

Funktionale Analyse von membrangebundenen Klasse III Peroxidasen aus Mais (*Zea mays* L.)

Charakterisierung durch heterologe und homologe Expression
sowie Imaging-Techniken

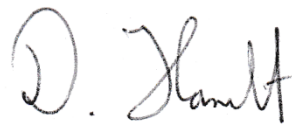
Dissertation

Zur Erlangung der Würde des Doktors der Naturwissenschaften
des Fachbereichs Biologie, der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften,
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Benjamin Möller

Hamburg 2015

Genehmigt vom Fachbereich Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Frau Priv.-Doz. Dr. S. LÜTHJE
Weitere Gutachterin der Dissertation:
Frau Professor Dr. J. KEHR
Tag der Disputation: 27. November 2015



Professor Dr. D. Hanelt
Vorsitzender des
Fach-Promotionsausschusses Biologie

Für Cathi

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	IV
Zusammenfassung.....	X
Abkürzungsverzeichnis.....	XIII
Abbildungsverzeichnis.....	XVIII
Tabellenverzeichnis.....	XXVII
1. Einleitung.....	1
1.1. Peroxidasefamilien	3
1.1.1. Peroxidase-Cyclooxygenase Superfamilie	3
1.1.2. Peroxidase-Chlorid-Dismutase Superfamilie	4
1.1.3. Peroxidase-Peroxygenase Superfamilie	4
1.1.4. Peroxidase-Katalase Superfamilie	5
1.1.4.1. Klasse I Peroxidasen	5
1.1.4.2. Klasse II Peroxidasen	6
1.1.4.3. Klasse III Peroxidasen	6
1.2. Reaktionsmechanismen und Substratspezifität	6
1.3. Funktionen von Klasse III Peroxidasen	12
1.4. Sequenz und 3D-Struktur von Klasse III Peroxidasen.....	15
1.5. Subzelluläre Lokalisierung von Klasse III Peroxidasen.....	16
1.6. Zielsetzung.....	19
2. Material und Methoden.....	22
2.1. Biologisches Material.....	22
2.1.1. Pflanzenmaterial	22
2.1.1.1. Stabile Maistransformation	22
2.1.1.2. Biolistische Transformation	22
2.1.2. Bakterienstämme.....	23

2.1.3. Hefestämme.....	23
2.1.4. Vektoren.....	24
2.1.4.1. Allgemeine Klonierungen	24
2.1.4.2. Fusionsproteine.....	25
2.1.4.3. pD1-Ubi-GFP.....	25
2.1.4.4. p7i-UCre-GFP.....	25
2.1.4.5. Marker für Co-Lokalisationsstudien	29
2.1.4.6. Homologe Expression.....	29
2.1.4.7. Heterologe Expression	31
2.1.5. Oligonukleotide.....	33
2.1.6. Antikörper	34
2.1.6.1. Nachweis nativer Proteine	34
2.1.6.2. Nachweis rekombinanter Proteine	34
2.1.7. Medien	34
2.1.7.1. Hydrokulturmedium für die Maisanzucht.....	34
2.1.7.2. Grundmedien für die Transformation von Mais	35
2.1.7.3. Medien für die Agrobakterien vermittelte Transformation von Mais.....	36
2.1.7.4. Kulturmedien <i>Escherichia coli</i>	37
2.1.7.5. Kulturmedien <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	37
2.1.7.6. Kulturmedien <i>Pichia pastoris</i>	38
2.2. Methoden	39
2.2.1. Arbeiten mit Pflanzenmaterial.....	39
2.2.1.1. Biolistische Transformation	40
2.2.1.2. Agrobakterium vermittelte Mais-Transformation	41
2.2.1.3. Hitzeschockaktivierung transgener Pflanzen	42
2.2.2. Molekularbiologische Methoden.....	43

2.2.2.1. Verwendete Kits	43
2.2.2.2. Aufschließen von Pflanzenmaterial.....	44
2.2.2.3. Isolierung genomischer DNA aus Pflanzen	44
2.2.2.4. Isolierung von RNA aus Pflanzen.....	44
2.2.2.5. <i>Southern Blot</i>	45
2.2.2.6. Molekulare Analyse der T ₀ -Generation.....	46
2.2.2.7. Generation rekombinanter Vektoren	46
2.2.2.8. Transformation von <i>Escherichia coli</i>	47
2.2.2.9. Transformation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	47
2.2.2.10. Hefetransformation	47
2.2.3. Biochemische Methoden	50
2.2.3.1. Proteinbestimmung.....	50
2.2.3.2. Konzentrieren von Proteinlösungen	50
2.2.3.3. Ammoniumsulfatfällung.....	50
2.2.3.4. Chromatographieverfahren	51
2.2.3.5. Analytische Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese	54
2.2.3.6. Überprüfung von Proteinsequenzen.....	55
2.2.3.7. <i>Western Blotting</i>	55
2.2.3.8. Enzymaktivitäten.....	56
2.2.4. Mikroskopiemethoden	58
2.2.4.1. Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie	58
2.2.4.2. Probenvorbereitung.....	59
2.2.4.3. Transmissionselektronenmikroskopie	59
2.2.4.4. Probenvorbereitung.....	59
2.2.4.5. Einbettung.....	60
2.2.4.6. Dünnschnittterstellung.....	60

2.2.4.7. Immunogold-Detektion	60
2.2.4.8. Imaging	60
2.2.5. Verwendete Software	61
2.2.6. Web-Ressourcen	62
3. Ergebnisse	63
3.3. Vorarbeiten.....	63
3.3.1. Sequenzvalidierung von <i>zmprx01</i> , <i>zmprx66</i> und <i>zmprx70</i>	63
3.4. Lokalisierung von ZmPrx01, ZmPrx66 und ZmPrx70	68
3.4.1. Immunogold-Detektion.....	68
3.5. Fusionsproteine	72
3.5.1. Test der Konstrukte und Aktivierung der Cre-Rekombinase	72
3.5.2. Transiente Expression	73
3.5.2.1. Homologes System.....	73
3.5.2.2. Expression im heterologen System	84
3.5.3. Agrobakterien vermittelte Transformation von Mais	90
3.5.3.1. Transformation unreifer Maisembryonen mit <i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4404.....	90
3.5.3.2. Molekulare Analyse der T ₀ -Generation.....	91
3.5.3.3. Pflanzenselektion	92
3.6. Heterologe Expression in <i>Pichia pastoris</i>	97
3.6.1. Hefetransformation	97
3.6.2. Selektion positiver Klone	98
3.6.3. Bestimmung des Mut-Phänotyps	99
3.6.4. Selektion sekretierender Klone.....	99
3.6.4.1. Kolonie-Blot.....	99
3.6.4.2. Plattenassay	102
3.6.5. Optimierung der Expressionsbedingungen	107

3.6.5.1. Methanolkonzentration	107
3.6.5.2. Addition von Spurenelementen und Intermediaten des Häm-Stoffwechsels	108
3.6.6. Reinigung rekombinanter Peroxidasen	112
3.6.6.1. Ammoniumsulfatfraktionierung	112
3.6.6.2. Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie	113
3.6.6.3. Ionenaustauschchromatographie	117
3.6.6.4. Gelfiltration	119
3.7. Biochemische Charakterisierung	120
3.8. Aktivitätsfärbungen	120
3.8.1. pH-Optimum	122
3.8.2. Temperaturoptimum	123
3.8.3. Temperaturstabilität	124
3.9. Enzymkinetik.....	125
3.9.1. Substratspezifität	125
3.9.2. Effektoren der Peroxidaseaktivität	129
4. Diskussion.....	133
4.1. Sequenzvalidierung und Sequenzanalyse von ZmPrx01, ZmPrx70 und ZmPrx66.....	133
4.2. Subzelluläre Lokalisierung	139
4.2.1. Immunogold-Detektion von ZmPrx01, ZmPrx70 und ZmPrx66.....	139
4.2.2. Fusionsproteine ZmPrx01, ZmPrx70 und ZmPrx66.....	141
4.3. Heterologe Expression von ZmPrx01, ZmPrx70 und ZmPrx66 in <i>Pichia pastoris</i>	148
4.3.1. Expression von ZmPrx _{rec}	149
4.3.1.1. Charakterisierung positiver Klone.....	151
4.3.1.2. Optimierung der Expression in Flüssigkulturen	152
4.3.2. Aufreinigung rekombinanter Peroxidasen.....	154
4.3.3. Biochemische Charakterisierung	156

4.4. Fazit und Ausblick	168
5. Literaturverzeichnis.....	171
Anhang	197

Zusammenfassung

Klasse III Peroxidasen werden im Zusammenhang mit vielen pflanzlichen Funktionen, von Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen über katabolische Aufgaben und ROS-Entgiftung bis hin zur Pathogenabwehr diskutiert (Passardi *et al.*, 2005). Neben vielen löslichen Mitgliedern in dieser großen Enzymfamilie konnte die Existenz von ZmPrx01, ZmPrx66 und ZmPrx70 an der PM gezeigt und deren Sequenzen identifiziert werden (Mika und Lühje, 2003; Mika *et al.*, 2008). *In silico* Analysen weiterer Mitglieder der Klasse III Peroxidasen lieferten einen hohen Anteil von nahezu 50 % membrangebundener Isoenzyme in *Zea mays* (Lühje *et al.*, 2011). Die Funktion einzelner Mitglieder ist jedoch in den meisten Fällen unbekannt. Die hohe Zahl an Mitgliedern und eine breite Substratspezifität erschwert durch auftretende Redundanz eine Funktionsanalyse. Die Reinigung von membrangebundenen nativen Peroxidasen in hoher Reinheit liefert nur geringe Ausbeuten und erschwert die biochemische Charakterisierung.

In dieser Arbeit wurde ein Ablauf für die heterologe Expression von *zmprx01*, *zmprx66* und *zmprx70* in *Pichia pastoris* erarbeitet. ZmPrx70_{rec} konnte in ausreichenden Mengen produziert, gereinigt und biochemisch charakterisiert sowie mit nativer ZmPrx70 verglichen werden. Die Lokalisation aller untersuchten Isoenzyme konnte durch Versuche mit Fusionsproteinen und Immunogold-Markierung bestimmt werden. Ergänzend lieferten Sequenz- und Promotoranalysen einen Einblick in die mögliche Regulation von *zmprx01*, *zmprx66* und *zmprx70*.

Die Sequenzen der Isoenzyme konnten in der Maislinie Hi-II A x Hi-II B bestätigt werden. Gefundene Sequenzunterschiede auf Nukleotid- und Aminosäureebene sind gering und bleiben ohne Beeinflussung des aktiven Zentrums.

Die heterologe Expression führte bei Exzision der N-terminalen Domäne bei *zmprx01*, *zmprx66* und *zmprx70* zu einer Sekretion rekombinanter Peroxidase in das Kulturmedium. Die Erhaltung dieser Domäne lieferte deutlich geringere Mengen an sekretiertem Protein, ZmPrx70_{rec} wurde in diesem Fall nicht in detektierbaren Mengen an das Medium abgegeben. Nach Etablierung eines Aktivitätsassays auf Agarplattenbasis wurden die erzeugten Klone auf die maximale Sekretion von rekombinanter Peroxidase in das umgebende Medium selektiert. Durch eine Optimierung der Expressions- und Induktionsbedingungen konnten

ausreichende Mengen an ZmPrx70_{rec} produziert und in einem angepassten Protokoll gereinigt werden.

Die biochemische Charakterisierung von ZmPrx70_{rec} lieferte Werte der nativen Masse, es konnten pH- und Temperaturoptima sowie kinetische Konstanten für die Substrate Guajacol, 2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) und H₂O₂ bestimmt werden. Vergleichende Untersuchungen der Aktivität verschiedener natürlicher und künstlicher Substrate ermöglichten den Vergleich von rekombinanter und nativer ZmPrx70. Dabei ergaben sich teilweise Differenzen in den detektierten Aktivitäten und Stabilitäten, die auf Unterschiede der verwendeten Puffersysteme und eine geänderte Glykosylierung des rekombinanten Proteins zurückzuführen sind. Die Substratspezifität zeigt wie auch bei nativer ZmPrx70 eine Bevorzugung kleiner, phenolischer Substrate. Die sehr gute Umsetzung von Zimtsäurederivaten spricht für eine Beteiligung von ZmPrx70 an Lignifizierungsprozessen im Apoplasten. Das erhaltene pH-Optimum um pH 5 entspricht den Werten nativer ZmPrx70 und passt ebenfalls zu einer Lokalisation des Enzyms in der Zellwand.

Durch Untersuchungen der Lokalisationen mit Fusionsproteinen konnte ein Vorkommen von ZmPrx01, ZmPrx66 und ZmPrx70 im Apoplasten bzw. in der Zellperipherie gezeigt werden. Diese Aussage stützt sich auf Ergebnisse in stabil transformierten Maispflanzen, da transiente Experimente keine eindeutige Identifikation von PM- oder Apoplastischen-Signalen zuließen. Durchgeführte Experimente mit einer Immunogold-Detektion nativer Peroxidasen in Maiswurzeln ergänzte das erhaltene Bild durch den Nachweis aller drei Isoenzyme in Organellen des sekretorischen Weges. Zudem konnten Signale beobachtet werden, die eine Lokalisierung an der PM bestätigen.

Untersuchungen der Promotoren von *zmprx01*, *zmprx66* und *zmprx70* auf Motive cis-regulatorischer Elemente deuten auf eine Regulation durch Hormone und biotischen sowie abiotischen Stress sowie durch Ca²⁺-Ionen hin. Zu gefundenen Elementen zählen Bindemotive für Transkriptionsfaktoren aus WRKY-, MYB- und NAC-Familien und Elemente für eine Regulation durch Auxin (IAA), Gibberlin (GA) und Abscissinsäure (ABA). Es wurden ARE-ähnliche Elemente gefunden, die eine Regulation durch oxidativen Stress und Wasserstoffperoxid ermöglichen. Eine Analyse von Expressionsdaten ergab eine fast vollständige Begrenzung der Expression auf junge Wurzeln, einzig *zmprx01* findet sich in deutlich geringerer Expressionsstärke auch in verschiedenen meristematischen Geweben.

Zusammenfassung

Eine Beteiligung aller drei Peroxidasen in verschiedene Stressantworten scheint wahrscheinlich, möglicherweise verbunden mit der Modifikation der Zellwand. Auffällig waren in sämtlichen analysierten Promotoren ABA abhängige Elemente. Die Verbindung von ABA induzierter Hemmung des Wurzelwachstums durch Peroxidasen wurde bereits beobachtet. Da *zmpvx01*, *zmpvx66* und *zmpvx70* nur in jungen Wurzeln eine hohe Expression zeigen, erscheint eine Beteiligung an Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen, wie dem Lignin- oder Suberinaufbau aus phenolischen Monomeren ebenso möglich.

Abkürzungsverzeichnis

(CaMV) 35S	Cauliflower Mosaic Virus 35S Promotorsequenz
3D	dreidimensional
A	Adenin
A	Alanin
ABA	Abscisinsäure
Abb.	Abbildung
ABRE	<i>ABA responsive element</i>
ABTS	2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
AOX1	Alkohol Oxidase 1 aus <i>Pichia pastoris</i>
AOX2	Alkohol Oxidase 2 aus <i>Pichia pastoris</i>
AP-1	Aktivator-Protein-1
APTPP	<i>aqueous polymer two-phase partitioning</i>
APX	Ascorbatperoxidase
ARE	<i>antioxidant-responsive-elements</i> (cis-regulatorisches Element, welches die Regulation eines Gens durch oxidativen Stress vermittelt)
Arg	Arginin
AtPrx	<i>Arabidopsis thaliana</i> -Peroxidase
AU	<i>Absorbance Unit</i> (Einheit für die Extinktion)
<i>bar</i>	Gen der Phosphinothricin-N-Acetyltransferase aus <i>Streptomyces hygroscopicus</i>
BMG	<i>Buffered Minimal Glycerol Medium</i>
BMGY	<i>Buffered Glycerol-Complex Medium</i>
BMM	<i>Buffered Minimal Methanol Medium</i>
BMMY	<i>Buffered Methanol-Complex Medium</i>
bp	Basenpaare
BSA	<i>Bovin Serum Albumin</i> (Rinderserumalbumin)
C	Cytosin
CAT	Katalase Protein
<i>cat</i>	Katalase Gen
Ccp	Cytochrom-c-peroxidase
Cd ²⁺	Cadmiumion
cDNA	<i>Complementary desoxyribonucleic acid</i> (von einer RNA-Matrize <i>in vitro</i> synthetisierte Desoxyribonukleinsäure)
Cld	Chlorid-Dismutase
CLSM	<i>Confocal laserscanning microscope</i>
Co ²⁺	Kobaltion
Cre	<i>Causes Recombination</i> , Rekombinase der Bakteriophage P1
CRT	<i>C-repeat</i>
CSPD	Dinatrium-3-(4-methoxyspiro-(1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro)-tricyclo-[3.3.1.13,7]-decan)-4-yl)-phenyl-Phosphat
CTPP	C-terminales Propeptid
CuRE	<i>Copper responsive Element</i>
CYT	Cytokinin
D	Asparaginsäure
Dig	Digoxigenin-11-dUTP
Dig-UTP	Digoxigenin-11-Desoxy-Uridintriphosphat

Abkürzungsverzeichnis

DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	DNA-Nuklease
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphat
DRE	<i>dehydration-responsive-element-binding factor</i>
dUTP	Desoxy-Uraciltriphosphat
DyP	<i>dye-decolorizing peroxidases</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EIRE	<i>elicitor-responsive element</i>
EPO	Eosinophilperoxidase
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI-MS/MS	<i>Electrospray Ionisation Hybrid Tandem Mass Spectrometry</i> (Elektrospray-Massenspektrometrie)
EST	<i>Expressed sequence tag</i> (teilsequenzierte cDNA in Datenbanken)
<i>et al.</i>	und andere
F	Phenylalanin
Fe ^{II}	Eisenatom mit der Oxidationsstufe 2
Fe ^{III}	Eisenatom mit der Oxidationsstufe 3
Fe ^{IV}	Eisenatom mit der Oxidationsstufe 4
FPLC	<i>Fast protein liquid chromatography</i>
G	Guanin
G	Glycin
GA	Gibberelin
GARE	<i>Gibberelin Responsive Element</i>
GCLM	Glutamat-Cystein-Ligase
gDNA	genomische DNA
<i>gfp</i>	Gensequenz des <i>Green Fluorescent Protein</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GmHSP17.5E	Hitzeschockpromotorsequenz aus <i>Glycine max</i>
GPX	Glutathionperoxidase
GSS	<i>Genome survey sequence</i> (teilsequenzierte genomische DNA in Datenbanken)
h	Stunde
H	Histidin
H _d	distales Histidin
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
His	Histidin
HOX	Halogensauerstoffsäure
H _p	proximales Histidin
HRP	Horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
HSP	Hitzeinduzierbarer Promotor HSP17.5E aus <i>Glycine max</i>
I	Isoleucin
IAA	Indol-3-Essigsäure, ein Phytohormon
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IEP _{exp}	experimentell ermittelter isoelektrischer Punkt
IEP _{theor}	theoretischer isoelektrischer Punkt

IEX	<i>Ion exchange chromatography</i>
KCl	Kaliumchlorid
kDa	kilo Dalton
L	Leucin
LB	<i>Left Border Sequenz</i> vom Ti-Plasmid aus <i>Agrobacterium tumefaciens</i> <i>locus of crossing over</i> , Erkennungssequenz der Cre Rekombinase der Bacteriophage P1
<i>loxP</i>	
LPO	Lactoperoxidase
LTRE	<i>Low Temperature Responsive Element</i>
MD	<i>Minimal Dextrose Medium</i>
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MGY	<i>Minimal Glycerol Medium</i>
min	Minute
MM	<i>Minimal Methanol Medium</i>
MPO	Myeloperoxidase
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i> (Boten-RNA)
MS	Murashige-Skoog
Mut ⁺	<i>methanol utilization plus</i>
Mut ^S	<i>methanol utilization slow</i>
MW _{exp}	experimentell ermittelte molekulare Masse
MW _{theor}	theoretische molekulare Masse
MYB	Transkriptionsfaktorfamilie mit DNA bindender Domäne (DBD) homolog zur tierischen c-Myb Domäne
N	Asparagin
n.d.	Nicht detektierbar
n.m.	<i>not measured</i> (nicht ermittelt)
NaAc	Natriumacetat
NAC	<i>Petunia</i> NAM und <i>Arabidopsis</i> ATAF und CUC Proteine beinhaltende Superfamilie von Transkriptionsfaktoren
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nikotinsäuramid-adenin-dinukleotid, reduzierte Form
NADPH	Nikotinsäuramid-adenin-dinukleotid-phosphat, reduzierte Form
Ni ²⁺	Nickelion
NOS	Terminatorsequenz der Nopalinsynthase
NPR1	<i>NON-EXPRESSOR OF PR1</i>
OCS	Terminatorsequenz der Octopinsynthase
OsPrx	<i>Oryza sativa</i> -Peroxidase (Datenbankeintrag von PeroxiBase)
P	Prolin
Pa	Pascal
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerase-Ketten-Reaktion)
Phe	Phenylalanin
<i>pI</i>	Isoelektrischer Punkt
PM	Plasmamembran
pmPOX	plasmamembrangebundene Peroxidase bzw. Peroxidaseaktivität
psi	<i>pounds per square inch</i>
Q	Glutamin

Abkürzungsverzeichnis

R	Arginin
RB	<i>Right Border</i> Sequenz von dem Ti-Plasmid aus <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
Rboh	<i>Respiratory burst oxidase homolog</i> (Pflanzliches Homolog zu humanen NADPH-Oxidasen)
RH	Organisches Substratmolekül
RNA	Ribonukleinsäure
ROH	Organisches Substratmolekül mit übertragenem Sauerstoff
ROS	Reactive oxygen species (Reaktive Sauerstoffverbindungen)
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
S	Serin
SA	Salicylsäure
SDS	<i>Sodiumdodecylsulfat</i> (Natriumdodecylsulfat)
SEC	<i>Size exclusion chromatography</i> (Gelfiltration)
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i> (Einzelnukleotidpolymorphismen)
SOD	Superoxiddismutase
SP	Signalpeptid
SSC	Saline Sodium Citrat
STLS-1	Sequenz des ersten Introns des <i>Light Sensitivity</i> -Gens aus Kartoffel (<i>Solanum tuberosum</i> L.)
SV	Säulenvolumen
T	Thymin
T ₀	Regenerierte Generation von transformierte Pflanzen
T ₁	Generation von Nachkommen der T ₀
T35S	Terminatorsequenz aus dem 35S CaMV
Tab.	Tabelle
TBS	<i>TRIS buffered saline</i>
TBST	<i>TRIS buffered saline Tween 20</i>
T-DNA	<i>transfer DNA</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
TPO	Thyroidperoxidase
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TRITON® X100	t-Octylphenoxypolyethoxyethanol
Trp	Tryptophan
U	<i>Units</i> (Umsatz µmol Substrat/min)
Ubi	Ubiquitinpromotor 1 aus Mais
UTR	<i>Untranslated region</i> (Nicht-translatierte Region)
UV	Ultraviolettes Licht
V	Valin
v/v	<i>Volume per volume</i> , Volumen pro Volumen
W	Tryptophan
w/v	<i>Weight per volume</i> , Gewicht pro Volumen
WBox	DNA Erkennungssequenz von WRKY-Transkriptionsfaktoren
WRKY	Transkriptionsfaktoren mit WRKY-Motiv
X	Halogen

XTT	2,3-bis(2-Methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilid
YPD	<i>Yeast Extract Peptone Dextrose Medium</i>
YPDS	<i>Yeast Extract Peptone Dextrose Medium + Sorbitol</i>
ZmPox	<i>Zea mays peroxidase</i> (Trivialname)
ZmPrx	<i>Zea mays peroxidase</i> (Datenbankeintrag von PeroxiBase)
ZmRboh	<i>Zea mays respiratory burst oxidase homolog</i>
δ-ALA	δ-Aminolävulinsäure

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Mögliche Reaktionsmechanismen von Klasse III Peroxidasen.....	12
Abb. 2: Links: Überlagerung der modellierten 3D-Struktur von ZmPrx01 (farbig) mit der Meerrettich-Peroxidase HRP1C (in Grau).....	16
Abb. 3: Lokalisation von Klasse III Peroxidasen aus <i>Zea mays</i>	19
Abb. 4: Vektor zur Kontrolle biolistischer Transformationen.....	25
Abb. 5: Grundbinärvektor für die Agrobakterien vermittelte Maistransformation mit C-terminaler Fusion von GFP an das <i>Gene of interest (GOI)</i>	26
Abb. 6: Binärkonstrukt zur Expression eines ZmPrx01-GFP-Fusionsproteins in Mais.....	28
Abb. 7: Konstrukt einer ZmPrx01-GFP Fusion ohne eine Maskierung von N- oder C-Terminus mit einer mittelständigen Anordnung von GFP.....	28
Abb. 8: Weiteres Konstrukt zur Expression einer ZmPrx01-GFP-Fusion mit mittelständiger Anordnung von GFP.	29
Abb. 9: Rekombination des induzierbaren Überexpressionskonstruktes p7i-UCre-ZmPrx01.	30
Abb. 10: Vektorkarten der verwendeten Plasmide für die rekombinante Produktion von ZmPrx am Beispiel ZmPrx01.....	33
Abb. 11: ZmPrx01 Aminosäuresequenz aus <i>Zea mays</i> Hi-II A x Hi-II B im Vergleich zur Datenbanksequenz von ZmPrx01 (Mika <i>et al.</i> , 2008).....	64
Abb. 12: ZmPrx70 Aminosäuresequenz aus <i>Zea mays</i> Hi-II A x Hi-II B im Vergleich zur Datenbanksequenz von ZmPrx70 (Mika <i>et al.</i> , 2008).....	64
Abb. 13: ZmPrx66 Aminosäuresequenz aus <i>Zea mays</i> Hi-II A x Hi-II B im Vergleich zur Datenbanksequenz von ZmPrx66 (Mika <i>et al.</i> , 2008).....	65
Abb. 14: Sequenzvergleich von Proteinen mit vorhandenen <i>Vacular Sorting Signal (VSS)</i> im C-Terminus mit ZmPrx01, ZmPrx66 und ZmPrx70.....	67
Abb. 15: TEM-Aufnahme nach der Immunogold-Detektion von ZmPrx66 in fünf Tage alten Maiswurzelzellen.	69

Abb. 16: TEM-Aufnahme nach der Immunogold-Detektion von ZmPrx01 in acht Tage alten Maiswurzelzellen.	69
Abb. 17: TEM-Aufnahme nach der Immunogold-Detektion von ZmPrx01 in acht Tage alten Maiswurzelzellen.	70
Abb. 18: TEM-Aufnahme nach der Immunogold-Detektion von ZmPrx01 in acht Tage alten Maiswurzelzellen.	70
Abb. 19: TEM-Aufnahme nach der Immunogold-Detektion von ZmPrx01 in acht Tage alten Maiswurzelzellen.	71
Abb. 20: TEM-Aufnahme nach der Immunogold-Detektion von ZmPrx70 in fünf Tage alten Maiswurzelzellen.	71
Abb. 21.: Aktivierung der Konstrukte der Peroxidase-GFP-Fusionsproteine über den GmHSP17.5E-Promotor und die Cre-Rekombinase.....	73
Abb. 22: CLSM-Aufnahmen einer biolistischen Transformation mit dem Konstrukt pD1-Ubi-GFP von Maisembryonen (Inzuchtlinie A188).....	74
Abb. 23: CLSM-Aufnahmen biolistischer Transformationen (nach Hitzeinduktion bei 42°C für 6 h) mit Peroxidase-GFP-Fusionen von Maisembryonen (Inzuchtlinie A188).	75
Abb. 24: Transiente Expression von p7i-UCre-ZmPrx70-GFP in fünf Tage alten Maiswurzelzellen (<i>Zea mays</i> cv. Gelber Badischer Landmais) nach biolistischer Transformation des Gewebes und einer Hitzeschockaktivierung.....	76
Abb. 25: CLSM-Aufnahmen transienter Expression von a: p7i-ZmPrx01-GFP, b: p7i-ZmPrx70-GFP und c: p7i-ZmPrx66-GFP in Zwiebelepidermiszellen nach biolistischer Transformation des Gewebes.....	77
Abb. 26: CLSM-Aufnahmen der transienten Expression des auf ZmPti1a basierenden PM-Markers Myr-GFP.....	78
Abb. 27: CLSM-Aufnahmen der transienten Expression des auf GmMAN1 basierenden Markers G-rk CD3-967 des <i>cis</i> -Golgi-Apparates und des PM-Markers (Myr-GFP) in fünf Tage alten Maiswurzelzellen (<i>Zea mays</i> cv. Gelber Badischer Landmais).....	79
Abb. 28: Transiente Expression von ZmPrx01-GFP-Fusionen in verschiedenen Maiswurzelzellen nach biolistischer Transformation mit dem Vektor p7i-ZmPrx01-GFP.	80

Abb. 29: Transiente Expression von ZmPrx01-GFP in Maiswurzelzellen nach biolistischer Transformation. CLSM-Aufnahme.	81
Abb. 30: Transiente Expression von ZmPrx01-GFP in Maiswurzelzellen nach biolistischer Transformation.	81
Abb. 31: Transiente Expression von ZmPrx70-GFP-Fusionen in Maiswurzelzellen nach biolistischer Transformation mit dem Vektor p7i-ZmPrx70-GFP. CLSM-Aufnahme.	82
Abb. 32: Transiente Expression von ZmPrx70-GFP in Maiswurzelzellen nach biolistischer Transformation.	83
Abb. 33: Transiente Expression von ZmPrx66-GFP-Fusionen in Maiswurzelzellen nach biolistischer Transformation mit dem Vektor p7i-ZmPrx66-GFP und dem ER-Marker ER-rk CD3-957.....	83
Abb. 34: Transiente Expression von freiem GFP (a-c), Myr-GFP und ER-rk CD3-957 (d-i) in Zwiebelepidermiszellen nach biolistischer Transformation sowie nach Plasmolyse (g-i). CLSM-Aufnahme. Dargestellt ist jeweils die aufgezeichnete GFP-Fluoreszenz in Grün, mCherry-Fluoreszenz in Rot sowie die Überlagerung der Signale.	85
Abb. 35: Transiente Expression von ZmPrx01-GFP, ER-rk CD3-957 und G-rk CD3-967 in Zwiebelepidermiszellen nach biolistischer Transformation.	86
Abb. 36: Transiente Expression von ZmPrx70-GFP, ER-rk CD3-957 und G-rk CD3-967 in Zwiebelepidermiszellen nach biolistischer Transformation. CLSM-Aufnahme.....	87
Abb. 37: Transiente Expression von ZmPrx01-GFP, ER-rk CD3-957 und G-rk CD3-967 in Zwiebelepidermiszellen nach biolistischer Transformation mit dem Konstrukt pUbi-ZmPrx01-GFP-IMb.....	89
Abb. 38: Verschiedene Stadien der Maistransformation	90
Abb. 39: <i>Southern Blot</i> -Analyse von T ₀ -Pflanzen der Konstrukte p7i-UCre-ZmPrx01 und p7i-UCre-ZmPrx66-GFP.	92
Abb. 40: Untersuchungen zur Autofluoreszenz in Maiswurzeln am CLSM.	95
Abb. 41: CLSM-Aufnahmen von Wurzelzellen stabil transformierter Hi-II A x Hi-II B Maispflanzen, welche Peroxidase-GFP-Fusionen exprimierten.	96
Abb. 42: Übersicht über erhaltene Zeocin [®] -resistente <i>Pichia</i> -Klone.	98

Abb. 43: Agarosegelelektrophorese nach einer Kolonie-PCR mit DNA ausgesuchter Zeocin®-resistenter Klone der Transformation des Konstruktes pPICZαA-ZmPrx70-SP. .	99
Abb. 44: Kolonie-Blot zur Analyse der Sekretion von ZmPrx01 _{rec} in das Kulturmedium.	100
Abb. 45: Kolonie-Blot zur Analyse der Sekretion von ZmPrx70 _{rec} in das Kulturmedium.	101
Abb. 46: Kolonie-Blot zur Analyse der Sekretion von ZmPrx66 _{rec} in das Kulturmedium.	102
Abb. 47: Etablierung des <i>Agarose-Overlay-Assays</i>	103
Abb. 48: Anwendung des <i>Agarose-Overlay-Assays</i> auf ein größeres Plattenformat zum Screening höherer Koloniezahlen.	104
Abb. 49: <i>Agarose-Overlay-Assay</i> der Konstrukte pPICZα A-ZmPrx01 (rechts) und pPICZα A-ZmPrx01-SP (links).	104
Abb. 50: <i>Agarose-Overlay-Assay</i> der Konstrukte pPICZα A-ZmPrx70 (rechts) und pPICZα A-ZmPrx70-SP (links).	105
Abb. 51: <i>Agarose-Overlay-Assay</i> der Konstrukte pPICZα A-ZmPrx66 und pPICZα A-ZmPrx66-SP.	105
Abb. 52: SDS-PAGE-Analyse der Induktion von X33 Zellen zur Expression von ZmPrx70 _{rec}	106
Abb. 53: Fermentationsversuch zur Produktion von ZmPrx70 _{rec} mit Änderung der verwendeten Methanolkonzentration während der Induktion und Fermentation.	108
Abb. 54: Versuch zur weiteren Steigerung der ZmPrx70 _{rec} -Aktivität im Überstand durch die Addition vom Intermediaten des Häm-Stoffwechsels und Spurenelementen zum Kulturmedium.	109
Abb. 55: Versuch zur Bestätigung der erhaltenen Einzelergebnisse durch photometrische Auswertung der erhaltenen Guajacolperoxidaseaktivitäten.	110
Abb. 56: Optimierung der Produktion von ZmPrx01 _{rec} (links) und ZmPrx66 _{rec} (rechts).	111
Abb. 57: ZmPrx70 _{rec} sekretierende <i>Pichia pastoris</i> Kulturen nach 144 h Fermentation und Zentrifugation.	112

Abb. 58: Etablierung der Ammoniumsulfatfraktionierung für ZmPrx70 _{rec} . Mikroassay zur Überprüfung der erhaltenen Proteinfractionen auf eine Peroxidaseaktivität.....	113
Abb. 59: Chromatogramm und korrespondierender Mikroassay einer Affinitätschromatographie mit Ni ²⁺ -NTA-Matrix und 5 ml Säulenvolumen.....	115
Abb. 60: Chromatogramm und korrespondierender Mikroassay einer Affinitätschromatographie mit Co ²⁺ -NTA-Matrix und 5 ml Säulenvolumen	116
Abb. 61: Photometrische Vermessung der erhaltenen Fraktionen sowie der spezifischen Aktivität nach IMAC mit Co ²⁺ -NTA-Matrix.	116
Abb. 62: Kationenaustauschchromatographie zur Aufreinigung von ZmPrx70 _{rec} und entsprechender Mikroassay.	118
Abb. 63: Darstellung der photometrischen Bestimmung der Guajacolperoxidaseaktivität in IEX-Fractionen normiert auf die eingesetzte Probe.	118
Abb. 64: Gelfiltration zur weiteren Reinigung der Fraktionen nach der Kationenaustauschchromatographie.....	119
Abb. 65: Aktivitätsfärbung aktiver Fraktionen aus der Gelfiltration nach modifizierter SDS-PAGE zur Bewertung der erhaltenen Peroxidaseaktivitäten und Abschätzung der nativen molekularen Masse.....	120
Abb. 66: Aktivitätsfärbungen von Fraktion 16 aus der Gelfiltration mit verschiedenen Substraten nach modifizierter SDS-PAGE zur Bestimmung der nativen molekularen Masse und Nachweis der Häm-Gruppe.	121
Abb. 67: pH-Optimum von ZmPrx70 _{rec} und HRP. Die Bestimmung des pH-Optimums erfolgte in vier verschiedenen Puffern	122
Abb. 68: Abhängigkeit des Temperaturoptimums von der Inkubationszeit.	123
Abb. 69: Temperaturoptimum (links) und Arrheniusplot (rechts) zur Bestimmung der Aktivierungsenergie EA.	124
Abb. 70: Auswirkungen verschiedener Temperaturen auf die Aktivität von ZmPrx70 _{rec} in Abhängigkeit der Inkubationsdauer.	125

Abb. 71: Gegenüberstellung der Berechnung der kinetischen Konstanten über eine Linearisierung bzw. lineare Regression und nicht-linearer Regression mit dem Prinzip der kleinsten Fehlerquadrate (<i>partial least squares</i>).....	127
Abb. 72: Relativer Vergleich verschiedener künstlicher Substrate mit dem Umsatz von Guajacol durch ZmPrx70 _{rec} (grün), ZmPrx70 nativ (grün, kariert) (Mika und Lüthje, 2003) und HRP (blau).	128
Abb. 73: Relativer Vergleich verschiedener natürlicher Substrate mit dem Umsatz von Guajacol durch ZmPrx70 _{rec} (grün), ZmPrx70 nativ (grün, kariert) (Mika und Lüthje, 2003) und HRP (blau).	129
Abb. 74: Effekt der Addition von 0,1 mM Ferulasäure und Coniferylalkohol auf die Guajacolperoxidaseaktivität von ZmPrx70 _{rec} (grün), ZmPrx70 nativ (grün, kariert) (Mika und Lüthje, 2003) und HRP (blau).....	130
Abb. 75: Effektorwirkung auf ZmPrx70 _{rec} (grün), ZmPrx70 nativ (grün, kariert) (Mika und Lüthje, 2003) und HRP (blau).	131
Abb. 76: Vergleich der 3D-Strukturen von HRP (in Grau) und ZmPrx70 (in Grün).	162
Abb. 77: Ansicht des Substratkanals von ZmPrx70 im Vergleich zu HRP.	163
Abb. 78: Vektor des Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kits für die Sequenzierung der erhaltenen ZmPrx Sequenzen der Maislinie Hi-II A x Hi-II B.	197
Abb. 79: Binärkonstrukt zur Expression eines ZmPrx70-GFP-Fusionsproteins in Mais..	197
Abb. 80: Binärkonstrukt zur Expression eines ZmPrx66-GFP-Fusionsproteins in Mais..	197
Abb. 81: Rekombination des induzierbaren Überexpressionskonstruktes p7i-UCre-ZmPrx70.	198
Abb. 82: Rekombination des induzierbaren Überexpressionskonstruktes p7i-UCre-ZmPrx66.	198
Abb. 83.: Modellierter Tertiärstruktur von ZmPrx01.	199
Abb. 84.: Modellierter Tertiärstruktur von ZmPrx70.	200
Abb. 85.: Modellierter Tertiärstruktur von ZmPrx66.	201
Abb. 86: Vektorkarten der verwendeten Plasmide für die rekombinante Produktion von ZmPrx70.	202

Abb. 87: Vektorkarten der verwendeten Plasmide für die rekombinante Produktion von ZmPrx66.	202
Abb. 88: 747 bp großes Fragment aus einer Restriktion des Vektors p7iL (DNA Cloning Service, Hamburg, Deutschland) mit <i>XhoI</i> und <i>BglII</i> zur Herstellung einer Digoxigenin-11-dUTP markierten Sonde.	203
Abb. 89: Sequenzvergleich der codierenden Sequenz von <i>zmprx01</i> aus den Maislinien B73, W22 und Hi-II A x Hi-II B.	203
Abb. 90: Sequenzvergleich der Aminosäuresequenz von ZmPrx01 aus den Maislinien B73, W22 und Hi-II A x Hi-II B.	204
Abb. 91: Sequenzvergleich der codierenden Sequenz von <i>zmprx01</i> aus den Maislinien W64A, W22 und Hi-II A x Hi-II B.	205
Abb. 92: Sequenzvergleich der Aminosäuresequenz von ZmPrx01 aus den Maislinien W64A, W22 und Hi-II A x Hi-II B.	206
Abb. 93: Sequenzvergleich der codierenden Sequenz von <i>zmprx70</i> aus den Maislinien B73, W22 und Hi-II A x Hi-II B.	206
Abb. 94: Sequenzvergleich der Aminosäuresequenz von ZmPrx70 aus den Maislinien B73, W22 und Hi-II A x Hi-II B.	207
Abb. 95: Sequenzvergleich der codierenden Sequenz von <i>zmprx66</i> aus den Maislinien B73, W22 und Hi-II A x Hi-II B.	207
Abb. 96: Sequenzvergleich der Aminosäuresequenz von ZmPrx66 aus den Maislinien B73, W22 und Hi-II A x Hi-II B.	208
Abb. 97: Analyse der Expressionsstärke von <i>zmprx01</i> in verschiedenen Geweben während der Maisentwicklung basierend auf ESTs (Sekhon <i>et al.</i> , 2011). Dargestellt wird diese durch den eFP Browser (Winter <i>et al.</i> , 2007).	209
Abb. 98: Analyse der Expressionsstärke von <i>zmprx70</i> in verschiedenen Geweben während der Maisentwicklung basierend auf ESTs (Sekhon <i>et al.</i> , 2011). Dargestellt wird diese durch den eFP Browser (Winter <i>et al.</i> , 2007).	210
Abb. 99: Analyse der Expressionsstärke von <i>zmprx66</i> in verschiedenen Geweben während der Maisentwicklung basierend auf ESTs (Sekhon <i>et al.</i> , 2011). Dargestellt wird diese durch den eFP Browser (Winter <i>et al.</i> , 2007).	211

Abb. 100: Darstellung der gDNA von ZmPrx01 auf Basis der Maislinie B73 (GRMZM2G104394). Zu erkennen ist die Intron- und Exonstruktur und die Größe der einzelnen Elemente.....	211
Abb. 101: Darstellung der gDNA von ZmPrx70 auf Basis der Maislinie B73 (GRMZM2G025441). Zu erkennen ist die Intron- und Exonstruktur und die Größe der einzelnen Elemente.....	211
Abb. 102: Darstellung der gDNA von ZmPrx66 auf Basis der Maislinie B73 (GRMZM2G133475). Zu erkennen ist die Intron- und Exonstruktur und die Größe der einzelnen Elemente.....	212
Abb. 103: Auftragung der Kulturdichte (optische Dichte bei 600 nm) gegen die Induktionsdauer.....	249
Abb. 104: Übersicht über das erreichte Nassgewicht/optische Dichte nach der Fermentation über 144 h.....	249
Abb. 105: Entwicklung der optischen Dichte zweier Kulturen in gepufferten Minimalmedium.....	250
Abb. 106: Entwicklung der optischen Dichte bei Durchführung der Fermentation bei 22°C und 0,5 % Methanolkonzentration in BMMY-Medium.....	251
Abb. 107: Fermentation von Klonen in gepufferten und ungepufferten Minimalmedium bei einer Induktionstemperatur von 22°C.....	252
Abb. 108: Induktion der Expression von <i>zmprx01</i> und <i>zmprx66</i> bei hohen Kulturdichten.	253
Abb. 109: Darstellung der Michaelis-Menten-Kinetik und entsprechende halbziproke Auftragung vom Umsatz von Guajacol.	254
Abb. 110: Darstellung der Michaelis-Menten-Kinetik und entsprechende halbziproke Auftragung vom Umsatz von ABTS.	255
Abb. 111: Darstellung der Michaelis-Menten-Kinetik und entsprechende halbziproke Auftragung vom Umsatz von Wasserstoffperoxid.....	256
Abb. 112: Darstellung der Michaelis-Menten-Kinetik als Vergleich einer linearen Anpassung (a) und einer nichtlinearen Anpassung nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate (b) beim Umsatz von Guajacol durch ZmPrx70 _{rec}	257

Abb. 113: Darstellung der Michaelis-Menten-Kinetik als Vergleich einer linearen Anpassung (a) und einer nichtlinearen Anpassung nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate (b) beim Umsatz von Wasserstoffperoxid durch ZmPrx70_{rec}. 257

Abb. 114: Darstellung der Michaelis-Menten-Kinetik als Vergleich einer linearen Anpassung (a) und einer nichtlinearen Anpassung (b) nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate beim Umsatz von Guajacol durch HRP. 258

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Zur Amplifikation und Klonierung von <i>zmp_{prx}</i> -Genen verwendete Oligonukleotide.	33
Tab. 2: Zusammensetzung des Mediums für die hydroponische Maiskultur	35
Tab. 3: Zusammensetzung von 2x MS-Medium	35
Tab. 4: Zusammensetzung der MS-Mikrosalzlösung	35
Tab. 5: Zusammensetzung der MS-Makrosalzlösung	35
Tab. 6: Zusammensetzung der MS-Vitaminlösung	36
Tab. 7: Zusammensetzung der Fe/Na-EDTA Lösung	36
Tab. 8: Zusammensetzung verschiedener Medien zur Agrobakterium vermittelten Transformation von Mais.....	36
Tab. 9: Zusammensetzung von AB-Medium	37
Tab. 10: Zusammensetzung von AB-Puffer	37
Tab. 11: Zusammensetzung von AB-Salzen	37
Tab. 12: Zusammensetzung von YEB-Medium	37
Tab. 13: Übersicht von in der Kultur von <i>Pichia pastoris</i> verwendeten Medien.....	39
Tab. 14: Während der dig-Markierung verwendetes PCR Programm.....	45
Tab. 15: Übersicht zur Herstellung der dig-Markierung, sowie der verwendeten PCR Bedingungen	45
Tab. 16: Übersicht der verwendeten Substratkonzentrationen.....	58
Tab. 17: Verwendete Web-Ressourcen für Sequenzanalysen.....	62
Tab. 18: <i>In silico</i> Analyse der Tertiärstruktur von ZmPrx01, ZmPrx66 und ZmPrx70, sowie posttranslationale Modifikationen.	66
Tab. 19: <i>In silico</i> Analyse der Signalpeptide und Prüfung auf vorhandene transmembrane Domänen der Sequenzen von ZmPrx01, ZmPrx66 und ZmPrx70.	66
Tab. 20: <i>In silico</i> Analyse der Signalpeptide zur Lokalisierung von ZmPrx01, ZmPrx66 und ZmPrx70. Experimentelle Daten entsprechend Mika <i>et al.</i> (2008).	67

Tab. 21: Grundlegende Eigenschaften von ZmPrx01, ZmPrx66 und ZmPrx70	67
Tab. 22: Übersicht über die erhaltenen Klone in Abhängigkeit des Selektionsdruckes. ...	97
Tab. 23: Erhaltene kinetische Konstanten für ZmPrx70 _{rec} und HRP	126
Tab. 24: Übersicht über Effektoren mit nicht signifikanter Wirkung auf ZmPrx70 _{rec} und HRP	132
Tab. 25: Analyse der Region 2 kbp stromaufwärts (-2000) des <i>zmprx01</i> -Gens durch PLACE.	212
Tab. 26: Analyse der Region 2 kbp stromaufwärts (-2000) des <i>zmprx66</i> -Gens durch PLACE.	225
Tab. 27: Analyse der Region 2 kbp stromaufwärts (-2000) des <i>zmprx70</i> -Gens durch PLACE.	236

1. Einleitung

Peroxidasen können als Oxidoreduktasen (EC 1) viele Substrate umsetzen und finden daher in vielen Prozessen eine Anwendung. Sowohl in chemischen Prozessen im industriellen Maßstab, wie der Umsetzung von Phenolen und anderen Stoffen in Abwässern (Nicell *et al.*, 1993; Caza *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2003) und in Reaktionen in der Herstellung von Feinchemikalien (Casella *et al.*, 2010) werden sie eingesetzt. Anwendungen in der Papierindustrie (Peralta-Zamora *et al.*, 1998; Murugesan, 2003), als immobilisierte Enzyme auf Biosensoren (May, 1999; Ahammad, 2013) sowie im Bereich der Diagnostik und Forschung kommen vor (Regalado *et al.*, 2004).

Durch auffällige Farbreaktionen wurden Reaktionen mit Peroxidasebeteiligung schon früh beobachtet. Die erste in der Literatur erwähnte Beobachtung einer HRP vermittelten Reaktion geht auf Louis Antoine Planche (1776-1840) zurück. Dieser beschrieb im Zusammenhang mit der Untersuchung von „Jalapharz“ auftretende Färbungen. Jalapharz wurde vermutlich aus der Karibik für medizinische Zwecke nach Frankreich importiert und auf Verunreinigungen geprüft. Bei diesen Untersuchungen berichtete Planche von einer blauen Farbreaktion bei dem Mischen von Guajak (*Guaiacum officinale* L.) (bekannt als „Guaiacum“, gemahlenes Holz der Art, einer möglichen Verunreinigung von Jalapharz) mit einem frischen Wurzelstück von Meerrettich (Planche, 1810). Diese Reaktion war vermutlich die Oxidation von α -Guajakonsäure zu Bis-Methylenchinon, auch bekannt als „Guajak-Blau“ (Kratochvil *et al.*, 1971). Weitere Pioniere auf dem Gebiet der Erforschung von Peroxidasen waren Robert Chodat (1865-1934) und Alexei Nikoleavich Bach (1857-1946) an der Universität Genf, die Peroxidasen in Meerrettich Wurzeln und anderen Pflanzen erforschten. Die Arbeit von Chodat und Bach führte zu Debatten über den Aufbau und die Funktion von Oxidoreduktasen und Peroxidasen, welche David Keilin (1887-1963) in seinem Buch „*The History of Cell Respiration and Cytochrome*“ 1966 zusammenfasste (Keilin, 1966).

Bis zu diesem Zeitpunkt lagen allen Forschungen Extrakte zugrunde. Die Reinigung des Enzyms geht auf die Arbeiten von Richard Willstätter (1872-1942) und Hugo Theorell (1903-1982) zurück. In den folgenden Jahren wurden dann Informationen zu Häm-Gehalt und Glykosylierung erhalten und die ersten Beobachtungen an katalytischen Intermediaten (*Compound I* und *II*) folgten (Veitch, 2004a).

Peroxidasen sind in der Lage vielfältige Substrate unter Reduktion von Wasserstoffperoxid zu oxidieren. Sie spielen daher in vielen Stoffwechselwegen eine Rolle und sind unter anderem

1. Einleitung

an der Oxidation verschiedener phenolischer Komponenten wie Lignin-Vorstufen, Auxin und sekundären Metaboliten beteiligt (Hiraga *et al.*, 2001). Diese Reaktion führt zu der Reduktion von Wasserstoffperoxid zu Wasser und der Oxidation eines ein-Elektronendonors (AH₂) zum entsprechenden Radikal ([•]AH) (Reaktion 1). Zwei-Elektronendonoren wie Halogene (X⁻) werden zu der entsprechenden Halogensauerstoffsäure oxidiert (HOX) (Reaktion 2). Einige wenige Peroxidasen entgiften Wasserstoffperoxid durch die Nutzung eines zweiten Moleküls Wasserstoffperoxid als zwei-Elektronendonor (Reaktion 3). Eine spezielle Gruppe von Peroxidasen katalysieren die Integration einer Sauerstoffgruppe aus Wasserstoffperoxid in organische Moleküle (Reaktion 4) (Zámocký *et al.*, 2015):



Diese Bandbreite an Reaktionen erklärt die Beteiligung von Peroxidasen an zahlreichen Prozessen in der Zelle, von der Produktion von *reactive oxygen species* (ROS), welche selbst eine Wirkung entfalten können oder auch als Auslöser verschiedener Signaltransduktionsketten in Frage kommen, bis hin zu vielfältigen physiologischen Prozessen wie dem Auxinmetabolismus und der Lignin- und Suberininformation, der Quervernetzung von Zellwandbestandteilen, der Abwehr von Pathogenen oder der einfachen Zellstreckung durch Veränderung der Integrität der Zellwand (Hiraga *et al.*, 2001; Passardi *et al.*, 2005).

Sowohl die Genstruktur als auch die Zusammensetzung der Proteinsequenz in den typischen Domänen ist über Paraloge und Orthologe hinweg hochkonserviert. Die isoelektrischen Punkte (*pI*) weisen jedoch eine hohe Variabilität auf, wobei noch kein Zusammenhang zwischen dem *pI* und der enzymatischen Funktion hergestellt werden konnte (Welinder *et al.*, 1992).

1.1. Peroxidasefamilien

Peroxidasen (EC 1.11.1.7) gliedern sich in vier Superfamilien: die Peroxidase-Cyclooxygenase, Peroxidase-Chlorid-Dismutase, Peroxidase-Peroxygenase und Peroxidase-Katalase Superfamilie (Zámocký *et al.*, 2015).

1.1.1. Peroxidase-Cyclooxygenase Superfamilie

Die Peroxidase-Cyclooxygenase Superfamilie (Pfam Accession PF03098, Pfam Datenbank, <http://pfam.xfam.org>) besteht aus strukturell diversen, teils tierischen Peroxidasen, welche eine wichtige Rolle bei der angeborenen Immunantwort spielen (Zámocký *et al.*, 2008). Die alte Bezeichnung „tierische-Häm-abhängige Peroxidasen“ ist irreführend und beruhte darauf, dass die Mitglieder Myeloperoxidase (MPO), Eosinophilperoxidase (EPO), Lactoperoxidase (LPO) und Thyroidperoxidase (TPO) aus Säugetieren beschrieben wurden. Es wurden jedoch weitere Mitglieder dieser Familie zugeordnet, sodass heute auch Enzyme aus Invertebraten sowie Pflanzen, Pilzen und Bakterien in diese Superfamilie eingeordnet werden (Zámocký *et al.*, 2008). Die Mitglieder dieser Superfamilie sind Multidomänfamilien mit einer Häm-Domäne welche vorwiegend aus α -Helices aufgebaut ist. Die Häm-Bindedomäne wird von einem zentralen Kern aus 5 α -Helices gebildet. Einzigartig für diese Superfamilie ist die post-translationale Modifikation der Häm-Gruppe (Zederbauer *et al.*, 2007; Auer *et al.*, 2013). Die Häm-Gruppe ist über zwei Ester-Bindungen, die durch zwei konservierte Aspartat- und Glutamat-Reste gebildet werden, kovalent an das Protein gebunden (Zámocký *et al.*, 2015). Durch diese Modifikationen erfolgt eine Verwindung der Häm-Gruppe und es entstehen besondere spektrale und Redoxeigenschaften der Proteine (Arnhold *et al.*, 2006). Ein sehr typisches Sequenzmotiv dieser Superfamilie ist die Abfolge – X-G-Q-X-X-D-H-D-X-, welches das katalytische Histidin, benachbart von zwei Aspartaten, mit einschließt. Dabei dient das erste Aspartat der Bildung der Ester-Bindung und das zweite der Bindung von Ca^{2+} . Das hochkonservierte Glutamin ist vermutlich an der Halogenbindung beteiligt (Reaktion 2) (Furtmüller *et al.*, 2006). Der typische proximale Ligand stellt in dieser Superfamilie ein Histidin dar, welches eine Wasserstoffbrücke zu einem Asparagin ausbildet. Alle Mitglieder dieser Proteinfamilie können Reaktion 1 und 2 katalysieren, die Halogenoxidation scheint bei den bisher untersuchten Mitgliedern jedoch die Hauptaufgabe darzustellen (Zámocký *et al.*, 2015).

1. Einleitung

1.1.2. Peroxidase-Chlorid-Dismutase Superfamilie

Mitglieder der Peroxidase-Chlorid-Dismutase Superfamilie (Pfam Accession PF04261 und PF06778) wurden zuerst aufgrund ähnlicher 3D-Strukturen aus drei Proteinfamilien gruppiert (Goblirsch *et al.*, 2011), wobei die Sequenzähnlichkeit eher niedrig ist. Sie besitzen Aufgaben im eisenabhängigen Stoffwechsel. In diese Familie gehören die *dye-decolorizing peroxidases* (DyPs) sowie Chlorid-Dismutasen (Cld) und ihre evolutionären Intermediate wie Deferochelatase/Peroxidase und Cld –ähnliche Proteine (Zámocký *et al.*, 2015). DyPs und Clds zeigen ein konserviertes Arginin an der distalen Häm-Seite, sowie ein katalytisches Aspartat bei den DyPs, welches bei den Clds fehlt. Cld-ähnlichen Proteinen fehlen diese beiden Reste vollständig. In allen Mitgliedern dieser Superfamilie wird der proximale Häm-Ligand durch ein Histidin gebildet, welches in Clds eine Wasserstoffbrücke zu einem Glutamat, in DyPs zu einem Aspartat ausbildet. Ein weiteres typisches Sequenzmotiv ist die Abfolge –X-I-P-V/I-K/R-K-X- welches die proximalen Reste einschließt (Zámocký *et al.*, 2015).

1.1.3. Peroxidase-Peroxygenase Superfamilie

Enzyme der Peroxidase-Peroxygenase Superfamilie (Pfam Accession PF00141) nehmen eine besondere Rolle ein, da sie die Integration von Sauerstoff aus Wasserstoffperoxid in Substratmoleküle katalysieren (Reaktion 4). Zusätzlich stellt in dieser Familie ein Cystein den proximalen Häm-Ligand. Diese Enzyme stellen eine besondere Superfamilie der Oxidoreduktasen dar, da sie funktionelle Hybride zwischen den klassischen Häm-Peroxidasen und P450-Monooxygenasen sind. Sie werden sekretiert und sind stark glykolysierte Enzyme, die zahlreiche Reaktionen katalysieren. Sie sind genauso an ein-Elektronenreaktionen (Reaktion 1 und 2) und Hydroxylierungsreaktionen (Reaktion 4) sowie Epoxidierungs- und Dealkylierungsreaktionen beteiligt (Hofrichter und Ullrich, 2006; Hofrichter *et al.*, 2010; Hofrichter und Ullrich, 2014). Zudem kommt die Oxidation organischer Heteroatome und anorganischer Halogenide vor (Zámocký *et al.*, 2015). Typische konservierte Domänen dieser Familie beinhalten das Motiv –X-P-C-P-X- mit dem proximalen Cystein als Häm-Ligand, sowie das Motiv –X-E-G-D-X-, in welchem drei Reste die Bindung eines Kations ermöglichen. Die distale Seite zeigt, obwohl dort die katalytische Reaktion stattfindet, eine große Variabilität. Experimentell bestätigt wurden ein Aspartat und eine basische Aminosäure in Proteinen dieser Superfamilie, in denen eine Peroxidase- und Peroxygenaseaktivität detektiert worden war (Zámocký *et al.*, 2015).

1.1.4. Peroxidase-Katalase Superfamilie

Die Peroxidase-Katalase Superfamilie enthält Mitglieder aus Pflanzen, Pilzen und Bakterien und erfährt eine weitere Unterteilung in drei Klassen (Welinder, 1992). Sie stellt zum jetzigen Zeitpunkt die häufigste Superfamilie in verschiedenen Gen- und Proteindatenbanken dar (Zámocký *et al.*, 2015). In der Datenbank Peroxibase (www.peroxibase.toulouse.inra.fr) finden sich (Juni 2015) 9916 Einträge für Häm-Peroxidasen, davon 8491 Einträge für nicht tierische Peroxidasen. Weiter untergliedert, verteilen sich die Einträge in die Klasse I Peroxidasen (n= 2004; etwa 24 %), Klasse II Peroxidasen (n= 621; etwa 7 %) und Klasse III Peroxidasen (n= 5827; etwa 69%).

Die gemeinsame Struktur ist weniger an eine konservierte Aminosäurestruktur gebunden, sondern zeigt sich in einer typischen dreidimensionalen Struktur. Diese besteht aus einer globulären Faltung mit 13 α -Helices und zeigte sich schon früh in der Entwicklung. Typische Domänen sind die distale Aminosäuretriade Arg-Trp/Phe-His innerhalb der Sequenz **-X-R-XX-W/F-H-X-** sowie die proximale Triade His-Trp/Phe-Asp (Zámocký *et al.*, 2010). Nach Welinder *et. al.* (1992) gliedern sich die Mitglieder der Peroxidase-Katalase Superfamilie in folgende Klassen:

1.1.4.1. Klasse I Peroxidasen

Mitglieder dieser Klasse bilden bakterielle interzelluläre Katalase-Peroxidasen (Zámocký, 2004; Singh *et al.*, 2008), Ascorbatperoxidasen im Cytosol, Chloroplasten und Peroxisomen (Passardi *et al.*, 2007) sowie membrangebundene Cytochrom-c-Peroxidasen in Mitochondrien (Erman und Vitello, 2002; Zámocký, 2004).

Mitglieder dieser Familie können Reaktionen entsprechend Reaktion 1 und 3 katalysieren. Katalase-Peroxidasen besitzen in dieser Familie neben einer peroxidativen Aktivität auch eine katalytische Aktivität zur Entgiftung von Wasserstoffperoxid nach Reaktion 3. Ascorbat und Cytochrom-c-Peroxidasen sind typische Vertreter der Klasse der monofunktionalen Peroxidasen, die nur nach Reaktionen 1 arbeiten und dabei Ascorbat oder Cytochrome c als Substrat verwenden. Die Hauptfunktionen dieser Klasse scheinen demnach Entgiftungsreaktionen durch die Reduktion von Wasserstoffperoxid zu sein.

1. Einleitung

1.1.4.2. Klasse II Peroxidasen

Diese Klasse wird von Pilzen sekretierten Isoenzymen gebildet, die im Zusammenhang mit den Zersetzungsprozessen von Lignin stehen (Floudas *et al.*, 2012; Kellner *et al.*, 2014). Zusätzlich wurden Proteine in diese Klasse gruppiert, welche nicht in der Lage sind Holz zu zersetzen. Enzyme dieser Klasse können grundsätzlich die Reaktionen 1 und 2 katalysieren (Zámocký *et al.*, 2015).

1.1.4.3. Klasse III Peroxidasen

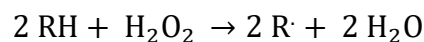
Diese stellt die größte der drei Klassen dar. Viele der Mitglieder sind sekretorische Peroxidasen aus Pflanzen, der bekannteste Vertreter ist die Meerrettich Peroxidase (HRP) aus Meerrettich (*Armoracia rusticana* GAERTN., B. MEY und SCHERB). Daneben kommen in dieser Gruppe auch Ascorbatperoxidase (APX) verwandte Vertreter sowie in Pilzen Hybrid-Typ 2 Peroxidasen vor (Zámocký *et al.*, 2015). Ihre Gene sind in großen Multigenfamilien organisiert (Tognolli *et al.*, 2002; Duroux und Welinder, 2003; Passardi *et al.*, 2004), kommen in allen Landpflanzen vor, nicht jedoch in einzelligen Grünalgen (Passardi *et al.*, 2004). In zahlreichen Pflanzen findet sich eine hohe Zahl von Paralogen. So kommen in Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana* (L.) HEYN., Ackerschmalwand) mindestens 73 Gene von Klasse III Peroxidasen vor (Tognolli *et al.*, 2002), auch in Reis (*Oryza sativa* L.) findet man mit 138 Mitgliedern eine erhöhte Anzahl von Paralogen (Passardi *et al.*, 2004). Wang *et al.* (2015) identifizierten 119 Gene in Mais (*Zea mays* L.), welche für Klasse III Peroxidasen codieren. In der Datenbank Peroxibase (<http://peroxibase.toulouse.inra.fr/>) finden sich 142 Einträge vollständiger Proteinsequenzen für Mais, 148 Sequenzen für Reis und 146 Sequenzen für Arabidopsis. Dieses verbindet man mit der hohen Rate von Gendublikationen, sowie hochkonservierten Peroxidasegenen. Genduplikate stellen einen wichtigen evolutionären Mechanismus dar. Durch die Verschiebung von Genen im Genom kann es zu einer Kopplung mit anderen regulatorischen Elementen kommen, durch Mutationen kann das duplizierte Gen neue Funktionen erlangen. Diese Vorgänge werden als *subfunctionalisation und neofunctionalisation* bezeichnet (Passardi *et al.*, 2005).

1.2. Reaktionsmechanismen und Substratspezifität

Die von Häm-Peroxidasen katalysierten Reaktionen, in der Regel eine ein-Elektronen-Oxidation eines passenden Substrates mithilfe des Co-Substrates Wasserstoffperoxid,

werden von Veränderungen im katalytischen Zentrum begleitet. Dieses ist ein Eisen-Protoporphyrin IX, bei den Cyclooxygenasen ist dieses zusätzlich autokatalytisch verändert (siehe oben). Da der Aufbau des aktiven Zentrums grundsätzlich recht konserviert ist, lässt sich ein allgemeiner Mechanismus formulieren. Festzuhalten ist jedoch, dass einzelne Charakteristika in Abhängigkeit des Aufbaus des aktiven Zentrums durchaus variieren können. Dies betrifft vor allem die bei der Koordinierung der Häm-Gruppe beteiligten Aminosäuren, die einen Einfluss auf die Reaktivität, den Zugang zu katalytisch aktiven Resten und das Redoxpotential haben können (Cusanovich *et al.*, 1989).

Die von Peroxidasen durchgeführte Standardreaktion ist die Oxidation eines Substrates unter Verbrauch von Wasserstoffperoxid und der Bildung von Wasser und einem Substratradikal. Die allgemeine Gleichung kann mit Anlehnung an Reaktion 1 wie folgt formuliert werden:



Hinter dieser Gleichung verbirgt sich eine stufenweise Reaktion des Reaktionszentrums mit typischen katalytischen Intermediaten. Das Reaktionszentrum einer Peroxidase liegt in verschiedenen Stadien vor, welche als *Resting state*, *Compound I*, *Compound II* und *Compound III* bezeichnet werden. *Compound I* und *Compound II* stellen die kritischen katalytischen Intermediate dar. Die Oxidationsstufe des zentralen Eisenatoms im Häm nimmt in der schrittweisen Umformung Oxidationsstufen von II (*Compound III*) bis IV (*Compound I und II*) an. Im Ruhestadium liegt Fe^{III} vor. Die Charakterisierung dieser Zustände erfolgte auch in diesem Fall an der HRP. In dieser und vielen anderen Peroxidasen ist die Koordinationszahl des Eisenatoms 5 in einer *High spin* Konfiguration (Smulevich *et al.*, 1994) mit einem Histidin als proximalem Eisenligand, sowie einem distalen, unkoordiniertem Wassermolekül. Zusätzlich zu diesem proximalen Histidin (His170, HRP), kommt in den meisten Peroxidasen ein distales Histidin (His42, HRP) vor, welches an der Katalyse beteiligt ist. Ein distales Arginin (Arg38, HRP) sorgt durch polare Wechselwirkungen für die heterolytische Spaltung der Di-Sauerstoffbindung im Wasserstoffperoxid. Weitere wichtige Reste bei der Bildung von *Compound I* sind ein Asparagin an der distalen Seite, welches durch eine Wasserstoffbrückenbindung mit der Aminogruppe von Histidin 42 dessen Basizität erhöht, sowie Asparaginsäure auf der proximalen Seite, welches durch eine weitere Wasserstoffbrückenbindung die Elektronendichte am Imidazolring erhöht. Durch die so

1. Einleitung

aufgebaute Spannung kommt es zu einer Spaltung der Sauerstoffbindung (Montellano, 2010). Die Rolle dieser Reste für die katalytische Aktivität wurde in Substitutionsstudien gezeigt. Das distale Histidin spielt demnach die wichtigste Rolle für die katalytische Aktivität (Erman *et al.*, 1993; Nagano *et al.*, 1996; Rodriguez-Lopez *et al.*, 1996).

Als erster Schritt der Katalyse erfolgt die Bindung von Wasserstoffperoxid an das Häm-Eisenatom, was zur Bildung eines *ferric*-Hydroperoxidintermediates führt [Fe(III)-OOH]. Dieses wurde erstmals bei der Reaktion von HRP mit Wasserstoffperoxid beobachtet (Baek und Van Wart, 1989). Das beobachtete Absorptionsspektrum konnte durch Berechnungen bestätigt werden, jedoch gab es auch abweichende Beobachtungen mit Intermediaten, welche ein ununterbrochenes Soret-Band aufwiesen. Dies deutet auf einen Komplex aus *ferric*-HRP und nicht deprotoniertem Wasserstoffperoxid hin [Fe(III)-HOOH] (Harris und Loew, 1996). Tatsächlich wird dieser Komplex möglicherweise benötigt, um die benötigte Azidität des Peroxides zur Deprotonierung durch das distale Histidin zu ermöglichen (Jones und Dunford, 2005).

Bei der Umwandlung von *Compound 0* zu *1* muss der distale Sauerstoff des *ferric*-Hydroperoxidkomplexes protoniert werden, um als Wasser bei der Umwandlung zum *ferryl*-Komplex aus der Reaktion hervorzugehen. Es wird angenommen, dass der distale Histidinrest als Base für die Deprotonierung des Peroxides während der Formierung von *Compound 1* dient. Dieses Proton wird dann durch den Imidazolring zum terminalen Sauerstoffatom des *ferric*-Hydroperoxidkomplexes geliefert, wo es zur Spaltung der O-O Bindung führt und so den Übergang zum *Compound 1* bewirkt. Dieser generelle Ablauf wird als Poulos-Kraut-Mechanismus beschrieben (Montellano, 2010). Spektrale Daten lassen vermuten, dass HRP *Compound 1* aus einem *ferryl*-Teil [Fe(IV)=O] und einem Radikalkation im Porphyrin-Netzwerk bestehen (Dolphin *et al.*, 1971). Dieser Übergangszustand ist jedoch bei einigen Peroxidasen nur kurz, wenn überhaupt erkennbar, zu beobachten. Es kommt zur Bildung eines Proteinradikals, welches das Porphyrinradikal ersetzt. Als klassisches Beispiel für einen solchen Mechanismus dient die Cytochrom-c-Peroxidase (CcP). In dieser wird Trp191, welches in Nachbarschaft zum proximalen Eisenligand His175 liegt zum Radikalkation oxidiert (Finzel *et al.*, 1984). Um dieses Konstrukt vom klassischen *Compound 1* zu unterscheiden, wird es als *Compound ES* bezeichnet. Interessanterweise ergaben Untersuchungen an HRP, bei der spezifisch Reste ausgetauscht wurden (Phenylalanin 172 gegen Tyrosin und Phenylalanin 221 gegen Tryptophan), dass sich auf diese Weise mutierte

Proteine erzeugen ließen, welche ebenfalls die Ausbildung von *Compound I* in Form eines Proteinradikals zeigten. Dies führte zu dem Schluss, dass nur geeignete Reste für die Bildung eines solchen Komplexes vorhanden sein müssen (Miller *et al.*, 1995; Morimoto *et al.*, 1998). Dieses Proteinradikal ist in einigen Fällen direkt an der Substratoxidation beteiligt (Pérez-Boada *et al.*, 2005; Pogni *et al.*, 2005; Miki *et al.*, 2009; Ruiz-Dueñas *et al.*, 2009). Dies hat den Vorteil, dass entsprechende Reste gut zugänglich an der Oberfläche des Proteins sind, was eine weite Substratspezifität, mit einem Umsatz auch großvolumiger Substrate, zulässt. Die Bildung von *Compound II* erfolgt aus einer ein-Elektronen-Reduktion von *Compound I*, in welcher das Eisen noch im [Fe(IV)]-Stadium vorliegt, das Porphyrinradikal ist zu diesem Zeitpunkt nicht mehr zu beobachten. Der *ferryl*-Sauerstoff liegt protoniert vor [Fe(IV)-OH] (Hersleth *et al.*, 2006) und bildet in HRP Wasserstoffbrückenbindungen mit His42 und Arg38 (Montellano, 2010).

Compound III stellt schließlich den letzten möglichen Komplex dar, bei dem ein Sauerstoffatom an das *ferrous*-Eisenatom (Fe^{III}) gebunden ist. Dieser Aufbau ist den Sauerstoffkomplexen in Myoglobin und Hämoglobin recht ähnlich. Zur Bildung von *Compound III* kommt es häufig unter hohem Überschuss von Wasserstoffperoxid, und der Kombination von Superoxid und *ferrous*-Peroxidase. Dieses Intermediat wird nicht als typisches Intermediat verstanden, wobei es in einigen Fällen durchaus an Reaktionen beteiligt sein kann (Montellano, 2010).

Peroxidasen katalysieren gewöhnlich ein-Elektronen-Oxidationen von Substraten, jedoch keine Reaktionen bei denen es zu einer Übertragung des *ferryl*-Sauerstoffs kommt. Diese Eigenschaft ermöglicht die Unterscheidung von Monooxygenasen, bei denen eine solche Übertragung stattfindet. Die katalytischen Intermediate sind sich bei beiden Proteinklassen recht ähnlich (Montellano, 2010). Die Kristallstruktur von HRP lässt erkennen, dass nur der δ -*meso*-Bereich des Häms dem Medium zugänglich ist. Der Rest der prosthetischen Gruppe wird komplett vom Protein umschlossen (Gajhede *et al.*, 1997). Das Häm-Eisenatom wird durch den katalytischen Histidinrest (His42) und einem weiteren Phenylalanin (Phe41) abgeschirmt. Die Reaktion kann daher nur über den δ -*meso*-Bereich des Häms erfolgen. Eine Übertragung von Sauerstoff ist sterisch nicht möglich. Diese Voraussetzungen bilden die Grundlage für die Substratspezifität von Peroxidasen, da es leicht zu sterischen Behinderungen beim Zugang von großvolumigen Substraten kommen kann. Die Abwicklung der Reaktion über eine Ecke des Häms wurde im Zusammenhang mit der Hemmung von

1. Einleitung

Peroxidasen durch Alkyl- und Aryl-Hydrazine aufgeklärt. Dabei kam es zu einer Anlagerung der entstehenden Kohlenstoffradikale an die δ -*meso*-Seite des Häms (Ator *et al.*, 1987; Ator und Montellano, 1987). Weitere Erkenntnisse für die katalytische Abwicklung der Reaktionen über den δ -*meso*-Bereich des Häms ergaben sich bei Beobachtungen von CcP. Dieses Enzym besitzt zwei Substratbindestellen, eine für Cytochrom *c* an der Oberfläche des Proteins, und eine weitere für den Umsatz von kleinen Substraten, der ebenfalls an der δ -*meso*-Ecke des prosthetischen Häms stattfindet. Nach einer Hemmung des Enzyms mit Phenylhydrazin oder Azid, bei der es zur kovalenten Bindung der Phenyl- oder Azidgruppe am δ -*meso*-Kohlenstoff kommt, ist der Umsatz von kleinen Substraten wie Guajacol stärker betroffen, als der Umsatz von Cytochrom *c* (Depillis *et al.*, 1991).

Zu den klassischen Peroxidasereaktionen gehört die ein-Elektronen-Oxidation von Phenolen. Schon die weiter oben beschriebene Oxidation von „Gaiac“ stellt eine solche Reaktion dar (Planche, 1810). Der Substituent des Phenols bestimmt die Rate mit der der Umsatz erfolgt. Es gibt einen deutlichen Zusammenhang des Redoxpotentials der Phenole und der erzielten Umsatzraten (Gilabert *et al.*, 2004). Die Endprodukte der Oxidation sind sekundäre Produkte aus Reaktionen der entstandenen Radikale. Aromatische Amine können ebenfalls zu Radikalkationen umgesetzt werden, auch hier ist der Substituent von entscheidender Bedeutung für die Umsatzraten der Reaktion. Auch bei diesen Substraten kommt es zu einer Weiterreaktion der gebildeten Radikale. Vergleicht man die Umsatzraten von substituierten Phenolen und Aminen so werden Phenole etwa 1-2-fach schneller umgesetzt (Gilabert *et al.*, 2004).

Kohlenstoffe können ebenfalls zu freien Radikalen oxidiert werden, sofern sie im Besitz einer passenden funktionellen Gruppe sind, die zu anionischen Eigenschaften bzw. zu einer negativen Nettoladung führt. Im Zusammenhang mit der Lipidperoxidation und dem Nachweis der Produktion von freien Radikalen in biologischen Systemen, konnte die Oxidation von Malondialdehyd durch HRP gezeigt werden (Mottley *et al.*, 1991).

Ein weiterer interessanter Mechanismus bei Oxidationen durch Peroxidasen stellt die schrittweise Oxidation von zwei Substraten dar. Dazu wird zunächst ein effektives, kleines Substrat umgesetzt, welches dann ein weiteres, weniger effektives Substrat oxidiert. Über dieses Elektronen-Transfer-Relais erfolgt die Oxidation von Lignin über Veratrylalkohol durch Ligninperoxidase (LiP). Das erzeugte Radikalkation kann in die vergleichsweise undurchlässige Ligninmatrix eindringen und den Abbau von Lignin einleiten (Blodig *et al.*,

2001). Ein ähnlicher Mechanismus ist beim Umsatz von Isoniazid unter Beteiligung von Chlorpromazin durch HRP zu beobachten. Isoniazid wird auch direkt von HRP umgesetzt, stellt jedoch ein ineffektives Substrat dar und führt zu einer irreversiblen Inaktivierung der Peroxidase. Chlorpromazin wird hingegen effektiv von HRP oxidiert und führt als Radikalkation zur Oxidation von Isoniazid unter Beibehaltung der Enzymfunktion (Goodwin *et al.*, 1997).

Alle bisher dargestellten Reaktionen gehören der Gruppe der ein-Elektronen-Oxidationen an. Peroxidasen können jedoch auch Reaktionen aus der Gruppe der zwei-Elektronen-Oxidationen wie Halogenierung (Huang *et al.*, 2005; Huang und Montellano, 2007), Sauerstoffübertragung (Sundaramoorthy *et al.*, 1995; Sundaramoorthy *et al.*, 1998) oder sequentielle ein-Elektronen-Oxidationen (Ferrari *et al.*, 1999) katalysieren. Diese Reaktionen spielen allerdings für Klasse III Peroxidasen nur eine untergeordnete Rolle. Sequentielle Oxidationen sind nicht an eine Wechselwirkung von Enzym und Substrat gebunden und können daher auch in dieser Klasse vorkommen.

Die Peroxidasereaktion folgt einem Ping-Pong Mechanismus, da zwei Substrate eingehen und zwei Produkte entstehen. Wenn nur ein Produkt zweimal umgesetzt wird, ist ein Uni-Uni-Bi-Bi-Ping-Pong Mechanismus zu bevorzugen (Gilabert *et al.*, 2004).

Die Darstellung der katalytischen Reaktionsmechanismen macht deutlich, wie breit das mögliche Substratspektrum von Klasse III Peroxidasen sein kann. Darin eingeschlossen sind Reaktionen, die spezifische Substrate umsetzen, sowie andere, die nur Intermediate produzieren, die ihrerseits spezifisch oder unspezifisch weiterreagieren können. Daraus kann sich eine mögliche Beteiligung an vielen biologischen Prozessen ergeben. Grundsätzlich lassen sich aus den Peroxidasefunktionen zwei mögliche Zyklen ableiten (Passardi *et al.*, 2005). Der peroxidative Zyklus oxidiert zahlreiche Substrate (XH) und entlässt deren oxidierte Form (X'), der hydroxidative Zyklus kann den Wasserstoffperoxid-Level regulieren und zur Produktion von ROS führen (siehe Abb. 1).

1. Einleitung

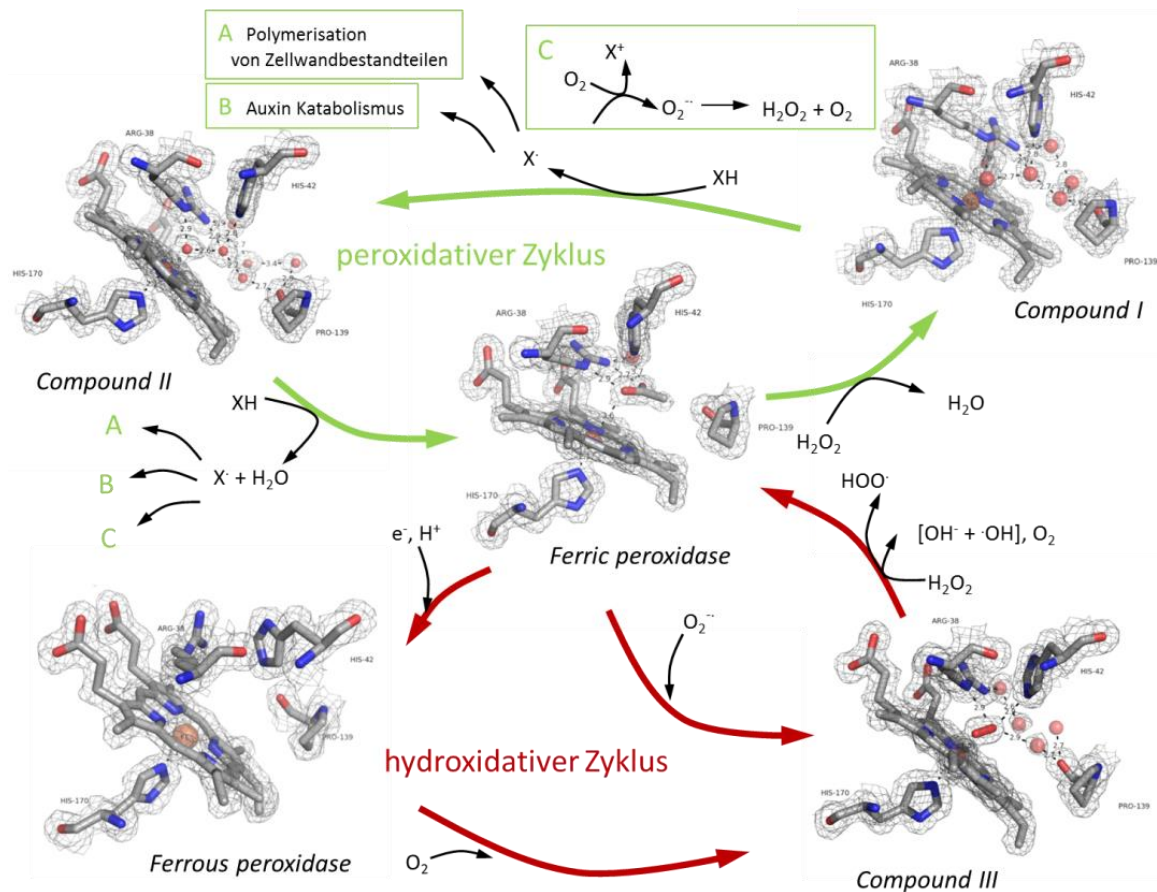


Abb. 1: Mögliche Reaktionsmechanismen von Klasse III Peroxidasen. Grundsätzlich sind zwei verschiedene Zyklen möglich. Im peroxidativen Zyklus (grün) erfolgt unter Wasserstoffperoxid Verbrauch die Umwandlung des Peroxidasegrundzustandes (Ferric Peroxidase) in *Compound I*. Beim Übergang von *Compound I* zu *Compound II* kommt es zu der Oxidation von Substraten (XH) zu entsprechenden Radikalen. Diese können beispielsweise Funktionen in der Polymerisation von Zellwandbestandteilen (A) oder dem Auxin-Katabolismus (B) übernehmen. Über die Erzeugung von Superoxidanionradikalen kann in diesem Schritt wieder Wasserstoffperoxid entstehen. Die Konversion von *Compound II* zum Grundstadium ermöglicht erneut die Oxidation zahlreicher Substrate. Der hydroxidative Zyklus dient unter Verbrauch von Superoxidanionradikalen und Wasserstoffperoxid der Erzeugung von Hydroxylradikalen, die Aufgaben in der Lockerung der Zellwandstruktur übernehmen, oder wieder durch die Superoxiddismutase (SOD) zu Wasserstoffperoxid umgesetzt werden. Die Elektronendichtekarten wurden anhand der fünf Oxidationsstufen der Meerrettich-Peroxidase C1A (PDB Nummern: 1H5A, 1H55, 1H57, 1H58 und 1HCH) mit Hilfe des Elektronendichte-Servers (<http://eds.bmc.uu.se/eds/>) berechnet. Modifiziert von (Passardi *et al.*, 2005; Lüthje *et al.*, 2011).

1.3. Funktionen von Klasse III Peroxidasen

Beide Zyklen ermöglichen Wechselwirkungen mit vielen verschiedenen weiteren Reaktionen. Im peroxidativen Zyklus werden phenolische Substanzen (z.B. Ferulasäure, Tyrosinreste in Proteinen, Monolignole) zu Phenylradikalen oxidiert und auf diesem Wege Wasserstoffperoxid verbraucht. Diese können weiterreagieren und Vernetzungen bilden. In einem oxidativen Zyklus wird eine Elektronendonator wie NADH durch die Peroxidase zum NAD^{\cdot} Radikal oxidiert, welches in einer Folgereaktion an der Bildung von

Superoxidanionradikalen beteiligt ist. Zusätzlich ist durch starke Reduktionsmittel eine Konversion des Häm-Grundzustandes zum *ferrous*-Häm möglich, welches dann mit atmosphärischen Sauerstoff *Compound III* bildet (O'Brien *et al.*, 2012). Die Weiterreaktion mit einem Elektronendonator führt zum Zurückkehren in den Grundzustand unter Bildung von Wasserstoffperoxid. Im hydroxidativen Zyklus können zudem über eine Reaktion vom Häm im Grundzustand mit Superoxid in der Rückreaktion Hydroxylradikale gebildet werden (Liszka *et al.*, 2003) (siehe Abb. 3). Die für die oxidative Funktion gebrauchten starken Reduktionsmittel können NAD(P)H, Ascorbat, Thiole oder Fettsäuren darstellen (Bolwell *et al.*, 2002; O'Brien *et al.*, 2012).

Durch Peroxidasen vermittelte Funktionen reichen durch alle Entwicklungsstadien und viele zelluläre Funktionen sowie die Beteiligung an Abwehrreaktionen, Perzeption und Weiterleitung von Signalen. Schon die große Anzahl an Genen in Arabidopsis, Reis und Mais kann ein Hinweis auf die ubiquitäre Beteiligung an katalytischen Prozessen in der Pflanze sein. Solche Multigenfamilien entstanden durch verschiedene Prozesse wie *unequal crossing over*, verschiedene Transpositionsvorfälle, Duplikation großer Bereiche des Genoms sowie durch Polyploidisierung. Durch Genduplikationen können sich Veränderungen der Expression des duplizierten Gens ergeben, es kann jedoch auch neue Funktionen erlangen (Zhang, 2003). Durch diese Mechanismen ergibt sich die Möglichkeit einer sehr feinen Spezialisierung innerhalb der Multigenfamilien zwischen verschiedenen Isoenzymen. Die wichtigsten Funktionen von Klasse III Peroxidasen sollen nachfolgend vorgestellt werden.

Kommt es zur Konfrontation von Pflanzen mit verschiedenen Stressoren, wird in den folgenden Reaktionen häufig auch eine Steigerung der Peroxidaseaktivität beobachtet. Die Art des Stressors kann dabei divers sein und teilt sich in biotische und abiotische Faktoren, mit biologischen (Pathogenen), chemischen (Schwermetallen) oder physikalischen (Verwundung) Stressoren. Die Expression von Peroxidasen führt zu einer Verteidigungsreaktion, entweder passiv durch eine Verstärkung der Zellwände, oder aktiv durch die Produktion von ROS. Wird die äußere Barriere durchbrochen, könnten Peroxidasen eine Rolle bei der Isolierung bzw. Eliminierung des Angreifers in der Pflanzenzelle spielen (Passardi *et al.*, 2005). Im Zusammenhang mit Schwermetallstress konnten für Peroxidasen Entgiftungsreaktionen in *Nymphaea* gezeigt werden, bei denen durch Polyphenole eine Einlagerung von Cd²⁺-Ionen stattfand (Lavid *et al.*, 2001a; Lavid *et al.*, 2001b). Toxische Stoffe können teilweise durch simple Oxidation entgiftet werden, teilweise kommt es dabei zu der

1. Einleitung

Bildung von Polymeren (Agostini *et al.*, 2003). Ein interessanter Aspekt ist die hohe Empfindlichkeit einer Hochregulation von Peroxidasegenen als Reaktion auf bestimmte Umweltgifte, was einen Einsatz als Biomarker erlauben kann (Cho und Park, 2000; Klumpp *et al.*, 2000; Geebelen *et al.*, 2002; Moraes *et al.*, 2002; Wu und Von Tiedemann, 2002).

Auch ein Effekt von Pathogenen auf die Expression und Aktivität von Peroxidasen konnte gezeigt werden. Nach einer Infektion kommt es zu Verstärkungen der Zellwand und der Einlagerung von Callose (Luna *et al.*, 2011; Voigt, 2014), sowie einer Produktion und Akkumulation von Superoxidanionen und Wasserstoffperoxid an den Infektionsstellen. Es kann auch zu einer Steigerung der Peroxidaseaktivität rund um die Infektionsstelle kommen (Martinez *et al.*, 1998). In Reis kommt es bei Infektion mit dem Bakterium *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* zur starken Hochregulation des Transkriptes einer einzelnen Peroxidase, welche dann in Xylemgefäße sekretiert wurde und dort zur Versteifung der Zellwände führt (Hilaire *et al.*, 2001). Die Behandlung von Maiskeimlingen mit verschiedenen Elicitoren führte zu einer teilweise starken Steigerung der beobachteten Peroxidaseaktivitäten (Mika *et al.*, 2010). Bei apoplastischen Peroxidasen konnte eine Veränderung der Aktivitäten im Zusammenhang mit Verwundung beobachtet werden (Minibayeva *et al.*, 2009). Zu weiteren Funktionen zählt die Beteiligung an Prozessen wie Parasitismus, Symbiosen und Seneszenz bzw. Fruchtreife (Passardi *et al.*, 2005). Darüber hinaus sind Klasse III Peroxidasen bei Vermittlung von Kältetoleranz (Kim *et al.*, 2012), Schutz vor UV-Strahlung (Jansen *et al.*, 2001) sowie in der Alkaloidsynthese (Costa *et al.*, 2008) beteiligt.

Bei vielen genannten Vorgängen spielt die Veränderung der Integrität der Zellwand eine Rolle. Auch bei Prozessen in der Pflanzenentwicklung wie normalen Wachstumsreaktionen sind diese Prozesse notwendig.

Klasse III Peroxidasen können die Struktur der Zellwand sowohl verfestigen, als auch aufweichen. Durch die Oxidation von aromatischen Zellwandbestandteilen (Monolignole, Zimtsäuren, aromatische Aminosäuren) in Gegenwart von Wasserstoffperoxid kommt es zu einer Verfestigung der Zellwand durch die Reaktion der entstehenden Radikale miteinander oder mit bestehenden Strukturen. Durch die Regulation von Wasserstoffperoxid-Pegeln und die Produktion von ROS wie Hydroxylradikalen ($\cdot\text{OH}$) kann die Festigkeit durch Aufbrechen kovalenter Bindungen vermindert werden (Schopfer *et al.*, 2001). Zudem konnte ein nichtenzymatisches Aufspalten von Zellwandpolysacchariden wie Pektinen und Xyloglukanen durch Hydroxylradikale gezeigt werden (Schopfer, 2001). Ein direkter Einfluss auf das

Streckungswachstum der Zellen ist durch eine Auxinoxidaseaktivität möglich (Kukavica *et al.*, 2012). Bei der Keimung konnte die Co-Lokalisation der ROS-Entwicklung und Peroxidaseaktivität gezeigt werden (Lariguet *et al.*, 2013). Der Einfluss von Wasserstoffperoxid auf das Wachstum, im Zusammenhang mit Tropismen oder Streckungsreaktionen konnte beobachtet werden. In Dikotyledonen wie Soja (*Glycine max* (L.) MERR.) ist die apoplastische Wasserstoffperoxid-Konzentration in der Elongationszone von Hypokotylen geringer (Schopfer, 1994). In *Arabidopsis* kommt es während der Krümmung der Wurzel zu einer Variation der Wasserstoffperoxidkonzentration (Joo, 2001). In Monokotyledonen konnte ein Auftreten von Wasserstoffperoxid in der Zellwand mit der Lignifizierung und Streckung während des Wachstums in Verbindung gebracht werden (Córdoba-Pedregosa *et al.*, 2003).

