGAATCCAGCGCAAGCCTCGCACTGGCTGAGCCGCTCCTCTTACAAGCTCAGCCTCGTTTG
CCGGTGCATCTCTATGCGTCTGGCTAG