1.4. Sequenz und 3D-Struktur von Klasse III Peroxidasen

Die Primärstruktur von pflanzlichen Peroxidasen ist hochkonserviert. Für die Ausbildung des katalytischen Zentrums existieren zwei Histidinreste, die mit der Häm-Gruppe wechselwirken (distales und proximales Häm), sowie acht Cysteinreste, die zur Ausbildung von vier Disulfidbrücken führen. Das distale Histidin ist essentiell für die katalytische Aktivität (Passardi *et al.*, 2004).

Die erhaltene dreidimensionale Struktur der verschiedenen Isoformen erscheint in dieser Klasse ebenfalls konserviert und besteht aus einer globulären Form mit 13 α -Helices, 10 dieser Helices findet man bereits in prokaryotischen Peroxidasen (Welinder, 1992; Passardi *et al.*, 2004; Cosio und Dunand, 2009). Von einigen Mitgliedern dieser Superfamilie wie z.B. aus *Arachis* (*Arachis hypogaea* L., Erdnuss), *Arabidopsis* und *Armoracia* wurde die dreidimensionale Struktur über Proteinkristallisation und Röntgenbeugungsanalyse bereits aufgeklärt (Schuller *et al.*, 1996; Lige *et al.*, 2001; Berglund *et al.*, 2002). Über ein *Alignment* und Abgleich mit vorhandenen Kristalldaten als Template, kann die dreidimensionale Struktur einer bisher nicht kristallisierten Peroxidase modelliert werden. Diese Modellierung sowie eine weitere *in silico* Charakterisierung von membrangebundenen Peroxidase-Isoenzymen aus Mais ergab 13 bis 21 α -Helices und zwei bis 11 β -Faltblätter, sowie konservierte Domänen im Bereich der Häm-, Substrat- und Calciumbindestellen. Typische Motive für die Bildung von Disulfidbrücken, sowie von Glykosylierungsstellen wurden ebenfalls gefunden (Lüthje *et al.*, 2011). Abb. 2 zeigt ein *Alignment* der modellierten Struktur

1. Einleitung

von ZmPrx01 mit der Struktur von HRP1C sowie eine schematische Übersicht über konservierte Domänen in der Peroxidase Primär- und Sekundärstruktur. Das Vorkommen variabler Sequenzen im Bereich der Substratbindestellen (siehe Abb.2b) bestärkt die vermutete breite Substratspezifität.

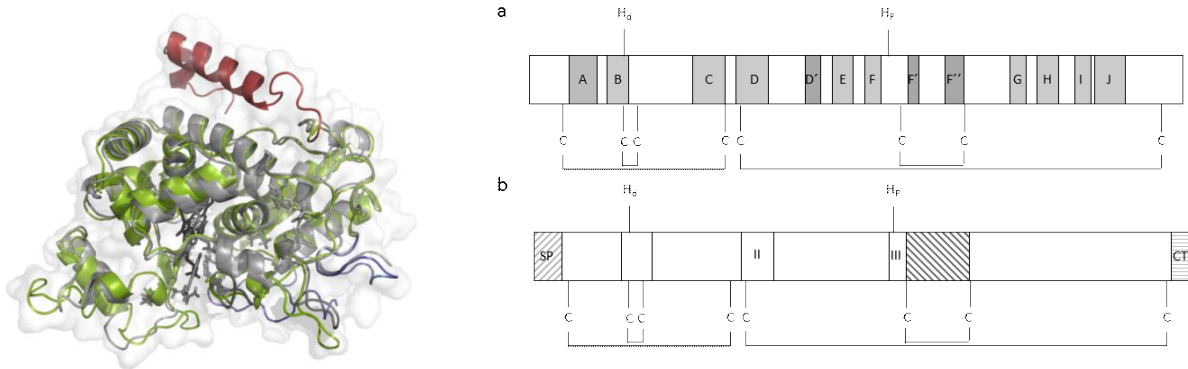


Abb. 2: Links: Überlagerung der modellierten 3D-Struktur von ZmPrx01 (farbig) mit der Meerrettich-Peroxidase HRP1C (in Grau). Gut zu erkennen ist die Ähnlichkeit der beiden Strukturen, größere Unterschiede sind in den Loop-Bereichen zu erkennen. Rechts: Modelle zur Veranschaulichung der Sekundär- (a) und Primärstruktur (b). A-J stellen die typischen α -Helices von Häm-Peroxidasen dar, dunkelgrau entsprechen Helices typisch für Klasse III Peroxidasen. Als Referenz dienen konservierte Cysteine, sowie distales (H_d) und proximales Histidin (H_p). Abb. b zeigt die Primärstruktur mit den hochkonservierten Domänen I, II und III, entsprechend der distalen Häm-Bindedomäne, eine Domäne unbekannter Funktion und der proximalen Häm-Bindedomäne. Die schraffierte Region neben Domäne III entspricht einer Region mit höherer Variabilität, die möglicherweise für die katalytische Spezifität sorgt. Signalpeptid (SP) und C-terminale Verlängerung sind hochvariabel in Zusammensetzung und Länge. Verändert aus (Cosio und Dunand, 2009). Modell von ZmPrx01 erzeugt durch Phyre² (Kelley *et al.*, 2015) im Intensive Modus.

Bei der Suche nach konservierten Peroxidasedomänen (Pfam Pf00141) im Mais Genom ergaben sich auf Proteinebene nach Entfernung von redundanten Proteinen 119 ZmPrx-Proteine, mit einer Größe von 158 bis 1063 Aminosäuren (AS) (Durchschnitt 364 AS). Über phylogentische Analysen wurden diese Proteine in 18 Untergruppen gegliedert, sowie mögliche Genduplikationen gezeigt (Wang *et al.*, 2015). Auch diese Analyse zeigte die hohe Konservierung der Proteinsequenzen und fand neben typischen Peroxidasedomänen weitere charakteristische Domänen einzelner Unterklassen.

1.5. Subzelluläre Lokalisierung von Klasse III Peroxidasen

Untersuchungen verschiedener Peroxidasen stützen sich auf lösliche intrazelluläre oder sekretierte Peroxidasen (Hiraga *et al.*, 2001; Shigeoka *et al.*, 2002). Gerade biochemisch interessante Isoenzyme mit wirtschaftlicher Relevanz, wie die HRP, erfahren große

Aufmerksamkeit. Diese Peroxidase wird in der Forschung bzw. zu diagnostischen Zwecken oft verwendet (May, 1999). Zur Optimierung von Abläufen und genaueren Charakterisierung der HRP wurde die Struktur aufgeklärt (Gajhede *et al.*, 1997; Henriksen *et al.*, 1999), zahlreiche weitere Isoenzyme entdeckt, und die rekombinante Expression sowie erste biochemische Charakterisierung durchgeführt (Morawski *et al.*, 2000; Krainer *et al.*, 2014). Auch in Studien zu verschiedenen Stressoren findet man häufig Untersuchungen von Peroxidaseaktivitäten löslicher Isoenzyme (Lüthje *et al.*, 2014). Es finden sich zahlreiche Hinweise zu membrangebundenen Peroxidaseaktivitäten, häufig in Membranaufreinigungen durch *aqueous polymer two-phase partitioning* (APTP) oder in Protoplasten. Schon 1982 wurde von Lin ein erhöhter Sauerstoffverbrauch von Maisprotoplasten in Anwesenheit von extrazellulärem NADH beobachtet (Lin, 1982). In Stoma-Protoplasten von *Commelina communis* L. wurde ein ähnliches Verhalten bei Anwesenheit von NAD(P)H beobachtet (Pantoja und Willmer, 1988). Diese NAD(P)H-Oxidase-Aktivität wurde ebenfalls und wiederholt in isolierten Plasmamembranen (PMs) beobachtet (Askerlund *et al.*, 1987; Vianello *et al.*, 1990; Marco *et al.*, 1995; Zancani *et al.*, 1995; Sagi und Fluhr, 2001). Diese Aktivitäten waren gegenüber einer Behandlung mit Detergenzien stabil und zusätzlich auch an intakten Protoplasten zu beobachten, was auf eine Lokalisation der Peroxidaseaktivitäten auf der apoplastischen Seite der PM hindeutete.

Die Reaktion der beobachteten Aktivitäten auf Effektoren wie phenolische Substanzen, oder andere spezifische Effektoren von Peroxidasen wie Katalase (KAT), Superoxiddismutase (SOD), Cyanid oder Azid (Askerlund *et al.*, 1987) bestätigte die Hypothese weiter. Zudem wurden klassische Peroxidasesubstrate wie Guajacol oder *o*-Dianisidin oxidiert (Vianello *et al.*, 1997), bei der Oxidation von Tryptophan wurde Wasserstoffperoxid verbraucht (Ludwig-Müller und Hilgenberg, 1992).

Ein direkter Nachweis von Proteinen erfolgte durch Versuche mit Antikörpern und anschließender Immunogold-Markierung *in situ* (Hu *et al.*, 1989; Crevecoeur *et al.*, 1997).

Weitere experimentelle Belege für das Vorkommen von Peroxidasen an der Plasmamembran von Mais lieferten Mika und Lüthje (2003). Sie isolierten PM Fraktionen mit detektierbarer Guajacolperoxidaseaktivität und untersuchten mit verschiedenen Detergenz- und Salzkonzentrationen die Ablösung der Peroxidaseaktivität von der PM. Dies gelang mit verschiedenen eingesetzten Detergenzien (CHAPS, Triton X-100, Triton X-114, Aminocaprinsäure und Octylglukopyranosid) und unter physiologischen bis hohen

1. Einleitung

Salzkonzentrationen (bis 500 mM KCl) nur teilweise (Mika und Lüthje, 2003). Die erhaltenen Aktivitäten wurden in pmPOX (membrangebundene Peroxidaseaktivitäten) und wPOX (abgewaschene Peroxidaseaktivitäten) gruppiert, gereinigt und biochemisch charakterisiert. Daraus ergaben sich zwei Hauptpeaks nach einer Kationenaustauschchromatographie (pmPOX1 und pmPOX2, sowie wPOX1 und wPOX2) mit unterschiedlichen biochemischen Charakteristika (Mika und Lüthje, 2003).

Es konnte noch eine weitere Aktivität separiert werden, sodass sich nach der Kationenaustauschchromatographie und anschließender Gelfiltration vier Aktivitäten trennen ließen. Die Sequenz, Gen- und 3D-Struktur sowie wichtige biochemische Merkmale konnten für pmPOX1 (ZmPrx01), pmPOX2b (ZmPrx70) und pmPOX3 (ZmPrx66) aufgeklärt werden (Mika *et al.*, 2008). Bei der Analyse konnte in allen Sequenzen ein N-terminales Signalpeptid detektiert werden. Auffällig ist zudem die lange C-terminale Sequenz von ZmPrx01. Die Analyse der Signalpeptide, lieferte eine Leitung in Richtung ER für alle Peroxidasen. Für ZmPrx70 konnte zusätzlich ein Transport an die PM vorhergesagt werden. Die gDNA Sequenzen konnten ebenso beschrieben werden, für ZmPrx70 (pmPOX2b) fand eine Analyse der partiell vorhandenen Promotorsequenz statt. Neben typischen Promotorelementen fanden sich auch einige putative *cis*-regulatorische Sequenzen, welche auf eine Regulation über Auxin, Elicitoren, Hitzestress, Methyljasmonat, Salicylsäure und Wundstress vermuten lassen. Zudem kamen *antioxidant-responsive elements* (ARE) vor. Die dreidimensionalen Strukturen ließen 13, 15 und 15 α -Helices und zwei, vier und zwei β -Faltblätter für ZmPrx01, ZmPrx70 und ZmPrx66 erkennen. Diese liegen an fast identischen Positionen in der 3D-Struktur. Die erhaltenen Strukturen weisen eine hohe Ähnlichkeit auf, die typischen Disulfidbrücken liegen an identischen Positionen in den Proteinen. Hinsichtlich der Glykosylierungsstellen zeigten sich deutliche Unterschiede, sie liegen jedoch alle an der Oberfläche der globulären Proteine (Mika *et al.*, 2008).

Eine *in silico* Analyse von 142 Klasse III Peroxidasen aus Mais, gruppierte 53 % dieser Proteine als lösliche und 47 % als membrangebundene Peroxidasen (siehe Abb. 3). Die membrangebundenen Proteine verteilten sich weiter in 55 % PM, 42 % ER, 2 % Golgi und 1 % Tonoplasten assoziiert (Lüthje *et al.*, 2011). Diese Klassifizierung erfolgte anhand von Sequenzanalysen durch verschiedene Programme, diese sollte jedoch durch Experimente belegt werden.

In Proteomstudien konnten jedoch weitere Klasse III Peroxidasen, Ascorbatperoxidasen sowie Glutathionperoxidasen an Plasmamembranen nachgewiesen werden (Santoni *et al.*, 1998; Marmagne *et al.*, 2007; Natera *et al.*, 2008; Katam *et al.*, 2010; Meisrimler *et al.*, 2011; Hopff *et al.*, 2013). Experimentell belegt ist auch die Existenz der basischen Peroxidase CrPrx01 an der Tonoplastenmembran in *Catharanthus roseus* (Costa *et al.*, 2008).

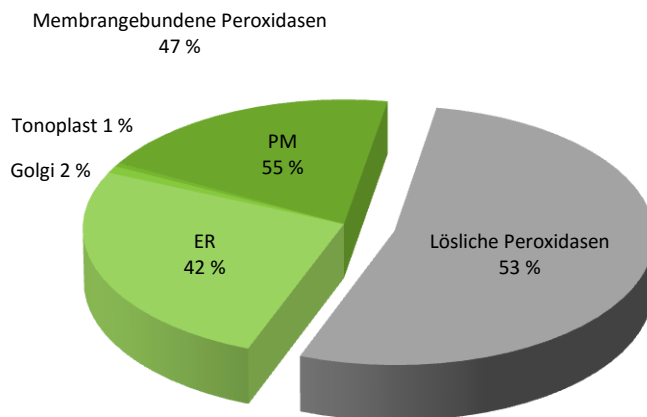


Abb. 3: Lokalisation von Klasse III Peroxidasen aus *Zea mays*. Für die Analyse der Lokalisation wurden 142 Sequenzen für Klasse III Peroxidasen aus der Peroxidase bioinformatisch auf Signalpeptide und mögliche Membrandomänen untersucht. Dabei ergab sich eine Verteilung von 53 % löslicher und 47 % membrangebundener Isoenzyme. Unter den membrangebundenen Proteinen konnten Signale für eine ER-Lokalisation (42 %), PM-Lokalisation (55 %), Golgi- (2 %) und Tonoplasten-Lokalisation (1 %) nachgewiesen werden (Lüthje *et al.*, 2011).

Die Reinheit von Plasmamembranpräparationen wird kritisch diskutiert (Asard und Bérzi, 2003). Entscheidend für die Reinheit der PM-Fraktion ist vor allem ein finaler Waschschriff mit ausreichender Ionenstärke, um mögliche Anhaftungen von löslichen Proteinen zu entfernen (Askerlund *et al.*, 1987; Asard und Bérzi, 2003; Mika *et al.*, 2010). Der Nachweis von löslichen und membrangebundenen Peroxidasen erfolgte in *Arabidopsis*, *Armoracia rusticana* und *Catharanthus roseus* (L.) G. DON über GFP Fusionen und ermöglichte einen direkten subzellulären Nachweis der Proteine *in vivo* (Matsui *et al.*, 2003; Narendra *et al.*, 2006; Passardi *et al.*, 2006; Sottomayor *et al.*, 2008; Matsui *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2013).

1.6. Zielsetzung

Die Charakterisierung von ZmPrx01, ZmPrx70 und ZmPrx66 beruht auf einer Aufreinigung aus Plasmamembranen aus jungen Maiswurzeln über *aqueous polymer two-phase partitioning* (APTPP). Anschließend erfolgte eine Trennung der Proteine anhand biochemischer Eigenschaften über eine Ionenaustauschchromatographie und anschließender Trennung anhand der Größe der Isoenzyme über eine Gelfiltration (SEC). Obwohl APTPP *state of the art* ist wird diese Methode hinsichtlich ihrer Anfälligkeit

1. Einleitung

gegenüber Kontamination von löslichen oder membrangebundenen Proteinen, vor allem aus dem ER, immer wieder in Frage gestellt. Zudem macht die geringe Ausbeute eine vollständige biochemische Charakterisierung aufwendig. Um diese Probleme zu lösen wurde ein Ansatz mit der rekombinanten Herstellung der Peroxidasen in *Escherichia coli* versucht. Eine Expression funktioneller ZmPrx_{rec} gelang im prokaryotischen System durch Mangel an notwendigen posttranskriptionalen Modifikationen nicht. Auch die intrazelluläre Expression des vollständigen Proteins mit nativem Signalpeptid/Membrandomäne in *Pichia pastoris* lieferte nur geringe Ausbeuten an rekombinanten Protein mit geringen spezifischen Aktivitäten.

In der vorliegenden Untersuchung sollte:

1. Die Durchführung der heterologen Expression in *Pichia pastoris* mit zwei Strategien verfolgt werden. Je ZmPrx sollte ein Konstrukt mit nativem Signalpeptid/Membrandomäne hergestellt und mit der α -Faktor-Signalsequenz aus *Saccharomyces cerevisiae* fusioniert werden. In einem weiteren Konstrukt sollte die Fusion ohne vorhandenes Signalpeptid und Membrandomäne erfolgen. Die Selektion positiv transformierter *Pichia* Zellen sollte über Zeocin[®] erfolgen, was zusätzlich eine Selektion von Klonen mit mehrfacher Kopie des GOI (*Gene Of Interest*) im Genom zulässt. Über diese Strategie sollte eine große Bandbreite von Klonen mit unterschiedlicher Expressionsstärke der ZmPrx_{rec} erreicht werden. Die sekretierten ZmPrx_{rec} sollten über eine simple Strategie aus dem Medium aufgereinigt und biochemisch Charakterisiert werden.
2. Das erhaltene Ergebnis der biochemischen Charakterisierung mindestens einer ZmPrx bestätigt bzw. weitergehende Analysen an einzelnen Isoenzymen ermöglicht werden.
3. Die Nukleotidsequenz aller drei Isoenzyme in einer weiteren Maislinie bestätigt und genomische Sequenzen ergänzt und analysiert werden.
4. Der Nachweis von nativen Peroxidasen im natürlichen Gewebe über eine Immunogold-Detektion erfolgen. Dazu sollten für jede Peroxidase Peptidantikörper synthetisiert und Immunogold-Experimente durchgeführt werden.
5. Die Bestätigung der subzellulären Lokalisation von ZmPrx01, ZmPrx70 und ZmPrx66 anhand von GFP-Fusionsproteinen erfolgen. Diese Untersuchungen sollten sowohl im heterologen System, als auch im homologen System durchgeführt werden. Entsprechende

Versuche mit, durch ein *Cre/loxP*-System induzierbarer, Binärkonstrukten zur stabilen Transformation von Mais sollten durch Versuche mit einer transienten Expression von ZmPrx-GFP-Fusionen in Zwiebelepidermiszellen und Maiswurzeln erweitert werden. Die Analyse der subzellulären Verbreitungsmuster sollte über Co-Lokalisationsversuche mit Markerproteinen erfolgen.

6. Die Durchführung von Überexpressionsversuchen in Mais eine zukünftige Funktionsanalysen erlauben. Dazu sollte jeweils eine der behandelten Peroxidasen unter Kontrolle des Ubi1-Promotors exprimiert werden. Um mögliche toxische Effekte abwägen zu können, sollte mit einem induzierbaren *Cre/loxP*-System gearbeitet werden.

Mit den erhaltenen Ergebnissen sollte ein Modell für mögliche Aufgaben von ZmPrx01, ZmPrx70 und ZmPrx66 an der Plasmamembran entwickelt werden.

2. Material und Methoden

2.1. Biologisches Material

2.1.1. Pflanzenmaterial

In dieser Arbeit wurden Maispflanzen (*Zea mays* L.) der Inzuchtlinien Hi-II A und Hi-II B (Armstrong *et al.*, 1991) sowie der Linie A188 (Green und Phillips, 1975) benutzt. Die Anzucht erfolgte im Gewächshaus unter Langtagbedingungen (16 h Licht bei einer Lichtsumme von 650 kLux h/d, 25°C/20°C Tag/Nacht). Die Bestäubung der Pflanzen erfolgte kontrolliert durch Abdecken unreifer Kolben mit einer Papiertüte und einer manuellen Bestäubung mit entsprechendem Pollen bei Reife der Kolben.

2.1.1.1. Stabile Maistransformation

Bei der Agrobakterien vermittelten Transformation erfolgte die Ernte unreifer Embryonen 11 Tage nach einer reziproken Kreuzung der Linien Hi-II A und Hi-II B. Transgene Pflanzen wurden mit Pollen der Linien Hi-II A, Hi-II B und A188 bestäubt, um Saatgut zu erhalten.

2.1.1.2. Biolistische Transformation

Für die biolistische Transformation wurden neben den oben angegebenen Inzuchtlinien auch *Zea mays* L. cv. Gelber Badischer Landmais, sowie im heterologen System *Allium fistulosum* L. (Frühlingszwiebel) eingesetzt. Die Anzucht von Wurzelmaterial für die biolistische Transformation und den Nachweis von aktiven Fusionsproteinen in transgenen Pflanzen erfolgte in Hydrokultur (siehe 2.1.7.1) in Klimakammern unter gleichen klimatischen Bedingungen (siehe 2.1.1) bei 150 μ Einstein (μ E, μ mol/photonen/s). Entsprechendes Saatgut wurde 4 h unter regelmäßigem Durchmischen in Leitungswasser vorgequollen und anschließend zwischen feuchtem Keimpapier (Ederol Medikrepp, Hainichen, Deutschland) in 60 x 40 cm Kulturschalen ausgelegt und nach drei Tagen Keimung in Dunkelheit bei 26°C in die hydroponische Kultur, wie unter 2.1.7.1 beschrieben, überführt.

2.1.2. Bakterienstämme

Für die Vermehrung und Klonierungen wurde der *Escherichia coli* Stamm XL1-blue ($\Delta(\text{mcrA})$ 183, $\Delta(\text{mcrCB-hsdSMR-mrr})$ 173, endA1 , supE44 , thi-1 , recA1 , gyrA96 , relA1 , lac , [F'proAB,lacqZ Δ M15,Tn10(tetR)] (Bullock *et al.*, 1987)) oder TOP10F' (F-, mcrA , $\Delta(\text{mrr-hsdRMS-mcrBC})$, Φ 80lacZ Δ M15, ΔlacX74 , recA1 , deoR , araD139 , $\Delta(\text{ara-leu})$ 7697, galU , galK , rpsL , (StrR), endA1 , nupG , Invitrogen, Carlsbad, USA) verwendet. Nach einer Transformation chemisch kompetenter Zellen (Inoue *et al.*, 1990) wurden positive Klone auf LB-Medium (Miller, 1972) selektiert. Das Medium wurde dabei mit einem, dem Vektor entsprechenden, Antibiotikum versetzt. Die verwendete Konzentration wurde je nach Antibiotikum angepasst (Ampicilin 100 $\mu\text{g/ml}$; Spectinomycin 100 $\mu\text{g/ml}$; Zeocin 25 $\mu\text{g/ml}$; Kanamycin 50 $\mu\text{g/ml}$). Erfolgte eine Selektion mit Zeocin wurde Low Salt LB Medium (siehe 2.1.7.4) eingesetzt und der pH-Wert des Mediums auf pH 7,5 eingestellt um einer Inaktivierung des Antibiotikums vorzubeugen. Die Inkubation erfolgte bei *E. coli* stets bei 37°C und 180 rpm in verschiedenen Kulturvolumen.

Für die stabile Maistransformation wurden *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 (Ooms *et al.*, 1982) in YEB Medium mit Tetracyclin (10 $\mu\text{g/ml}$) bei 28°C und 220 rpm angezogen. In der Transformation wurden chemisch kompetente Zellen eingesetzt (Höfgen und Willmitzer, 1988). Positive Klone wurden auf YEB Medium (siehe 2.1.7.5) mit Tetracyclin (10 $\mu\text{g/ml}$) und Spectinomycin (100 $\mu\text{g/ml}$) selektiert. Zur Vorbereitung der Maistransformation wurden die Agrobakterien bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 bis 0,6 in AB-Medium mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Tetracyclin, 100 $\mu\text{g/ml}$ Spectinomycin und 100 mM Acetosyringon bei 28°C und 220 rpm angezogen.

2.1.3. Hefestämme

Für die Herstellung rekombinanter Peroxidasen wurde das Invitrogen EasySelect™ *Pichia* Expression Kit (Invitrogen, Carlsbad, USA) verwendet. Für die Produktion der Proteine wurde der Wildtypstamm *Pichia pastoris* X33 (Wildtyp, Invitrogen, Carlsbad, USA) verwendet. Als Hintergrundkontrollen dienten Zellen, die mit dem Leervektor transformiert wurden (pPICZ α A), der Stamm KM71H (*arg4 aox1::ARG4*, Invitrogen, Carlsbad, USA) stellte die Kontrolle für den Mut^S-Phänotyp dar. Die Anzucht der Kulturen erfolgte für die normale Vermehrung und die Herstellung kompetenter Zellen in YPD (*Yeast peptone dextrose*) Vollmedium bei 30°C. Bei der Expression rekombinanter Proteine wurde eine Temperatur von 28°C verwendet,

2. Material und Methoden

sofern nicht anders vermerkt. Nach der Transformation wurden die Zellen auf YPDS (YPD und Sorbitol) Medium unter verschiedenen Zeocin®-Konzentrationen selektiert (100-2000 µg/ml). Die Bestimmung des *methanol utilization* (Mut) Phänotyps erfolgte auf MD (*minimal dextrose*) und MM (*minimal methanol*) medium. Die Expression rekombinanter Proteine erfolgte in verschiedenen ungepufferten (MGY, *minimal glycerol medium*; MM, *minimal methanol medium*) und gepufferten Minimal- (BMG, *buffered minimal glycerol*; BMM, *buffered minimal methanol*) und Komplexmedien (BMGY, *buffered complex medium containing glycerol*; BMMY, *buffered complex medium containing methanol*) (alle Medien entsprechend dem EasySelect® *Pichia* Expression Kit, Invitrogen, Carlsbad, USA, siehe Tab. 13).

2.1.4. Vektoren

2.1.4.1. Allgemeine Klonierungen

2.1.4.1.1. pCR®-Blunt II-TOPO (3519 bp)

Dieser Vektor des Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kits (Lifetechnologies, Carlsbad, USA) erlaubt eine Einschnitt-Insertion eines *blunt-end* PCR-Produktes ohne den Einsatz von Oligonukleotiden mit spezifischen Sequenzen, den Einsatz einer Ligase oder sonstige Aufbereitung des PCR-Produktes. Er diente als Vektor zur Sicherung und Vermehrung der aus cDNA erhaltenen *zmpvx*-Sequenzen.

2.1.4.1.2. pJET1.2/blunt (2974 bp)

Ein weiterer Klonierungsvektor aus dem CloneJet PCR Cloning Kit (Thermo Fischer Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland). Die Ampicillinresistenz wird über das β -Lactamase-Gen *bla* vermittelt. Enthalten sind weiterhin der Replikationsursprung *rep* und das Endonuklease-Gen *eco47IR*, welches durch die Integration von *blunt*-PCR-Fragmenten unterbrochen wird und so eine einfache Selektion von positiven Klonen zulässt. Dieser Vektor diente als Zwischenvektor bei der Erzeugung der pPICZ α A-ZmPrx Konstrukte.

2.1.4.2. Fusionsproteine

2.1.4.3. pD1-Ubi-GFP

Dieser Vektor zur Kontrolle der biologischen Transformation basiert auf dem Vektor pD1-AF (DNA Cloning Service, Hamburg). Er enthält das *gfp*-Gen (Tsien, 1998) unter Kontrolle des Ubi1-Promotors aus Mais mit erstem Intron (Christensen *et al.*, 1992) unterbrochen von dem STLS1-Intron (Vancanneyt *et al.*, 1990) und NOS-Terminator (siehe Abb. 4). Des Weiteren sind der ColE1-Replikationsursprung und ein Ampicillinresistenzgen enthalten. Die Kontrolle des *gfp*-Gens durch den Ubi1-Promotor führt zu einer starken konstitutiven Expression.

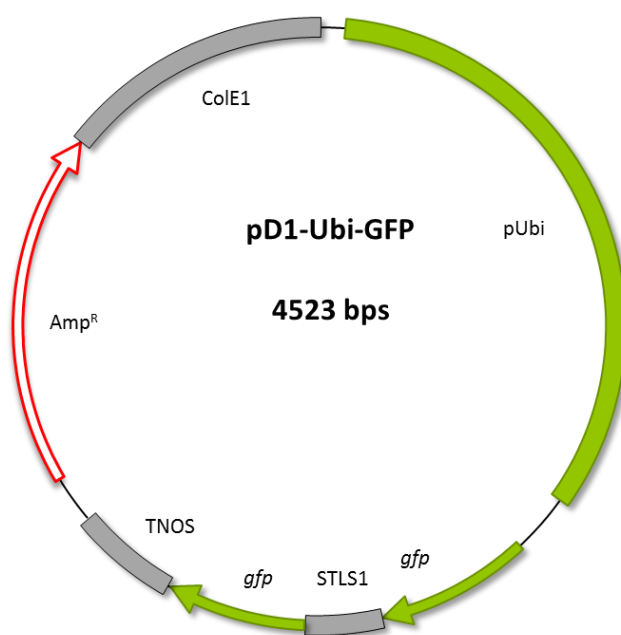


Abb. 4: Vektor zur Kontrolle biologischer Transformationen. pD1-Ubi-GFP enthält das *gfp*-Gen, unterbrochen vom STLS1-Intron zur Vermeidung einer Expression in Prokaryoten. Kontrolliert wird die Expression durch den Ubi1-Promotor (Christensen *et al.*, 1992) mit erstem Intron zur weiteren Verstärkung der Expression und NOS-Terminator. Grundresistenz ist Ampicillin. Über diesen Vektor erfolgte die Kontrolle der biologischen Transformationen, sowie die Visualisierung einer nicht organellspezifischen Expression in Pflanzenzellen.

2.1.4.4. p7i-UCre-GFP

Abb. 5 zeigt den Grundvektor für eine induzierbare Expression eines C-Terminal mit GFP fusionierten Proteins. Dieser Vektor basiert auf dem p7iM-Vektor (DNA Cloning Service, Hamburg) und trägt für die Selektion in Pflanzen das *bar*-Gen mit inseriertem STLS1-Intron (Vancanneyt *et al.*, 1990) unter Kontrolle des CaMV-35S-Promotors und 35S-Terminators, den pVS1-Ori als Replikationsursprung in Agrobakterien, den ColE1-Ori als Replikationsursprung in *E. coli*, sowie das *aadA*- (Streptomycin/Spectinomycin

2. Material und Methoden

Adenylyltransferase) Gen für eine Spectinomycin-Resistenz. An den Ubi1-Promotor aus Mais (Christensen *et al.*, 1992) schließt sich eine induzierbare Cre-Rekombinasekassette an, die den Promotor von einem *gfp-Gen* trennt. Diese Aktivierungskassette besteht aus dem GmHSP17.5E-Promotor (Czarnecka *et al.*, 1985), dem *cre*-Gen mit STLS1-Intron und dem OCS-Terminator und wird von zwei parallelen *loxP*-Sequenzen begrenzt. Diese sind so angeordnet, dass bei erfolgreicher Hitzeaktivierung des Promotors (bei 42°C), das *cre*-Gen exprimiert wird und die Aktivität dieses Enzyms zu einer Exzision der gesamten HSP/Cre-Kassette führt. Dadurch erfolgt eine neue Anordnung des *gfp-Gens* gleich hinter den Ubi1-Promotor, was zu einer starken konstitutiven Expression von GFP führt. Eine *loxP*-Sequenz verbleibt bei der Exzision im Konstrukt.

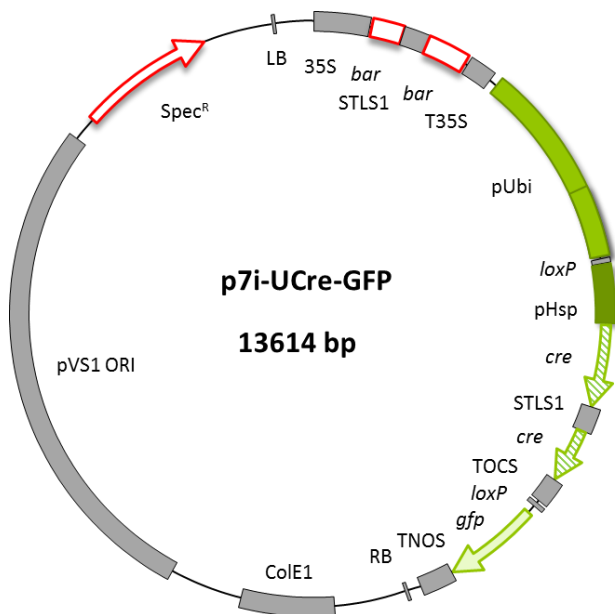


Abb. 5: Grundbinärvektor für die Agrobakterien vermittelte Maistransformation mit C-terminaler Fusion von GFP an das *Gene of interest* (GOI). Die Selektion in Pflanzen erfolgt durch eine Basta®-Resistenz vermittelt durch das *bar*-Gen unter Kontrolle des 35S-Promotors. Die Selektion in Prokaryoten erfolgt über eine Spectinomycinresistenz (*aadA*-Gen). Das Konstrukt wird durch eine Hitzebehandlung über den GmHSP17.5E-Promotor aktiviert. Im nicht aktivierten Zustand liegt die Aktivierungskassette aus HSP-Promotor, dem *cre*-Gen unterbrochen vom STLS1-Intron und dem Octopin-Synthase-Terminator flankiert von zwei parallel angeordneten *loxP*-Sequenzen zwischen Ubi1-Promotor und *gfp-Gen*. Nach Aktivierung erfolgt die Exzision der Kassette durch die Aktivität der Cre-Rekombinase. Der Ubi1-Promotor ist nun direkt vor dem GOI und dem *gfp-Gen* angeordnet. Es verbleibt eine *loxP*-Sequenz zwischen Promotor und dem offenen Leserahmen von GOI und *gfp-Gen*.

2.1.4.4.1. p7i-UCre-ZmPrx01-GFP (14700 bp)

Expressionsvektor aus dem Grundvektor p7i-UCre-GFP abgeleitet, in welchem das *zmprx01*-Gen (aus Maislinie Hi-II A x Hi-II B isoliert) C-terminal mit dem *gfp-Gen* fusioniert ist. Auch hier führte die Hitzeaktivierung zu einer konstitutiven Expression des Fusionsproteins

kontrolliert durch den Ubi1-Promotor. In Abb. 6 ist das Konstrukt vor und nach der Hitzeschockaktivierung dargestellt.

2.1.4.4.2. p7i-UCre-ZmPrx70-GFP (14562 bp)

Ebenfalls aus dem Grundvektor p7i-UCre-GFP abgeleitetes Konstrukt in dem das *zmp70*-Gen (aus Maislinie Hi-II A x Hi-II B isoliert) C-terminal mit dem *gfp-Gen* fusioniert ist. Auch hier führt die Hitzeaktivierung zu einer Kontrolle des Fusionsproteins durch den Ubi1-Promotor (siehe Abb. 79).

2.1.4.4.3. p7i-UCre-ZmPrx66-GFP (14559 bp)

Aus dem Grundvektor p7i-UCre-GFP abgeleitetes Konstrukt in dem das *zmp66*-Gen (aus Maislinie Hi-II A x Hi-II B isoliert) C-terminal mit dem *gfp-Gen* fusioniert ist. Auch hier führt die Hitzeaktivierung zu einer Kontrolle des Fusionsproteins durch den Ubi1-Promotor (siehe Abb. 80).

2.1.4.4.4. p7i-ZmPrx01-GFP (12699 bp)

Expressionsvektor aus dem Vektor p7i-UCre-ZmPrx01-GFP durch *in vitro* Rekombination mit einer Cre-Rekombinase erzeugtes Konstrukt. Die Aktivierungskassette wurde durch die Rekombination bis auf eine der *loxP*-Sequenzen entfernt. Dieses ermöglicht eine konstitutive Expression des Fusionsproteins ohne vorhergehende Hitzeschockbehandlung.

2.1.4.4.5. p7i-ZmPrx70-GFP (12561 bp)

Aus dem Expressionsvektor p7i-UCre-ZmPrx70-GFP durch *in vitro* Rekombination erzeugtes Konstrukt, welches ohne vorhergehende Hitzeschockaktivierung eine konstitutive Expression des *zmp70:gfp*-Gens ermöglicht.

2.1.4.4.6. p7i-ZmPrx66-GFP (12558 bp)

Durch *in vitro* Rekombination aus p7i-UCre-ZmPrx66-GFP erzeugtes Konstrukt, welches ohne Induktion mit einem Hitzeschock zur kontinuierlichen Expression des *zmp66:gfp*-Gens führt.

2. Material und Methoden

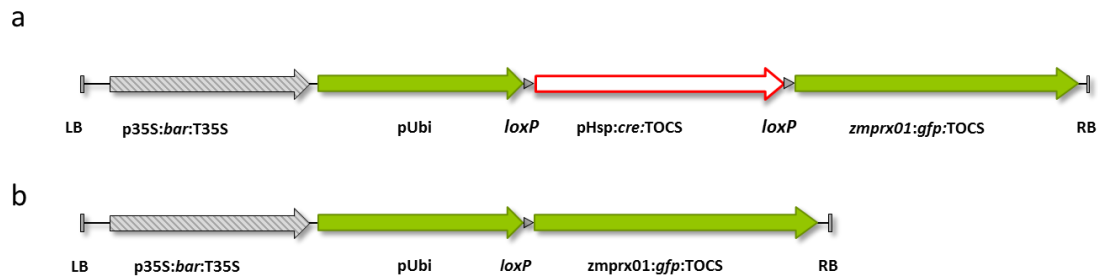


Abb. 6: Binärkonstrukt zur Expression eines ZmPrx01-GFP-Fusionsproteins in Mais. a: Konstrukt vor der Aktivierung mit Bastia®-Kassette, Aktivierungskassette sowie Ubi1-Promotor und zmprx01:gfp-Fusion. b: Nach der Hitzeschockaktivierung rückt der Ubiquitin-Promotor vor das Peroxidasegen und kontrolliert die Expression des Fusionsproteins. Nach der Exzision verbleibt eine *loxP*-Sequenz zwischen Promotor und Peroxidasegen.

2.1.4.4.7. pUbi-ZmPrx01-GFP-IMa (5155 bp)

Expressionsvektor für transiente Expression einer Fusion des *zmprx01*-Gens mit dem *gfp*-Gen basierend auf dem pUC-Vektor p1U (DNA Cloning Service, Hamburg). Bei dieser Fusion liegt das *gfp*-Gen mittig umschlossen von den 5'- und 3'-Regionen des *zmprx01*-Gens, getrennt von Linker-Sequenzen mit der AS Abfolge GSAGSAAGSG (Waldo *et al.*, 1999), um eine sterische Behinderung zu vermeiden. Die Teilung des *zmprx01*-Gens in zwei Abschnitte führt zu einer Inaktivierung des Gens. Die Expression wird durch den Ubi1-Promotor (Christensen *et al.*, 1992) kontrolliert, begrenzt wird das Konstrukt durch den NOS-Terminator (siehe Abb. 7).

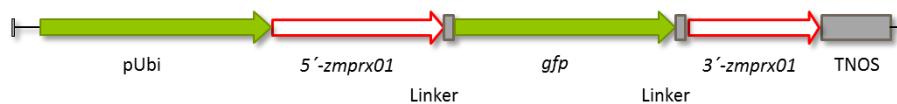


Abb. 7: Konstrukt einer ZmPrx01-GFP Fusion ohne eine Maskierung von N- oder C-Terminus mit einer mittelständigen Anordnung von GFP. In der Sequenz von ZmPrx01 fanden sich Hinweise auf ein vorhandenes C-terminales Signalpeptid. Um beide Abschnitte des Proteins unmaskiert zu lassen, wurde eine Anordnung des *gfp*-Gens innerhalb der Peroxidasegens vorgenommen. Um die Funktion des Fluorophors zu erhalten wurden kurze Linker-Sequenzen eingefügt (Waldo *et al.*, 1999). Die Expression wird auch in diesem Konstrukt vom Ubi1-Promotor aus Mais kontrolliert.

2.1.4.4.8. pUbi-ZmPrx01-GFP-IMb (4526 bp)

Im Aufbau ähnlich wie pUbi-ZmPrx01-GFP-IMa, jedoch sind die Bereiche des *zmprx01*-Gens bis auf jeweils 135 Nukleotide am C- und N-Terminus reduziert, um das Signalpeptid komplett abzudecken, sterische Behinderungen jedoch zu reduzieren. Um die Leitungsfähigkeit des Fluorophores nicht zu mindern wurden kurze Linker-Sequenzen mit der

AS-Abfolge GSAGSAAGSG (Waldo *et al.*, 1999) eingefügt. Auch in diesem Konstrukt sorgt der Ubi1-Promotor für eine starke, konstitutive Expression (siehe Abb. 8).

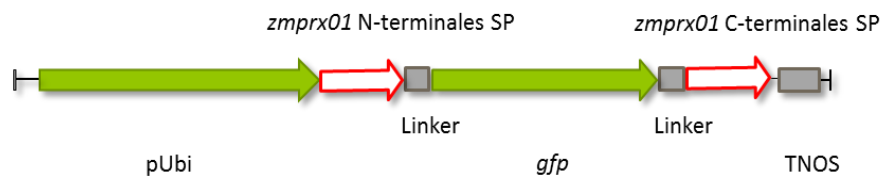


Abb. 8: Weiteres Konstrukt zur Expression einer ZmPrx01-GFP-Fusion mit mittelständiger Anordnung von GFP. In diesem Konstrukt wurden die Anteile an Peroxidasesequenz an C- und N-Terminus deutlich reduziert, um sterische Behinderungen weiter zu reduzieren. Die Länge wurde jeweils auf 45 Aminosäuren bzw. 135 Nukleotide reduziert. Auch in diesem Konstrukt wurden Linkersequenzen zwischen GFP und N- und C-Terminus verwendet, um die Funktion des Fluorophors sicherzustellen.

2.1.4.5. Marker für Co-Lokalisationsstudien

Zur genauen Evaluierung der subzellulären Lokalisation wurden Markerproteine verschiedener Zellorganellen verwendet. Als Marker des sekretorischen Weges wurde ein ER-Marker ER-rk CD3-957 (Nelson *et al.*, 2007), bestehend aus dem Signalpeptid der *Arabidopsis thaliana* wall-associated kinase 2 (AtWAK2) (He *et al.*, 1999) am N-terminus und einem ER-Retentions-Signal (His-Asp-Glu-Leu; HDEL) (Gomord *et al.*, 1999) am C-terminus von mCherry (Shaner *et al.*, 2004), verwendet. Der Golgi-Marker G-rk CD967 (Nelson *et al.*, 2007) basiert auf dem cytoplasmatischen Teil und der transmembranen Domäne (erste 49 Aminosäuren) von GmMAN1 (Soybean α -1,2-mannosidase I) (Saint-Jore-Dupas *et al.*, 2006) und mCherry (Shaner *et al.*, 2004).

Zur Abbildung eines PM-Signals wurde ein Konstrukt aus den ersten 24 Aminosäuren von ZmPTI1a (*Ptointeracting 1a*) (Herrmann *et al.*, 2006) fusioniert mit GFP verwendet (Myr-GFP).

2.1.4.6. Homologe Expression

2.1.4.6.1. p7i-UCre-ZmPrx01 (13944 bp)

Expressionsvektor für die induzierbare Überexpression eines Gens unter Kontrolle des Ubi1-Maispromotors mit erstem Intron (Christensen *et al.*, 1992). Das Design leitet sich vom p7iM-Vektor (DNA Cloning Service, Hamburg) ab und trägt das *bar*-Gen mit inseriertem STLS1-Intron (Vancanneyt *et al.*, 1990) unter Kontrolle des CaMV-35S-Promotors und dem 35S-Terminator, den pVS1-Ori als Replikationsursprung in Agrobakterien, den ColE1-Ori als

2. Material und Methoden

Replikationsursprung in *E. coli*, sowie das Gen für die Streptomycinresistenz. Auch in diesem Konstrukt befand sich eine Aktivierungskassette aus dem GmHSP17.5E-Promotor (Czarnecka *et al.*, 1985), dem *cre*-Gen mit STLS1-Intron (Vancanneyt *et al.*, 1990) und dem OCS-Terminator und wurde von zwei parallelen *loxP*-Sequenzen begrenzt. Wurde der HSP-Promotor aktiviert, erfolgte nach Expression der Cre-Rekombinase eine Exzision der gesamten Aktivierungskassette und der vor der Kassette angeordnete Ubi1-Promotor aus Mais (Christensen *et al.*, 1992) wurde vor dem *zmprx01*-Gen angeordnet, was zu einer starken kontinuierlichen Expression führte. Eine der *loxP*-Sequenzen verblieb zwischen Promotor und Peroxidasegen. Abb. 9 fasst den Aufbau und die Rekombination zusammen.

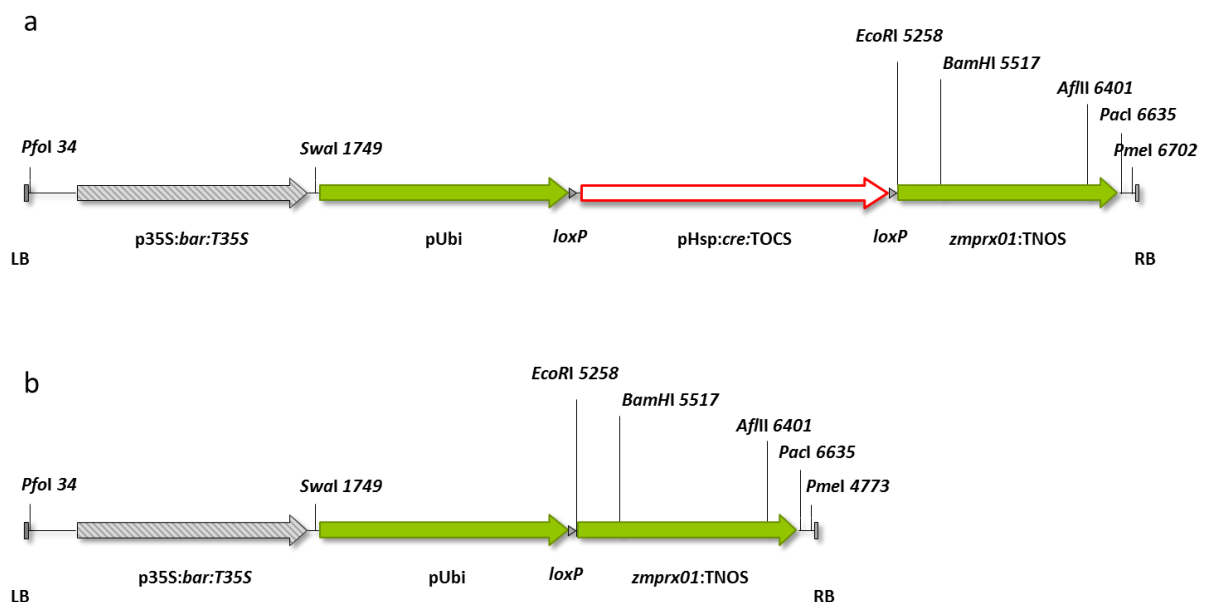


Abb. 9: Rekombination des induzierbaren Überexpressionskonstruktes p7i-UCre-ZmPrx01. a. Nichtaktivierte Expressionskassette vor der Rekombination. Der grundsätzliche Aufbau gleicht den entsprechenden Fusionskonstrukten. Der Mechanismus der Rekombination ist unter Abb. 8 beschrieben. b. Rekombinierte Expressionskassette nach erfolgter Exzision der Aktivierungskassette. Diese Anordnung ist in aktivierten Pflanzen zu finden.

2.1.4.6.2. p7i-UCre-ZmPrx70 (13806 bp)

Der Expressionsvektor entspricht im Aufbau dem Vektor p7i-UCre-ZmPrx01, als Gen für die Fusion mit *gfp* wird in diesem Konstrukt das Peroxidasegen *zmprx70* eingesetzt (siehe Abb. 81).

2.1.4.6.3. p7i-Ucre-ZmPrx66 (13803 bp)

Der Expressionsvektor entspricht im Aufbau dem Vektor p7i-UCre-ZmPrx01, als Gen für die Fusion mit *gfp* wird in diesem Konstrukt das Peroxidasegen *zmpix66* eingesetzt (siehe Abb. 82).

2.1.4.7. Heterologe Expression

2.1.4.7.1. pPICZ α A-ZmPrx01 (4639 bp)

Für die Herstellung rekombinanter Proteine wurde das EasySelect™ *Pichia* Expression Kit (Invitrogen, Carlsbad, USA) verwendet. Als Grundvektor diente pPICZ α A. Dieser Vektor beinhaltet das *sh ble*-Gen unter Kontrolle des EM7- und TEF1-Promotors, was in Bakterien bzw. Hefen eine Zeocin Resistenz vermittelt. Als Terminator diente CYC1 aus *Saccharomyces cerevisiae*. Für die Replication in *E. coli* befand sich ein pUC-Replikationsursprung auf dem Plasmid. Für die Integration in das *Pichia*-Genom und Induktion der Expression befindet sich Upstream der *Multiple Cloning Site* (MCS) ein 942 bp großes Fragment aus dem 5' Bereich des AOX1-Lokus mit dem vollständigen AOX1-Promotor. Es folgte das α -Faktor-Signalpeptid aus *Saccharomyces cerevisiae* für die Sekretion des GOI und schließlich die *Multiple Cloning Site*. Nach dieser folgte ein *c-myc-Tag* (Aminosäure Abfolge: Glu-Gln-Lys-Leu-Ile-Ser-Glu-Glu-Asp-Leu-Asn) für die Detektion des Rekombinanten Proteins und ein 6x Histidin-*Tag* für die Aufreinigung über eine Ni²⁺-NTA (Nickel-Nitrilotriessigsäure)-Affinitätschromatographie. Als Terminator dient der AOX1-Terminator aus *P. pastoris*.

Das *zmpix01*-Gen wurde über die *Multiple Cloning Site* so integriert, dass sich ein offener Leserahmen vom α -Faktor-Signalpeptid bis zum 6x Histidin-*Tag* ergab. In diesem Konstrukt erfolgte die Integration des kompletten Gens mit nativem 5'-Signalpeptid (siehe Abb. 10).

2.1.4.7.2. pPICZ α A-ZmPrx70 (4531 bp)

Vektor für die rekombinante Produktion von ZmPrx70. Der Aufbau unterscheidet sich nicht vom Vektor pPICZ α A-ZmPrx01, in diesem Konstrukt wurde jedoch die komplette kodierende Sequenz des *zmpix70*-Gens eingesetzt (siehe Abb. 86).

2. Material und Methoden

2.1.4.7.3. pPICZ α A-ZmPrx66 (4528 bp)

Vektor für die rekombinante Produktion von ZmPrx66. Der Aufbau unterschied sich nicht vom Vektor pPICZ α A-ZmPrx01, in diesem Konstrukt wurde jedoch die komplette kodierende Sequenz des *zmprx66*-Gens eingesetzt (siehe Abb. 87).

2.1.4.7.4. pPICZ α A-ZmPrx01-SP (4540 bp)

Konstrukt für die Expression des *zmprx01*-Gens ohne das native Signalpeptid/die transmembrane Domäne. Dabei war das Gen um die ersten 99 Nukleotide deletiert und direkt mit dem α -Faktor Signalpeptid am 3'-Ende fusioniert. Der Aufbau des Vektorrückgrates unterschied sich nicht vom Vektor pPICZ α A-ZmPrx01 (siehe Abb. 10).

2.1.4.7.5. pPICZ α A-ZmPrx70-SP (4441 bp)

Konstrukt für die Expression des *zmprx70*-Gens ohne das native Signalpeptid/die transmembrane Domäne. Dabei war das Gen um die ersten 75 Nukleotide deletiert und direkt mit dem α -Faktor Signalpeptid am 3'-Ende fusioniert. Der Aufbau des Vektorrückgrates unterschied sich nicht vom Vektor pPICZ α A-ZmPrx70 (siehe Abb. 86).

2.1.4.7.6. pPICZ α A-ZmPrx66-SP (4456 bp)

Konstrukt für die Expression des *zmprx66*-Gens ohne das native Signalpeptid/die transmembrane Domäne. Dabei war das Gen um die ersten 87 Nukleotide deletiert und direkt mit dem α -Faktor-Signalpeptid am 3'-Ende fusioniert. Der Aufbau des Vektorrückgrates unterschied sich nicht vom Vektor pPICZ α A-ZmPrx66 (siehe Abb. 87).

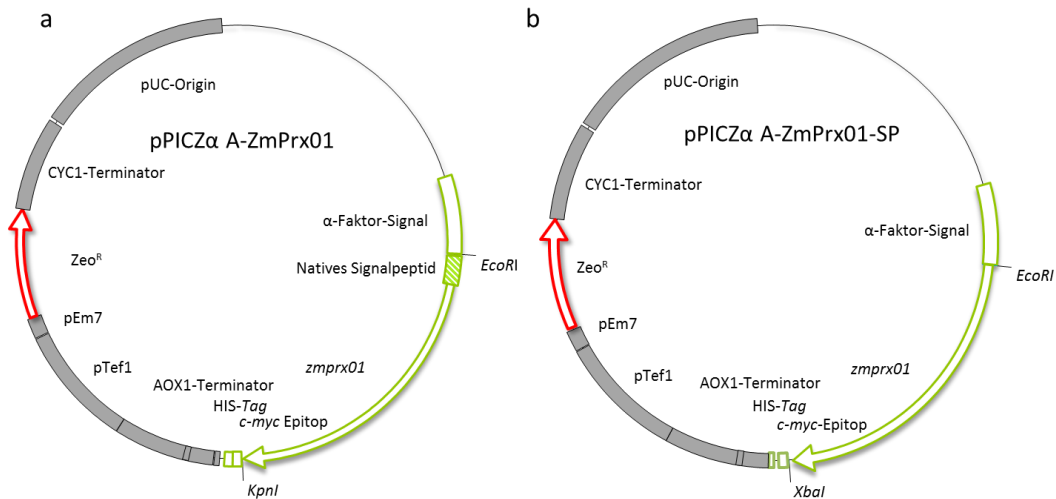


Abb. 10: Vektorkarten der verwendeten Plasmide für die rekombinante Produktion von ZmPrx am Beispiel ZmPrx01. **a:** Über Restriktionsschnittstellen der Enzyme *EcoRI* und *KpnI* wurde die komplette kodierende Sequenz von ZmPrx01 in die MCS (*Multiple cloning site*) eingefügt. Dies führte zur N-terminalen Verknüpfung mit der α -Faktor-Signalsequenz und C-terminal zum Anfügen eines *c-myc*-Epitopes und eines Histidin-Tags. Bei diesem Konstrukt bleibt das native Signalpeptid und somit auch die putative Membrandomäne erhalten **b:** Der Aufbau des zweiten Konstruktes ist grundlegend gleich, es wurde jedoch das N-terminale Signalpeptid entfernt und das deletierte *zmprx01*-Gen über die Restriktionendonukleasen *EcoRI* und *XbaI* eingefügt.

2.1.5. Oligonukleotide

Tab. 1: Zur Amplifikation und Klonierung von *zmprx*-Genen verwendete Oligonukleotide.

Name	Sequenz	Ziel
ZmPrx01F	GCTCAGTACACAGCTAGG	Amplifikation des <i>zmprx01</i> -Gens
ZmPrx01R	AGACTGGTATGCGAGCTA	
ZmPrx70F	TCAACGGTGTAGCAGTAG	Amplifikation des <i>zmprx70</i> -Gens
ZmPrx70R	CAACCGGCCTTATTACAG	
ZmPrx66F	GTCGAGATCGAGCATAAG	Amplifikation des <i>zmprx66</i> -Gens
ZmPrx66R	GGCGTAGTAGTTTACGAG	
p1F3mit	GCGCGGAATTCATGGCTAAGGAAAGCAAGCTAACGGCCGGAGT G	Insertion in pPICZα A
p1R6mit	TCTAGACGGCTCGCGGCGTAGCCCTCTTCACC	
p2F2mit	GCGCAGGAATTCATGGCTTCTTCTTTACTTCTCTTG	
p2R3mit	GCGCAGGTACCGCGTTGACCCTGGAGCAGGCGCGCCTG	Insertion in pPICZα A
p3F2mit	GCGCAGGAATTCATGGCGCCTCTGTTTCTGCCTC	
p3R3mit	GCGCAGGTACCGCCGAGTTGAGCTTCCAGCAG	
p1F1SPmit	GAATCCAGTCCGGGTGGGATTCTACGACACCAG	Deletion des Signalpeptides aus <i>zmprx01</i>
p2F1SPmit	GAATCCAAGTGCGCCGACATTTACTCCAGG	Deletion des Signalpeptides aus <i>zmprx70</i>
p3F1SPmit	GAATCCAGTCTCGTTCGACGTTCTACG	Deletion des Signalpeptides aus <i>zmprx66</i>
5' AOX SEQ	GACTGGTTCCAATTGACAAGC	Sequenzierung von pPICZα A
3' AOX SEQ	GCAAATGCATTCTGACATCC	
GAP1	AGGGTGGTGCCAAGAAGGTTG	mRNA Validierung
GAP2	GTAGCCCCACTCGTTGTCGTA	

2. Material und Methoden

2.1.6. Antikörper

2.1.6.1. Nachweis nativer Proteine

Für die Detektion nativer Peroxidasen wurden polyklonale Peptidantikörper aus der IgG-Fraktion aus Kaninchen der Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) verwendet:

ZmPrx01: für die Immunisierung verwendetes Peptid: H₂N- GGQTERDALPNNPSL -CONH₂

ZmPrx70: für die Immunisierung verwendetes Peptid: H₂N- TYASTPRRFSRDFAA -CONH₂

ZmPrx66: für die Immunisierung verwendetes Peptid: H₂N- RSGVNSAVRQEPRVG -CONH₂

Für die Detektion des primären Antikörpers wurden polyklonale Anti-Rabbit IgG HRP Konjugat Antikörper (Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland) aus Ziege verwendet.

2.1.6.2. Nachweis rekombinanter Proteine

Der Nachweis der rekombinanten Proteine im *Western Blot* erfolgte mit einem Anti-myc-HRP Antikörper der Firma Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland). Das entsprechende Epitop (Glu-Gln-Lys-Leu-Ile-Ser-Glu-Glu-Asp-Leu-Asn, basiert auf *c-myc* (Evan *et al.*, 1985)) wurde C-terminal mit dem Protein fusioniert.

2.1.7. Medien

Alle Medien wurden, sofern nicht anders angegeben, bei 121°C und 2×10^5 Pa für 20 min autoklaviert. Hitzeempfindliche Medien wurden sterilfiltriert. Selektionsmedien wurden nach Abkühlen auf unter 60°C mit dem entsprechenden Antibiotikum (Ampicilin 100mg/l, Spectinomycin 100 mg/l, Tetracyclin 10 mg/l, Kanamycin 50 mg/l, Zeocin 25-2000 mg/l) oder dem Herbizid Glufosinat (Busta®, 1,5 oder 3 mg/l) versetzt. Entsprechende Festmedien wurden mit 1,5 % (*E. coli*) oder 2 % (*P. pastoris*) Agar oder mit 0,6 % Gelrite® bzw. Phytigel® versetzt.

2.1.7.1. Hydrokulturmedium für die Maisanzucht

Für die Ernte von Maiswurzeln im Bereich von 3 bis 14 Tagen wurde eine hydroponische Kultur verwendet. Dazu wurden je nach Menge der benötigten Pflanzen Kunststoffgefäße mit gelochtem Deckel mit 3 oder 9 l Volumen eingesetzt. Drei Tage alte Maiskeimlinge

wurden dann über diesen Löchern platziert und die Primärwurzel in das Medium geführt. Von außen wurden der Wurzelbereich und das Medium durch Aluminiumfolie abgedunkelt. Die Zusammensetzung des Kulturmediums lässt sich aus Tab. 2 entnehmen. Der pH-Wert des Mediums wurde mit KOH auf pH 5,5 eingestellt.

Tab. 2: Zusammensetzung des Mediums für die hydroponische Maiskultur

Salz	Konzentration
KNO_3	5,25 mM
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$	7,75 mM
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	4,06 mM
KH_2PO_4	1,0 mM
Fe (III)-EDTA	100 μM
H_3BO_4	46 μM
$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	9,18 μM
$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	5,4 μM
$\text{CuSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	9,0 μM
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	2,0 μM

2.1.7.2. Grundmedien für die Transformation von Mais

Die entsprechenden Lösungen wurden autoklaviert oder sterilfiltriert. Die Herstellung der Medien erfolgte zweifach konzentriert. Es wurde für die Herstellung von Festmedien mit dem entsprechenden Volumen an Gelrite™ (Duchefa Biochemie, Harleem, Niederlande) oder Phytigel™ (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) versetzt.

Tab. 5: Zusammensetzung der MS-Makrosalzlösung

MS-Makrosalzlösung (10x)	
NH_4NO_3	206 mM
KNO_3	187,9 mM
KH_2PO_4	12,5 mM
CaCl_2	29,9 mM
MgSO_4	15 mM

Tab. 4: Zusammensetzung der MS-Mikrosalzlösung

MS-Mikrosalzlösung (1000x)	
H_3BO_4	100 mM
MnSO_4	65 mM
ZnSO_4	20 mM
Na_2MoO_4	1 mM
CuSO_4	0,1 mM
CoCl_2	0,1 mM
KJ	4,8 mM

Tab. 3: Zusammensetzung von 2x MS-Medium

2x MS-Medium (Murashige und Skoog, 1962)	
MS-Makrosalz-Lösung (10x)	200 ml
Ms-Mikrosalz (1000x)	2 ml
MS-Vitamine (1000x)	2 ml
Fe/Na-EDTA (500x)	4 ml
Saccharose	40 g
ad 1000 ml Milli-Q-Wasser	pH 5,7
sterilfiltrieren	

2. Material und Methoden

Tab. 7: Zusammensetzung der Fe/Na-EDTA Lösung

Fe/Na-EDTA (500x)	
Na ₂ -EDTA	100 mM
FeSO ₄	100 mM

Tab. 6: Zusammensetzung der MS-Vitaminlösung

MS-Vitamine	
Thiamin-HCl	0,33 mM
Nikotinsäure	4 mM
Pyridoxin-HCl	2,43 mM
Glycin	26,6 mM

2.1.7.3. Medien für die Agrobakterien vermittelte Transformation von Mais

Tab. 8: Zusammensetzung verschiedener Medien zur Agrobakterium vermittelten Transformation von Mais

	Infektions- medium	Co- kultivierungs- medium	Resting- medium	Selektions- medium I/II	Regenerations- medium
N6-Medium (Chu <i>et al.</i>, 1975)	1x	1x	1x	1x	-
MS-Medium	-	-	-	-	1x
L-Prolin	6 mM	6 mM	6 mM	6 mM	-
Saccharose	200 mM	88 mM	200 mM	200 mM	88 mM
Glucose	200 mM	-	-	-	-
AgNO₃	-	7,5 µM	5 µM	5 µM	-
Cefotaxim	-	-	220 µM	220 µM	220 µM
Vancomycin	-	-	70 µM	70 µM	-
Glufosinat	-	-	-	17 µM / 34 µM	16 µM
2-(N-Morpholino)- ethansulfonsäure	-	-	2,5 mM	2,5 mM	-
myo-Inositol	-	-	-	-	0,5 mM
L-Cystein	-	2,5 µM	-	-	-
2,4-Dichlor- phenoxyessigsäure	-	10 µM	6,5 µM	6,5 µM / -	-
Acetosyringon	100 µM	100 µM	-	-	-
Silwett L-70	150 ppm	-	-	-	-
Phytigel™	-	-	0,6	0,6	-
Gelrite™	-	0,6	-	-	0,6
pH	5,2	5,8	5,8	5,8	5,8

2.1.7.4. Kulturmedien *Escherichia coli*

Für die Kultivierung von *E. coli* wurde in Abhängigkeit vom verwendeten Antibiotikum LB- (*Lysogeny broth*)-Medium mit verschiedenen Salzkonzentrationen verwendet. Als Standard diente Medium mit einer NaCl-Konzentration von 10g/l (Miller, 1972), bei salzsensitiven Antibiotika wie Zeocin wurde eine Konzentration von 5 g/l NaCl (Lennox, 1955) verwendet.

2.1.7.5. Kulturmedien *Agrobacterium tumefaciens*

Die Kultivierung von *Agrobacterium tumefaciens* erfolgte in YEB Medium. Für die Vorbereitung der Transformation erfolgte die Kultur in AB-Medium (Chilton *et al.*, 1974).

Tab. 10: Zusammensetzung von AB-Puffer

AB-Puffer 20 X	
K ₂ HPO ₄	60 g/l
NaH ₂ PO ₄	20 g/l
pH 7,0 mit KOH, steril filtrieren	

Tab. 11: Zusammensetzung von AB-Salzen

AB-Salze 20 X	
NH ₄ Cl	20 g/l
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	6 g/l
KCl	3 g/l
CaCl ₂	0,2 g/l
FeSO ₄ * 7 H ₂ O	50 mg/l
Autoklavieren	

Tab. 9: Zusammensetzung von AB-Medium

AB-Medium	
AB Puffer 20 X	10 ml
AB Salze 20 X	10 ml
100 mM Glukose	100 ml
H ₂ O	80 ml

Tab. 12: Zusammensetzung von YEB-Medium

YEB-Medium	
Hefeextrakt	1 g/l
Fleischextrakt	5 g/l
Pepton	5 g/l
MgCl ₂	0,5 g/l

2. Material und Methoden

2.1.7.6. Kulturmedien *Pichia pastoris*

2.1.7.6.1. Grundmedien

Die generelle Kultivierung von *Pichia pastoris* und die Erzeugung von kompetenten Zellen erfolgte in YPD- (Yeast Peptone Dextrose)-Vollmedium. Nach der Transformation erfolgte die Selektion von positiven, Zeocin®-resistenten Klonen in YPDS-(Yeast Peptone Dextrose Sorbitol)-Medium.

2.1.7.6.2. Produktion rekombinanter Proteine

Für die Produktion rekombinanter Peroxidasen wurden verschiedene Medien eingesetzt und laut den Angaben im EasySelect™ *Pichia* Expression Kit (Life Technologies, Carlsbad, USA) hergestellt. Für die Bestimmung des *methanol utilizing phenotypes* wurden Minimal-Dextrose- und Minimal-Methanol-Medium (MD und MM) eingesetzt. Für die Erzeugung von Biomasse vor der Induktion der ZmPrx_{rec}-Expression wurde ein glycerolhaltiges Minimal- oder Komplexmedium eingesetzt, die Induktion der Expression erfolgte in einem Minimal- oder Komplexmedium mit verschiedenen Methanolkonzentrationen von 0,5 bis 4 % (v/v). Tab. 13 fasst die verwendeten Medien zusammen. Zusätzlich erfolgten Versuche mit der Zugabe von Intermediaten des Häm-Stoffwechsels (1 mM δ-ALA, 1 mM Vitamin B₁) sowie Spurenelementen (0,5 ml/l Spurenelemente Mix, (Morawski *et al.*, 2000)).

Tab. 13: Übersicht von in der Kultur von *Pichia pastoris* verwendeten Medien. Diese wurden nach Angaben des EasySelect™ *Pichia* Expression Kits (Life Technologies, Carlsbad, USA) hergestellt.

Medium	Beschreibung	Anwendung
YPD	Komplexes Vollmedium	Hälterung, Vermehrung
YPDS + Zeocin®	YPD mit Sorbitol und Zeocin®	Selektion von positiven Transformanten
MGY	Minimalmedium mit Glycerol	Biomasseproduktion vor Induktion
MD	Minimalmedium mit Glukose	Bestimmung des Mut-Phänotypes
MM	Minimalmedium mit Methanol	Bestimmung des Mut-Phänotypes
BMG	Gepuffertes Minimalmedium mit Glycerol	Biomasseproduktion vor Induktion
BMM	Gepuffertes Minimalmedium mit Methanol	Induktion der Expression
BMGY	Gepuffertes Komplexmedium mit Glycerol	Biomasseproduktion vor Induktion
BMMY	Gepuffertes Komplexmedium mit Methanol	Induktion der Expression

2.2. Methoden

2.2.1. Arbeiten mit Pflanzenmaterial

Die von Mika *et al.* (2008) ermittelten Sequenzen sollten in der Maislinie Hi-II A x Hi-II B bestätigt werden. Dazu wurden fünf Tage alte Keimlinge der reziproken Kreuzung von Hi-II A und Hi-II B geerntet und die Wurzeln entsprechend der Angaben unter 2.2.2.4 aufgeschlossen. Die Qualität der erhaltenen RNA wurde photometrisch und über eine Agarosegelelektrophorese bestimmt. Nach der cDNA-Synthese über oligo-dT-Primer erfolgte eine Test-PCR mit den Primern GAP1 und GAP2 zur Überprüfung der erhaltenen cDNA. Über PCR-Reaktionen mit Peroxidase spezifischen Primern über eine Polymerase mit *proof reading* Aktivität (*Pfu* DNA Polymerase; Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) wurden die entsprechenden Gene amplifiziert, in den Vektor pCR®-Blunt II-TOPO ligiert und anschließend sequenziert. Dabei wurde jeweils ein Pool aus 10 Keimlingen erstellt und verarbeitet, es erfolgten mindestens drei unabhängige Isolationen und Sequenzierungen.

2. Material und Methoden

2.2.1.1. Biolistische Transformation

Für die transiente Expression der verschiedenen Fusionsproteine in pflanzlichen Geweben wurde eine biolistische Transformation mit Hilfe von Goldpartikeln durchgeführt. Die Goldpartikel dienten als ballistischer Träger der Plasmid-DNA und brachten diese in die Pflanzenzelle ein.

Für die Goldsuspension wurde eine Stammlösung von 40 mg Gold (0,4-0,8 µm Durchmesser, Heraeus, Hanau, Deutschland) in 1 ml absolutem Ethanol aufgenommen und anschließend für 30 s in einem Ultraschallbad bei maximaler Intensität behandelt, um Aggregate aufzulösen. Dann wurde der Ansatz für 10 s bei 4200 xg zentrifugiert, der Überstand verworfen und wieder in 1 ml absolutem Ethanol resuspendiert. Dieses Vorgehen wurde dreimal wiederholt und anschließend erneut mit sterilem Wasser durchgeführt. Aliquotiert in 50 µl Portionen diente diese Goldsuspension als Lösung für die Beschichtung mit Plasmid-DNA. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

Für die Beschichtung der Partikel mit DNA wurde maximal 5 µl (oder etwa 1 µg DNA) zu der Goldsuspension zugefügt und kurz gemischt. Dann erfolgte die Zugabe einer Mischung von 50 µl 2,5 M CaCl₂ und 20 µl 0,1 M Spermidin, verbunden mit gründlichem Mischen. Diese Mischung wurde nun 15 min auf Eis inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde dreimal in 250 µl absolutem Ethanol gewaschen und, in Abhängigkeit von der gewünschten Partikelkonzentration, in verschiedenen Mengen absolutem Ethanol aufgenommen. Das Volumen zur Resuspension betrug für die Transformation von Maisembryonen 240 µl und für Zwiebelepidermis und Maiswurzeln 120 µl.

Für die biolistische Transformation wurde verschiedenes Pflanzenmaterial verwendet. Für die Expression im homologen System wurden fünf Tage alte Maiskeimlinge (Mais Inzuchtlinie Hi-II A x Hi-II B) verwendet. Das entsprechende Saatgut wurde 4 h in Wasser vorgequollen und dann zwischen feuchtem Keimpapier in 90 mm Petrischalen fünf Tage lang bei 26°C im Dunkeln inkubiert. Versuche im heterologen System erfolgten in Epidermiszellen von Frühlingszwiebeln (*Allium fistulosum* L.).

Die Maiskeimlinge wurden direkt ohne weitere Aufarbeitung in der biolistischen Transformation eingesetzt und nach der Transformation für etwa 12-24 h bei 26°C inkubiert. Erste Versuche der Transformation erfolgten an Embryonen der Inzuchtlinie A 188 14 Tage nach der Bestäubung. Dazu wurden die Embryonen steril aus dem Korn präpariert und mit

dem Skutellum nach unten auf MS-Medium (siehe Tab. 3) aufgebracht. Nach der Transformation wurden die Embryonen 12-24 h inkubiert.

Epidermiszellen wurden frisch vor der Transformation präpariert. Es wurden innere Schichten ohne Pigmente verwendet. Die Epidermis wurde entweder direkt im Verbund mit der Zwiebelschuppe transformiert, oder unmittelbar vor der biolistischen Transformation präpariert und mit der Unterseite auf MS-Medium aufgebracht. Auch hier erfolgte eine Inkubation von 12-24 h.

Der Partikelbeschuss erfolgte mit der Partikelkanone PDS 1000/He (Biorad, München, Deutschland) unter Einsatz von 4 µl der hergestellten Goldsuspension. Der verwendete Gasdruck wurde dem Gewebe entsprechend angepasst. Mais-Embryonen und Epidermiszellen wurden mit einem Gasdruck von 1100 psi (75,84 bar) und Maiswurzeln mit 1350 psi (93,08 bar) beschossen.

Nach der Inkubation wurde die biolistische Transformation an einer UV-Lupe (Olympus MVX 10®, Hamburg, Deutschland) oder einem CLSM (*confocal laser scanning microscope*, LSM780, Zeiss, Oberkochen, Deutschland oder SP6, Leica, Wetzlar, Deutschland) ausgewertet. Sofern die Konstrukte eine hitzeinduzierbare Cre-Rekombinasekassette enthielten, erfolgte eine einmalige Hitzeschockbehandlung für 6 h bei 42°C und das Analysieren der transformierten Gewebe erfolgte nach einer etwa 16 stündigen Regenerationsphase.

2.2.1.2. Agrobakterium vermittelte Mais-Transformation

Für die Transformation unreifer Maisembryonen wurde der *Agrobacterium tumefaciens* Stamm LBA4404 (Ooms *et al.*, 1982) verwendet. Für die Transformation wurden reziproke Kreuzungen der Mais-Inzuchtlinien Hi-II A x Hi-II B verwendet. Die Ernte der Embryonen erfolgte 11 Tage nach der Bestäubung unter sterilen Bedingungen in Infektionsmedium (Tab. 8). Nach der Transformation mit dem entsprechenden Binärvektor wurden die Agrobakterien in 30 ml AB-Medium (Chilton *et al.*, 1974) supplementiert mit Spectinomycin (100 µg/ml), Tetracyclin (10 µg/ml) und Acetosyringon (100 µM) bei 28°C und 220 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 bis 0,8 inkubiert und durch Zentrifugation bei 5000 xg für 5 min sedimentiert. Nach einmaligem Waschen in 10 mM MgCl₂ wurden die Zellen in Infektionsmedium (siehe Tab. 8) resuspendiert und die optische Dichte auf 0,5 eingestellt.

Diese Bakteriensuspension wurde für die Infektion der Embryonen eingesetzt. Dazu wurden die frisch isolierten Maisembryonen in der Bakteriensuspension aufgenommen und für 5 min

2. Material und Methoden

inkubiert. Anschließend wurde die Suspension auf Cokultivierungsmedium (siehe Tab. 8) überführt. Nach dem Verdunsten der Flüssigkeit folgte eine Inkubation bei 21°C über Nacht. Die Embryonen wurden einmal gewendet, auf neues Cokultivierungsmedium übertragen und weitere 24 h inkubiert.

Es folgte die Überführung der Embryonen auf Restingmedium (siehe Tab. 8), die Achse wurde in diesem Schritt nach unten ausgerichtet. Nach einer Inkubationszeit von einer Woche wurden die Embryonen auf Keimung kontrolliert und austreibendes Gewebe entfernt. Das verbleibende vitale Skutellumgewebe wurde auf Selektionsmedium (siehe Tab. 8) überführt und die Selektion von transgenem Gewebe durch die Zugabe von 17 µm Glufosinat gestartet. Nach weiteren zwei Wochen wurden sich entwickelnde Kallusstrukturen auf Selektionsmedium (siehe Tab. 8) mit einem Gehalt von 34 µm Glufosinat überführt um den Selektionsdruck zu verstärken. Nach etwa 4 Wochen, bzw. bei erkennbarer Differenzierung von Pflanzengeweben wurde das Kallusgewebe auf Regenerationsmedium (siehe Tab. 8) in eine Lichtklimakammer (24°C, 16 h Licht, 25 kLux/h) überführt. Wurde ausreichend Blatt und Wurzelgewebe regeneriert, erfolgte ein Wechsel von Petrischalen auf Magentadosen. Während der *in vitro* Kultur wurde regelmäßig absterbendes Gewebe aus den Kulturen entfernt. Nach Bildung eines ausreichenden Wurzelapparates wurden die jungen Pflanzen in ein Gewächshaus überführt und dort in Aussaaterde, durch Abdecken mit einer lichtdurchlässigen Haube, unter hoher Luftfeuchtigkeit weiterkultiviert. Anschließend erfolgte eine weitere Selektion mit Basta®-Lösung (300 mg/ml). Dazu wurden die Pflanzen dreimal im Abstand von einem Tag mit Basta® besprüht. So selektierte Pflanzen wurden weiter molekularbiologisch über *Southern Blot* bezüglich Insertion des Transgenes und Klonalität untersucht.

2.2.1.3. Hitzeschockaktivierung transgener Pflanzen

Je 10 Körner einer Maislinie wurden für 4 h mit Leitungswasser überschichtet und so rehydriert. Es folgte eine Oberflächensterilisierung für 20 min in einer wässrigen Lösung mit 2 % Natriumhypochlorid (NaOCl) und 0,1 % Mucasol (Merz GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland). Nach dreimaligem Waschen mit sterilem Milli-Q-Wasser wurden die Samen zwischen feuchtem Whatman®-Papier (Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland) in Petrischalen zwei Tage bei 21°C inkubiert. Es folgten ein sechsständiger Hitzeschock bei 42°C und eine anschließende Regeneration über Nacht bei 21°C. Diese Prozedur aus Hitzeschock

und Regeneration wurde viermal wiederholt und die Keimlinge anschließend ins Gewächshaus, für eine Kultur in Erde, oder in eine Klimakammer, für die hydroponische Kultur, überführt. Die Pflanzen wurden erneut mit Basta® selektiert und anschließend auf die Expression von GFP untersucht.

2.2.2. Molekularbiologische Methoden

Sämtliche molekular biologischen Arbeiten orientierten sich, sofern nicht anders angegeben, nach Sambrook (Sambrook *et al.*, 1989). Dazu zählen Methoden wie DNA-Extraktion und Fällung, Restriktionen, Ligationen sowie Polymerase-Ketten-Reaktionen. Verwendete Enzyme und Kits wurden entsprechend den Vorgaben des Herstellers verwendet. DNA Sequenzierungen wurden durch die Firma Eurofins (Ebersberg, Deutschland) durchgeführt.

2.2.2.1. Verwendete Kits

2.2.2.1.1. RNA Isolation

peqGold TriFast™ (PEQLAB, Erlangen, Deutschland)

2.2.2.1.2. Erststrangsynthese

First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)

2.2.2.1.3. Plasmidisolation

AveGene High-Speed Plasmid Mini/Midi Kit (Pacific Image Electronics Co., Ltd, New Taipei, Taiwan)

NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland)

NucleoBond® Xtra Midi (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland)

2.2.2.1.4. Klonierung von PCR Fragmenten

CloneJET PCR Kloning Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)

Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit (Life technologies, Carlsbad, USA)

2. Material und Methoden

2.2.2.1.5. Gelextraktion und PCR-Reinigung

AveGene Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Pacific Image Electronics Co., Ltd, New Taipei, Taiwan)

NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland)

2.2.2.1.6. Cre-Rekombination der Konstrukte

Creator™ DNA Cloning Kit (Clontech Laboratories, Mountain View, USA)

2.2.2.1.7. Expression rekombinanter Proteine

EasySelect™ *Pichia* Expression Kit (Life Technologies, Carlsbad, USA)

2.2.2.2. Aufschließen von Pflanzenmaterial

Für die Extraktion von genomischer DNA (gDNA) und Ribonukleinsäuren (RNA) aus Pflanzenmaterial wurde dieses über eine Schwingmühle (Mixer Mill, MM300, Retsch GmbH, Haan, Deutschland) aufgeschlossen. Entsprechende Proben wurden zusammen mit zwei Stahlkugeln (4,5 mm Durchmesser, Umarex, Arnsberg, Deutschland) in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend 2 min bei einer Amplitude von 28 Hz in der Schwingmühle gemörsert. Die Stahlkugeln wurden im Anschluss aus dem Pulver entfernt und dieses für die Isolierung von RNA, DNA oder Proteinen genutzt.

2.2.2.3. Isolierung genomischer DNA aus Pflanzen

Für die Isolierung von gDNA aus Maispflanzen wurde das Protokoll von Pallotta (Pallotta *et al.*, 2000) verwendet. Die isolierte gDNA wurde in 35 µl RNase-Lösung (R100, 100 mg/ml) aufgenommen und anschließend photometrisch quantifiziert (NanoDrop 2000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

2.2.2.4. Isolierung von RNA aus Pflanzen

Für die Isolierung von RNA aus Pflanzengewebe wurde das Gewebe nach 2.2.2.2 aufgearbeitet und entsprechend des Protokolls des peqGold TriFast™ Kits (PEQLAB, Erlangen, Deutschland) die RNA isoliert. Die RNA wurde anschließend in 50 µl Milli-Q-Wasser aufgenommen und photometrisch quantifiziert (NanoDrop 2000, Thermo Fisher Scientific,

Waltham, USA). Es erfolgte zusätzlich eine Qualitätskontrolle über eine Agarosegelelektrophorese. Vor dem Einsatz der RNA in das *First Strand cDNA Synthesis Kit* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) erfolgte eine DNase-I-Behandlung entsprechend dem Protokoll des Herstellers (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

2.2.2.5. Southern Blot

Der Nachweis von transgenen DNA-Abschnitten in genomischer DNA erfolgte mithilfe der *Southern Blot* Technik (Southern, 1975) nach einem Protokoll für Filterhybridisierung von Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland). Die Digoxigenin-11-dUTP-markierten Sonden leiten sich von einem 747 bp großen Fragment aus einer Restriktion des Vektors p7iL (DNA Cloning Service Hamburg) mit *XhoI* und *BglII* ab (siehe Abb. 88). Das entsprechende Fragment wurde über eine Gelelektion aufgereinigt und diente als Template für die Markierung. Die PCR wurde mit den Primern bar-for und bar-rev durchgeführt. Über eine Agarosegelelektrophorese wurde der Einbau von Digoxigenin-11-dUTP bestätigt und die Konzentration der PCR-Reaktion abgeschätzt. Die Konditionen der PCR fassen die folgenden Tabellen zusammen.

Tab. 14: Während der dig-Markierung verwendetes PCR Programm

PCR-Konditionen		
95°C	120	
95°C	30	17x
62°C	30	
72°C	150	
72°C	300	
4°C	PAUSE	+ 0,1 µl Polymerase
95°C	30	17x
62°C	30	
72°C	150	
72°C	600	
4°C	∞	

Tab. 15: Übersicht zur Herstellung der dig-Markierung, sowie der verwendeten PCR Bedingungen

	Master Mix	DIG	Kontrolle	H ₂ O
10x Puffer	7,5	2,5	2,5	2,5
MgCl ₂ (50mM)	2,25	0,75	0,75	0,75
DIG dNTPs (10mM)	1,5	0,5	0,5	0,5
Primer for (10µM)	1,5	0,5	0,5	0,5
Primer rev (10µM)	1,5	0,5	0,5	0,5
Taq Platinum (5u/µl)	0,3	0,1	0,1	0,1
Endvolumen [µl]		25	25	25
Master Mix		4,85	4,85	4,85
DIG dUTP		0,375	-	-
Template		5	5	-
H ₂ O		14,775	15,15	20,15

Für den *Southern Blot* wurden 20 µg gDNA in einem Volumen von 40 µl mithilfe einer Endonuklease restringiert und über eine Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Die DNA-

2. Material und Methoden

Fragmente wurden im Anschluss durch einen Kapillarblot auf eine positiv geladene Nylonmembran (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) übertragen und mit UV-Bestrahlung (1200 mJ über Stratalinker, Stratagene, Heidelberg, Deutschland) fixiert. Die anschließende Hybridisierung der Membran mit der Sonde bei 48°C und die Detektion mittels CSPD-(Dinatrium-3-(4-methoxyspiro[1,2-dioxetan-3,2'-(5'-chloro)tricyclodecan]-4-yl)phenylphosphat)-Chemilumineszenz erfolgte den Vorgaben von Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland) entsprechend. Die Exposition erfolgte auf Röntgenfilm (Hyperfilm™ MP, GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) und dem anschließenden Scannen des Filmes mit einem Durchlichtscanner (Epson Perfection V700 Photo, Seiko Epson, Suwa, Japan).

2.2.2.6. Molekulare Analyse der T₀-Generation

Zur molekularen Analyse der T₀-Generation erfolgte die Isolation von gDNA aus Blättern der Pflanzen (siehe 2.2.2.3), diese einem Restriktionsverdau mit *Scal* unterzogen und die Fragmente über eine 1 % Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Im Folgenden wurden die Fragmente über einen Kapillarblot auf eine Nylonmembran (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) übertragen. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 42°C in einem Hybridisierungssofen. Es kamen im Konstrukt zwei Erkennungssequenzen für *Scal* vor, die Erkennungssequenz im 3'-Ende des *bar*-Gens führte zu einer Fragmentgröße von mindestens 1,9 kb zuzüglich eines variablen Anteils, abhängig von der nächsten Schnittstelle im Maisgenom. Als Sonde diente ein 722 bp großes Fragment des *bar*-Gens, amplifiziert mit den Primern *bar-for* und *bar-rev* und über eine PCR mittels dig-dNTPs markiert. Der Erfolg dieser Markierung wurde über die Änderung der Bandengröße in einem Agarosegel überprüft (Vorgehen siehe 2.2.2.5).

2.2.2.7. Generation rekombinanter Vektoren

Die binären und pUC-basierten Vektoren sowohl für die Fusion mit GFP (p7i-UCre-ZmPrx-GFP sowie pUbi-ZmPrx-GFP-IMA und -b) als auch für die Überexpression von *zmpmx01*, *zmpmx70* und *zmpmx66* in Mais wurden vom DNA Cloning Service, Hamburg, hergestellt. Ausgehend vom Grundvektor p7iM wurde der Ubi1-Promotor aus Mais (Christensen *et al.*, 1992), eine induzierbare Cre/*loxP*-Kassette, das entsprechende *zmpmx*-Gen und im Falle der Fusionen das *gfp*-Gen eingefügt.

Für die Klonierung der Vektoren für die rekombinante Expression in *Pichia pastoris* wurden die entsprechenden *zmpvx*-Gene über eine PCR-Reaktion mit Restriktionsschnittstellen (Primersequenzen siehe 2.1.5) für eine Integration in den pPICZ α A-Vektor (Life Technologies, Carlsbad, USA) versehen. Über eine Subklonierung in den Vektor pJET1.2/blunt (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), einem anschließenden Restriktionsverdau und sowie einem Reinigungsschritt über eine Gelelektion, erfolgte die Ligation in den Zielvektor. Die Deletion der Signalpeptide aus den *zmpvx*-Genen erfolgte ebenfalls über eine PCR-Reaktion mit angepassten Primern.

2.2.2.8. Transformation von *Escherichia coli*

Die Herstellung von kompetenten Zellen und deren Transformation erfolgte nach Inou *et al.* (1990).

2.2.2.9. Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

Die Herstellung von kompetenten Zellen und deren Transformation erfolgte nach Höfgen und Willmitzer (1988).

2.2.2.10. Hefetransformation

Die Transformation von *Pichia pastoris* erfolgte mittels Elektroporation den Vorgaben des EasySelect™ *Pichia* Expression Kit (Life Technologies, Carlsbad, USA) entsprechend. Zur Elektroporation wurde ein Eporator (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) verwendet.

2.2.2.10.1. Anzucht

Die Anzucht von *Pichia pastoris* erfolgte in 500 ml YPD-Medium (siehe Tab. 13) bei 30°C und 220 rpm in 2 l Erlenmeyerkolben.

2.2.2.10.2. DNA-Präparation

Für die Transformation wurde 5-10 μ g linearisiertes Plasmid verwendet. Dazu wurde mit dem NucleoBond® Xtra Midi Kit (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) eine Plasmidpreparation erstellt und diese vollständig mit der Endonuklease *PmeI/MssI* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) restringiert, anschließend über eine Phenol/Chloroform-

2. Material und Methoden

Extraktion gereinigt und in sterilem Milli-Q-Wasser aufgenommen. Die Linearisierung wurde mithilfe einer Agarosegelelektrophorese überprüft.

2.2.2.10.3. Selektion

Die Selektion von positiven Transformanten wurde auf YPDS-Medium (Tab. 13) durchgeführt, um die nach der Elektroporation osmotisch sensitiven Zellen zu stabilisieren. Je 10, 25, 50, 100 und 200 μl des Transformationsansatzes wurde auf den Platten ausgestrichen. Die direkte Selektion von Klonen mit mehrfacher Integration des GOI im Genom wurde durch den Einsatz verschiedener Zeocin[®]-Konzentrationen (100, 500, 1000 und 2000 $\mu\text{g/ml}$) erreicht. Auf Platten mit hoher Konzentration von Zeocin[®] (500, 1000, 2000 μg) wurden je 200 μl Transformationsansatz ausgestrichen. Nach Erreichen einer ausreichenden Koloniegröße (3-10 Tage bei 30°C) wurden je Selektionsansatz 10 Klone ausgewählt und auf Integration des Inserts, Expression bzw. Sekretion des rekombinanten Proteins untersucht.

2.2.2.10.4. Kolonie PCR

Für den Nachweis der Integration in das *Pichia*-Genom wurde wenig Material einer Einzelkolonie mit sterilen Zahnstochern in 50 μl TE Puffer übertragen, 2 min in einer Mikrowelle bei maximaler Leistung (700 W) erhitzt und anschließend 2 min bei 13'000 rpm zentrifugiert. 1 μl des Überstandes wurde in eine PCR mit den Primern 3'AOX SEQ und 5'AOX SEQ eingesetzt und über eine Agarosegelelektrophorese ausgewertet.

2.2.2.10.5. Bestimmung produktiver Klone

Nach der Bestätigung der Integration des GOI in das *Pichia*-Genom wurden Klone selektiert, welche eine maximale Sekretion der jeweiligen ZmPrx_{rec} zeigten. Dafür wurde ein Plattenassay, der ein Screening einer hohen Zahl von Transformanten zulässt, sowie eine Anzucht in Flüssigmedium, verwendet.

2.2.2.10.5.1. Plattenassay

Für den Nachweis von aktiver rekombinanter Peroxidase wurden positive Klone zunächst auf BMM-Agar (BMM-Medium siehe Tab. 13, unter Zusatz von 2 % Agar (Phytoagar, Duchefa Biochemie, Harleem, Niederlande)) induziert. Dazu wurden zu prüfende Klone in einem

Raster auf Agarplatten im Format 100 x 100 mm übertragen, und die Platten invertiert. Die Zugabe von 100 % Methanol (400 µl) erfolgte in flüssiger Form über den Deckel der Petrischalen. Nach 48 h Induktion bei 24°C wurde ein Agarose-*Overlay-Assay* gestartet. Dazu wurde Natriumacetatpuffer (pH 5) mit 0,5 % Agarose (w/w) versetzt und aufgekocht. Nach dem Abkühlen auf etwa 40°C wurden 8,8 mM Guajacol und 8,23 mM Wasserstoffperoxid zugesetzt und das Medium mit ca. 15 ml dieser Lösung überschichtet. Nach etwa 15 min Inkubation wurde die Peroxidaseaktivität anhand der Größe der entstandenen orangenen Halos abgeschätzt und das erhaltene Ergebnis mit einer digitalen Spiegelreflexkamera (DSLR, Canon EOS600D; Canon, Chichibu, Japan) dokumentiert.

2.2.2.10.5.2. Testkulturen

Die Produktivität verschiedener Klone wurde unter verschiedenen Kulturbedingungen beobachtet, um die Ausbeute an rekombinanter Peroxidase zu erhöhen. Zusätzlich wurde ein Kolonie-Blot der resistenten Klone erstellt, um die Sekretion rekombinanter Peroxidase abzuschätzen (siehe 2.2.3.7.2). Es wurden verschiedene Minimal- und Komplexmedien, verschiedene Induktionstemperaturen und Methanolkonzentrationen, sowie unterschiedliche Zelldichten während der Induktion verwendet (siehe Optimierungsversuche im Anhang).

Standardbedingungen zur Expression von ZmPrx_{rec} war die Vorkultur einer Einzelkolonie des entsprechenden Klons in BMGY-Medium (siehe Tab. 13) bei 28°C und 220 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 2-6 (16-18 h). Dann erfolgte ein Austausch des Mediums gegen BMMY-Medium (siehe Tab. 13) und eine Verdünnung auf eine OD₆₀₀ von etwa 1. Die Standard Methanolkonzentration betrug 0,5 % (v/v). Während der Induktion wurde die Expression und Sekretion von rekombinantem Protein zu verschiedenen Zeitpunkten verfolgt (0-144 h). Gemessen wurde die Guajacolperoxidaseaktivität im Überstand (ΔE_{470} , siehe 2.2.3.8.2). Zudem wurde das Auftreten des rekombinanten Proteins im Medium mittels *Western Blot* (siehe 2.2.3.7) verfolgt. Die Standardtemperatur während der Induktion lag bei 28°C.

Um mögliche Auswirkungen der Induktionstemperatur auf die Stabilität und Ausbeute von rekombinantem Protein abschätzen zu können, wurde eine Versuchsreihe bei einer Induktionstemperatur von 22°C durchgeführt.

2. Material und Methoden

Die Stärke der Induktion wurde unter verschiedenen Methanolkonzentrationen beobachtet. Ausgehend von der Standardkonzentration von 0,5 % Methanol (v/v) wurden verschiedene Testreihen mit Konzentrationen bis zu 4 % Methanol (v/v) durchgeführt.

Zusätzlich zum Komplexmedium wurden Testreihen in gepuffertem Minimalmedium durchgeführt. In diesem Medium wurde kein Trypton/Pepton zugesetzt, eine nachfolgende Reinigung des rekombinanten Proteins war somit erleichtert.

Die Zugabe von Spurenelementen und Zwischenprodukten des Häm-Stoffwechsels sollte sich vorteilhaft auf die Produktion von funktioneller Peroxidase auswirken (Morawski *et al.*, 2000). Daher wurde diese in einer Versuchsreihe ab dem Induktionsstart hinzugegeben und die Auswirkungen auf die Peroxidaseaktivität im Kulturüberstand beobachtet.

Sämtliche Variationen der Standardinduktionsbedingungen wurden über einen Zeitraum von 0-144 h nach Induktionsstart über einen Anstieg der Peroxidaseaktivität im Kulturmedium beobachtet. Als Negativkontrolle diente eine Kultur mit *Pichia pastoris* X33 transformiert mit dem Leervektor ohne Insert.

2.2.3. Biochemische Methoden

2.2.3.1. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung von Kulturüberständen, Ammoniumsulfat- und Chromatographiefraktionen erfolgte mit Hilfe des Thermo Scientific™ Pierce™ 660 nm Protein Assay (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) Kits mit Bovine Serum Albumin (BSA, Sigma-Aldrich, St. Luis, USA) als Standard.

2.2.3.2. Konzentrieren von Proteinlösungen

Zur Konzentration von Proteinlösungen wurde mit Amicon® Ultra-Zentrifugal-Filtern (Merck, Darmstadt, Deutschland) gearbeitet. Es wurden verschiedene Filter mit einem Startvolumen von 500 µl bis 4 ml verwendet. Der verwendete NMWL (*Nominal Molecular Weight Limit*) betrug 10 kDa.

2.2.3.3. Ammoniumsulfatfällung

Zur Konzentration und selektivem Aussalzen der rekombinanten Peroxidasen wurde eine Ammoniumsulfatfällung durchgeführt. Dazu wurde entweder durch Zugabe einer gesättigten NH₄SO₄-Lösung die gewünschte Zielkonzentration eingestellt, oder durch schrittweises

Zufügen von festem NH_4SO_4 -Salz zum *Pichia pastoris* Kulturüberstand bis zur gewünschten Konzentration. Nach erfolgter Induktion wurden die Zellen durch Zentrifugation (10 min 10.000 rpm, 4°C, Rotor JA-10; Avanti® J-E, Beckman Coulter, Brea, USA) sedimentiert und der zellfreie Überstand der Fällung unterworfen. Die bei der Fällung eingesetzten Volumen betragen zwischen 200 und 600 ml.

Es wurde sowohl fraktioniert, als auch über einen einzigen Konzentrationsschritt gefällt. Für die Ermittlung der optimalen NH_4SO_4 -Konzentration wurden in Vorversuchen verschiedene Konzentrationen verwendet und die erhaltenen Pellets auf vorhandene Peroxidaseaktivität untersucht. Dies geschah semiquantitativ über einen Mikroassay (siehe 2.2.3.8.1). Die Konzentrationen reichten in 10 % Schritten von 20 % bis 90 % gesättigte NH_4SO_4 -Lösung. In der fraktionierten Fällung wurden Pellets aus dem Bereich 20-30 %, 30-40 %, 40-50 %, 50-60 % und 60-70 % erzeugt. Zunächst wurden 10 ml zellfreier Überstand auf eine Sättigung von 20 bis 60 % NH_4SO_4 eingestellt, 30 min auf Eis inkubiert und zentrifugiert (4000 xg, 4°C, 30 min; Centrifuge 5810R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Der Überstand wurde auf eine 10 % höhere NH_4SO_4 Sättigung eingestellt und erneut zentrifugiert. Das resultierende Pellet sowie erhaltene Überstände wurden auf Peroxidaseaktivität überprüft.

2.2.3.4. Chromatographieverfahren

2.2.3.4.1. Entsalzung und Pufferaustausch

Für eine Entsalzung oder einen Pufferaustausch in Proteinlösungen wurden PD-10 Säulen (GE Healthcare Life Sciences, Freiburg, Deutschland) mit Sephadex-G25-Matrix entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet. Vor Gebrauch wurden die Säulen mit 20 ml des entsprechenden Puffers äquilibriert. Es wurde bei 4°C gearbeitet.

2.2.3.4.2. *Fast Protein Liquid Chromatography*

Proteinreinigungen über Chromatographieverfahren wurden über ein Äkta *Fast Protein Liquid Chromatography* (FPLC) System (P-920 Pumpen, INV-907/M- 925 Injektionssystem, UPC-900 Steuersystem, Frac-900/901 Fraktionssammler; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) in Verbindung mit einer analytischen Software (Unicorn V 3.20, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) durchgeführt. Alle für die FPLC verwendeten Lösungen wurden mit Milli-Q-Wasser (Millipore, Eschborn, Deutschland) hergestellt und mit OE 67 Membranfiltern (Schleicher und Schuell, Dassel, Deutschland)

2. Material und Methoden

durch ein Vakuumfiltrationsgerät (Nr. 16307 Sartorius, Göttingen, Deutschland) entgast und auf 4°C gekühlt. Das System wurde vor jedem Lauf mit Milli-Q und dem jeweiligen Puffer gewaschen. Die Lagerung des Systems erfolgte in 20 % (v/v) Ethanol. Die Chromatographien wurden bei 4°C durchgeführt.

2.2.3.4.3. Affinitätschromatographie

Für die Aufreinigung über eine immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) wurde eine Nickel-Nitrilotriessigsäure-Matrix verwendet. Zum Einsatz kamen Ni-NTA *Superflow Cartridges* (SV 1 ml; Quiagen, Hilden, Deutschland) sowie Protino® Ni-NTA Säulen (SV 5 ml; Macherey-Nagel, Düren, Deutschland). Vor den Läufen wurden die Säulen mit Milli-Q-Wasser oder dem entsprechenden Puffer gewaschen (10 SV). Nach einem Lauf wurde mit 0,5 M NaOH (2 SV) gereinigt, anschließend mit Milli-Q-Wasser gespült (10 SV) und mit dem Auftragspuffer äquilibriert (10 SV). Die Flussrate wurde während des Waschens so eingestellt, dass der Maximaldruck über der Säule nicht überschritten wurde, während der Reinigung wurde sie so gewählt, dass sich eine Kontaktzeit von Säulenmatrix und NaOH von mindestens 30 min ergab. Das aus der Ammoniumsulfatfällung (siehe 2.2.3.3) gewonnene Pellet wurde in NPI-10 Puffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 10 % Glycerol, pH 8) aufgenommen und entweder bei -80°C gelagert oder direkt weiterverarbeitet. Das Bindevolumen wurde so gewählt, dass die maximale Bindungskapazität der Säule nicht überschritten wurde. Aufgetragen wurde über einen 10 ml Superloop mit einer Geschwindigkeit von 0,25-0,5 ml/min. Anschließend wurde die Matrix mit 10 SV Waschpuffen NPI-20 (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 10 % Glycerol, pH 8) gewaschen. Die Elution erfolgte isokratisch mit einem Wechsel des Puffers auf NPI-250 (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, 10 % Glycerol, pH 8). Die Fraktionsgröße während der Elution betrug 1 ml. Der gesamte Vorgang wurde über einen 280 nm Detektor dokumentiert. Die gesammelten Fraktionen wurden anschließend auf eine Peroxidaseaktivität untersucht (siehe 2.2.3.8).

Durch Probleme mit einer irreversiblen Inhibition der Peroxidasen durch Imidazol wurde das Protokoll modifiziert. Die Puffer NPI-10, NPI-20 und NPI-250 wurde ohne Imidazol angesetzt und die Elution mit einem pH-Wechsel zum sauren Bereich durchgeführt. Die Bindung der Proteine erfolgte bei einem pH-Wert von 8 (NPG8-Puffer; 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 % Glycerol, pH 8). Gewaschen wurde mit einem pH-Wert von 6 (NPG6-Puffer; 50 mM

NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 % Glycerol, pH 6), um unspezifisch gebundene Proteine von der Säulenmatrix zu entfernen. Eluiert wurde anfangs mit einem pH-Wert von 5 (NPG5-Puffer; 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 % Glycerol, pH 5), später mit einem pH-Wert von 4,2 (NPG4,2-Puffer; 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 % Glycerol, pH 4,2).

Nach 10 Läufen pro Säule wurden diese regeneriert. Dazu wurden zunächst die Ni²⁺-Ionen durch Waschen mit 10 SV 100 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, pH 8) von der Matrix gelöst und nach Waschen mit 10 SV Milli-Q-Wasser die Matrix mit 2 SV 100 mM wässriger Metallionenlösung neu beladen. Verwendet wurde neben NiSO₄(H₂O)₆ auch CoCl₂(H₂O)₆. Die Lagerung der Säulen erfolgte in 30 % Ethanol bei 4°C.

2.2.3.4.4. Ionenaustauschchromatographie

Die Ionenaustauschchromatographie (IEX) wurde mit einer Mono S-HR-5/5-Säule (SV 0,98 ml; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) durchgeführt. Vor einer Chromatographie wurde die Säulenmatrix mit Natriumacetatpuffer äquilibriert (10 SV). Die Spülvorgänge erfolgten bei hohen Durchflussgeschwindigkeiten unter Beachtung des maximal zulässigen Säulendruckes. Das Proteinpellet aus der Ammoniumsulfatfällung wurde in Natriumacetatpuffer (pH 4) aufgenommen. Der Auftrag auf die Säule erfolgte mit einer Flussrate von 0,25 ml/min, das Auftragsvolumen wurde dem Proteingehalt der Probe angepasst und überschritt nicht die Menge von 75 % maximaler Bindungskapazität. Nach dem Probenauftrag erfolgte ein Waschen der Säule bis zum Erreichen der 280 nm Basislinie. Eluiert wurde mit einem NaCl-Salzgradienten in Natriumacetatpuffer mit einer Flussrate von 0,25 ml/min. Es wurden verschiedene Bedingungen für die Elution getestet, Standardeinstellung war 100 % Puffer B (Natriumacetatpuffer mit 1 M NaCl) in 20 SV. Fraktionen mit einer Größe von 1 ml wurden gesammelt und auf Peroxidaseaktivität getestet. Nach einem Lauf schloss sich eine Reinigung mit 10 SV 1M NaCl in Natriumacetatpuffer an. Die Lagerung der Matrix erfolgte in 20 % Ethanol.

2.2.3.4.5. Gelfiltration

Gelfiltrationen wurden mit einer Superdex-200-HR-10/30-Säule (SV 24 ml; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) durchgeführt. Dazu wurde die Säule mit 5 SV Puffer (50 mM Na₂HPO₄, pH 7,0, 150 mM NaCl) mit einer Flussrate von 0,5 ml/min äquilibriert. Über einen 2 ml Sample Loop wurden 150-250 µl Probe aufgetragen und mit

2. Material und Methoden

1,5 SV eluiert. Die Fraktionsgröße betrug 1 ml. Mit einem Mikroassay (siehe 2.2.3.8.1) wurden die Fraktionen auf eine Peroxidaseaktivität untersucht. Die Reinigung erfolgte durch Spülen mit 10 SV Milli-Q-Wasser. Die Lagerung erfolgte in 20 % Ethanol. Erhaltene Proteinfractionen wurden durch die Bestimmung des Verhältnisses der Absorption bei 404 und 280 nm (A_{404}/A_{280}) charakterisiert. Dieses Verhältnis zeigt den Häm-Gehalt im Verhältnis zum Proteingehalt und stellt einen Wert zur Beurteilung der Reinheit von Peroxidasepräparationen dar (Dunford 1991).

2.2.3.5. Analytische Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) erfolgte mit in Gießständen (Mini-PROTEAN Tetra Cell Casting Module, Biorad, Hercules, USA) selbst hergestellten Acrylamidgelen mit einem Acrylamidgehalt von 10-12 % (10-12 % (v/v) ROTIPHORESE® 30 GEL (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland), 375 mM TRIS, pH 8,8 – HCl, 0,1 % (w/v) SDS, 0,1 % (w/v) Ammoniumpersulfat, 0,04 % (v/v) N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)) in Mini-PROTEAN Tetra Cell Gelsystemen (Biorad, Hercules, USA). Nach Mischen aller Bestandteile erfolgte das Gießen der Minigele (7 x 8 cm) und die Polymerisation für etwa 45-60 min. Während dieser Zeit waren die Gele mit 200 µl Isopropanol überschichtet. Nach Aushärten der Gele erfolgte ein Überschichten mit dem Sammelgel (6 % (v/v) ROTIPHORESE® 30 GEL (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland), 150 mM TRIS, pH 6,8 – HCl, 0,1 % SDS, 0,05 % Ammoniumpersulfat, 0,1 % (v/v) TEMED) und das Einschieben des Kammes. Nach 45-60 min Polymerisation wurden die Gele sofort verwendet oder in 1x SDS Puffer (25 mM TRIS, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS) feucht verpackt und bei 4°C gelagert.

25 µl Probe wurden mit 5 µl 6-fach Probenpuffer (125 mM TRIS, pH 6,8 – HCl, 6 % (w/v) SDS, 0,03 % Bromphenolblau, 48 % (w/v) Glycerol, 9 % 2-Mercaptoethanol (14,3 M)) vermischt, 5 min bei 95°C inkubiert, abgekühlt und 15-20 µl dieses Gemisches auf das Gel aufgetragen. Die elektrophoretische Trennung erfolgte mit einer Spannung von 120 V für 10 min, dann 150 V für etwa 50 min in Mini-PROTEAN Tetra Cell Systemen (Biorad, Hercules, USA) in SDS-Laufpuffer (25 mM TRIS, pH 8,3 – HCl, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS) entsprechend der Methode vom Laemmli (Laemmli, 1970). Als Größenstandard diente der *PageRuler Prestained* Protein Marker (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Ein Anfärben der

Proteinbanden erfolgte mit Coomassie-Blue (Coomassie Färbung R-250; Biorad, Hercules, USA) nach Wilson (Wilson, 1983).

Aktivitätsfärbungen wurden basierend auf einer modifizierten SDS-PAGE durchgeführt. Hier wird SDS in einer maximalen Konzentration von 0,1 % (w/v) in allen Lösungen und Gelen verwendet (Thomas *et al.*, 1976). 25 µl Probe wurden mit 5 µl nichtreduzierendem Probenpuffer (125 mM TRIS, pH 6,8 – HCl, 0,6 % (w/v) SDS, 0,03 % Bromphenolblau, 48 % (w/v) Glycerol) vermischt und ohne Erwärmung wie oben beschrieben über einen Zeitraum von etwa 60 min aufgetrennt.

Als Färbemethoden wurde eine Guajacol- und 3,3'-Diaminobenzidine- (DAB)-Färbung als Nachweis von Klasse III Peroxidaseaktivität sowie eine Tetramethylbenzidin-(TMB-) Färbung für den Nachweis der Häm-Gruppe durchgeführt (Lüthje *et al.*, 2014).

2.2.3.6. Überprüfung von Proteinsequenzen

Rekombinante Proteine wurden über eine massenspektroskopische Untersuchung (MALDI-TOF) in ihrer Sequenz bestätigt. Das Vorgehen entspricht dem von Mika *et al.* (2008) beschriebenen.

2.2.3.7. Western Blotting

2.2.3.7.1. Proteinblot

Für den Nachweis rekombinanter Peroxidasen wurde Kulturüberstand, partiell gereinigte bzw. gereinigte Proteine über eine SDS-PAGE wie unter 2.2.3.5 beschrieben aufgetrennt und über einen *Semidry*-Transfer auf eine Nitrozellulosemembran (Roti®-NC; Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) übertragen. Dazu wurde die Membran (8 x 6 cm) und Whatman-Papier (Whatman 3MM Chr (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) in 1x *Semidry*-Transferpuffer (50 mM TRIS, 40 mM Glycin, 20 % Methanol) äquilibriert und anschließend die Proteine mit einem Fastblot B43 (Biometra, Göttingen, Deutschland) übertragen. Der Transfer erfolgte bei 0,8 mA/cm² für etwa 1 Stunde.

Nach erfolgtem Transfer wurde entweder über Nacht bei 4°C, oder für 1 h bei Raumtemperatur die Membran in TBST-Puffer (50 mM TRIS-Cl, 150 mM NaCl, pH 7,6, 0,05 % Tween 20) mit 5 % Milchpulver blockiert. Der Nachweis der rekombinanten Proteine erfolgte über ein *c-myc*-Epitop (EQKLISEEDL, (Evan *et al.*, 1985)) über einen Anti-*myc*-HRP-Antikörper

2. Material und Methoden

(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland). Die Inkubation erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur und leichtem Schütteln in TBST und 5 % Milchpulver bei einer Konzentration von 1:2500. Die Entwicklung erfolgte über eine *enhanced chemiluminescence* (ECL) Reaktion auf Luminol Basis. Nach Inkubation mit dem Antikörper wurde die Membran zweimal mit Milli-Q-Wasser gewaschen, dann 5 min in TBST inkubiert und erneut zweimal mit Milli-Q-Wasser gewaschen, um ungebundenen Antikörper zu entfernen. Das Nachweisreagenz setzte sich aus 10 ml Lösung A (100 mM Tris-HCl, pH 8,6, 0,25 mg/ml Luminol) und 1 ml Lösung B (1,1 mg/ml Para-Hydroxycoumarinsäure in Dimethylsulfoxid (DMSO)) und 3 µl Wasserstoffperoxid (30%) für 100 cm² Membran zusammen. Für die Nachweisreaktion wurde die Membran in dieser Lösung 2 min inkubiert, überflüssige Lösung entfernt, und die Membran zwischen zwei Folien gelegt. Die Aufzeichnung der Chemilumineszenz erfolgte in einem *Luminescent image analyzer* LAS 3000 (Fujifilm, Tokyo, Japan).

2.2.3.7.2. *Pichia pastoris* Kolonie-Blot

Um Klone zu selektieren, die rekombinantes Protein exprimieren und auch sekretieren, wurde ein *Yeast* Kolonie-Blot durchgeführt. Die Methode orientiert sich an Cregg (Cregg *et al.*, 2009). Es wurden jeweils 40 Klone einer Transformation sowie eine Positiv- und Negativkontrolle auf BMM-Medium (siehe Tab. 13) angezogen (24°C, 48 h). Dann wurden diese auf Whatman 3MM Chr (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) Papier übertragen, das Papier auf frisches BMM-Medium platziert und erneut für 48 h bei 24°C inkubiert. Es folgte der Transfer auf eine Nitrocellulosemembran. Der Transfer erfolgte gemäß 2.2.3.7.1, es wurde jedoch mit einem höheren Strom übertragen (1-4 mA/cm²; verwendet wurde 250 mA bei 100 cm² Membranfläche). Der Nachweis rekombinanter Peroxidasen erfolgte wie unter 2.2.3.7.1 beschrieben. Anhand der Intensität und Größe des Signals um die einzelnen Kolonien wurde die Menge an sekretierter Peroxidase abgeschätzt und entsprechende Klone selektiert.

2.2.3.8. Enzymaktivitäten

2.2.3.8.1. Mikroassay

Für die Detektion von Peroxidaseaktivitäten in Kulturüberständen und ein schnelles Selektieren exprimierender Klone wurde ein Assay im Mikroplattenformat verwendet. Der

Assay basiert auf der Umsetzung von Guajacol zum orangefarbenes Tetraguajacol ($\epsilon = 26,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). In einer 96-well Mikroplatte (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) wurde 225 μl 25 mM Natriumacetatpuffer (pH 5) mit 8,26 mM Guajacol und 8,8 mM Wasserstoffperoxid vorgelegt und mit 25 μl Fraktion oder Kulturüberstand vermischt und 30 min inkubiert. Von Fraktionen nach IEX und SEC wurden 10 μl in den Assay eingesetzt. Die Intensität der Färbung wurde mit einer digitalen Spiegelreflexkamera (DSLR, Canon EOS600D; Canon, Chichibu, Japan) auf einem Leuchtpult dokumentiert. Als Positivkontrolle diente 10 μl einer HRP-Lösung (Typ I, P8125; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) mit einer Konzentration von 0,7 U/ml.

2.2.3.8.2. Peroxidaseassay

Die Aktivität von Peroxidase wurde über die Oxidation von Guajacol zu Tetraguajacol (A470 nm; $\epsilon = 26,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) in Gegenwart von 8,8 mM Wasserstoffperoxid über einen Zeitraum von 2 Min verfolgt. Der Versuchsansatz von 1 ml enthielt Natriumacetatpuffer (25 mM, pH 5 –HCl) und verschiedene Mengen Probe (10-25 μl gereinigtes Protein, 100 μl *Pichia*-Kulturüberstand). Die Reaktion wurde durch Zugabe der Fraktion und vorsichtiges Mischen gestartet und die Reaktion photometrisch als Extinktionszunahme bei 470 nm über 2 min beobachtet (UV-1800 UV-VIS; Shimadzu, Kyoto, Japan). Als Referenz diente jeweils die Assaylösung ohne eingesetztes Enzym. Für die Berechnung von Aktivitäten wurde der lineare Bereich der Messung verwendet.

Die Umsetzung von weiteren Substraten wurde als Extinktionsänderung von 2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS) (405 nm; $\epsilon = 36,8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$), Coniferylalkohol (265 nm; $\epsilon = 7,5 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$), Kaffeesäure (310 nm; $\epsilon = 11,2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$), Ferulasäure (310 nm; $\epsilon = 16,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$), p-Coumarinsäure (310 nm; $\epsilon = 16,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$), IAA (261 nm; $\epsilon = 3,2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) oder TMB (652 nm; $\epsilon = 39,0 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) gemessen. Die sonstigen Versuchsbedingungen entsprachen den oben beschriebenen. Die Umsetzung von Ascorbat (5 mM; 290 nm; $\epsilon = 2,8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) wurde in Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 7) mit Wasserstoffperoxid als Oxidationsmittel über einen Zeitraum von 60 s gemessen.

Organische Effektoren wie Ferulasäure, Kaffeesäure, Coumarinsäure und Coniferylalkohol wurden in 50 % DMSO (v/v) gelöst, und 10 μl der Lösung in den Assay eingesetzt. Die DMSO Konzentration im Assay betrug 0,5 % (v/v). Kontrollexperimente zeigten keinen Einfluss von DMSO auf die Umsatzraten. Alle verwendeten Enzym-, Substrat- und Effektorlösungen

2. Material und Methoden

wurden auf Eis gehalten, sofern kein DMSO enthalten war. Die Standardtemperatur während des Assays betrug 25°C. Für Temperaturabhängigkeiten wurde die entsprechende Temperatur durch einen Thermostaten (Thermostat C; Eppendorf, Hamburg, Deutschland) hergestellt oder der gesamte Ansatz für einen definierten Zeitraum inkubiert.

Die Abhängigkeit der Enzymaktivität vom pH-Wert wurde über einen Bereich von pH 4 bis pH 8 ermittelt. Es wurde je nach Bereich entweder Natriumacetat- (25 mM; pH 4-5), 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure- (MES; 50 mM; pH 5,5-6,5) oder 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure-(HEPES; 50 mM; pH 7-8)-Puffer verwendet. Bei den Aktivitätsmessungen wurden verschiedene Substratkonzentrationen verwendet, die sich an die Vorgaben der Messungen mit den nativen Enzymen orientierten (Mika *et al.*, 2008). In Messungen zur Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstanten wurden verschiedene Substratmengen eingesetzt, bis es zu einer Sättigung der Reaktion kam (Guajacol: 0-168 mM, ABTS: 0-32 mM, H₂O₂: 0-15 mM). Tabelle 16 gibt einen Überblick der in Vergleichsmessungen verwendeten Konzentrationen.

Tab. 16: Übersicht der verwendeten Substratkonzentrationen

Substrat	Konzentration (mM)
ABTS	0,36
Guajacol	9,09
p-Coumarinsäure	0,1
Ferulasäure	0,1
Coniferylalkohol	0,1
Kaffeensäure	0,1
IAA	0,2
TMB	0,083
Ascorbat	0,5

2.2.4. Mikroskopiemethoden

2.2.4.1. Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Der Nachweis von Fusionsproteinen, sowie die subzelluläre Lokalisation von Peroxidase-GFP-Fusionen erfolgte mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM: *Confocal laser scanning microscopy*) an einem LSM 780 (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) bzw. einem TCS SP8 (Leica, Wetzlar, Deutschland). GFP (Tsien, 1998) wurde mit 488 nm angeregt und die Emission in Abhängigkeit vom verwendeten Gewebe weit- oder engbandiger in einem

Bereich von maximal 500-568 nm detektiert, mCherry (Shaner *et al.*, 2004) wurde mit 561 nm angeregt und die Emission in einem Bereich von 590-619 nm aufgezeichnet. In deutlich lignifizierten Geweben wurde zusätzlich dieses Gewebe mit 405 nm angeregt und die Autofluoreszenz bei 480-485 nm aufgezeichnet. Die Autofluoreszenz lignifizierter Maisgewebe nach Anregung mit verschiedenen Wellenlängen wurde durch Lambdascans aufgezeichnet und analysiert. In Geweben mit vorhandener Autofluoreszenz erfolgte eine engbandige Aufzeichnung des GFP-Signals von 505-515 nm. *Cross talk* parallel aufgezeichneter Kanäle wurde durch ein sequenzielles Scannen unterbunden.

2.2.4.2. Probenvorbereitung

Die Proben wurden zunächst unter einer UV-Lupe (MVX 10[®], Olympus, Hamburg, Deutschland) evaluiert und für die Mikroskopie vorbereitet. Von positiven Pflanzen wurden manuell Quetsch- (Maisembryonen) oder Schnittpräparate (Maiswurzeln, Maisblätter) hergestellt. Zwiebelepidermiszellen wurden von der Zwiebelchuppe abgelöst. Mikroskopiert wurde in Leitungswasser.

2.2.4.3. Transmissionselektronenmikroskopie

2.2.4.4. Probenvorbereitung

Die Wurzeln von Maiskeimlingen wurden nach Anzucht auf feuchtem Keimpapier im Alter von fünf und acht Tagen nach der Keimung geerntet und in 2 % Paraformaldehyd (PFA) und 0,1 % Glutaraldehyd in 50 mM MSB-Puffer (100 mM PIPES, 10 mM EGTA, 5 mM MgSO₄, pH 6,8 mit KOH) fixiert. Es folgte ein Waschschrift in MSB-Puffer unmittelbar nach der Fixierung, zwei weitere folgten mit je 5 und 10 min Inkubationszeit. Die Nachfixierung erfolgte in 0,5 % OsO₄ in 50 mM MSB-Puffer (pH 6,8) für 90 min auf Eis. Anschließend wurde dreifach gewaschen, zwischen den letzten Schritten wurde je 5 und 15 min inkubiert. Es folgte ein schrittweises Entwässern des Gewebes durch Umsetzen in Ethanol-Lösungen mit steigender Konzentration und ein Inkubieren von jeweils 30 min bei 4°C. Die schrittweise Erhöhung der Ethanol Konzentration erfolgte in fünf Schritten von 30-100 % absolutem Alkohol. Die Inkubation in 100 % Alkohol wurde einmal bei Raumtemperatur wiederholt.

2. Material und Methoden

2.2.4.5. Einbettung

Nach der Fixierung folgte die Infiltrierung des Gewebes mit *LR-White* (Plano GmbH, Deutschland). In vier Schritten erfolgte der Austausch von Ethanol gegen *LR-White*. Begonnen wurde mit einem Alkohol/*LR-White* Verhältnis von 2:1 mit einer Inkubationszeit von 60 min, es folgten 60 min bei einem Verhältnis von 1:1 und schließlich eine Inkubation für 3 h bei einem Verhältnis von 1:2 Ethanol/*LR-White*. Über Nacht wurde in 100 % *LR-White* inkubiert. Es folgte ein finaler Wechsel der 100 % *LR-White* Lösung und nach 6 h die Einbettung der Gewebe in Gelatinekapseln. Die Polymerisation wurde unter sauerstofffreien Bedingungen für 2 h bei Raumtemperatur und 36 h bei 50°C durchgeführt.

2.2.4.6. Dünnschnitterstellung

Aus den eingebetteten Geweben wurden Ultradünnschnitte (0,5-0,7 µm) mit einem Ultramicrotome Ultracut E (Glasmesser; Leica, Wetzlar, Deutschland) hergestellt und auf formvar-beschichtete Nickel *Grids* aufgenommen.

2.2.4.7. Immunogold-Detektion

Auf vorgeschnittenen Parafilmblättern (Parafilm® M, Pechiney Plastic Packaging, Menasha, USA) wurde die jeweilige Lösung vorgelegt. Die Schnitte wurden auf Nickel-Grids 30 min auf MSB-Puffer inkubiert, dann 1 Stunde mit 3 % BSA und 0,2 % BSA-C (acetyliertes BSA) in MSB geblockt. Es folgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper (siehe 2.1.6.1, 1:1000) für 1 h, ein erneuter Waschschrift mit 1 % BSA und 0,07 % BSA-C in MSB und die Inkubation mit dem zweiten Antikörper (Anti-Rabbit IgG, Gold Konjugat 1:40, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland). Die Schnitte wurden schließlich mit 1 % Glutaraldehyd (in Milli-Q-Wasser) nachfixiert, dreimal 5 min mit Milli-Q-Wasser gewaschen und mit Uranylacetat (2%, 10 s) und Bleicitrat (0,2 %, 15 s) nachkontrastiert.

2.2.4.8. Imaging

Die erstellten und beprobten Schnitte wurden mit dem Transmissionselektronenmikroskop LEO 906 (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) bei 100 kV untersucht.

2.2.5. Verwendete Software

Für die Planung von Klonierungen, Sequenzanalysen (Nukleotid- und Proteinsequenzen) und Primerdesign wurde die Software Clone Manager 9 Professional (Scientific & Educational Software, Cary, USA) verwendet. Die Auswertung und Bearbeitung CLSM-Aufnahmen erfolgte mit der Software Zen 2009 Light Edition (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) und LAS X (Leica, Wetzlar, Deutschland). Abbildungen wurden mit der Software Adobe Photoshop CS4 und CS6 verarbeitet, Tabellenkalkulation, Statistik und die Erstellung von Grafiken erfolgte mit Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, USA). Das *Alignment* der Proteinsequenzen zur Bewertung vorhandener CTPP-(C-terminale Propeptide)-Elemente im C-Terminus von ZmPrx01 erfolgten mit ClustalX2. Für die Darstellung von Proteinstrukturen auf Basis von Kristallstrukturen wurde die Software Pymol (Version 1.2r1, Delano Scientific, San Carlos, USA) verwendet.

Für die im Anhang dargestellten Sequenzvergleiche von Nukleotid- und Proteinsequenzen wurde Clone Manager verwendet. Für Nukleotidsequenzen wurde der *Global-Ref Alignment*-Typ mit der *Standard Linear Scoring Matrix* verwendet. Proteinsequenzen wurden mit der *BLOSUM 62 Scoring Matrix* verglichen.

2. Material und Methoden

2.2.6. Web-Ressourcen

Für Sequenzanalysen wurden neben lokaler Software einige Web-Ressourcen verwendet (siehe Tab. 17).

Tab. 17: Verwendete Web-Ressourcen für Sequenzanalysen

Service	Adresse	Funktion
BaCeLo	http://gpcr.biocomp.unibo.it/bacello/	Lokalisierung
ClustalW2	http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/	Sequenzvergleiche
Codon Usage Database	http://www.kazusa.or.jp/codon/	Datenbank/ <i>Codon usage</i>
HMMP	http://www.enzim.hu/hmmp/	Vorhersage transmembraner Helices
Maize GDB	http://www.maizegdb.org	Datenbank
Maize Sequence	http://www.maizesequenze.org	Datenbank
NCBI Blast	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi	Datenbank
NetPhos 2.0	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/	<i>In silico</i> Proteinanalyse
PeroxiBase	http://peroxibase.toulouse.inra.fr/	Datenbank
Phobius	http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/phobius/	Datenbank
Phyre ²	http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/	Modellierung von 3D-Strukturen
PLACE	http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/	<i>In silico</i> Promotoranalyse
ProtParam	http://web.expasy.org/protparam/	<i>In silico</i> Proteinanalyse
PSORT	http://psort.hgc.jp/	Lokalisierung
SignalP 3.0	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-3.0/	Lokalisierung
SoSui Signal	http://harrier.nagahama-i-bio.ac.jp/sosui/sosuisignal/sosuisignal_submit.html	Lokalisierung
Swiss-Model	http://swissmodel.expasy.org/	Modellierung von 3D-Strukturen
Tair	https://www.arabidopsis.org/	Datenbank
TargetP	http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/	Lokalisierung
TMHMM	http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/	Vorhersage transmembraner Helices
Uni Prot	http://www.uniprot.org/	Datenbank

3. Ergebnisse

3.3. Vorarbeiten

Vor der Klonierung von Fusionskonstrukten sowie der Maistransformation sollten die Sequenzen von ZmPrx01, ZmPrx66 und ZmPrx70 (Mika *et al.*, 2008) auf Nukleotidebene in der verwendeten Maisinzuchtlinie Hi-II A x Hi-II B bestätigt werden, um eventuelle Unterschiede in der Sequenz der *zmprx*-Gene zwischen den verschiedenen für die Aufklärung der Sequenzen verwendeten Maislinien (W22, W64A und Kultivar Jet) zu zeigen.

3.3.1. Sequenzvalidierung von *zmprx01*, *zmprx66* und *zmprx70*

Die erhaltenen Sequenzen (*zmprx01* n= 3; *zmprx70* n= 4; *zmprx66* n= 4) zeigten auf Nukleotidebene eine Sequenzähnlichkeit von 98 % (ZmPrx66, 10 SNPs) bis 99 % (ZmPrx01, 1 SNP; ZmPrx70, 7 SNPs). Diese Änderungen führten teils zu einem Austausch einzelner Aminosäuren (ZmPrx01 n= 1, ZmPrx70 n= 1, ZmPrx66 n= 5). Dabei fanden sich diese Veränderungen alle in Randbereichen des Proteins, ohne das aktive Zentrum oder andere strukturell wichtige Regionen zu beeinflussen.

In der *Coding sequence* (CDS) von *zmprx01* (Referenz: UniProtKB/Swiss-Prot: A5H8G4.1) erfolgte an Position 1025 ein Austausch von Thymin gegen Cytosin (T1025C) (siehe Abb. 89). Dies führte zur Änderung des Codons von TTG zu TCG und somit zum Austausch der Aminosäure Leucin gegen Serin an Position 342 im Protein (L342S) (siehe Abb. 90). Die gefundene Sequenz differiert damit in dieser Aminosäure von der Datenbanksequenz ZmPrx01 (UniProtKB A5H8G4). De Obeso *et al.* isolierten eine cDNA (*zmprx1*) aus der Maislinie W64, welche auf Nukleotidebene fünf SNPs aufweist, was auf Proteinebene zu einer Sequenzähnlichkeit von 95 % führt (siehe Anhang Abb. 91 und Abb. 92). In dieser Sequenz tritt an Position 319 der Aminosäuresequenz (entspricht nach Alignment Position 342 in ZmPrx01) ebenfalls ein Serin auf. In der aktuell vorliegenden Sequenz der Maislinie B73 (B73 RefGen_v3, MaizeGDB) findet sich ebenfalls dieser Austausch. Eine Analyse der Substitution durch PROVEAN (*Protein Variation Effect Analyzer* (Choi, 2012)) ergab einen neutralen Austausch mit einem Wert von 1,539. Abb. 11 stellt die Aminosäuresequenz vom ZmPrx01 mit N- und C-terminaler Verlängerung, Bindestelle des Peptidantikörpers, der in der Massenspektroskopie gefundenen Peptide (Mika *et al.*, 2008), sowie typischer Peroxidasedomänen dar.

3. Ergebnisse

H₂N-MAKESKLTAGVAAALTVVAACALCLLLPATARAQLRVGFYDTSCPNAEALVRQAVAAAFKADAGI
AAGLIRLHFHDCFVRGCDGSVLLTVNPGGGQTERDALPNNPSLRGFDVIDAAKTAVEQSCPRTVSCADI
VAF^{AA}RDDSISLTGSVSYQVPAGRRDGRVSNATETVDLPPPTSTAQSLTDLFKAKELSVEDMVVLSGAHTV
GRSFCASFFKRVWNTSTNPATAIVDAGLSPSYAQLLRALCPSNTTQTTPITTAMDPGTPNVLDNNYYKLL
PRGMGLFFSDNQLRVNPQMAALVSSFASNETLWKEKFAAAMVKMGRIQVQTGTGCEVRLNCGVVNP
SYSSSSAVELGSSAPAAVGEEGYAAS-COOH

Abb. 11: ZmPrx01 Aminosäuresequenz aus *Zea mays* Hi-II A x Hi-II B im Vergleich zur Datenbanksequenz von ZmPrx01 (Mika *et al.*, 2008). Dargestellt ist das putative Signalpeptid (unterstrichen), die C-terminale Verlängerung (doppelt Unterstrichen), die Sequenz des Peptidantikörpers (fett, unterstrichen), die nachgewiesenen Peptide zur Identifikation der Proteinsequenz aus der Massenspektroskopie (grün hinterlegt) sowie typische Peroxidasedomänen: *peroxidases active site signature* (PASS), nahe dem N-terminus, und *peroxidases proximal heme-ligand signature* (PPHLS) (beide orange hinterlegt) Austausch der AS L342S (PROVEAN Score: 1,539= neutral, rote Hervorhebung).

In der ermittelten Sequenz für *zmprx70* aus der Inzuchtlinie Hi-II A x Hi-II B ergaben sich ebenfalls Unterschiede auf Nukleotid- und Aminosäureebene zur Referenzsequenz (UniProtKB/Swiss-Prot: A5H452.1). Auf Nukleotidebene ergab sich eine Sequenzhomologie von 99 %, es fanden sich sieben Nukleotidsubstitutionen (A69C, G120C, A597G, T662A, G684A, A732G, A804G siehe Abb. 93). Dabei hatte nur der Wechsel von Thymin auf Adenin an Position 662 Auswirkungen auf die Aminosäuresequenz. Dort erfolgte der Austausch von Leucin gegen Glutaminsäure (L221Q siehe Abb. 94). Auch dieser Austausch war nach Klassifizierung mittels PROVEAN neutral. Abb. 12 fasst die erhaltenen Ergebnisse zusammen und zeigt die Aminosäuresubstitution im Zusammenhang mit konservierten Peroxidasedomänen, Signalpeptid und nachgewiesenen Peptiden in der massenspektroskopischen Analyse des nativen Proteins (Mika *et al.*, 2008).

H₂N-MASSSFTSLSVMVLLCLAAAAVASAQLSPTFYRSRCPRALATIKAAVTAAVAQEARMGASLLRLHF
HDCFVQGCDSVLLNDTATFTGEQTANPNVGSIRGFGVVDNIKAQVEAVCPGVVSCADILAVAARDSV
VALGGPSWRVLLGRRDSTTASLALANS^{DL}PAPSLDLANLTAFAKKRLSRTDLVALSGAHTIGLAQCKNFR
AHIYNDTNVNAAFATQRRANCPAAAGNGDGNLAPLDTATPTAFDNAYYTNLLAQRGLLHSDQQLFNG
GATDGLVRTYASTPRRFSRDFAAAMIRMGNISPLTGTQGQIRRACSRVN-COOH

Abb. 12: ZmPrx70 Aminosäuresequenz aus *Zea mays* Hi-II A x Hi-II B im Vergleich zur Datenbanksequenz von ZmPrx70 (Mika *et al.*, 2008). Dargestellt ist das putative Signalpeptid (unterstrichen), die Peptidsequenz des Peptidantikörpers (fett, unterstrichen), die nachgewiesenen Peptide zur Identifikation der Proteinsequenz aus der Massenspektroskopie (grün hinterlegt) sowie typische Peroxidasedomänen: *peroxidases active site signature* (PASS), nahe dem N-terminus, und *peroxidases proximal heme-ligand signature* (PPHLS) (beide orange hinterlegt) Austausch der AS L221Q (PROVEAN Score: 0,30= neutral, rote Hervorhebung).

Die ermittelte mRNA-Sequenz für *zmprx66* zeigte die größte Anzahl an SNPs unter den drei untersuchten Peroxidasen gegenüber der entsprechenden Datenbankreferenzsequenz (Genbank: ABN48845.1). Auf Nukleotidebene zeigten sich 10 SNPs (A32T, G36C, A174G, A231C, C381A, T393C, A472G, G514C, G930A, G952A, siehe Abb. 95), fünf führten zu einer Änderung in der Aminosäuresequenz (N11I, R12S, A158P, G172R, V318L, siehe Abb. 96), dabei bleiben diese Änderungen entsprechend dem PROVEAN Score neutral (siehe Abb. 13). Vergleicht man die erhaltene Sequenz mit der Maislinie B73, so zeigen sich auf Nukleotidebene im *Open Reading Frame* zwei SNPs (930G>A, 952G>C; siehe auch Abb. 95 und Abb. 96), was zum Austausch von Valin an Position 318 gegen ein Leucin führt. Der Austausch an dieser Position ist ebenfalls neutral (PROVEAN Score: -1,929). Abb. 13 fasst die erhaltenen Ergebnisse zusammen und zeigt die Aminosäuresubstitution im Zusammenhang mit konservierten Peroxidasedomänen, Signalpeptid und nachgewiesenen Peptiden in der massenspektroskopischen Analyse des nativen Proteins (Mika *et al.*, 2008).

H₂N-MAASVSASCLISLSSLAVVLVALASAASAQLSSTFYDRSCPNALSTIRSGVNSAVRQEPRVGASLLR
LHFHDCFVRGCDASLLLNDTSGEQSQGPNTLNPRGFVVNSIKAQVESVCPGIVSCADILAVAARDGV
VALGGPSWTVLLGRRDSTASFPGQTS~~DL~~PPPTSSLRQLLSAYNKKNLNPTDMVALSGAHTIGQAQCSSF
NDHIYNDTNINSAFAASLRANCPRAGSTALAPLDTTTPNAFDNAYYTNLLSQKLLHSDQELFNSGSTDS
TVRSFASSTSAFNSAFATAMVKMGNLSPQTGTQGQIRRSCWKLNS-COOH

Abb. 13: ZmPrx66 Aminosäuresequenz aus *Zea mays* Hi-II A x Hi-II B im Vergleich zur Datenbanksequenz von ZmPrx66 (Mika *et al.*, 2008). Dargestellt ist das putative Signalpeptid (unterstrichen), die Peptidsequenz des Peptidantikörpers (fett, unterstrichen), die nachgewiesenen Peptide zur Identifikation der Proteinsequenz aus der Massenspektroskopie (grün hinterlegt) sowie typische Peroxidasedomänen: *peroxidases active site signature* (PASS), nahe dem N-terminus, und *peroxidases proximal heme-ligand signature* (PPHLS) (beide orange hinterlegt) Austausch der AS N11I, R12S, A158P, G172R, V318L (PROVEAN Score: 0,562, 0,544, -1,203, -0,344, -1,938= neutral, rote Hervorhebung).

Eine Analyse der gDNA, basierend auf der Maislinie B73, ergab für *zmprx01* eine Unterbrechung des Gens durch zwei Introns mit einer Gesamtgröße von 7123 bp für die gesamte gDNA und eine Lokalisierung auf Chromosom 3 (siehe Abb. 100). Die Struktur ähnelt Klasse b der von Passardi gebildeten Klassen von Reisperoxidasegenen (Passardi *et al.*, 2004). Das erste Exon ist 15 bp und das zweite sechs Nukleotide größer als in der entsprechenden Reis-Klasse angegeben. *Zmprx70* besitzt eine Gesamtgröße von 1827 bp und ist auf Chromosom sieben lokalisiert. Die Genstruktur entspricht der Klasse c mit drei Exons und zwei Introns (siehe Abb. 101). Das *zmprx66*-Gen schließlich besitzt die typische in

3. Ergebnisse

Arabidopsis beobachtet Genstruktur mit vier Exons und drei Introns und einer Gesamtgröße von 1261 bp (siehe Abb. 102) und befindet sich auf Chromosom 2. Dieser Aufbau ist in 48 von 73 Klasse III Peroxidasegenen zu finden (Tognolli et al., 2002). Eine Analyse der Region 2000 bp stromaufwärts (-2000) des Startcodons durch die PLACE Datenbank (Higo et al., 1999) lieferte in allen Peroxidasen vergleichbare Elemente (siehe Tab. 25, Tab. 26 und Tab. 27). Es wurden Motive für *antioxidant responsive elements* (ARE) sowie WBox Elemente (WRKY) detektiert. Zudem fanden sich Elemente die im Zusammenhang mit zahlreichen Stressantworten (Trocken-, Wasser-, Salzstress, Verwundung, Pathogenantwort) und Phytohormonen (Gibbereline, Auxine, Salicylsäure) stehen. Daneben kamen Elemente für die gewebespezifische Expression in Wurzeln und Samen vor.

Um die Auswirkungen der Substitutionen in den Proteinen auf Lokalisation und posttranslationale Modifikationen abzuschätzen, wurde eine *in silico* Analyse mit den Sequenzen aus Hi-II A x Hi-II B durchgeführt. Die Tabellen 18 bis 21 fassen die erhaltenen Daten zusammen.

Tab. 18: *In silico* Analyse der Tertiärstruktur von ZmPrx01, ZmPrx66 und ZmPrx70, sowie posttranslationale Modifikationen.

Maislinie	Protein	AA	Template	α -Helices	β -Faltblätter	Cys	Disulfide	NGlyc	Oglyc	NetPhos		
										Ser	Thr	Tyr
W22	ZmPrx01	367	3HDL	13	2	11	4	3	24	10	8	3
	ZmPrx70	321	1SCH	15	4	9	4	3	14	7	4	4
	ZmPrx66	320	1SCH	15	2	9	4	3	16	13	3	4
Hi-II A x B	ZmPrx01	367	3HDL	13	2	11	4	3	24	13	8	4
	ZmPrx70	321	1SCH	15	4	9	4	3	13	7	4	4
	ZmPrx66	320	1SCH	15	2	9	4	3	15	13	3	4

Tab. 19: *In silico* Analyse der Signalpeptide und Prüfung auf vorhandene transmembrane Domänen der Sequenzen von ZmPrx01, ZmPrx66 und ZmPrx70.

Maislinie	Protein	Phobius		SignalP 3.0	SoSuiSignal	TMHMM	HMMTOP
		Signal	TM				
W22	ZmPrx01	1-33	-	1-33/cut	1-33	1 TMD	1 TMD
	ZmPrx70	1-25	-	1-25/cut	1-29	1 TMD	1 TMD
	ZmPrx66	1-29	-	1-29/cut	1-29	1 TMD	1 TMD
Hi-II A x B	ZmPrx01	1-33	-	1-33/cut	1-33	1 TMD	1 TMD
	ZmPrx70	1-25	-	1-25/cut	1-29	1 TMD	1 TMD
	ZmPrx66	1-26	-	1-29/cut	1-29	1 TMD	1 TMD

Tab. 20: *In silico* Analyse der Signalpeptide zur Lokalisierung von ZmPrx01, ZmPrx66 und ZmPrx70. Experimentelle Daten entsprechend Mika *et al.* (2008).

	Protein	Experimentell	PSORT	BaCeLo	TargetP
W22	ZmPrx01	PM	Extrazellulär	Sekretorisch	Sekretorisch
	ZmPrx70	PM	ER/PM	Sekretorisch	Sekretorisch
	ZmPrx66	PM	Tylakoid	Sekretorisch	Sekretorisch
Hi-II A x B	ZmPrx01	-	Extrazellulär	Sekretorisch	Sekretorisch
	ZmPrx70	-	ER/PM	Sekretorisch	Sekretorisch
	ZmPrx66	-	Extrazellulär	Sekretorisch	Sekretorisch

Tab. 21: Grundlegende Eigenschaften von ZmPrx01, ZmPrx66 und ZmPrx70 auf Basis einer Analyse von ProtParam (theoretische Werte), experimenteller Belege von Mika *et al.* (2008)* sowie dieser Studie

	ZmPrx01	ZmPrx01 _{rec}	ZmPrx70	ZmPrx70 _{rec}	ZmPrx66	ZmPrx66 _{rec}
AA (n)	367	359	321	329	320	326
MW _{theo} (kDa)	38,33	38,19	33,5	34,73	33,49	34,74
MW _{exp} (kDa)	98*	-	55*	ca. 40	57*	-
<i>pI</i> _{theo}	6,81	5,86	9,21	8,85	8,39	6,91
<i>pI</i> _{exp}	5,2*	-	10,1*	-	9,2*	-

Zur Abschätzung möglicher C-terminaler Sequenzen (CTP) für einen Transport in die Vakuole bzw. die Tonoplastenmembran wurde ein Sequenzvergleich zwischen Proteinen mit bekannter Lokalisation in der Vakuole (Carter *et al.*, 2004) sowie HRP1a in deren C-Terminus ebenfalls ein *Vacuolar Sorting Signal* (VSS) vorkommt mit ZmPrx01, ZmPrx66 und ZmPrx70 durchgeführt. Im Bereich der C-terminalen Verlängerung konnte ein VSS ähnliches Motiv bei ZmPrx01 detektiert werden, ZmPrx66 und ZmPrx70 zeigen derartige Motive nicht (siehe Abb. 14).

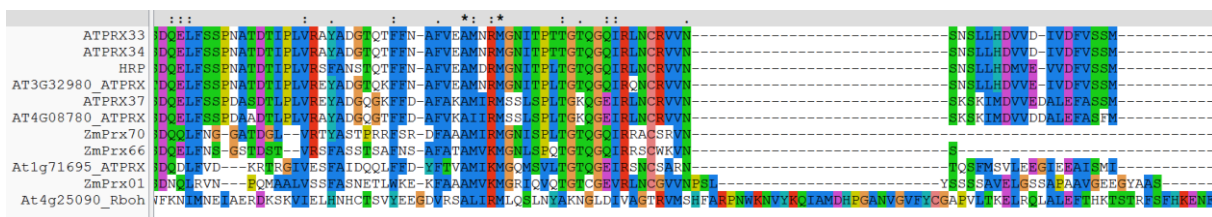


Abb. 14: Sequenzvergleich von Proteinen mit vorhandenen *Vacuolar Sorting Signal* (VSS) im C-Terminus mit ZmPrx01, ZmPrx66 und ZmPrx70.

Zur Abschätzung der Gewebelokalisation von ZmPrx01, ZmPrx 66 und ZmPrx 70 wurde eine Analyse von Mikroarraydaten basierend auf ESTs (Sekhon *et al.*, 2011) durchgeführt und diese mit dem eFP-Browser (Winter *et al.*, 2007) dargestellt. Alle untersuchten Peroxidasen

3. Ergebnisse

zeigten eine starke Expression in der Primärwurzel. Diese ist bei *zmprx66* und *zmprx70* auf diese beschränkt, *zmprx01* zeigt zudem schwächere Signale in Meristemen (Apikalmeristeme, Meristeme in Blättern) und der Koleoptile und weiteren Organen (siehe Abb. 97, Abb. 98 und Abb. 99).

3.4. Lokalisierung von ZmPrx01, ZmPrx66 und ZmPrx70

Die Lokalisation von ZmPrx01, ZmPrx66 und ZmPrx70 sollte über weitere unabhängige Methoden bestätigt werden. Verwendet wurden die Immunogold-Detektion sowie die Herstellung von GFP-Fusionsproteinen.

3.4.1. Immunogold-Detektion

Da rekombinante Proteine zu diesem Zeitpunkt nicht zur Verfügung standen, wurden von der Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) Peptidantikörper (siehe 2.1.6.1) gegen ZmPrx01, ZmPrx66 und ZmPrx70 hergestellt und für Immunogold-Detektionen benutzt. Die erstellten Dünnschnitte (siehe 2.2.4.6) wurden mit den primären Antikörpern inkubiert (Verdünnung 1:1000), nach mehrfachen Waschen erfolgte die Inkubation mit sekundärem Antikörper konjugiert mit Gold, gefolgt vom Imaging am TEM. Für die Anfertigung der Schnitte wurden fünf Tage alte Maiskeimlinge verwendet, eingebettet wurden Wurzeln. Der Focus lag auf der Elongationszone, da die Zellen hier einen ausreichenden Grad an Differenzierung erreicht haben sollten.

Die Analyse der erhaltenen Dünnschnitte im TEM ließ zahlreiche Details der Zellen erkennen (siehe Abb. 15). Viele Zellen in diesem Gewebe zeichneten sich durch eine große Vakuole und ein daher stark komprimiertes Cytosol aus (siehe Abb. 20). Als Kontrolle für den sekundären Antikörper wurde ein Gewebeschnitt ohne Vorinkubation mit dem primären Antikörper inkubiert. Diese Negativkontrollen lieferten einen sauberen Hintergrund, es konnte keine Detektion festgestellt werden.

Für alle drei untersuchten Peroxidasen wurde eine vergleichbare subzelluläre Verteilung festgestellt. Es sind im Folgenden aussagekräftige Beispiele der untersuchten Peroxidasen dargestellt. Das deutlichste Signal wurde im ER bzw. an Ribosomen (siehe Abb. 17) detektiert. Des Weiteren konnten mit Detektionen im Golgi-Apparat eine Lokalisierung von ZmPrx01, ZmPrx66 und ZmPrx70 in einem Kompartiment des sekretorischen Weges nachgewiesen werden (siehe Abb. 18, Abb. 19 und Abb. 20). Detektionen an der PM und im

Apoplasten kamen ebenfalls vor (siehe Abb. 16, Abb. 17 und Abb. 20), lieferten aber kein so deutliches Signal wie das ER. Zusätzlich ließen sich auch Signale in Mitochondrien und Plastiden nachweisen (siehe Abb. 19 und Abb. 18). Hintergrundsignale waren kaum zu beobachten.

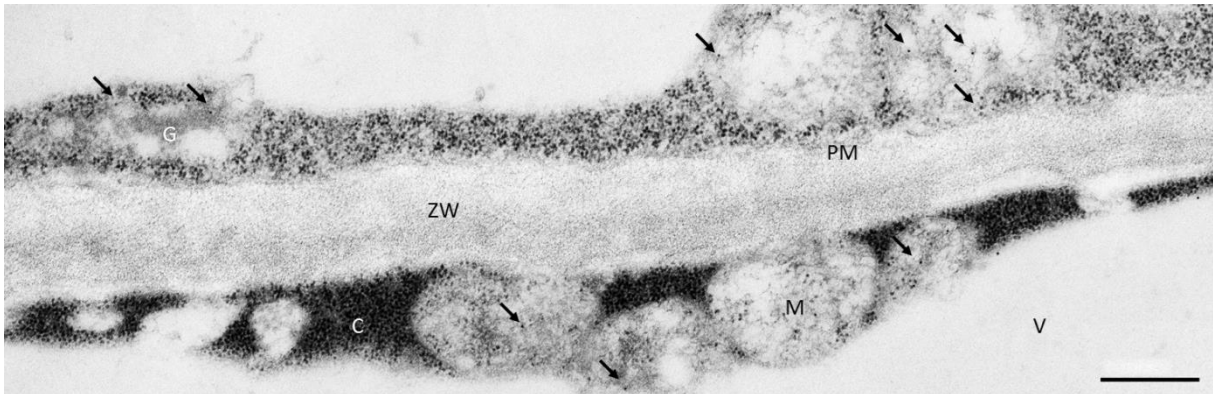


Abb. 15: TEM-Aufnahme nach der Immunogold-Detektion von ZmPrx66 in fünf Tage alten Maiswurzelzellen. Übersicht über einen Teil des Apoplasten zweier benachbarter Zellen, erkennbar waren Mitochondrien, das dichte Cytoplasma, ein Golgi-Apparat sowie die Zellwand, die Plasmamembran und die Vakuole. Einzelne Goldpartikel (\varnothing 10 nm) waren auch in dieser Vergrößerung in Golgi-Apparat und Mitochondrien erkennbar. Bild zusammengesetzt aus 8 Einzelbildern. Einige Goldpartikel wurden zur Orientierung durch Pfeile gekennzeichnet. Der Maßstab entspricht 0,5 μ m. ER= endoplasmatisches Retikulum, M= Mitochondrium, ZW= Zellwand, PM= Plasmamembran G= Golgi-Apparat, V= Vakuole.

Die Suche nach geeigneten Gewebeabschnitten, die aufgelockert genug waren um einzelne Elemente gut zu identifizieren, sowie anhand sichtbarer Membranen eine Trennung der Kompartimente zuließen, erwies sich als aufwändig. Oft zeigten geeignete Bereiche keine ausreichende Auflösung der Feinstrukturen, oder gesuchte Kompartimente fehlten ganz.

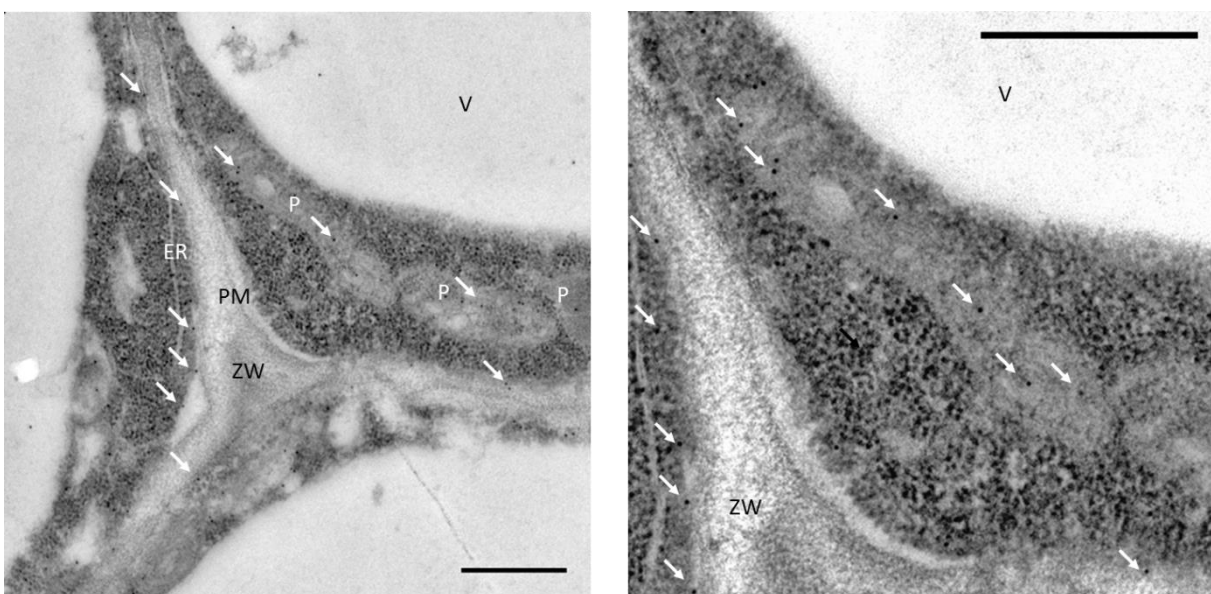


Abb. 16: TEM-Aufnahme nach der Immunogold-Detektion von ZmPrx01 in acht Tage alten Maiswurzelzellen. Übersicht (links) und Ausschnitt (rechts) zur Verdeutlichung der Verteilung der Goldpartikel (\varnothing 10 nm) im

3. Ergebnisse

Präparat. Es ließen sich Detektionen an der Grenze des Apoplasten zur Zelle ausmachen, weiter waren einzelne Goldpartikel im ER, dem Cytoplasma und Mitochondrien zu erkennen. Einige Goldpartikel wurden zur Orientierung durch Pfeile gekennzeichnet. Der Maßstab entspricht 0,5 μm . ER= endoplasmatisches Retikulum, M= Mitochondrium, CW= Zellwand, P= Plastid, PM= Plasmamembran.

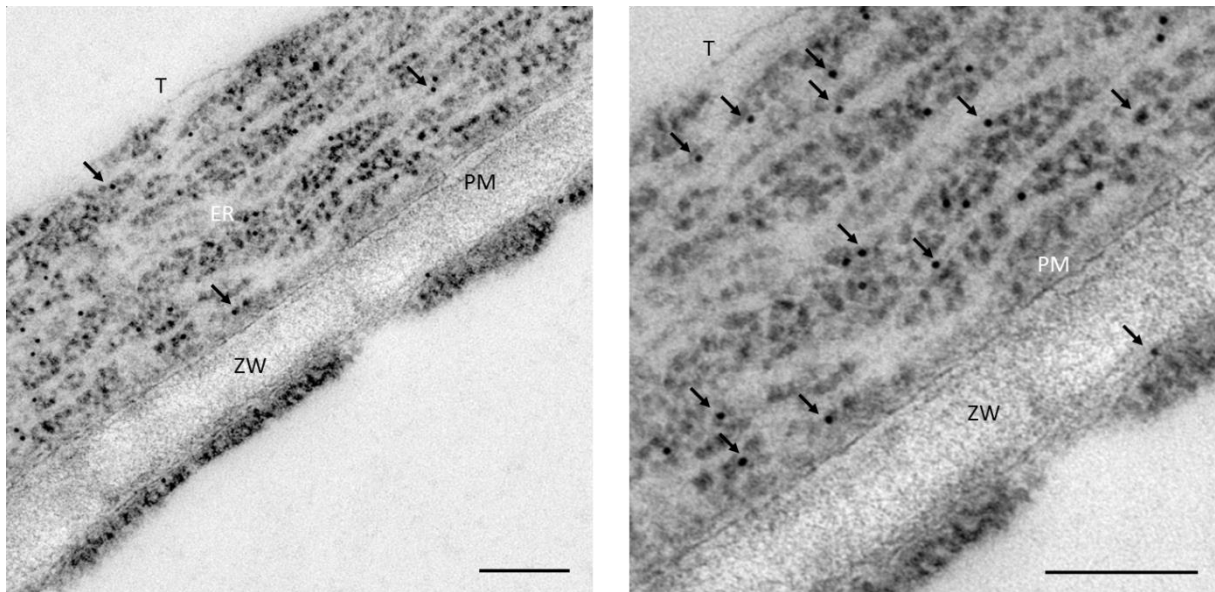


Abb. 17: TEM-Aufnahme nach der Immunogold-Detektion von ZmPrx01 in acht Tage alten Maiswurzelzellen. Dieser Bereich des Dünnschnittes lies den Tonoplasten und die PM gut erkennen. Es fanden sich zahlreiche Detektionen im Bereich des ER, eine war nahe der PM zu erkennen (rechts, untere Bildhälfte). Einige Goldpartikel wurden zur Orientierung durch Pfeile gekennzeichnet. Der Maßstab entspricht 0,2 μm (links) und 200 nm (rechts). ER= endoplasmatisches Retikulum, M= Mitochondrium, ZW= Zellwand, T= Tonoplastenmembran, PM= Plasmamembran.

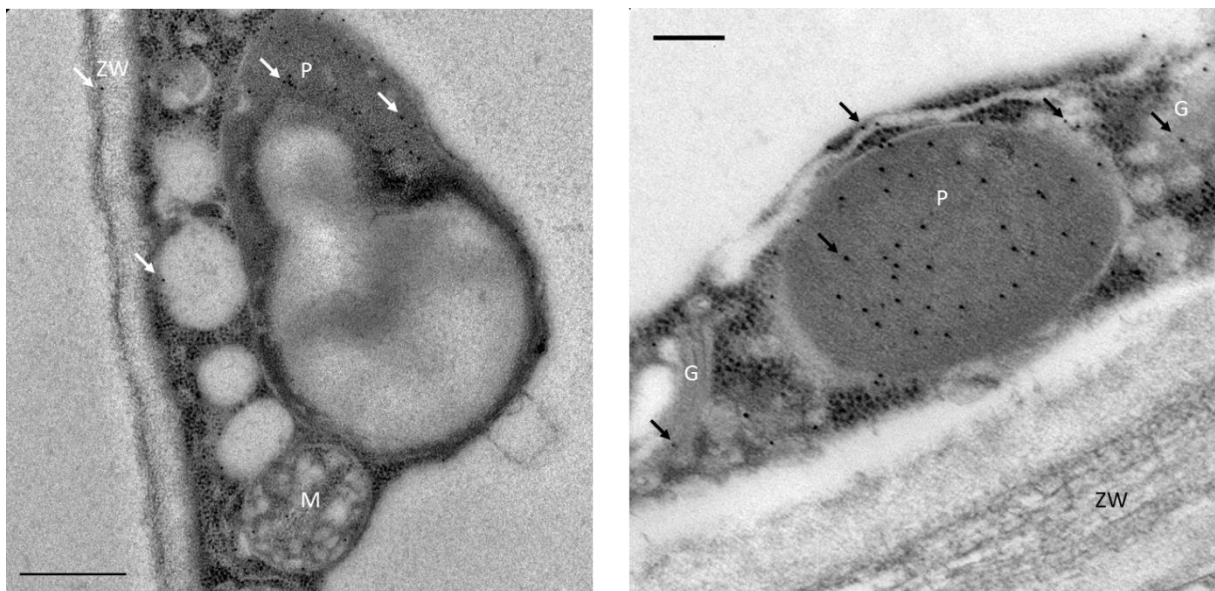


Abb. 18: TEM-Aufnahme nach der Immunogold-Detektion von ZmPrx01 in acht Tage alten Maiswurzelzellen. Zahlreiche Detektionen waren innerhalb vom Golgi-Apparat und entsprechenden Vesikeln zu finden. Einzelne Detektionen auch am rauen ER. Zudem gab es eine deutliche Detektion in Plastiden. Einige Goldpartikel wurden zur Orientierung durch Pfeile gekennzeichnet. Der Maßstab entspricht 0,2 μm . ZW= Zellwand, P= Plastid, G= Golgi-Apparat, M= Mitochondrium.

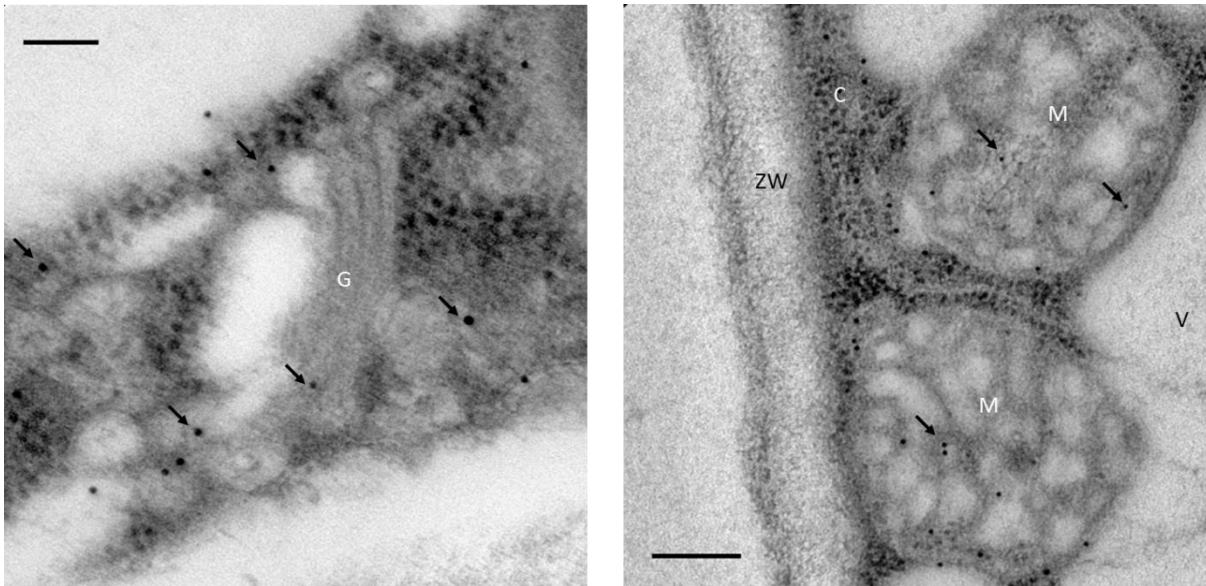


Abb. 19: TEM-Aufnahme nach der Immunogold-Detektion von ZmPrx01 in acht Tage alten Maiswurzelzellen. Vergrößerte Ansicht zur Darstellung der Detektionen im Golgi-Apparat (links) und Mitochondrien (rechts). Gut erkennbar waren die Detektionen auf der *trans*-Seite des Golgi-Apparates und in Golgi-Vesikeln. Deutlich waren auch die Detektionen im Mitochondrium zu erkennen. Einige Goldpartikel wurden zur Orientierung durch Pfeile gekennzeichnet. Der Maßstab entspricht 100 nm (links) und 0,2 μ m (rechts). M= Mitochondrium, ZW= Zellwand, G= Golgi-Apparat, C= Cytosol.

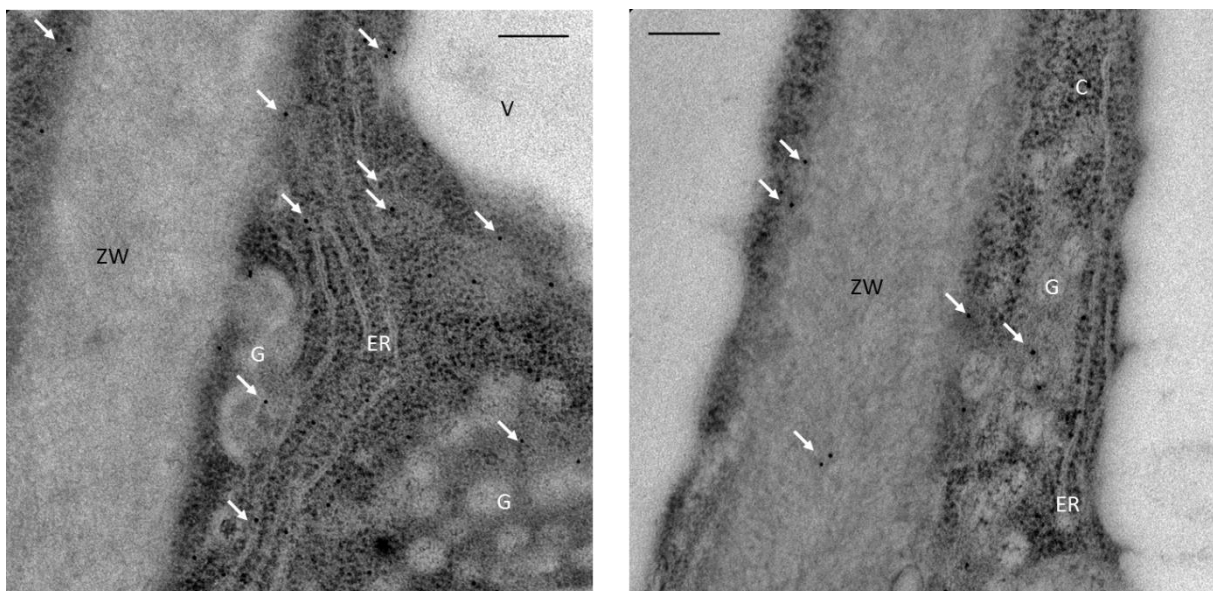


Abb. 20: TEM-Aufnahme nach der Immunogold-Detektion von ZmPrx70 in fünf Tage alten Maiswurzelzellen. Es fanden sich auch in dieser Präparation Detektionen im ER und dem Golgi-Apparat. An der Zellwand ließen sich ebenfalls Detektionen beobachten. Einige Goldpartikel wurden zur Orientierung durch Pfeile gekennzeichnet. Der Maßstab entspricht 0,2 μ m. ER= endoplasmatisches Retikulum, ZW= Zellwand, G= Golgi-Apparat, C= Cytoplasma.

3. Ergebnisse

3.5. Fusionsproteine

Erste transiente Experimente erfolgten mit den binären Konstrukten der stabilen Maistransformation. Zunächst wurde nur die Funktionalität von Chromophor und Induktionssystem in Maisembryonen überprüft (Siehe 3.5.1). Dieses System bot den Vorteil einer guten Transformationseffizienz und einer einfachen Probenvorbereitung für die Analyse unter UV-Lupe oder CLSM. Das Erstellen von Quetschpräparaten ist schnell und ohne großen Aufwand durchführbar und gestattete eine einfache Kontrolle vieler Transformationsansätze.

3.5.1. Test der Konstrukte und Aktivierung der Cre-Rekombinase

Im Gegensatz zum Aktivierungsprotokoll von stabil transformierten Maispflanzen wurde für die Vorversuche ein kürzeres Aktivierungsprotokoll verwendet, da das Gewebe weniger dicht war. Überprüft wurden die Fluoreszenz der Konstrukte sowie deren Expression unter aktivierten und nicht aktivierten Bedingungen, um eine Aussage über die Funktionalität und Induzierbarkeit des Systems zu erhalten. 14 Tage alte Maisembryonen der Inzuchtlinie A188 wurden wie unter 2.2.1.1 beschrieben transformiert und einem Hitzeschock unterzogen. Kontrolltransformationen erfolgten mit dem Vektor pD1-Ubi-GFP. Abb. 21 zeigt ein typisches Ergebnis dieses Versuches.

Die Positivkontrollen lieferten in diesen Experimenten eine hohe Dichte an gut detektierbaren Signalen, in den Negativkontrollen konnten keine Signale nachgewiesen werden. Für alle transformierten Konstrukte konnte eine GFP-Fluoreszenz beobachtet werden. Transformanten des Konstruktes p7i-UCre-ZmPrx70-GFP zeigten die höchste Fluoreszenzintensität, gefolgt von einer deutlich schwächeren Fluoreszenz bei p7i-UCre-ZmPrx01-GFP und einer sehr schwachen Fluoreszenz bei p7i-UCre-ZmPrx66-GFP in den Embryonen.

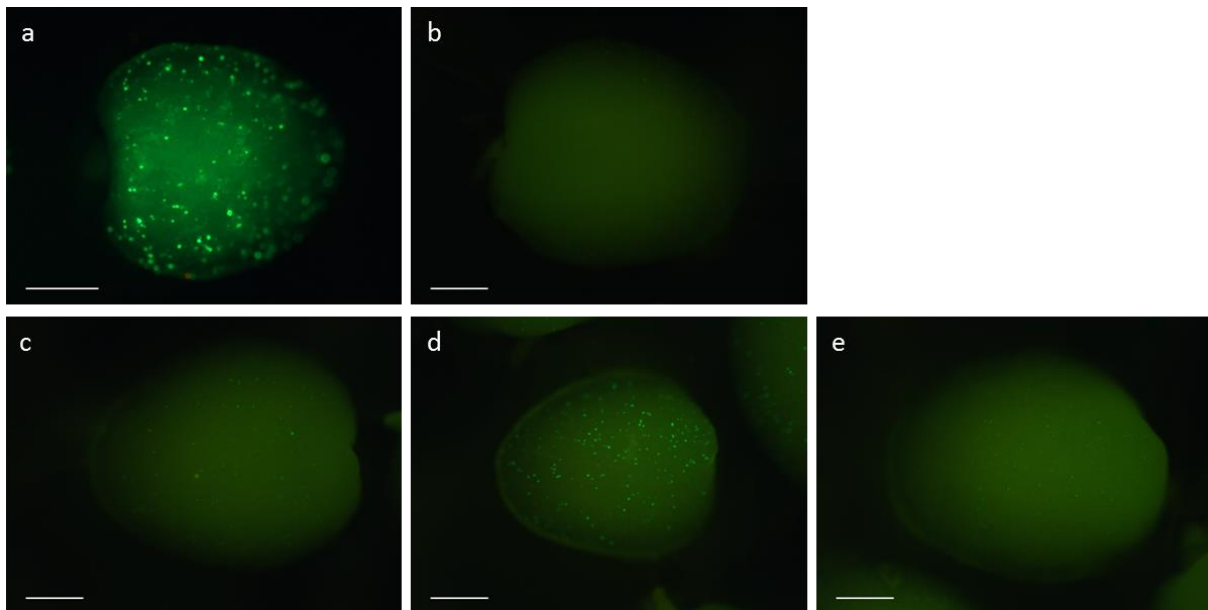


Abb. 21.: Aktivierung der Konstrukte der Peroxidase-GFP-Fusionsproteine über den GmHSP17.5E-Promotor und die Cre-Rekombinase. Biolistische Transformation 14 Tage alter Maisembryonen, Hitzeschock wurde einmal für 6 h bei 42°C durchgeführt a: Kontrollbeschuss mit Konstrukt pD1-Ubi-GFP 48 h nach Transformation und Inkubation bei 21°C b: negative Kontrolle, Konstrukt p7i-UCre-ZmPrx70-GFP ohne Induktion bei 42°C c: p7i-UCre-ZmPrx01-GFP d: p7i-UCre-ZmPrx70-GFP e: p7i-UCre-ZmPrx66-GFP, Maßstab 0,5 mm.

3.5.2. Transiente Expression

3.5.2.1. Homologes System

Für die Überprüfung der biolistischen Transformation sowie als Vergleich für Lokalisationsstudien wurde das Konstrukt pD1-Ubi-GFP immer parallel zu den Peroxidase-GFP-Fusionskonstrukten transformiert. Dieses Konstrukt führt zu einer starken Expression von GFP unter Kontrolle des starken konstitutiven Promotors Ubi1 aus Mais. Dieser trägt zusätzlich noch das erste Intron zur weiteren Steigerung der Expression.

Abb. 22 zeigt das typische Verbreitungsmuster von freiem GFP innerhalb der Zelle. Durch die geringe Größe von rund 27 kDa diffundiert es frei innerhalb des Cytoplasmas und dem Zellkern der Pflanzenzelle. Die beobachtete Fluoreszenz hatte eine hohe Intensität und war leicht unter einer UV-Lupe zu detektieren. Pro Transformationsansatz konnte eine hohe Zahl von transformierten Zellen beobachtet werden (siehe Abb. 21a).

3. Ergebnisse

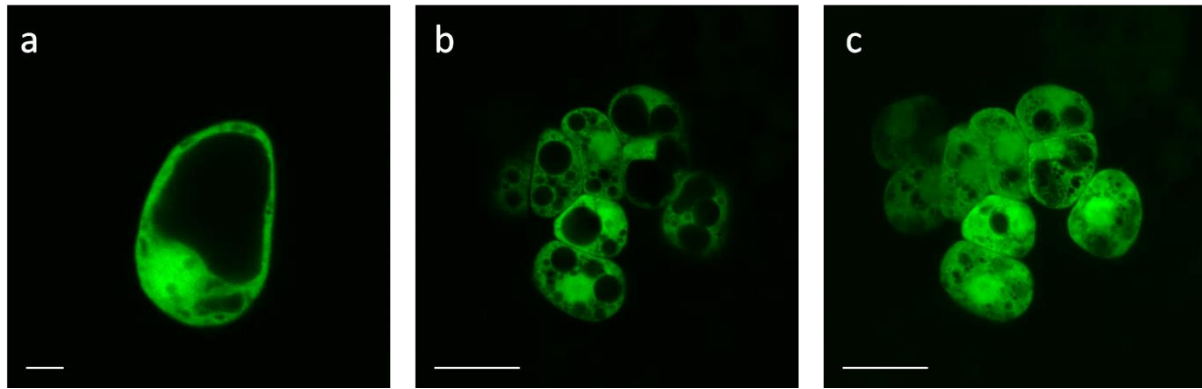


Abb. 22: CLSM-Aufnahmen einer biologischen Transformation mit dem Konstrukt pD1-Ubi-GFP von Maisembryonen (Inzuchtlinie A188). a: Einzelne transformierten Zelle. Deutlich zu erkennen war diffuse Verteilung der Fluoreszenz im Cytoplasma und im Zellkern. b: Gruppe transformierter Zellen mit erkennbaren Vakuolen und Zellkernen. c: Maximumprojektion der gleichen Gruppe aus 53 Ebenen. Zu erkennen war das teilweise Verschwinden klarer Strukturen durch Bewegungen während der Aufnahme der einzelnen Ebenen sowie durch die Überdeckung von Strukturen durch das Zusammenrechnen der Einzelaufnahmen. Maßstab: a: 5 μm , b und c: 20 μm .

Alle verwendeten Konstrukte ließen sich aktivieren und zeigten eine Fluoreszenz in embryonalem Gewebe. Die Intensität und Signalhäufigkeit unterschied sich jedoch deutlich vom Kontrollexperiment (siehe Abb. 21). Transformationen mit dem Konstrukt p7i-UCre-ZmPrx70-GFP lieferten die höchste Signalintensität und Dichte an Signalen, gefolgt von p7i-UCre-ZmPrx01-GFP und p7i-UCre-ZmPrx66-GFP. Die Embryonen wurden nach erfolgreichem Hitzeschock und einer Kontrolle auf Signale unter einer UV-Lupe für die Visualisierung der subzellulären Verteilung am CLSM vorbereitet. Aufgrund der Größe der Embryonen wurden keine Gewebsschnitte, sondern Quetschpräparate hergestellt. Auf eine Dünnschnittstellung am Mikrotom mit vorhergehender Einbettung wurde verzichtet, da die Verteilung in vitalen Zellen beobachtet werden sollte. Es konnten für alle Fusionsproteine transformierte Zellen beobachtet und entsprechende konfokale Fluoreszenzaufnahmen erstellt werden, die eine Bewertung der Verteilung in der Zelle zulassen sollten. Die teils schwache Signalstärke, welche Beobachtungen unter der UV-Lupe erschwerte, erschwerte die Analysen am CLSM nicht.

Das beobachtete Verteilungsmuster war unter den transformierten Konstrukten vergleichbar und unterschied sich deutlich vom Verteilungsmuster von freiem GFP (siehe Abb. 22 vergl. Abb. 23). Es zeigten sich feine, netzwerkartige Strukturen mit einzelnen Vesikeln. Im Gegensatz zu freiem GFP zeigte sich kein Signal im Zellkern und die Verbreitung in der Zelle erschien weniger diffus. Rund um den Zellkern ergab sich eine zum Inneren klar begrenzte Fluoreszenz, die sich zum Zellinneren ungleichmäßig ausdehnte.

Maximumprojektionen entsprechender z-Stacks verschleiern dieses Bild hin zu einem diffuseren Signal, der Zellkern tritt weniger deutlich hervor (siehe Abb. 23).

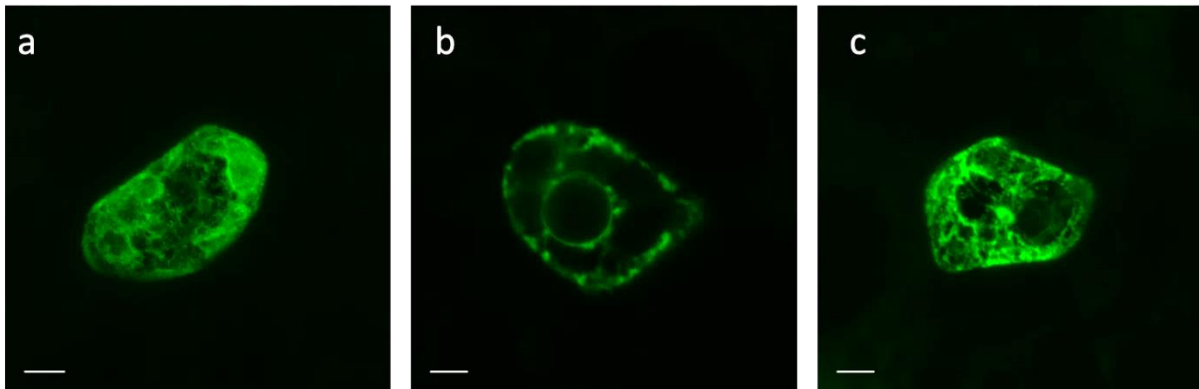


Abb. 23: CLSM-Aufnahmen biolistischer Transformationen (nach Hitzeinduktion bei 42°C für 6 h) mit Peroxidase-GFP-Fusionen von Maisembryonen (Inzuchtlinie A188). a: p7i-UCre-ZmPrx01-GFP b: p7i-UCre-ZmPrx70-GFP c: p7i-UCre-ZmPrx66-GFP. Alle drei Peroxidasen zeigten ein ähnliches Verbreitungsmuster, welches sich deutlich von der Kontrolle unterschied. Die sichtbaren Strukturen erschienen feiner, teilweise war ein feines Netzwerk sichtbar. Der Zellkern blieb frei von Signalen. Abb. a und c stellen Maximumprojektionen dar (a: 49 Ebenen, c: 41 Ebenen), Abb. b eine einzelne Sektion. Erneut wurde das Problem der Maximumprojektion bei der Darstellung feiner, unter Umständen aktiver, Strukturen deutlich. Das Verbreitungsmuster in a und c erschien deutlich diffuser als in b. Es sind in b feine Strukturen erkennbar, ebenso eine schmale Umrandung des Zellkerns sowie einzelne vesikelartige Strukturen. Maßstab: 5 μM .

Insgesamt ergaben sich aus diesen Versuchen erste Hinweise zu einer Lokalisation im ER der Zellen, da die Strukturen an das retikuläre Netzwerk älterer Zellen erinnerten, es traten jedoch auch Nachteile dieses Systems hervor. Durch die Beobachtung junger, nicht vollständig ausdifferenzierter Zellen lassen sich einzelne Kompartimente nur unklar erkennen (siehe Abb. 23). Zudem ist die Zellgröße in diesem Stadium sehr klein, was eine genaue Beobachtung zusätzlich erschwert. Das Gewebe besaß keine besonders auffällige Autofluoreszenz, positive Zellen waren deutlich vom umgebenden Gewebe zu unterscheiden. Das Imaging der GFP-Fluoreszenz konnte breitbandig bei 500-568 nm erfolgen. Zur genaueren Klärung der Lokalisation sollten Marker-Fusionsproteine Cotransformiert werden. Apoplastische Signale waren in diesem Gewebe nicht zu beobachten. Auch hier ergab sich die Frage, inwiefern der Differenzierungsgrad des Gewebes eine Rolle spielt. Das Maisembryonensystem stellte ein ausgezeichnetes System zur ersten Prüfung der Konstrukte dar, da die Transformation einfach durchführbar und kontrollierbar ist. Für eine aussagekräftige Analyse mit konfokaler Mikroskopie ergaben sich jedoch einige Schwierigkeiten, sodass folgende Versuche in einem anderen Gewebe durchgeführt wurden.

3. Ergebnisse

Da die Versuche im homologen System durchgeführt werden sollten, wurde zunächst an Mais als Versuchspflanze festgehalten. Um größere Zellen mit deutlicher differenzierten Kompartimenten zu erhalten, wurde das Protokoll an fünf Tage alte Maiswurzeln angepasst. Die Transformation dieses Gewebes war deutlich weniger effektiv, die Zahl an transformierten Zellen war weder in Kontrollexperimenten, noch in Transformationen der Fusionsproteine hoch. Die Inkubation bei 42°C für 6 h erwies sich ebenfalls als kritisch für eine gute Ausbeute an transformiertem Gewebe. Von positiven Wurzeln wurden Handschnitte erstellt und diese einer Analyse am CLSM unterzogen. Durch die deutlich größeren Zellen in der Elongationszone der Wurzeln konnten die subzellulären Strukturen deutlich besser aufgelöst werden.

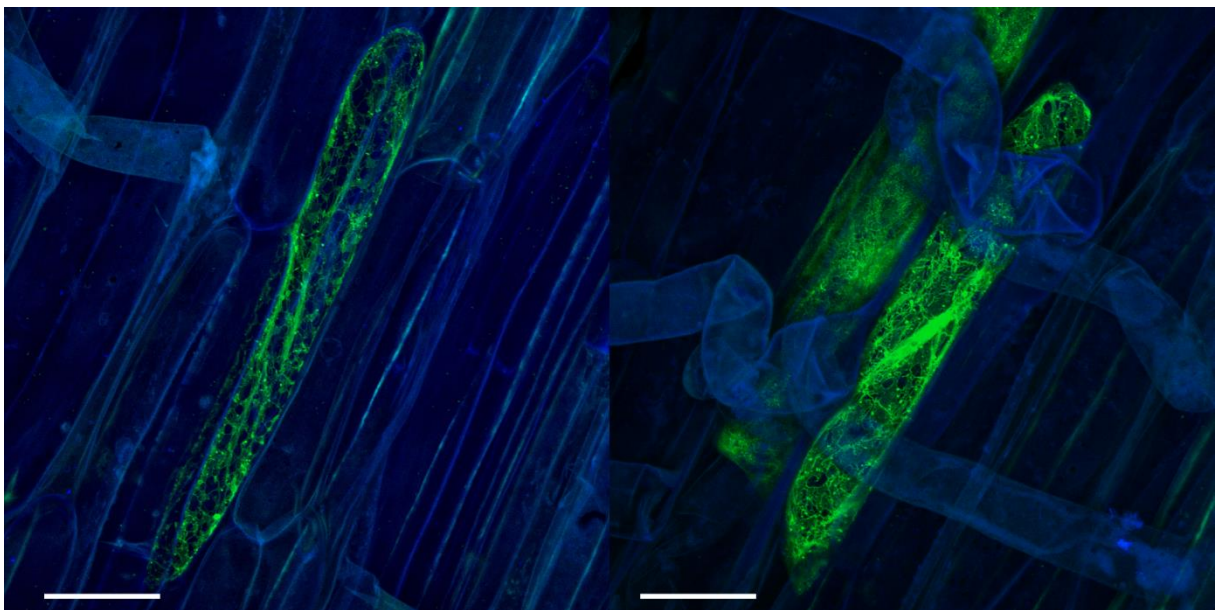


Abb. 24: Transiente Expression von p7i-UCre-ZmPrx70-GFP in fünf Tage alten Maiswurzelzellen (*Zea mays* cv. Gelber Badischer Landmais) nach biolistischer Transformation des Gewebes und einer Hitzeschockaktivierung. CLSM-Aufnahme mit einer Anregung der Zellwandfluoreszenz über einen 405 nm UV-Laser und der GFP-Fluoreszenz über eine 488 nm Laserlinie. Maximumprojektion aus 48 (links) und 61 (rechts) Einzelebenen. Maßstab: 50 µm.

Die sich ergebenden Verbreitungsmuster ähnelten den Mustern in Embryonen, ließen aber mehr Details erkennen. Das feine Netzwerk setzte sich aus flächigen und feinen Strukturen zusammen, welche sich zu größeren Strukturen zusammenfassten. Regelmäßig waren kleine, vesikelartige Strukturen zu erkennen (siehe Abb.24). Ein deutliches Signal an Plasmamembran oder in der Zellwand war nicht zu beobachten. Deutlich ausgebildete Zellwände führten in diesem Gewebe zu einem hohen Anteil an Autofluoreszenz, welche durch eine Hitzeschockbehandlung noch verstärkt wurde. An Schnittstellen war diese Autofluoreszenz nochmals erhöht. Die Aufnahmebedingungen wurden entsprechend

angepasst, um den Anteil an Autofluoreszenz im GFP Kanal gering zu halten. Das Imaging der GFP Fluoreszenz erfolgte engbandiger in einem Bereich von 500-525 nm. Dazu wurde die Zellwandautofluoreszenz mit einem 405 nm UV-Laser angeregt und in einem Bereich von 440-480 nm sequenziell aufgezeichnet. Die Hitzeschockbehandlung zur Aktivierung der Konstrukte zeigte einen deutlichen Einfluss auf die untersuchten Gewebe. Es war eine deutliche Steigerung der Autofluoreszenz und eine herabgesetzte Ausbeute an transformierten Zellen nach Transformation und Hitzeschock zu beobachten.

Die Konstrukte UCre-ZmPrx01-GFP, UCre-ZmPrx70-GFP und UCre-ZmPrx66-GFP wurden einer *in vitro* Cre-Rekombinasereaktion unterworfen, welches zur Exzision des HSP-cre-Aktivierungselementes führte und die Konstrukte somit aktivierte. Diese Konstrukte wurden nun für weitere Versuche benutzt.

Ein erster Test der Konstrukte in Zwiebelepidermiszellen zeigte in allen Fällen detektierbare Signale (siehe Abb. 25). CLSM-Aufnahmen der entsprechenden Präparate bestätigten auch in diesem System die subzelluläre Verteilung der ZmPrx-GFP-Fusionen. Ein weiterer Vorteil dieses Modellsystems war die sehr geringe Autofluoreszenz und leichte Vorbereitung der Präparate.

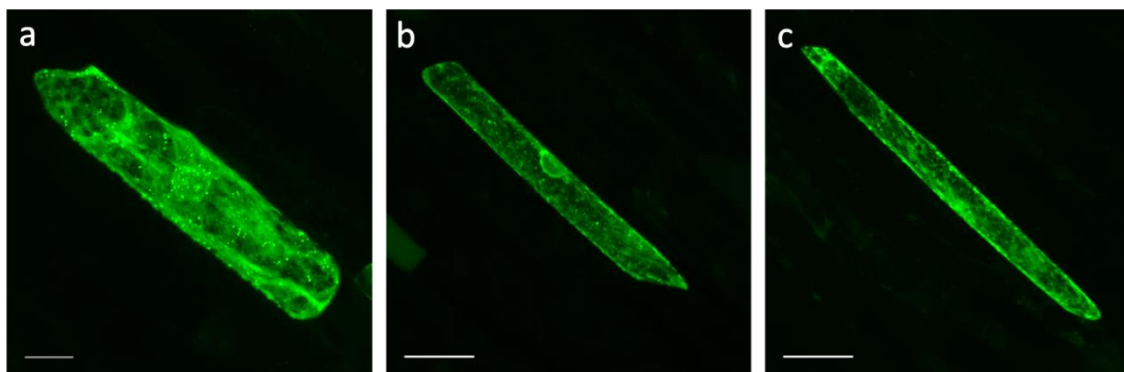


Abb. 25: CLSM-Aufnahmen transienter Expression von a: p7i-ZmPrx01-GFP, b: p7i-ZmPrx70-GFP und c: p7i-ZmPrx66-GFP in Zwiebelepidermiszellen nach biolistischer Transformation des Gewebes. GFP-Fluoreszenz angeregt mit 488 nm. Dargestellt sind Maximumprojektionen. Diese Vektoren entstanden aus einer *in vitro* Cre-Rekombinationsreaktion und sind durch Exzision der pHSP:cre:TOCS-Kassette dauerhaft aktiviert. Maßstab: a: 20 μ m, b, c: 50 μ m.

Für die genaue Bestimmung der subzellulären Lokalisation der ZmPrx-GFP-Fusionen wurden Marker verschiedener Kompartimente verwendet. Co-Lokalisationen mit einem ER-(ER-rk CD3-957, siehe 2.1.4.5) und Golgi-Marker (G-rk CD3-967, siehe 2.1.4.5) sollten den Eintritt der Peroxidasen in den sekretorischen Weg zeigen. Ein PM-lokalisiertes Protein (ZmPTI1a, siehe 2.1.4.5) wurde verwendet um ein klares PM-Signal abzubilden.

3. Ergebnisse

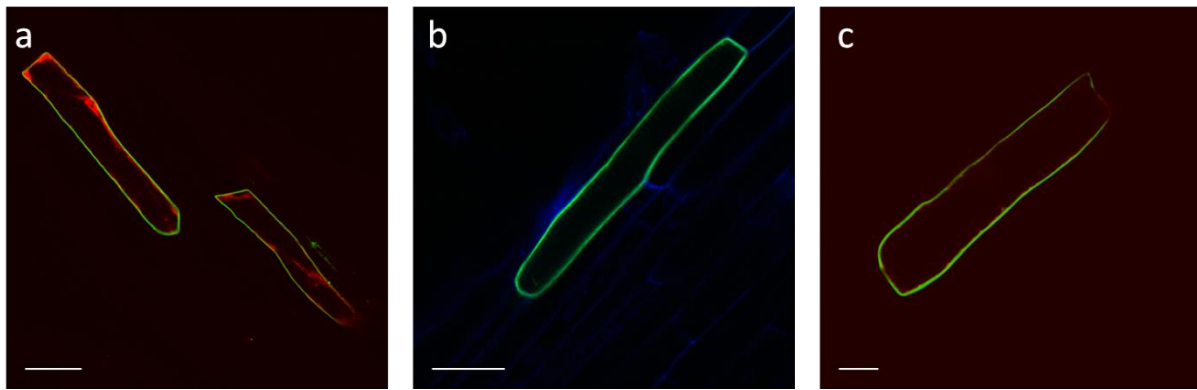


Abb. 26: CLSM-Aufnahmen der transienten Expression des auf ZmPti1a basierenden PM-Markers Myr-GFP (siehe 2.1.4.5), eines Markers des Endoplasmatischen Retikulums basierend auf AtWAK2 (siehe 2.1.4.5) sowie ein von GmMAN1 abgeleiteter Marker des *cis*-Golgi-Apparates (siehe 2.1.4.5) in fünf Tage alten Maiswurzelzellen (*Zea mays* cv. Gelber Badischer Landmais) nach biolistischer Transformation des Gewebes. Der PM-Marker wurde zur Visualisierung einer Plasmamembranlokalisation verwendet und war mit GFP fusioniert. Der ER-Marker diente zur Klärung einer möglichen Lokalisation im ER. In ER- und Golgi-Marker wurde als Fluorophor mCherry verwendet. a: Signal von ZmPti1a an der Plasmamembran der Wurzelzelle. Sie wurde mit dem ER-Marker ER-rk CD3-957 co-transformiert, der sich im inneren der Zelle als rote Fluoreszenz darstellte. b: Weitere Aufnahme eines typischen Fluoreszenzmusters an der Plasmamembran bzw. Zellperipherie. Schwach blau zu erkennen war die Autofluoreszenz der Zellwand. c: Maßstab a, b: 50 μm , c: 20 μm .

Abb. 26 zeigt typische Verteilungsmuster der verwendeten Marker in transformierten Maiswurzeln. Das auf ZmPTI1a basierende Konstrukt führt zu einem Signal an der PM bzw. Zellperipherie, teilweise ist eine Überlappung mit der apoplastischen Autofluoreszenz zu erkennen. Eng an der Membran anliegend und sich unregelmäßig zum Zellinneren verbreitend zeigt sich der ER-Marker. Das Signal dieses Markers zeigt eine starke Variation von Zelle zu Zelle. Es treten teilweise feine, netzartige Strukturen auf, oft lassen sich jedoch auch diffuse Muster erkennen. Die Markerproteine gaben einen Eindruck der morphologischen Anmutung bestimmter subzellulärer Lokalisationen. Insgesamt verliefen Versuche mit doppelter Transformation von Peroxidase-GFP-Fusionen und entsprechendem Marker wenig erfolgreich, da die Zahl an doppelt transformierten Zellen recht gering war und somit wenig Zellen pro Versuch analysiert werden konnten. Für Co-Lokalisationsstudien wurde daher auf Zwiebelepidermiszellen ausgewichen, da die Transformationseffizienz wesentlich höher und die Präparation der Zellen unkomplizierter war.

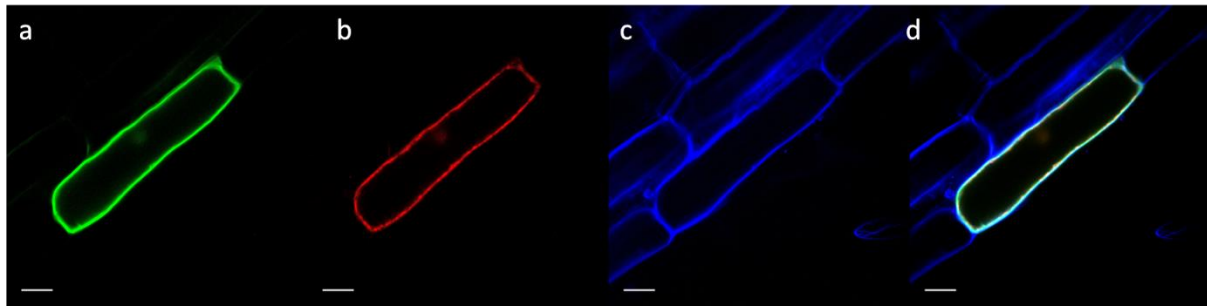


Abb. 27: CLSM-Aufnahmen der transienten Expression des auf GmMAN1 basierenden Markers G-rk CD3-967 des *cis*-Golgi-Apparates und des PM-Markers (Myr-GFP) in fünf Tage alten Maiswurzelzellen (*Zea mays* cv. Gelber Badischer Landmais). Auch in Teilen des ER konnte eine Fluoreszenz detektiert werden. Rot stellt die detektierte Fluoreszenz von mCherry dar, Blau die Autofluoreszenz der Zellwand und Grün GFP-Fluoreszenz. a: Darstellung eines definierten Signals an der Zellperipherie durch Myr-GFP b: Detektiertes Signal von mCherry, lokalisiert im ER und *cis*-Golgi c: Autofluoreszenz der Zellwand d: Überlagerung aller erfassten Signale zu einem Einzelbild. Gut zu erkennen war die klare Beschränkung des GFP-Signals auf die Plasmamembran, bzw. die Zellperipherie. Der Golgi-Marker zeichnete sich durch zahlreiche Vesikel und ein schwächeres Hintergrundsignal im retikulären Netzwerk aus. Maßstab: 20 µm.

Für die einzelnen Peroxidase-GFP-Fusionen wurden ohne Co-Lokalisationstudien Versuche in Mais durchgeführt und erhaltene Verteilungen der Fluoreszenz am CLSM beobachtet und dokumentiert. Das *Imaging* erfolgte wie unter 2.2.4.1 beschrieben mit einer engbandigen Aufzeichnung des GFP-Signals zwischen 500 und 525 nm nach Anregung mit 488 nm und der ergänzenden Abbildung der erhaltenen Autofluoreszenz der Zellwände nach Anregung durch einen 405 nm UV-Laser mit Detektion der Emission in einem Bereich von 440-480 nm.

In mit dem Konstrukt p7i-ZmPrx01-GFP transformierten Geweben konnten ähnliche subzelluläre Lokalisationen beobachtet werden wie in den vorangegangenen Versuchen (Siehe Abb. 24 und Abb. 25 vergl. Abb. 28). Viele stark exprimierende Zellen zeigten ein deutliches Signal am retikulären Netzwerk, das Auftreten von vesikulären Strukturen und einem deutlichen Signal an der Peripherie der Zellen. Dieses Signal überlagerte sich dabei teilweise deutlich mit dem apoplastischen Autofluoreszenzsignal (siehe Abb. 28). Durch die Vermeidung der Hitzeschockaktivierung erschienen die Gewebe weniger gestresst, was sich durch eine höhere Zahl an transformierten Zellen und ein geringeres Level an Autofluoreszenz erkennen ließ. Deutliche Signale an der Zellperipherie waren in vorherigen Experimenten nicht zu beobachten. Eine isolierte Betrachtung vom möglichen ER-Signal war nicht möglich, es zeigte sich in allen Zellen eine Mischung aus den beobachteten Lokalisationen (ER, Vesikel, Zellperipherie, siehe Abb. 29 und Abb. 30). Eine Unterscheidung von Signalen nahe der Zellperipherie erwies sich in diesen Zellen mit großer Vakuole als schwierig. Teilweise konnte nur ein schwaches Signal im ER und innerhalb der Zellen

3. Ergebnisse

beobachtet werden und ein deutlicheres GFP-Signal im Bereich des Apoplasten (siehe Abb. 28d-f und Abb. 30).

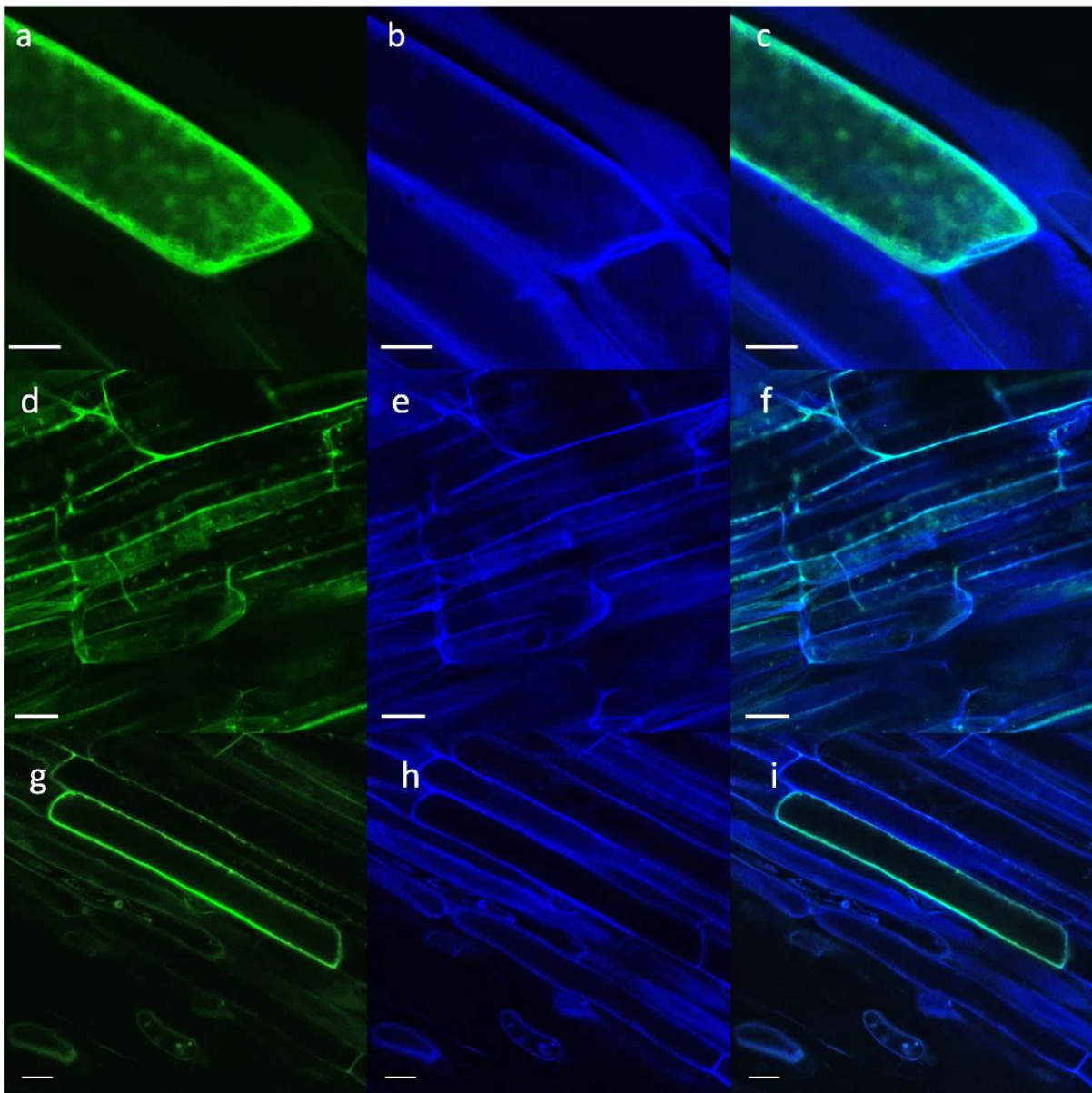


Abb. 28: Transiente Expression von ZmPrx01-GFP-Fusionen in verschiedenen Maiswurzelzellen nach biolistischer Transformation mit dem Vektor p7i-ZmPrx01-GFP. CLSM-Aufnahme. Dargestellt ist jeweils die aufgezeichnete GFP-Fluoreszenz in Grün (a, d, g), die Autofluoreszenz der Zellwand in Blau (b, e, h) und eine Überlagerung der Signale (c, f, i). Maßstab: 20 μm .

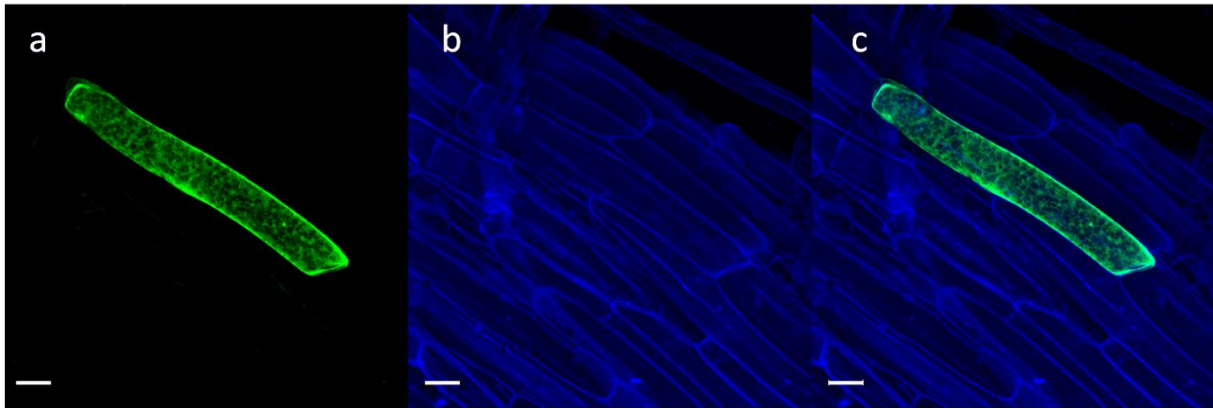


Abb. 29: Transiente Expression von ZmPrx01-GFP in Maiswurzelzellen nach biolistischer Transformation. CLSM-Aufnahme. Dargestellt sind jeweils die aufgezeichnete GFP-Fluoreszenz in Grün (a), die Autofluoreszenz der Zellwand in Blau (b) und eine Überlagerung der Signale (c). Darstellung als Maximumprojektion aus 52 Einzelebenen. Maßstab: 20 μm .

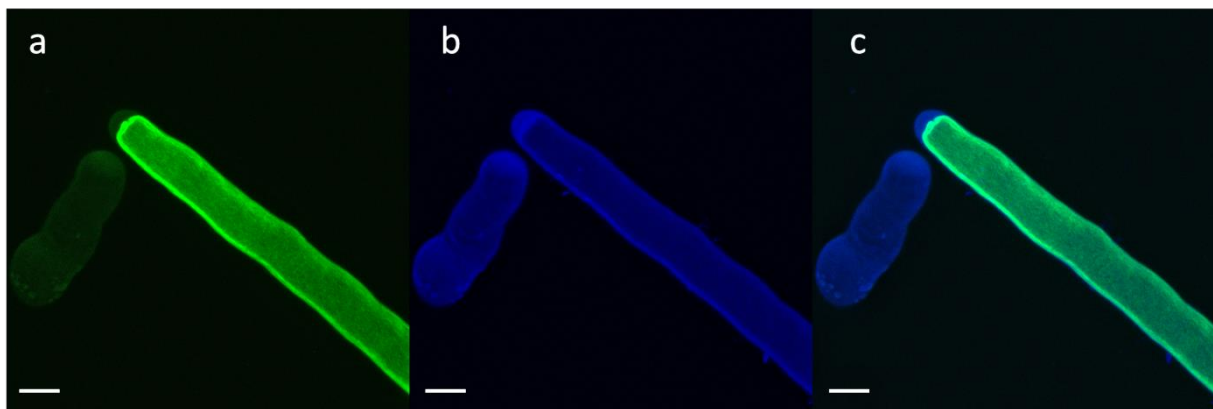


Abb. 30: Transiente Expression von ZmPrx01-GFP in Maiswurzelzellen nach biolistischer Transformation. CLSM-Aufnahme. Dargestellt sind jeweils die aufgezeichnete GFP-Fluoreszenz in Grün (a), die Autofluoreszenz der Zellwand in Blau (b) und eine Überlagerung der Signale (c). Darstellung als Maximumprojektion aus 56 Einzelebenen. Maßstab: 10 μm .

Transformationen mit dem Konstrukt p7i-UCre-ZmPrx70-GFP waren vergleichbar mit den Ergebnissen der ZmPrx01-Fusionen. Es konnte in diesen Transformationen kein eindeutig diffuses Signal im Apoplasten detektiert werden. Jedoch kommt es auch bei dem ZmPrx70-Fusionsprotein zu einer Überlagerung der GFP-Fluoreszenz und einem apoplastischen Autofluoreszenzsignal an der Zellperipherie (siehe Abb. 31). In manchen Zellen ergab sich keine deckende, sondern flickenartige Verteilung entlang der Peripherie (vgl. Abb. 31a-f). Im Inneren der Zellen konnten auch hier sowohl netzartige als auch diffusere, flächige Strukturen beobachtet werden (siehe Abb. 32).

3. Ergebnisse

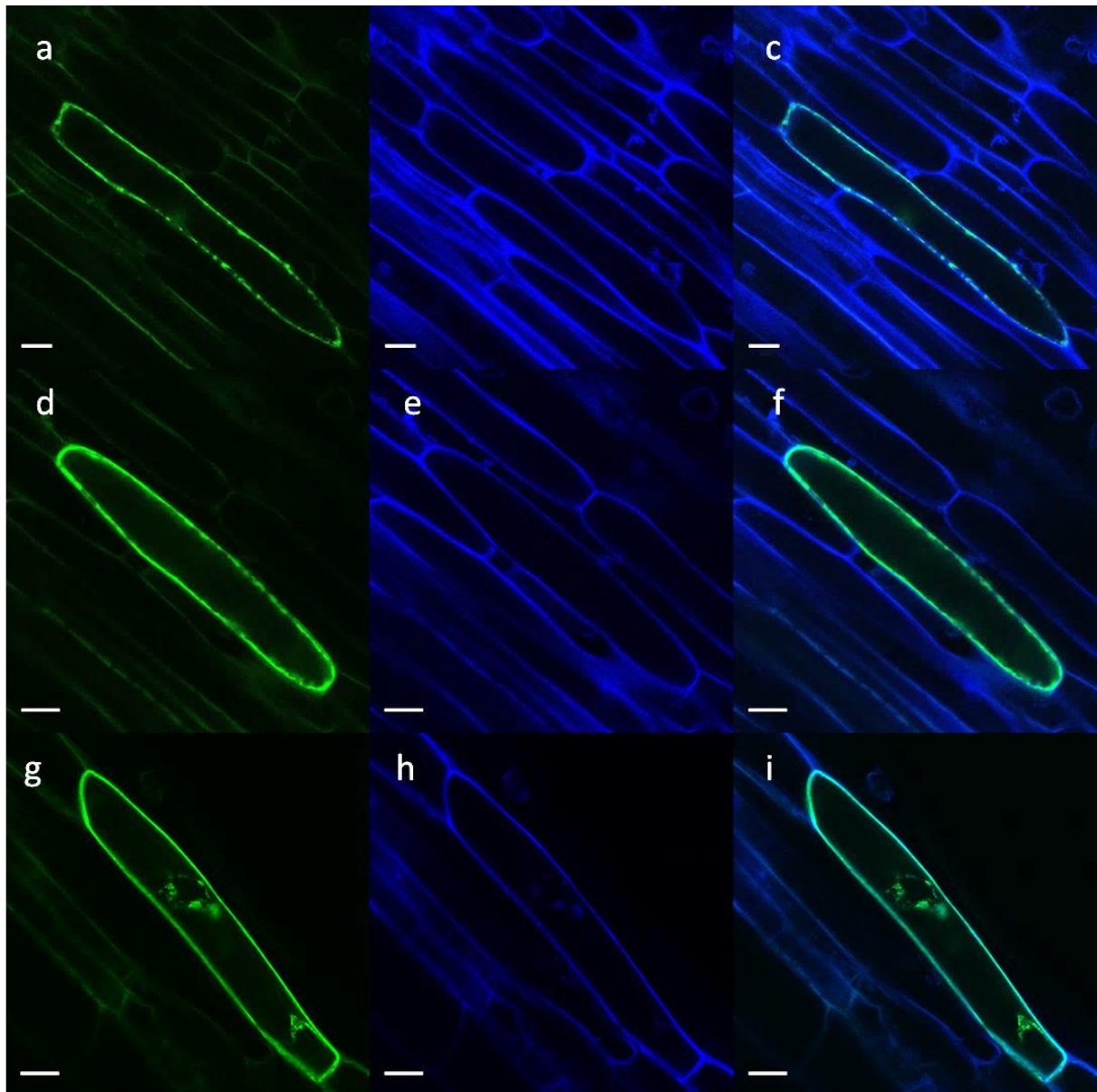


Abb. 31: Transiente Expression von ZmPrx70-GFP-Fusionen in Maiswurzelzellen nach biolistischer Transformation mit dem Vektor p7i-ZmPrx70-GFP. CLSM-Aufnahme. Dargestellt ist jeweils die aufgezeichnete GFP-Fluoreszenz in Grün (a, d, g), die Autofluoreszenz der Zellwand in Blau (b, e, h) und eine Überlagerung der Signale (c, f, i). Maßstab: 20 μm .

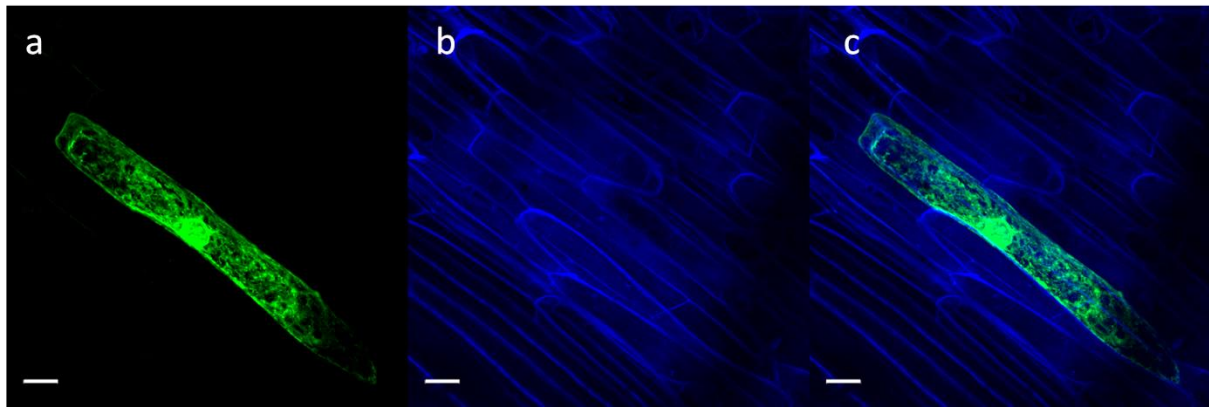


Abb. 32: Transiente Expression von ZmPrx70-GFP in Maiswurzelzellen nach biolistischer Transformation. CLSM-Aufnahme. Dargestellt sind jeweils die aufgezeichnete GFP-Fluoreszenz in Grün (a), die Autofluoreszenz der Zellwand in Blau (b) und eine Überlagerung der Signale (c). Darstellung als Maximumprojektion aus 50 Einzelebenen. Zur Veranschaulichung des ER-Netzwerkes wurde eine Projektion von mehreren Ebenen vorgenommen, gut zu erkennen ist die Abwechslung feingliedriger Strukturen mit flächigen Strukturen. Maßstab: 20 μm .

Biolistische Transformationen des Konstruktes p7i-UCre-ZmPrx66-GFP lieferten nur eine geringe Ausbeute an positiven Zellen. Es zeigte andere Verteilungen in transienten Experimenten in Mais als Experimente mit ZmPrx01 und ZmPrx70. Ein Signal an der Zellperipherie war nicht zu beobachten. Erste Experimente mit Co-Transformationen waren dennoch bei diesem Konstrukt erfolgreich und konnten ausgewertet werden. Die beobachtete GFP-Fluoreszenz colokalisierte größtenteils mit dem Marker ER-rk CD3-957 (siehe Abb. 33c). In einzelnen Bereichen ergab sich im GFP-Kanal eine geringere Fluoreszenzintensität und die Deckung der Signale erschien geringer (siehe Abb. 33).

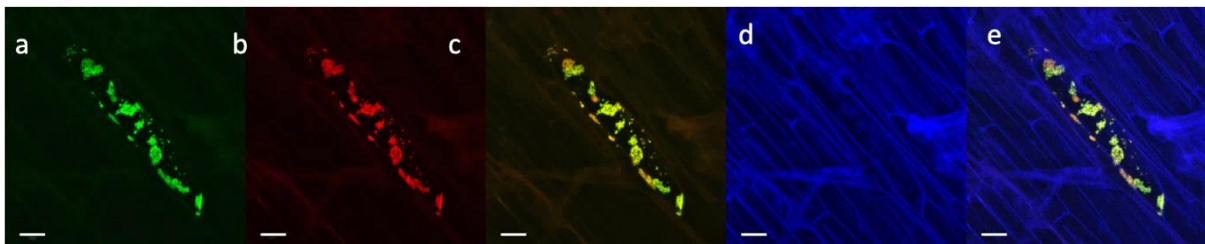


Abb. 33: Transiente Expression von ZmPrx66-GFP-Fusionen in Maiswurzelzellen nach biolistischer Transformation mit dem Vektor p7i-ZmPrx66-GFP und dem ER-Marker ER-rk CD3-957. Dargestellt ist jeweils die aufgezeichnete GFP-Fluoreszenz in Grün (a), mCherry-Fluoreszenz in Rot (b) die Autofluoreszenz der Zellwand in Blau (d) sowie die Überlagerung der Signale (c: ZmPrx66-GFP mit ER-rk CD3-957 und e: alle Signale). Maßstab: 20 μm .

3. Ergebnisse

3.5.2.2. Expression im heterologen System

Aufgrund der deutlich einfacheren Handhabung und Transformationseffizienz wurden für Co-Lokalisationsexperimente Zwiebelepidermiszellen verwendet. Diese Zellen ermöglichen durch eine vergleichbare Größe eine gute Beobachtung der Verteilungsmuster und erleichtern das Imaging der gefundenen Fluoreszenz durch einen geringeren Anteil an Autofluoreszenz. Es ist zudem einfach möglich eine einzige Zellschicht zu präparieren bzw. die Epidermisschicht vor der biologischen Transformation zu präparieren und auf einer Schicht MS-Agar zu transformieren.

Verwendet wurden die gleichen Positivkontrollen und Marker wie in bisherigen Experimenten. Abb. 34 zeigt eine Übersicht aus typischen Verbreitungsmustern in *Allium fistulosum*-Epidermiszellen. Die erste Reihe stellt die Positivkontrolle, freies GFP, in diesen Zellen dar. Es ergab sich auch hier das bisher beobachtete typische Bild mit einer freien Verteilung im Cytosol und dem Kern der Zelle. Gut zu erkennen war die starke Fluoreszenz und Cytoplasmastränge rund um die Vakuole.

Die Abb. 34d-i zeigt einen Versuch zur genaueren Darstellung der PM-Lokalisierung über die Plasmolyse/Deplasmolyse der Zellen. Die Abb. 34d-f stellt die normale Situation mit turgeszenter Zelle und der typischen Verteilung der Fluoreszenz an der Zellperipherie und im ER dar. Dem entsprechenden Präparat wurde dann 1M NaCl Lösung zugesetzt und die Plasmolyse beobachtet (Abb. 34g-i). Die entstehenden Hechtschen Fäden zeigen bei einer Lokalisation von Fusionsproteinen an der PM eine Fluoreszenz. Bleibt diese rund um die Zellen erhalten, ist keine Fluoreszenz in der Zellwand enthalten. Dieses Prinzip sollte bei der genauen Charakterisierung der Signale an der Zellperipherie helfen eine apoplastische und PM-Fluoreszenz zu unterscheiden. Der Marker Myr-GFP wurde ebenfalls eingesetzt um ein eindeutiges Signal an der Zellperipherie zu generieren.

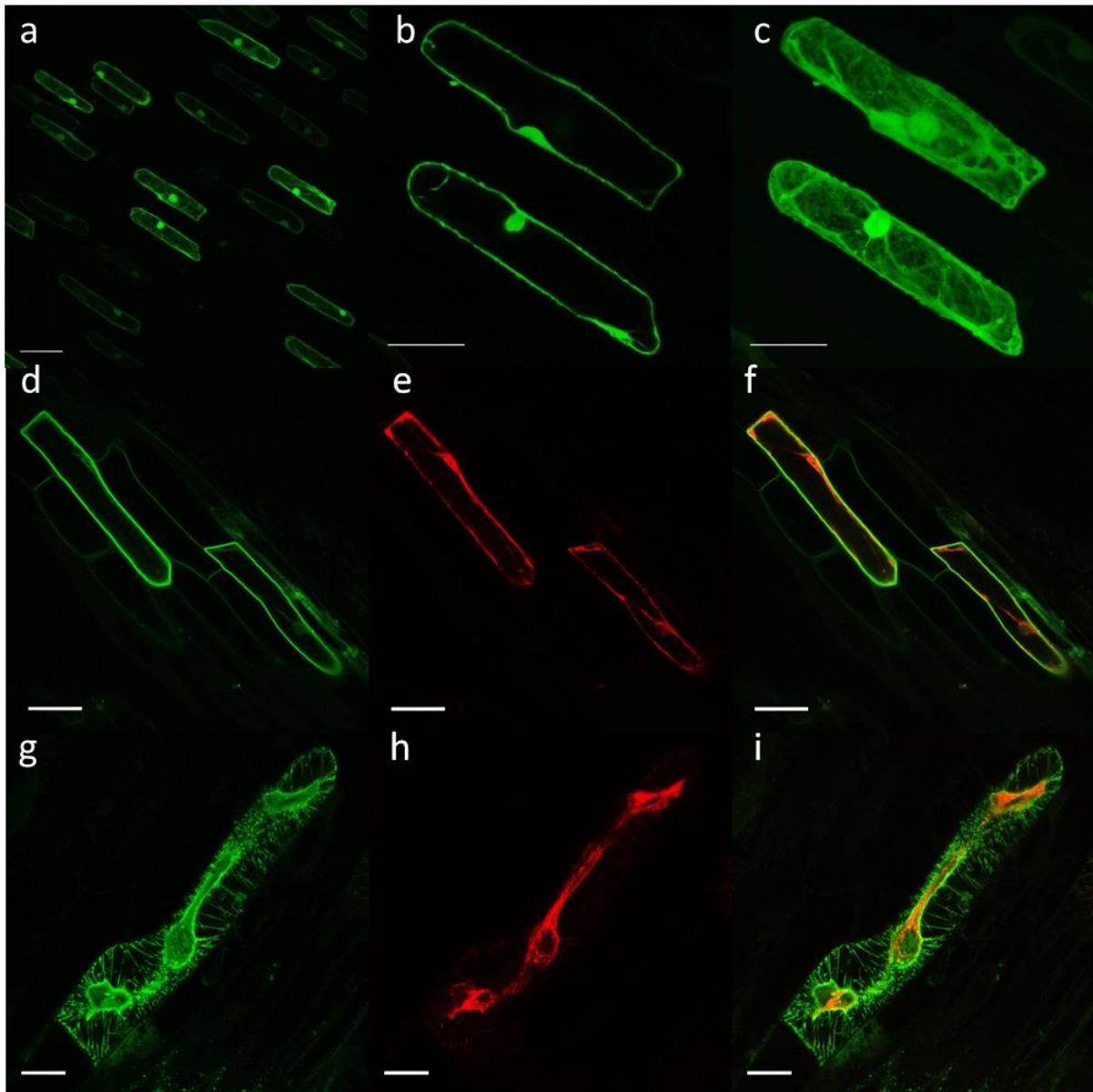


Abb. 34: Transiente Expression von freiem GFP (a-c), Myr-GFP und ER-rk CD3-957 (d-i) in Zwiebelepidermiszellen nach biolistischer Transformation sowie nach Plasmolyse (g-i). CLSM-Aufnahme. Dargestellt ist jeweils die aufgezeichnete GFP-Fluoreszenz in Grün, mCherry-Fluoreszenz in Rot sowie die Überlagerung der Signale. Maßstab: a: 100 μm; b, c: 50 μm; d-i: 20 μm.

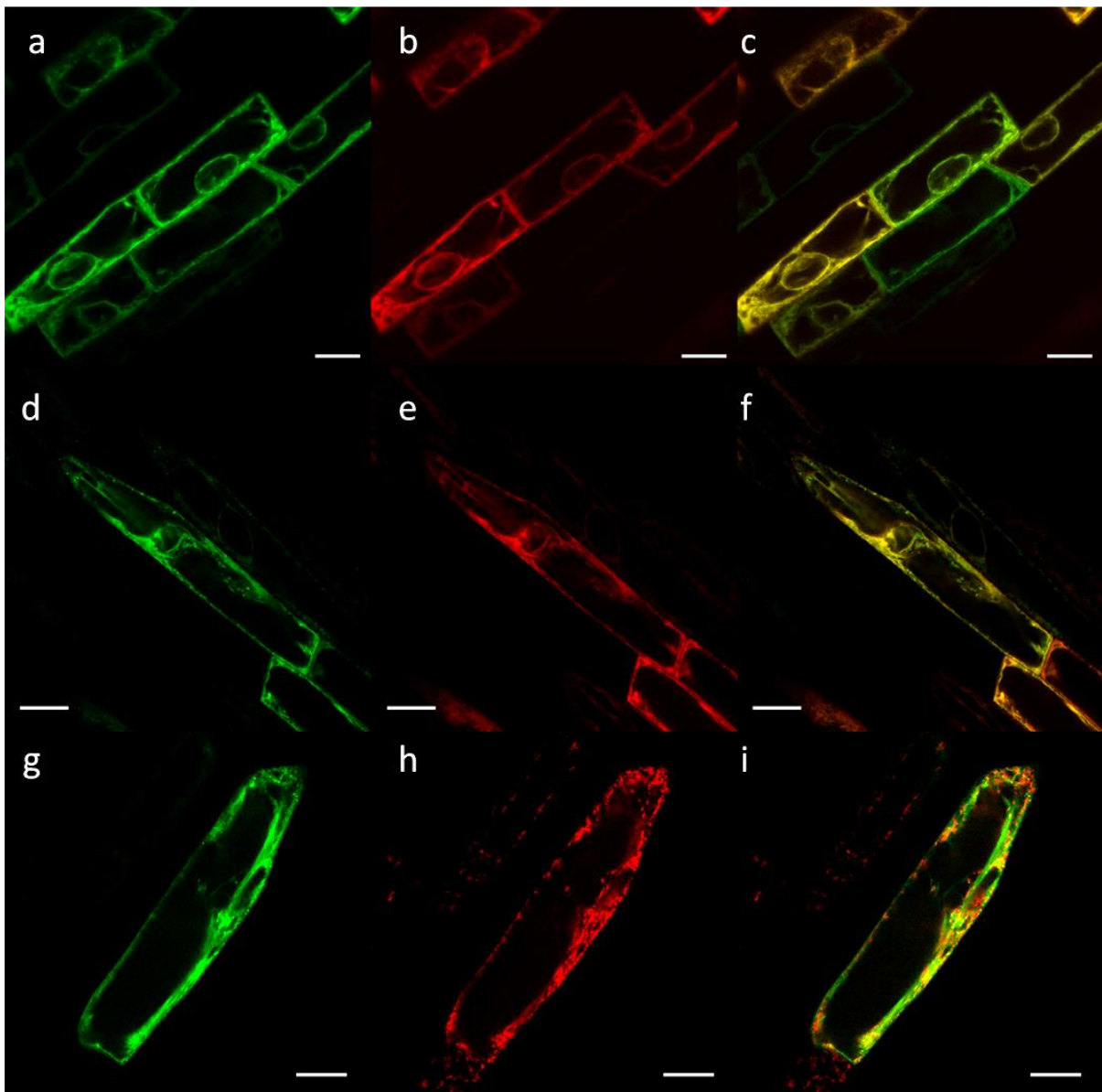


Abb. 35: Transiente Expression von ZmPrx01-GFP, ER-rk CD3-957 und G-rk CD3-967 in Zwiebelepidermiszellen nach biolistischer Transformation. CLSM-Aufnahme. Dargestellt ist jeweils die aufgezeichnete GFP-Fluoreszenz in Grün (a, d, g), die mCherry-Fluoreszenz in Rot (b, e, h) und die Überlagerung der Signale (c, f, i). Die Co-Transformation mit dem Vektor ER-rk CD3-957 bestätigte die vermutete Lokalisierung im ER der Zellen. Die Überlagerung der erhaltenen Fluoreszenzsignale zeigte eine gute Deckung (c), gut erkennbar am entstehenden gelben Farbsignal bei gleicher Fluoreszenzstärke von GFP und mCherry. Nicht dem ER zugeordnet werden konnten die vesikulären Strukturen. Eine Überlagerung mit dem mCherry Signal erfolgte nicht (f). Die Zuordnung dieser Strukturen zum *cis*-Golgi-Apparat konnte mit dem Marker G-rk CD3-967 nicht bestätigt werden. Es traten immer wieder einzelne Vesikel auf, die nicht mit der mCherry-Fluoreszenz colokalisierten (i). Maßstab: 20 µm.

Durch die verwendeten Marker konnten die Beobachtungen aus vorhergegangenen Experimenten bekräftigt werden. Es zeigte sich bei beiden untersuchten Konstrukten (p7i-UCre-ZmPrx01-GFP und p7i-UCre-ZmPrx70-GFP) eine sehr gute Co-Lokalisation mit dem verwendeten ER-Marker ER-rk CD3-959. Teilweise zeigten die Aufnahmen nicht überlappende Bereiche, meist Vesikel oder Bereiche mit hoher Mobilität. Diese hohe

Mobilität war in den ER-Regionen häufig zu beobachten und es konnte auch durch schnelles Scannen der Bereiche eine leichte Unschärfe nicht vollständig vermeiden werden.

Eine Co-Lokalisation mit dem Golgi-Marker G-rk CD3-967 konnte bei beiden Konstrukten nicht beobachtet werden. Dieser ist im ER sowie *cis*-Golgi lokalisiert (Saint-Jore-Dupas *et al.*, 2006). Der ER-Anteil zeigte sich in diesen Versuchen nur als sehr schwache Fluoreszenz, deutlich stärker war das mCherry-Signal im *cis*-Golgi Anteil sichtbar. Es zeigte sich keine Überlagerung in den sichtbaren Vesikeln. Diese sind damit weder Teil des ER-Netzwerkes, noch des *cis*-Golgi. Die Autofluoreszenz in diesem Gewebe war sehr gering und mit 405 nm Anregung nur bei hoher Laserleistung schwach detektierbar. Zugunsten schnellerer Scanzeit und einer Schonung der Präparate wurde auf ein Aufzeichnen der Autofluoreszenz daher verzichtet.

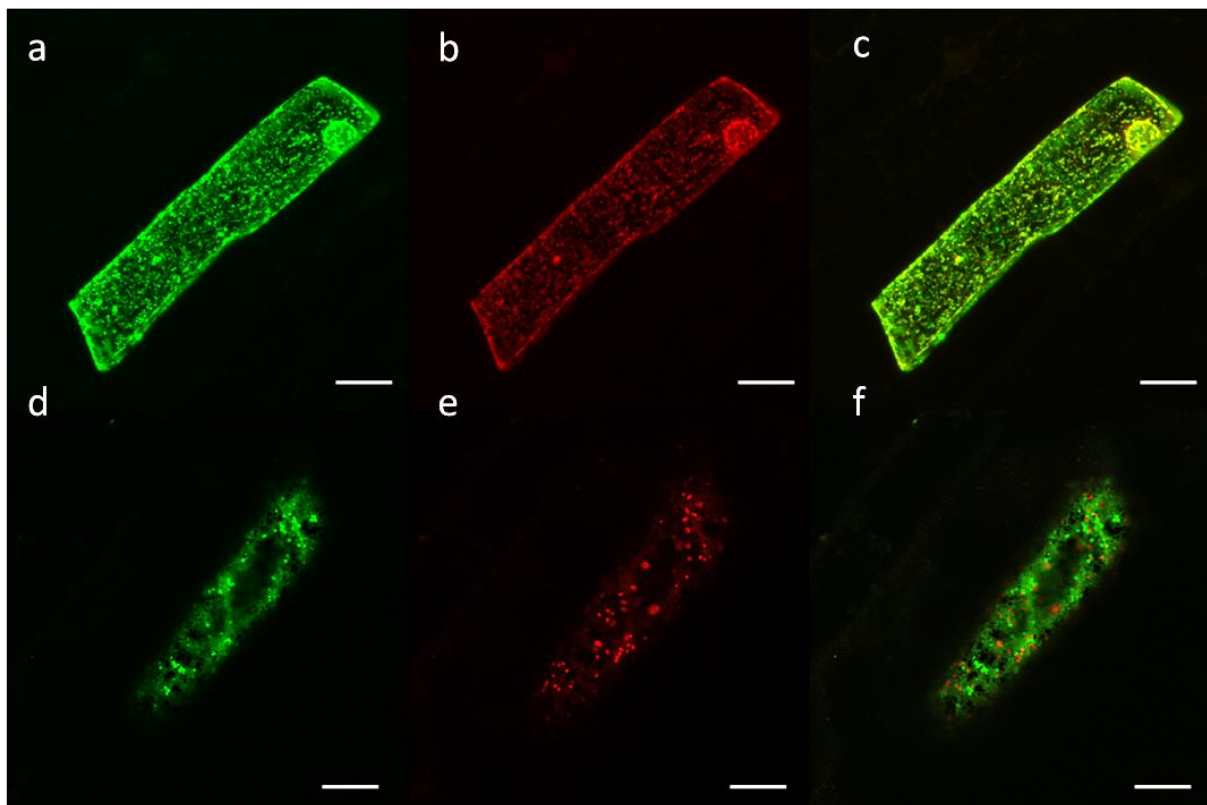


Abb. 36: Transiente Expression von ZmPrx70-GFP, ER-rk CD3-957 und G-rk CD3-967 in Zwiebelepidermiszellen nach biolistischer Transformation. CLSM-Aufnahme. Dargestellt ist jeweils die aufgezeichnete GFP-Fluoreszenz in Grün (a, d), die mCherry-Fluoreszenz in Rot (b, e) und eine Überlagerung der Signale (c, f). Es zeigte sich auch bei diesem Konstrukt eine Überlagerung des GFP-Signals mit der Fluoreszenz des ER-rk CD3-957 Konstruktes. Auch hier waren zahlreiche putative Vesikel zu beobachten, welche nicht dem ER zugeordnet werden konnten (c). Deutlich ist in e der ER Anteil des Markers G-rk CD3-967 erkennbar, deutlich wird in f erneut das Auftreten von nicht dem *cis*-Golgi zugehörigen Vesikeln. Maßstab: 20 μm .

ZmPrx01 besitzt im Gegensatz zu ZmPrx70 und ZmPrx66 eine auffällige Verlängerung am C-Terminus des Proteins. Um mögliche Signalpeptide in diesem Bereich nicht zu blockieren

3. Ergebnisse

wurde ein weiteres Konstrukt angefertigt, in welchem sowohl N- als auch C-Terminus nicht durch die Fusion mit GFP maskiert wurde. Zmprx01 wurde durch die mittige Unterbrechung durch das *gfp-Gen* inaktiviert. Da sich in einigen Präparaten aller Peroxidasen nach Inkubationszeiten < 16 h immer wieder Hinweise für einen erhöhten Anteil an apoptotischen Zellen zeigten, wurde die Inaktivierung von ZmPrx01 als zusätzlicher Vorteil empfunden. Dieses Konstrukt erwies sich in Versuchen jedoch als nicht funktionell und es konnte keine GFP-Fluoreszenz detektiert werden.

Es wurde daher ein weiteres Konstrukt erstellt, in welchem die Größe an ZmPrx01-Anteil auf beiden Seiten des Fluorophors auf ein sinnvolles Maß reduziert war. Da die Größe des Signalpeptides sowohl N- als auch C-terminal nicht experimentell bestimmt wurde, musste ohne Befunde eine sinnvolle Größe für die benötigten Peptide an N- und C-Terminus festgelegt werden. Das durch *in silico* Analyse bestimmte N-terminale Signalpeptid von ZmPrx01 hat eine Länge von 33 Aminosäuren mit einer postulierten Schnittstelle zwischen Position 33 (A) und 34 (Q) (siehe Tab. 19). Von dieser Vorhersage ausgehend wurden an N- und C-Terminus 45 Aminosäuren entsprechend N- und C-terminal mit GFP fusioniert.

Dieses Konstrukt erwies sich in der biolistischen Transformation als funktionell und es konnten Signale detektiert und aufgezeichnet werden. Die Analysen mit Co-Lokalisationen bestätigten auch bei diesem Konstrukt die vorherigen Ergebnisse (siehe Abb. 37 vergl. Abb. 35). Es zeigten sich weitestgehend Überlagerungen mit AtWAK1, einzelne Bereiche blieben jedoch ausgespart. Auffällig waren auch auftretende Vesikel in der Zelle. Mit GmMAN1 ergaben sich nur in netzwerkartigen Bereichen Überlagerungen, die vesikulären *cis*-Golgi Bereiche blieben ausgespart (siehe Abb. 37).

In den Co-Lokalisationsstudien ergaben sich nur für den ER Marker ER-rk CD3-959 klare Überlagerungen in der subzellulären Verbreitung (siehe Abb. 35, Abb. 36 und Abb. 37). Sämtliche Konstrukte zeigten keine Co-Lokalisierung mit den *cis*-Golgi Bereichen des Markers G-rk CD3-967.

Da sich in vorhergehenden Analysen das Konstrukt p7i-UCre-ZmPrx66-GFP kaum von den untersuchten Fusionen von ZmPrx01 und ZmPrx70 unterschied (siehe Abb. 25) wurden keine ergänzenden Untersuchungen mit diesem Konstrukt durchgeführt. Weitere Analysen erfolgten an stabil transformierten Maispflanzen.

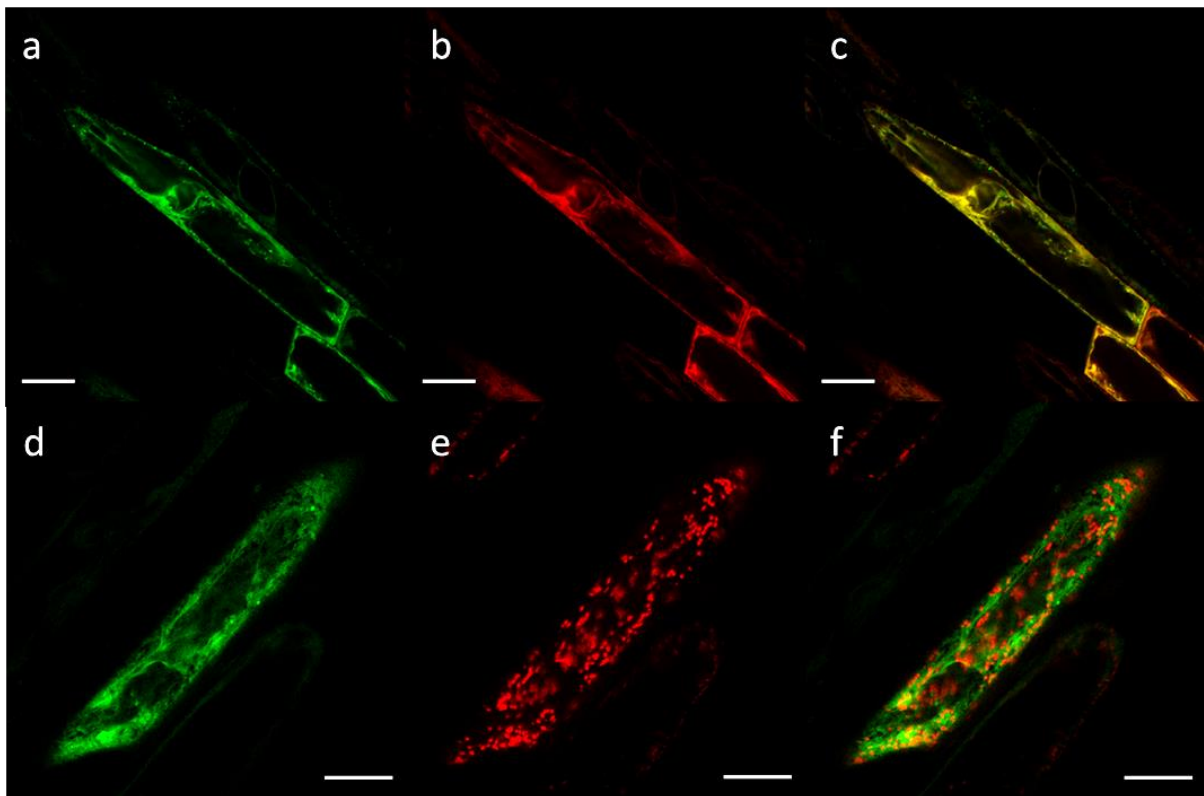


Abb. 37: Transiente Expression von ZmPrx01-GFP, ER-rk CD3-957 und G-rk CD3-967 in Zwiebelepidermiszellen nach biolistischer Transformation mit dem Konstrukt pUbi-ZmPrx01-GFP-IMb. CLSM-Aufnahme. Dargestellt ist jeweils die aufgezeichnete GFP-Fluoreszenz in Grün (a, d), die mCherry-Fluoreszenz in Rot (b, e) und eine Überlagerung der Signale (c, f). Auch dieses Konstrukt unterschied sich trotz Zugänglichkeit eines möglichen C-terminalen Signalpeptides nicht von vorherigen Versuchen. Es zeigte sich ebenfalls eine Co-Lokalisation von Peroxidase-GFP-Fusion und ER Marker (c), ebenfalls traten Vesikel auf, welche nicht mit dem *cis*-Golgi Marker Co-Lokalisierten (f). Maßstab: 20 μ m.

3. Ergebnisse

3.5.3. Agrobakterien vermittelte Transformation von Mais

3.5.3.1. Transformation unreifer Maisembryonen mit *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404

Nach erfolgreicher Überprüfung der Aktivierbarkeit und Funktionalität der Konstrukte wurde der Agrobakteriumstamm LBA4404 transformiert und in der stabilen Maistransformation eingesetzt.

Die Überexpressionskonstrukte wurden insgesamt in 31 Transformationen eingesetzt (p7i-UCre-ZmPrx01 n= 9, p7i-UCre-ZmPrx70 n= 10, p7i-UCre-ZmPrx66 n= 12), die Fusionsproteine wurden jeweils einmal in eine Transformation eingesetzt, dabei wurden jeweils 100-150 Embryonen transformiert. Es konnte Saatgut von 29 Pflanzen der Überexpressionskonstrukte (p7i-UCre-ZmPrx01 n= 14, p7i-UCre-ZmPrx70 n= 14, p7i-UCre-ZmPrx66 n= 1) erzeugt werden sowie 17 Pflanzen der Peroxidase-GFP-Fusionen (p7i-UCre-ZmPrx01-GFP n= 9, p7i-UCre-ZmPrx70-GFP n= 6, p7i-UCre-ZmPrx66-GFP n= 2).

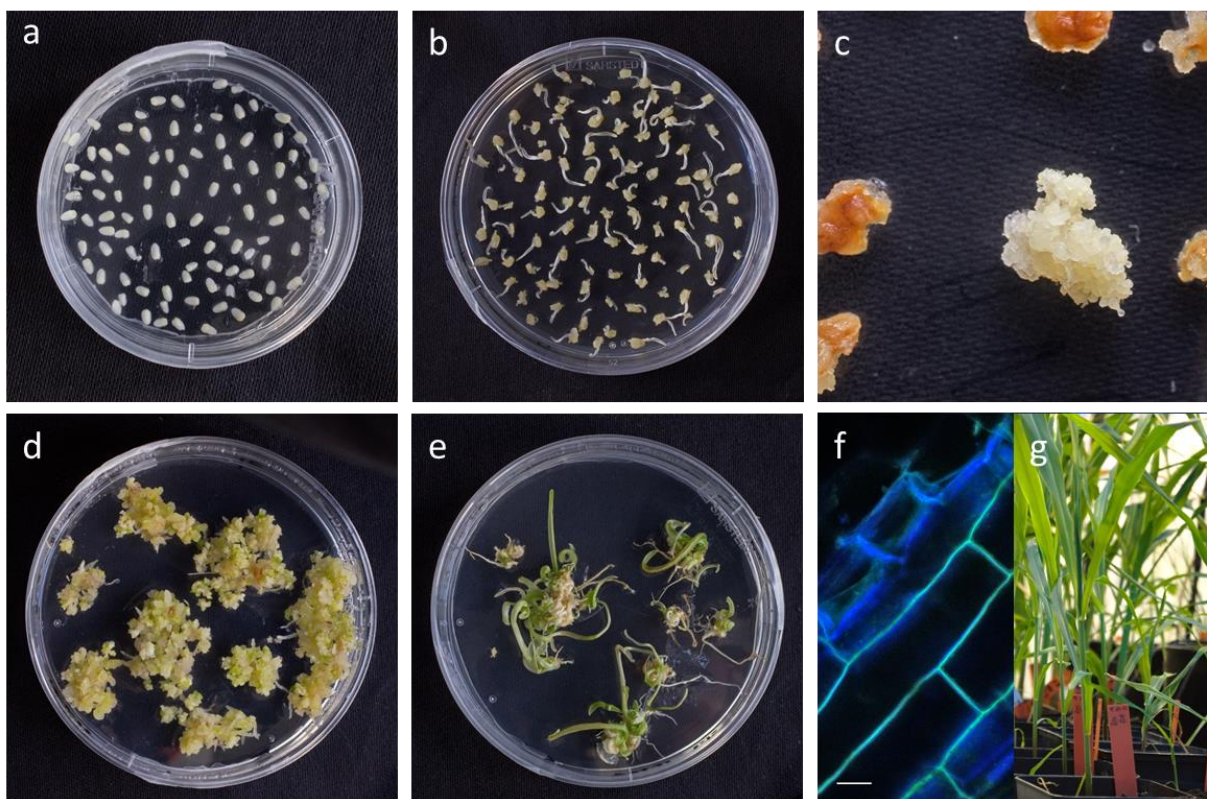


Abb. 38: Verschiedene Stadien der Maistransformation: a: 11 Tage alte Maisembryonen auf Co-Kultivierungsplatten b: Selektion auf Restingmedium, austreibende Koleoptilen wurden vor der Überführung auf S1 Medium entfernt c: Typ II Kallus in der *in vitro* Kultur, absterbendes Gewebe wurde regelmäßig entfernt d: Kalluskultur unter Licht mit beginnender Organogenese auf Regenerationsmedium e: Kalluskultur unter Licht mit fortgeschrittener Organogenese auf Regenerationsmedium f: Jungpflanzen nach Akklimatisierung und Basta® Selektion im Gewächshaus sowie der Nachweis von GFP-Signalen mittels CLSM. g: Jungpflanze im Gewächshaus.

3.5.3.2. Molekulare Analyse der T₀-Generation

Nach erfolgter Akklimatisierung im Gewächshaus nach der *in vitro* Kultur erfolgte die Kontrolle auf ein vorhandenes Transgen durch eine erneute Selektion mit Basta®. Zur weiteren Überprüfung der Linien, sowie zur Klärung des klonalen Ursprungs der Linien, wurde mit gDNA von ausgewählten Exemplaren der verschiedenen Transformationen *Southern Blot*-Experimente durchgeführt.

In den überprüften Pflanzen konnte das *bar*-Gen detektiert werden (siehe Abb. 88). Die überprüften Pflanzen der ZmPrx01-Überexpression in den Spuren 2-5 und 7-8 zeigten Mehrfachintegrationen sowie die Klonalität mehrerer Linien an (klonal: Linien 2,3; 4, 5 und 7, 8). T₀-Linien des Konstrukts p7i-UCre-ZmPrx66-GFP zeigten eine Einfachintegration (Spur 9,10) sowie eine Mehrfachintegration (Spur 12, 13). Dabei wiesen die verglichenen Linien einen gemeinsamen klonalen Ursprung auf (Spur 10, 11 und 12, 13 siehe Abb. 39). Die Saatgutgewinnung der T₀-Generation erfolgte mit Bestäubung der sich entwickelnden Kolben mit Pollen der zur Verfügung stehenden Inzuchtlinien, normalerweise Pollen der Linie Hi-II A. Stand dieser nicht zur Verfügung wurde auf die Inzuchtlinien A188 oder B73 ausgewichen.

3. Ergebnisse

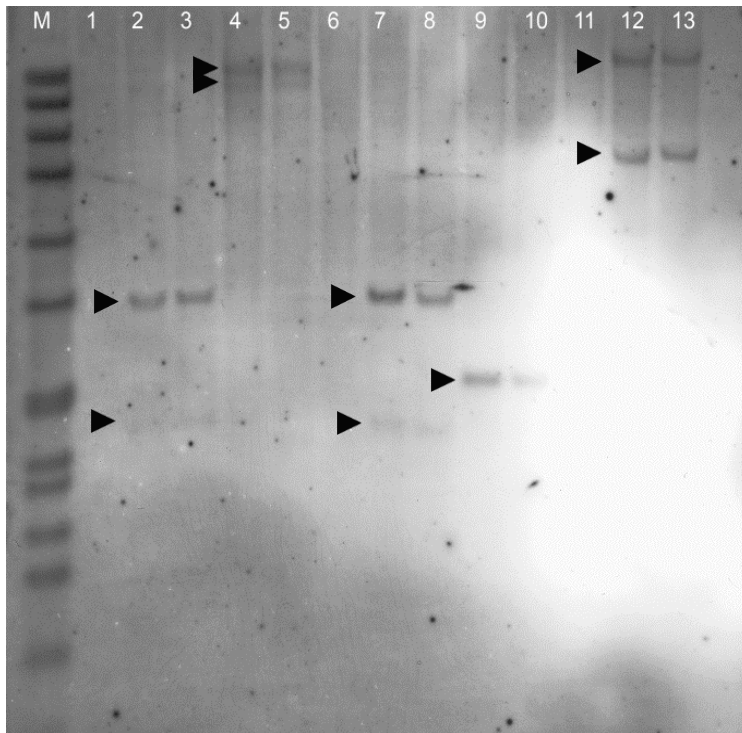


Abb. 39: *Southern Blot*-Analyse von T₀-Pflanzen der Konstrukte p7i-UCre-ZmPrx01 und p7i-UCre-ZmPrx66-GFP. Nach der Akklimatisierung der Pflanzen im Gewächshaus wurde ein *Southern Blot* zur Überprüfung der Integration der T-DNA, sowie der Häufigkeit der Integration und der klonalen Abstammung der verschiedenen Linien durchgeführt. Der hier gezeigte *Southern Blot* zeigt die Analyse von 10 Pflanzen der T₀-Generation der Konstrukte p7i-UCre-ZmPrx01 und p7i-UCre-ZmPrx66-SP. Die Spur M enthält den DIG Marker VII (Roche Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) als Größenstandard. Spur 1 enthält als Hintergrundkontrolle gDNA der Inzuchtlinie Hi-II A x B. Die Spuren 2, 3, 4, 5 und 7, 8 zeigen gDNA Proben der Konstrukte p7i-UCre-ZmPrx01. Die Spuren 9, 10 und 12, 13 zeigen gDNA Proben von Transformationen des Konstruktes p7i-UCre-ZmPrx66-GFP.

3.5.3.3. Pflanzenselektion

Nach der Aktivierung ausgesuchter Linien der Konstrukte p7i-UCre-ZmPrx01-GFP, p7i-UCre-ZmPrx70-GFP und p7i-UCre-ZmPrx66-GFP und erfolgter Basta[®]-Selektion wurden resistente Pflanzen auf vorhandene GFP-Fluoreszenz untersucht. Wurzeln positiver Pflanzen wurden zur weiteren Charakterisierung der Fluoreszenzverteilung präpariert und am CLSM analysiert. Eine weitere Analyse der Überexpressionskonstrukte konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr erfolgen.

Das Imaging der schwachen Signale in den lignifizierten Wurzeln stellte einige Anforderungen an die Einstellungen von Anregung und Detektionsbandbreiten der emittierten Signale. Es sollte zusätzlich zur GFP-Fluoreszenz die Autofluoreszenz der Zellwand aufgezeichnet werden, um die relative Lage der beiden Signale zueinander bestimmen zu können, da aus den Vorversuchen eine Verbreitung des GFP-Signals in der

Zellperipherie vermutet wurde. Die Autofluoreszenz der Zellwand wurde entsprechend den Angaben unter 2.2.4.1 mit einer 405 nm Laserlinie angeregt, das GFP-Signal mit einer 488 nm Laserlinie. Die Verwendung beider Laserlinien parallel führte zu einer deutlichen Verstärkung des detektierten Signals im GFP-Band zwischen 500 und 525 nm. Daher wurden die Scans sequenziell durchgeführt, was die Wechselwirkung der Kanäle wirkungsvoll verhinderte.

Die Autofluoreszenz bei Anregung mit 488 nm sollte weitergehend charakterisiert werden um den Bereich der Detektion anzupassen und die Notwendigkeit einer *spectral dye seperation* abzuschätzen. Für diese Charakterisierung wurden für beide Anregungswellenlängen λ -Scans durchgeführt und entsprechende Spektren erhalten. Abb. 40 fasst die erhaltenen Spektren und Abbildungen zusammen. Für die Bestimmung der Spektren wurden von jeweils drei Pflanzen der Inzuchtlinien Hi-II A, Hi-II B und B73 drei λ -Scans aufgezeichnet und verrechnet. Es wurde auf die erhaltene Intensität normiert und ein mittleres Spektrum errechnet. Die Laserleistung der 405 nm Linie wurde dem jeweiligen Präparat angepasst und entsprechende ROIs (*Region of Interest*) definiert. Die Anregung der Gewebe mit der 488 nm Laserlinie lieferte nur geringe Signalstärken und wurde auf eine Laserleistung von 25 % beschränkt, da das Imaging der GFP-Fluoreszenz unterhalb dieses Wertes erfolgte. In Abb. 40a und b ist eine Gegenüberstellung der erhaltenen Emissionen dargestellt und gibt einen Eindruck der unterschiedlichen Intensitäten. Abb. 40c stellt die aufgezeichneten Spektren dar.

Die Autofluoreszenz bei Anregung mit 405 nm zeigte einen deutlichen Peak bei 490 nm. Die Emission erstreckte sich über einen breiten Bereich. Die Schulter wies bei 80 % relativer Signalintensität eine Breite von 55 nm auf und reichte von 465-520 nm. Die nach Anregung mit 488 nm beobachtete Autofluoreszenz zeigte einen Peak bei 580 nm, die Schulter bei 80 % relativer Signalintensität hatte eine Breite von 60 nm und reichte von 540 bis 600 nm.

Beide detektierten Autofluoreszenzen zeigten eine deutliche Überlappung mit dem Emissionsspektrum von GFP. Für die Abbildung der Zellwand mithilfe der 405 nm Laserlinie wurde eine Überlagerung der Signale durch den Wechsel auf ein sequenzielles Scannen des Präparates gelöst. Die Autofluoreszenz im GFP-Kanal wurde durch ein möglichst enges Wählen der Detektionsbandbreite (505-515 nm) gering gehalten. Das Scannen von Wildtypmaterial mit diesen Einstellungen (Laserlinie 488 nm, 25 % Laserleistung, Emission

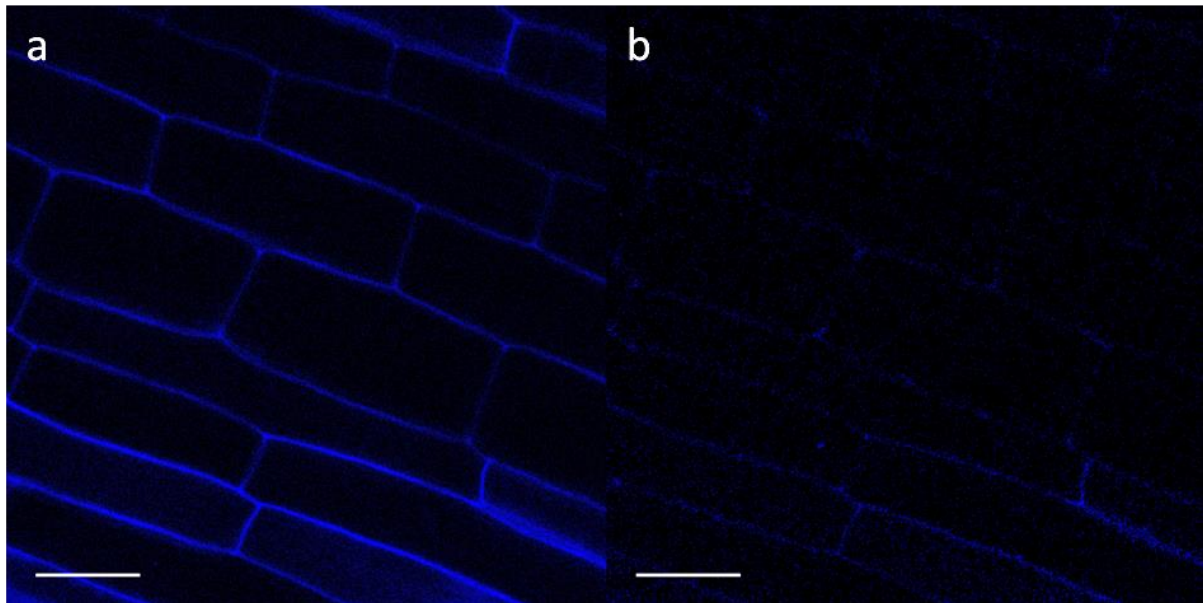
3. Ergebnisse

510/5 nm) lieferte nur sehr geringe Fluoreszenzintensitäten (vergl. Abb. 40b). Die Zellwandautofluoreszenz wurde in einem Bereich von 480-485 nm detektiert.

Mit diesen Einstellungen konnten für alle Peroxidase-GFP-Fusionsproteine deutliche Signale detektiert werden (siehe Abb. 41). Im direkten Vergleich mit Kontrollexperimenten oder transienten Experimenten war die beobachtete Fluoreszenzintensität relativ gering. Das verwendete Gewebe ließ zudem ein tiefes Eintauchen in das Gewebe nicht zu, da die lignifizierten Zellwände die Laserleistung und eventuelle Signale schnell abschwächten. Diese Beobachtung gilt gleichermaßen für eine aufzuzeichnende Autofluoreszenz, wie für die Anregung und Detektion von GFP oder anderen Fluorophoren. Daher fand das Imaging in den ersten beiden Zellschichten der Wurzeln, unterhalb der Wurzelhaarzone in der Elongationszone statt. Auf ein Imaging von Blättern wurde verzichtet, da hier durch vorhandene Pigmente weitere Störeinflüsse auftraten.

Das Verteilungsmuster glich sich in diesen Experimenten auffällig. Alle drei Peroxidasen zeigten eine Verbreitung an der Zellperipherie. Diese zeigte eine großflächige Überdeckung mit der aufgezeichneten Zellwand Fluoreszenz. Im Gegensatz zu transienten Ergebnissen ließen sich nur geringe Mengen Fluoreszenz innerhalb der Zellen beobachten. Ein stark sichtbares Signal mit retikulärem Netzwerk und Vesikeln war nicht zu beobachten.

Zur Unterscheidung einer PM- und apoplastischen Lokalisation wurden zusätzlich Plasmolyse-Experimente durchgeführt um die Fluoreszenz vom Apoplasten zu trennen oder dort zu erhalten bzw. ein Plasmamembransignal deutlich zu machen. Diese Experimente lieferten jedoch kein eindeutiges Ergebnis. Es waren teilweise extrem schwache Signale an der Plasmamembran zu beobachten, zusammen mit einer Abschwächung der Fluoreszenz im Apoplasten, die Intensität reichte jedoch nicht für eine aussagekräftige Abbildung dieser Vorgänge. Die Steigerung der GFP-Fluoreszenzintensität im Apoplasten wurde durch das Inkubieren der präparierten Wurzeln in PIPES-(Piperazin-N,N-bis(2-ethansulfonsäure)-Puffer bei einem pH-Wert von 7,0 versucht. Nach einer Inkubation über Nacht war jedoch keine GFP-Fluoreszenz mehr nachweisbar. Abb. 41 zeigt eine Übersicht des erhaltenen Verbreitungsmusters von ZmPrx01, 70 und 66 und die Überlagerung mit dem erhaltenen Zellwandsignal.



c

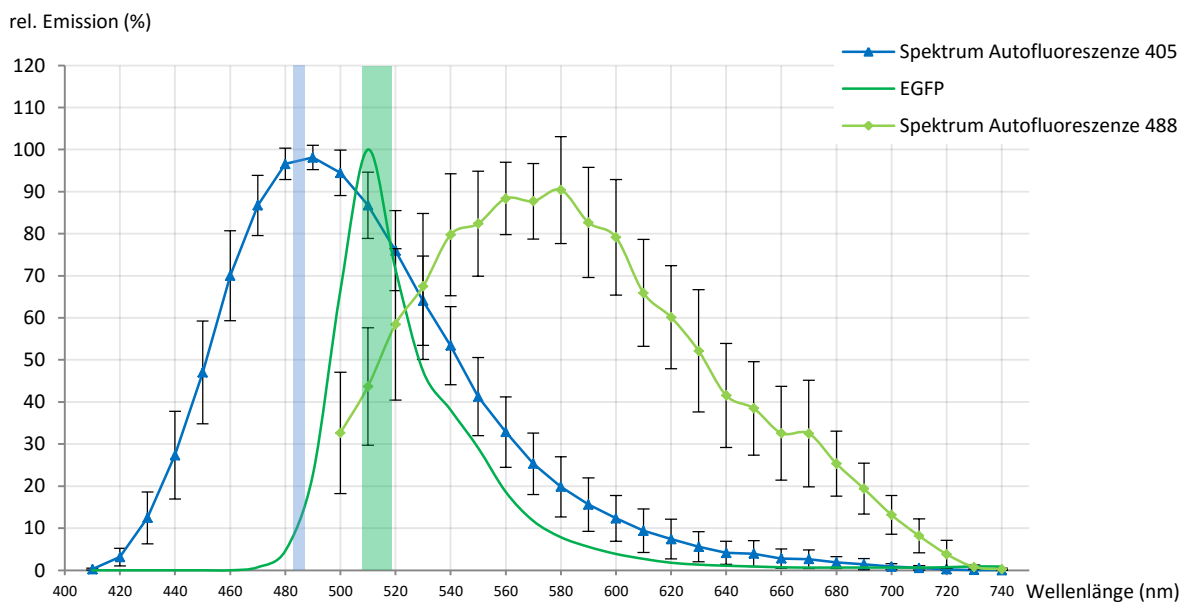


Abb. 40: Untersuchungen zur Autofluoreszenz in Maiswurzeln am CLSM. a: Signal der Zellwandautofluoreszenz angeregt mit 405 nm und detektiert zwischen 410 und 740 nm. Dargestellt ist eine Maximumprojektion des erhaltenen Fluoreszenzsignals. Gut zu erkennen war der Aufbau des Apoplasten zur Abgrenzung der einzelnen Zellen. Innerhalb der Zellen ließ sich kein Signal detektieren b: Signal der Autofluoreszenz bei Anregung des Gewebes mit 488 nm. Auch in dieser Abb. wurde eine Projektion der erhaltenen Signale erstellt. Die Aufzeichnung erfolgte in einem Bereich von 500 bis 740 nm. Das erhaltene Signal war vor allen relativ zur eingesetzten Laserleistung schwach und relativ diffus. c: Vergleich der aufgezeichneten Spektren für Autofluoreszenz bei Anregung über 405 (in Blau) und 488 nm (in Hellgrün), sowie als Referenz ein GFP-Emissionsspektrum. Diese Spektren repräsentieren einen Mittelwert der relativen Intensität aus je drei Pflanzen jeder Inzuchtlinie (Hi-II A, Hi-II B und B73). Jede Probe wurde für technische Replikate dreifach vermessen. Daraus ergeben sich $n = 9$ Messungen pro Spektrum, dargestellt ist das arithmetische Mittel mit entsprechender Standardabweichung. Deutlich zu erkennen war die für Autofluoreszenzen typische große Bandbreite der gemessenen Spektren ohne einen eng definierten Peak. Die Autofluoreszenz bei Anregung über 405 nm zeigte ein Maximum bei 490 nm, nach Anregung mit 488 nm

3. Ergebnisse

ergab sich ein relativ breiter Peak um 580 nm. Die Bandbreite der Emissionsaufzeichnung ist in durchsichtig Blau (405 nm Anregung, Zellwand) und in Grün (488 nm Anregung, GFP) eingezeichnet. Die starke Überlappung der Spektren von Zellwandautofluoreszenz und GFP-Fluoreszenz wurde durch sequenzielles Scannen der Probe eliminiert. Der Maßstab in a und b entspricht 50 μm .

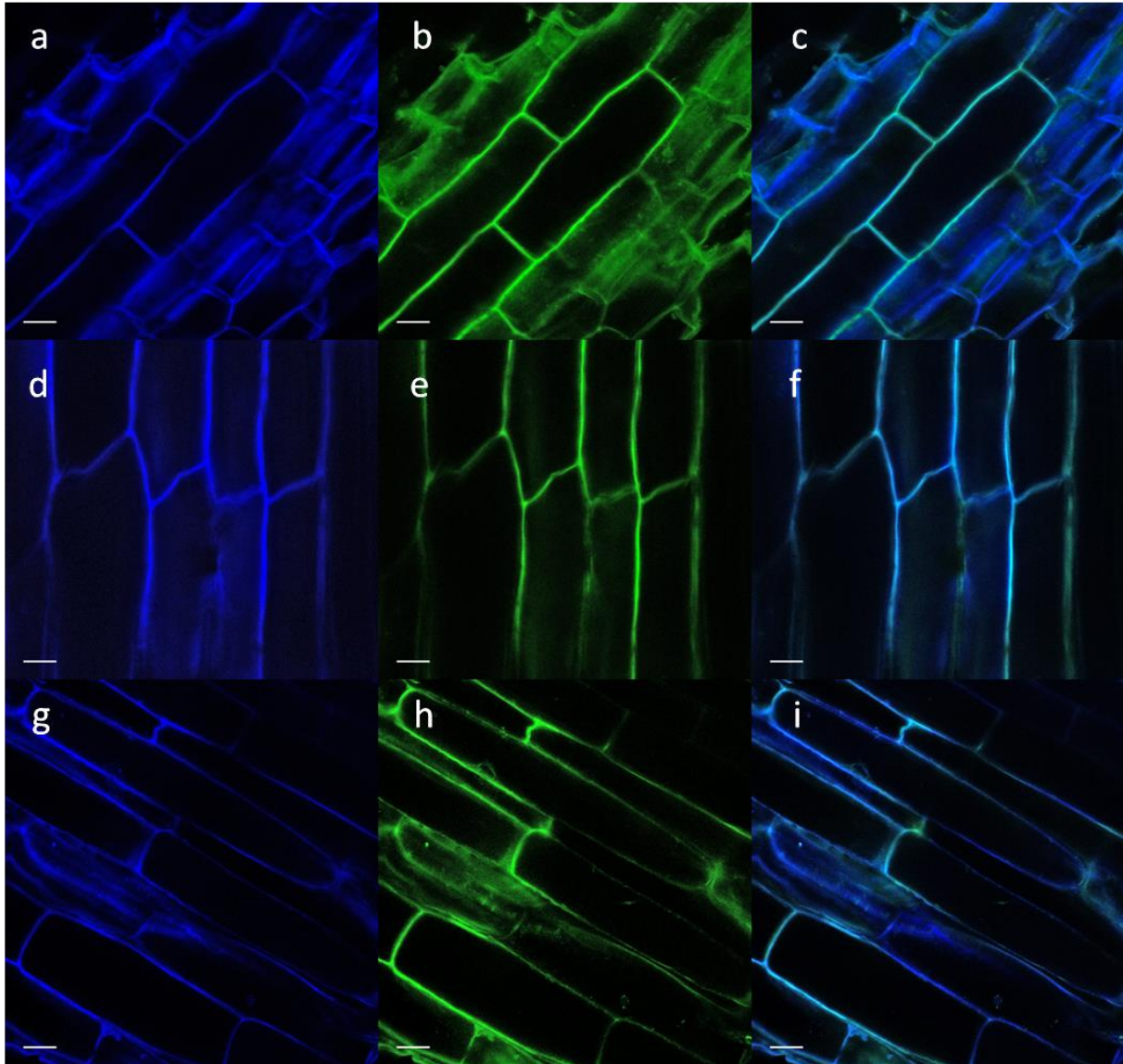


Abb. 41: CLSM-Aufnahmen von Wurzelzellen stabil transformierter Hi-II A x Hi-II B Maispflanzen, welche Peroxidase-GFP-Fusionen exprimierten. a-c: p7i-UCre-ZmPrx01-GFP, d-f: p7i-UCre-ZmPrx70-GFP und g-i: p7i-UCre-ZmPrx66-GFP. Linke Reihe (a, d, g) in Blau, apoplastische Autofluoreszenz angeregt mit 405 nm und detektiert in einem Bereich von 480-485 nm. Mittlere Reihe (b, e, h) in Grün, GFP-Fluoreszenz angeregt mit 488 nm und detektiert in einem Bereich von 505-515 nm. Rechte Reihe (c, f, i) Überlagerung aus beiden Aufnahme. Bei allen Konstrukten konnte eine Fluoreszenz an der Zellperipherie beobachtet werden. Diese deckte sich in weiten Teilen mit dem detektierten Zellwandsignal. Vergleichende Aufnahmen in Wildtypmaterial aller verwendeten Inzuchtlinien (Hi-II A, Hi-II B und B73) ließen nur bei vergleichsweise hoher Laserleistung schwache Signale erkennen. Zudem unterschied sich das aufgezeichnete Spektrum (vgl. Abb. 40) deutlich vom GFP-Spektrum. Durch die geringe Bandbreite des Emissionsfilters wurde ein Großteil des Autofluoreszenzsignals im GFP-Kanal unterdrückt. Der Maßstab entspricht 20 μm .

3.6. Heterologe Expression in *Pichia pastoris*

3.6.1. Hefetransformation

Für die Erzeugung rekombinanter Peroxidasen im eukaryotischen System wurde *Pichia pastoris* ausgewählt. Als Vektorsystem diente pPICZ α A (Invitrogen, siehe 2.1.4.7). Dieser ermöglicht durch das α -Faktor-Signalpeptid aus *Saccharomyces cerevisiae* eine Sekretion des gewünschten Proteins in das Kulturmedium. Die Expression des rekombinanten Proteins wird durch den AOX1-Promotor kontrolliert. Die Induktion des Systems erfolgt über die Zugabe von Methanol in das Kulturmedium. Es wurden zwei Transformationsdurchgänge mit jeweils drei transformierten rekombinanten Plasmiden durchgeführt. In den Transformationsansätzen sollte direkt ein *Screening* nach Klonen mit einer Mehrfachintegration erfolgen, daher erfolgte die Selektion bei steigenden Zeocin-Konzentrationen von 100 bis 2000 μg . Als Hintergrund- und Negativkontrollen dienten Transformationen des Leervektors pPICZ α A in den Stamm X33 (Mut⁺ Kontrolle) und KM71H (Mut^S Kontrolle). Die Transformationseffizienz lag zwischen maximal 2960 Klonen pro μg DNA und minimal 1630 Klonen pro μg DNA. Durchschnittlich wurden bei der Transformation von *Pichia pastoris* mit Peroxidasekonstrukten mit vollständiger Membranbindedomäne 862 Klone, und bei Transformation der deletierten Konstrukte 642 Klone pro μg DNA erzeugt. Tabelle 22 fasst die erhaltenen Klone in Abhängigkeit der verwendeten Selektionsstärke zusammen. In der Abb. 42 sind YPDS-Platten nach einer Inkubation von drei bis zehn Tagen bei 30°C dargestellt.

Tab. 22: Übersicht über die erhaltenen Klone in Abhängigkeit des Selektionsdruckes. Es wurde aus einem Transformationsansatz unter verschieden hohen Zeocin®-Konzentrationen selektiert. Dies ermöglichte eine direkte Selektion von hochresistenten Klonen mit einer Mehrfachintegration des GOI in das Genom. Gut erkennbar ist die geringere Anzahl von Klonen bei höherem Selektionsdruck. Dargestellt sind die Mittelwerte von je drei Konstrukten mit transmembraner Domäne (ZmPrx) und ohne transmembrane Domäne (ZmPrx-SP).

Konstrukt	Selektion			
	100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	500 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$	2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$
Transformaten ZmPrx	2690	372	100	16
Transformaten ZmPrx-SP	1609	691	227	41

3. Ergebnisse

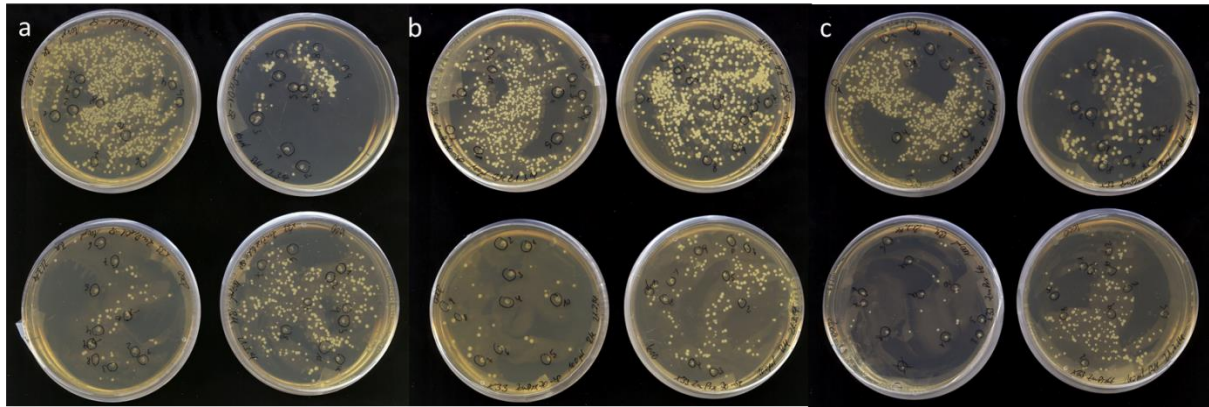


Abb. 42: Übersicht über erhaltene Zeocin[®]-resistente *Pichia*-Klone. Transformation von *P. pastoris* X33 mit a: pPICZ α A-ZmPrx01-SP b: pPICZ α A-ZmPrx70-SP c: pPICZ α A-ZmPrx66-SP Die Transformation der Konstrukte lieferte unter allen Selektionsbedingungen eine ausreichende Menge an Klonen für die weitergehende Analyse auf eine Integration des GOI in das *Pichia*-Genom sowie die Sekretionsleistung des entsprechenden Klons. Aus jedem Ansatz bzw. jeder Selektionsstärke wurden 10 Klone für die weitere Charakterisierung ausgewählt. Maßstab: 90 mm Petrischalen.

3.6.2. Selektion positiver Klone

Die Selektion positiver Klone erfolgte nach der Selektion auf Zeocin[®]-YPDS-Platten über eine Kolonie-PCR mit den Primern 5'AOX SEQ und 3'AOX SEQ. Als Kontrolle diente ein rekombinanter Vektor mit Peroxidase-Insert und entsprechenden flankierenden Regionen aus AOX1-Promotor in 5'-Position und AOX1-Terminator in 3'-Position mit Bindestellen für die verwendeten Primer. Positive Klone liefern als PCR-Ergebnis zwei Banden. Eine Bande mit einer Größe von 2,2 kbp, welche auf die Amplifikation des WT-Gens zurückzuführen ist, und eine weitere kleinere Bande, spezifisch für jedes Konstrukt (pPICZ α A-ZmPrx01: 1635 bp; pPICZ α A-ZmPrx70: 1527 bp; pPICZ α A-ZmPrx66: 1524 bp; pPICZ α A-ZmPrx01-SP: 1536 bp; pPICZ α A-ZmPrx70-SP: 1452 bp; pPICZ α A-ZmPrx66-SP: 1437 bp). Zusätzlich ist eine Aussage zum Mut-Phänotyp des geprüften Klons möglich, da bei Mut^S-Klonen keine WT-Bande nachweisbar ist. Es wurden nur Mut⁺-Klone erzeugt.

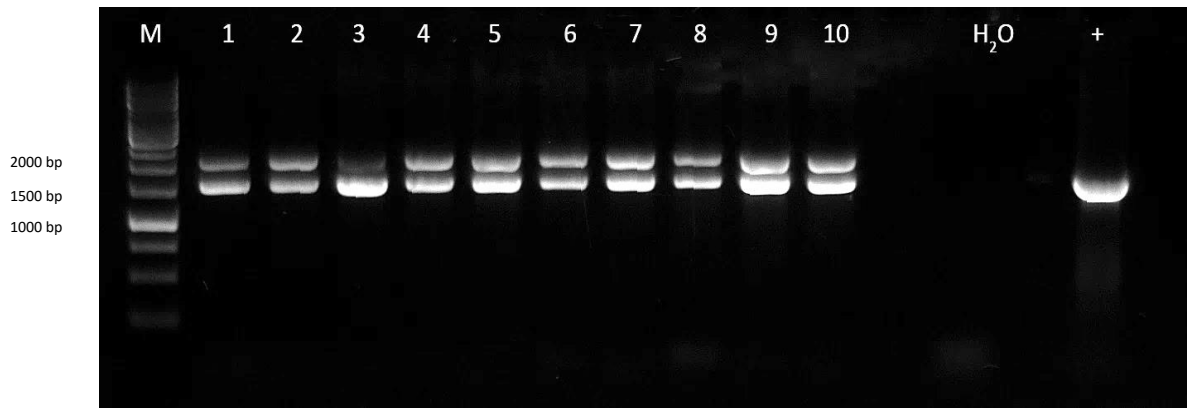


Abb. 43: Agarosegelelektrophorese nach einer Kolonie-PCR mit DNA ausgesuchter Zeocin[®]-resistenter Klone der Transformation des Konstruktes pPICZ α A-ZmPrx70-SP. Aufgetragen ist die Analyse der Transformanten nach Selektion auf 100 μ g/ml Zeocin[®] (70-100#1-10) in dem Spuren 1-10. Wildtypbande bei 2,2 kbp (Amplifikation des *aox1* Gens). Das zusätzliche Amplifikat bei 1,5 kbp zeigte die Integration des GOI ins Genom. + Positivkontrolle, 100 ng des Vektors pPICZ α A-ZmPrx01-SP, M= Marker 1 kb GeneRuler[™] DNA Ladder, H₂O= Wasserkontrolle.

3.6.3. Bestimmung des Mut-Phänotyps

Zur weiteren Bestätigung des Mut-Phänotyps wurden die Klone auf MD- und MM-Medien hinsichtlich ihres Wachstums klassifiziert. Die Ergebnisse der PCR konnten in diesem Versuch bestätigt werden, das erhaltene Bild war aber nicht so deutlich wie die klar zu bewertenden Ergebnisse der PCR (siehe Abb. 43).

3.6.4. Selektion sekretierender Klone

Für die Optimierung der Expressions- bzw. Induktionsbedingungen erfolgte ein Vorscreening, um Klone zu selektieren, die eine möglichst hohe Menge an aktiver rekombinanter Peroxidase sekretieren. Die Auswahl solcher Klone über Flüssigkulturen war nicht effektiv möglich und es wurden Alternativen gesucht, um viele Klone schnell und ökonomisch hinsichtlich ihrer Sekretionsleistung zu charakterisieren. Dazu wurden zwei unterschiedliche Methoden verwendet, die Aussagen über die Sekretionsleistung der Klone zuließen.

3.6.4.1. Kolonie-Blot

Diese Technik basiert auf der Methode von Cregg (Cregg *et al.*, 2009) und wurde wie unter 2.2.3.7.2 beschrieben durchgeführt. In fast alle Ansätzen konnte das *c-myc*-Epitop nachgewiesen und somit die Sekretion rekombinanter Peroxidasen beobachtet werden. Die Klone konnten somit hinsichtlich ihrer Sekretionsleistung charakterisiert werden. Eine

3. Ergebnisse

Aussage über die Aktivität der rekombinanten Proteine war mit dieser Technik allerdings nicht möglich. Die Analyse der Transformanten mit N-terminalem Signalpeptid ergab in Flüssigkultur keine detektierbare Peroxidaseaktivität bei den untersuchten Klonen.

Für alle drei exprimierten Peroxidasen konnten mit dieser Technik sekretierende Klone nachgewiesen werden. Für ZmPrx01 konnten unter allen Selektionsstärken deutlich sekretierende Klone gefunden werden, mit einer deutlich zu erkennenden Tendenz einer Anreicherung bei Selektion unter hohen Zeocin[®]-Konzentrationen (siehe Abb. 44). Auch das Konstrukt mit vollständigem N-terminalem Signalpeptid lieferte zahlreiche Klone mit guten bis sehr guten Signalen, ebenfalls angereichert bei Selektion unter hohen Zeocin[®]-Konzentrationen.

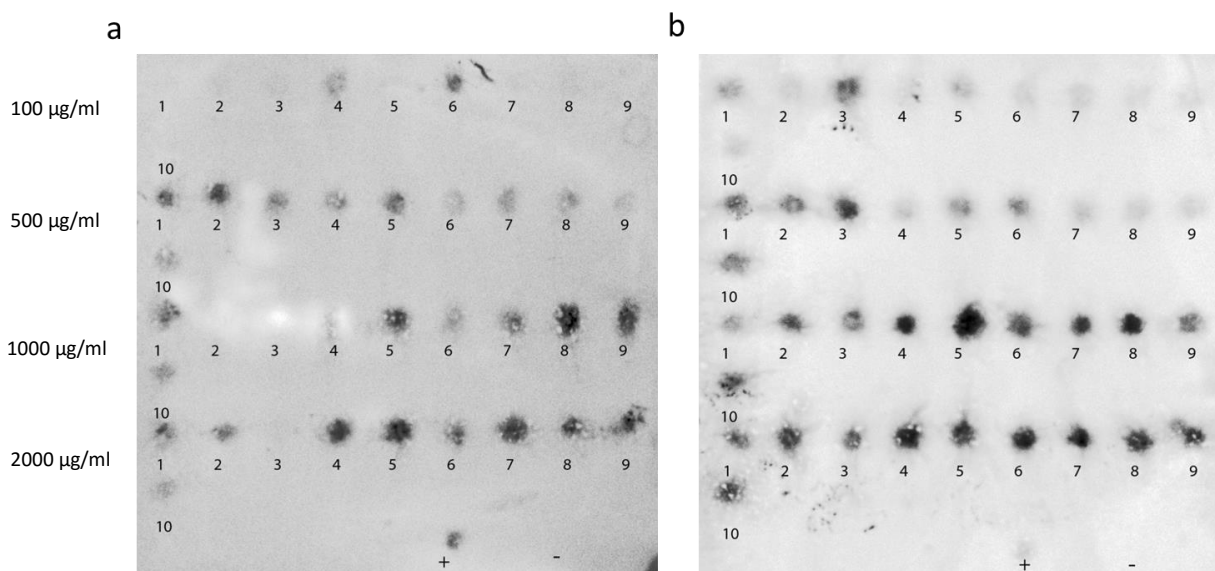


Abb. 44: Kolonie-Blot zur Analyse der Sekretion von ZmPrx01_{rec} in das Kulturmedium. Durchführung wie unter 2.2.3.7.2 beschrieben. Detektion über das *c-myc*-Epitop. **a:** Analyse der Sekretion von ZmPrx01_{rec} mit N-terminalem Signalpeptid bzw. Membrandomäne. **b:** Analyse der Sekretion von ZmPrx01_{rec} ohne N-terminales Signalpeptid bzw. Membrandomäne. Gezeigt sind jeweils 10 Klone pro bei der Selektion verwendeter Zeocin[®]-Konzentration. Die Negativkontrolle bestand aus einem *Pichia pastoris* X33 Stamm transformiert mit Leervektor. Die Positivkontrolle war ein Klon des Konstruktes pPICZα A-ZmPrx70-SP, der in Vorversuchen als sekretierend identifiziert wurde. Beide Konstrukte ließen sich im Kolonie-Blot gut detektieren, was auf eine ausreichende Sekretion der rekombinanten Peroxidase in das Kulturmedium schließen ließ. Gut zu erkennen war auch die Anreicherung stark sekretierender Klone bei Selektion unter hohen Zeocin[®]-Konzentrationen.

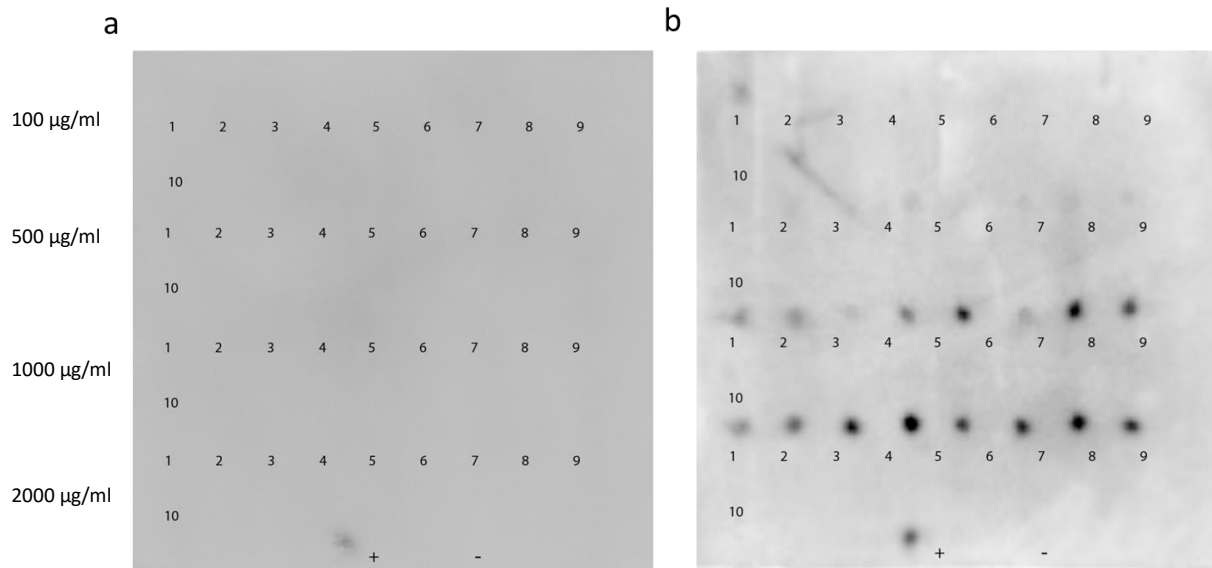


Abb. 45: Kolonie-Blot zur Analyse der Sekretion von ZmPrx70_{rec} in das Kulturmedium. Durchführung wie unter 2.2.3.7.2 beschrieben. Detektion über das *c-myc*-Epitop. a: Analyse der Sekretion von ZmPrx70_{rec} mit N-terminalem Signalpeptid bzw. Membrandomäne. b: Analyse der Sekretion von ZmPrx70_{rec} ohne N-terminales Signalpeptid bzw. Membrandomäne. Gezeigt sind jeweils 10 Klone pro bei der Selektion verwendeter Zeocin®-Konzentration. Negativkontrolle bestand aus einem *Pichia pastoris* X33 Stamm transformiert mit Leervektor. Positivkontrolle war ein Klon des Konstruktes pPICZα A-ZmPrx70-SP, der in Vorversuchen als sekretierend identifiziert wurde. Die Ergebnisse der Sekretion von ZmPrx70_{rec} in das Kulturmedium bestätigten die Versuche mit ZmPrx01 bezüglich einer Anreicherung von stärker sekretierenden Klonen bei Selektion unter höheren Zeocin®-Konzentrationen (rechts). Die Negativkontrolle ließ auch hier keine Sekretion erkennen. Versuche zur Abgabe des kompletten Proteins mit Signalpeptid und Membrandomäne ergaben keine Detektion von sekretierter ZmPrx70_{rec} (links).

Dieser Trend ließ sich auch bei mit pPICZα A-ZmPrx70 transformierten *Pichia*-Klonen beobachten (siehe Abb. 45). Unter Selektion mit 1000 und 2000 µg Zeocin® konnten einige gut bis sehr gut sekretierende Klone identifiziert werden. Allerdings zeigte sich bei den ZmPrx70-Konstrukten keine sichtbare Sekretion in das Kulturmedium bei vorhandenem N-terminalem Signalpeptid.

3. Ergebnisse

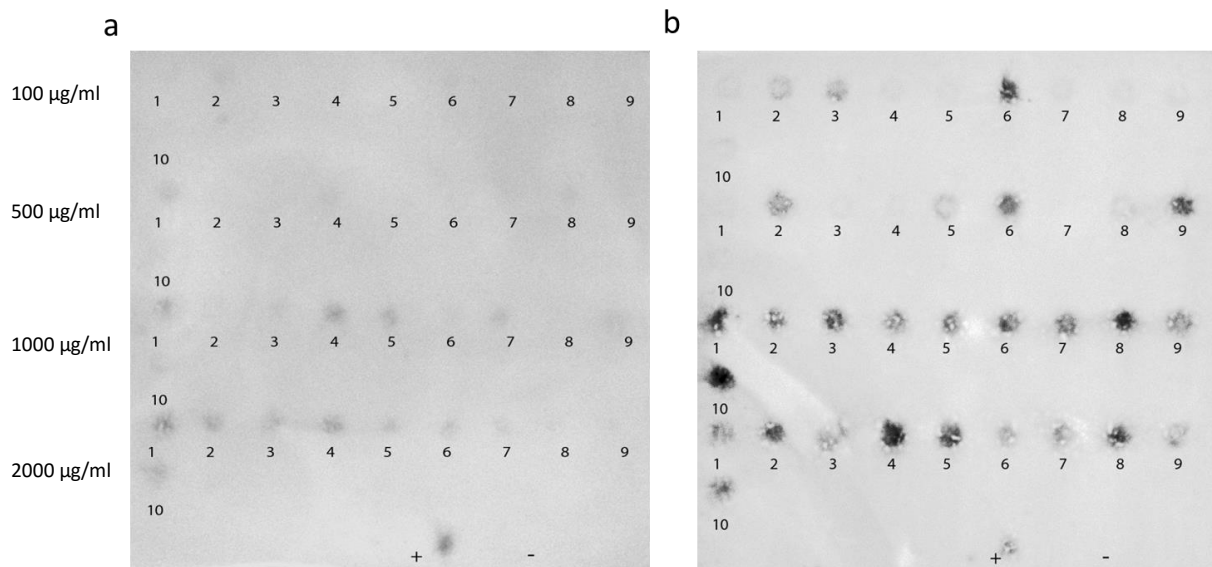


Abb. 46: Kolonie-Blot zur Analyse der Sekretion von ZmPrx66_{rec} in das Kulturmedium. Durchführung wie unter 2.2.3.7.2 beschrieben. Detektion über das *c-myc*-Epitop. a: Analyse der Sekretion von ZmPrx66_{rec} mit N-terminalem Signalpeptid bzw. Membrandomäne. b: Analyse der Sekretion von ZmPrx66_{rec} ohne N-terminales Signalpeptid bzw. Membrandomäne. Gezeigt sind jeweils 10 Klone pro bei der Selektion verwendeter Zeocin®-Konzentration. Negativkontrolle bestand aus einem *Pichia pastoris* X33 Stamm transformiert mit Leervektor. Positivkontrolle war ein Klon des Konstruktes pPICZα A-ZmPrx70-SP, der in Vorversuchen als sekretierend identifiziert wurde. Die Analyse der Sekretion von ZmPrx66_{rec} in das Kulturmedium ließ im Falle des Konstruktes ohne natives Signalpeptid zahlreiche gut sekretierende Klone erkennen (rechts). Auch das komplette Protein mit nativem Signalpeptid konnte im Medium detektiert werden (links). Das Signal war in diesem Fall jedoch deutlich schwächer relativ zum Konstrukt ohne Signalpeptid. Auch unter geringeren Zeocin®-Konzentrationen konnten stark sekretierende Klone detektiert werden (rechts, Klon 66-100#06-SP, Selektion bei 100 µg/ml Zeocin®). Jedoch ist auch hier Anreicherung von stärker sekretierenden Klonen bei Selektion unter 1000 und 2000 µg/ml Zeocin® erkennbar.

Pichia Zellen transformiert mit dem Konstrukt pPICZα A-ZmPrx66 und pPICZα A-ZmPrx66-SP lieferten beide sekretierende Klone. War das native Signalpeptid vorhanden, konnte nur eine schwache Abgabe ins Kulturmedium beobachtet werden (siehe Abb. 46). Gut sekretierende Klone zeigten sich unter allen verwendeten Zeocin®-Konzentrationen, eine Anreicherung solcher Klone war aber auch im Fall vom ZmPrx66 unter hohen Zeocin® -Konzentrationen zu beobachten.

3.6.4.2. Plattenassay

Der Kolonie-Blot liefert keine Informationen zur Aktivität der sekretierten Proteine. Um Informationen über die Aktivität der sekretierten Proteine zu erhalten, wurde ein *Agarose-Overlay-Assay* entwickelt, der den Mikroassay auf Agarplatten überträgt. Zunächst wurde in kleinerem Maßstab (90 mm Petrischale) das Vorgehen entwickelt und optimiert und schließlich ein Screening kompletter Transformationsansätze (120 Klone pro Konstrukt) wie

unter (siehe 2.2.2.10.5.1) beschrieben durchgeführt. Abb. 47a und b zeigt den Assay in 90 mm Petrischalen. Deutlich erkennbar war die Guajacolperoxidaseaktivität als orangefarbenes Halo um die Kolonien. Die Ausprägung dieser Färbungen war in etwa proportional zur sekretierten ZmPrx_{rec}-Menge und deckte sich weitestgehend mit den Ergebnissen des Kolonie-Blots. Auch erkennbar war die Abhängigkeit der Aktivität um die Klone von der Stärke der Zeocin-Selektion. Klone aus der Selektion bei 1000 µg/ml lieferten gegenüber Klonen die über 100 µg/ml selektiert wurden ein deutlich stärkeres Signal.

Abb. 48 zeigt den Assay im 100x100 mm Format für die Selektion ganzer Transformationsansätze mit bis zu 90 Klonen plus Positiv- und Negativkontrolle. Das Bild aus den Vorversuchen bestätigte sich hier. Insgesamt zeigte sich dieses Assayverfahren als wirkungsvoll und ökonomisch durchführbar für die Durchmusterung großer Mengen an *Pichia pastoris*-Transformanten.

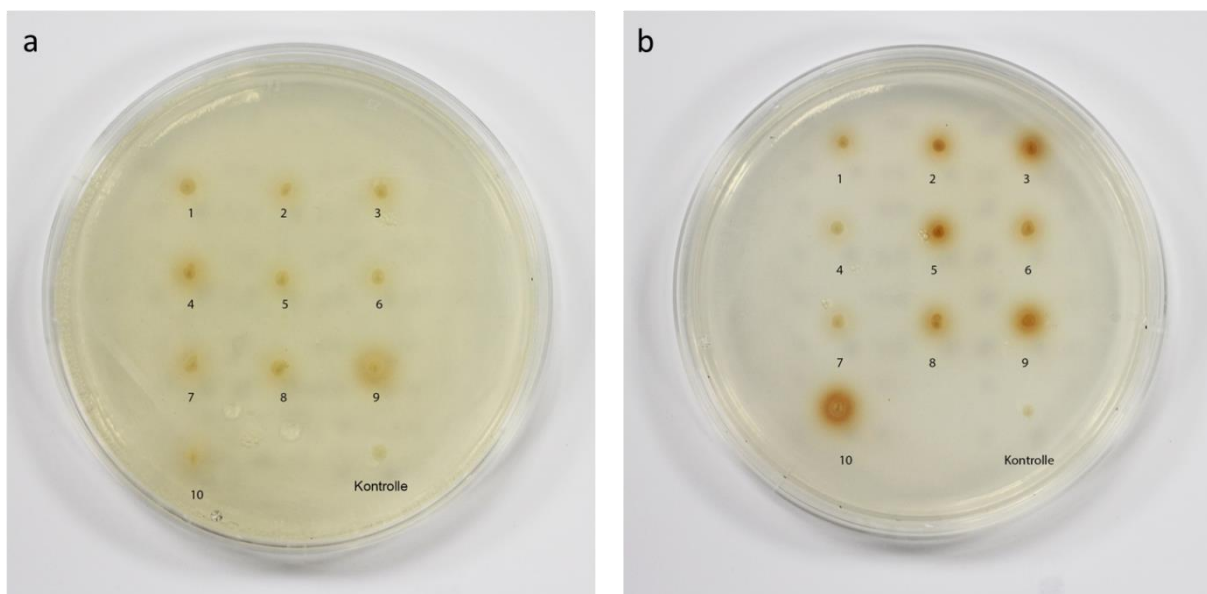


Abb. 47: Etablierung des Agarose-Overlay-Assays. Dargestellt sind induzierte Kolonien auf BMM-Medium nach 48 h Induktion. Getestet wurden je 10 Kolonien einer Selektionsstärke (1-10). Kontrolle war ein Klon des Stammes *Pichia pastoris* X33 transformiert mit dem Leervektor pPICZα A. a: Klone des Konstruktes pPICZα A-ZmPrx70-SP nach Selektion auf 100 µg/ml Zeocin®. Die höchste Aktivität war um den Klon 9 herum zu beobachten. b: Klone des Konstruktes pPICZα A-ZmPrx70-SP nach Selektion auf 1000 µg/ml Zeocin®. Auch in diesem Experiment ließen sich positive Klone durch eine kreisförmige Guajacolperoxidaseaktivität um entsprechende Kolonien selektieren. Es zeigten sich gegenüber Klonen aus Selektion unter 100 µg/ml Zeocin® stärkere Aktivitäten rund um die Kolonien. Kontrollen zeigten keine sichtbaren Guajacolperoxidaseaktivität.

3. Ergebnisse

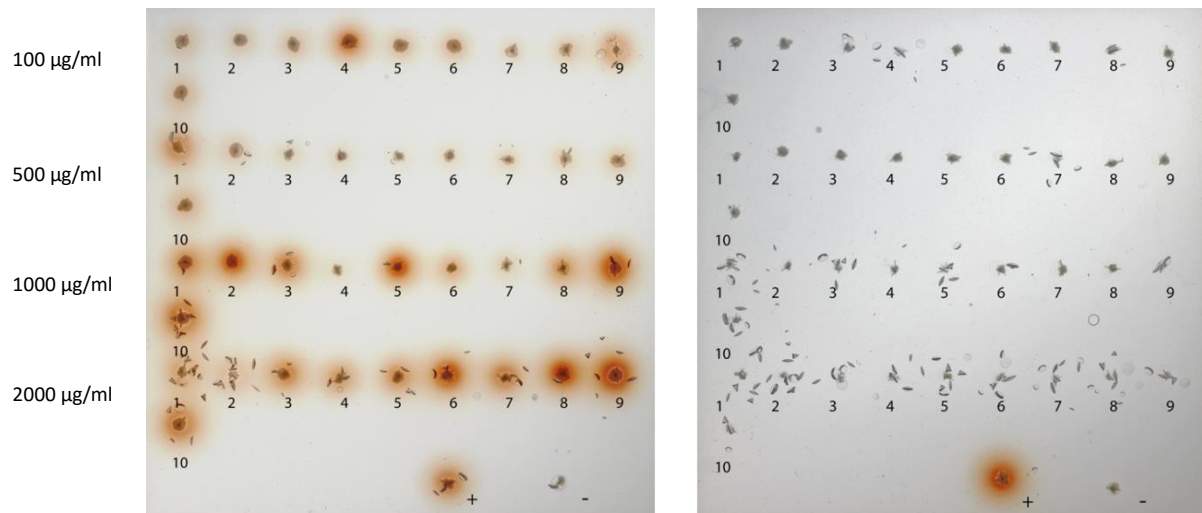


Abb. 48: Anwendung des *Agarose-Overlay-Assays* auf ein größeres Plattenformat zum Screening höherer Koloniezahlen. Es wurden 100x100 mm Petrischalen verwendet um jeweils den kompletten Satz von ausgesuchten und bestätigten *Pichia*-Klonen hinsichtlich der Sekretion von aktiver ZmPrx_{rec} durchzumustern. Es wurden je 10 per PCR und Kolonie-Blot überprüfte Klone je verwendeter Zeocin®-Konzentration auf das entsprechende Induktionsmedium übertragen, induziert und dem Assay unterzogen. Die Gesamtkapazität dieser Technik liegt bei Verwendung dieses Plattenformates bei 81 Klonen, abzüglich Negativ- und Positivkontrolle. Dargestellt ist das Screening der Konstrukte pPICZα A-ZmPrx70-SP (links) und pPICZα A-ZmPrx70 (rechts). Positivkontrolle ist ein Klon des Konstruktes pPICZα A-ZmPrx70-SP, der sich in Vorversuchen als positiv erwies, Negativkontrolle ist ein Klon des *Pichia pastoris* Stammes X33 transformiert mit dem Leervektor pPICZα A.

Während Klone der Konstrukte pPICZα A-ZmPrx01 und pPICZα A-ZmPrx01-SP im Kolonie-Blot eine sehr gut detektierbare Menge an rekombinanter sekretierter Peroxidase zeigten, lässt sich in beiden Fällen keine sichtbare Aktivität im *Overlay-Assay* beobachten.

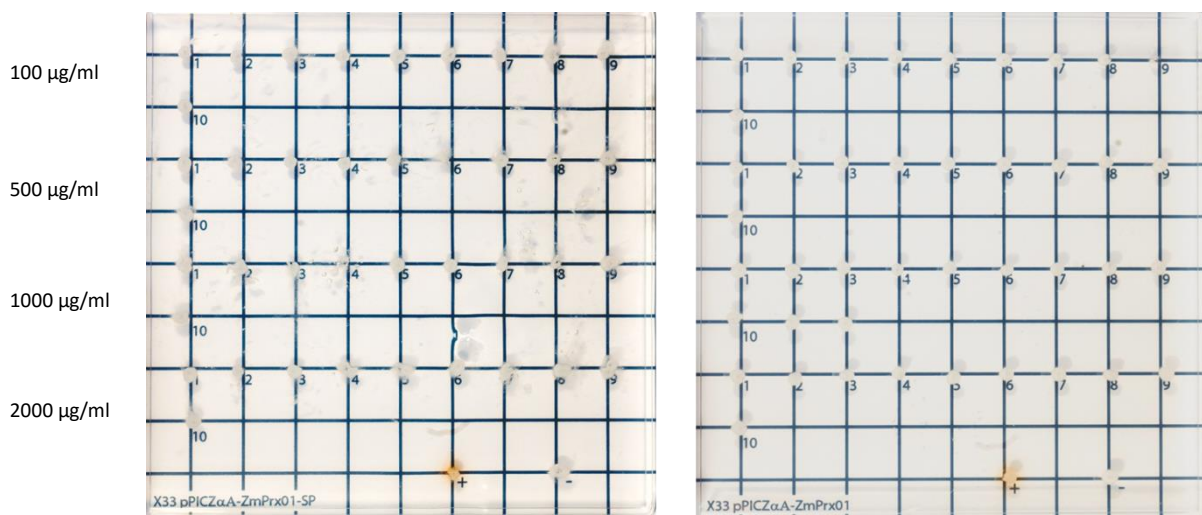


Abb. 49: *Agarose-Overlay-Assay* der Konstrukte pPICZα A-ZmPrx01 (rechts) und pPICZα A-ZmPrx01-SP (links). Positivkontrolle ist ein Klon des Konstruktes pPICZα A-ZmPrx70-SP, der sich in Vorversuchen als positiv erwies, Negativkontrolle: *Pichia pastoris* X33 transformiert mit dem Leervektor pPICZα A. Im Gegensatz zu den gut sichtbaren Resultaten im Kolonie-Blot konnte in diesem Assay keine Aktivität rund um die Kolonien detektiert werden. Dieser Versuch wurde unter Variation verschiedener Bedingungen (Temperatur, Induktionszeit, Methanolkonzentration) wiederholt und lieferte immer ein negatives Ergebnis.

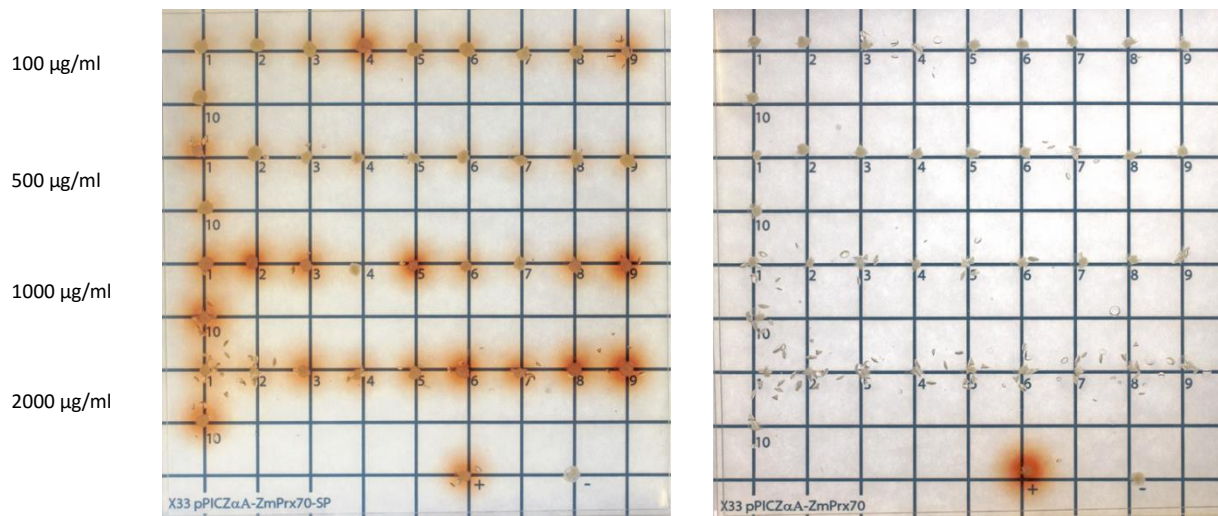


Abb. 50: Agarose-Overlay-Assay der Konstrukte pPICZα A-ZmPrx70 (rechts) und pPICZα A-ZmPrx70-SP (links). Positivkontrolle ist ein Klon des Konstruktes pPICZα A-ZmPrx70-SP, der sich in Vorversuchen als positiv erwies, Negativkontrolle: *Pichia pastoris* X33 transformiert mit dem Leervektor pPICZα A. Klone des Konstruktes pPICZα A-ZmPrx70-SP lieferten in diesem Assay gut sichtbare Guajacolperoxidaseaktivitäten. Die Ergebnisse der Anreicherung an stärker sekretierenden Klonen bei Selektion mit hohen Zeocin®-Konzentrationen konnte auch hier bestätigt werden. In Assays mit dem Konstrukt pPICZα A-ZmPrx70 konnten keine Aktivitäten um die Kolonien beobachtet werden.

Mit dem Konstrukt pPICZα A-ZmPrx70-SP transformierte X33-Zellen zeigten im *Overlay*-Assay ohne das N-terminale Signalpeptid eine sehr deutlich zu detektierende Guajacolperoxidaseaktivität bei nahezu allen untersuchten Klonen (siehe Abb. 50 links).

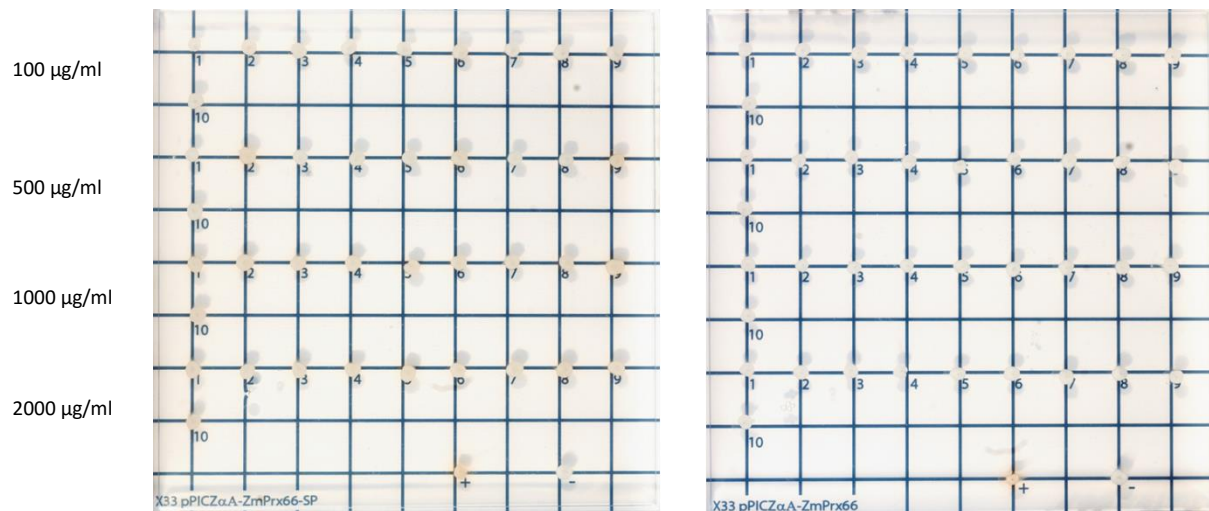


Abb. 51: Agarose-Overlay-Assay der Konstrukte pPICZα A-ZmPrx66 und pPICZα A-ZmPrx66-SP. Positivkontrolle ist ein Klon des Konstruktes pPICZα A-ZmPrx70-SP, der sich in Vorversuchen als positiv erwies, Negativkontrolle: *Pichia pastoris* X33 transformiert mit dem Leervektor pPICZα A. Bei Klonen des Konstruktes pPICZα A-ZmPrx66-SP konnte Guajacolperoxidaseaktivität rund um die Kolonien detektiert werden. Rund um Klone des Konstruktes mit nativem Signalpeptid konnte im Assay keine Aktivität nachgewiesen werden. Die sichtbare Aktivität ist in diesem Versuch gegenüber Abb. 50 deutlich geringer, da zu diesem Zeitpunkt mit geringeren Temperaturen bei Überschichtung der Kolonien gearbeitet wurde.

3. Ergebnisse

Die Klone der Konstrukte pPICZ α A-ZmPrx66 und pPICZ α A-ZmPrx66-SP ließen nur eine sehr schwache Guajacolperoxidaseaktivität ohne vorhandene transmembrane Domäne erkennen (siehe Abb. 51 links). Ausgehend von den Ergebnissen des Kolonie-Blots war eine deutlich höhere Aktivität zu erwarten.

Zur weiteren Überprüfung der Sekretion wurden ausgewählte Klone in Flüssigkultur unter 0,5 % Methanol induziert und der Überstand über eine SDS-PAGE analysiert. Es zeigten sich gegenüber der Hintergrundkontrolle einige zusätzliche Banden im SDS-Gel, eine deutliche Bande im erwarteten Bereich war nicht zu detektieren. Über Kolonie-Blot und Plattenassay wurden für jedes Konstrukt Klone selektiert, die eine deutliche Sekretion von rekombinanter Peroxidase ins Medium erkennen ließen. Mit diesen Klonen wurde die Expression in Flüssigkultur optimiert.

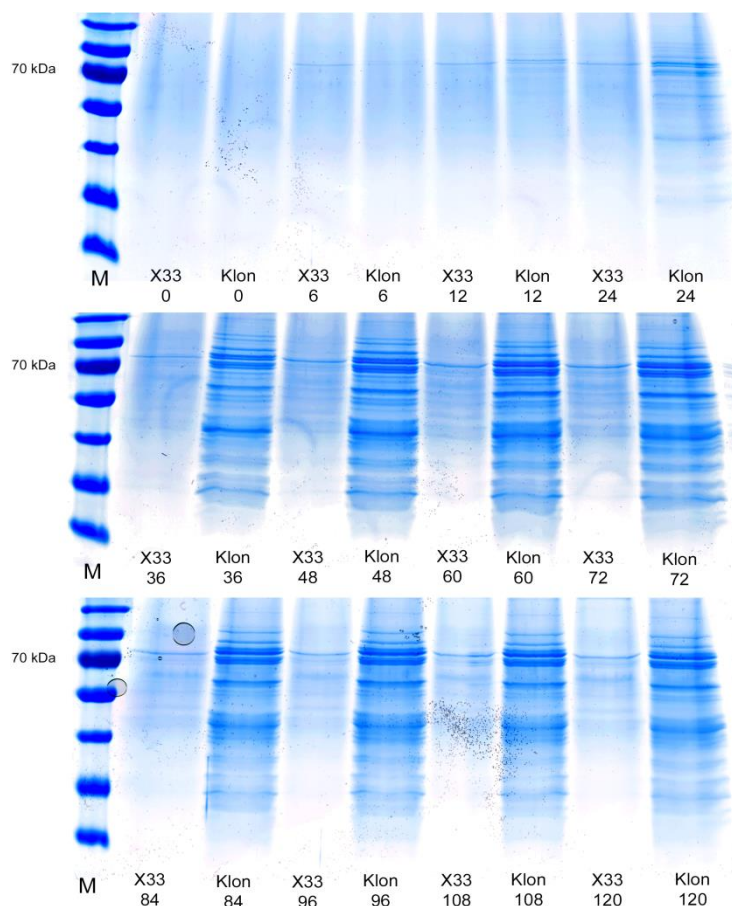


Abb. 52: SDS-PAGE-Analyse der Induktion von X33 Zellen zur Expression von ZmPrx70_{rec}. 15 μ l des Kulturüberstandes wurden über eine SDS-PAGE (10 %) elektrophoretisch aufgetrennt und Proteine mittels kolloidaler Coomassie-Färbung nachgewiesen. Die Analyse erfolgte in einem Zeitbereich von 0-120 h nach Induktion mit 0,5 % Methanol. Dargestellt ist jeweils der Vergleich eines induzierten Klons sowie der Hintergrundkontrolle transformiert mit Leervektor. Gut zu erkennen war das Auftreten zahlreicher Banden, einige besaßen korrespondierende Banden in der Hintergrundkontrolle, andere traten nur im induzierten Klon bei Expression von ZmPrx70_{rec} auf. Eine deutliche erkennbare Bande, die sich prominent in ihrer Stärke abhob, konnte nicht beobachtet werden.

3.6.5. Optimierung der Expressionsbedingungen

Zunächst erfolgten erste Expressionsversuche nach dem Standardprotokoll von Invitrogen (EasySelect™ *Pichia* Expression Kit, Manual). Für die Optimierungsversuche wurde ein im Kolonie-Blot und Plattenassay positiver Klon der Transformation mit dem Vektor pPICZα A-ZmPrx70-SP (Klon 70-1000#05-SP) verwendet. Dabei erfolgt die Induktion nach einer Vorkultur bei einer OD_{600} von 1 in 100-200 ml BMMY-Medium (1 l Schikanekolben) unter einer Methanolkonzentration von 0,5 %. Alle 24 h wurde erneut Methanol in der entsprechenden Menge ergänzt, um die Induktion zu erhalten. Die Induktionstemperatur betrug 28°C, um durch Schwankungen des Inkubators ein Erwärmen des Mediums über 30°C zu vermeiden. Das Monitoring der Peroxidaseaktivität erfolgte mittels Guajacolperoxidase-Mikroassay (siehe 2.2.3.8.1) über einen Beobachtungszeitraum von 0-144 h. In den ersten Versuchsreihen wurden zusätzlich Messzeitpunkte kurz nach Induktionsstart eingeschlossen (6 und 12 h). Unter diesen Bedingungen konnte keine Peroxidaseaktivität im Überstand beobachtet werden. Es folgten Versuchsreihen mit der Variation verschiedener Kulturbedingungen, um die Produktion und Sekretion von ZmPrx70_{rec} in das Kulturmedium zu optimieren. Erst Versuche mit verschiedenen Methanolkonzentrationen hoben die Peroxidaseaktivität im Kulturüberstand über die Nachweisgrenze. Die Ergebnisse zur Optimierung über verschiedene Medien, Zelldichten während der Induktion und Induktionstemperaturen sind im Anhang dokumentiert (siehe Abb. 103 bis Abb. 108).

3.6.5.1. Methanolkonzentration

Die Versuche zur Optimierung der Produktion wurden mit dem Standardwert von 0,5 % Methanol durchgeführt. Unter den getesteten Bedingungen konnte keine detektierbare Sekretion von rekombinanten ZmPrx erreicht werden. Daher wurde eine weitere Versuchsreihe mit Variation der Methanolkonzentration in einem Bereich von 0,5 bis 4 % (v/v) durchgeführt. Die Zugabe der erforderlichen Menge Methanol wurde alle 24 h wiederholt, um die Induktion zu erhalten. Die Kontrolle auf eine Peroxidaseaktivität im Kulturmedium erfolgte auch hier visuell über das Mikroassay, ergänzt durch eine photometrische Bestimmung bei 470 nm (siehe 2.2.3.8.2). Abb. 53 fasst die Ergebnisse zusammen. Die optische Dichte zeigte eine Staffelung der Werte in Abhängigkeit der Methanolkonzentration bis zu einem Gehalt von 2 % Methanol. Dort wurde mit einer OD_{600} von 51,6 der höchste Wert erzielt. 4 % Methanol wurden von den Kulturen unter den

3. Ergebnisse

gegebenen Kulturbedingungen nicht toleriert, die Wachstumsrate blieb deutlich hinter den Vergleichskulturen zurück und erreichte eine OD_{600} von 12,5 nach 144 h Kulturzeit (siehe Abb. 53).

In dieser Versuchsreihe konnte im Kulturmedium eine Guajacolperoxidaseaktivität nachgewiesen werden. Ab einer Konzentration von 1 % Methanol (v/v) konnte eine schwache Peroxidaseaktivität im Mikroassay wahrgenommen werden, 2 % Methanol (v/v) lieferte ab 24 h nach Induktionsstart ein deutlich erkennbares Signal, das bis zum Versuchsstopp nach 144 h stetig zunahm (siehe Abb. 53).

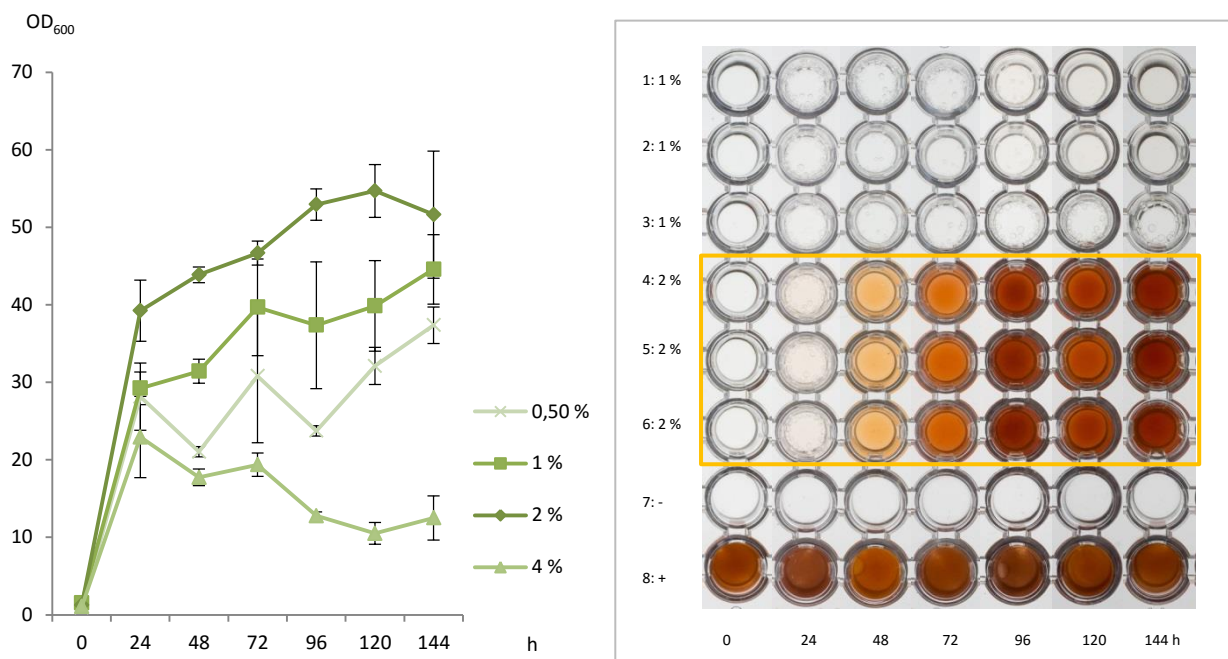


Abb. 53: Fermentationsversuch zur Produktion von $ZmPrx70_{rec}$ mit Änderung der verwendeten Methanolkonzentration während der Induktion und Fermentation. Aufzeichnung der Entwicklung der optischen Dichte (links) und der Guajacolperoxidaseaktivität im Kulturüberstand (rechts). Je 25 μ l Kulturüberstand wurden eingesetzt. 1-3: Kulturen induziert mit 1 % Methanol (v/v), 4-6: Kulturen induziert mit 2 % Methanol (v/v), 7: Negativkontrolle *Pichia pastoris* X33 transformiert mit Leervektor, 8: Positivkontrolle 10 μ l HRP (0,7 U/ml). Die dargestellten Messwerte zeigen das arithmetische Mittel aus $n=3$ unabhängigen Wiederholungen mit der entsprechenden Standardabweichung.

3.6.5.2. Addition von Spurenelementen und Intermediaten des Häm-Stoffwechsels

Zur weiteren Steigerung der Peroxidaseproduktion wurden Intermediate des Häm-Stoffwechsels sowie Spurenelemente bei Induktionsstart zugegeben (siehe 2.1.7.6) und die Entwicklung der Peroxidaseaktivität aufgezeichnet. Die Entwicklung der optischen Dichte ließ gegenüber der Kontrolle keine signifikanten Unterschiede erkennen. Die erreichte

Peroxidaseaktivität erschien im Mikroassay höher, lieferte aber bei Überprüfung der Ergebnisse in der photometrischen Messung keine signifikant höheren Aktivitäten gegenüber den Kontrollen (siehe Abb. 54). Die Erzeugung unter Addition von Spurenelementen und δ -ALA sowie Vitamin B₁ erschien zudem inhomogen.

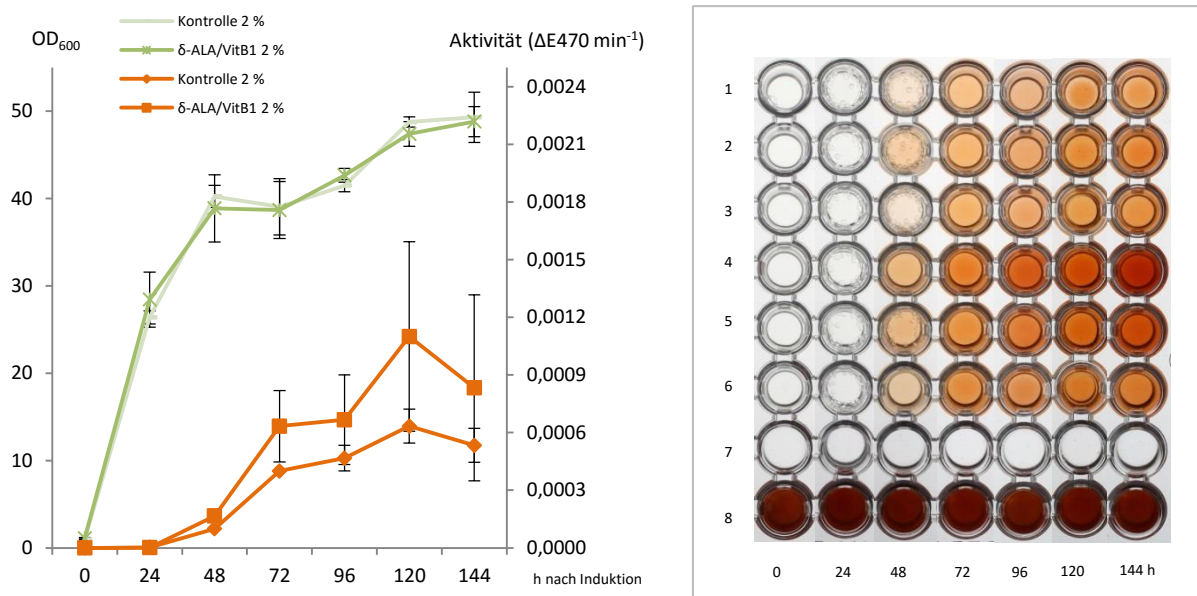


Abb. 54: Versuch zur weiteren Steigerung der $ZmPrx70_{rec}$ -Aktivität im Überstand durch die Addition vom Intermediaten des Häm-Stoffwechsels und Spurenelementen zum Kulturmedium. Links: Das Wachstum nach Addition von δ -ALA sowie Vitamin B₁ sowie Spurenelementen (OD_{600} in grün) im Vergleich zur erhaltenen Aktivität von $ZmPrx70_{rec}$ (orange) Rechts: Mikroassay entsprechender $ZmPrx70_{rec}$ sekretierender Kulturen im Bereich 0-144 h nach Induktion. Je 25 μ l Kulturüberstand wurden eingesetzt. 1-3: Kontrollkulturen ohne Addition, 4-6: Kulturen mit Addition von δ -ALA sowie Vitamin B₁ und Spurenelementen, 7: Negativkontrolle *Pichia pastoris* X33 transformiert mit Leervektor, 8: Positivkontrolle 10 μ l HRP (0,7 U/ml). Die dargestellten Messwerte zeigen das arithmetische Mittel aus n= 3 unabhängigen Wiederholungen mit der entsprechenden Standardabweichung.

Die Ergebnisse des Mikroassays (siehe 3.6.5.1) wurden durch die photometrischen Messungen bestätigt. Bei allen transformierten Konstrukten lieferte die Induktion mit 2 % Methanol die höchsten Aktivitäten (siehe Abb. 54). Versuche mit 4 % (v/v) Methanol wurden nur in der ersten Versuchsreihe durchgeführt und nicht photometrisch vermessen, da die erreichten optischen Dichten gering waren und im Mikroassay keine Aktivität erkennbar war. Die stärksten Aktivitäten im Überstand waren bei mit dem Konstrukt pPICZ α A- $ZmPrx70$ -SP transformierten X33-Zellen zu beobachten. Sie erreichten maximal eine Aktivität von 0,2378 $\Delta E470 \text{ min}^{-1}$ (8938 U/l) nach 120 h Kultur (siehe Abb. 55). In Optimierungsexperimenten wurde bei vergleichbarer optischer Dichte im Maximum eine Aktivität von 0,0029 $\Delta E470 \text{ min}^{-1}$ (107 U/l) erreicht.

3. Ergebnisse

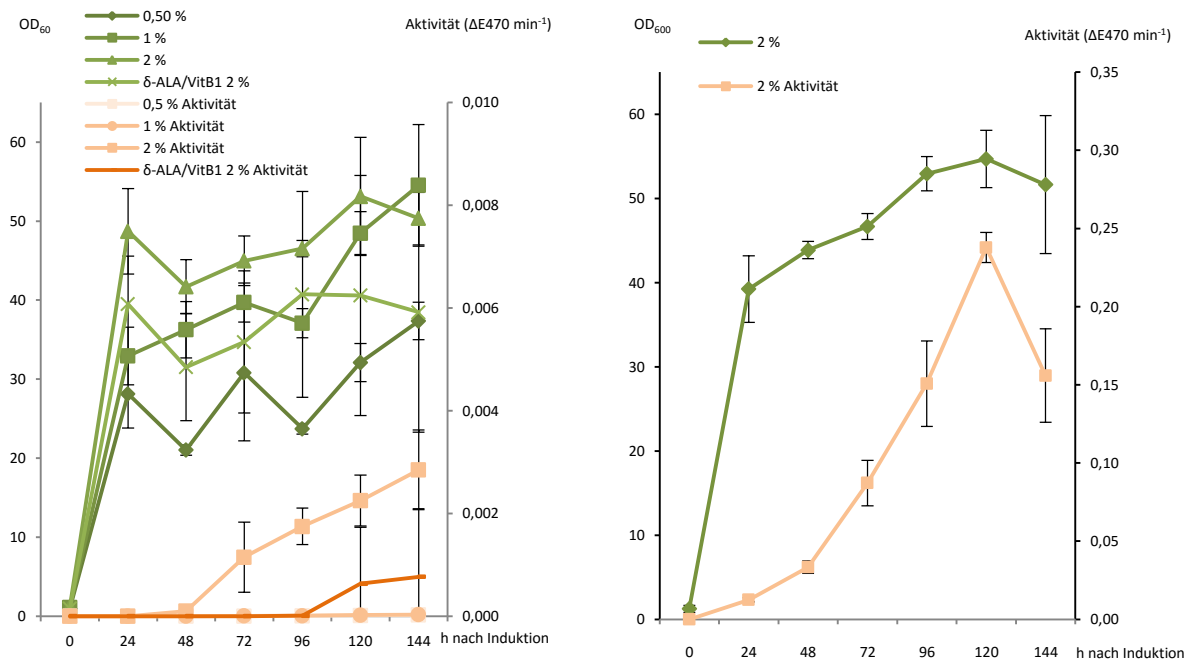


Abb. 55: Versuch zur Bestätigung der erhaltenen Einzelergebnisse durch photometrische Auswertung der erhaltenen Guajacolperoxidaseaktivitäten. Links: Vergleich der erhaltenen optischen Dichten der Kulturen (OD₆₀₀ in Grün) und der erreichten ZmPrx70_{rec} Peroxidaseaktivität im Überstand (in Orange) in Abhängigkeit von der Methanolkonzentration. Verlauf vom 0 bis 144 h nach Start der Induktion. Rechts: Einzelergebnis einer Fermentation mit maximal erreichter Ausbeute von 8938 U/l. Die dargestellten Messwerte zeigen das arithmetische Mittel aus n= 3 unabhängigen Wiederholungen mit der entsprechenden Standardabweichung.

Die Optimierungsversuche wurden für die Produktion von ZmPrx01_{rec} und ZmPrx66_{rec} wiederholt und ebenfalls die Methanolkonzentrationen 0,5 bis 2 % sowie die Addition von Spurenelementen getestet (siehe Abb. 56).

Die Produktivität von ZmPrx70_{rec}-Klonen konnte nicht erreicht werden. ZmPrx01_{rec} erreichte die höchste Aktivität im Überstand von 0,63 U/l 24 h nach Induktionsstart. Später konnte keine Aktivität im Überstand mehr detektiert werden. Die Aktivität vom ZmPrx66_{rec} im Kulturmedium war 48 h nach Induktionsstart am höchsten und wurde dann sukzessive geringer. Sie erreichte maximal eine Aktivität von 0,28 U/l. Beide maximalen Aktivitäten wurden unter 2 % (v/v) Methanol erzielt. Bei ZmPrx01_{rec} traten detektierbare Aktivitäten unter Zugabe von Spurenelementen bzw. δ-ALA und Vitamin B₁ auf.

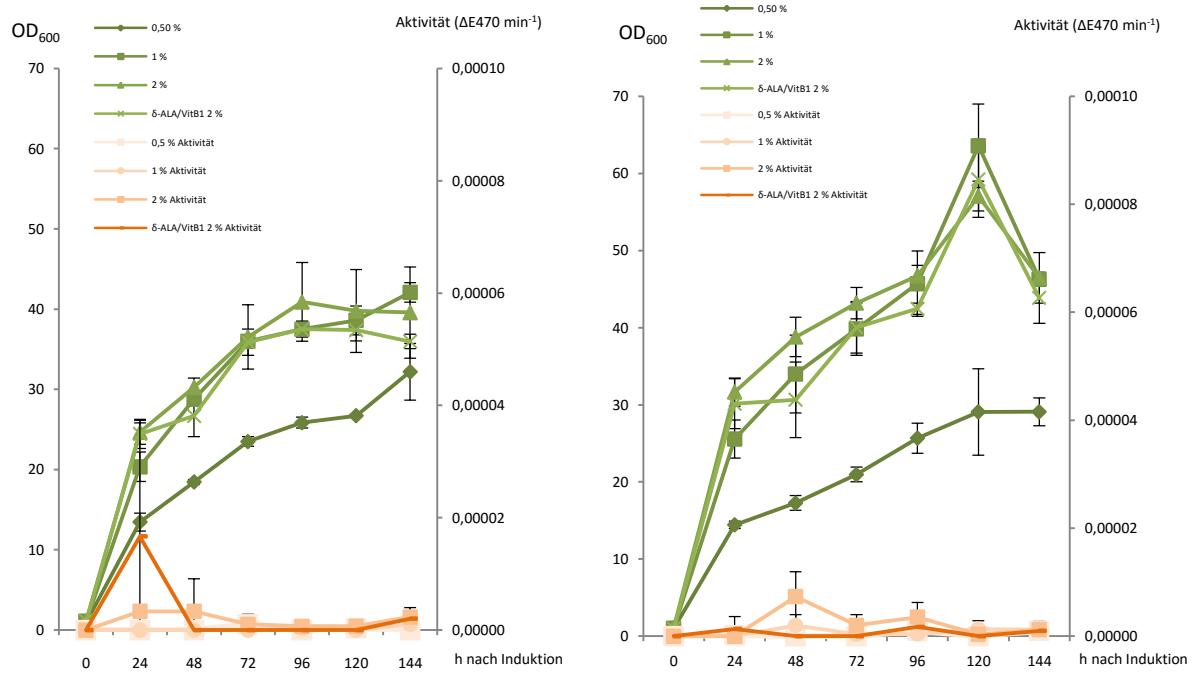


Abb. 56: Optimierung der Produktion von ZmPrx01_{rec} (links) und ZmPrx66_{rec} (rechts). Für beide Proteine wurden Optimierungsexperimente mit Veränderung der Methanolkonzentration während der Induktion entsprechend dem Vorgehen für ZmPrx70_{rec} vorgenommen. Gezeigt ist die Entwicklung der optischen Dichte (OD₆₀₀ in Grün) und der Guajacolperoxidaseaktivitäten im Kulturüberstand (in Orange) im Bereich von 0 bis 144 h nach Induktionsstart. Die dargestellten Messwerte zeigen das arithmetische Mittel aus n = 3 unabhängigen Wiederholungen mit der entsprechenden Standardabweichung.

3. Ergebnisse

3.6.6. Reinigung rekombinanter Peroxidasen

Es wurden jeweils drei Liter Schikanekolben mit 200 ml BMMY (2 % Methanol) aus einer in BMGY Medium bis zu einer OD_{600} von 2 bis 6 vorgezogenen Kultur inokuliert und 144 h induziert. Zur Erhaltung der Induktion wurde alle 24 h 100 % Methanol bis zu einer Gesamtkonzentration von 2 % hinzugegeben. Nach der Induktion wurden die Zellen durch Zentrifugation sedimentiert (17700 \times g/10 min) und der Überstand aus drei Ansätzen vereinigt und weiterverarbeitet. Abb. 57 zeigt die typische Größe der Zellpellets nach 144 h Fermentation.



Abb. 57: ZmPrx70_{rec} sekretierende *Pichia pastoris* Kulturen nach 144 h Fermentation und Zentrifugation. Der erhaltene Überstand wurde der weiteren Aufarbeitung zugeführt. Das erhaltene Nassgewicht betrug typischerweise um 50 g/l.

3.6.6.1. Ammoniumsulfatfraktionierung

Der erhaltene Überstand wurde vor der Anwendung eines Chromatographieverfahrens konzentriert und in den benötigten Puffer aufgenommen. Zur ersten Reinigung wurde eine Ammoniumsulfatfällung eingesetzt. Es wurde zunächst im Vorversuch die Ammoniumsulfatkonzentration bestimmt bei der ZmPrx70 ausgesalzt werden konnte. Dazu wurde schrittweise (20-30 %, 30-40 %, 40-50 %, 50-60 % und 60-70 %) ein Aussalzen durchgeführt und die erhaltenen Pellets auf eine Peroxidaseaktivität untersucht. Die höchste Aktivität wurde im Bereich von 60-70 % beobachtet (siehe Abb. 58). In ersten Versuchen wurde mit einer zweistufigen Methode gearbeitet. Einer ersten Fällung mit 35 % gesättigter Ammoniumsulfatlösung folgte ein zweiter Schritt bei 70 % gesättigter Lösung. Die Fällung

erfolgte für mindestens 4 h bzw. über Nacht bei 4°C um die Ausbeute zu erhöhen. Dieses Vorgehen wurde im Verlauf der Versuche auf ein einstufiges Verfahren reduziert, um die Verarbeitungszeit zu verkürzen und möglichst viel Peroxidaseaktivität zu erhalten. Nach einer Fällung mit 60 % gesättigter Ammoniumsulfatlösung erfolgte die Aufnahme in Natriumphosphat-Glycerol-Puffer bei pH 8,0 (NPG 8) für die Reinigung über IMAC, bzw. in Natriumacetatpuffer bei pH 4,0 für die Reinigung von ZmPrx70_{rec} über eine Ionenaustauschchromatographie. Über dieses Vorgehen konnte der Überstand von anfänglich etwa 600 ml auf 10-20 ml reduziert werden. Es folgte ein erneuter Pufferaustausch über PD10-Säulen, um den Salzgehalt weiter zu reduzieren.

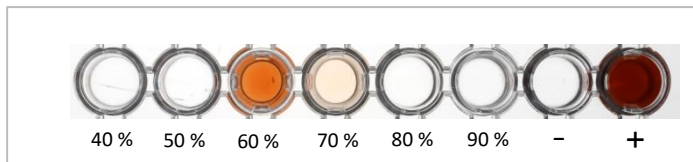


Abb. 58: Etablierung der Ammoniumsulfatfraktionierung für ZmPrx70_{rec}. Mikroassay zur Überprüfung der erhaltenen Proteinfractionen auf eine Peroxidaseaktivität. Angaben in % entsprechen der Ammoniumsulfatsättigung, die in der Fällung verwendet wurde. 25 µl der Enzymlösung wurden eingesetzt. Negativkontrolle war eine chemische Kontrolle ohne Enzym, Positivkontrolle HRP Sigma Typ I, 10 µl (0,7 U/ml). Dargestellt ist ein typische Ergebnis der Ammoniumsulfatfällung.

3.6.6.2. Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie

Die erhaltene Proteinlösung in NPI-10- oder NPG8-Puffer wurde direkt in die Affinitätschromatographie eingesetzt. Das Auftragsvolumen richtete sich nach dem Proteingehalt der entsprechenden Proben. Es wurden in Vorversuchen verschiedene Volumen und Proteingehalte eingesetzt. Das Säulenvolumen betrug zunächst 1 ml, später 5 ml. Das normale Protokoll sieht für die Auftrags-, Wasch- und Elutionspuffer eine Verwendung von verschiedenen Imidazolkonzentrationen vor. Während der Bindung sollte eine Konzentration von 10 mM Imidazol zur Verringerung unspezifischer Bindungen und im Waschpuffer 20 mM Imidazol zur Auflösung schwacher Wechselwirkungen mit der Säulenmatrix eingesetzt werden. Über einen Histidin-tag gebundene Proteine werden nach der Bindung entweder isokratisch über 250 mM Imidazol oder über einen Gradienten von der Säulenmatrix gelöst. Imidazol stellt einen Peroxidasehemmstoff dar. Daher wurde das Standardprotokoll nur in Pilotversuchen eingesetzt. Bindung und Elution zeigten in diesen Versuchen keine Auffälligkeiten, das Chromatogramm zeigte einen definierten Peak bei der

3. Ergebnisse

Elution. In entsprechenden Fraktionen konnte keine Peroxidaseaktivität detektiert werden. Auch die in NPI-10-Puffer aufgenommenen Proteinlösungen zeigten eine stark verringerte Aktivität.

Es wurde daher ein neues Protokoll mit veränderten Bindungs-, Wasch- und Elutionspuffern etabliert. Die Elution Histidin-*Tag* gebundener Proteine von Nickelsäulen kann zusätzlich zur Verwendung von Imidazol ebenso über einen starken Chelator wie EDTA oder eine Veränderung des pH-Wertes in den sauren Bereich (< 6,0) erfolgen. Da die Verwendung von EDTA ein Regenerieren der Säule nötig macht und das Eluat mit EDTA und Nickelionen verunreinigt wird, wurde mit einer Änderung des pH-Wertes im Elutionspuffer in den sauren Bereich gearbeitet.

Verwendet wurden pH-Werte von 5,0 und 4,2 zur Elution der gebundenen Proteine. Die Elution mit niedrigerem pH-Wert lieferte schärfere und symmetrische Elutionspeaks und wurde daher in Folgeexperimenten verwendet.

Abb. 59 zeigt ein typisches Chromatogramm sowie ein durchgeführtes Mikroassay der erhaltenen Fraktionen. Peroxidaseaktivität wurde in den Fraktionen 4-7 nachgewiesen. Dies waren auch die Fraktionen mit den höchsten Proteinkonzentrationen, Chromatogramm und Aktivität ließen sich in Deckung bringen. Es zeigte sich jedoch in diesen Versuchen, dass der größte Anteil an Aktivität im Durchfluss zu finden war (siehe Abb. 59, Mikroassay). Dies war unabhängig von der aufgetragenen Proteinmenge und der Probenvorbereitung zu beobachten. Die Bindungskapazität der Säule war in diesen Versuchen nicht ausgeschöpft. Generell erfolgte eine maximale Beladung mit etwa 50 % der angegebenen Kapazität der Säulenmatrix. Es zeigte sich zudem in diesen Versuchen keine deutlich angereicherte Fraktion. Dieses Bild war in den durchgeführten Aufreinigungen typisch, auch Variationen von Proteinmenge, Durchflussgeschwindigkeit während der Bindung oder pH-Wert im Waschpuffer verschob das Verhältnis nicht zugunsten einer höheren Aktivität in den eluierten Fraktionen.

Es wurden ergänzende Versuche mit einer Co^{2+} -NTA-, statt der vorher verwendeten Ni-NTA-Matrix durchgeführt. Dazu erfolgte über ein Spülen mit einer 100 mM EDTA-Lösung ein vollständiges Ablösen der Ni^{2+} -Ionen von NTA-Matrix und ein anschließendes Beladen mit Kobalt aus einer 100 mM Kobaltchlorid-Lösung. Dieses Protokoll wurde auch für die Regeneration von verbrauchten Säulen verwendet.

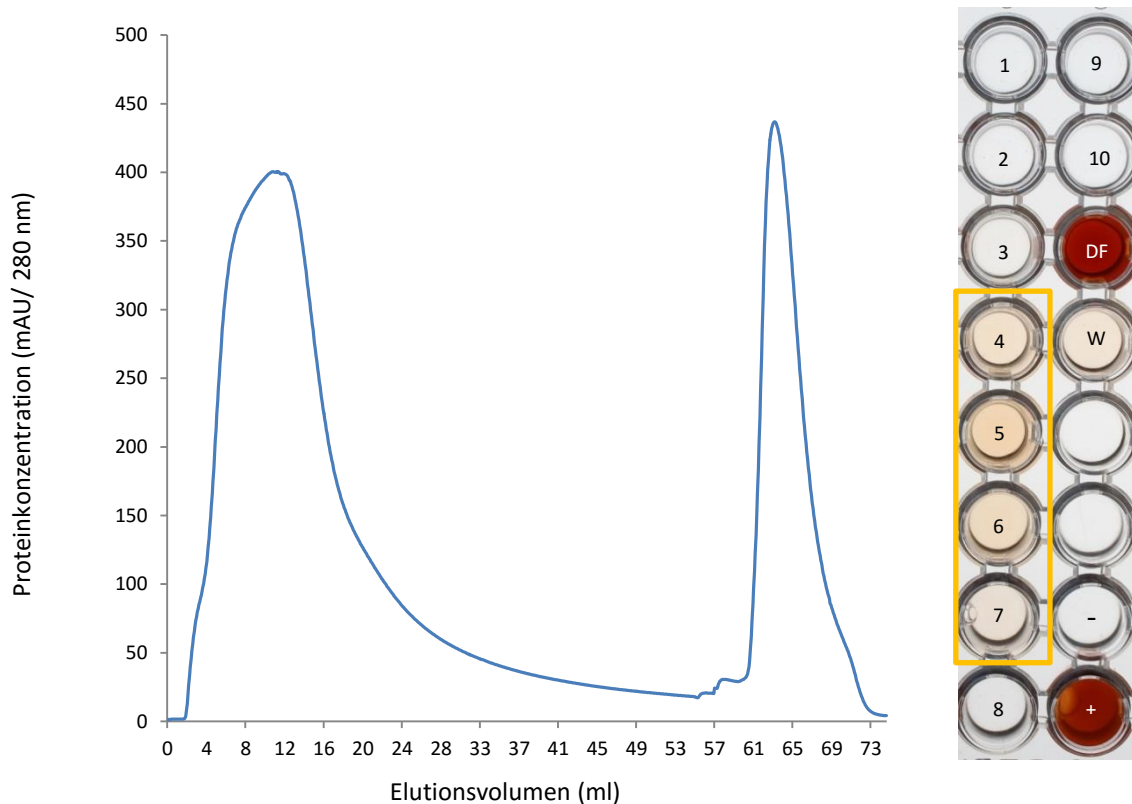


Abb. 59: Chromatogramm und korrespondierender Mikroassay einer Affinitätschromatographie mit Ni^{2+} -NTA-Matrix und 5 ml Säulenvolumen (Protino® Ni-NTA Säule, Macherey-Nagel, Düren, Deutschland). Aufgetragen wurden 10 ml Probe mit einem Gesamtproteingehalt von rund 60 mg. Je 10 μl der Fraktionen wurden im Assay analysiert, 1-10: Erhaltene Fraktionen, DF: Durchfluss, W: Waschfraktion, Negativkontrolle: chemische Kontrolle ohne Enzym, Positivkontrolle HRP, 10 μl (0,7 U/ml). Dargestellt ist ein typisches Ergebnis der Aufreinigung über eine IMAC mit Ni^{2+} -NTA-Matrix.

Das Vorgehen während der Chromatographie und die verwendeten Puffer wurden beibehalten. Die Co^{2+} -NTA-Matrix führte zu einer deutlicheren Hauptfraktion, verglichen mit einer Ni^{2+} -Matrix. Auch das Verhältnis der Aktivität der Hauptfraktion und des Durchflusses erscheint im Mikroassay besser (siehe Abb. 60). Eine Analyse der Fraktionen auf Proteingehalt und Aktivität ergab die in Abb. 61 dargestellte Verteilung. Nur 8 % der aufgetragenen Aktivität finden sich in der Hauptfraktion, 60 % finden sich auch hier im Durchfluss. Zudem ergab sich aus Proteingehalt der erhaltenen Proben und der erhaltenen Aktivität, keine Steigerung der spezifischen Aktivität durch diesen Chromatographieschritt. Die höchste spezifische Aktivität wurde im Durchfluss detektiert (siehe Abb. 61).

3. Ergebnisse

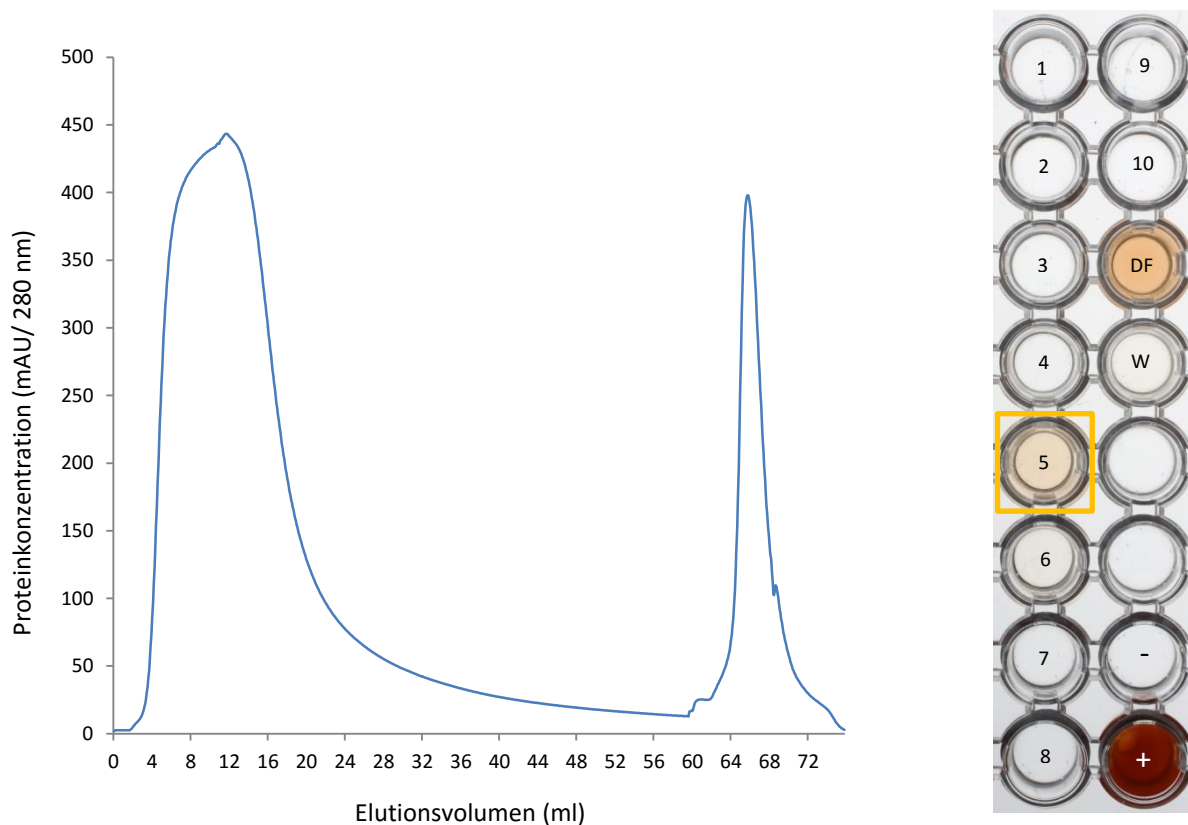


Abb. 60: Chromatogramm und korrespondierender Mikroassay einer Affinitätschromatographie mit Co^{2+} -NTA-Matrix und 5 ml Säulenvolumen (Protino® Ni-NTA Säule, Macherey-Nagel, Düren, Deutschland). Je 10 μl der Fraktionen wurden im Assay analysiert, 1-10: Erhaltene Fraktionen, DF: Durchfluss, W: Waschfraktion, Negativkontrolle: chemische Kontrolle ohne Enzym, Positivkontrolle HRP, 10 μl (0,7 U/ml). Dargestellt ist ein typisches Ergebnis der Aufreinigung über eine IMAC mit Co^{2+} -NTA-Matrix.

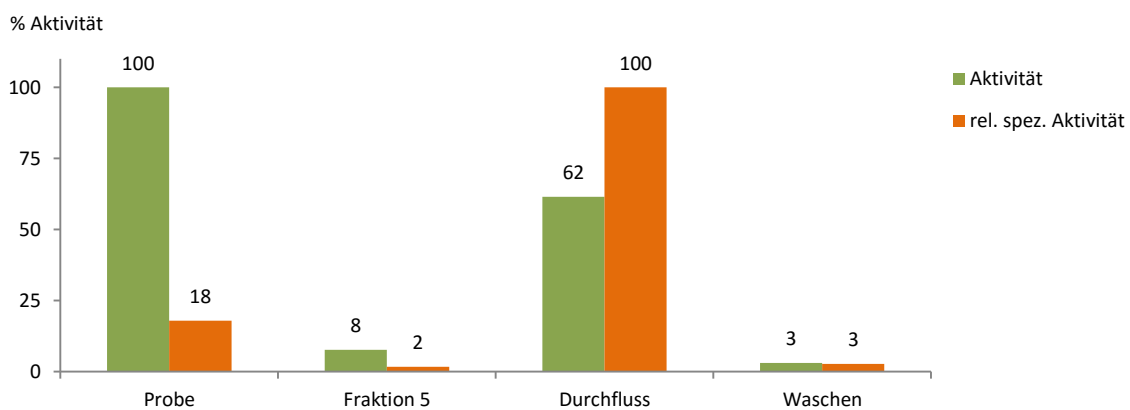


Abb. 61: Photometrische Vermessung der erhaltenen Fraktionen sowie der spezifischen Aktivität nach IMAC mit Co^{2+} -NTA-Matrix. Je 10 μl der erhaltenen Fraktionen wurden photometrisch hinsichtlich ihrer Guajacolperoxidaseaktivität charakterisiert. Dargestellt ist ein typisches Ergebnis der Reinigung über eine IMAC.

Durch die nicht zufriedenstellende Bindung von ZmPrx70_{rec} an die Säule und somit einer fehlenden Steigerung der spezifischen Aktivität wurde die Reinigungsstrategie modifiziert. Es wurde eine Strategie basierend auf den biochemischen Eigenschaften des rekombinanten Proteins entworfen.

3.6.6.3. Ionenaustauschchromatographie

Da der isoelektrische Punkt von ZmPrx70_{rec} laut Berechnungen im deutlich alkalischen Bereich (pI 8,85; ProtParam) liegen sollte, wurde als zweiter Reinigungsschritt nach der fraktionierten Ammoniumsulfatfällung eine Kationenaustauschchromatographie durchgeführt. Der pH-Wert wurde entsprechend des optimalen Aktivitätsbereichs nativer ZmPrx70 ausgewählt. Dazu wurde das aus der Ammoniumfällung resultierende Pellet in Natriumacetatpuffer mit einem pH-Wert von 4 aufgenommen, auf eine Mono-S-Säule aufgetragen und über einen NaCl-Gradienten die Proteine eluiert. Die erhaltenen Fraktionen wurden anschließend auf Peroxidaseaktivität überprüft. Die Abb. 62 zeigt das Ergebnis einer durchgeführten Chromatographie. Nur ein geringer Anteil (etwa 10%) der Aktivität findet sich im Durchfluss, es finden sich stark mit Aktivität angereicherte Fraktionen (4-7). In diesen Fraktionen zeigen sich in den Hauptfraktionen (5 und 6) Aktivitäten von 556 und 361 % gegenüber der aufgetragenen Proteinlösung (siehe Abb. 63). Es zeigte sich eine Steigerung der spezifischen Aktivität von $4,3 \text{ U/mg}^{-1}$ auf $64,8 \text{ U/mg}^{-1}$ bzw. $45,5 \text{ U/mg}^{-1}$ (Fraktion 5 bzw. 6). Daraus errechnet sich in dieser Phase der Aufreinigung ein Reinigungsfaktor von 15- bzw. 10,6-fach. Die erhaltenen Hauptfraktionen wurden vereinigt, auf ein Volumen von 200 μl eingengt und über eine Gelfiltration weiter verarbeitet.

3. Ergebnisse

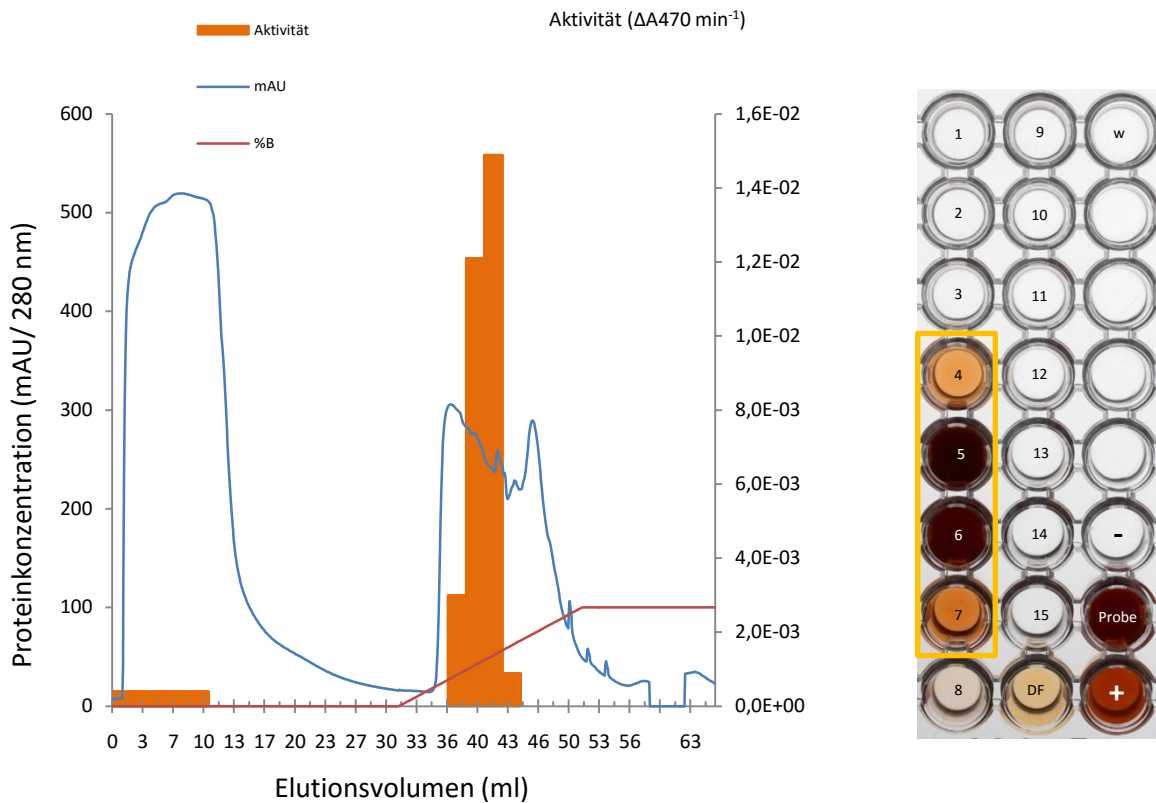


Abb. 62: Kationenaustauschchromatographie zur Aufreinigung von $ZmPrx70_{\text{rec}}$ und entsprechender Mikroassay. Je $10 \mu\text{l}$ der Fraktionen wurden im Assay analysiert, 1-15: Erhaltene Fraktionen, DF: Durchfluss, W: Waschfraktion, Negativkontrolle: chemische Kontrolle ohne Enzym, Positivkontrolle HRP, $10 \mu\text{l}$ ($0,7 \text{ U/ml}$). Dargestellt ist ein typisches Ergebnis der Kationenaustauschchromatographie.

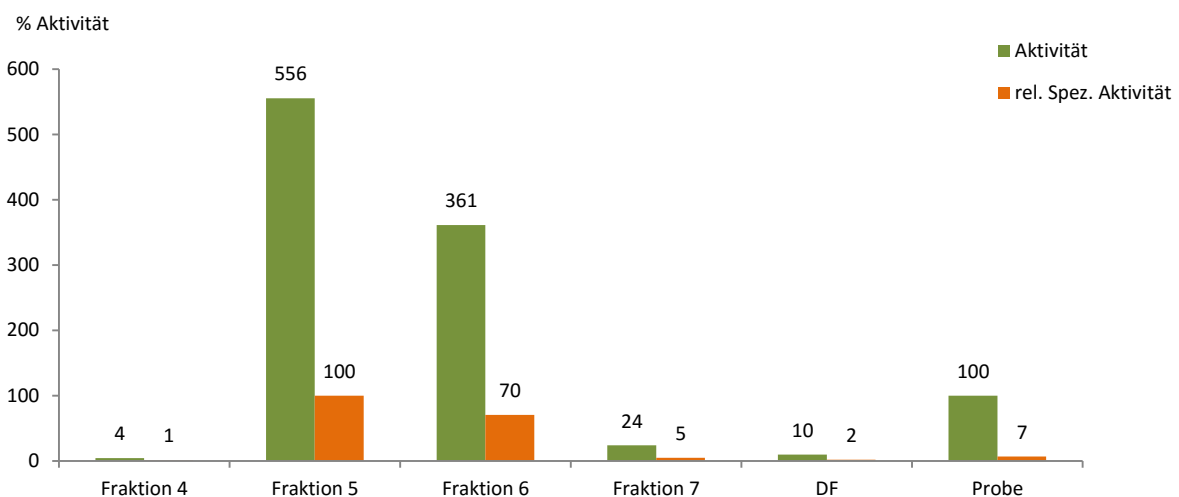


Abb. 63: Darstellung der photometrischen Bestimmung der Guajacolperoxidaseaktivität in IEX-Fractionen normiert auf die eingesetzte Probe. $10 \mu\text{l}$ der einzelnen Fraktionen sowie Durchfluss und der eingesetzten Probe wurden hinsichtlich ihrer Guajacolperoxidaseaktivität (siehe 2.2.3.8.2) untersucht. Relativ zur Probe ergaben sich Aktivitätssteigerungen auf 556 % und 361 % in den Hauptfraktionen und eine deutliche Steigerung der spezifischen Aktivität. Dargestellt ist ein typisches Ergebnis der Aufreinigung über eine Kationenaustauschchromatographie.

3.6.6.4. Gelfiltration

Die Gelfiltration wurde entsprechend 2.2.3.4.5 mit einzelnen Hauptfraktionen (Fraktionen 5 oder 6) durchgeführt. Es ergaben sich fünf Fraktionen mit nachweisbarer Peroxidaseaktivität (siehe Abb. 64). Über Standardproteine wurde eine Eichgerade, die das Elutionsvolumen in Abhängigkeit vom Molekulargewicht beschreibt, erstellt. Aus dieser leitet sich für die Hauptfraktion 16 eine Masse von 35 kDa ab. Diese deckt sich mit der *in silico* Berechnung über die Software ProtParam.

Die Gelfiltration lieferte nicht nur eine Hauptfraktion mit Peroxidaseaktivität, sondern diese enthielt eine deutliche Hauptfraktion sowie drei bis vier weitere Fraktionen mit enthaltener Peroxidaseaktivität (siehe Abb. 64). Die Analyse der Fraktionen über eine modifizierte SDS-PAGE zeigte eine deutliche Bande bei etwa 40 kDa sowie eine etwas größere in den Fraktionen 14 und 15 (siehe Abb. 65). Die spezifischen Aktivitäten nach der Gelfiltration erreichten 238 U/mg^{-1} in der Hauptfraktion. Dies entspricht einem erreichten Reinigungsfaktor von 3,7-fach gegenüber der IEX. Für die Messungen der Substratspezifität, pH-Wert-Abhängigkeit sowie der Bestimmung von K_M und V_{max} wurden die Fraktionen 16 und 17 aus den Gelfiltrationen verwendet. Für die Bestimmung von Temperaturabhängigkeit und $-optimum$ wurden die Fraktionen 5 und 6 aus den IEX Aufreinigungen verwendet.

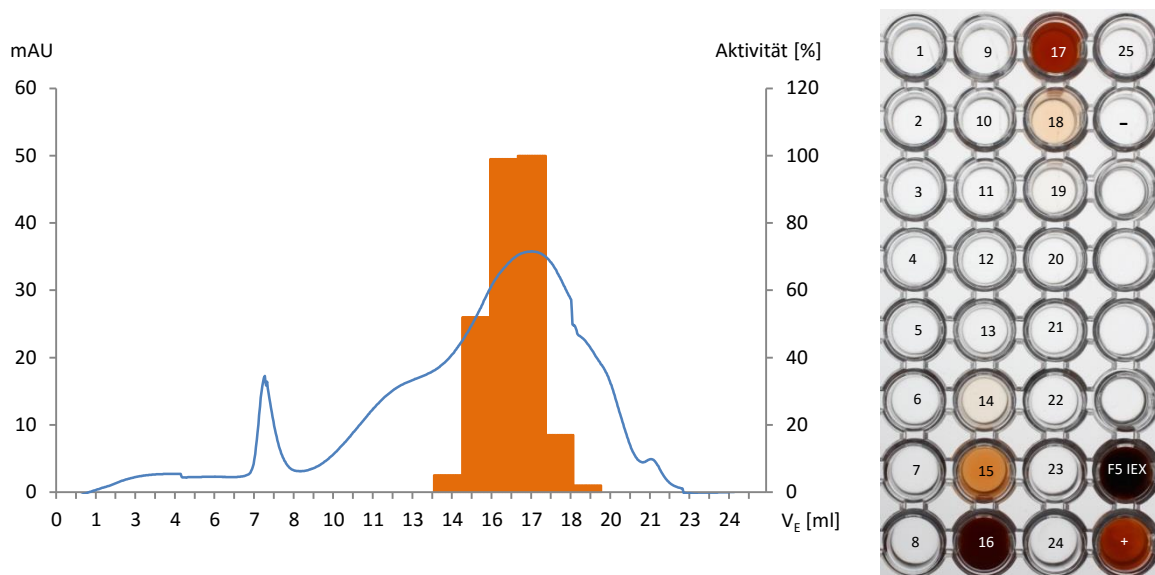


Abb. 64: Gelfiltration zur weiteren Reinigung der Fraktionen nach der Kationenaustauschchromatographie. Dargestellt sind ein typisches Chromatogramm und die Überprüfung der Fraktionen durch einen Mikroassay. 2 ml Fraktion aus der IEX wurden auf etwa 200 μl eingengt und auf eine 10/300 GL Säule mit Superdex 200 Matrix aufgetragen. Die Chromatographie erfolgte bei 0,5 ml/min in Natriumphosphatpuffer (pH 7,0). Das erhaltene Chromatogramm zeigte rund um die Peroxidaseaktivität keinen klaren Proteinpeak, sondern einen breiten, unsymmetrischen Hauptpeak. 1-25: erhaltene Fraktionen, -: chemische Negativkontrolle, F5 IEX: eingesetzte Probe aus der IEX, +: Positivkontrolle HRP, 10 μl (0,7 U/ml). Dargestellt ist ein typisches Ergebnis einer Gelfiltration.

3. Ergebnisse

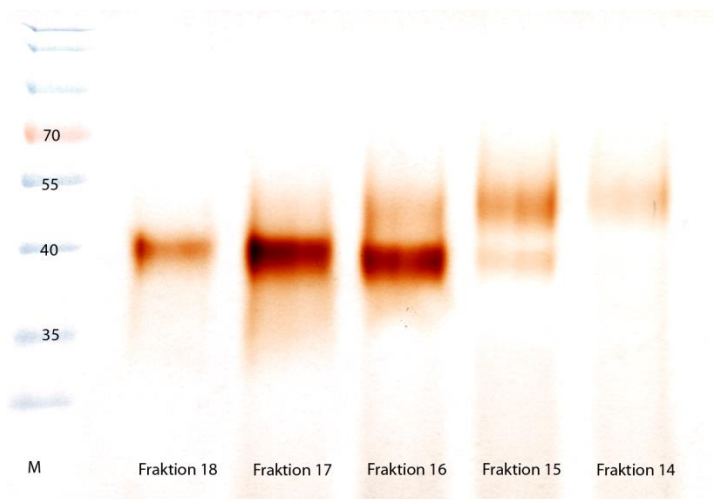


Abb. 65: Aktivitätsfärbung aktiver Fraktionen aus der Gelfiltration nach modifizierter SDS-PAGE zur Bewertung der erhaltenen Peroxidaseaktivitäten und Abschätzung der nativen molekularen Masse. Nach dem elektrophoretischen Auftrennen wurde ZmPrx70_{rec} mittels Guajacol im Gel detektiert. Es ließen sich zwei Banden detektieren, beide mit geringem Größenunterschied im Bereich von 40-45 kDa. Dabei konnte in Fraktion 14 nur die Größere beider Formen detektiert werden, in Fraktion 15 wurden beide Größen nachgewiesen. Die Fraktionen 16-18 ließen jeweils nur eine Aktivitätsbande mit einer molekularen Masse von etwa 40 kDa erkennen. Diese wurden für weitere Analysen verwendet. Aufgetragen wurden jeweils rund 1 µg Protein.

Nach der Gelfiltration ergab sich eine typische Ausbeute von 0,383 mg/l an ZmPrx70_{rec}. Die erreichten RZ-Werte (A_{404}/A_{280}) lagen zwischen 0,6 und 0,8.

3.7. Biochemische Charakterisierung

Für biochemische Charakterisierung wurden Fraktionen (16,17 und 18) aus der Gelfiltration (pH-Optimum, kinetische Konstanten, relative Aktivitäten) sowie Hauptfraktionen (Fraktion 5 und 6) der Kationenaustauschchromatographie (Temperaturoptimum und Stabilität) verwendet.

3.8. Aktivitätsfärbungen

Zum Visualisieren der molekularen Masse nativer ZmPrx70_{rec} wurden Aktivitätsfärbungen durchgeführt (siehe 2.2.3.5). Auch hier erfolgte die Analyse einzelner Fraktionen aus der Gelfiltration. In allen Färbungen (Guajacol, TMB, DAB) konnte eine einzelne Bande im Bereich um 40 kDa detektiert werden. Auch beim Einsatz von geringen Proteinmengen konnte eine hohe Peroxidaseabundanz in den Gelen beobachtet werden (siehe Abb. 66). Basierend auf einer TMB-Färbung wurde die entsprechende Bande ausgeschnitten und konnte nach einer MALDI-TOF-Analyse als ZmPrx70_{rec} identifiziert werden.

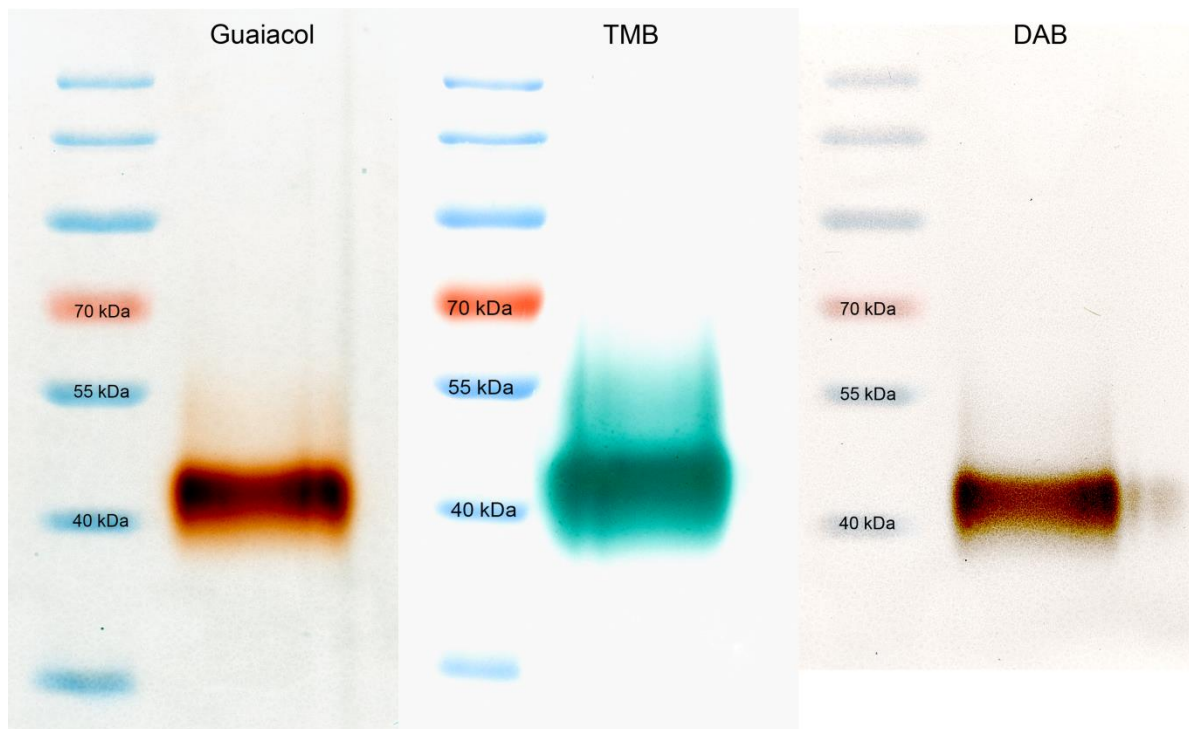


Abb. 66: Aktivitätsfärbungen von Fraktion 16 aus der Gelfiltration mit verschiedenen Substraten nach modifizierter SDS-PAGE zur Bestimmung der nativen molekularen Masse und Nachweis der Häm-Gruppe. Als Substrate der Aktivitätsfärbungen wurden Guajacol, TMB und DAB verwendet. In allen Färbungen konnte eine starke Peroxidaseabundanz detektiert werden. Aufgetragen wurden jeweils 1,2 µg Protein.

3. Ergebnisse

3.8.1. pH-Optimum

Ergänzend zu den bisherigen Ergebnissen sollte als weitere wichtige biochemische Eigenschaft die pH-Abhängigkeit vom ZmPrx70_{rec} bestimmt werden. Als Vergleich wurde HRP herangezogen. Nach Aufzeichnung der Messdaten und Verrechnung von drei unabhängigen Aufreinigungen ergab sich ein pH-Optimum von 4,82 für ZmPrx70_{rec} und 5,79 für HRP (siehe Abb. 67).

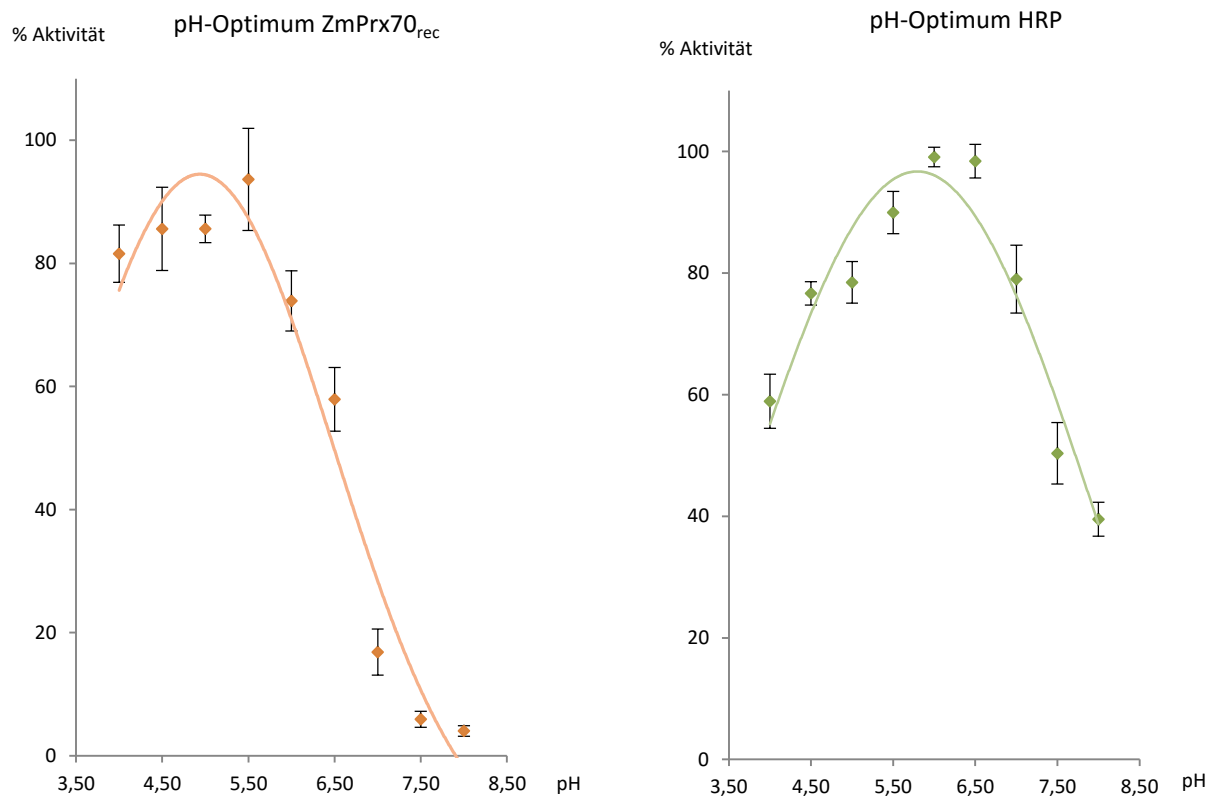


Abb. 67: pH-Optimum von ZmPrx70_{rec} und HRP. Die Bestimmung des pH-Optimums erfolgte in vier verschiedenen Puffern (Natriumacetat (25 mM; pH 4-5), MES (50 mM; pH 5,5-6,5) bzw. HEPES (50 mM; pH 7-8)) in einem pH Bereich von 4-8. Der Assay wurde bei deutlichem Substratüberschuss mit 84 mM Guajacol und 8,8 mM Wasserstoffperoxid (siehe 2.2.3.8.2) bestimmt. Nach der Normierung auf die Maximalaktivität ergaben sich die oben abgebildeten Grafiken. Die Hochpunkte der angelegten Gaußkurven ergaben Maximalwerte bei pH 4,93 (ZmPrx70_{rec}) und pH 5,79 (HRP). Dargestellt ist das arithmetische Mittel mit Standardabweichung aus n= 3 unabhängigen Versuchen. Eingesetztes Protein: ZmPrx70_{rec}: 0,57 µg/Assay, HRP: 0,50 µg/Assay.

3.8.2. Temperaturoptimum

Für die Bestimmung des Temperaturoptimums erfolgten zunächst Vorversuche zur Ermittlung einer sinnvollen Vorinkubationszeit. In ersten Versuchen zeigte sich eine hohe Toleranz von ZmPrx70_{rec} gegen hohe Inkubationstemperaturen. Ohne eine Vorinkubation wurde die höchste gemessene Aktivität bei 95°C gemessen. Um die Auswirkungen von

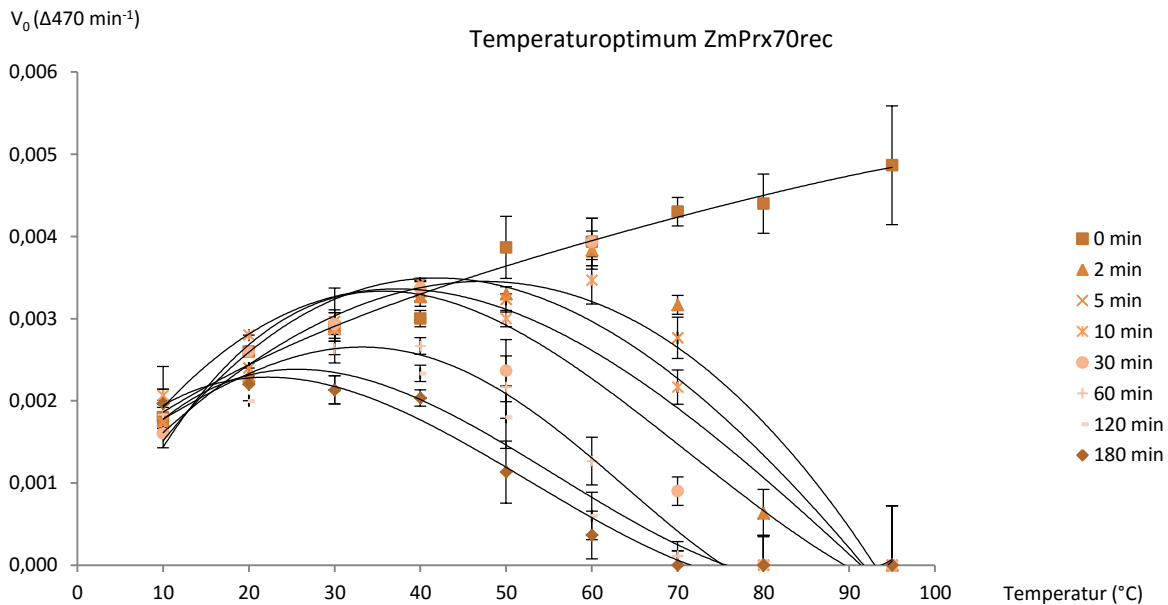


Abb. 68: Abhängigkeit des Temperaturoptimums von der Inkubationszeit. Die Aktivität von ZmPrx70_{rec} wurde unter verschiedenen Temperaturen mit Vorinkubation zwischen 0 und 180 min aufgezeichnet und grafisch aufgetragen. Eingesetztes Gesamtprotein: ZmPrx70_{rec}: 2,57 µg/Assay, HRP: 0,50 µg/Assay. Dargestellt ist das arithmetische Mittel mit Standardabweichung aus n= 3 unabhängigen Versuchen.

thermischer Instabilität und niedrigeren Temperaturen besser abschätzen zu können wurden Versuchsreihen unter Temperaturen zwischen 10 und 95°C und verschiedenen Inkubationszeiten durchgeführt. Getestete Inkubationszeiten reichten von 0 bis 180 min. Dabei wurde das Enzym in Puffer bei der entsprechenden Temperatur inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von Guajacol und Wasserstoffperoxid gestartet.

Abb. 68 fasst die erhaltenen Daten zusammen. Es erfolgte eine Verschiebung der optimalen Temperatur hin zu niedrigeren Temperaturen bei Verlängerung der Inkubationsdauer. Aus den Regressionskurven errechnete Optimaltemperaturen reichen von 95°C (0 min) bis 14°C (180 min). Anhand des Vorversuches wurde mit einer Vorinkubation von 2 min gearbeitet, was ein Temperaturoptimum von 64,45°C ergab (siehe Abb. 69, links).

3. Ergebnisse

Über einen Arrhenius-Plot wurde aus den erhaltenen Versuchsdaten über den stabilen Bereich (ohne Denaturierungseffekte) die Aktivierungsenergie berechnet. Sie lag bei 10,76 kJ/mol (siehe Abb. 69, rechts).

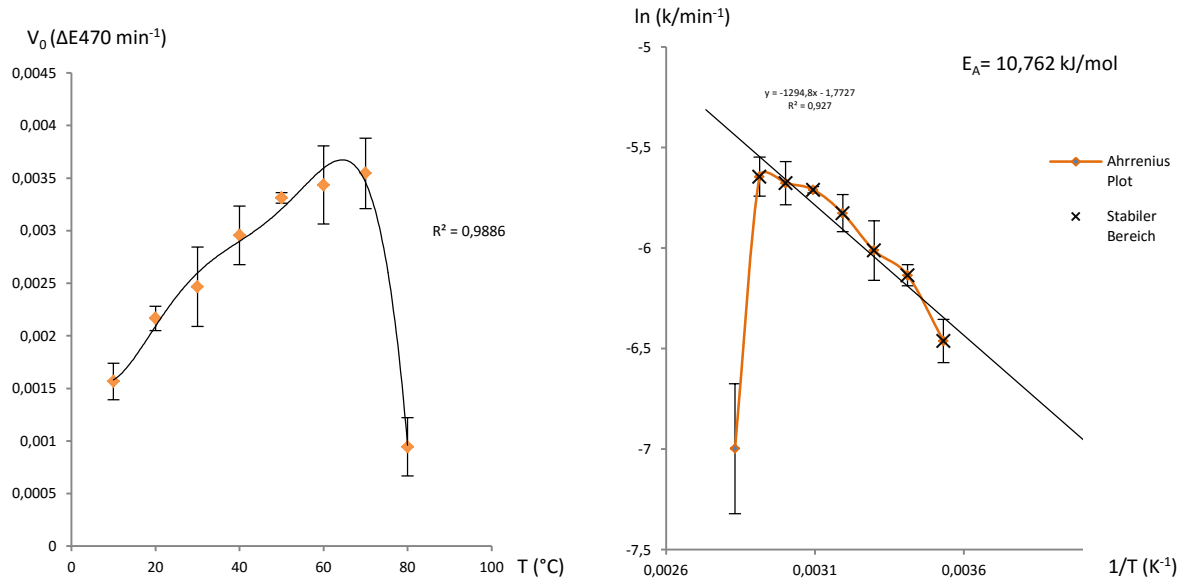


Abb. 69: Temperaturoptimum (links) und Arrheniusplot (rechts) zur Bestimmung der Aktivierungsenergie E_A . Dargestellt sind der Mittelwert und die entsprechende Standardabweichung. Eingesetztes Protein: ZmPrx70_{rec}: 2,57 $\mu\text{g}/\text{Assay}$, HRP: 0,50 $\mu\text{g}/\text{Assay}$. Dargestellt ist das arithmetische Mittel mit Standardabweichung aus $n=3$ unabhängigen Versuchen.

3.8.3. Temperaturstabilität

Es wurde zusätzlich zum Temperaturoptimum die Stabilität von ZmPrx70_{rec} überprüft. Dazu erfolgte die Inkubation des Enzyms bei 30 $^{\circ}\text{C}$, 50 $^{\circ}\text{C}$, 60 $^{\circ}\text{C}$, 70 $^{\circ}\text{C}$ und 80 $^{\circ}\text{C}$ über einen Zeitraum von 180 min. Es erfolgte eine Bestimmung der Restaktivität unter Standardbedingungen nach bestimmten Zeitpunkten und eine Normierung auf die Anfangsaktivität. Es zeigte sich ein stabiles Verhalten über einen weiten Zeitraum des Versuches, die Aktivität hatte nach 10 min bei 50 $^{\circ}\text{C}$ eine Restaktivität von 78 % und besaß nach 180 min noch eine Restaktivität von 29 %. Bei 30 $^{\circ}\text{C}$ wurde eine Restaktivität von 74 % und bei 60 $^{\circ}\text{C}$ noch 9 % der Anfangsaktivität detektiert. Die schnellste Inaktivierung erfolgte bei 95 $^{\circ}\text{C}$ nach 2 min Inkubation (keine messbare Aktivität), bei einer Temperatur von 80 $^{\circ}\text{C}$ erreichte die Restaktivität nach 2 min noch 14 %, bei 70 $^{\circ}\text{C}$ nach 60 min noch 3 %. Insgesamt ergibt sich eine temperaturabhängige Inaktivierung mit flachem Verlauf sowie gut detektierbare Aktivitäten auch bei Inkubation bei wärmeren Temperaturen.

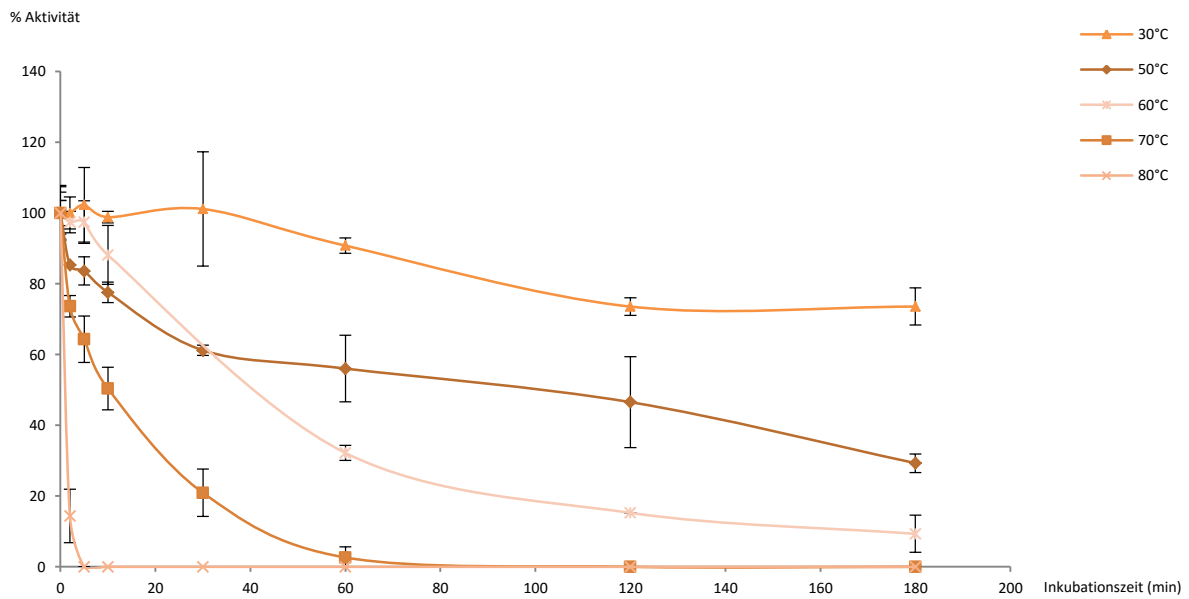


Abb. 70: Auswirkungen verschiedener Temperaturen auf die Aktivität von ZmPrx70_{rec} in Abhängigkeit der Inkubationsdauer. Dargestellt sind der Mittelwert und die entsprechende Standardabweichung. Eingesetztes Protein: ZmPrx70_{rec}: 2,57 µg/Assay, HRP: 0,50 µg/Assay. Dargestellt ist das arithmetische Mittel mit Standardabweichung aus n= 3 unabhängigen Versuchen.

3.9. Enzymkinetik

Mit den erhaltenen Fraktionen aus der Gelfiltration und IEX-Hauptfraktionen wurde ZmPrx70_{rec} biochemisch charakterisiert. Es wurden K_M -Werte und Maximalgeschwindigkeiten für typische Peroxidasesubstrate bestimmt. Als Substratstandard diente Guajacol, welches auch während der Auswahl von Klonen und Optimierung der Expression als Standard-Assaysubstrat verwendet wurde. Verschiedene natürliche und künstliche Substrate wurden umgesetzt und erhaltene Raten in Relation zum Guajacolumsatz gesetzt. Einige typische, sowie Assay-relevante, Effektoren wurden hinsichtlich ihrer Wirkung charakterisiert. Als Vergleich diente in den verschiedenen Assays HRP sowie, falls Messwerte verfügbar waren, das native ZmPrx70-Protein (Mika *et al.*, 2008).

3.9.1. Substratspezifität

K_M und V_{max} wurden für Guajacol und ABTS sowie Wasserstoffperoxid bestimmt. Zunächst wurde die Substratmenge ermittelt, die zu einer annähernden Sättigung der Reaktion ohne eine sichtbare Substrathemmung führte (siehe Anhang Abb. 109ff.). Aus den erhaltenen Anfangsgeschwindigkeiten wurden mittels nicht linearer Regression und Verfahren der kleinsten Fehlerquadrate (*partial least square*) die kinetischen Konstanten bestimmt (siehe Abb. 71 sowie Abb. 112, Abb. 113, Abb. 114). Als Vergleich erfolgte eine Bestimmung über

3. Ergebnisse

Linearisierung der Michaelis-Menten-Gleichung und die Auswertung über lineare Regression. Abbildungen erfolgten zusätzlich nach Lineweaver-Burk oder Hanes-Woolf zur Visualisierung der Daten (Abb. 109, Abb. 110 und Abb. 111). Die Bestimmung der kinetischen Konstanten für den Umsatz von Guajacol durch ZmPrx70_{rec} erfolgte in einem Bereich von 5,25 bis 168 mM Guajacol, bei 9,8 mM Wasserstoffperoxid in Natriumacetatpuffer bei pH 5 (siehe Abb. 67). Im Substratbereich von 0 bis 168 mM ergab sich ein für Michaelis-Menten-Kinetiken typischer Verlauf mit zu größeren Substratkonzentrationen hin abflachenden Aktivitätswerten. Es ergab sich ein K_M Wert von 16,7 mM mit einer Maximalgeschwindigkeit von 0,156 $\mu\text{mol}/\text{min}$ (HRP: $K_M= 5,1 \text{ mM}$, $V_{\text{max}}= 0,0755 \mu\text{mol}/\text{min}$). Entsprechende Auftragungen nach Hanes-Woolf finden sich im Anhang (Abb. 109). Der Umsatz von ABTS wurde in einem Bereich von 0,25 bis 32 mM bei 9,8 mM Wasserstoffperoxid in Natriumacetatpuffer bei pH 5,0 gemessen. Es ergaben sich eine K_M von 14,5 mM bei einer maximalen Reaktionsgeschwindigkeit von 0,0157 $\mu\text{mol}/\text{min}$ (HRP: $K_M= 1,5 \text{ mM}$, $V_{\text{max}}= 0,3847 \mu\text{mol}/\text{min}$). Wasserstoffperoxid wurde in einem Bereich von 0,2 bis 15 mM umgesetzt. Bei höheren Werten zeigten sich deutliche Effekte einer Hemmung der Reaktion. Durch das vorherige Ergebnis bei der Bestimmung der K_M von Guajacol wurde bei einer Konzentration von 84 mM Guajacol in Natriumacetatpuffer bei pH 5 gemessen, um eine Produkthemmung auszuschließen. Die größte Übereinstimmung mit der Messung der Initialgeschwindigkeit zeigte eine angelegte Kurve berechnet mit einer K_M von 1,7 mM und V_{max} mit 0,0960 $\mu\text{mol}/\text{min}$. Tabelle 23 fasst die Ergebnisse der kinetischen Studien zusammen.

Tab. 23: Erhaltene kinetische Konstanten für ZmPrx70_{rec} und HRP.

	ZmPrx70 _{rec}		ZmPrx70 (Mika <i>et al.</i> , 2008)		HRP	
	K_M (mM)	V_{max} ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	K_M (mM)	V_{max} ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	K_M (mM)	V_{max} ($\mu\text{mol}/\text{min}$)
Guajacol	16,7	0,116	14,3	-	5,1	0,0755
ABTS	14,5	0,0157	-	-	1,5	0,3847
Wasserstoffperoxid	1,7	0,0960	-	-	n.m.	n.m.

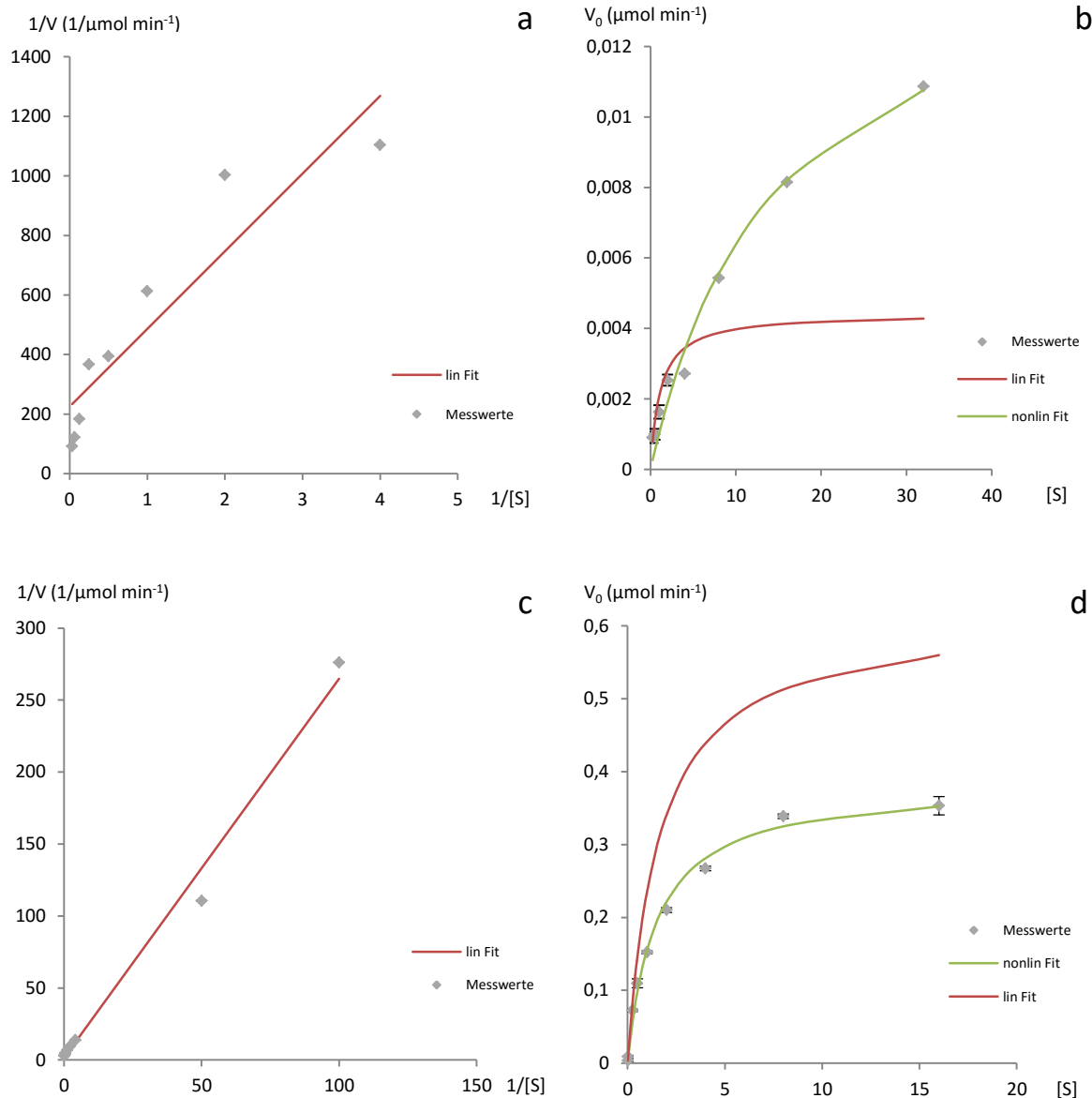


Abb. 71: Gegenüberstellung der Berechnung der kinetischen Konstanten über eine Linearisierung bzw. lineare Regression und nicht-lineare Regression mit dem Prinzip der kleinsten Fehlerquadrate (*partial least squares*). In Grau die Mittelwerte der gemessenen Werte dar bzw. deren Kehrwerte für die linearisierte Auftragung. In Rot dargestellt ist die entsprechende lineare Anpassung und deren Rückrechnung durch Einsetzen der erhaltenen Werte in die Michaelis-Menten-Gleichung, jeweils für ZmPrx70_{rec} (a, b) und HRP (c, d) für das Substrat ABTS gezeigt. Deutlich zu erkennen waren die in beiden Fällen auftretenden Ungenauigkeiten bei der Rückrechnung der Linearisierung auf die erhaltenen Messwerte. In beiden Fällen lieferte die nonlineare Anpassung die passendere Beschreibung der Messdaten. Eingesetztes Protein: ZmPrx70_{rec}: 0,57 $\mu\text{g}/\text{Assay}$, HRP: 0,50 $\mu\text{g}/\text{Assay}$. Dargestellt ist das arithmetische Mittel mit Standardabweichung aus $n=3$ unabhängigen Versuchen.

3. Ergebnisse

Ergänzend zu der Bestimmung kinetischer Konstanten verschiedener Substrate wurden Versuche zum relativen Umsatz, verglichen mit Guajacol, durchgeführt. Dabei wurden verschiedene künstliche und natürliche Substrate in typischen Konzentrationen unter Standardassaybedingungen (Natriumacetatpuffer pH 5, 25°C, normiert auf 9,09 mM Guajacol) umgesetzt. Als Vergleich diente auch hier HRP (Typ I).

Getestete künstliche Substrate waren TMB und ABTS. Der Umsatz von TMB unterschied sich nicht signifikant vom Guajacolumsatz. Die erreichte Aktivität mit ABTS als Substrat erreichte nur 1,61 % des Kontrollumsatzes. Beide Substrate erreichten bei Umsatz durch HRP deutlich höhere Aktivitäten mit 309 % (TMB) und 292 % (ABTS). Das native ZmPrx70-Isoenzym erreichte mit 180 % (TMB) und 11 % (ABTS) relativer Aktivität Werte zwischen ZmPrx70_{rec} und HRP.

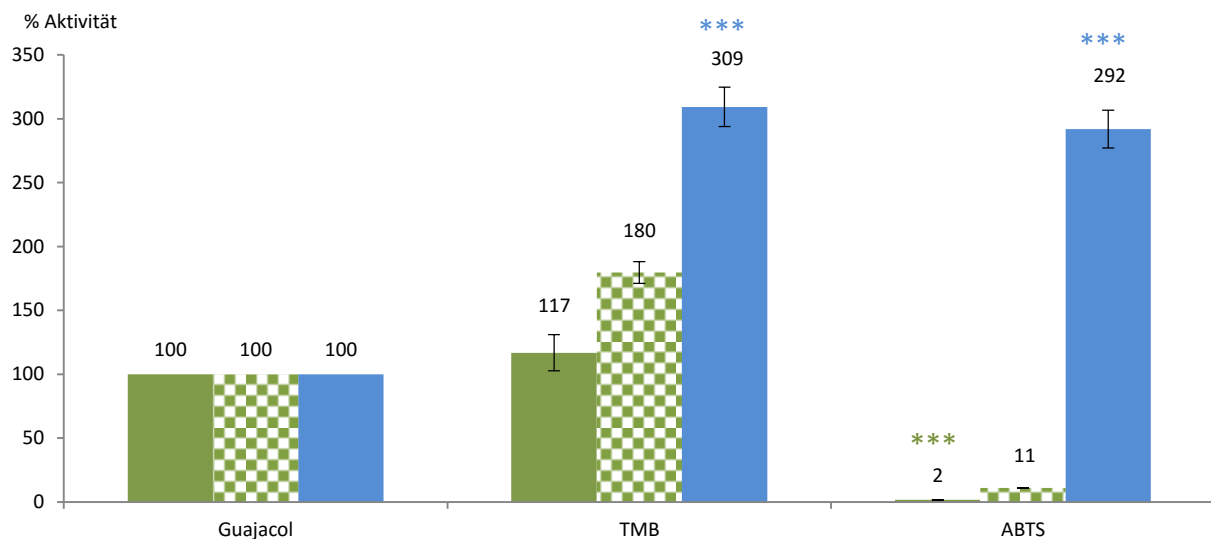


Abb. 72: Relativer Vergleich verschiedener künstlicher Substrate mit dem Umsatz von Guajacol durch ZmPrx70_{rec} (grün), ZmPrx70 nativ (grün, kariert) (Mika und Lüthje, 2003) und HRP (blau). Eingesetztes Protein: ZmPrx70_{rec}: 2,57 µg/Assay, HRP: 0,50 µg/Assay. Dargestellt ist das arithmetische Mittel mit Standardabweichung aus n= 3 unabhängigen Versuchen. Signifikanzniveau: nicht signifikant: p>0,05; * p<0,05; ** p<0,01; * p<0,001; **** p<0,00001.**

Durch die apoplastische Orientierung von ZmPrx70 ist eine Beteiligung an Lignifizierungsprozessen möglich. An natürlichen Substraten wurden daher vier in der Ligninbiosynthese vorkommende Substanzen verglichen. Im Syntheseweg weit oben angeordnet sind Ferula-, Kaffee- und Coumarinsäure. Am letzten Schritt vor der Ligninbiosynthese liegt Coniferylalkohol. Zusätzlich wurden der Umsatz von Ascorbat und des natürlichen Auxins IAA gemessen.

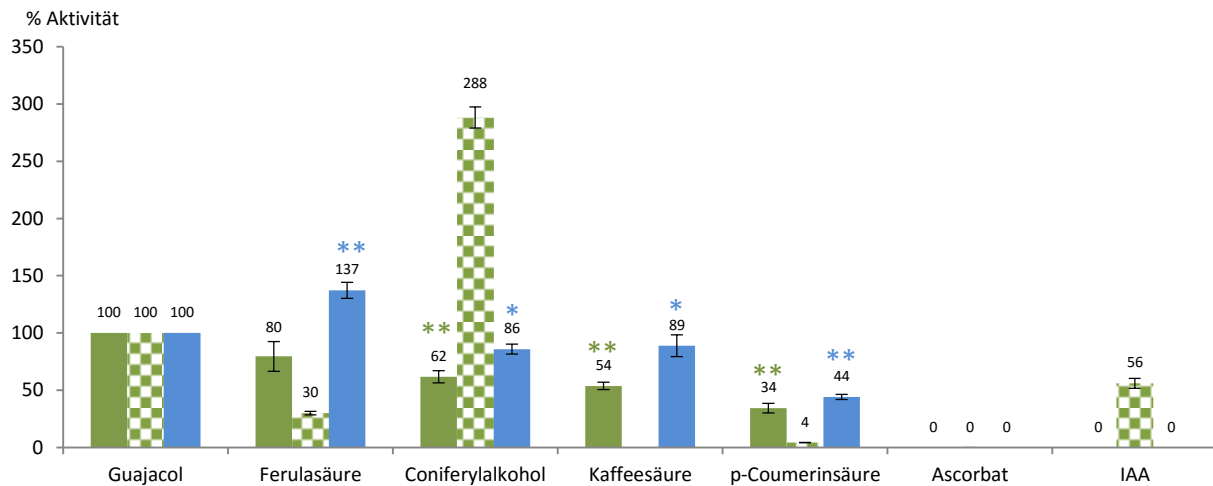


Abb. 73: Relativer Vergleich verschiedener natürlicher Substrate mit dem Umsatz von Guajacol durch ZmPrx70_{rec} (grün), ZmPrx70 nativ (grün, kariert) (Mika und Lüthje, 2003) und HRP (blau). Eingesetztes Protein: ZmPrx70_{rec}: 2,57 µg/Assay, HRP: 0,50 µg/Assay. Dargestellt ist das arithmetische Mittel mit Standardabweichung aus n= 3 unabhängigen Versuchen. Signifikanzniveau: nicht signifikant: p>0,05; * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,00001.

Bei den verwendeten Konzentrationen wurde Ferulasäure im Vergleich zu Guajacol von ZmPrx70_{rec} nicht signifikant anders umgesetzt, HRP zeigte eine leicht erhöhte Ferulasäureaktivität, alle weiteren Substrate wurden von beiden Enzymen gegenüber Guajacol schlechter umgesetzt. Es ergibt sich insgesamt bei ZmPrx70_{rec} eine Abstufung von Ferulasäure > Coniferylalkohol > Kaffeesäure > Coumarinsäure in den erreichten Aktivitäten. Diese Tendenz war ebenso bei HRP zu beobachten, jedoch waren gemessene Aktivitäten stets höher. Bei Ascorbat und IAA zeigten weder ZmPrx70_{rec} noch HRP eine detektierbare Aktivität. Beim Umsatz von natürlichen Substraten kommt es zu deutlichen Unterschieden zwischen ZmPrx70_{rec} und nativer ZmPrx70. Das native Isoenzym zeigte mit Coniferylalkohol die höchste gemessene relative Aktivität gegenüber Guajacol (288 %). Dieser Wert liegt deutlich über dem erreichten Wert von ZmPrx70_{rec} (62%). Ferulasäure wird deutlich schlechter umgesetzt, auch die Aktivität mit p-Coumarinsäure erreicht bei nativer ZmPrx70 deutlich geringere Werte. Im Gegensatz zu ZmPrx70_{rec} und HRP konnte bei nativer ZmPrx70 eine Auxinoxidaseaktivität beobachtet werden.

3.9.2. Effektoren der Peroxidaseaktivität

Neben Studien mit verschiedenen Substraten wurden auch typische Effektoren von Peroxidasen untersucht. Auch in diesen Versuchen wurde die Reaktion der HRP als Kontrolle vermessen. Phenolische Substanzen sind als klassische Stimulatoren von Peroxidasen

3. Ergebnisse

bekannt. Daher wurden aus dieser Stoffklasse Ferulasäure und Coniferylalkohol in geringen Konzentrationen zum Guajacolassay zugefügt und die Reaktion beobachtet.

Andere Effektoren wurden untersucht, da sie teilweise im Assay als Lösungsmittel vorkamen (DMSO, Ethanol), bei der Reinigung verwendet wurden (Imidazol), oder als klassische Hemmstoffe von Peroxidasen gelten (Natriumazid, Kaliumcyanid). Als Kontrolle diente jeweils der Standardassay mit 9,09 mM Guajacol als Substrat. Erhaltene Aktivitäten wurden auf diesen Standardwert normiert dargestellt.

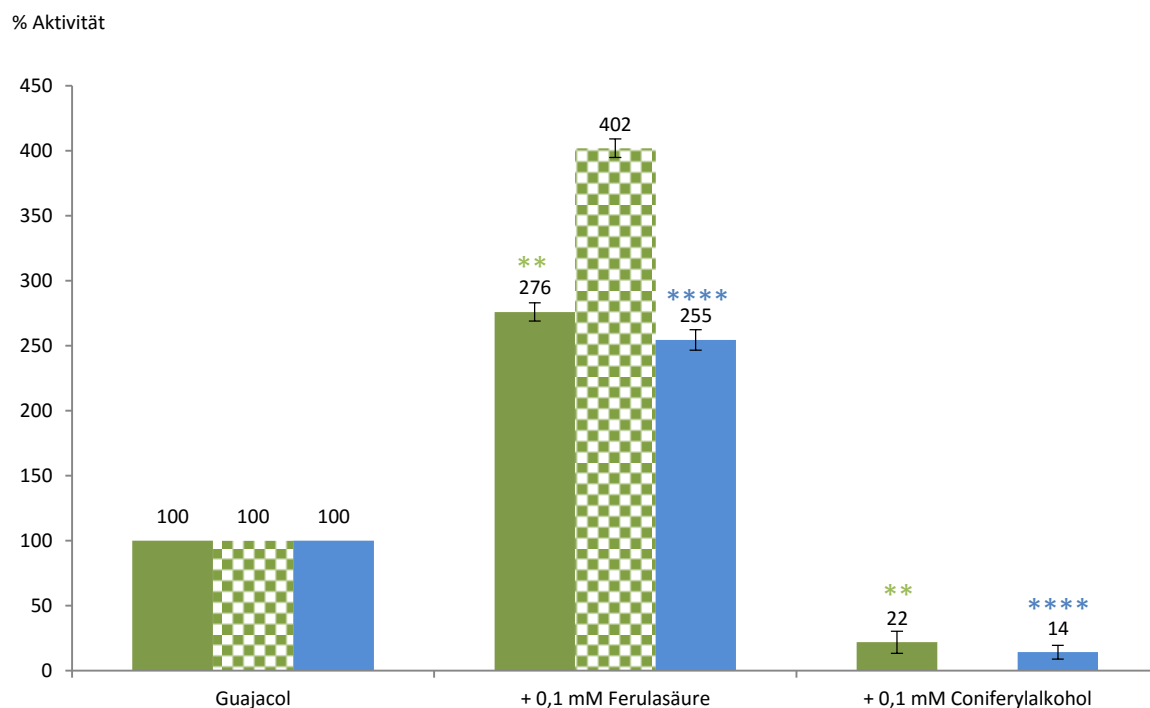


Abb. 74: Effekt der Addition von 0,1 mM Ferulasäure und Coniferylalkohol auf die Guajacolperoxidaseaktivität von ZmPrx70_{rec} (grün), ZmPrx70 nativ (grün, kariert) (Mika und Lühje, 2003) und HRP (blau). Eingesetztes Protein: ZmPrx70_{rec}: 2,57 µg/Assay, HRP: 0,5 µg/Assay. Dargestellt ist das arithmetische Mittel mit Standardabweichung aus n= 3 unabhängigen Versuchen. Signifikanzniveau: nicht signifikant: p>0,05; * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,00001.

Die Addition von Ferulasäure zum Assay lieferte in allen Fällen eine deutlich sichtbare hochsignifikante Steigerung der Guajacolaktivität auf 276 % (ZmPrx70_{rec}) und 255 % (HRP). Auch die Guajacolaktivität nativer ZmPrx70 wurde durch die Addition von Ferulasäure deutlich verstärkt und erreichte Werte von 402 %. Hingegen sank bei der Zugabe von Coniferylalkohol zum Ansatz die Aktivität auf den Wert von 22 % (ZmPrx70_{rec}) und 14 % (HRP). Auch diese Änderungen zeigten ein hohes Signifikanzniveau (siehe Abb. 74).

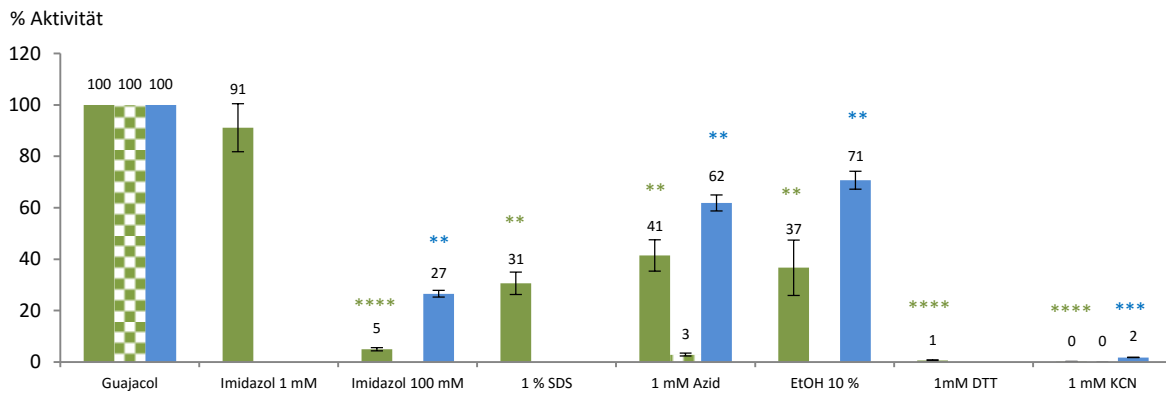


Abb. 75: Effektorwirkung auf ZmPrx70_{rec} (grün), ZmPrx70 nativ (grün, kariert) (Mika und Lühje, 2003) und HRP (blau). Eingesetztes Protein: ZmPrx70_{rec}: 2,57 µg/Assay, HRP: 0,50 µg/Assay. Dargestellt ist das arithmetische Mittel mit Standardabweichung aus n= 3 unabhängigen Versuchen. Signifikanzniveau: nicht signifikant p>0,05; * p<0,05; ** p<0,01; * p<0,001; **** p<0,00001.**

Die Untersuchung verschiedener weiterer Effektoren der Peroxidaseaktivität bestätigte die Ergebnisse aus Vorversuchen und zeigte in weiteren Fällen das typische Verhalten von Peroxidasen auf diese Stoffe. Das in der Elution von Nickelsäulen (Ni²⁺-NTA) eingesetzte Imidazol zeigte in einer Konzentration von 1 mM eine nicht signifikante Beeinflussung der Aktivität. In dieser Konzentration wurde mit Imidazol kein Versuch mit HRP durchgeführt. In einer Konzentration von 100 mM ist bei beiden Enzymen eine deutliche Hemmung zu erkennen. ZmPrx70_{rec} zeigte eine hochsignifikante Senkung auf 5 % der Kontrollaktivität, HRP wird auf 27 % des Kontrollniveaus gesenkt. Versuche mit 1 % SDS und 1 mM DTT ergaben bei ZmPrx70_{rec} eine signifikante Hemmung der Reaktion auf 31 % bzw. 0,6 % der Kontrolle. 10 % Ethanol hemmte beide Enzyme signifikant um 63 % (ZmPrx70_{rec}) und 29 % (HRP).

Die klassischen Peroxidasehemmstoffe KCN und NaN₃ zeigten in den durchgeführten Versuchen einen signifikanten Einfluss auf die Aktivität. 1 mM Azid führte zu einer Reduktion der Aktivität auf 40 % (ZmPrx70_{rec}) und 62 % (HRP) der Kontrolle, KCN führt zu einer fast vollständigen Hemmung des Umsatzes mit sichtbaren Restaktivitäten von 0,2 % (ZmPrx70_{rec}) und 2 % (HRP) der Kontrolle. Vergleichbare Werte konnten bei nativer ZmPrx70 beobachtet werden. Abb. 75 fasst die erhaltenen Ergebnisse zusammen.

Andere untersuchte Effektoren, wie Calcium- und Manganchlorid, Lectine (ConA und WGA) sowie DMSO zeigten bis auf 2 % DMSO keine signifikanten Effekte auf die Guajacolperoxidaseaktivität. Tab. 24 fasst die erhaltenen Ergebnisse zusammen.

3. Ergebnisse

Tab. 24: Übersicht über Effektoren mit nicht signifikanter Wirkung auf ZmPrx70_{rec} und HRP. Eingesetztes Protein: ZmPrx70_{rec}: 2,57 µg/Assay, HRP: 0,50 µg/Assay. Angegeben ist die relative Aktivität zur Kontrolle (Guajacol ohne Effektor). Als Vergleich dienen Messungen mit nativer ZmPrx70 (Mika und Lühje, 2003). Dargestellt ist das arithmetische Mittel mit Standardabweichung aus n= 3 unabhängigen Versuchen.

	Konzentration	ZmPrx70 _{rec}	ZmPrx70 (Mika <i>et al.</i> , 2008)	HRP
Guajacol	9,09 mM	100 %	100 %	100 %
CaCl₂	0,5 mM	103,89 % ± 5,06 (3)	85,10 % ± 1,7 (3)	108,84 % ± 0,44 (3)
MnCl₂	0,1 mM	102,66 % ± 8,72 (3)	107,40 % ± 3,4 (3)	114,90 % ± 5,69 (3)
	0,5 mM	102,87 % ± 6,63 (3)	101,60 % ± 2,4 (3)	106,06 % ± 5,25 (3)
ConA	1 µg/ml	99,46 % ± 7,93 (3)	79,80 % ± 2,00 (4)	n.m.
	5 µg/ml	93,44 % ± 10,82 (3)	78,1 % ± 2,80 (3)	135,86 % ± 31,94 (3)
WGA	1 µg/ml	91,35 % ± 8,49 (3)	85,60 % ± 1,90 (4)	n.m.
	5 µg/ml	94,35 % ± 12,51 (3)	n.m.	114,90 % ± 10,72 (3)
DMSO 0,5 %	0,50%	82,95 % ± 7,06 (3)	n.m.	103,28 % ± 10,06 (3)
DMSO 2%	2%	64,48 % ± 8,53 (3)	77,0 % ± 2,30 (3)	n.m.

4. Diskussion

Ziel dieser Untersuchung war es, die Nukleotidsequenzen von ZmPrx01, ZmPrx70 und ZmPrx66 (Mika *et al.*, 2008) auf mRNA-Ebene, sowie die Lokalisation dieser Peroxidasen in Plasmamembranen von Maiswurzeln zu bestätigen. Zusätzlich sollte die heterologe Expression dieser Proteine ausreichende Mengen reinen Proteins zur Verfügung stellen, um eine biochemische Charakterisierung mindestens eines der Isoenzyme zu ermöglichen.

4.1. Sequenzvalidierung und Sequenzanalyse von ZmPrx01, ZmPrx70 und ZmPrx66

Die Sequenzen von ZmPrx01, ZmPrx70 und ZmPrx66 beruhen auf einer ESI-MS/MS Analyse tryptischer Peptide nach der Aufreinigung aus hochreinen PM-Fractionen aus Maiswurzeln. Über Datenbankanalysen der gefundenen Peptide wurden genomische Sequenzen identifiziert und über *in silico cloning* eine virtuelle cDNA generiert und für das Design von Oligonukleotiden verwendet. Mit diesen Primern erfolgte das Screening einer λ -Phagenbank auf Basis der Maislinie *color converted line W22* (14 Tage alte Sämlinge) nach entsprechenden Transkripten. Es folgte die Klonierung der Amplifikate und anschließend die Sequenzierung der DNA. Die erhaltenen cDNA Sequenzen wurden mit den aus MALDI-TOF MS, ESI-MS/MS Analysen erhaltenen Peptiden und genomischen Sequenzen verglichen (Mika *et al.*, 2008). Zudem erfolgte die Konstruktion der identifizierten cDNA auf EST-Sequenzen, welche eine hohe Fehlerhäufigkeit aufweisen können.

Für die stabile Maistransformation sollte die Inzuchtlinie Hi-II A x Hi-II B verwendet werden. Da sowohl Fusionsproteine der drei ZmPrx stabil exprimiert werden, als auch eine Überexpression dieser Peroxidasen in dieser Maislinie erfolgen sollten, wurde mRNA dieser Linie für die Analysen der Nukleotidsequenz verwendet. Diese wurde aus drei Tage alten Maiswurzeln isoliert, entsprechende cDNA hergestellt und über PCR die Zielgene amplifiziert. Die eingesetzte *Pfu*-DNA-Polymerase besitzt eine *Proof reading*-Aktivität zur Vermeidung hoher Fehlerraten beim Einbau von Nukleotiden. Die PCR-Produkte wurden in Klonierungsvektoren ligiert und sequenziert. Für jedes *zmp*rx-Gen erfolgte mindestens ein dreifacher Ansatz auf einem Pool von 10 Pflanzen.

Die erhaltenen Sequenzen wurden dann mit den hergeleiteten bzw. aus der λ -Phagenbank amplifizierten Sequenzen verglichen und mögliche Unterschiede validiert. Dabei ergaben sich Übereinstimmungen zwischen 98 und 99 %. Die größte Abweichung zeigte mit 10 SNPs

4. Diskussion

zmpvx66. *ZmPrx01* wies lediglich ein SNP auf, *zmpvx70* zeigte sieben SNPs im offenen Leseraster. Diese Veränderungen zeigten sich auch auf Proteinebene, *ZmPrx01* und *ZmPrx70* zeigten jeweils eine Substitution (L342S, L221Q), *ZmPrx66* fünf Änderungen in der Aminosäuresequenz (N11I, R12S, A158P, G172R, V318L). Für die Analyse dieser Substitutionen wurde das Tool PROVEAN (*Protein Variation Effect Analyzer*, <http://provean.jcvi.org/index.php>) verwendet. Es ermöglicht eine Analyse einzelner Änderungen, sowie mehrfacher Substitutionen und *amino acid indels* (*Insertions and Deletions*). Dazu werden Vergleichssequenzen für die Analyse herangezogen, ein *Alignment* durchgeführt und über dieses Verfahren ein PROVEAN Score errechnet (Choi *et al.*, 2012; Choi, 2012; Choi und Chan, 2015). Diese Analyse der Änderungen ergab in allen Fällen einen neutralen Austausch (siehe 3.3.1).

Die Substitutionen liegen sämtlich in Bereichen, welche keine kritischen Domänen enthalten. Der Austausch L342S befindet sich nahe dem C-terminalen Ende des Proteins, noch vor der C-terminalen Verlängerung. Häm-Bindestellen bzw. typische Peroxidasemotive (*peroxidases active site*, PASS und *peroxidases proximal heme-ligand signature*, PPHLS, siehe Abb. 11) betrifft die Änderung nicht. Am Modell der 3D-Struktur findet sich die Substitution im Bereich einer *Loop*-Region, sollte also auch auf die generelle Struktur wenige Auswirkungen haben (siehe Abb. 83). Auch die Substitution L221Q bei *ZmPrx70* befindet sich nicht in konservierten Peroxidasedomänen, liegt allerdings innerhalb einer α -Helix (siehe Abb. 84). Glutaminsäure stört aufgrund seiner Eigenschaften die Helixbildung nicht. In der Tat befindet sich diese Änderung im Bereich einer variablen Region, welche putativ an der breiten Substratvariabilität beteiligt ist. Diese schließt sich nach Definition von Cosio *et al.* direkt an Region III (siehe Abb. 2) an (Cosio und Dunand, 2009). Die Änderungen beeinflussen die über *in silico* Analysen bestimmten Eigenschaften nur in geringem Maße. Es ergeben sich Änderungen in den vorhergesagten O-Glykolysierungsstellen von *ZmPrx66* und *ZmPrx70*, sowie eine Änderung der vorhergesagten Phosphorylierungsstellen von *ZmPrx01* (siehe Tab. 18).

ZmPrx66 zeigt schließlich die deutlichsten Sequenzunterschiede auf Nukleotid- und Aminosäureebene. Auch in diesem Fall finden sich keine Substitutionen innerhalb der Peroxidasedomänen PASS und PPHLS. Drei der Substitutionen finden sich verteilt in *Loop* (V318L und A158P) und Helix Bereichen (G172R). Zwei weitere (N11I und R12S) finden sich am N-Terminus des Proteins, innerhalb des Signalpeptides und vorhergesagten

transmembranen Domänen (siehe Abb. 13). Diese Änderung ist kritisch zu bewerten, da zwar keine Beeinflussung der Struktur und katalytischen Funktionen zu erwarten ist, aber die Lokalisierung des Proteins über Substitutionen im Signalpeptid verändert werden kann. Eine erneute Analyse zeigte tatsächlich eine Verschiebung der vorhergesagten Lokalisierung von der Thylakoidmembran zum extrazellulären Raum (PSORT)(siehe Tab. 19 und Tab. 20).

Die beobachteten Nukleotidunterschiede zwischen den Datenbanksequenzen und den aus HI-II A x HI-II B isolierten mRNA-Sequenzen sind möglicherweise auf Unterschiede zwischen einzelnen Maislinien zurückzuführen. Zu solchen Unterschieden gibt es Hinweise in der Literatur. Generell wird von einer vergleichsweise hohen Nukleotiddiversität im Maisgenom berichtet (Lai *et al.*, 2010; Ganai *et al.*, 2011). Dabei kommt es durchschnittlich alle 44-75 bp zu einem SNP-Polymorphismus (Gore *et al.*, 2009). Verglichen mit den meisten Tierspezies ist dieses Level etwa 10- bis 20-mal höher. Zudem zeigen einige Maislinien große strukturelle Unterschiede in der Kopienzahl und dem Auftreten von Polymorphismen (Springer *et al.*, 2009). Dabei sind SNPs in codierenden Bereichen seltener, führen aber teilweise auch durch das Einfügen von Stopcodons, Veränderung der Methionin-Initiation oder Verschiebungen des offenen Leserasters zu Inaktivierung von Genen (Lai *et al.*, 2010).

Im Zusammenhang mit der unterschiedlichen Verdaubarkeit von 37 Maislinien fanden Guillet-Claude *et al.* (2004) einen Zusammenhang mit dem Polymorphismus des *zmpox3*-Gens. Sie konnten im Durchschnitt einen SNP pro 57 bp nachweisen. Dabei zeigten Intronbereiche eine höhere Dichte an SNPs (alle 14 bp) als Exonbereiche (alle 82 bp). Nicht-synonyme Substitutionen waren seltener zu finden und erreichten maximal fünf Substitutionen in 357 Aminosäureresten (1,4 %) (Guillet-Claude *et al.*, 2004).

Wang *et al.* (2015) suchten auf Basis der Pfam Peroxidasedomäne (PF00141) im Maisgenom nach Klasse III Peroxidasen. Dabei fanden sie 119 Peroxidase-Gene und untersuchten diese bezüglich ihrer Phylogenie, Genomlokalisierung und Genduplikation. Dabei fanden sich *zmprx01*, *zmprx70* und *zmprx66* als *zmprx36*, *zmprx75* und *zmprx26* in ihren Analysen. Sie gruppierten sie in die Subklassen I (*zmprx01*) und XVII (*zmprx66* und *zmprx70*) ein und gehen bei *zmprx66* und *zmprx70* von einem paralogem Paar aus, das durch einen segmentalen Duplikationsevent entstanden ist. Tatsächlich zeigen diese Peroxidasen eine vergleichsweise hohe Sequenzähnlichkeit.

Auch de Obeso *et al.* (2003) isolierten ähnliche Peroxidasen. Diese wurden ebenfalls aus jungen Maiswurzeln, allerdings von der Linie W64A isoliert. Dabei ergibt sich eine Ähnlichkeit

4. Diskussion

der Sequenzen von ZmPrx01 (pmPox1) und ZmPox1. Auf mRNA-Niveau ist eine Differenz von nur fünf Nukleotiden zu beobachten. Jedoch führen mehrere Insertionen zu einem *Frameshift*, wodurch das Genprodukt nur noch eine Sequenzähnlichkeit von 88 % aufweist. Mika *et al.* (2008) führen die beobachteten Unterschiede auf Linieneffekte zurück (siehe Abb. 92).

Multigenfamilien, wie auch die große Klasse III Peroxidasefamilie in Mais, entstanden durch Genduplikationen, ausgelöst durch verschiedene Mechanismen. Dazu zählen inäquales *Crossing over*, verschiedene Transpositionseffekte, die Verdopplung großer Chromosomensegmente sowie die Genomverdoppelung (Zhang, 2003). Das Auftreten von Polymorphismen und der damit möglichen Funktionsänderung sowie das Arrangieren von Genabschnitten in anders kontrollierte Bereiche des Genoms stellen Möglichkeiten für eine Genevolution dar. Paraloge können durch derartige Vorgänge eine Spezialisierung erfahren (Zhang, 2003).

Insgesamt sprechen die geringen Unterschiede in codierenden und daraus resultierenden Proteinsequenzen für Linieneffekte. Auch die maximal beobachtete Substitution von fünf Aminosäuren bei ZmPrx66 konnte durchaus bei anderen Genen zwischen verschiedenen Maislinien beobachtet werden. Die Substitutionen haben aufgrund der Lage in der Sequenz vermutlich keine Auswirkungen auf die Faltung und katalytische Aktivität der Peroxidasen. Die aus Datenbanken abgeleitete Struktur der gDNA folgt in allen Fällen dem typischen Aufbau von Klasse III Peroxidasegenen und lässt sich durch Tognolli *et al.* (2002) definierten Klassen zuordnen.

Ein Beispiel für einen Positionseffekt ist auch für das *zmpox3*-Gen in Mais beschrieben. Die Transposition steht in Zusammenhang mit *Miniature inverted-repeat transposable Elements* (MITE). Diese Elemente können nicht selbstständig die Position verändern sondern sind auf die Aktivität einer *trans-acting*-Transposase angewiesen, welche Erkennungssequenzen innerhalb von MITE-Regionen erkennt (*terminal inverted repeats*). Die durch die Insertion dieses Elementes ausgelöste Inaktivierung von *zmpox3* kann in Zusammenhang mit einer Störung der Ligninbiosynthese betroffener Linien gestellt werden (Guillet-Claude *et al.*, 2004).

Die Analyse der Promotorsequenzen lieferte neben typischen Promotorelementen wie TATA-Box und CAAT-Box einige *cis*-regulatorische Sequenzen, welche mögliche Einflüsse auf die Regulation von *zmprx01*, *zmprx66* und *zmprx70* aufzeigen. In allen Sequenzen wurden

Motive gefunden, welche auf eine wurzel- und kornspezifische Expression der Gene hinweisen. Auffällig sind zudem Elemente im Zusammenhang mit einer lichtabhängigen Regulation, sowie Elemente des Zuckerstoffwechsels. Typische Motive sind Bindedomänen ähnlich der Transkriptionsfaktorfamilien R2R3-MYB, NAC und WRKY. Zusätzlich finden sich Sequenzen mit großer Übereinstimmung zu Bindemotiven von Transkriptionsfaktoren die eine Rolle in Stressantworten besitzen und über Pflanzenhormone wie Auxin (IAA u.a.), Cytokinin (CYT), Gibberelin (GA) und Salicylsäure (SA) reguliert sind. Auffällig häufig kommen in allen drei Promotoren Motive für eine Regulation durch Abscisinsäure (ABA) vor (siehe Tab. 25, Tab. 26 und Tab. 27). Ein weiteres vorkommendes Motiv ist das *antioxidant-response element* (ARE). Diese wurden im Zusammenhang mit der Regulation von chemoprotektiven Proteinen wie der Glutathion-S-Transferase (GSH) und der Glutamat-Cystein-Ligase (GCLM) in Mäusen und Menschen identifiziert und charakterisiert (Wasserman und Fahl, 1997; Erickson *et al.*, 2002), später erfolgte auch die Identifikation von solchen Elementen in der Promotorregion von Katalasegenen (*cat*) in Mais (Polidoros und Scandalios, 1999) und des antioxidativen *atper1*-Gens in *Arabidopsis* (Palmieri *et al.*, 2008). Die Konsensussequenz 5'-TMA_nRTKAY_nnnnGCR_nwww-3' (M: A/C, R: A/G, K: G/T, Y: A/G, W: A/T) (Erickson *et al.*, 2002) wurde mit Änderungen in der 5'-Region (TMA) und 3'-Region (GCR_nwww) in *zmprx01*, *zmprx66* und *zmprx70* gefunden. Der *atper1*-Promotor zeigt ebenfalls Unterschiede in der 5'-Region. Inwieweit die gefundenen Änderungen kritisch sind, lässt sich durch eine *in silico* Analyse nicht klären. Diese Elemente stehen in Verbindung mit einer Regulierung von oxidativem Stress und können durch Wasserstoffperoxid induziert werden (Palmieri *et al.*, 2008).

AREs stellen die Bindedomäne des Aktivatorprotein-1-(AP-1)-Transkriptionsfaktorkomplexes dar. Die Expression von Katalasen in Mais (*cat1*, *cat2* und *cat3*) wird als Reaktion auf Wasserstoffperoxid induziert (Polidoros und Scandalios, 1999). In allen drei Promotoren dieser Gene vermitteln AREs die Reaktion auf oxidativen Stress. Zudem erfolgt eine Regulation von *cat1* und *cat3* als Reaktion auf Verwundung in einem von ABA und Jasmonsäure (JA) unabhängigen Weg, *cat2* zeigt in Reaktion auf Trockenstress in Weizenblättern einen erhöhten Transkriptlevel. Das Sequenzmotiv für die Steigerung der Expression durch Verwundung überlappt mit einem ABRE-(G-Box)-Motiv im *cat1*-Promotor. Es wird daher vermutet, dass Wasserstoffperoxid das Signal für die Expressionssteigerung

4. Diskussion

von *cat*-Genen durch Verwundung darstellt (Pastori und Foyer, 2002). Solche ABRE-Elemente kommen in den Promotoren von *zmpvx01*, *zmpvx66* und *zmpvx70* ebenfalls vor.

Generell ist die Häufigkeit dieser Elemente in den Promotorregionen von *zmpvx01*, *zmpvx66* und *zmpvx70* auffällig. Im Zusammenhang mit der Inhibition des Wurzelwachstums durch ABA wurde die Stimulation der Aktivität einer Peroxidase berichtet (Lin und Kao, 2002).

Die Proteinfamilie der R2R3-MYB Transkriptionsfaktoren zeichnet sich durch den Besitz einer konservierten DNA-bindenden Domäne (DBD) aus, welche ein pflanzliches Homolog zur DBD-Domäne tierischer c-MYB-Proteine darstellt. Das erste pflanzliche *myb*-Gen wurde aus Mais isoliert und mit der Synthese von Anthocyanen in Verbindung gebracht. Die Funktionen dieser, mit 157 Genen in Mais recht großen Familie, sind im Detail noch nicht bekannt, zeigen jedoch verschiedene Gewebespezifitäten und die Beteiligung an zahlreichen Prozessen. Darunter fallen sowohl Pathogenantworten, Regulationen durch Pflanzenhormone als auch Prozesse der Zellwandmodifikation (Du *et al.*, 2012). Mitglieder der Familie aus *Arabidopsis* sind hingegen mit deutlich höherer Detailkenntnis charakterisiert (Yanhui *et al.*, 2006). Hier konnten Effekte durch Hormonbehandlung (ABA, GA, IAA, JA, SA) sowie Salz- (NaCl) und Schwermetalle (CdCl₂) auf die Expression der *myb*-Gene beobachtet werden. Die bei der Analyse gefundenen MYB-Proteine stehen im Zusammenhang mit Wasserstress sowie ABA- und GA-Signalen.

Ein weiteres auftretendes Motiv ist die WBox. Sie stellt die Bindedomäne für WRKY-Transkriptionsfaktoren dar. Diese Familie besitzt in Mais 136 Mitglieder auf Proteinbasis (Wei *et al.*, 2012). Diese Transkriptionsfaktoren sind in Prozesse wie Verwundung, Pathogeninfektion und die Reaktion auf abiotischen Stress involviert. Auch im SA und JA Signalweg kommen sie vor. Das Protein *NON-EXPRESSOR OF PR1* (NPR1) wird im Zusammenhang mit der pflanzlichen Immunantwort von WRKY-Proteinen kontrolliert, diese treten jedoch auch stromabwärts von NPR1 auf. Die Regulation von WRKYs schließt vermutlich eine Interaktion von verschiedenen WRKYs mit ihren eigenen, sowie zu Promotoren von weiteren Familienmitgliedern ein, was zu einer Auto- und Kreuzregulation führt (Herrero *et al.*, 2014). Anhand der gefundenen Motive wurden Bindedomänen für WRKY-Proteine identifiziert, welche im Zusammenhang mit Pathogenantworten und Verwundung stehen.

Zusätzlich wurden *Core*-Motive von *C-repeat/Drought Responsive Elements* (CRT/DER), *Copper Responsive Elements* (CuRE), lichtregulierte *GT-1 Consensus* Elementen, *Low*

Temperature Responsive Elements (LTRE), *Gibberelin Responsive Elements* (GARE) und *Elicitor-Responsive Elements* (EIRE) sowie NAC (abiotischer Stress) gefunden (Baker *et al.*, 1994; Fukuda und Shinshi, 1994; Chattopadhyay *et al.*, 1998; Shinwari *et al.*, 1998; Quinn *et al.*, 2000; Lu *et al.*, 2012; Nakashima *et al.*, 2012).

Insgesamt lässt sich eine mögliche Regulation durch diverse Stressfaktoren aus dem abiotischen (CuRE, NAC) und dem biotischen Umfeld (EIRE) im Zusammenhang mit hormoneller Regulation (GARE, ABRE) vermuten. NAC Transkriptionsfaktoren spielen in *Arabidopsis* auch eine Rolle bei der Modulation von Lignin (Zhong *et al.*, 2008; Zhao und Dixon, 2011). Die Untersuchung der Proteinaktivitäten von ZmPrx01, ZmPrx66 und ZmPrx70 bestätigte eine Regulation durch Elicitoren und anderer Stressoren auf Proteinniveau (Mika *et al.*, 2010).

4.2. Subzelluläre Lokalisierung

Zur Bestätigung der Lokalisierung von ZmPrx01, ZmPrx66 und ZmPrx70 in der PM wurden zwei verschiedene Methoden angewendet. Zum einen sollte über Fusionsproteine mit GFP die subzelluläre Lokalisation der Peroxidasen in verschiedenen Systemen gezeigt werden. Da Fusionsproteine ein artifizielles System darstellen, sollte die erhaltene Lokalisation mit der Detektion nativer Peroxidasen durch Immunogold-Detektion bestätigt werden. Diese Methode hat den Vorteil eines direkten Nachweises der Peroxidasen im nativen Gewebe.

4.2.1. Immunogold-Detektion von ZmPrx01, ZmPrx70 und ZmPrx66

Zur Bestätigung der Lokalisation von ZmPrx01, ZmPrx66 und ZmPrx70 wurden Experimente mit einer Immunogold-Detektion in fünf Tage alten Maiswurzeln durchgeführt. Derartige Experimente wurden schon in Erdnuss, Bohne, Pappel und Spinat durchgeführt (Hu *et al.*, 1989; Smith *et al.*, 1994; Crevecoeur *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 2002). Die Wahl der Peptide erfolgte hinsichtlich ihrer Spezifität für die entsprechende Peroxidase sowie unter Berücksichtigung ihrer Lage auf der Oberfläche der nativen Proteine. Mögliche Stellen posttranslationaler Modifikationen wurden auf Basis der *in silico* Analyse ausgespart (Lage der Peptide siehe Anhang Abb. 83, Abb. 84 und Abb. 85). Die Aufreinigung der Antikörper erfolgte über eine Affinitätschromatographie mit dem synthetisierten Peptid. In Hintergrundkontrollen ohne Inkubation des ersten Antikörpers konnten keine Signale detektiert werden.

4. Diskussion

In diesen Experimenten ergaben sich keine Unterschiede in der Lokalisation zwischen den untersuchten Peroxidasen. Untersucht wurden Maiswurzeln der Linien Hi-II A x Hi-II B sowie des Kultivars Gelber Badischer Landmais mit einem Alter von drei und fünf Tagen im Bereich der Elongationszone. Aufgrund der vorgefundenen Differenzierung und Morphologie erfolgte das Imaging der Zellen in fünf Tage alten Maiswurzeln der Linie Hi-II A x Hi-II B.

Es wurden Detektionen im ER (siehe Abb. 17), dem Golgi-Apparat (siehe Abb. 19), der PM (siehe Abb. 16, Abb. 17 und Abb. 20), dem Apoplasten (siehe Abb. 18 und Abb. 20) sowie Mitochondrien (siehe Abb. 19) und Plastiden (siehe Abb. 18) gefunden. Zusätzlich konnten Signale im Golgi-Apparat und Golgi-Vesikeln nachgewiesen werden. Diese Lokalisationen sind typisch für sekretierte Proteine. Jedoch ist auch in diesen Versuchen eine sehr deutliche Detektion von ZmPrx01, ZmPrx70 und ZmPrx66 im ER der untersuchten Zellen sichtbar. Diese Lokalisierung stimmt mit der *in silico* Vorhersage eines ER-Signalpeptides überein, zudem stellt das ER den Eintritt in den sekretorischen Weg dar. Dennoch überrascht die Deutlichkeit des Signals gegenüber anderen Detektionen, wie der PM und dem Apoplasten. Die Aufreinigung der Peroxidasen aus hochreinen Plasmamembranfraktionen führt zu der Erwartung einer deutlichen Detektion der Proteine an der PM und dem Apoplasten mit undeutlicheren Signalen in Kompartimenten des sekretorischen Weges.

Die untersuchten Proben stellen nicht eliciertes Material dar, aufgereinigt wurden die Proteine ebenfalls aus solchen unbehandelten Proben. Auch der Differenzierungsgrad der Zellen sollte sich durch das gleiche physiologische Alter entsprechen, die Ergebnisse sollten also vergleichbar sein. Die Sauberkeit der PM-Fraktionen wurde über Kompartimentmarker mittels *Western Blot* überprüft. Untersucht wurde die Verunreinigung von ER (α -NADH spezifische Cytochrom-c-Reduktase), Golgi (IDPase) und Mitochondrien (Cytochrom-c-Oxidase) sowie die Anreicherung von PM (H^+ -ATPase) und Tonoplast (V-ATPase) (Mika *et al.*, 2010; Menckhoff *et al.*, 2013).

Die Detektion von ZmPrx01, ZmPrx66 und ZmPrx66 in Mitochondrien und Plastiden passt nicht in das erwartete Muster. Mitochondriale Peroxidasen spielen eine Rolle bei dem Schutz vor oxidativen Schäden, sind jedoch nicht glykosyliert (Prasad *et al.*, 1995). Weitere experimentelle Belege für ein Vorkommen von Klasse III Peroxidasen in Mitochondrien konnten nicht gefunden werden. Die Charakteristika von ZmPrx01, ZmPrx66 und ZmPrx70 sprechen nicht für die Lokalisierung in Mitochondrien und lassen bei der Detektion ein Artefakt vermuten.

Um Auswirkungen einer Elicitierung zu überprüfen, wurden zusätzliche Versuche mit einer Behandlung mit 0,5 mM Salicylsäure unternommen. Aus diesen Experimenten konnten allerdings keine Ergebnisse gewonnen werden, da die Integrität der präparierten Zellen schlecht war und subzelluläre Strukturen somit kaum noch erkennbar waren. Eine Aussage zur Situation in elicierten Zellen kann daher nicht erfolgen.

4.2.2. Fusionsproteine ZmPrx01, ZmPrx70 und ZmPrx66

Das Design der Fusionskonstrukte orientierte sich an der *in silico* Charakterisierung der Proteine und experimenteller Belege der Lokalisierung der Peroxidasen (Mika *et al.*, 2008; Lüthje *et al.*, 2011). In allen Fällen wurde im N-Terminus der Proteine ein Signalpeptid detektiert. Diese Vorhersage konnte mit verschiedenen Programmen bestätigt werden (Lüthje *et al.*, 2011). Zusätzlich konnten im Bereich des N-Terminus auch transmembrane Domänen detektiert werden (Lüthje *et al.*, 2011). Zusammen mit dem Nachweis dieser Proteine in hochreinen PM-Fractionen, wurde eine Verankerung der Proteine mit dem N-Terminus an der PM postuliert. Um das N-terminale Signalpeptid nicht zu maskieren, erfolgte die Fusion mit GFP am C-terminalen Bereich der Peroxidasen (siehe Abb. 5).

ZmPrx01 besitzt einen auffällig verlängerten C-Terminus. Solche strukturellen Merkmale können ein Hinweis auf ein Signalpeptid in diesem Bereich sein, welche oft einen Transport an die Tonoplastenmembran bzw. in die Vakuole bewirken (Carter *et al.*, 2004; Francoz *et al.*, 2015). Tatsächlich ergab ein *Alignment* von ZmPrx01, ZmPrx66 und ZmPrx70 mit sechs Klasse III Peroxidasen aus Arabidopsis, welche in der Vakuole gefunden wurden (Carter *et al.*, 2004), ähnliche Sequenzmotive im C-Terminus von ZmPrx01. Diese CTPP-Signale bestehen aus hydrophoben Bereichen im C-Terminus von vakuolären Proteinen (Carter *et al.*, 2004). Solche Signale wurden auch in der Peroxidase C1a (Meerrettich), in Osmotin PR-5 (Tabak, *Nicotiana tabacum* L.) und einem Lectin (Hopfen, *Humulus lupulus* L.) nachgewiesen (Bednarek *et al.*, 1990; Neuhaus *et al.*, 1991; Melchers *et al.*, 1993; Matsui *et al.*, 2003). Daher wurden für ZmPrx01 alternative Konstrukte entworfen, die ein Maskieren des C-Terminus verhindern (Abb. 7 und Abb. 8). Da der N-Terminus eine Rolle bei der Verankerung des Proteins in der Membran spielen könnte, als auch als zusätzliches Signal in diesem Transportweg gebraucht wird, sollte dieser ebenfalls unmaskiert bleiben. Es konnte gezeigt werden, dass auch ein Transportweg über ER-Vesikel zur Vakuole existiert (Matsushima *et al.*, 2003; Rojo *et al.*, 2003). Die C-terminalen Fusionskonstrukte wurden im Fall von ZmPrx01

4. Diskussion

durch Konstrukte mit einer mittigen Anordnung von GFP ergänzt. Dabei wurden verschiedene Längen von N- und C-terminalen Peroxidaseanteilen verwendet, um mögliche Signalpeptide zu erhalten (siehe Abb. 7 und Abb. 8).

Als Fluorophor wurde in den Konstrukten GFP verwendet. Mit diesem Reporter gen konnte in vergleichbaren Studien sowohl eine Lokalisation im Apoplasten (Passardi *et al.*, 2006; Ren *et al.*, 2014), als auch in der Vakuole (Costa *et al.*, 2008) detektiert werden.

Die Experimente erfolgten zunächst transient. Als homologes System wurden fünf Tage alte Maiskeimlinge und 14 Tage alte Maisembryonen verwendet, alternativ erfolgten Versuche im heterologen System mit der Transformation von Zwiebelepidermiszellen mit den Fusionskonstrukten.

Erste Experimente in Maisembryonen erbrachten gute Transformationsraten mit einer hohen Zahl an transformierten Zellen (siehe Abb. 21). Dieses System wurde auch für die Überprüfung der Aktivierung und erste Kontrollen der Funktionalität der Fusionskonstrukte verwendet. Ohne eine Aktivierung der Konstrukte konnte keine GFP-Fluoreszenz beobachtet werden, was die Funktionalität des verwendeten Induktionssystems zeigt.

Die Analyse der subzellulären Lokalisation war in diesen Geweben mit Problemen verbunden. Durch die geringe Größe der Präparate waren manuelle Schnitte schwer durchzuführen, zudem zeigte verletztes Gewebe Autofluoreszenz einer hohen Intensität. Durch die geringe Zellgröße konnten subzelluläre Strukturen in den zudem häufig nicht ausdifferenzierten Zellen nur schwer identifiziert werden. Gegenüber freiem GFP konnte dennoch eine deutliche Veränderung der Verteilung innerhalb der Zellen wahrgenommen werden. Es konnte keine Fluoreszenz im Zellkern detektiert werden, die Verbreitung erschien weniger diffus und zeigte häufig feine netzartige Strukturen. Der Nukleus wurde ebenfalls von derartigen Strukturen umschlossen. Zusätzlich waren kleine Vesikel zu beobachten (siehe Abb. 23). Diese Strukturen ähnelten in der Literatur beschriebenen ER-Netzwerken (Boevink *et al.*, 1998; Manford *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012; Yamada *et al.*, 2013). Eine Analyse der beobachteten Lokalisation erfolgte in diesem Gewebe nicht. Unterschiede in der Lokalisation zwischen den beobachteten ZmPrx ließen sich nicht erkennen. Eine Lokalisation im Bereich der Vakuole konnte ebenfalls nicht detektiert werden. Auch Konstrukte mit zugänglichen N- und C-Termini bei *zmpvx01* änderten die Lokalisation nicht. Das Konstrukt mit vollständiger N- und C-terminaler *zmpvx01* Sequenz (siehe Abb. 7) zeigte in durchgeführten Versuchen keine GFP-Fluoreszenz. Die Länge an

Peptiden an C- und N-Terminus des GFPs könnte eine sterische Behinderung des Proteins bedingen und somit die Fluoreszenz stark herabgesetzt, oder durch Behinderung der Faltung in den nativen Zustand die Ausbildung des Fluorophors verhindert haben.

Die Transformationsraten in Embryonen waren in Maiswurzeln, auch nach Anpassung des Protokolls, nicht erreichbar. Es konnten pro Transformationsansatz nur wenige Zellen im Präparat transformiert werden. Dies wurde zunächst auch mit der nötigen Induktion durch einen Hitzeschock und die dadurch bedingte lange Inkubation der Präparate erklärt. Der Wechsel auf bereits aktivierte Konstrukte konnte jedoch die Transformationsrate nicht deutlich steigern.

Ziel des Gewebewechsels war eine Vergrößerung der Zellen für eine bessere Auflösung der subzellulären Strukturen. Ein weiterer Vorteil dieses Gewebes war die deutlicher erkennbare Morphologie in den stärker differenzierten Zellen. Die beobachteten Verteilungsmuster in den Zellen hatten eine hohe Übereinstimmung mit den von Boevink *et al.* veröffentlichten Aufnahmen des Aktin/ER-Netzwerkes in *Nicotiana clevelandii*. Die Struktur des ERs und des assoziierten Actin-Netzwerkes waren gut erkennbar. Punktförmige Strukturen wurden anhand ihrer Morphologie dem Golgi-Apparat zugeordnet. Ein PM-Signal konnte in den Präparaten nicht detektiert werden, es kam in der Zellperipherie jedoch zu Überlappungen mit dem Autofluoreszenzsignal des Apoplasten (siehe Abb. 24).

Zur Bestätigung der Lokalisierung im ER und der Klärung der Herkunft der beobachteten Vesikel wurden Co-Lokalisationsversuche mit Organellmarkern unternommen. Für die Detektion eines PM-Signales wurde das Konstrukt Myr-GFP verwendet (Herrmann *et al.*, 2006). Mit diesem wurden aufgrund des gleichen Fluorophors keine Co-Lokalisationen durchgeführt. Der verwendete Marker des Endoplasmatischen Retikulums wird durch ein N-terminales Signalpeptid zum ER transportiert und dort durch eine KDEL-Sequenz akkumuliert (Nelson *et al.*, 2007). Der Golgi-Marker markiert zu geringen Anteilen das ER sowie den *cis*-Golgi. Co-Transformationsversuche erfolgten aufgrund der höheren Transformationsrate in Epidermiszellen von Zwiebeln. Die Lokalisation im ER konnte in diesen Versuchen für alle ZmPrx-GFP Konstrukte bestätigt werden. Es konnte jedoch keine Co-Lokalisation mit dem Golgi-Marker beobachtet werden. An der Zellperipherie war kein deutliches Signal zu erkennen, welches nicht mit dem ER-Marker co-lokalisierte (siehe Abb. 35, Abb. 36 und Abb. 37).

4. Diskussion

Laut Saint-Jore-Dupas *et al.* (2006) lokalisiert das Konstrukt G-rk CD967 im ER und im *cis*-Teil des Golgi-Apparates. Der Marker basiert auf der α -1,2-Mannosidase I aus Soja und ist an der Glykosylierung von Proteinen im Golgi-Apparat beteiligt (Saint-Jore-Dupas *et al.*, 2006). Die Beschränkung nur auf *trans*-Golgi-Bereiche erscheint für sekretierte Proteine nicht sinnvoll. Proteine, die an der Glykosylierung beteiligt sind, erscheinen je nach ihrer Aufgabe an verschiedenen Stellen im sekretorischen Weg. So ergibt sich eine schrittweise Modifikation der Zuckerreste an der Oberfläche der Proteine. Dies wurde in Säugern anhand von Glykosidasen und Glykosyltransferasen gezeigt (Roth, 1991; Nilsson *et al.*, 1993; Velasco *et al.*, 1993; Rabouille *et al.*, 1995; Igdoura *et al.*, 1999). Proteine die keine spezifische Funktion im Golgi-Apparat erfüllen, sollten diesen während der Sekretion komplett durchlaufen. Da auch keine Versuche mit Hemmung der *de novo* Synthese von Proteinen, z.B. mit Cycloheximid, durchgeführt wurden, sollte die ZmPrx-GFP Fusion auch im *cis*-Golgi zu finden sein.

Dieses Ergebnis schließt einen Eintritt in den sekretorischen Weg allerdings nicht aus. Neben dem klassischen Weg über das ER, *cis/trans*-Golgi und Vesikel (Vitale und Denecke, 1999; Bonifacino und Glick, 2004; Surpin und Raikhel, 2004), existieren in Pflanzen weitere mögliche Mechanismen für die Sekretion von Proteinen in den Apoplasten. Dieser nicht auf N-terminalen Signalpeptiden und dem *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN) beruhenden Weg wurde zunächst in Säugetieren und Hefen untersucht (Nickel und Seedorf, 2008; Nickel und Rabouille, 2009; Nickel, 2010; Chua *et al.*, 2012). Es wurden Mechanismen gefunden, die nach Eintreten in den sekretorischen Weg über das ER zu einer Golgi-unabhängigen Sekretion führen. Zusätzlich wurden cytoplasmatische Proteine gefunden, welche ohne ein vorhandenes Signalpeptid sekretiert werden (Nickel und Rabouille, 2009). Diese Sekretion erfolgt über sekretorische Lysosomen, Mikrovesikel, Bildung von multivesikulären Körpern (*Multivesicular bodies*, MVP) gefolgt von einer Freisetzung von Vesikeln im Inneren der Zelle und der Translokation von PM-Vesikeln (Nickel und Rabouille, 2009; Nickel, 2010).

In Pflanzen wurden vom klassischen Schema abweichende Transportwege ebenfalls beobachtet. Die Beobachtung einer Golgi-unabhängigen Sekretion von cytoplasmatischen Proteinen erfolgte anhand von Manitoldehydrogenase (MTD) aus Sellerie (*Apium graveolens* L.) und einer Hygromycinphosphotransferase (HYG^R) aus *Arabidopsis*. MTD ist unter normalen Bedingungen im Cytoplasma lokalisiert und übernimmt dort vermutlich Aufgaben im Stoffwechsel und der Osmoregulation. Nach einer Induktion durch Salicylsäure erfolgt die

Sekretion in den Apoplasten auf einem Golgi-unabhängigen Weg, um dort die Inaktivierung von ROS durch von Pilzen abgegebenes Mannitol zu verhindern (Cheng *et al.*, 2009; Cheng und Williamson, 2010). In Arabidopsis ist eine Fusion von HYG^R mit GFP im Cytosol und extrazellulärem Raum lokalisiert. Der Transport von HYG^R in den Apoplasten wird vermutlich von einem Golgi lokalisierten Protein, dem Synaptotagmin 2 (SYT2), vermittelt. In *syt2*-Mutanten kommt es zu einer Akkumulation des Fusionsproteins in der Vakuole und interzellulären Vesikeln (Zhang *et al.*, 2011). In beiden Fällen ist eine Hemmung des Transportes durch Brefeldin A nicht möglich, was eine Beteiligung des Golgi-Apparates ausschließt.

Einen weiteren Mechanismus schließt die Beteiligung des *Exocyst positive organelle* (EXPO) ein. Dieses neuartige Organell wurde ebenfalls in Arabidopsis entdeckt. Es wird charakterisiert durch das Protein EXO70E2 eines der Homologe von *Exocyst* Proteinen in Arabidopsis. Diese Proteine bilden oktamere Proteinkomplexe und wurden zuerst in *Saccharomyces* beschrieben (Novick *et al.*, 1980; Wang *et al.*, 2010). Sie sind an der Fusion von *post*-Golgi-Vesikeln mit der PM beteiligt. Der Transport über diesen Weg wird weder über Brefeldin A noch Wortmannin gehemmt. Marker des TGN, Golgi, prävacuolären Kompartiments (*prevacuolar compartment*, PVC) und Tonoplasten co-lokalisieren nicht mit EXO70E2. Elektronenmikroskopische Untersuchungen ergaben, dass es sich bei EXPO um ein exozytotisches Kompartiment handelt, welches mit der PM fusioniert und Vesikel mit einer einfachen Membran in den Apoplasten entlässt.

Für die genaue Analyse des sekretorischen Weges reichen die Daten der Fusionsproteine nicht aus. Die Natur der beobachteten Vesikel bleibt unklar.

Ergänzend zu den transienten Versuchen wurden stabil transformierte Maispflanzen angefertigt, um Effekte der Transformationsmethode abschätzen zu können. Die Transformation erfolgte vermittelt von Agrobakterium auf Basis des Transformationsvektors p7i-UCre-GFP mit C-terminaler Fusion von GFP an ZmPrx. Die erhaltenen Ergebnisse differierten stark von den transienten Experimenten. Dies trifft sowohl für Transformationen von jungen Maiswurzeln als auch für Transformationen von Epidermiszellen von Zwiebel zu. Das erhaltene subzelluläre Verbreitungsmuster differiert hingegen nicht zwischen den einzelnen Konstrukten. Im Gegensatz zu transienten Experimenten ergab sich im Zellinneren nur eine sehr schwache Fluoreszenz, das ER war nur undeutlich sichtbar. In diesen Präparaten konnte ein deutliches Signal an der Zellperipherie detektiert werden, welches

4. Diskussion

sehr gut mit dem Zellwandsignal in Deckung zu bringen war (siehe Abb. 41). Diese Ergebnisse entsprechen den Vorhersagen einer apoplastischen Lokalisation von ZmPrx01, ZmPrx66 und ZmPrx70 durch *in silico* Analysen. Eine PM-ständige Lokalisation konnte nicht nachgewiesen werden, entsprechende Versuche mit einer Plasmolyse der Zellen blieben durch eine extrem schwache Fluoreszenz im Zellinneren ohne einen deutlichen Befund. Untersuchungen an stabil transformierten Maispflanzen lieferte nur eine schwache GFP-Fluoreszenz. Dabei konnte das detektierte Signal durch die spektralen Eigenschaften gut von der Autofluoreszenz der Zellwand unterschieden werden. Für die niedrige Intensität der Fluoreszenz kann die Orientierung der Fusionsproteine verantwortlich gemacht werden. Vorhergehende Analysen sprechen für eine Orientierung des aktiven Zentrums zur apoplastischen Seite der Membran. Diese Annahme resultiert aus der vorhandenen Glykosylierung in Kombination mit den vorhergesagten Glykosylierungsstellen sowie der Vorhersage der transmembranen Domäne an der N-terminalen Seite des Proteins (Mika *et al.*, 2008). Biochemische Eigenschaften weisen zudem mehr Übereinstimmungen mit apoplastischen als mit cytosolischen Peroxidasen auf (Mika und Lühje, 2003). Eine Untersuchung an PM-Vesikeln konnte die Peroxidaseaktivität bisher nicht genau lokalisieren, möglicherweise aufgrund von membrangängigen Substraten oder Verunreinigungen mit löslichen cytosolischen Proteinen (Askerlund *et al.*, 1987; Vianello *et al.*, 1997).

Ist das aktive Zentrum der Peroxidase in Richtung Apoplast ausgerichtet, so ist durch die C-terminale Fusion das GFP-Fluorophor ebenfalls apoplastisch orientiert. Dort bewegt sich der pH-Wert in einem Bereich von 5 bis 6,5 (Grignon und Sentenac, 1991; Felle, 1998). Der pH-Wert des Mediums verändert die Fluoreszenzausbeute von GFP. Einzelne Abkömmlinge vom Wildtyp-GFP unterscheiden sich dabei in ihrer pH-Sensitivität. Während Wildtyp-GFP auf saure pH-Werte sensibel reagiert (pK_a 4,5) sind andere Varianten stabiler und erreichen pK_a -Werte bis 6,8 (Tsien, 1998). Das in den Konstrukten verwendete GFP mit einer Substitution von Serin gegen Tyrosin an Position 65 (S65T) besitzt nur noch etwa 30 % der ursprünglichen Fluoreszenzintensität bei einem pH-Wert von 5,5 (pK_a 6,0) (Kneen *et al.*, 1998; Campbell und Choy, 2001). Die Fluoreszenzausbeute kann bei höheren Temperaturen weiter verschlechtert werden, da die Faltungseffizienz von GFP bei Temperaturen über 20°C stark abnimmt. Dennoch wurde die Lokalisation von Proteinen in sauren Kompartimenten wie dem Apoplasten und der Vakuole mit GFP-Fusionen gezeigt (Passardi *et al.*, 2006; Costa *et al.*, 2008).

Zudem kann der Integrationsort im Maisgenom die Expression des Transgens negativ beeinflussen. Die Fluoreszenz der einzelnen Konstrukte unterschied sich zudem auch untereinander. Das stärkste Signal konnte bei Konstrukten mit ZmPrx70 detektiert werden (siehe Abb. 21).

Die in den transienten Experimenten ausgeprägte Lokalisation im ER der Fusionsproteine war in den stabil transformierten Pflanzen nicht zu beobachten. Durch die, vor allem unter Umständen gegenüber dem natürlichen Promotor, starke Expression des Fusionsproteins, kann es zu Fehlleitungen oder unvollständigem Export kommen (Lisenbee *et al.*, 2003). Gerade kerncodierte Proteine, die zu einem Organell transportiert werden können hiervon betroffen sein (Tanz *et al.*, 2013). Auch *Silencing* Effekte können vorkommen (Baulcombe, 2005).

Die Fusionskonstrukte führten nicht zu einem klaren Bild der Lokalisation. Transiente Experimente zeigten ein starkes GFP-Signal im ER. Zusätzlich konnten in Maiswurzelzellen schwache Signale im Apoplasten detektiert werden. Das ER Signal konnte durch die Co-Lokalisationsstudien bestätigt werden. Die aufgetretenen Vesikel konnten jedoch nicht eindeutig zugeordnet werden. Ergebnisse transienter Experimente können durch die starke Expression des Ubi1-Promotors und Stress beeinflusst werden (Boevink *et al.*, 1999). Versuche mit Konstrukten ohne eine nötige Hitzeschockaktivierung zeigten jedoch keine veränderte Lokalisierung der Fusionen. Möglich ist dennoch ein hohes Stresslevel der exprimierenden Zellen durch eine starke Überexpression der Peroxidasen. Eine hohe Abundanz eines Proteins mit derartigen katalytischen Eigenschaften könnte zu interzellulären oxidativen Stress führen.

Experimente mit stabil transformierten Maispflanzen lieferten abweichende Ergebnisse und zeigten einen Transport an die Peripherie der Zellen. Plasmolyseexperimente zeigten keine Beschränkung der Signale auf die PM.

Die Detektion aller drei Peroxidasen in Kompartimenten des sekretorischen Weges durch Immunogold-Untersuchungen vervollständigt das Bild, welches sich in Versuchen mit Fusionsproteinen ergab. Mögliche an der Sekretion beteiligte Zellorganellen konnten detektiert werden. Es zeigten sich zudem auch Signale im Golgi-Apparat, welche bei ZmPrx-GFP-Fusionen, zumindest mithilfe des *cis*-Golgi-Markers, nicht nachgewiesen werden konnten. Die Detektion in sekretorischen Vesikeln gibt einen Hinweis auf die Natur der in transienten Experimenten beobachteten vesikulären Strukturen. Die in diesen Experimenten

ebenfalls beobachtete deutliche Lokalisation im ER der transformierten Zellen, bestätigt sich in den Immunogold-Experimenten. Die deutlichste Detektion ist im ER der untersuchten Zellen zu beobachten. Da die Detektion in natürlichen Geweben stattfand, sollte es sich hierbei nicht um Effekte einer starken Überexpression mit den diskutierten Auswirkungen wie der Auslastung des sekretorischen Systems oder anderweitige Stressreaktionen der Zelle handeln. Eine Speicherung der Proteine im ER und der Weitertransport in großen Mengen nur in besonderen Situationen ist durchaus denkbar. Ein Beispiel für einen solchen Fall gibt das *Auxin binding protein 1* (ABP1). In der Sequenz von ABP1 finden sich ein N-terminales Signalpeptid, welches zum Eintritt des Proteins in den sekretorischen Weg und somit Transport des Proteins zum ER führt. Zusätzlich existiert ein Signal zur Speicherung im ER von KDEL-Typ (Lys-Asp-Glu-Leu). Dennoch gibt es experimentelle Beweise für einen Transport von ABP1 an die PM oder den Apoplasten. Modelle für die Funktion von ABP1 gehen von einer Lokalisierung dieses Proteins an der PM oder der Zellwand aus. Studien mit nicht membranpermeablen Stoffen wie dem gesamten Protein, Peptiden oder Antikörper gegen ABP1 konnten schnelle, auxinabhängige Effekte auslösen. Entwickelte Modelle gehen von einer Speicherung des inaktiven Proteins im ER aus, nur ein kleiner Teil des Proteins wird sekretiert und entwickelt an der PM seine Aktivität (Sauer und Kleine-Vehn, 2011; Xu *et al.*, 2014). Der gesamte Mechanismus ist bisher nicht vollständig verstanden, könnte aber bei Proteinen, welche nur in bestimmten Situationen in größerer Menge an der PM benötigt werden, zur Anwendung kommen. Sollten die Proteine nur während eines bestimmten Prozesses während der Differenzierung eine Rolle spielen, könnte es kritisch sein, den richtigen Zeitpunkt bzw. Wurzelabschnitt für die Detektion zu wählen. Weiter unklar bleibt eine mögliche Prozessierung des N-Terminus von ZmPrx01, ZmPrx66 und ZmPrx70. Teilweise wird bei detektierten Signalpeptiden eine Schnittstelle nach diesen Peptiden vorhergesagt (siehe Tab. 19). Ob diese vorhergesagten Schnittstellen verwendet werden und welche Faktoren eine Erhaltung der N-terminalen Domäne bedingen, bleibt unklar.

4.3. Heterologe Expression von ZmPrx01, ZmPrx70 und ZmPrx66 in *Pichia pastoris*

Analysen von ZmPrx01, ZmPrx66 und 70 erfolgten bisher anhand von PM-Fractionen aus Maiswurzeln und einem anschließenden Reinigungsprotokoll (Mika *et al.*, 2008). Die große Anzahl an sehr ähnlichen Isoenzymen gestaltet die Reinigung aus komplexen Proben schwierig und liefert nur geringe Ausbeuten an Protein. Zudem muss die Kontamination der

Proben mit löslichen Enzymen oder membranständigen Enzymen anderer Zellorganellen durch Waschschriffe vermindert und Markeranalysen stets kontrolliert werden, kann aber nicht ganz ausgeschlossen werden und wird diskutiert (Asard und Bérzi, 2003).

Die heterologe Expression von Proteinen ermöglicht die komfortable Produktion des gewünschten Proteins im Wirtsorganismus und lässt durch die Verwendung von bestimmten *Tags* eine erleichterte Aufreinigung des Proteins zu (Baneyx, 1999; Young *et al.*, 2012). Es lassen sich so sehr reine Aufarbeitungen erzielen, welche in biochemische Analysen eingesetzt werden können.

4.3.1. Expression von ZmPrx_{rec}

Die heterologe Expression von pflanzlichen Peroxidasen stellt an den Organismus einige Anforderungen. Für die funktionelle Expression sind posttranslationale Modifikationen notwendig, da die Enzyme glykosyliert sind und Disulfidbrücken besitzen. Die Glykosylierung wurde schon früh als kritischer Faktor für die Aktivität der Enzyme erkannt (Hu und Huystee, 1989). Versuche der Expression von Peroxidasen in *E. coli* führten zu einer Anhäufung von nichtfunktionellem Protein in *inclusion bodies* (Burke *et al.*, 1989; Jayaraman *et al.*, 1991). Nach Aufreinigung und einer *in vitro* Faltung konnten geringe Mengen des Proteins mit katalytischer Aktivität gewonnen werden (Smith *et al.*, 1990).

Die Expression von *zmprx01*, *zmprx66* und *zmprx70* lieferte zwar eine hohe Ausbeute an rekombinantem Protein, eine Guajacolperoxidaseaktivität war jedoch nicht detektierbar. Auch im industriellen Maßstab erfolgt die Aufreinigung von HRP aus Wurzeln von Meerrettich (Passardi *et al.*, 2005), was die Schwierigkeiten einer rekombinanten Produktion von Peroxidasen weiter verdeutlicht.

Die funktionelle Expression von Peroxidasen muss in eukaryotischen Systemen erfolgen. In Insektenzellen konnten nur geringe Ausbeuten erreicht werden (Hartmann und Montellano, 1992; Segura *et al.*, 2005), die Expression in Hefen wie *Saccharomyces cerevisiae* oder *Pichia pastoris* liefert sowohl funktionelles Protein als auch zufriedenstellende Ausbeuten (Morawski *et al.*, 2000; Morawski *et al.*, 2001; Krainer *et al.*, 2014; Krainer und Glieder, 2015).

Die Expression von *zmprx01*, *zmprx66* und *zmprx70* ist durch das vorhandene Signalpeptid bzw. die putative Membrandomäne weiter erschwert. Zur erfolgreichen Expression von Membranproteinen existieren unterschiedliche Erfahrungen. Die Menge an erfolgreich

4. Diskussion

exprimierten und kristallisierten Membranproteinstrukturen ist immer noch recht gering. Die Anzahl an Kristalldaten von löslichen Proteinen in der Proteindatenbank (*Protein Data Bank*, PDB, <http://www.rcsb.org/>) stellt die deutliche Mehrheit dar. Dennoch ließen sich aus vielen Organismen Membranproteine exprimieren (Hedfalk, 2013).

Da ZmPrx01, ZmPrx66 und ZmPrx70 alle ein N-terminales Signalpeptid enthalten, welches putativ noch als Membrandomäne dient, musste beim Konstruktdesign auf diesen Umstand Rücksicht genommen werden. Über die Wahl des Sekretionssignales kann keine allgemeingültige Aussage getroffen werden, teilweise wurden native Signalpeptide erfolgreich eingesetzt (Raemaekers *et al.*, 1999), teilweise nicht native Peptide mit guten Ergebnissen fusioniert. Dazu gehören das Signalpeptid der Sauren Phosphatase aus *Pichia pastoris* (PHO1) (Ha *et al.*, 2001) oder die α -Mating Faktor Leading Sequence (α -MF) aus *Saccharomyces cerevisiae* (Daly und Hearn, 2005).

Da nicht abschätzbar war, wie sich das native Sekretionssignal auf die Sekretion auswirken würde, wurde für jede ZmPrx ein Konstrukt mit fehlender N-terminaler Domäne hergestellt. Dabei wurde der N-Terminus bis zur vorhergesagten Proteaseschnittstelle verkürzt und stattdessen mit dem α -MF fusioniert. Dieses Vorgehen ergab bei ZmPrx01 eine Verkürzung um 33 Aminosäuren, bei ZmPrx66 um 29 Aminosäuren und ZmPrx70 um 25 Aminosäuren.

Als Transformationsmethode wurde die Elektroporation verwendet. Diese ist als effektiv bekannt und liefert eine deutlich höhere Zahl an Transformanten als die alternativen Methoden wie die auf LiCl oder PEG₁₀₀₀ basierenden Methoden oder die Spheroblastierung (Cregg, 2007). Da auf Basis einer Zeocin[®]-Selektion gearbeitet werden sollte, konnte zudem die Spheroblastierung nicht verwendet werden, da durch die fehlende Zellwand eine erhöhte Empfindlichkeit gegen das Selektionsreagenz besteht (Higgins *et al.*, 1998).

Die erzielten Transformationsraten erschienen gegenüber dem Literaturwert von 10⁵ Transformanten pro μ g DNA (Cregg, 2007) nicht auffällig hoch, erreichten aber mit maximal 10³ Transformanten (Selektion unter 100 mg/l Zeocin[®]) akzeptable Werte (siehe Tab. 22). Auch bei der Selektion auf Mehrfachintegration konnten genügend positive *Pichia* Kolonien selektiert werden.

Die Selektion der Transformanten erfolgte auf unterschiedlichen Zeocin[®]-Konzentrationen, da so ein direktes *Screening* auf Klone mit mehrfach Integrationen möglich ist (Cregg, 2007). Dieses Vorgehen hat den Vorteil, dass die Transkriptmenge erheblich gesteigert werden und zu einer erhöhten Expression und Sekretion des Zielgens führen kann (Scorer *et al.*, 1994;

Hohenblum *et al.*, 2004; Nordén *et al.*, 2011). Dies ist in Abhängigkeit vom exprimierten Gen jedoch höchst variabel und schwer abzuschätzen. Durch die Membranständigkeit von ZmPrx01, ZmPrx66 und ZmPrx70 ergeben sich weitere Schwierigkeiten, einer möglichen Sättigung des sekretorischen Weges durch große Mengen membranständiger ZmPrx_{rec}. Dabei scheint es einen, für verschiedene Proteine unterschiedlichen, Maximalwert von Genkopien zu geben, um eine Sättigung zu erreichen (Koganesawa *et al.*, 2001; Vassileva *et al.*, 2001).

Für die Expression von *zmpmx01*, *zmpmx66* und *zmpmx70* wurde eine Strategie entworfen, die eine Selektion von Klonen mit einer Mehrfachintegration des *GOI* ermöglicht, jedoch Klone mit Einzelkopien nicht diskriminiert. Eine Analyse der erhaltenen Klone auf die Kopienzahl erfolgte nicht. Es fand eine Selektion nach der stärksten detektierbaren Aktivität im Kulturmedium statt. Entsprechende Klone wurden dann weiter charakterisiert.

4.3.1.1. Charakterisierung positiver Klone

Die weitere Charakterisierung der Klone hinsichtlich der Sekretion von rekombinanter ZmPrx_{rec} mittels Kolonie-Blot basierend auf dem C-terminalen *c-myc-Tag* erfüllte weitestgehend die Erwartungen. Es ergab sich bei der Expression von *zmpmx01*, *zmpmx66* und *zmpmx70* eine Abhängigkeit von der verwendeten Zeocin[®]-Konzentration. Unter hohen Konzentrationen zeigte sich eine deutliche Anreicherung stärker sekretierender Klone. Die Sekretion der ZmPrx_{rec} mit nativem Signalpeptid war im Falle von ZmPrx66 sehr gering, aber noch detektierbar. ZmPrx70 konnte mit nativem Signalpeptid nicht nachweisbar sekretiert werden (siehe Abb. 45 und Abb. 46). ZmPrx01 zeigte zwischen beiden verwendeten Konstrukten eine vergleichbar hohe Sekretion (siehe Abb. 44). In der Hintergrundkontrolle mit Leervektor konnte keine Sekretion beobachtet werden.

Zur Überprüfung der Aktivität wurde der verwendete Mikroassay auf Agarplatten übertragen. Dies ergänzt den Kolonie-Blot mit einem Nachweis auf die Aktivität des sekretierten Proteins. Bei der heterologen Expression und Sekretion von Laccasen wurden auf Tanninsäure und ABTS basierende Assays zur Charakterisierung positiver Klone verwendet (Kim *et al.*, 2010; Gu *et al.*, 2014).

Die Ergebnisse des Kolonie-Blot konnten nur teilweise bestätigt werden, da sich starke Signale nicht in allen Fällen auch in deutlichen Guajacolperoxidase-Aktivitäten widerspiegelten. Die gut detektierbaren Mengen von ZmPrx01 im Kolonie-Blot führten zu

4. Diskussion

keiner detektierbaren Aktivität im Plattenassay, unabhängig vom verwendeten Konstrukt (siehe Abb. 49). Schwache ZmPrx66_{rec}-Aktivitäten konnten bei Klonen transformiert mit Konstrukten ohne natives Signalpeptid detektiert werden (siehe Abb. 51). Die stärksten Aktivitäten lieferte die Expression von *zmprx70* ohne natives Signalpeptid, auch hier war mit Membrandomäne keine Aktivität detektierbar (siehe Abb. 50).

In Vorversuchen lieferte die intrazelluläre Expression basierend auf dem Vektor pPIC3.5 von *zmprx01*, *zmprx66* und *zmprx70* mit nativen Signalpeptid/Membrandomäne eine Lokalisation der rekombinanten Proteine in *Yeast light membranes* (Lüthje, pers. Mitteilung). Die geringe Sekretion der Konstrukte mit Membrandomäne lässt vermuten, dass trotz des α -MF eine Lokalisierung in intrazellulären Membranen erfolgt und nur ein geringer Teil aus der Zelle geschleust wird. Dieses Ergebnis gibt einen weiteren Hinweis auf die Funktion des N-Terminus als Membranbindedomäne.

Das Fehlen einer detektierbaren Aktivität im Fall von ZmPrx01_{rec} und der nur schwachen Aktivität von ZmPrx66_{rec} könnte mit einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber Proteasen zusammenhängen. Die Versuche wurden bei 24°C durchgeführt, bei 28°C konnte nach 48 h auch bei ZmPrx70_{rec} keine Guajacolperoxidaseaktivität detektiert werden. Im Zusammenhang mit der Stabilität von sekretierten Proteinen wird die Proteaseaktivität im Kulturüberstand häufig diskutiert (Jönsson *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2010; Salamin *et al.*, 2010). Dabei sind auch intrazelluläre Proteasen beteiligt, welche vermutlich aus lysierten Zellen stammen und bei höheren Methanolkonzentrationen verstärkt auftreten (Çelik *et al.*, 2009). In einer Proteomstudie wurden zwei Proteasen im Überstand induzierter Kulturen detektiert (Huang *et al.*, 2011).

4.3.1.2. Optimierung der Expression in Flüssigkulturen

Anhand der Plattenassays wurden entsprechende Klone für die Optimierung der Expression verwendet. Die Optimierungsversuche erfolgten in 1 l Schikanekolben in Volumen von 100-200 ml bei 28°C. Es wurde zunächst die Expression von ZmPrx70_{rec} optimiert, da hier die höchsten Aktivitäten detektiert wurden. Die Induktion erfolgte in verschiedenen Minimal- und Komplexmedien, bei verschiedenen Temperaturen und Methanolkonzentrationen. Auch die Zelldichte bei Induktion wurde variiert. Als optimal erwies sich im Verlauf der Versuche eine Induktion mit 2 % Methanol in Komplexmedium mit der Addition von Hefeextrakt und Pepton (BMMY-Medium), was eine Stabilisierung des sekretierten Proteins bewirkte und für

die Biomasseentwicklung förderlich war (Macauley-Patrick *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2007). Die Addition von Spurenelementen und Intermediaten des Häm-Stoffwechsels hatte keine signifikanten Auswirkungen auf die erreichte Peroxidaseproduktion (siehe Abb. 54). Bei der Expression von *zmpvx01* war ein leichter Effekt sichtbar, der die Produktion knapp in den detektierbaren Bereich hob (siehe Abb. 56 links). Auch die Expression von *zmpvx70* profitierte in Einzelversuchen von der Addition, es konnte jedoch keine signifikante Abhängigkeit erreicht werden. Insgesamt erschien das erreichte Expressionsniveau gering, auch wenn deutliche ZmPrx70_{rec}-Aktivitäten detektiert werden konnten.

Den stärksten Effekt hatte die Steigerung von 0,5 % Methanol auf eine Induktion unter 2 % Methanol. Die vom Hersteller empfohlene Startkonzentration beträgt 0,5 % Methanol. Diese lässt sich jedoch bis zum Auftreten toxischer Effekte variieren (Macauley-Patrick *et al.*, 2005).

Die Produktion von ZmPrx01_{rec} und ZmPrx66_{rec} konnte nicht auf das Niveau von ZmPrx70_{rec} gehoben werden. Vergleichbare Kulturbedingungen lieferten sowohl im Plattenassay als auch in Flüssigkultur nur schwache (ZmPrx66_{rec}) bzw. kaum messbare (ZmPrx01_{rec}) Aktivitäten (siehe Abb. 56). Auch niedrige Temperaturen konnten die Proteine nicht stabilisieren, zudem war die erzeugte Biomasse erheblich geringer (siehe Abb. 106 und Abb. 107). Li *et al.* (2001) erreichten durch niedrigere Temperaturen deutliche Steigerungen in der Ausbeute an rekombinanten *Herring antifreeze Protein*.

Zurückzuführen sind die schwachen erreichten Peroxidaseaktivitäten möglicherweise auf eine niedrige *Codon usage*. Die Gene der Peroxidasen wurden nicht auf eine Expression in *P. pastoris* optimiert und weisen daher nicht die optimale Codonzusammensetzung auf. Dabei erreicht ZmPrx01 ein *Codon Adaptation Index* (CAI) von 0,534 (Mais: 0,861), ZmPrx66 erreicht 0,539 (Mais: 0,855) und ZmPrx70 0,511 (Mais: 0,871). Die Expression könnte durch eine Anpassung von wenig genutzten Triplets vermutlich deutlich verbessert werden. Die Empfindlichkeit gegenüber Proteasen wird dadurch nicht beeinflusst, bei höheren Konzentrationen an rekombinanter ZmPrx_{rec} im Kulturmedium erscheint eine Reinigung jedoch aussichtsreicher. In einigen Fällen führte eine angepasste Codon Usage zu einer deutlichen Steigerung der Produktivität (Gustafsson *et al.*, 2004; Hedfalk *et al.*, 2008; Oberg *et al.*, 2011).

Die Optimierungsversuche lassen den Trend erkennen, dass eine gesteigerte Zelldichte eine höhere Aktivität von ZmPrx70_{rec} im Überstand bewirkt. Kulturen, induziert bei niedrigeren

4. Diskussion

Temperaturen, erreichten nur geringe Zelldichten und keine detektierbare Peroxidaseaktivität im Überstand. Eine Induktion mit hohen Methanolkonzentrationen bei 28°C führte hingegen zu den höchsten Zelldichten. Die Induktion des AOX1-Promotors (Cregg *et al.*, 1989) ist schon bei wachstumslimitierenden Methanolkonzentrationen sehr hoch, bis zu 30 % der löslichen Proteine ist nach Induktion die AOX1 (Couderc und Baratti, 1980; Roggenkamp *et al.*, 1984). Kolbenkulturen leiden vor allem unter der fehlenden Möglichkeit der genauen Überwachung der Induktionsparameter, wie einer gleichmäßigen Versorgung mit Methanol und die Aufrechterhaltung einer guten Belüftung der Kultur. Beobachtete Schwankungen in der Produktivität sind vermutlich auf die ungleichmäßigen Kulturbedingungen zurückzuführen. Auch durch eine geringere genetische Stabilität von Klonen mit mehrfachen Kopien der Expressionskassette wird berichtet (Zhu *et al.*, 2009). Eine Kultur im Fermenter bietet die Kontrolle sämtlicher wichtiger Parameter und liefert sehr hohe Zelldichten bis zu 500 OD₆₀₀ Units (Sreekrishna *et al.*, 1997; Çelik *et al.*, 2009). Mit der Produktivität der getesteten Klone könnten in einer solchen kontrollierten Fermentation voraussichtlich wesentlich höhere Ausbeuten an ZmPrx70_{rec} erreicht werden.

4.3.2. Aufreinigung rekombinanter Peroxidasen

Durch unzureichende Expressionslevel von *zmprx01* und *zmprx66* wurden Versuche zur Reinigung nur mit ZmPrx70_{rec} durchgeführt. Die ursprüngliche Strategie war die auf dem Vektor pPICZα A basierende Aufreinigung der rekombinanten Peroxidasen über eine immobilisierte Metallionen Affinitätschromatographie. Die Technik basierend auf Nickel-Nitrilotriessigsäure (Ni²⁺-NTA), liefert häufig zufriedenstellende Aufreinigungen und zeigt geringe Wechselwirkungen mit dem fusionierten Protein da der Tag elektrisch neutral ist und keine weiteren toxischen Eigenschaften aufweist (Lichty *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2013).

Nach Durchführung einer Ammoniumsulfatfraktionierung und anschließendem Pufferaustausch gegen den Bindepuffer wurde die Probe auf die Ni²⁺-NTA Säule aufgetragen. Da Imidazol Peroxidasen irreversibel hemmt, wurde das Standardprotokoll ersetzt. Die Elution des gebundenen Proteins erfolgte durch eine Veränderung des pH-Wertes in einen sauren Bereich. Dabei wurden pH-Werte zwischen 4 und 5 für die Elution verwendet. Die erhaltenen Chromatogramme zeigten keine Auffälligkeiten (siehe Abb. 59 und Abb. 60), die Guajacolperoxidaseaktivitäten fanden sich jedoch hauptsächlich im Durchfluss und waren nicht an die Säule gebunden. Ein Wechsel auf eine Co²⁺-NTA Matrix mit geringerer Affinität,

sollte unspezifische Bindungen minimieren. Tatsächlich ergab sich in diesen Versuchen nur noch eine einzelne Hauptfraktion, allerdings immer noch ein großer Teil der Aktivität im Durchfluss (siehe Abb. 60). Die vergleichsweise hohe Proteinkonzentration in den Fraktionen, gekoppelt mit nur einer geringen Aktivität, kann möglicherweise auf unspezifische Bindungen von Proteinen aus dem Kulturüberstand hindeuten. Abhängig vom verwendeten Expressionssystem kommt es zu unspezifischen Bindungen (Lichty *et al.*, 2005). Sollten unspezifische Bindungen derartig gut mit der Bindung von ZmPrx70_{rec} konkurrieren können, müsste man von einer geringen Affinität des Histidin-Tags ausgehen. Eine Glykosylierung im Bereich des C-Terminus des Proteins könnte die Bindung des Tags ebenfalls negativ beeinflussen.

Eine weitere Möglichkeit stellt intaktes, aber nicht aktives Protein dar. Die Überexpression von Peroxidasen stellt einige Anforderungen an den exprimierenden Organismus, da viel Eisen und Porphyrin für die Bildung des aktiven Proteins benötigt wird. Einige Untersuchungen zeigten, dass auch eine große Menge Apoprotein synthetisiert wird, in welchem der Häm-Cofaktor fehlt (Khosla *et al.*, 1990; Guengerich *et al.*, 1996). Die Kulturversuche mit der Zugabe von Intermediaten des Häm-Stoffwechsels geben aber keinen Hinweis auf dieses Phänomen bei der Expression von ZmPrx70_{rec}, da keine signifikante Aktivitätssteigerung zu erkennen war.

Schließlich kann die Proteolyse am C-Terminus der rekombinanten Proteine eine Zerstörung des Histidin-Tags bedeuten und so die Aufreinigung verhindern. Die angewendete Reinigungsstrategie ist vor allem im ersten Schritt, der Ammoniumsulfatpräzipitation, zeitaufwändig. Zudem müssen große Volumen verarbeitet werden, was an diesem Punkt den generellen Einsatz von Proteaseinhibitoren erschwert. Ein weiterer Umstand, der die Reinigung des rekombinanten Proteins erschweren könnte, ist die Glykosylierung des Proteins. Tatsächlich befinden sich nahe dem C-Terminus mögliche Glykosylierungsstellen (siehe Tab. 18).

Da nicht abschließend geklärt werden konnte, welcher Effekt für die Probleme bei der IMAC-Aufreinigung ursächlich war, und zudem die erreichten Aktivitäten gering waren, wurde eine alternative Methode zur Aufreinigung entwickelt. Neben der Aufreinigung mit Affinitätstags, gibt es Berichte, in denen eine klassische, auf den biochemischen Eigenschaften der Proteine beruhende, Methode verwendet wurde (Morawski *et al.*, 2000; Morawski *et al.*, 2001; Krainer *et al.*, 2014; Krainer und Glieder, 2015).

4. Diskussion

Es wurde eine Methode verwendet, die sich an der Aufreinigung der nativen Peroxidasen aus Maiswurzeln orientiert (Mika *et al.*, 2008). Nach der Ammoniumsulfatfällung erfolgte nach einem Austausch des Puffers gegen Natriumacetatpuffer (pH 4) eine Kationenaustauschchromatographie und eine Gelfiltration. Mit diesem Ablauf ergab sich eine deutliche Steigerung der absoluten Aktivitäten in den Fraktionen und zusätzlich eine Steigerung der spezifischen Aktivitäten und erreichten Reinheitszahlen auf ein akzeptables Niveau. In der Überprüfung der erhaltenen Fraktionen durch eine modifizierte SDS-PAGE konnten in den Fraktionen zwei Größen detektiert werden, die vermutlich auf einen Unterschied in der Glykosylierung zurückzuführen ist. Die Glykosylierung in *P. pastoris* unterscheidet sich deutlich von höheren Eukaryoten, sowohl die O- als auch die N-Glykosylierung betreffend, häufig kommt es zu zusätzlicher Glykosylierung (Higgins *et al.*, 1998; Cereghino und Cregg, 2000).

In weitergehenden Analysen wurden hauptsächlich die Fraktionen 16 und 17 verwendet, welche homogen erscheinen. In der massenspektroskopischen Analyse konnte dieses Protein als ZmPrx70_{rec} identifiziert werden. Die erreichten Ausbeuten (um 0,4 mg/l, siehe 3.6.6.4) sind vergleichbar mit von Morawski *et al.* (2000) erzielten Ausbeuten an rekombinanter HRP bei Expression in *P. pastoris* (zwischen 0,6 mg/l und 5,2 mg/l). Die erreichten RZ-Werte erscheinen jedoch zu niedrig. Dies deutet auf eine Kontamination der Aufreinigungen mit inaktivem Protein, welches keine Häm-Gruppe mehr enthält, hin.

4.3.3. Biochemische Charakterisierung

Die erhaltenen Fraktionen aus der Gelfiltration und Kationenaustauschchromatographie wurden für die biochemische Charakterisierung eingesetzt. Es wurden Untersuchungen zur Temperaturstabilität, dem pH-Optimum, sowie der Substratspezifität und dem Einfluss verschiedener Effektoren auf ZmPrx70_{rec} durchgeführt. Als Vergleich diente HRP sowie die Daten des nativen Enzyms (Mika *et al.*, 2008).

Die kinetischen Konstanten von ZmPrx_{rec} wurden mit den Substraten Guajacol, ABTS und Wasserstoffperoxid bestimmt und mit HRP verglichen (siehe Tab. 23). Mit Guajacol und ABTS wurden jeweils ein phenolisches Substrat und ein Substrat aus der Gruppe der Hydrazine verwendet.

Die beobachteten K_M Werte entsprechen typischen Werten bei Reaktionen von Peroxidasen mit künstlichen Substraten. Bei nativen Enzymen wurden ähnliche Werte in Kiwi und

Knoblauch erreicht (Soda *et al.*, 1991; Marzouki *et al.*, 2005). Auch die Untersuchung nativer ZmPrx01 und ZmPrx70 lieferte ebenfalls vergleichbar hohe K_M Werte (Mika und Lühje, 2003) (siehe Tab. 23). Die bei der HRP gemessenen K_M -Werte bewegten sich ebenfalls in einem typischen Bereich (Krainer *et al.*, 2014).

Deutlich wird bei diesen Messungen die Fähigkeit von ZmPrx70_{rec} und HRP, Substrate mit einem hohen Redoxpotential umzusetzen. Dies ist eine generelle Eigenschaft von Peroxidasen, da die für die Katalyse zugrunde liegende Reduktion von Wasserstoffperoxid zu H₂O ein hohes Redoxpotential (E_0) von +1780 mV besitzt. Dieses liegt damit deutlich höher als vergleichbare Potentiale bei Oxidasen (Ayala, 2010). Das Redoxpotential von ABTS wird mit +472 mV angegeben (Bourbonnais *et al.*, 1998), und ist zudem unabhängig vom pH-Wert, da bei der Umwandlung keine Protonen beteiligt sind (Xu, 1997). Dies lässt den Schluss zu, dass E_0 von ZmPrx70_{rec} mindestens diesen Wert erreicht.

Andere Substrate wurden in der Peroxidaseaktivität relativ zu Guajacol verglichen. Die verwendeten Stoffe setzen sich aus den Gruppen der Benzidine (TMB), Hydrazine (ABTS), Phenolsäuren (Ferulasäure, Kaffeesäure, p-Coumarinsäure) Phenylpropanoide (Coniferylalkohol) sowie einem substituierten Indol (IAA) und der vinylogenen Carbonsäure Ascorbinsäure zusammen. Verwendete Phenolderivate spielen eine Rolle als sekundäre Pflanzenstoffe und kommen in der Suberin- und Ligninsynthese vor (Vanholme *et al.*, 2010). Eine IAA-Peroxidaseaktivität könnte einen direkten Eingriff in den IAA Katabolismus ermöglichen, eine Ascorbatoxidaseaktivität wäre ebenfalls physiologisch interessant.

Es zeigte sich bei den verwendeten künstlichen Substraten ABTS und TMB ein unterschiedliches Verhalten von ZmPrx70_{rec} und HRP. Während HRP mit ABTS und TMB deutlich höhere Aktivitäten im Vergleich zu Guajacol zeigte, wies ZmPrx70_{rec} mit TMB vergleichbare Aktivitäten und mit ABTS eine kaum detektierbare Aktivität gegenüber Guajacol auf. Dabei wurden ABTS und TMB in deutlich geringeren Konzentrationen gegenüber Guajacol verwendet (TMB: 0,083 mM, ABTS: 0,36 mM). Diese Beobachtungen entsprechen dem Trend, der in nativen Aufreinigungen beobachtet wurde (Mika und Lühje, 2003).

Natürliche Substrate wurden gegenüber Guajacol mit dem Trend Ferulasäure > Coniferylalkohol > Kaffeesäure > p-Coumarinsäure schlechter umgesetzt. Dabei ist zu beachten, dass auch hier im Vergleich zu Guajacol deutlich niedrigere Substratkonzentrationen verwendet wurden (Guajacol 9,09 mM, natürliche Substrate

4. Diskussion

0,1 mM). Dieses Verhalten zeigt HRP ebenfalls, jedoch wird mit dem Substrat Ferulasäure eine höhere Aktivität beobachtet. Im Vergleich zu Messungen an nativer ZmPrx70 ergeben sich deutliche Unterschiede. Diese zeigt die höchste Aktivität beim Umsatz von Coniferylalkohol gefolgt von Ferulasäure und Coumarinsäure (siehe Abb. 73).

Die hohe beobachtete Aktivität beim Umsatz von Hydroxycimtsäuren (3,4-Dihydroxycimtsäure, Kaffeesäure; 4-Hydroxycimtsäure, p-Coumarinsäure) und Derivaten (3-Methoxy-4-Hydroxycimtsäure, Ferulasäure) spricht für eine Beteiligung an Lignifizierungsprozessen. Hier werden Ferulasäurereste umgesetzt, welche über eine Esterbindung an Zellwandsaccharide gebunden sind. Dieser Prozess führt zu einer Verstärkung der Zellwand (Ward *et al.*, 2001).

Zusätzlich wurden Versuche mit einer Addition von 0,1 mM Ferulasäure und Coniferylalkohol zum Guajacolansatz unternommen. In diesen Versuchen zeigte sich im Fall von Ferulasäure eine deutliche Steigerung der Aktivität, und bei Coniferylalkohol eine sichtbare Hemmung der Guajacolaktivität (siehe Abb. 74). Ferulasäure stellt für den Umsatz durch HRP ein sehr gutes Substrat dar, da durch Größe und mögliche Wechselwirkungen eine fast optimale Ausrichtung im aktiven Zentrum erfolgt (Henriksen *et al.*, 1999). HRP und ZmPrx70_{rec} verhalten sich in diesem Versuch gleich. Auch in Versuchen mit nativer ZmPrx70 kam es zu derartigen Aktivitätssteigerungen. Die beobachtete Steigerung der Guajacolaktivität ist ein Effekt, der im Zusammenhang mit Verstärkern der Peroxidaseaktivität durch Zufügen von phenolischen Substanzen zum Reaktionsansatz beschrieben wird (Thorpe *et al.*, 1985; Hodgson und Jones, 1989). Montellano beschreibt diesen Mechanismus als *Electron transfer relay*, wobei ein mobiles, effizient umgesetztes Peroxidasesubstrat den Umsatz eines zweiten Substrates vermittelt und die Reaktion so deutlich beschleunigt. Dieser Mechanismus ermöglicht die Oxidation von schlecht zugänglichen Substraten bzw. kann das Enzym auch vor Inhibitoren schützen, da das aktive Zentrum stetig mit dem effizienten Substrat besetzt ist (Montellano, 2010). Wirtschaftliche Anwendung findet dieser Mechanismus zum einen, wie bereits beschrieben, bei Reagenzien zur Detektion von Chemilumineszenz sowie zum anderen beim Bleichen von Zellstoff auf biologischer Basis durch Laccasen (Bourbonnais *et al.*, 1998). Eine Verminderung der Aktivität spricht für eine simple Kompetition der eingesetzten Substrate um Bindung an das aktive Zentrum. Die beobachteten Unterschiede zwischen rekombinanter und nativer ZmPrx70 sind möglicherweise auf Unterschiede im verwendeten Assay zurückzuführen, wie vorhandene

Detergenzien, bzw. durch verschiedene Glykosylierungsgrade der Enzyme, welche die Aktivität beeinflussen können (Van Huystee *et al.*, 2004).

Die beobachteten Hemmungen der Peroxidaseaktivitäten bei hohen Guajacol- und Wasserstoffperoxidkonzentrationen sind auf Inaktivierungen des Enzyms zurückzuführen (Scheller *et al.*, 1996).

Die Substratspezifität von Peroxidasen wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst. Eine grundlegende Eigenschaft ist das Redoxpotential des Enzyms. Über dieses wird die Fähigkeit definiert, gewisse Substrate oxidieren zu können. Daneben spielen jedoch auch bei Peroxidasen klassische Eigenschaften wie vorhandene elektrostatische Wechselwirkungen, Ausrichtung des Substrates und der Aufbau des aktiven Zentrums eine große Rolle (Cusanovich *et al.*, 1989).

Das Fe(III)/Fe(II)-Paar besitzt ein Standard-Redoxpotential von +770 mV, welches im Komplex mit Protoporphyrin auf -115 mV absinkt. Die umgebende Proteinmatrix kann dieses Potential in einem weiten Bereich von etwa 1000 mV modellieren (Ayala, 2010). In HRP erreicht das Fe(III)/Fe(II)-Paar ein Redoxpotential von -278 mV (Yamada *et al.*, 1975). Dieses niedrige Potential besitzt den Vorteil der Stabilisierung des *ferric*-Häm-Grundzustandes und zudem die Möglichkeit noch höhere Oxidationsstufen wie Fe(IV) oder Fe(V), sollten diese während der Katalyse entstehen, zu stabilisieren. Da freies Fe(III) in wässriger Lösung zudem mit Wasserstoffperoxid reagieren kann und so Hydroxylradikale bildet (Fenton-Reaktion), stellt die Kontrolle solcher unerwünschten Reaktionen einen weiteren Vorteil dar (Ayala, 2010).

An der katalytischen Reaktion ist das Fe(III)/Fe(II)-Paar nicht direkt beteiligt, sie erfolgt über die höheren Oxidationsstufen des Enzyms, *Compound I* (2 Elektronen) und *Compound II* (1 Elektron). Dabei ergibt sich ein deutlich erkennbarer Zusammenhang der spezifischen Aktivität mit den Redoxpotentialen der Substrate. Ayala *et al.* (2007) untersuchten diesen Zusammenhang mit verschiedenen substituierten Phenolen mit Redoxpotentialen zwischen +720 und +1230 mV und verschiedenen Peroxidasen. Dabei ergab sich ein Redoxpotential von $+890 \pm 100$ mV für das Redoxpotential von *Compound II*/Fe(III) für HRP. 4-Nitrophenol konnte durch sein hohes Redoxpotential von +1230 mV nicht mehr durch HRP umgesetzt werden. Maximal wurden $+1370 \pm 190$ mV von der *Versatile Peroxidase* erreicht (Ayala *et al.*, 2007).

4. Diskussion

Das Redoxpotential von Häm-Proteinen kann durch die Eigenschaften der Peptidkette selbst, und durch Substitutionen am Häm moduliert werden. Dabei haben proximale und distale Liganden einen entscheidenden Einfluss, da sie die verschiedenen Redoxstufen stabilisieren können. Hier kommt das Pearson-Konzept, bzw. das *Hard and Soft Acids and Bases*-Konzept (HSAB-Konzept) zur Anwendung (Pearson, 1963). Ein weicher Ligand, wie die Schwefelgruppe in Methionin, bindet mit höherer Affinität *ferric*-Häm, wogegen härtere Liganden, wie der Imidazolring von Histidin, *ferrous*-Häm bevorzugen. Häm-Substituenten verändern durch ihre Eigenschaft, entweder als Elektronendonoren oder -akzeptoren zu dienen, durch Beeinflussen der äquatorialen Liganden das Redoxpotential der gesamten Häm-Gruppe (Ayala, 2010).

Sowohl HRP als auch ZmPrx70 besitzen, typisch für Klasse III Peroxidasen, eine hohe Übereinstimmung in ihrer Struktur, was sich vor allem in der hohen Konservierung der 3D-Struktur widerspiegelt (siehe Abb. 76). Unterschiede ergeben sich vor allem im Bereich zwischen Helixregionen. Die Lage von Disulfiden und Ca^{2+} -Ionen wird nicht stark beeinflusst. Diese Ca^{2+} -Ionen sind durch ein Netzwerk von Wasserstoffbrücken mit dem aktiven Zentrum verbunden. Sie sind jeweils 7-fach über Sauerstoffliganden aus Carboxy- (Asp), Hydroxyl- (Ser, Thr) sowie Carbonylgruppen aus dem Peptidrückgrad sowie durch ein strukturelles Wassermolekül an der distalen Seite koordiniert. Ein Verlust von Calcium führt zu verminderter Aktivität und thermischer Stabilität sowie zu Änderungen der Häm-Umgebung (Veitch, 2004b). Die Unterschiede zwischen HRP und ZmPrx70 im aktiven Zentrum sind ebenfalls gering (siehe Abb. 76). Die distalen und proximalen Häm-Liganden sind in beiden Enzymen jeweils ein Histidin, die beteiligten Aminosäuren und ihre Lage im aktiven Zentrum bis hin zur Ca^{2+} -Bindung erscheint konserviert. Das Isoleucin 228, welches in HRP an der Koordination des proximalen Ca^{2+} -Ions beteiligt ist, ist in ZmPrx70 gegen ein Alanin (im Protein an Position 247) substituiert. Dieser Austausch verändert die Koordination des Calciums nicht, könnte aber durch die verkürzte Kettenlänge von Alanin zu einer leichten Veränderung in der Architektur führen. Insgesamt erscheint das aktive Zentrum zwischen beiden Enzymen sehr konserviert, es ergeben sich jedoch sichtbare Veränderungen in der räumlichen Lage und der Torsion einzelner Reste, was die Veränderung der katalytischen Eigenschaften bewirken könnte. Die Auswirkungen verschiedener Reste auf das aktive Zentrum wurde bereits am Beispiel der HRP untersucht (Veitch und Smith, 2000).

Einen weiteren Einfluss auf die Unterschiede in der Substratumsetzung hat die Umgebung des Kanals, der den δ -meso-Bereich des Häms mit dem Lösungsmittel verbindet (siehe Abb. 77 in Rot). Der Umsatz erfolgt bei Klasse III Peroxidasen an dieser Seite des Häms, da andere Bereiche durch das Proteingerüst gut abgeschirmt werden. Ein Merkmal, welches als *Closed heme architecture* bezeichnet wird (Veitch, 2004b). Versuche der Inhibition der HRP mit Alkyl- und Phenylhydrazinen sowie Natriumazid und anderen reaktiven Substanzen führten zu C18-Hydroxylmethyl- und C20-Mesophenylderivaten (Montellano *et al.*, 1988; Montellano, 1992). Der Zugang zu diesem Bereich wird unter anderem von den Helices F und F' gebildet (siehe Abb. 77), einem Bereich, in dem es zu einer Variabilität von Aminosäureresten kommt, die im Zusammenhang mit der Substratspezifität vermutet werden (Gajhede *et al.*, 1997). Auch in HRP vermitteln Reste dieser Helices den Substratzugang und die Bindung (Veitch, 2004b). Die Bindung von Ferulasäure erfolgt mit der Ausrichtung des aromatischen Ringes in Richtung des zugänglichen δ -meso-Bereichs des Häms. Es kommt zu Wasserstoffbrücken mit konservierten Resten wie Arg38 und Pro139. Zudem bestehen hydrophobe Interaktionen mit Resten von Phe68, Gly69, Pro139, Ala140, Phe142 und Phe179 (Veitch, 2004b). Hier ergeben sich Unterschiede zu ZmPrx70, welche zu einer veränderten Zugänglichkeit des katalytischen Bereichs für Substrate führen könnte.

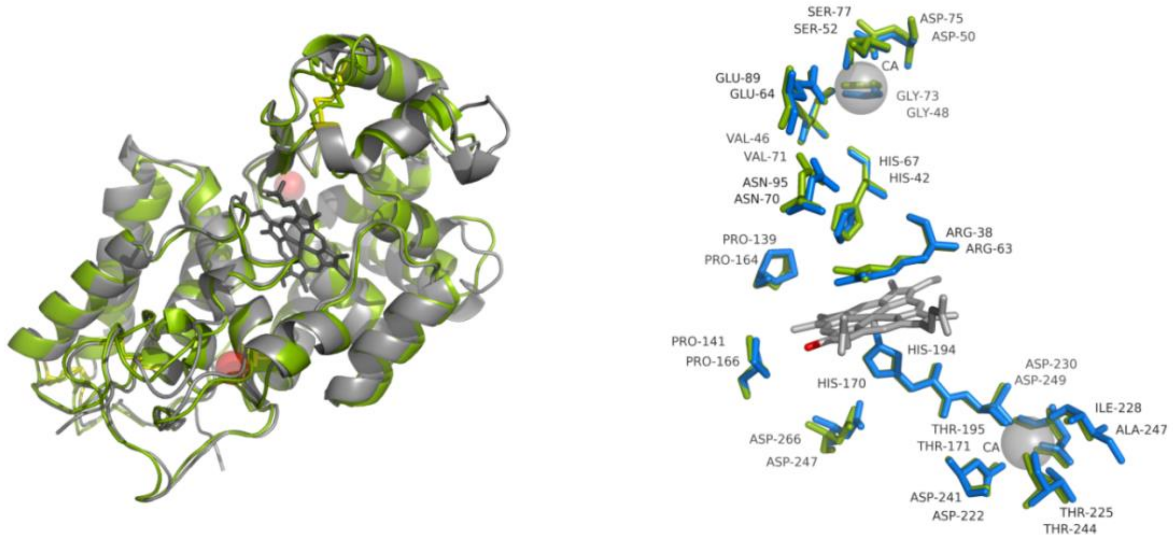


Abb. 76: Vergleich der 3D-Strukturen von HRP (in Grau) und ZmPrx70 (in Grün). Eingelagerte Ca^{2+} -Ionen in Rot links: Ein Alignment beider Strukturen zeigt die hohe Konservierung der Struktur innerhalb der Klasse III Peroxidasen. Wichtige Domänen sowie helikale Bereiche zeigen nur geringe Abweichungen. Die Position von Disulfiden und Ca^{2+} -Ionen innerhalb der Strukturen bleibt ebenfalls erhalten. Rechts: Isolierte aktive Zentren von HRP (in Blau) und ZmPrx70 (in Grün). Die Häm-Gruppe wird durch ein distales und proximales Histidin moduliert. Nahezu alle weiteren Reste sind in Position und Interaktion konserviert. Dies betrifft sowohl Reste, welche direkt an der Häm Bindung beteiligt sind, als auch Reste die an der Koordination der Ca^{2+} -Ionen (dargestellt als graue Sphären) beteiligt sind. Einzelne Reste zeigen eine Torsion, welche Auswirkungen auf die Reaktivität des Häms haben können. Eine Substitution an Stelle des Isoleucin 228 in HRP gegen ein Alanin an Position 247 in ZmPrx70 könnte eine weitere räumliche Veränderung des aktiven Zentrums bewirken. Abbildung auf Basis der Kristallstruktur von HRP (PDB: 1HCH) und der durch Phyre² modellierten ZmPrx70-Struktur.

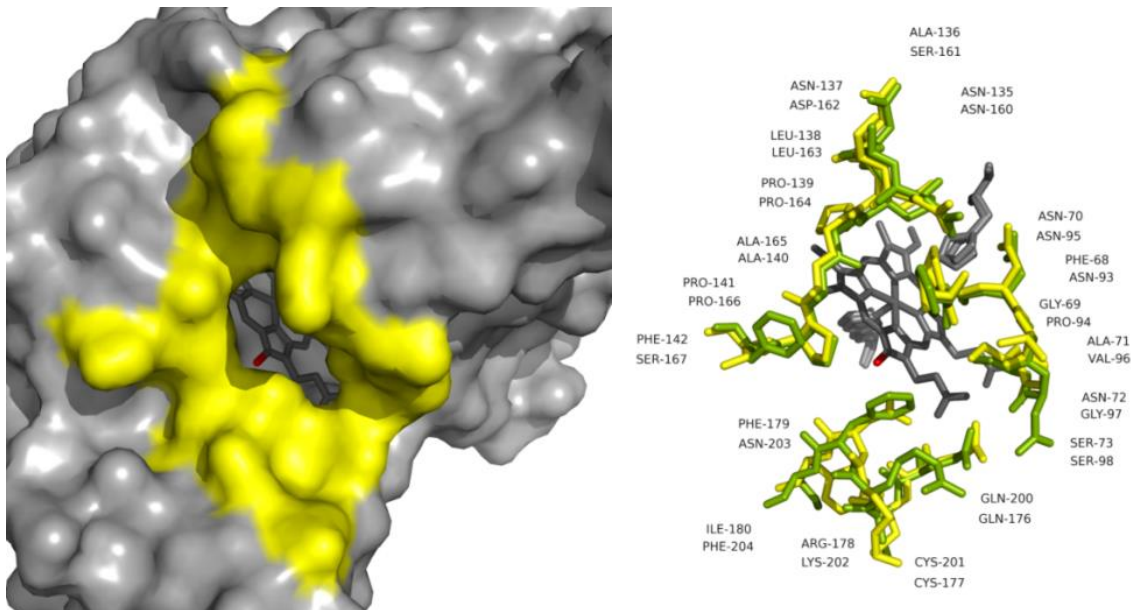


Abb. 77: Ansicht des Substratkanals von ZmPrx70 im Vergleich zu HRP. Links: Zugang zum δ -meso-Bereich des Häms über den Substratkanal von ZmPrx70. Darstellung der Oberfläche als Connolly-Oberfläche. Sie ist gleichzusetzen mit der *accessible surface area* (ASA) bzw. *solvent accessible surface area* (SASA). Gelbe Aminosäurereste an der Oberfläche können in Wechselwirkung mit Substraten treten und den Zugang zum aktiven Zentrum beeinflussen. Rechts: Vergleich der beteiligten Reste als Überlagerung von HRP (Grün) und ZmPrx70 (in Gelb). In der Mitte die Häm-Gruppe (in Grau) mit zugänglichem δ -meso-Bereich des Häms (in Rot). Zusätzlich sind die konservierten proximalen und distalen Histidinreste sichtbar (in Grau), um eine Orientierung zu ermöglichen. Es ergeben sich zwischen HRP und ZmPrx70 in diesem Bereich einige Unterschiede, es zeigt sich eine Variabilität an Aminosäureresten. Insgesamt erfolgt ein Austausch unpolare Aminosäuren gegen polare Reste. Auch sind Variationen in der Ausrichtung einzelner Reste erkennbar. Diese Modifikationen können zu einer veränderten Zugänglichkeit des katalytischen Bereiches für Substrate führen. Die Abbildung erfolgte auf Basis der Kristallstruktur von HRP (PDB: 1HCH) und der modellierten ZmPrx70-Struktur.

Ein Umsatz von IAA konnte bei beiden Proteinen nicht beobachtet werden. Für HRP wurde ein solcher Umsatz jedoch schon gezeigt. Auch in Abwesenheit von Wasserstoffperoxid wird IAA durch HRP *Compound I* und *II* zum Indolyl-Radikalkation oxidiert. Zudem kann die Oxidation über den typischen katalytischen Weg erfolgen (Hinman und Lang, 1965; Krylov und Dunford, 1996; Hu und Dryhurst, 1997; Veitch, 2004b). Es wurden zusätzlich übereinstimmende Motive zwischen IAA bindenden Proteinen und Peroxidasen gefunden, welche im Zusammenhang mit einer Bindung und einer katalytischen Umsetzung von Auxin stehen könnten (Savitsky *et al.*, 1999). Da Teile dieser Domänen in pflanzlichen Peroxidasen konserviert sind, kommen sie auch in ZmPrx70 vor. Messungen mit nativer ZmPrx70 bestätigen zudem eine Auxinoxidaseaktivität (Mika und Lühje, 2003). Die Funktion der IAA Oxidation wird im Zusammenhang mit dem Abbau bzw. der Inaktivierung von IAA sowie der Produktion von Superoxidanionradikalen unabhängig von Wasserstoffperoxid diskutiert (Ljung, 2013; Pencik *et al.*, 2013; Kimura *et al.*, 2014).

4. Diskussion

Ein Umsatz von Ascorbat erfolgte im Assay ebenfalls nicht. Für Ascorbat als spezifisches Substrat kommen in Pflanzen aus der Klasse I intrazelluläre Ascorbatperoxidasen vor (Zámocký *et al.*, 2010). Diese Enzyme unterscheiden sich von HRP und ZmPrx70 zum einen durch den Aufbau des aktiven Zentrums in der Koordination des Häms und zum anderen durch den Besitz einer Bindestelle für Ascorbat. Der Umsatz erfolgt nicht im Bereich des δ -meso-Häms, sondern am zweiten Substratkanal über den γ -meso-Bereich des Häms. An der Bindung sind die Reste Cys32, Lys30 und Arg172 beteiligt (Sharp *et al.*, 2003). Dieses Motiv lässt sich bei HRP und ZmPrx70 nicht beobachten. Ascorbat spielt jedoch bei der Modulation der Aktivität von apoplastischen Peroxidasen eine Rolle. Dabei erfolgt keine direkte Interaktion von Ascorbat mit den Enzymen, vielmehr wird eine Aktivität durch die antioxidative Fähigkeit von Ascorbat unterdrückt und moduliert (Córdoba-Pedregosa *et al.*, 2003; Córdoba-Pedregosa *et al.*, 2005).

Die untersuchten Hemmstoffe gliederten sich in typische Peroxidasehemmstoffe wie Azide und Cyanide, sowie verschiedene, in den Versuchsansätzen vorkommende, Substanzen. Zusätzlich wurde die Wirkung von verschiedenen Salzen und Lektinen auf die Aktivitäten untersucht. Dabei ergaben sich signifikante Effekte bei der Hemmung durch hohe Imidazolkonzentrationen. Diese Beeinflussung der Aktivität könnte im Zusammenhang mit einer Beeinflussung des aktiven Zentrums stehen. Derartige Beobachtungen wurden an mikrobiellen Flavohämoglobin im Zusammenhang mit spezifischen Antibiotika gemacht (Helmick *et al.*, 2005). Eine Reaktion des Imidazols, mit im Ansatz vorhandenen Wasserstoffperoxid könnte die Aktivität ebenfalls vermindern (Nozaki und Kawamoto, 2003). Die Hemmung durch SDS und DTT entspricht der Erwartung und ist mit der Störung der Tertiärstruktur, durch Reduktion der Disulfidbrücken zu erklären. Die Disulfidbrücke zwischen Cys201 und Cys226 (entsprechend Cys177 und Cys209 bei HRP) spielt eine wichtige Rolle bei der Erhaltung der Integrität der Struktur (Veitch, 2004b).

Schließlich beruht die Hemmung der klassischen Peroxidasehemmstoffe Cyanid und Azid auf einem Binden an das katalytische Zentrum in Position 6 der Fe-Koordination und einer sterischen Behinderung der distalen Häm-Bindetasche (Henriksen *et al.*, 1999). Die Hemmung durch Ethanol wurde im Zusammenhang mit der Änderung der dielektrischen Konstante (elektrische Feldkonstante, ϵ) diskutiert, es findet jedoch eine Bindung von Ethanol ebenso in Position 6 der Fe-Koordination im aktiven Zentrum statt, da sowohl die

Bildung von *Compound I* als auch die Inhibition durch Cyanid gleichermaßen gehemmt wird (Dunford und Hewson, 1977).

Andere eingesetzte Effektoren zeigten keinen signifikanten Einfluss auf die Peroxidaseaktivitäten (siehe Tab. 24). Sowohl Ca^{2+} - als auch Mn^{2+} -Ionen konnten die Aktivitäten nicht signifikant verändern, zumindest Ca^{2+} -Ionen zeigten hemmende Effekte auf die Aktivität nativer ZmPrx70 (Mika und Lühje, 2003). In der Literatur werden stimulierende Effekte in Bezug auf Ca^{2+} - und Mn^{2+} -Ionen berichtet (Rasmussen *et al.*, 1998). Diese beruhen unter Umständen auf dem Ausgleich von Verlusten dieser Ionen während der Aufreinigung dieser Enzyme. Die Entfernung von Ca^{2+} -Ionen aus der Struktur führt zu einer Verminderung der Aktivität um etwa 40 % (Haschke und Friedhoff, 1978), die beobachtete Steigerung (Vianello *et al.*, 1997) könnte also durch eine erfolgte Reintegration der Ionen in die Struktur zu erklären sein. Diese Stabilisierung steht auch im Zusammenhang mit der thermalen Stabilität von Peroxidasen (Plieth und Vollbehr, 2012).

Eingesetzte Lektine konnten die Aktivität von ZmPrx70_{rec} ebenfalls nicht signifikant beeinflussen, native ZmPrx70 zeigt eine Reduktion der Aktivität um etwa 20 % (Mika und Lühje, 2003). Dieser Unterschied ist möglicherweise auf eine Hyperglykosylierung, bzw. veränderte Zusammensetzung der Zuckerreste durch die Expression in *P. pastoris* zurückzuführen (Bretthauer und Castellino, 1999).

ZmPrx70_{rec} zeigte eine gegenüber nativer ZmPrx70 erhöhte Temperaturstabilität. Ohne Vorinkubation wurde die maximale Aktivität bei 95°C beobachtet (siehe Abb. 68). Es ergab sich in Vorversuchen der typische Zusammenhang, dass eine erhöhte Temperatur eine erhöhte Substratumsetzung zur Folge hat bis denaturierende Effekte die Aktivität des untersuchten Enzyms beeinflussen (Bisswanger, 2014). Bei der Darstellung der Daten als Arrhenius-Plot erkennt man den Übergang vom stabilen Bereich in den Denaturierungsbereich (siehe Abb. 69). Durch Variation der Vorinkubationszeit wird die Optimaltemperatur hin zu niedrigeren Temperaturen verschoben. Mit einer Vorinkubation von 2 min erhält man eine Optimaltemperatur von 65,45 °C (siehe Abb. 69). Pflanzliche Peroxidasen besitzen ein breites Spektrum an Temperaturoptima und Temperaturstabilitäten (Plieth und Vollbehr, 2012). Es kommen auch in Soja und Dattelpalmen Isoenzyme mit einer sehr hohen Temperaturstabilität vor (McEldoon und Dordick, 1996; Al-Senaidy und Ismael, 2011). Neben der hohen Optimaltemperatur zeigt ZmPrx70_{rec} eine gute Temperaturstabilität und erreichte bei 50°C noch eine Restaktivität von

4. Diskussion

56 %, bei 60°C werden noch 32 % Restaktivität nach 60 min Inkubation erreicht (siehe Abb. 70). Untersuchungen von 19 rekombinanten HRP Isoenzymen ergeben bei einigen dieser Isoenzyme vergleichbare Werte (Krainer *et al.*, 2014). Gegenüber der nativen ZmPrx70 ergibt sich eine höhere Temperaturstabilität und ein höheres Temperaturoptimum. Das Optimum lag bei etwa 43°C, die Restaktivität nach 180 min Inkubation betrug noch 5,7 % (ZmPrx70_{rec}: 29 %). Auch diese Steigerung der Stabilität könnte mit einer Veränderung der Glykosylierung von ZmPrx70_{rec} gegenüber der nativen Form in Zusammenhang gebracht werden. Generell wird eine Stabilisierung und Erhöhung der Halbwertszeit von Proteinen im Zusammenhang mit der Glykosylierung diskutiert (Solá und Griebenow, 2009). Im Zusammenhang mit HRP zeigten sich jedoch Auswirkungen eher auf die katalytische, als auf die thermale Stabilität (Tams und Welinder, 1998). Große Zuckerreste dämpfen die Bewegung des Proteins und erschweren so die Denaturierung des Moleküls. Die Stabilität gegenüber Erhitzung wurde jedoch zwischen glykosylierter und deglykosylierter Form nicht signifikant verändert (Tams und Welinder, 1995; Tams und Welinder, 1998).

Die beobachteten pH-Optima für den Umsatz von Guajacol lagen bei pH 4,9 für ZmPrx70_{rec} und pH 5,8 für HRP (siehe Abb. 67). Ein Optimum um pH 6 für HRP deckt sich mit den Literaturwerten (Miller *et al.*, 1995; Savenkova *et al.*, 1996). Das beobachtete Optimum für ZmPrx70_{rec} entspricht dem nativen Protein (pH 5-6, Mika *et al.* (2008)) und liegt in einem Bereich, der dem pH-Wert im Apoplasten entspricht. Auch andere apoplastische Peroxidasen weisen pH-Optima in diesem Bereich auf (Hendriks *et al.*, 1991; Nair und Showalter, 1996). Verschiedene pH-Optima könnten einen Wechsel von einem Isoenzym zum anderen bewirken (Marco *et al.*, 1995).

Aktivitätsfärbungen mit den Substraten DAB, TMB und Guajacol ergaben eine Größe um 40 kDa des nativen rekombinanten Proteins, das berechnete Molekulargewicht von ZmPrx70_{rec} liegt mit rund 35 kDa etwas unter diesem Bereich und dürfte den angefügten Zuckerresten anzurechnen sein. Native Zmprx70 besitzt in der modifizierten SDS-PAGE eine Größe von 55 kDa (siehe Tab. 21). Die Menge an angefügten Zuckerresten variiert, bei rekombinanter HRP liegt das native Molekulargewicht bei etwa 66-100 kDa und das des deglykosylierten Proteins bei 34,5 kDa (Morawski *et al.*, 2000).

Einzelne Isoenzyme der Klasse III Peroxidasen sind durch ihr breites Spektrum an oxidierbaren Substraten und das Vorkommen eines peroxidativen und hydroxidativen Zyklus kaum definierten Funktionen zuzuordnen. Redoxmediatoren erschweren durch eine

Erweiterung der möglichen Substrate die Zuordnung einer spezifischen Funktion weiter. Durch Studien, die eine differenzielle Regulierung zahlreicher Gene unter verschiedenen Stressfaktoren zeigen, lassen sich co-regulierte Gene finden und mögliche Modelle entwickeln. Das Zusammenspiel einzelner Proteine ist bis heute zumeist nur lückenhaft verstanden. Bestandteile von Membranredoxsystemen wurden in Mikrodomänen gefunden, sowie die Beteiligung an Protein-Protein-Interaktionen nachgewiesen (Lüthje *et al.*, 2013). Auch hier wird die Detektion bestimmter Proteine in der PM im Zusammenhang mit der Kontamination mit löslichen Proteinen und Proteinen anderer Zellkompartimente diskutiert. Kandidaten für die Bildung von Funktionseinheiten mit Klasse III Peroxidasen sind Proteine aus den Familien der DOMON-Domänen Superfamilie (AIR12), Cytochrome b_{561} Familie (Cyt b_{561}), Chinon-Reduktasen (NQR, FQR1, WrbA), *Respiratory burst oxidase homologs* (Rbohs) und die Monodehydroascorbatreduktase (MDHAR). Es wird postuliert, dass ein Zusammenspiel dieser Proteine ein Transport von Elektronen über die PM von einem cytosolischen Elektronendonator (NAD(P)H oder Ascorbat) zu einem extrazellulären oder intrazellulären Elektronenakzeptor (zum Beispiel Eisen oder Sauerstoff) sowie der Stimulierung der PM- H^+ -ATPase führt (Lüthje *et al.*, 2013). Viele dieser Enzyme können den Redoxstatus von Ascorbat, sowohl auf der cytosolischen, als auch auf der apoplastischen Seite kontrollieren. Über Ascorbat ist eine Modellierung von Peroxidasen (Francoz *et al.*, 2015) und anderen Radikalproduzierenden Enzymen möglich. Dabei kommt es nicht zu einer direkten Wechselwirkung mit den entsprechenden Enzymen, entstehende Radikale können jedoch durch Ascorbat abgefangen werden (Córdoba-Pedregosa *et al.*, 2003; Córdoba-Pedregosa *et al.*, 2005). Zahlreiche Vorgänge können durch den Redoxstatus von Ascorbat im Apoplasten kontrolliert und feinreguliert werden. Wichtige Enzyme in diesem Zusammenspiel sind Ascorbatoxidase (AO), Superoxiddismutase (SOD), Monodehydroascorbatreduktase (MDHAR) im Apoplasten sowie Dihydroascorbatreduktase (DHAR), die Ascorbatperoxidase (APX) und Gluthationreduktase (GR) im Cytosol. Der zur Regeneration benötigte Transport von Dihydroascorbat ins Cytosol erfolgt über einem DHA-Transporter, welcher auch Ascorbat in den Apoplasten transportiert (Pignocchi und Foyer, 2003). Die genaue Zusammensetzung zur Vermittlung spezifischer Funktionen ist noch nicht im Detail aufgeklärt. Dennoch gibt es Beispiele, in denen sich ein Zusammenspiel einiger dieser Elemente nachweisen ließ.

4. Diskussion

Ein Beispiel für die gerichtete Bündelung verschiedener katalytischer Vorgänge und der daraus resultierenden lokal begrenzten Aktivität verschiedener Enzymklassen zeigte Lee et al. (2013). Beim Aufbau des Casparischen Streifens kommt es zu einer Wechselwirkung einer NADPH Oxidase (RBOHF), eines *Casparian Strip Domain Proteins* (CASP1) und einer Klasse III Peroxidase (AtPER64) in Arabidopsis. In diesem Modell werden von RBOHF produzierte Superoxidanionradikale nach Umsatz zu Wasserstoffperoxid von der Peroxidase AtPER64 für die Polymerisation von Monolignolen zu Lignin genutzt, was zum Aufbau des Casparischen Streifens führt. Interessanterweise führt eine Wechselwirkung von AtPER64 und CASP1 zu einer präzisen Lokalisierung dieser Peroxidase in die Region des Casparischen Streifens (Lee et al., 2013). Eine solche Gruppierung von Proteinen führt zu einer effektiven Zusammenarbeit in Multienzymkomplexen, welche dann bestimmte Aufgaben erfüllen können. Neben Komplexen für den Umsatz verschiedener Substrate an definierten Stellen der Membran sind solche Proteingruppierungen auch im Falle von Signaltransduktionsketten denkbar. Die Bildung von Proteinkomplexen zu Funktionseinheiten wird in Mikrodomänen oder *Lipid rafts* vermutet und im Zusammenhang mit der Ausübung verschiedener Funktionen diskutiert (Mongrand et al., 2004; Borner et al., 2005; Grennan, 2007; Lüthje et al., 2011; Lüthje et al., 2013; Hemsley, 2015).

4.4. Fazit und Ausblick

Die erhaltenen Ergebnisse vervollständigen das Bild zur Lokalisation von ZmPrx01, ZmPrx66 und ZmPrx70. Für ZmPrx70 konnten kinetische Konstanten und Stabilitäten sowie die pH Abhängigkeit auf Basis des rekombinanten Proteins im Vergleich zu HRP bestimmt werden. Die Verwendung von Fusionsproteinen und der Immunogold-Detektion ermöglichte die Verfolgung der Peroxidasen durch den sekretorischen Weg zum Zielkompartiment, offenbarten jedoch auch die Schwächen dieser Systeme im Zusammenhang mit Membranproteinen und deren Lokalisation in sauren Zellkompartimenten. Mögliche Regulationsmechanismen erschweren die Beurteilung der Ergebnisse weiter. Die Lokalisation der Peroxidasen in der PM konnte mit diesen Methoden nicht eindeutig gezeigt werden, es ergibt sich in stabil transformierten Pflanzen ein deutliches Signal im Apoplasten der Zellen. Die Lokalisierung dort kann ein Hinweis auf mögliche Funktionen der Proteine sein, wobei jedoch zu vermuten ist, dass auch im Apoplasten/PM die Anzahl an Isoenzymen sehr hoch ist (Lüthje et al., 2011).

Die rekombinante Erzeugung von ZmPrx01, ZmPrx 66 und ZmPrx 70 in *Pichia pastoris* erwies sich ebenfalls als problematisch und lieferte nur im Fall von ZmPrx70 ausreichende Mengen für eine biochemische Charakterisierung des Proteins. Die gewonnenen Ergebnisse konnten die Messungen am nativen Protein weitestgehend bestätigen, im Detail ergaben sich jedoch Unterschiede, welche teilweise auf Modifikationen des Proteins durch die Expression im *Pichia* System und die notwendige Addition von Detergenzien in Aktivitätsmessungen zurückzuführen sind.

Eine Einordnung der Peroxidasen in bestehende Regulationssysteme anhand der erhaltenen Daten bleibt indes schwierig. Klasse III Peroxidasen besitzen durch ihren Aufbau eine große Bandbreite an Substraten, die Untersuchung der Substratspezifität grenzt diese nur geringfügig ein. Kommt es zu sterischen Behinderungen beim Umsatz eines Substrates, kann *in vivo* ein Mediator die fragliche Reaktion dennoch vermitteln. Gerade im Zusammenhang mit der Modifikation der Zellwand, also der Oxidation von Ligninvorstufen und Zerstörung der Quervernetzung können solche Mediatoren eine Rolle spielen. Derartige Funktionen machen die Charakterisierung einzelner Isoenzyme schwierig, eröffnen jedoch auch die Möglichkeit einer Feinregulation der genannten Prozesse. Das Zusammenspiel vieler, sich nur minimal unterscheidender Isoenzyme macht eine spezifische Regulation noch wahrscheinlicher, erschwert die Situation jedoch weiter. Studien mit einer Überexpression von *zmprx01*, *zmprx66* und *zmprx70* könnten in diesem Zusammenhang weitere Erkenntnisse liefern, konnten jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht abgeschlossen werden. Auch die Analyse der Überexpression oder dem Ausschalten einzelner Peroxidasegene ist durch ein möglicherweise redundantes System schwierig. Die Erkenntnisse aus solchen Experimenten sind häufig nicht eindeutig (Cosio und Dunand, 2009), können ein fragliches System jedoch auch aufklären (Lee *et al.*, 2013).

Bei der Betrachtung der Funktionen und Organisation von Klasse III Peroxidasen ist eine Gruppierung dieser mit anderen Proteinen in Funktionseinheiten sinnvoll und wahrscheinlich. Über solche Einheiten könnten spezifische Aufgaben an der Membran vermittelt werden, so die reine Signalperzeption auf Basis von Wasserstoffperoxid oder die Modifikation der Zellwand im Fall eines Pathogenangriffs (Cosio und Dunand, 2009; Francoz *et al.*, 2015). Untersuchungen an nativen Proteinen (Mika *et al.*, 2010) und *in silico* Promotoranalysen zeigen eine Beteiligung bzw. geben Hinweise der Beteiligung an Stress- und Elicitor-vermittelten Reaktionen (Herrero *et al.*, 2014). Das Auftreten aller drei

4. Diskussion

untersuchten Peroxidasen in jungen Wurzeln lässt zudem eine Beteiligung an Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen vermuten. QTL-Daten und Vergleiche mit anderen paralogen und orthologen Peroxidasen lassen eine Beteiligung in Lignifizierungsprozessen vermuten (De Obeso *et al.*, 2003). Diese finden sich sowohl in der Differenzierung als auch in der Pathogenabwehr. Die gefundenen biochemischen Eigenschaften unterstützen die Lokalisation von ZmPrx70 im Apoplasten.

Die Analyse der erzeugten Überexpressionslinien könnte weitere Erkenntnisse über die Prozesse liefern, an denen ZmPrx01, ZmPrx66 und ZmPrx70 beteiligt sind.

Die erhaltenen Ergebnisse der rekombinanten Expression von ZmPrx70 sollten durch weitere Analysen des Proteins wie Redox titrationen und die Aufzeichnung von Häm-Spektren ergänzt werden. Die Bestimmung katalytischer Konstanten weiterer Substrate würde das erhaltene Bild vervollständigen. Für eine erhöhte Ausbeute könnte im Fall von ZmPrx70 eine Expression des Proteins in Fermenterkulturen sowie eine weitere Anpassung des Reinigungsprotokolls sorgen. Die Expression von ZmPrx01 und ZmPrx66 lieferte deutlich zu niedrige Ausbeuten, verbunden mit einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber Proteasen. Beide Gene sollten codonoptimiert werden und das Expressionssystem einer Anpassung erfahren. Auch die Expression in proteasedefizienten *P. pastoris* Stämmen (SMD1168) ist möglich.

5. Literaturverzeichnis

- Agostini E, Coniglio MS, Milrad SR, Tigier HA, Giulietti AM** (2003) Phytoremediation of 2,4-dichlorophenol by *Brassica napus* hairy root cultures. *Biotechnology and Applied Biochemistry* **37**: 139–144
- Ahammad AS** (2013) Hydrogen peroxide biosensors based on horseradish peroxidase and hemoglobin. *Journal of Biosensors & Bioelectronics*: 1–11
- Armstrong CL, Green CE, Phillips RL** (1991) Development and availability of germplasm with high Type II culture formation response. *Maize Genetics Cooperation Newsletter* **65**: 92–93
- Arnhold J, Monzani E, Furtmüller PG, Zederbauer M, Casella L, Obinger C** (2006) Kinetics and thermodynamics of halide and nitrite oxidation by mammalian heme peroxidases. *European Journal of Inorganic Chemistry* **2006**: 3801–3811
- Asard H, Bézi A** (2003) Soluble proteins, an often overlooked contaminant in plasma membrane preparations. *Trends in Plant Science* **8**: 250–251
- Askerlund P, Larsson C, Widell S, Moller IM** (1987) NAD(P)H oxidase and peroxidase activities in purified plasma membranes from cauliflower inflorescences. *Physiologia Plantarum* **71**: 9–19
- Ator MA, David SK, Montellano PR Ortiz de** (1987) Structure and catalytic mechanism of horseradish peroxidase. Regiospecific meso alkylation of the prosthetic heme group by alkylhydrazines. *Journal of Biological Chemistry* **262**: 14954–14960
- Ator MA, Montellano PR Ortiz de** (1987) Protein control of prosthetic heme reactivity. Reaction of substrates with the heme edge of horseradish peroxidase. *Journal of Biological Chemistry* **262**: 1542–1551
- Auer M, Gruber C, Bellei M, Pirker KF, Zamocky M, Kroiss D, Teufer SA, Hofbauer S, Soudi M, Battistuzzi G, et al.** (2013) A stable bacterial peroxidase with novel halogenating activity and an autocatalytically linked heme prosthetic group. *Journal of Biological Chemistry* **288**: 27181–27199
- Ayala M** (2010) Redox potential of peroxidases. In E Torres, M Ayala, eds, *Biocatalysis based on heme peroxidases*, 1st ed. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 61–77
- Ayala M, Roman R, Vazquez-Duhalt R** (2007) A catalytic approach to estimate the redox potential of heme-peroxidases. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **357**: 804–808
- Baek HK, Van Wart HE** (1989) Elementary steps in the formation of horseradish peroxidase compound I: direct observation of compound O, a new intermediate with a hyperporphyrin spectrum. *Biochemistry* **28**: 5714–5719

- Baker SS, Wilhelm KS, Thomashow MF** (1994) The 5'-region of *Arabidopsis thaliana* cor15a has cis-acting elements that confer cold-, drought- and ABA-regulated gene expression. *Plant Molecular Biology* **24**: 701–713
- Baneyx F** (1999) Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology* **10**: 411–421
- Baulcombe D** (2005) RNA silencing. *Trends in Biochemical Sciences* **30**: 290–293
- Bednarek SY, Wilkins TA, Dombrowski JE, Raikhel NV** (1990) A carboxyl-terminal propeptide is necessary for proper sorting of barley lectin to vacuoles of tobacco. *The Plant Cell* **2**: 1145–1155
- Berglund GI, Carlsson GH, Smith AT, Szöke H, Henriksen A, Hajdu J** (2002) The catalytic pathway of horseradish peroxidase at high resolution. *Nature* **417**: 463–468
- Bisswanger H** (2014) Enzyme assays. *Perspectives in Science* **1**: 41–55
- Blodig W, Smith AT, Doyle WA, Piontek K** (2001) Crystal structures of pristine and oxidatively processed lignin peroxidase expressed in *Escherichia coli* and of the W171F variant that eliminates the redox active tryptophan 171. Implications for the reaction mechanism. *Journal of Molecular Biology* **305**: 851–861
- Boevink P, Martin B, Oparka K, Cruz SS, Hawes C** (1999) Transport of virally expressed green fluorescent protein through the secretory pathway in tobacco leaves is inhibited by cold shock and brefeldin A. *Planta* **208**: 392–400
- Boevink P, Oparka K, Cruz SS, Martin B, Betteridge A, Hawes C** (1998) Stacks on tracks: The plant Golgi apparatus traffics on an actin/ER network. *Plant Journal* **15**: 441–447
- Bolwell GP, Bindschedler LV, Blee K a, Butt VS, Davies DR, Gardner SL, Gerrish C, Minibayeva F** (2002) The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. *Journal of Experimental Botany* **53**: 1367–1376
- Bonifacino JS, Glick BS** (2004) The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell* **116**: 153–166
- Borner GHH, Sherrier DJ, Weimar T, Michaelson LV, Hawkins ND, Macaskill A, Napier J a, Beale MH, Lilley KS, Dupree P** (2005) Analysis of detergent-resistant membranes in *Arabidopsis*. Evidence for plasma membrane lipid rafts. *Plant Physiology* **137**: 104–116
- Bourbonnais R, Leech D, Paice MG** (1998) Electrochemical analysis of the interactions of laccase mediators with lignin model compounds. *Biochimica et Biophysica Acta* **1379**: 381–390
- Bretthauer RK, Castellino FJ** (1999) Glycosylation of *Pichia pastoris*-derived proteins. *Biotechnology and Applied Biochemistry* **30 (Pt 3)**: 193–200

- Bullock WO, Fernandez JM, Short JM** (1987) XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques* **5**: 376–379
- Burke JF, Smith A, Santama N, Bray RC, Thorneley RN, Dacey S, Griffiths J, Catlin G, Edwards M** (1989) Expression of recombinant horseradish peroxidase C in *Escherichia coli*. *Biochemical Society Transactions* **17**: 1077–1078
- Campbell T, Choy F** (2001) The effect of pH on green fluorescent protein: A brief review. *Molecular Biology Today* **2**: 1–4
- Carter C, Pan S, Zouhar J, Avila EL, Girke T, Raikhel NV** (2004) The vegetative vacuole proteome of *Arabidopsis thaliana* reveals predicted and unexpected proteins. *The Plant Cell* **16**: 3285–3303
- Casella L, Monzani E, Nicolis S** (2010) Potential applications of peroxidases in the fine chemical industries. In E Torres, M Ayala, eds, *Biocatalysis based on heme peroxidases: Peroxidases as potential industrial biocatalysts*, 1st ed. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 1–358
- Caza N, Bewtra JK, Biswas N, Taylor KE** (1999) Removal of phenolic compounds from synthetic wastewater using soybean peroxidase. *Water Research* **33**: 3012–3018
- Çelik E, Çalik P, Oliver SG** (2009) Fed-batch methanol feeding strategy for recombinant protein production by *Pichia pastoris* in the presence of co-substrate sorbitol. *Yeast* **26**: 473–484
- Cereghino JL, Cregg JM** (2000) Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews* **24**: 45–66
- Chattopadhyay S, Puente P, Deng XW, Wei N** (1998) Combinatorial interaction of light-responsive elements plays a critical role in determining the response characteristics of light-regulated promoters in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **15**: 69–77
- Cheng F, Williamson JD** (2010) Is there leaderless protein secretion in plants? *Plant Signaling & Behavior* **5**: 129–131
- Cheng FY, Zamski E, Guo WW, Pharr DM, Williamson JD** (2009) Salicylic acid stimulates secretion of the normally symplastic enzyme mannitol dehydrogenase: A possible defense against mannitol-secreting fungal pathogens. *Planta* **230**: 1093–1103
- Chilton MD, Currier TC, Farrand SK, Bendich AJ, Gordon MP, Nester EW** (1974) *Agrobacterium tumefaciens* DNA and PS8 bacteriophage DNA not detected in crown gall tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **71**: 3672–3676
- Cho U-H, Park J-O** (2000) Mercury-induced oxidative stress in tomato seedlings. *Plant Science* **156**: 1–9

- Choi Y** (2012) A fast computation of pairwise sequence alignment scores between a protein and a set of single-locus variants of another protein. *Proceedings of the ACM Conference on Bioinformatics, Computational Biology and Biomedicine - BCB '12* 414–417
- Choi Y, Chan AP** (2015) PROVEAN web server: a tool to predict the functional effect of amino acid substitutions and indels. *Bioinformatics* **31**: 2745–2747
- Choi Y, Sims GE, Murphy S, Miller JR, Chan AP** (2012) Predicting the functional effect of amino acid substitutions and indels. *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0046688
- Christensen AH, Sharrock RA, Quail PH** (1992) Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. *Plant Molecular Biology* **18**: 675–689
- Chu CC, Want CC, Sun CS, Hsu C, Yin KC, Chu CY, Bi FY** (1975) Establishment of an efficient medium for anther culture of rice, through comparative experiments on the nitrogen sources. *Science China Mathematics* **18**: 659–668
- Chua CEL, Lim YS, Lee MG, Tang BL** (2012) Non-classical membrane trafficking processes galore. *Journal of Cellular Physiology* **227**: 3722–3730
- Córdoba-Pedregosa MDC, Córdoba F, Villalba JM, González-Reyes JA** (2003) Zonal changes in ascorbate and hydrogen peroxide contents, peroxidase, and ascorbate-related enzyme activities in onion roots. *Plant Physiology* **131**: 697–706
- Córdoba-Pedregosa MDC, Villalba JM, Córdoba F, González-Reyes JA** (2005) Changes in intracellular and apoplastic peroxidase activity, ascorbate redox status, and root elongation induced by enhanced ascorbate content in *Allium cepa* L. *Journal of Experimental Botany* **56**: 685–694
- Cosio C, Dunand C** (2009) Specific functions of individual class III peroxidase genes. *Journal of Experimental Botany* **60**: 391–408
- Costa MMR, Hilliou F, Duarte P, Pereira LG, Almeida I, Leech M, Memelink J, Barceló AR, Sottomayor M** (2008) Molecular cloning and characterization of a vacuolar class III peroxidase involved in the metabolism of anticancer alkaloids in *Catharanthus roseus*. *Plant Physiology* **146**: 403–417
- Couderc R, Baratti J** (1980) Oxidation of methanol by the yeast, *Pichia pastoris*. Purification and properties of the alcohol oxidase. *Agricultural and Biological Chemistry* **44**: 2279–2289
- Cregg JM** (2007) DNA-mediated transformation. In JM Cregg, ed, *Pichia Protocols*, 2nd ed. Humana Press, pp 27–42
- Cregg JM, Madden KR, Barringer KJ, Thill GP, Stillman C a** (1989) Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Molecular and Cellular Biology* **9**: 1316–1323

- Cregg JM, Tolstorukov I, Kusari A, Sunga J, Madden K, Chappell T** (2009) Expression in the yeast *Pichia pastoris*, 1st ed. *Methods in Enzymology* **463**: 169–189
- Crevecoeur M, Pinedo M, Greppin H, Penel C** (1997) Peroxidase activity in shoot apical meristem from *Spinacia*. *Acta Histochemica* **99**: 177–186
- Cusanovich M a., Hazzard JT, Meyer TE, Tollin G** (1989) Electron transfer mechanisms in heme proteins. *Journal of Macromolecular Science: Part A - Chemistry* **26**: 433–443
- Czarnecka E, Gurley WB, Nagao RT, Mosquera LA, Key JL** (1985) DNA sequence and transcript mapping of a soybean gene encoding a small heat shock protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **82**: 3726–3730
- Daly R, Hearn MTW** (2005) Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: A useful experimental tool in protein engineering and production. *Journal of Molecular Recognition* **18**: 119–138
- Depillis GD, Sishta BP, Mauk AG, Demontellano PR** (1991) Small substrates and cytochrome-c are oxidized at different sites of cytochrome-c peroxidase. *The Journal of Biological Chemistry* **266**: 19334–19341
- Dolphin D, Forman A, Borg DC, Fajer J, Felton RH** (1971) Compounds I of catalase and horse radish peroxidase: pi-cation radicals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **68**: 614–618
- Du H, Feng B, Yang S, Huang Y, Tang Y** (2012) The R2R3-MYB transcription factor gene family in maize. *PLoS ONE* **7**: e37463
- Dunford HB** (2010) Horseradish peroxidase: Structure and kinetic properties, *In* J Everse, KE Everse, MB Grisham, eds, *Peroxidases in chemistry und biology Volume II*, 1st ed., CRC Press, Boca Renton, pp 1-24
- Dunford HB, Hewson WD** (1977) Effect of mixed solvents on the formation of horseradish peroxidase compound I. The importance of diffusion-controlled reactions. *Biochemistry* **16**: 2949–2957
- Duroux L, Welinder KG** (2003) The peroxidase gene family in plants: a phylogenetic overview. *Journal of Molecular Evolution* **57**: 397–407
- Erickson AM, Nevarea Z, Gipp JJ, Timothy Mulcahy R** (2002) Identification of a variant antioxidant response element in the promoter of the human glutamate-cysteine ligase modifier subunit gene: Revision of the are consensus sequence. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 30730–30737
- Erman JE, Vitello LB** (2002) Yeast cytochrome c peroxidase: mechanistic studies via protein engineering. *Biochimica et Biophysica Acta* **1597**: 193–220

- Erman JE, Vitello LB, Miller MA, Shaw A, Brown KA, Kraut J** (1993) Histidine 52 is a critical residue for rapid formation of cytochrome c peroxidase compound I. *Biochemistry* **32**: 9798–9806
- Evan GI, Lewis GK, Ramsay G, Bishop JM** (1985) Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product. *Molecular and Cellular Biology* **5**: 3610–3616
- Felle H** (1998) The apoplastic pH of the *Zea mays* root cortex as measured with pH-sensitive microelectrodes: aspects of regulation. *Journal of Experimental Botany* **49**: 987–995
- Ferrari RP, Laurenti E, Trotta F** (1999) Oxidative 4-dechlorination of 2,4,6-trichlorophenol catalyzed by horseradish peroxidase. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **4**: 232–237
- Finzel BC, Poulos TL, Kraut J** (1984) Crystal structure of yeast cytochrome c peroxidase refined at 1.7-Å resolution. *The Journal of biological chemistry* **259**: 13027–13036
- Floudas D, Binder M, Riley R, Barry K, Blanchette RA, Henrissat B, Martinez AT, Otilar R, Spatafora JW, Yadav JS, et al.** (2012) The paleozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes. *Science* **336**: 1715–1719
- Francoz E, Ranocha P, Nguyen-Kim H, Jamet E, Burlat V, Dunand C** (2015) Roles of cell wall peroxidases in plant development. *Phytochemistry* **112**: 15–21
- Fukuda Y, Shinshi H** (1994) Characterization of a novel *cis*-acting element that is responsive to a fungal elicitor in the promoter of a tobacco class I chitinase gene. *Plant Molecular Biology* **24**: 485–493
- Furtmüller PG, Zederbauer M, Jantschko W, Helm J, Bogner M, Jakopitsch C, Obinger C** (2006) Active site structure and catalytic mechanisms of human peroxidases. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **445**: 199–213
- Gajhede M, Schuller DJ, Henriksen A, Smith AT, Poulos TL** (1997) Crystal structure of horseradish peroxidase C at 2.15 Å resolution. *Nature Structural Biology* **4**: 1032–1038
- Ganal MW, Durstewitz G, Polley A, Bérard A, Buckler ES, Charcosset A, Clarke JD, Graner EM, Hansen M, Joets J, et al.** (2011) A large maize (*Zea mays* L.) SNP genotyping array: Development and germplasm genotyping, and genetic mapping to compare with the B73 reference genome. *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0028334
- Geebelen W, Vangronsveld J, Adriano DC, Van Poucke LC, Clijsters H** (2002) Effects of Pb-EDTA and EDTA on oxidative stress reactions and mineral uptake in *Phaseolus vulgaris*. *Physiologia Plantarum* **115**: 377–384
- Gilabert MA, Hiner AN, García-Ruiz PA, Tudela J, García-Molina F, Acosta M, García-Cánovas F, Rodríguez-López JN** (2004) Differential substrate behaviour of phenol and aniline derivatives during oxidation by horseradish peroxidase: kinetic evidence for a

- two-step mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* **1699**: 235–243
- Goblirsch B, Kurker RC, Streit BR, Wilmot CM, Dubois JL** (2011) Chlorite dismutases, DyPs, and EfeB: 3 microbial heme enzyme families comprise the CDE structural superfamily. *Journal of Molecular Biology* **408**: 379–398
- Gomord V, Wee E, Faye L** (1999) Protein retention and localization in the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus. *Biochimie* **81**: 607–618
- Goodwin DC, Grover TA, Aust SD** (1997) Roles of efficient substrates in enhancement of peroxidase-catalyzed oxidations. *Biochemistry* **36**: 139–147
- Gore MA, Chia J-M, Elshire RJ, Sun Q, Ersoz ES, Hurwitz BL, Peiffer JA, McMullen MD, Grills GS, Ross-Ibarra J, et al.** (2009) A first-generation haplotype map of maize. *Science* **326**: 1115–1117
- Green CE, Phillips RL** (1975) Plant regeneration from tissue cultures of maize. *Crop Science* **15**: 417
- Grennan AK** (2007) Lipid rafts in plants. *Plant Physiology* **143**: 1083–1085
- Grignon C, Sentenac H** (1991) pH and ionic conditions in the apoplast. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **42**: 103–128
- Gu C, Zheng F, Long L, Wang J, Ding S** (2014) Engineering the expression and characterization of two novel laccase isoenzymes from *Coprinus comatus* in *Pichia pastoris* by fusing an additional ten amino acids tag at N-terminus. *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0093912
- Guengerich FP, Martin MV, Guo Z, Chun YJ** (1996) Purification of functional recombinant P450s from bacteria. *Methods in Enzymology* **272**: 35–44
- Guillet-Claude C, Birolleau-Touchard C, Manicacci D, Rogowsky PM, Rigau J, Murigneux A, Martinant J-P, Barrière Y** (2004) Nucleotide diversity of the *zmPox3* maize peroxidase gene: relationships between a MITE insertion in exon 2 and variation in forage maize digestibility. *BMC Genetics* **5**: 19
- Gustafsson C, Govindarajan S, Minshull J** (2004) Codon bias and heterologous protein expression. *Trends in Biotechnology* **22**: 346–353
- Ha SH, Park JJ, Kim JW, Jeong JW, Noh KS, Jeon YJ, Kim HS, Kim HB** (2001) Molecular cloning and high-level expression of G2 protein of hantaan (HTN) virus 76-118 strain in the yeast *Pichia pastoris* KM71. *Virus Genes* **22**: 167–173
- Harris DL, Loew GH** (1996) Identification of putative peroxide intermediates of peroxidases by electronic structure and spectra calculations. *Journal of the American Chemical Society* **118**: 10588–10594

- Hartmann C, Montellano PR Ortiz de** (1992) Baculovirus expression and characterization of catalytically active horseradish peroxidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **297**: 61–72
- Haschke RH, Friedhoff JM** (1978) Calcium-related properties of horseradish peroxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **80**: 1039–1042
- He ZH, Cheeseman I, He D, Kohorn BD** (1999) A cluster of five cell wall-associated receptor kinase genes, *Wak1-5*, are expressed in specific organs of *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* **39**: 1189–1196
- Hedfalk K** (2013) Further advances in the production of membrane proteins in *Pichia pastoris*. *Bioengineered* **4**: 1–5
- Hedfalk K, Pettersson N, Öberg F, Hohmann S, Gordon E** (2008) Production, characterization and crystallization of the *Plasmodium falciparum* aquaporin. *Protein Expression and Purification* **59**: 69–78
- Helmick R a., Fletcher AE, Gardner AM, Gessner CR, Hvitved AN, Gustin MC, Gardner PR** (2005) Imidazole antibiotics inhibit the nitric oxide dioxygenase function of microbial flavohemoglobin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **49**: 1837–1843
- Hemsley PA** (2015) The importance of lipid modified proteins in plants. *The New Phytologist* **205**: 476–89
- Hendriks T, Wijsman HJ, Loon LC van** (1991) Petunia peroxidase a: isolation, purification and characteristics. *European Journal of Biochemistry* **199**: 139–146
- Henriksen A, Smith AT, Gajhede M** (1999) The structures of the horseradish peroxidase C-ferulic acid complex and the ternary complex with cyanide suggest how peroxidases oxidize small phenolic substrates. *Journal of Biological Chemistry* **274**: 35005–35011
- Herrero J, Esteban Carrasco A, Zapata JM** (2014) *Arabidopsis thaliana* peroxidases involved in lignin biosynthesis: *In silico* promoter analysis and hormonal regulation. *Plant Physiology and Biochemistry* **80**: 192–202
- Herrmann MM, Pinto S, Kluth J, Wienand U, Lorbiecke R** (2006) The PTI1-like kinase ZmPti1a from maize (*Zea mays* L.) co-localizes with callose at the plasma membrane of pollen and facilitates a competitive advantage to the male gametophyte. *BMC Plant Biology* **6**: 22
- Hersleth H-P, Ryde U, Rydberg P, Görbitz CH, Andersson KK** (2006) Structures of the high-valent metal-ion haem–oxygen intermediates in peroxidases, oxygenases and catalases. *Journal of Inorganic Biochemistry* **100**: 460–476
- Higgins DR, Busser K, Comiskey J, Whittier PS, Purcell TJ, Hoeffler JP** (1998) Small vectors for expression based on dominant drug resistance with direct multicopy selection. *In* JM Cregg, ed, *Pichia Protocols*, 1st ed. Humana Press, Totowa, NJ, pp 41–53

- Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M, Korenaga T** (1999) Plant *cis*-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. *Nucleic Acids Research* **27**: 297–300
- Hilaire E, Young S a, Willard LH, McGee JD, Sweat T, Chittoor JM, Guikema J a, Leach JE** (2001) Vascular defense responses in rice: peroxidase accumulation in xylem parenchyma cells and xylem wall thickening. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **14**: 1411–1419
- Hinman RL, Lang J** (1965) Peroxidase-catalyzed oxidation of indole-3-acetic acid. *Biochemistry* **4**: 144–158
- Hiraga S, Sasaki K, Ito H, Ohashi Y, Matsui H** (2001) A large family of class III plant peroxidases. *Plant Cell Physiology* **42**: 462–468
- Hodgson M, Jones P** (1989) Enhanced chemiluminescence in the peroxidase-luminol-H₂O₂ system: anomalous reactivity of enhancer phenols with enzyme intermediates. *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence* **3**: 21–25
- Höfgen R, Willmitzer L** (1988) Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. *Nucleic Acids Research* **16**: 9877
- Hofrichter M, Ullrich R** (2006) Heme-thiolate haloperoxidases: versatile biocatalysts with biotechnological and environmental significance. *Applied Microbiology and Biotechnology* **71**: 276–288
- Hofrichter M, Ullrich R** (2014) Oxidations catalyzed by fungal peroxygenases. *Current Opinion in Chemical Biology* **19**: 116–125
- Hofrichter M, Ullrich R, Pecyna MJ, Liers C, Lundell T** (2010) New and classic families of secreted fungal heme peroxidases. *Applied Microbiology and Biotechnology* **87**: 871–897
- Hohenblum H, Gasser B, Maurer M, Borth N, Mattanovich D** (2004) Effects of gene dosage, promoters, and substrates on unfolded protein stress of recombinant *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Bioengineering* **85**: 367–375
- Hopff D, Wienkoop S, Lühje S** (2013) The plasma membrane proteome of maize roots grown under low and high iron conditions. *Journal of Proteomics* **91**: 605–618
- Hu C, Smith R, Van Huystee R** (1989) Biosynthesis and localization of peanut peroxidases. a comparison of the cationic and the anionic isozymes. *Journal of Plant Physiology* **135**: 391–397
- Hu CF, Huystee RB van** (1989) Role of carbohydrate moieties in peanut (*Arachis hypogaea*) peroxidases. *The Biochemical journal* **263**: 129–135
- Hu T, Dryhurst G** (1997) Electrochemical and peroxidase O₂-mediated oxidation of indole-3-acetic acid at physiological pH. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **432**: 7–18

- Huang CJ, Damasceno LM, Anderson K a., Zhang S, Old LJ, Batt C a.** (2011) A proteomic analysis of the *Pichia pastoris* secretome in methanol-induced cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology* **90**: 235–247
- Huang L, Montellano PR Ortiz de** (2007) *Arthromyces ramosus* peroxidase produces two chlorinating species. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **355**: 581–586
- Huang L, Wojciechowski G, Montellano PR Ortiz de** (2005) Prosthetic heme modification during halide ion oxidation. demonstration of chloride oxidation by horseradish peroxidase. *Journal of the American Chemical Society* **127**: 5345–5353
- Van Huystee RB, Roig MG, Shnyrov VL, Sakharov IY** (2004) Peroxidase stability related to its calcium and glycans. *Phytochemistry Reviews* **3**: 19–28
- Igdoura SA, Herscovics A, Lal A, Moremen KW, Morales CR, Hermo L** (1999) Alpha-mannosidases involved in N-glycan processing show cell specificity and distinct subcompartmentalization within the Golgi apparatus of cells in the testis and epididymis. *European Journal of Cell Biology* **78**: 441–452
- Inoue H, Nojima H, Okayama H** (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**: 23–28
- Jansen M a, Noort RE van den, Tan MY, Prinsen E, Lagrimini LM, Thorneley RN** (2001) Phenol-oxidizing peroxidases contribute to the protection of plants from ultraviolet radiation stress. *Plant Physiology* **126**: 1012–1023
- Jayaraman K, Fingar S a, Shah J, Fyles J** (1991) Polymerase chain reaction-mediated gene synthesis: synthesis of a gene coding for isozyme c of horseradish peroxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**: 4084–4088
- Jones P, Dunford HB** (2005) The mechanism of Compound I formation revisited. *Journal of Inorganic Biochemistry* **99**: 2292–2298
- Jönsson LJ, Saloheimo M, Penttilä M** (1997) Laccase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*: cDNA cloning of lcc1 and expression in *Pichia pastoris*. *Current Genetics* **32**: 425–430
- Joo JH** (2001) Role of auxin-induced reactive oxygen species in root gravitropism. *Plant Physiology* **126**: 1055–1060
- Katam R, Basha SM, Suravajhala P, Pechan T** (2010) Analysis of peanut leaf proteome. *Journal of Proteome Research* **9**: 2236–2254
- Keilin D** (1966) *The history of cell respiration and cytochrome.*, 1st ed. Cambridge University Press 436
- Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJE** (2015) The Phyre2 web portal for protein modeling , prediction and analysis. *Nature Protocols* **10**: 845–858

- Kellner H, Luis P, Pecyna MJ, Barbi F, Kapturska D, Krüger D, Zak DR, Marmeisse R, Vandebol M, Hofrichter M** (2014) widespread occurrence of expressed fungal secretory peroxidases in forest soils. *PLoS ONE* **9**: e95557
- Khosla C, Curtis JE, DeModena J, Rinas U, Bailey JE** (1990) Expression of intracellular hemoglobin improves protein synthesis in oxygen-limited *Escherichia coli*. *Biotechnology* **8**: 849–853
- Kim BH, Kim SY, Nam KH** (2012) Genes encoding plant-specific class III peroxidases are responsible for increased cold tolerance of the brassinosteroid-insensitive 1 mutant. *Molecules and Cells* **34**: 539–548
- Kim J-M, Park S-M, Kim D-H** (2010) Heterologous expression of a tannic acid-inducible laccase3 of *Cryphonectria parasitica* in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Biotechnology* **10**: 18
- Kim YS, Wi SG, Grünwald C, Schmitt U** (2002) Immuno electron microscopic localization of peroxidases in the differentiating xylem of *Populus* spp. *Holzforschung* **56**: 355–359
- Kimura M, Umemoto Y, Kawano T** (2014) Hydrogen peroxide-independent generation of superoxide by plant peroxidase: hypotheses and supportive data employing ferrous ion as a model stimulus. *Frontiers in Plant Science* **5**: 1–10
- Klumpp G, Furlan CM, Domingos M, Klumpp A** (2000) Response of stress indicators and growth parameters of *Tibouchina pulchra* Cogn. exposed to air and soil pollution near the industrial complex of Cubatao, *Brazilian Science of the Total Environment* **246**: 79–91
- Kneen M, Farinas J, Li Y, Verkman AS** (1998) Green fluorescent protein as a noninvasive intracellular pH indicator. *Biophysical Journal* **74**: 1591–1599
- Koganesawa N, Aizawa T, Masaki K, Matsuura A, Nimori T, Bando H, Kawano K, Nitta K** (2001) Construction of an expression system of insect lysozyme lacking thermal stability: the effect of selection of signal sequence on level of expression in the *Pichia pastoris* expression system. *Protein Engineering* **14**: 705–710
- Krainer FW, Glieder A** (2015) An updated view on horseradish peroxidases: recombinant production and biotechnological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* **99**: 1611–1625
- Krainer FW, Pletzenauer R, Rossetti L, Herwig C, Glieder A, Spadiut O** (2014) Purification and basic biochemical characterization of 19 recombinant plant peroxidase isoenzymes produced in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification* **95**: 104–112
- Kratochvil JF, Burris RH, Seikel MK, Harkin JM** (1971) Isolation and characterization of α -guaiacolic acid and the nature of guaiacum blue. *Phytochemistry* **10**: 2529–2531

- Krylov SN, Dunford HB** (1996) Evidence for a free radical chain mechanism in the reaction between peroxidase and indole-3-acetic acid at neutral pH. *Biophysical Chemistry* **58**: 325–334
- Kukavica BM, Veljovic-Jovanovic SD, Menckhoff L, Lühje S** (2012) Cell wall-bound cationic and anionic class III isoperoxidases of pea root: Biochemical characterization and function in root growth. *Journal of Experimental Botany* **63**: 4631–4645
- Laemmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680–685
- Lai J, Li R, Xu X, Jin W, Xu M, Zhao H, Xiang Z, Song W, Ying K, Zhang M, et al.** (2010) Genome-wide patterns of genetic variation among elite maize inbred lines. *Nature Genetics* **42**: 1027–1030
- Lariguet P, Ranocha P, Meyer M de, Barbier O, Penel C, Dunand C** (2013) Identification of a hydrogen peroxide signalling pathway in the control of light-dependent germination in *Arabidopsis*. *Planta* **238**: 381–395
- Lavid N, Schwartz A, Lewinsohn E, Tel-Or E** (2001a) Phenols and phenol oxidases are involved in cadmium accumulation in the water plants *Nymphoides peltata* (*Menyanthaceae*) and *Nymphaeae* (*Nymphaeaceae*). *Planta* **214**: 189–195
- Lavid N, Schwartz A, Yarden O, Tel-Or E** (2001b) The involvement of polyphenols and peroxidase activities in heavy-metal accumulation by epidermal glands of the waterlily (*Nymphaeaceae*). *Planta* **212**: 323–331
- Lee Y, Rubio MC, Alassimone J, Geldner N** (2013) A mechanism for localized lignin deposition in the endodermis. *Cell* **153**: 402–412
- Lennox ES** (1955) Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage P1. *Virology* **1**: 190–206
- Li P, Anumanthan A, Gao X-G, Ilangovan K, Suzara VV, Düzgüneş N, Renugopalakrishnan V** (2007) Expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **142**: 105–124
- Li Z, Xiong F, Lin Q, D'Anjou M, Daugulis AJ, Yang DSC, Hew CL** (2001) Low-temperature increases the yield of biologically active herring antifreeze protein in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification* **21**: 438–445
- Lichty JJ, Malecki JL, Agnew HD, Michelson-Horowitz DJ, Tan S** (2005) Comparison of affinity tags for protein purification. *Protein Expression and Purification* **41**: 98–105
- Lige B, Ma S, Huystee RB van** (2001) The effects of the site-directed removal of n-glycosylation from cationic peanut peroxidase on its function. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **386**: 17–24

- Lin CC, Kao CH** (2002) Osmotic stress-induced changes in cell wall peroxidase activity and hydrogen peroxide level in roots of rice seedlings. *Plant Growth Regulation* **37**: 177–183
- Lin W** (1982) Responses of corn root protoplasts to exogenous reduced nicotinamide adenine dinucleotide: Oxygen consumption, ion uptake, and membrane potential. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **79**: 3773–3776
- Lisenbee CS, Karnik SK, Trelease RN** (2003) Overexpression and mislocalization of a tail-anchored GFP redefines the identity of peroxisomal ER. *Traffic* **4**: 491–501
- Liszakay A, Kenk B, Schopfer P** (2003) Evidence for the involvement of cell wall peroxidase in the generation of hydroxyl radicals mediating extension growth. *Planta* **217**: 658–667
- Ljung K** (2013) Auxin metabolism and homeostasis during plant development. *Development* **140**: 943–950
- Lu M, Ying S, Zhang DF, Shi YS, Song YC, Wang TY, Li Y** (2012) A maize stress-responsive NAC transcription factor, ZmSNAC1, confers enhanced tolerance to dehydration in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Cell Reports* **31**: 1701–1711
- Ludwig-Müller J, Hilgenberg W** (1992) Tryptophan oxidizing enzyme and basic peroxidase isoenzymes in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.: Are they identical? *Plant Cell Physiology* **33**: 1115–1125
- Luna E, Pastor V, Robert J, Flors V, Mauch-Mani B, Ton J** (2011) Callose deposition: a multifaceted plant defense response. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **24**: 183–193
- Lüthje S, Meisrimler C, Hopff D, Schütze T, Köppe J, Heino K** (2014) Class III peroxidases. In J Jorriin-Novo, S Komatsu, W Weckwerth, S Wienkoop, eds, *Methods in Molecular Biology*. pp 687–706
- Lüthje S, Meisrimler CN, Hopff D, Möller B** (2011) Phylogeny, topology, structure and functions of membrane-bound class III peroxidases in vascular plants. *Phytochemistry* **72**: 1124–1135
- Lüthje S, Möller B, Perrineau FC, Wöltje K** (2013) Plasma membrane electron pathways and oxidative stress. *Antioxidants & Redox Signaling* **18**: 2163–83
- Macauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B, Harvey LM** (2005) Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast* **22**: 249–270
- Manford AG, Stefan CJ, Yuan HL, MacGurn J a., Emr SD** (2012) ER-to-plasma membrane tethering proteins regulate cell signaling and ER morphology. *Developmental Cell* **23**: 1129–1140

- Marco A de, Pinton R, Fischer-Schliebs E, Varanini Z** (1995) Possible interaction between peroxidase and NAD(P)H-dependent nitrate reductase activities of plasma membranes of corn roots. *Journal of Experimental Botany* **46**: 1677–1683
- Marmagne A, Ferro M, Meinnel T, Bruley C, Kuhn L, Garin J, Barbier-Brygoo H, Ephritikhine G** (2007) A high content in lipid-modified peripheral proteins and integral receptor kinases features in the arabidopsis plasma membrane proteome. *Molecular & Cellular Proteomics* **6**: 1980–1996
- Martinez C, Montillet JL, Bresson E, Agnel JP, Dai GH, Daniel JF, Geiger JP, Nicole M** (1998) Apoplastic peroxidase generates superoxide anions in cells of cotton cotyledons undergoing the hypersensitive reaction to *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* Race 18. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **11**: 1038–1047
- Marzouki SM, Limam F, Smaali MI, Ulber R, Marzouki MN** (2005) A new thermostable peroxidase from garlic *Alium sativum*: Purification, biochemical properties, immobilization, and use in H₂O₂ detection in milk. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **127**: 201–214
- Matsui T, Nakayama H, Yoshida K, Shinmyo A** (2003) Vesicular transport route of horseradish C1a peroxidase is regulated by N- and C-terminal propeptides in tobacco cells. *Applied Microbiology and Biotechnology* **62**: 517–522
- Matsui T, Tabayashi A, Iwano M, Shinmyo A, Kato K, Nakayama H** (2011) Activity of the C-terminal-dependent vacuolar sorting signal of horseradish peroxidase C1a is enhanced by its secondary structure. *Plant and Cell Physiology* **52**: 413–420
- Matsushima R, Kondo M, Nishimura M, Hara-Nishimura I** (2003) A novel ER-derived compartment, the ER body, selectively accumulates a β -glucosidase with an ER-retention signal in Arabidopsis. *Plant Journal* **33**: 493–502
- May SW** (1999) Applications of oxidoreductases. *Current Opinion in Biotechnology* **10**: 370–375
- McEldoon JP, Dordick JS** (1996) Unusual thermal stability of soybean peroxidase. *Biotechnology Progress* **12**: 555–558
- Meisrimler C-N, Planchon S, Renaut J, Sergeant K, Lüthje S** (2011) Alteration of plasma membrane-bound redox systems of iron deficient pea roots by chitosan. *Journal of Proteomics* **74**: 1437–1449
- Melchers LS, Selaburlage MB, Vloemans SA, Woloshuk CP, Vanroekel JSC, Pen J, Vandanelzen PJM, Cornelissen BJC** (1993) Extracellular targeting of the vacuolar tobacco proteins-ap24, chitinase and beta-1,3-glucanase in transgenic plants. *Plant Molecular Biology* **21**: 583–593
- Menckhoff L, Mielke-Ehret N, Buck F, Vuletic M, Lüthje S** (2013) Plasma membrane-associated malate dehydrogenase of maize (*Zea mays* L.) roots: Native versus recombinant protein. *Journal of Proteomics* **80**: 66–77

- Mika A, Boenisch MJ, Hopff D, Lühje S** (2010) Membrane-bound guaiacol peroxidases from maize (*Zea mays* L.) roots are regulated by methyl jasmonate, salicylic acid, and pathogen elicitors. *Journal of Experimental Botany* **61**: 831–841
- Mika A, Buck F, Lühje S** (2008) Membrane-bound class III peroxidases: Identification, biochemical properties and sequence analysis of isoenzymes purified from maize (*Zea mays* L.) roots. *Journal of Proteomics* **71**: 412–424
- Mika A, Lühje S** (2003) Properties of guaiacol peroxidase activities isolated from corn root plasma membranes. *Plant Physiology* **132**: 1489–1498
- Miki Y, Morales M, Ruiz-Dueñas FJ, Martínez MJ, Wariishi H, Martínez AT** (2009) *Escherichia coli* expression and in vitro activation of a unique ligninolytic peroxidase that has a catalytic tyrosine residue. *Protein Expression and Purification* **68**: 208–214
- Miller JH** (1972) Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- Miller VP, Goodin DB, Friedman AE, Hartmann C, Ortiz De Montellano PR** (1995) Horseradish peroxidase Phe172→Tyr mutant: Sequential formation of compound I with a porphyrin radical cation and a protein radical. *Journal of Biological Chemistry* **270**: 18413–18419
- Minibayeva F, Kolesnikov O, Chasov A, Beckett RP, Lühje S, Vylegzhaniina N, Buck F, Böttger M** (2009) Wound-induced apoplastic peroxidase activities: Their roles in the production and detoxification of reactive oxygen species. *Plant, Cell and Environment* **32**: 497–508
- Mongrand S, Morel J, Laroche J, Claverol S, Carde JP, Hartmann MA, Bonneau M, Simon-Plas F, Lessire R, Bessoule JJ** (2004) Lipid rafts in higher plant cells: Purification and characterization of triton X-100-insoluble microdomains from tobacco plasma membrane. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 36277–36286
- Montellano PR Ortiz de** (1992) Catalytic sites of hemoprotein peroxidases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **32**: 89–107
- Montellano PR Ortiz de, David SK, Ator M a, Tew D** (1988) Mechanism-based inactivation of horseradish peroxidase by sodium azide. Formation of meso-azidoporphyrin IX. *Biochemistry* **27**: 5470–5476
- Montellano PROD** (2010) Catalytic mechanisms of heme peroxidases. *In* E Torres, M Ayala, eds, *Biocatalysis based on heme peroxidases*, 1st ed. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 79–107
- Moraes RM, Klumpp A, Furlan CM, Klumpp G, Domingos M, Rinaldi MCS, Modesto IF** (2002) Tropical fruit trees as bioindicators of industrial air pollution in southeast Brazil. *Environment International* **28**: 367–374

- Morawski B, Lin Z, Cirino P, Joo H, Bandara G, Arnold FH** (2000) Functional expression of horseradish peroxidase in *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris*. *Protein Engineering* **13**: 377–384
- Morawski B, Quan S, Arnold FH** (2001) Functional expression and stabilization of horseradish peroxidase by directed evolution in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering* **76**: 99–107
- Morimoto A, Tanaka M, Takahashi S, Ishimori K, Hori H, Morishima I** (1998) Detection of a tryptophan radical as an intermediate species in the reaction of horseradish peroxidase mutant (Phe-221→Trp) and Hydrogen Peroxide. *Journal of Biological Chemistry* **273**: 14753–14760
- Mottley C, Robinson RE, Mason RP** (1991) Free radical formation in the oxidation of malondialdehyde and acetylacetone by peroxidase enzymes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **289**: 153–160
- Murugesan K** (2003) Bioremediation of paper and pulp mill effluents. *Indian Journal of Experimental Biology* **41**: 1239–1248
- Nagano S, Tanaka M, Ishimori K, Watanabe Y, Morishima I** (1996) Catalytic roles of the distal site asparagine-histidine couple in peroxidases. *Biochemistry* **35**: 14251–14258
- Nair AR, Showalter AM** (1996) Purification and characterization of a wound-inducible cell wall cationic peroxidase from carrot roots. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **226**: 254–260
- Nakashima K, Takasaki H, Mizoi J, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2012) NAC transcription factors in plant abiotic stress responses. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms* **1819**: 97–103
- Narendra S, Venkataramani S, Shen G, Wang J, Pasapula V, Lin Y, Korniyev D, Holaday AS, Zhang H** (2006) The Arabidopsis ascorbate peroxidase 3 is a peroxisomal membrane-bound antioxidant enzyme and is dispensable for Arabidopsis growth and development. *Journal of Experimental Botany* **57**: 3033–3042
- Natera SH a, Ford KL, Cassin AM, Patterson JH, Newbign EJ, Bacic A** (2008) Analysis of the *Oryza sativa* plasma membrane proteome using combined protein and peptide fractionation approaches in conjunction with mass spectrometry. *Journal of Proteome Research* **7**: 1159–1187
- Nelson BK, Cai X, Nebenführ A** (2007) A multicolored set of in vivo organelle markers for co-localization studies in Arabidopsis and other plants. *Plant Journal* **51**: 1126–1136
- Neuhaus JM, Sticher L, Meins F, Boller T** (1991) A short C-terminal sequence is necessary and sufficient for the targeting of chitinases to the plant vacuole. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**: 10362–10366

- Nicell J a., Bewtra JK, Biswas N, Taylor E** (1993) Reactor development for peroxidase catalyzed polymerization and precipitation of phenols from wastewater. *Water Research* **27**: 1629–1639
- Nickel W** (2010) Pathways of unconventional protein secretion. *Current Opinion in Biotechnology* **21**: 621–626
- Nickel W, Rabouille C** (2009) Mechanisms of regulated unconventional protein secretion. *Nature reviews Molecular Cell Biology* **10**: 148–155
- Nickel W, Seedorf M** (2008) Unconventional mechanisms of protein transport to the cell surface of eukaryotic cells. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **24**: 287–308
- Nilsson T, Pypaert M, Hoe MH, Slusarewicz P, Berger EG, Warren G** (1993) Overlapping distribution of two glycosyltransferases in the Golgi apparatus of HeLa cells. *Journal of Cell Biology* **120**: 5–13
- Nordén K, Agemark M, Danielson JÅH, Alexandersson E, Kjellbom P, Johanson U** (2011) Increasing gene dosage greatly enhances recombinant expression of aquaporins in *Pichia pastoris*. *BMC Biotechnology* **11**: 47
- Novick P, Field C, Schekman R** (1980) Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway. *Cell* **21**: 205–215
- Nozaki O, Kawamoto H** (2003) Reactivation of horseradish peroxidase with imidazole for continuous determination of hydrogen peroxide using a microflow injection-chemiluminescence detection system. *Luminescence* **18**: 203–206
- O'Brien J a., Daudi A, Butt VS, Bolwell GP** (2012) Reactive oxygen species and their role in plant defence and cell wall metabolism. *Planta* **236**: 765–779
- Oberg F, Sjöhamn J, Conner MT, Bill RM, Hedfalk K** (2011) Improving recombinant eukaryotic membrane protein yields in *Pichia pastoris*: The importance of codon optimization and clone selection. *Molecular membrane biology* **28**: 398–411
- De Obeso M, Caparrós-Ruiz D, Vignols F, Puigdomènech P, Rigau J** (2003) Characterisation of maize peroxidases having differential patterns of mRNA accumulation in relation to lignifying tissues. *Gene* **309**: 23–33
- Ooms G, Hooykaas PJJ, Van Veen RJM, Van Beelen P, Regensburg-Tuznk TJG, Schilperoort RA** (1982) Octopine ti-plasmid deletion mutants of *Agrobacterium tumefaciens* with emphasis on the right side of the T-region. *Plasmid* **7**: 15–29
- Pallotta M a., Graham RD, Langridge P, Sparrow DHB, Barker SJ** (2000) RFLP mapping of manganese efficiency in barley. *Theoretical and Applied Genetics* **101**: 1100–1108
- Palmieri MC, Sell S, Huang X, Scherf M, Werner T, Durner J, Lindermayr C** (2008) Nitric oxide-responsive genes and promoters in *Arabidopsis thaliana*: A bioinformatics approach. *Journal of Experimental Botany* **59**: 177–186

- Pantoja O, Willmer CM** (1988) Redox activity and peroxidase activity associated with the plasma membrane of guard-cell protoplasts. *Planta* **174**: 44–50
- Passardi F, Bakalovic N, Teixeira FK, Margis-Pinheiro M, Penel C, Dunand C** (2007) Prokaryotic origins of the non-animal peroxidase superfamily and organelle-mediated transmission to eukaryotes. *Genomics* **89**: 567–579
- Passardi F, Cosio C, Penel C, Dunand C** (2005) Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Reports* **24**: 255–265
- Passardi F, Longet D, Penel C, Dunand C** (2004) The class III peroxidase multigenic family in rice and its evolution in land plants. *Phytochemistry* **65**: 1879–1893
- Passardi F, Tognolli M, De Meyer M, Penel C, Dunand C** (2006) Two cell wall associated peroxidases from *Arabidopsis* influence root elongation. *Planta* **223**: 965–974
- Pastori GM, Foyer CH** (2002) Common components, networks, and pathways of cross-tolerance to stress. the central role of “redox” and abscisic acid-mediated controls. *Plant Physiology* **129**: 460–468
- Pearson RG** (1963) Hard and soft acids and bases. *Journal of the American Chemical Society* **85**: 3533–3539
- Pencik A, Simonovik B, Petersson SV, Henyková E, Simon S, Greenham K, Zhang Y, Kowalczyk M, Estelle M, Zazimalová E, et al.** (2013) Regulation of auxin homeostasis and gradients in *Arabidopsis* roots through the formation of the indole-3-acetic acid catabolite 2-oxindole-3-acetic acid. *The Plant Cell* **25**: 3858–70
- Peralta-Zamora P, Esposito E, Pelegrini R, Groto R, Reyes J, Durán N** (1998) Effluent treatment of pulp and paper, and textile industries using immobilised horseradish peroxidase. *Environmental Technology* **19**: 55–63
- Pérez-Boada M, Ruiz-Dueñas FJ, Pogni R, Basosi R, Choinowski T, Martínez MJ, Piontek K, Martínez AT** (2005) Versatile peroxidase oxidation of high redox potential aromatic compounds: Site-directed mutagenesis, spectroscopic and crystallographic investigation of three long-range electron transfer pathways. *Journal of Molecular Biology* **354**: 385–402
- Pignocchi C, Foyer CH** (2003) Apoplastic ascorbate metabolism and its role in the regulation of cell signalling. *Current Opinion in Plant Biology* **6**: 379–389
- Planche LA** (1810) Note sur la sophistication de la résine de jalap et sur les moyens de la reconnaître. *Bulletin de Pharmacie*. pp 578–580
- Plieth C, Vollbehr S** (2012) Calcium promotes activity and confers heat stability on plant peroxidases. *Plant Signaling & Behavior* **7**: 650–660
- Pogni R, Baratto MC, Giansanti S, Teutloff C, Verdin J, Valderrama B, Lenzian F, Lubitz W, Vazquez-Duhalt R, Basosi R** (2005) Tryptophan-based radical in the catalytic

- mechanism of versatile peroxidase from *Bjerkandera adusta*. *Biochemistry* **44**: 4267–4274
- Polidoros AN, Scandalios JG** (1999) Role of hydrogen peroxide and different classes of antioxidants in the regulation of catalase and glutathione S-transferase gene expression in maize (*Zea mays* L.). *Physiologia Plantarum* **106**: 112–120
- Prasad TK, Anderson MD, Stewart CR** (1995) Localization and characterization of peroxidases in the mitochondria of chilling-acclimated maize seedlings. *Plant Physiology* **108**: 1597–1605
- Quinn JM, Barraco P, Eriksson M, Merchant S** (2000) Coordinate copper- and oxygen-responsive Cyc6 and Cpx1 expression in *Chlamydomonas* is mediated by the same element. *Journal of Biological Chemistry* **275**: 6080–6089
- Rabouille C, Hui N, Hunte F, Kieckbusch R, Berger EG, Warren G, Nilsson T** (1995) Mapping the distribution of Golgi enzymes involved in the construction of complex oligosaccharides. *Journal of Cell Science* **108**: 1617–1627
- Raemaekers RJM, Muro L de, Gatehouse JA, Fordham-Skelton AP** (1999) Functional phytohemagglutinin (PHA) and *Galanthus nivalis* agglutinin (GNA) expressed in *Pichia pastoris*. Correct N-terminal processing and secretion of heterologous proteins expressed using the PHA-E signal peptide. *European Journal of Biochemistry* **265**: 394–403
- Rasmussen CB, Hiner ANP, Smith AT, Welinder KG** (1998) Effect of calcium, other ions, and pH on the reactions of barley peroxidase with hydrogen peroxide and fluoride: Control of activity through conformational change. *Journal of Biological Chemistry* **273**: 2232–2240
- Regalado C, García-Almendárez BE, Duarte-Vázquez MA** (2004) Biotechnological applications of peroxidases. *Phytochemistry Reviews* **3**: 243–256
- Ren L, Liu Y-J, Liu H, Qian T, Qi L, Wang X, Zeng Q** (2014) Subcellular relocalization and positive selection play key roles in the retention of duplicate genes of populus class iii peroxidase family. *The Plant Cell* **26**: 2404–2419
- Rodriguez-Lopez JN, Smith AT, Thorneley RNF** (1996) Recombinant horseradish peroxidase isoenzyme C: the effect of distal haem cavity mutations (His42→Leu and Arg38→Leu) on compound I formation and substrate binding. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **1**: 136–142
- Roggenkamp R, Janowicz Z, Stanikowski B, Hollenberg CP** (1984) Biosynthesis and regulation of the peroxisomal methanol oxidase from the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *Molecular and General Genetics* **194**: 489–493
- Rojo E, Zouhar J, Carter C, Kovaleva V, Raikhel NV** (2003) A unique mechanism for protein processing and degradation in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 7389–7394

- Roth J** (1991) Localization of glycosylation sites in the Golgi apparatus using immunolabeling and cytochemistry. *Journal of Electron Microscopy Technique* **17**: 121–131
- Ruiz-Dueñas FJ, Pogni R, Morales M, Giansanti S, Mate MJ, Romero A, Martínez MJ, Basosi R, Martínez AT** (2009) Protein radicals in fungal versatile peroxidase: Catalytic tryptophan radical in both compound I and compound II and studies on W164Y, W164H, and W164S variants. *Journal of Biological Chemistry* **284**: 7986–7994
- Sagi M, Fluhr R** (2001) Superoxide production by plant homologues of the gp91(phox) NADPH oxidase. Modulation of activity by calcium and by tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiology* **126**: 1281–1290
- Saint-Jore-Dupas C, Nebenführ A, Boulaflous A, Follet-Gueye M-L, Plasson C, Hawes C, Driouich A, Faye L, Gomord V** (2006) Plant N-glycan processing enzymes employ different targeting mechanisms for their spatial arrangement along the secretory pathway. *The Plant Cell* **18**: 3182–3200
- Salamin K, Sriranganadane D, Léchenne B, Jousson O, Monod M** (2010) Secretion of an endogenous subtilisin by *Pichia pastoris* strains GS115 and KM71. *Applied and Environmental Microbiology* **76**: 4269–4276
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T** (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.*, 3rd ed. 1120
- Santoni V, Rouquie D, Doumas P, Mansion M, Boutry M, Degand H, Dupree P, Packman L, Sherrier J, Prime T, et al.** (1998) Use of a proteome strategy for tagging proteins present at the plasma membrane. *The Plant Journal* **16**: 633–641
- Sauer M, Kleine-Vehn J** (2011) Auxin binding protein 1: The outsider. *The Plant Cell* **23**: 2033–2043
- Savenkova MI, Newmyer SL, Montellano PR Ortiz de** (1996) Rescue of His-42→Ala horseradish peroxidase by a Phe-41→His mutation. Engineering of a surrogate catalytic histidine. *Journal of Biological Chemistry* **271**: 24598–24603
- Savitsky PA, Gazaryan IG, Tishkov VI, Lagrimini LM, Ruzgas T, Gorton L** (1999) Oxidation of indole-3-acetic acid by dioxygen catalysed by plant peroxidases: specificity for the enzyme structure. *The Biochemical Journal* **340 (Pt 3)**: 579–583
- Scheller FW, Schubert F, Fedrowitz J, eds** (1996) *Frontiers in Biosensorics I*, 1st ed. doi: 10.1007/978-3-0348-9043-4
- Schopfer P** (1994) Histochemical demonstration and localization of H₂O₂ in organs of higher plants by tissue printing on nitrocellulose paper. *Plant Physiology* **104**: 1269–1275
- Schopfer P** (2001) Hydroxyl radical-induced cell-wall loosening *in vitro* and *in vivo*: Implications for the control of elongation growth. *Plant Journal* **28**: 679–688
- Schopfer P, Plachy C, Frahy G** (2001) Release of reactive oxygen intermediates (superoxide radicals, hydrogen peroxide, and hydroxyl radicals) and peroxidase in germinating

- radish seeds controlled by light, gibberellin, and abscisic acid. *Plant Physiology* **125**: 1591–1602
- Schuller DJ, Ban N, Huystee RB, McPherson A, Poulos TL** (1996) The crystal structure of peanut peroxidase. *Structure* **4**: 311–321
- Scorer CA, Clare JJ, McCombie WR, Romanos MA, Sreekrishna K** (1994) Rapid selection using G418 of high copy number transformants of *Pichia pastoris* for high-level foreign gene expression. *Biotechnology* **12**: 181–184
- Segura M de las M, Levin G, Miranda MV, Mendive FM, Targovnik HM, Cascone O** (2005) High-level expression and purification of recombinant horseradish peroxidase isozyme C in SF-9 insect cell culture. *Process Biochemistry* **40**: 795–800
- Sekhon RS, Lin H, Childs KL, Hansey CN, Robin Buell C, De Leon N, Kaeppler SM** (2011) Genome-wide atlas of transcription during maize development. *Plant Journal* **66**: 553–563
- Al-Senaïdy AM, Ismael M a.** (2011) Purification and characterization of membrane-bound peroxidase from date palm leaves (*Phoenix dactylifera* L.). *Saudi Journal of Biological Sciences* **18**: 293–298
- Shaner NC, Campbell RE, Steinbach P a, Giepmans BNG, Palmer AE, Tsien RY** (2004) Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nature Biotechnology* **22**: 1567–1572
- Sharp KH, Mewies M, Moody PCE, Raven EL** (2003) Crystal structure of the ascorbate peroxidase-ascorbate complex. *Nature Structural Biology* **10**: 303–307
- Shigeoka S, Ishikawa T, Tamoi M, Miyagawa Y, Takeda T, Yabuta Y, Yoshimura K** (2002) Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal of Experimental Botany* **53**: 1305–1319
- Shinwari ZK, Nakashima K, Miura S, Kasuga M, Seki M, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (1998) An Arabidopsis gene family encoding DRE/CRT binding proteins involved in low-temperature-responsive gene expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **250**: 161–170
- Singh R, Wiseman B, Deemagarn T, Jha V, Switala J, Loewen PC** (2008) Comparative study of catalase-peroxidases (KatGs). *Archives of Biochemistry and Biophysics* **471**: 207–214
- Smith AT, Santama N, Dacey S, Edwards M, Bray RC, Thorneley RNF, Burke JF** (1990) Expression of a synthetic gene for horseradish peroxidase C in *Escherichia coli* and folding and activation of the recombinant enzyme with Ca²⁺ and heme. *Journal of Biological Chemistry* **265**: 13335–13343
- Smith CG, Rodgers MW, Zimmerlin A, Ferdinando D, Bolwell GP** (1994) Tissue and subcellular immunolocalisation of enzymes of lignin synthesis in differentiating and

- wounded hypocotyl tissue of French bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Planta* **192**: 155–164
- Smulevich G, Paoli M, Burke JF, Sanders SA, Thorneley RN, Smith AT** (1994) Characterization of recombinant horseradish peroxidase C and three site-directed mutants, F41V, F41W, and R38K, by resonance Raman spectroscopy. *Biochemistry* **33**: 7398–7407
- Soda I, Hasegawa T, Suzuki T, Ogura N** (1991) Purification and some properties of peroxidase from kiwifruit. *Agricultural and Biological Chemistry* **55**: 1677–1678
- Solá RJ, Griebenow K** (2009) Effects of glycosylation on the stability of protein pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **98**: 1223–1245
- Sottomayor M, Duarte P, Figueiredo R, Ros Barceló A** (2008) A vacuolar class III peroxidase and the metabolism of anticancer indole alkaloids in *Catharanthus roseus*: Can peroxidases, secondary metabolites and arabinogalactan proteins be partners in microcompartmentation of cellular reactions? *Plant Signaling & Behavior* **3**: 899–901
- Southern EM** (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* **98**: 503–508
- Springer NM, Ying K, Fu Y, Ji T, Yeh CT, Jia Y, Wu W, Richmond T, Kitzman J, Rosenbaum H, et al.** (2009) Maize inbreds exhibit high levels of copy number variation (CNV) and presence/absence variation (PAV) in genome content. *PLoS Genetics*. doi: 10.1371/journal.pgen.1000734
- Sreekrishna K, Brankamp RG, Kropp KE, Blankenship DT, Tsay JT, Smith PL, Wierschke JD, Subramaniam A, Birkenberger LA** (1997) Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene* **190**: 55–62
- Sundaramoorthy M, Turner J, Poulos TL** (1995) The crystal structure of chloroperoxidase: a heme peroxidase–cytochrome P450 functional hybrid. *Structure* (London, England : 1993) **3**: 1367–1377
- Sundaramoorthy M, Turner J, Poulos TL** (1998) Stereochemistry of the chloroperoxidase active site: crystallographic and molecular-modeling studies. *Chemistry & Biology* **5**: 461–473
- Surpin M, Raikhel N** (2004) Plant cell biology: Traffic jams affect plant development and signal transduction. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **5**: 100–109
- Tams JW, Welinder KG** (1995) Mild chemical deglycosylation of horseradish peroxidase yields a fully active, homogeneous enzyme. *Analytical Biochemistry* **228**: 48–55
- Tams JW, Welinder KG** (1998) Glycosylation and thermodynamic versus kinetic stability of horseradish peroxidase. *FEBS Letters* **421**: 234–236

- Tanz SK, Castleden I, Small ID, Millar AH** (2013) Fluorescent protein tagging as a tool to define the subcellular distribution of proteins in plants. *Frontiers in Plant Science* **4**: 214
- Thomas P, Ryan D, Levin W** (1976) An improved staining procedure for the detection of the peroxidase activity of cytochrome P-450 on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry* **75**: 168–176
- Thorpe GHG, Kricka LJ, Moseley SB, Whitehead TP** (1985) Phenols as enhancers of the chemiluminescent horseradish peroxidase-luminol-hydrogen peroxide reaction: Application in luminescence-monitored enzyme immunoassays. *Clinical Chemistry* **31**: 1335–1341
- Tognolli M, Penel C, Greppin H, Simon P** (2002) Analysis and expression of the class III peroxidase large gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Gene* **288**: 0–129
- Tsien RY** (1998) The green fluorescent protein. *Annual Review of Biochemistry* **67**: 509–544
- Vancanneyt G, Schmidt R, O'Connor-Sanchez A, Willmitzer L, Rocha-Sosa M** (1990) Splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Molecular and General Genetics* **220**: 245–250
- Vanholme R, Demedts B, Morreel K, Ralph J, Boerjan W** (2010) Lignin biosynthesis and structure. *Plant Physiology* **153**: 895–905
- Vassileva A, Chugh DA, Swaminathan S, Khanna N** (2001) Expression of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* using the GAP promoter. *Journal of Biotechnology* **88**: 21–35
- Veitch NC** (2004a) Structural determinants of plant peroxidase function. *Phytochemistry Reviews* **3**: 3–18
- Veitch NC** (2004b) Horseradish peroxidase: A modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry* **65**: 249–259
- Veitch NC, Smith AT** (2000) Horseradish peroxidase. *Advances in Inorganic Chemistry* **51**: 107–162
- Velasco A, Hendricks L, Moremen KW, Tulsiani DRP, Touster O, Farquhar MG** (1993) Cell type-dependent variations in the subcellular distribution of α -Mannosidase I and II. *Cell* **122**:
- Vianello A, Zancani M, Macri F** (1990) Hydrogen peroxide formation and iron ion oxidoreduction linked to NADH oxidation in radish plasmalemma vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* **1023**: 19–24
- Vianello A, Zancani M, Nagy G, Macri F** (1997) Guaiacol peroxidase associated to soybean root plasma membranes oxidizes ascorbate. *Journal of Plant Physiology* **150**: 573–577

- Vitale A, Denecke J** (1999) The endoplasmic reticulum-gateway of the secretory pathway. *The Plant Cell* **11**: 615–628
- Voigt C a** (2014) Callose-mediated resistance to pathogenic intruders in plant defense-related papillae. *Frontiers in Plant Science* **5**: 168
- Waldo GS, Standish BM, Berendzen J, Terwilliger TC** (1999) Rapid protein-folding assay using green fluorescent protein. *Nature Biotechnology* **17**: 691–695
- Wang J, Ding Y, Wang J, Hillmer S, Miao Y, Lo SW, Wang X, Robinson DG, Jiang L** (2010) EXPO, an exocyst-positive organelle distinct from multivesicular endosomes and autophagosomes, mediates cytosol to cell wall exocytosis in Arabidopsis and tobacco cells. *The Plant Cell* **22**: 4009–4030
- Wang Y, Wang Q, Zhao Y, Han G, Zhu S** (2015) Systematic analysis of maize class III peroxidase gene family reveals a conserved subfamily involved in abiotic stress response. *Gene* **566**: 95–108
- Ward G, Hadar Y, Bilkis I, Konstantinovskiy L, Dosoretz CG** (2001) Initial steps of ferulic acid polymerization by lignin peroxidase. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 18734–18741
- Wasserman WW, Fahl WE** (1997) Functional antioxidant responsive elements. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 5361–5366
- Wei K-F, Chen J, Chen Y-F, Wu L-J, Xie D-X** (2012) Molecular phylogenetic and expression analysis of the complete WRKY transcription factor family in maize. *DNA Research* **19**: 153–164
- Welinder KG** (1992) Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Current Opinion in Structural Biology* **2**: 388–393
- Welinder KG, Mauro JM, Nørskov-Lauritsen L** (1992) Structure of plant and fungal peroxidases. *Biochemical Society Transactions* **20**: 337–340
- Wilson CM** (1983) Staining of proteins on gels: Comparisons of dyes and procedures. *Methods in Enzymology* **91**: 236–247
- Winter D, Vinegar B, Nahal H, Ammar R, Wilson GV, Provart NJ** (2007) An “electronic fluorescent pictograph” browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS ONE* **2**: 1–12
- Wu Y xuan, Von Tiedemann A** (2002) Impact of fungicides on active oxygen species and antioxidant enzymes in spring barley (*Hordeum vulgare* L.) exposed to ozone. *Environmental Pollution* **116**: 37–47
- Xu F** (1997) Effects of redox potential and hydroxide inhibition on the pH activity profile of fungal laccases. *Journal of Biological Chemistry* **272**: 924–928

- Xu T, Dai N, Chen J, Nagawa S, Cao M, Li H, Zhou Z, Chen X, De Rycke R, Rakusova H, et al.** (2014) Cell Surface ABP1-TMK auxin-sensing complex activates ROP GTPase signaling. *Science* **343**: 1025–1028
- Yamada H, Makino R, Yamazaki I** (1975) Effects of 2,4-substituents of deuteroheme upon redox potentials of horseradish peroxidases. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **169**: 344–353
- Yamada K, Nagano AJ, Nishina M, Hara-Nishimura I, Nishimura M** (2013) Identification of two novel endoplasmic reticulum body-specific integral membrane proteins. *Plant Physiology* **161**: 108–120
- Yang Q, Yang M, Pritsch K, Yediler A, Hagn A, Schloter M, Kettrup A** (2003) Decolorization of synthetic dyes and production of manganese-dependent peroxidase by new fungal isolates. *Biotechnology Letters* **25**: 709–713
- Yanhui C, Xiaoyuan Y, Kun H, Meihua L, Jigang L, Zhaofeng G, Zhiqiang L, Yunfei Z, Xiaoxiao W, Xiaoming Q, et al.** (2006) The MYB transcription factor superfamily of Arabidopsis: Expression analysis and phylogenetic comparison with the rice MYB family. *Plant Molecular Biology* **60**: 107–124
- Young CL, Britton ZT, Robinson AS** (2012) Recombinant protein expression and purification: A comprehensive review of affinity tags and microbial applications. *Biotechnology Journal* **7**: 620–634
- Zámocký M** (2004) Phylogenetic relationships in class I of the superfamily of bacterial, fungal, and plant peroxidases. *European Journal of Biochemistry* **271**: 3297–3309
- Zámocký M, Furtmüller PG, Obinger C** (2010) Evolution of structure and function of Class I peroxidases. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **500**: 45–57
- Zámocký M, Hofbauer S, Schaffner I, Gasselhuber B, Nicolussi A, Soudi M, Pirker KF, Furtmüller PG, Obinger C** (2015) Independent evolution of four heme peroxidase superfamilies. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **574**: 108–119
- Zámocký M, Jakopitsch C, Furtmüller PG, Dunand C, Obinger C** (2008) The peroxidase-cyclooxygenase superfamily: Reconstructed evolution of critical enzymes of the innate immune system. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **72**: 589–605
- Zancani M, Nagy G, Vianello A, Macri F** (1995) Copper-inhibited NADH-dependent peroxidase activity of purified soya bean plasma membranes. *Phytochemistry* **40**: 367–371
- Zederbauer M, Furtmüller PG, Brogioni S, Jakopitsch C, Smulevich G, Obinger C** (2007) Heme to protein linkages in mammalian peroxidases: impact on spectroscopic, redox and catalytic properties. *Natural Product Reports* **24**: 571
- Zhang D, Vjestica A, Oliferenko S** (2012) Plasma membrane tethering of the cortical ER necessitates its finely reticulated architecture. *Current Biology* **22**: 2048–2052

5. Literaturverzeichnis

- Zhang H, Zhang L, Gao B, Fan H, Jin J, Botella MA, Jiang L, Lin J** (2011) Golgi apparatus-localized synaptotagmin 2 is required for unconventional secretion in Arabidopsis. *PLoS ONE* **6**: e26477
- Zhang J** (2003) Evolution by gene duplication: an update. *Trends in Ecology & Evolution* **18**: 292–298
- Zhang W, Inan M, Meagher MM** (2000) Fermentation strategies for recombinant protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* **5**: 275–287
- Zhao Q, Dixon RA** (2011) Transcriptional networks for lignin biosynthesis: More complex than we thought? *Trends in Plant Science* **16**: 227–233
- Zhao X, Li G, Liang S** (2013) Several affinity tags commonly used in chromatographic purification. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*. doi: 10.1155/2013/581093
- Zhong R, Lee C, Zhou J, McCarthy RL, Ye Z** (2008) A battery of transcription factors involved in the regulation of secondary cell wall biosynthesis in Arabidopsis. *The Plant Cell* **20**: 2763–2782
- Zhu T, Guo M, Sun C, Qian J, Zhuang Y, Chu J, Zhang S** (2009) A systematical investigation on the genetic stability of multi-copy *Pichia pastoris* strains. *Biotechnology Letters* **31**: 679–684

Anhang

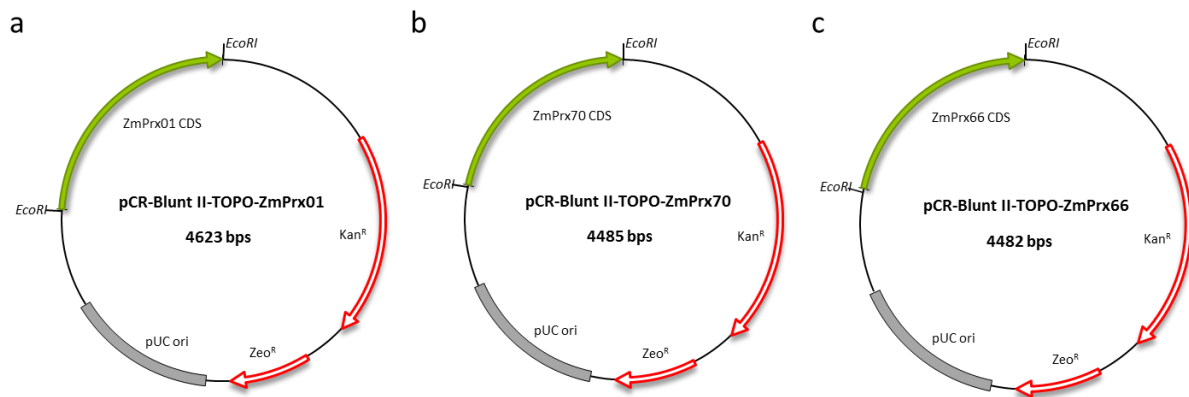


Abb. 78: Vektor des Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kits für die Sequenzierung der erhaltenen ZmPrx Sequenzen der Maislinie Hi-II A x Hi-II B. a: mit ZmPrx01 Insert, b: mit ZmPrx70 Insert, c: mit ZmPrx66 Insert, jeweils flankiert durch *EcoRI* Restriktionserkennungssequenzen.

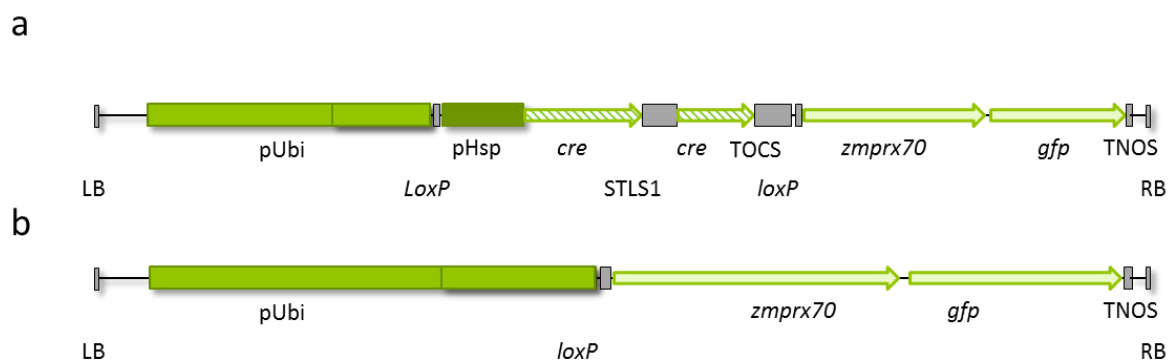


Abb. 79: Binärkonstrukt zur Expression eines ZmPrx70-GFP-Fusionsproteins in Mais. a: Konstrukt vor der Aktivierung mit Basta®-Kassette, Aktivierungskassette sowie Ubi1-Promotor und *zmprx70:gfp*-Fusion. b: Nach der Hitzeschockaktivierung rückt der Ubiquitin-Promotor vor das Peroxidasegen und kontrolliert die Expression des Fusionsproteins. Nach der Exzision verbleibt eine *loxP*-Sequenz zwischen Promotor und Peroxidasegen.

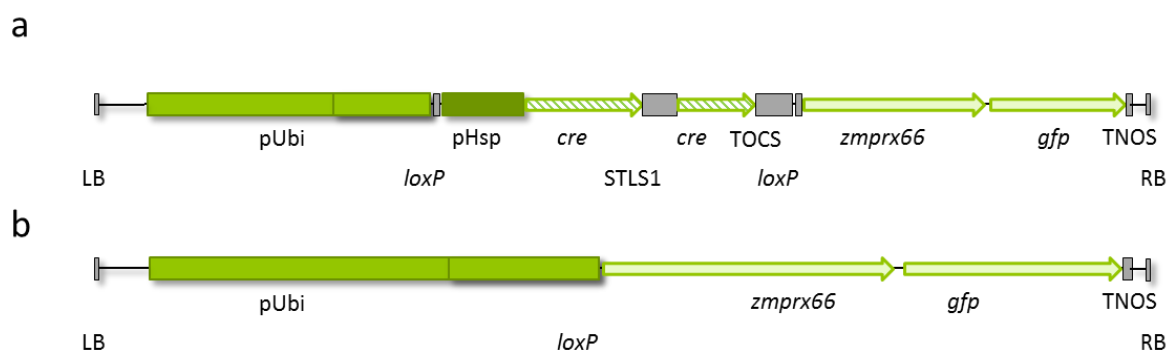


Abb. 80: Binärkonstrukt zur Expression eines ZmPrx66-GFP-Fusionsproteins in Mais. a: Konstrukt vor der Aktivierung mit Basta®-Kassette, Aktivierungskassette sowie Ubi1-Promotor und *zmprx66:gfp*-Fusion. b:

Nach der Hitzeschockaktivierung rückt der Ubiquitin-Promotor vor das Peroxidasegen und kontrolliert die Expression des Fusionsproteins. Nach der Exzision verbleibt eine *loxP*-Sequenz zwischen Promotor und Peroxidasegen.

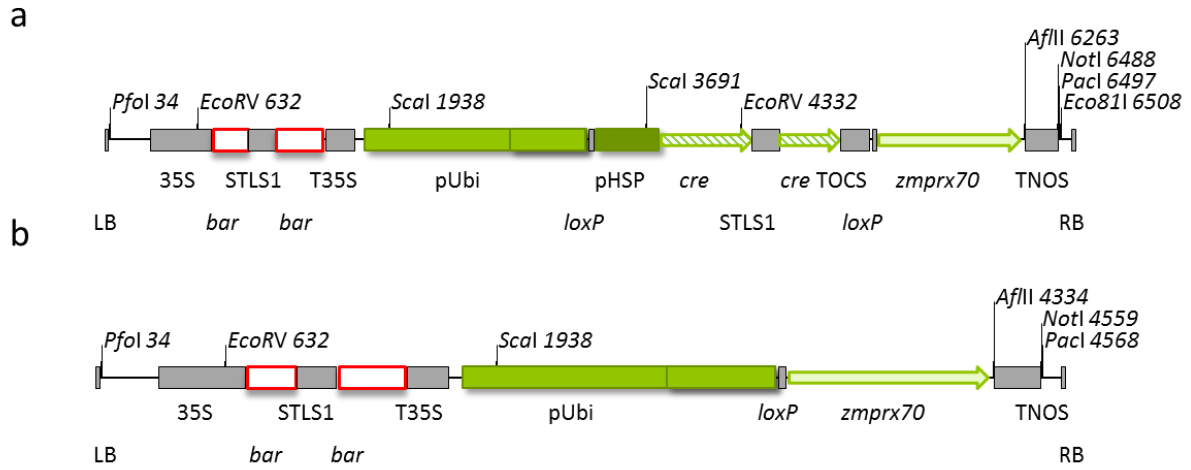


Abb. 81: Rekombination des induzierbaren Überexpressionskonstruktes p7i-UCre-ZmPrx70. a. Nichtaktivierte Expressionskassette vor der Rekombination. Der grundsätzliche Aufbau gleicht den entsprechenden Fusionskonstrukten. Der Mechanismus der Rekombination ist unter Abb. 8 beschrieben. b: Rekombinierte Expressionskassette nach erfolgter Exzision der Aktivierungskassette. Diese Anordnung ist in aktivierten Pflanzen zu finden.

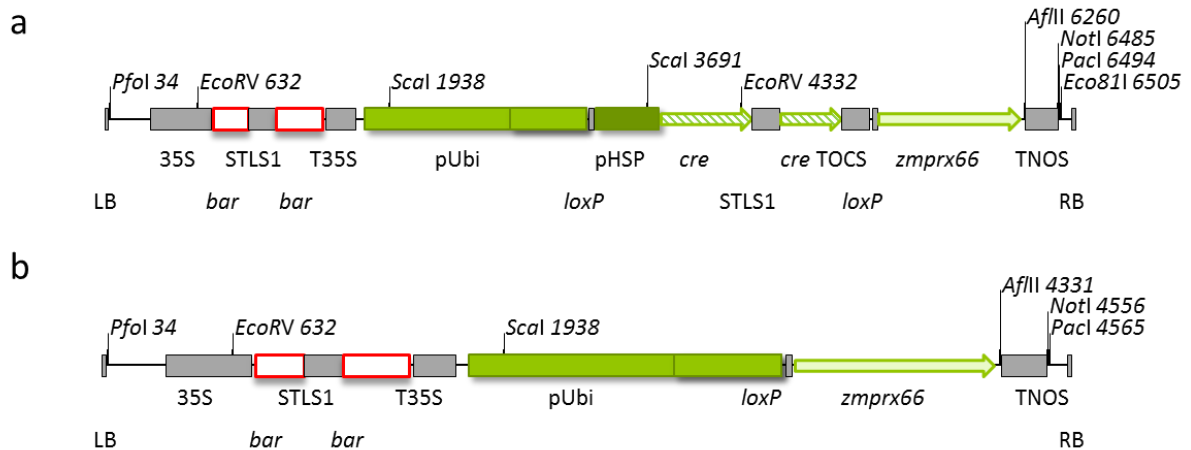


Abb. 82: Rekombination des induzierbaren Überexpressionskonstruktes p7i-UCre-ZmPrx66. a. Nichtaktivierte Expressionskassette vor der Rekombination. Der grundsätzliche Aufbau gleicht den entsprechenden Fusionskonstrukten. Der Mechanismus der Rekombination ist unter Abb. 8 beschrieben. b: Rekombinierte Expressionskassette nach erfolgter Exzision der Aktivierungskassette. Diese Anordnung ist in aktivierten Pflanzen zu finden.

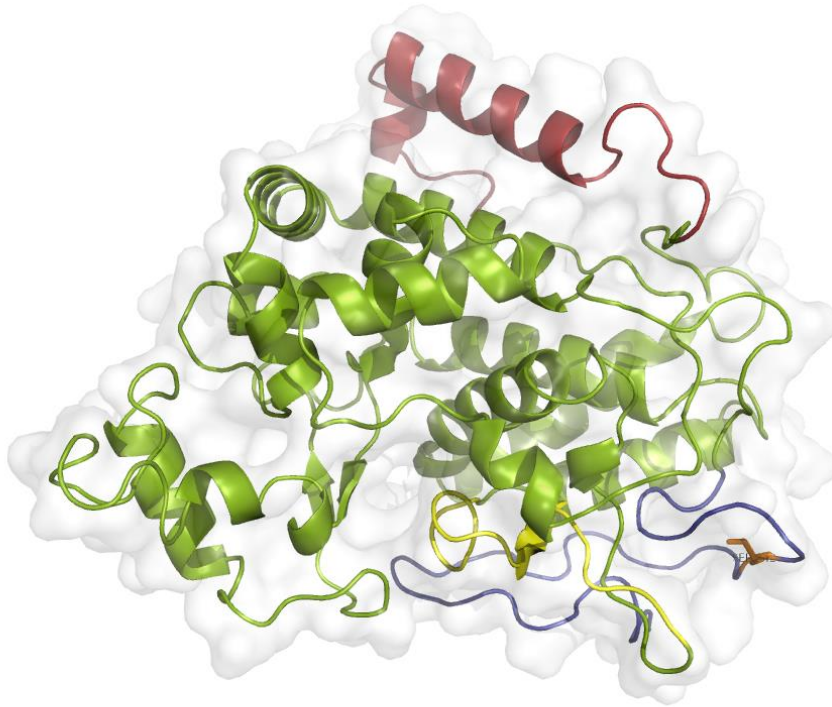


Abb. 83.: Modellierter Tertiärstruktur von ZmPrx01. Zu erkennen ist die für Klasse III Peroxidasen typische Struktur. Rot: N-terminales Signalpeptid, orange: Aminosäuresubstitution, Blau: C-terminale Verlängerung, gelb: Bereich des Peptidantikörper-Epitopes. Die Oberfläche wird durchsichtig als Connolly-Oberfläche dargestellt. Sie ist gleichzusetzen mit der *accessible surface area (ASA)* bzw. *solvent accessible surface area (SASA)*. Modell erzeugt durch Phyre² (Kelley *et al.*, 2015) im *Intensive* Modus.

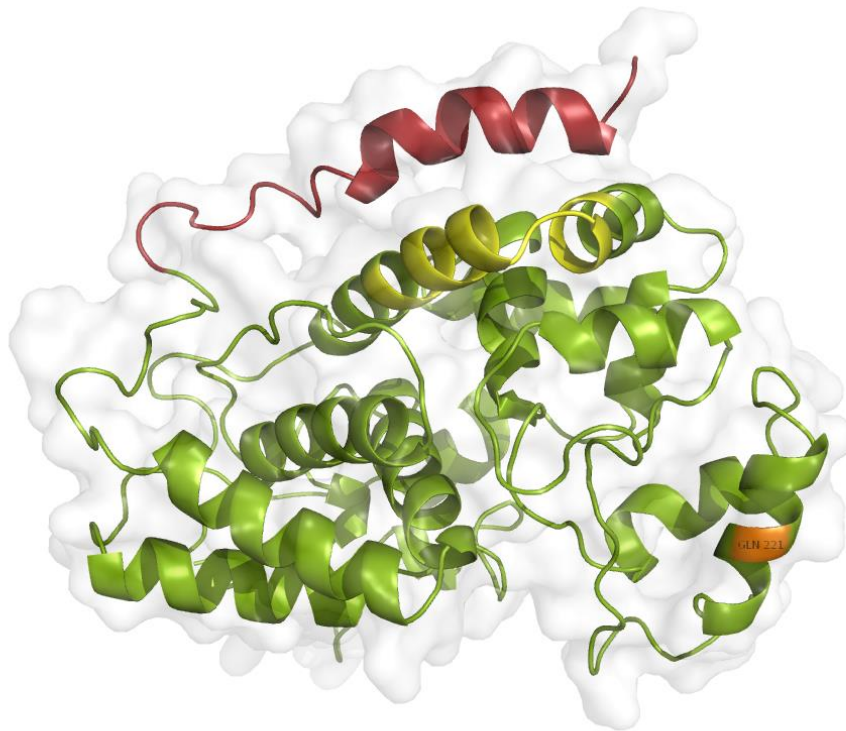


Abb. 84.: Modellierte Tertiärstruktur von ZmPrx70. Zu erkennen ist die für Klasse III Peroxidasen typische Struktur. Rot: N-terminales Signalpeptid, Orange: Aminosäuresubstitution, Gelb: Bereich des Peptidantikörper-Epitopes. Die Oberfläche wird durchsichtig als Connolly-Oberfläche dargestellt. Sie ist gleichzusetzen mit der *accessible surface area* (ASA) bzw. *solvent accessible surface area* (SASA). Modell erzeugt durch Modell erzeugt durch Phyre² (Kelley *et al.*, 2015) im *Intensive* Modus.

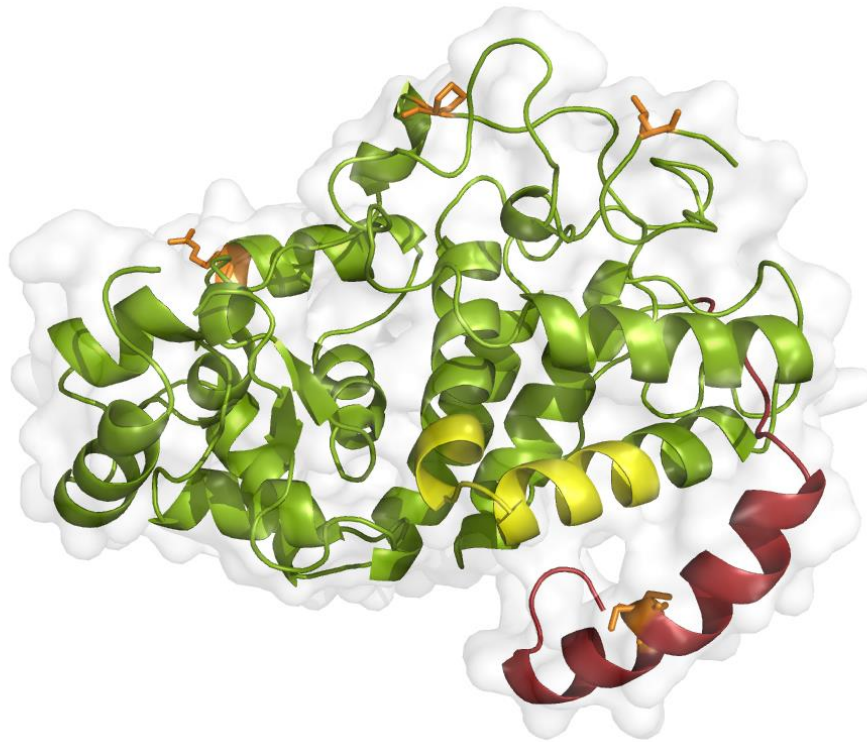


Abb. 85.: Modellerte Tertiärstruktur von ZmPrx66. Zu erkennen ist die für Klasse III Peroxidasen typische Struktur. Rot: N-terminales Signalpeptid, Orange: Aminosäuresubstitution, Gelb: Bereich des Peptidantikörper-Epitopes. Die Oberfläche wird durchsichtig als Connolly-Oberfläche dargestellt. Sie ist gleichzusetzen mit der *accessible surface area* (ASA) bzw. *solvent accessible surface area* (SASA). Modell erzeugt durch Modell erzeugt durch Phyre² (Kelley *et al.*, 2015) im *Intensive* Modus.

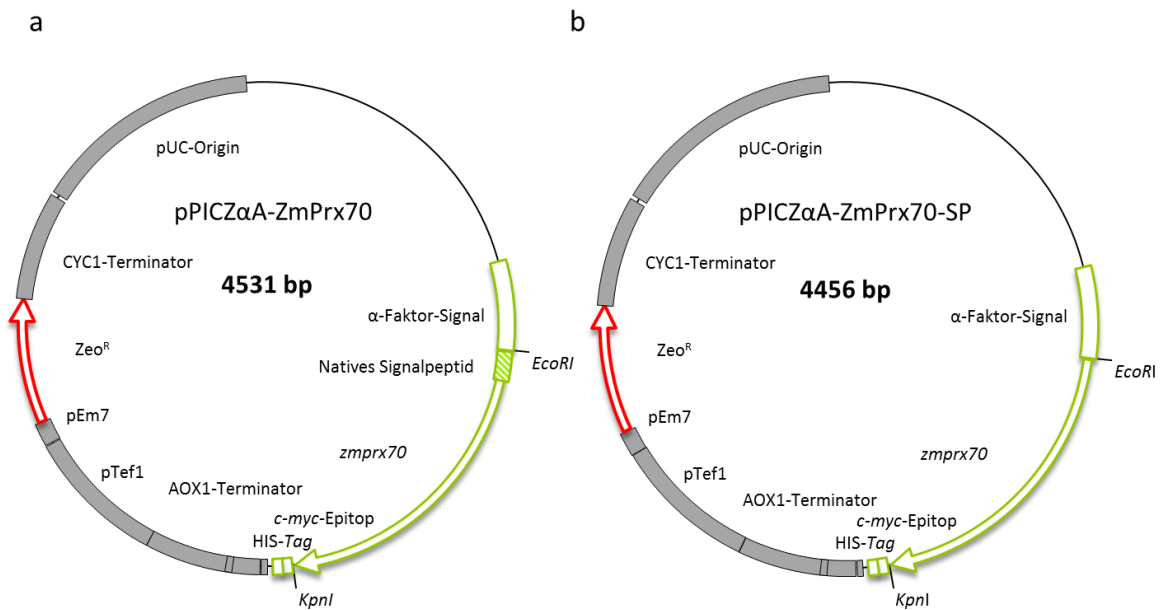


Abb. 86: Vektorkarten der verwendeten Plasmide für die rekombinante Produktion von ZmPrx70. a: Über Restriktionsschnittstellen der Enzyme *EcoRI* und *KpnI* wurde die komplette kodierende Sequenz von ZmPrx70 in die MCS (*Multiple cloning site*) eingefügt. Dies führt zur N-terminalen Verknüpfung mit der α -Faktor Signalsequenz und C-terminal zum Anfügen eines *c-myc*-Epitopes und eines Histidin-Tags. Bei diesem Konstrukt bleibt das native Signalpeptid und somit auch die putative Membrandomäne erhalten b: Der Aufbau des zweiten Konstruktes ist grundlegend gleich, es wurde jedoch das N-terminale Signalpeptid entfernt und das deletierte *zmprx70*-Gen über die Restriktionendonukleasen *EcoRI* und *KpnI* eingefügt.

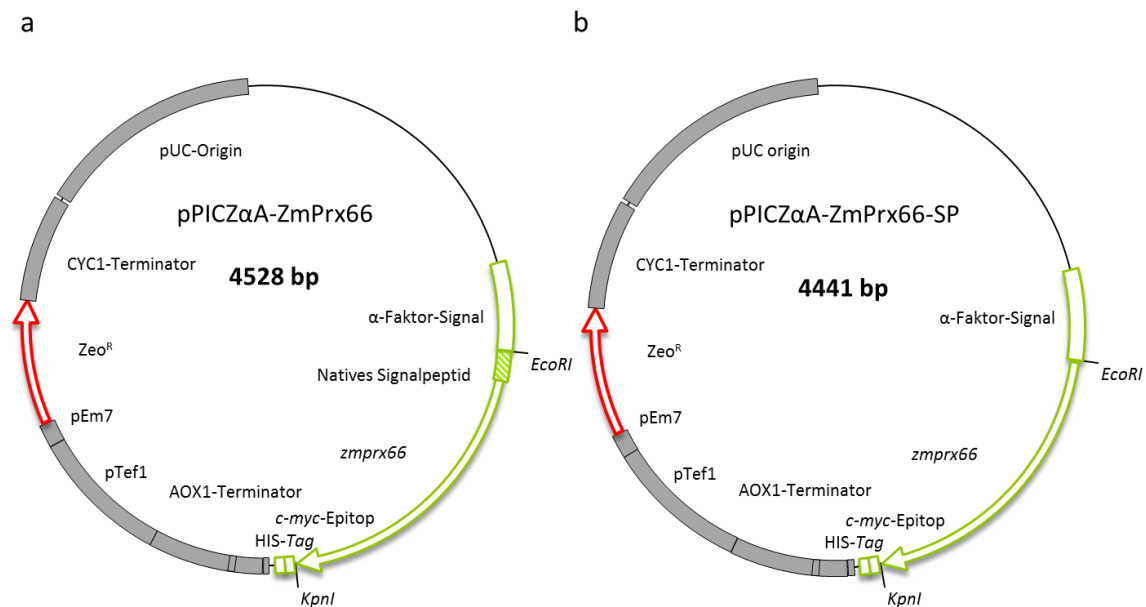


Abb. 87: Vektorkarten der verwendeten Plasmide für die rekombinante Produktion von ZmPrx66. a: Über Restriktionsschnittstellen der Enzyme *EcoRI* und *KpnI* wurde die komplette kodierende Sequenz von ZmPrx66 in die MCS (*Multiple cloning site*) eingefügt. Dies führt zur N-terminalen Verknüpfung mit der α -Faktor Signalsequenz und C-terminal zum Anfügen eines *c-myc*-Epitopes und eines Histidin-Tags. Bei diesem Konstrukt bleibt das native Signalpeptid und somit auch die putative Membrandomäne erhalten b: Der Aufbau des zweiten Konstruktes ist grundlegend gleich, es wurde jedoch das N-terminale Signalpeptid entfernt und das deletierte *zmprx66* Gen über die Restriktionendonukleasen *EcoRI* und *KpnI* eingefügt.

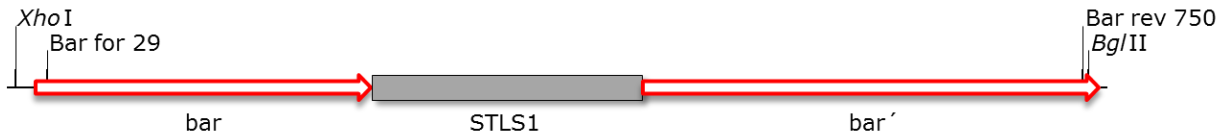


Abb. 88: 747 bp großes Fragment aus einer Restriktion des Vektors p7iL (DNA Cloning Service, Hamburg, Deutschland) mit *XhoI* und *BglII* zur Herstellung einer Digoxigenin-11-dUTP markierten Sonde.

Global DNA alignment. Reference molecule: ZmPrx01B73, Region 1 to 1104
Sequences: 3. Scoring matrix: Linear (Mismatch 2, OpenGap 4, ExtGap 1)

Sequence View: Similarity Format, Color areas of high matches at same base position

ZmPrx01_B73	1	atggctaaggaaagcaagctaacggccggggtggccgcccgcgtgaccgtcgtcgccgcttgccgctatgacctgctgctgcccggcgaag
ZmPrx01_W22	1	atggctaaggaaagcaagctaacggccggggtggccgcccgcgtgaccgtcgtcgccgcttgccgctatgacctgctgctgcccggcgaag
ZmPrx01_HiII	1	atggctaaggaaagcaagctaacggccggggtggccgcccgcgtgaccgtcgtcgccgcttgccgctatgacctgctgctgcccggcgaag
ZmPrx01_B73	91	gcccgcgcccagctccgggtgggattctacgacaccagctgcccacaacgcccaggcctcgtccgcccaggcctgcccggccgcttccgcc
ZmPrx01_W22	91	gcccgcgcccagctccgggtgggattctacgacaccagctgcccacaacgcccaggcctcgtccgcccaggcctgcccggccgcttccgcc
ZmPrx01_HiII	91	gcccgcgcccagctccgggtgggattctacgacaccagctgcccacaacgcccaggcctcgtccgcccaggcctgcccggccgcttccgcc
ZmPrx01_B73	181	aaggacgcccgcactcgcgcccggcctcatccgcccacttccacgactgctttgtcaggggctgtgatggatccgtccctccctcacgctg
ZmPrx01_W22	181	aaggacgcccgcactcgcgcccggcctcatccgcccacttccacgactgctttgtcaggggctgtgatggatccgtccctccctcacgctg
ZmPrx01_HiII	181	aaggacgcccgcactcgcgcccggcctcatccgcccacttccacgactgctttgtcaggggctgtgatggatccgtccctccctcacgctg
ZmPrx01_B73	271	aatcctggcggcggcagactgagcgtgacgcccctcccaaaacaccccgagcctccgcccgttcgacgtgatcgacgcccacaagaccgcc
ZmPrx01_W22	271	aatcctggcggcggcagactgagcgtgacgcccctcccaaaacaccccgagcctccgcccgttcgacgtgatcgacgcccacaagaccgcc
ZmPrx01_HiII	271	aatcctggcggcggcagactgagcgtgacgcccctcccaaaacaccccgagcctccgcccgttcgacgtgatcgacgcccacaagaccgcc
ZmPrx01_B73	361	gttgagcagagctgcccgcgacagctctcgtgcccgcacatcgtgccttccgcccgcgacagcatcagttccacgggagcgtctcgt
ZmPrx01_W22	361	gttgagcagagctgcccgcgacagctctcgtgcccgcacatcgtgccttccgcccgcgacagcatcagttccacgggagcgtctcgt
ZmPrx01_HiII	361	gttgagcagagctgcccgcgacagctctcgtgcccgcacatcgtgccttccgcccgcgacagcatcagttccacgggagcgtctcgt
ZmPrx01_B73	451	taccaggtccccgcggcggcggcgcgacgcccgcgtgtccaaacgacgagagaccgtcgacctccccccgcccactccacggcgcaaaagc
ZmPrx01_W22	451	taccaggtccccgcggcggcggcgcgacgcccgcgtgtccaaacgacgagagaccgtcgacctccccccgcccactccacggcgcaaaagc
ZmPrx01_HiII	451	taccaggtccccgcggcggcggcgcgacgcccgcgtgtccaaacgacgagagaccgtcgacctccccccgcccactccacggcgcaaaagc
ZmPrx01_B73	541	ctgaccgacttgttcaaggtcaaggagcttagcgtggaggacatggctcctctccggcgtccacacgctggccgctccttctcggcc
ZmPrx01_W22	541	ctgaccgacttgttcaaggtcaaggagcttagcgtggaggacatggctcctctccggcgtccacacgctggccgctccttctcggcc
ZmPrx01_HiII	541	ctgaccgacttgttcaaggtcaaggagcttagcgtggaggacatggctcctctccggcgtccacacgctggccgctccttctcggcc
ZmPrx01_B73	631	tccttcttcaagcgcgtctggaacacaagcaacgacgcccgcctaccgcaatcgtggacgcccgggctgagcccgtcgtacgcccagctacta
ZmPrx01_W22	631	tccttcttcaagcgcgtctggaacacaagcaacgacgcccgcctaccgcaatcgtggacgcccgggctgagcccgtcgtacgcccagctacta
ZmPrx01_HiII	631	tccttcttcaagcgcgtctggaacacaagcaacgacgcccgcctaccgcaatcgtggacgcccgggctgagcccgtcgtacgcccagctacta
ZmPrx01_B73	721	cgccgctgtgcccgtcaaacacgacgacgacgcccgcctaccgcaatcgtggacgcccgggctgagcccgtcgtacgcccagctacta
ZmPrx01_W22	721	cgccgctgtgcccgtcaaacacgacgacgacgcccgcctaccgcaatcgtggacgcccgggctgagcccgtcgtacgcccagctacta
ZmPrx01_HiII	721	cgccgctgtgcccgtcaaacacgacgacgacgcccgcctaccgcaatcgtggacgcccgggctgagcccgtcgtacgcccagctacta
ZmPrx01_B73	811	tacaagctcctgcctcggcagtggggctcttcttctccgacaaccagctgcccgtgaaacccgagatggcccgcgtggtgagcagcttc
ZmPrx01_W22	811	tacaagctcctgcctcggcagtggggctcttcttctccgacaaccagctgcccgtgaaacccgagatggcccgcgtggtgagcagcttc
ZmPrx01_HiII	811	tacaagctcctgcctcggcagtggggctcttcttctccgacaaccagctgcccgtgaaacccgagatggcccgcgtggtgagcagcttc
ZmPrx01_B73	901	gcgtccaacgagacgctgtggaaggagaaattcggcggccatggtaaaagatgggacgcatccaggtgcagacagggagctgcccggagag
ZmPrx01_W22	901	gcgtccaacgagacgctgtggaaggagaaattcggcggccatggtaaaagatgggacgcatccaggtgcagacagggagctgcccggagag
ZmPrx01_HiII	901	gcgtccaacgagacgctgtggaaggagaaattcggcggccatggtaaaagatgggacgcatccaggtgcagacagggagctgcccggagag
ZmPrx01_B73	991	gtccgtctcaactcggcgtcgtcaaccggagtctgactcgtcgtcgtcggcgggtggagctgggttcgagcgcgcccagcagccgtcgtt
ZmPrx01_W22	991	gtccgtctcaactcggcgtcgtcaaccggagtctgactcgtcgtcgtcggcgggtggagctgggttcgagcgcgcccagcagccgtcgtt
ZmPrx01_HiII	991	gtccgtctcaactcggcgtcgtcaaccggagtctgactcgtcgtcgtcggcgggtggagctgggttcgagcgcgcccagcagccgtcgtt
ZmPrx01_B73	1081	gaagagggtctacgcccgcgagctag
ZmPrx01_W22	1081	gaagagggtctacgcccgcgagctag
ZmPrx01_HiII	1081	gaagagggtctacgcccgcgagctag

Abb. 89: Sequenzvergleich der codierenden Sequenz von *zmprx01* aus den Maislinien B73, W22 und Hi-II A x Hi-II B.

Anhang

Global Protein alignment. Reference molecule: ZmPrx01B73, Region 1 to 367
Sequences: 3. Scoring matrix: BLOSUM 62

Sequence View: Similarity Format, Color areas of high matches at same base position

```
ZmPrx01_B73          1  makeskItagvaaltvvaacalclllpataraqlrvgyfytscpnaealvrqavaafakdagaaglirlhfhdcfvrgcdgsvlltv
ZmPrx01_W22         1  makeskItagvaaltvvaacalclllpataraqlrvgyfytscpnaealvrqavaafakdagaaglirlhfhdcfvrgcdgsvlltv
ZmPrx01_HiII        1  makeskItagvaaltvvaacalclllpataraqlrvgyfytscpnaealvrqavaafakdagaaglirlhfhdcfvrgcdgsvlltv

ZmPrx01_B73          91  nppggqterdalpnnpslrgfdvidaaktaveqscprtvscaDIVafaardsislTgsvsyqvpagrrdgrvsnatetvdlppptstaqs
ZmPrx01_W22         91  nppggqterdalpnnpslrgfdvidaaktaveqscprtvscaDIVafaardsislTgsvsyqvpagrrdgrvsnatetvdlppptstaqs
ZmPrx01_HiII        91  nppggqterdalpnnpslrgfdvidaaktaveqscprtvscaDIVafaardsislTgsvsyqvpagrrdgrvsnatetvdlppptstaqs

ZmPrx01_B73          181 ltdlFkvkelsvedmVvlsGahtvgrsfcaSffkrVwntstnpataiVdaglpsyaqllralcpSnttqtTtpittamDpgtPnVldnny
ZmPrx01_W22         181 ltdlFkAkelsvedmVvlsGahtvgrsfcaSffkrVwntstnpataiVdaglpsyaqllralcpSnttqtTtpittamDpgtPnVldnny
ZmPrx01_HiII        181 ltdlFkAkelsvedmVvlsGahtvgrsfcaSffkrVwntstnpataiVdaglpsyaqllralcpSnttqtTtpittamDpgtPnVldnny

ZmPrx01_B73          271 ykllprgmglffsdnqlrvnpqmaalvssfasnetlwkekfaaamvkmgrIqvTgtGevrIncgVvnpssYssssavelgssapaavG
ZmPrx01_W22         271 ykllprgmglffsdnqlrvnpqmaalvssfasnetlwkekfaaamvkmgrIqvTgtGevrIncgVvnpssYssssavelgssapaavG
ZmPrx01_HiII        271 ykllprgmglffsdnqlrvnpqmaalvssfasnetlwkekfaaamvkmgrIqvTgtGevrIncgVvnpssYssssavelgssapaavG

ZmPrx01_B73          361 eegyaas
ZmPrx01_W22         361 eegyaas
ZmPrx01_HiII        361 eegyaas
```

Abb. 90: Sequenzvergleich der Aminosäuresequenz von ZmPrx01 aus den Maislinien B73, W22 und Hi-II A x Hi-II B.

Global DNA alignment. Reference molecule: ZmPox1_W64, Region 1 to 1398
Sequences: 3. Scoring matrix: Linear (Mismatch 2, OpenGap 4, ExtGap 1)

Sequence View: Similarity Format, Color areas of high matches at same base position

```

ZmPox1_W64      1  cagcagtgagctcagtacacagctaggcacagcgaggggtccggccaggccatggctaaggaagaagcaagctaacggccggagtggcc
ZmPrx01_W22    1  -----gagctcagtacacagctaggcacagcgaggggtccggccaggccatggctaaggaagaagcaagctaacggccggagtggcc
ZmPrx01_HiII   1  -----atggctaaggaagaagcaagctaacggccggagtggcc

ZmPox1_W64     91  gccgcgctgacogctcgtcgtcgtctgocgctatgocctgctgctgocggcgacggcccgocgocag-tccgggtgggattctacgacacc
ZmPrx01_W22    84  gccgcgctgacogctcgtcgtcgtctgocgctatgocctgctgctgocggcgacggcccgocgocagctccgggtgggattctacgacacc
ZmPrx01_HiII   37  gccgcgctgacogctcgtcgtcgtctgocgctatgocctgctgctgocggcgacggcccgocgocagctccgggtgggattctacgacacc

ZmPox1_W64     180 agctgccccaaacggcagggccctcgtccgccaggccgtcggccgoccttcgccaaaggacgocggcatcgccggcggcctcatccgcctc
ZmPrx01_W22    174 agctgccccaaacggcagggccctcgtccgccaggccgtcggccgoccttcgccaaaggacgocggcatcgccggcggcctcatccgcctc
ZmPrx01_HiII   127 agctgccccaaacggcagggccctcgtccgccaggccgtcggccgoccttcgccaaaggacgocggcatcgccggcggcctcatccgcctc

ZmPox1_W64     270 cacttccacgactgctttgtcaggggctgtgatggatccgtcctcctcaccgtgaatcctggcggcgggcagactgagcgtgacgcccctc
ZmPrx01_W22    264 cacttccacgactgctttgtcaggggctgtgatggatccgtcctcctcaccgtgaatcctggcggcgggcagactgagcgtgacgcccctc
ZmPrx01_HiII   217 cacttccacgactgctttgtcaggggctgtgatggatccgtcctcctcaccgtgaatcctggcggcgggcagactgagcgtgacgcccctc

ZmPox1_W64     360 ccaaaacaaccgagcctccggcgttcgacgtgatcgacggccaaagacggccgttgagcagagctgcccgcgacagctcctcgtgocgc
ZmPrx01_W22    354 ccaaaacaaccgagcctccggcgttcgacgtgatcgacggccaaagacggccgttgagcagagctgcccgcgacagctcctcgtgocgc
ZmPrx01_HiII   307 ccaaaacaaccgagcctccggcgttcgacgtgatcgacggccaaagacggccgttgagcagagctgcccgcgacagctcctcgtgocgc

ZmPox1_W64     450 gacatcgtcgccttcgocggccgacagcagcatcagctcaccgggagcgtctcgtaccaggtccccggggcgggcgacggccgocgtg
ZmPrx01_W22    444 gacatcgtcgccttcgocggccgacagcagcatcagctcaccgggagcgtctcgtaccaggtccccggggcgggcgacggccgocgtg
ZmPrx01_HiII   397 gacatcgtcgccttcgocggccgacagcagcatcagctcaccgggagcgtctcgtaccaggtccccggggcgggcgacggccgocgtg

ZmPox1_W64     540 tccaaacggcagggagacogctogacctaccoccccccacctccacggcgcaaaagcctgaccgacttgttcaaggccaaggagcttagcgtg
ZmPrx01_W22    534 tccaaacggcagggagacogctogacctaccoccccccacctccacggcgcaaaagcctgaccgacttgttcaaggccaaggagcttagcgtg
ZmPrx01_HiII   487 tccaaacggcagggagacogctogacctaccoccccccacctccacggcgcaaaagcctgaccgacttgttcaaggccaaggagcttagcgtg

ZmPox1_W64     630 gaggacatggtcgtcctctccggcgtcaccacgtcggccgctcctctcgtcgcctccttcttcaagcogctctggaacacaagcagcaac
ZmPrx01_W22    624 gaggacatggtcgtcctctccggcgtcaccacgtcggccgctcctctcgtcgcctccttcttcaagcogctctggaacacaagcagcaac
ZmPrx01_HiII   577 gaggacatggtcgtcctctccggcgtcaccacgtcggccgctcctctcgtcgcctccttcttcaagcogctctggaacacaagcagcaac

ZmPox1_W64     720 cccgctaccgcaatcgtggacggggctgagccogctgtagcgcagctactacggcgtgtgcccgtcaaacacgacgcagacgacg
ZmPrx01_W22    714 cccgctaccgcaatcgtggacggggctgagccogctgtagcgcagctactacggcgtgtgcccgtcaaacacgacgcagacgacg
ZmPrx01_HiII   667 cccgctaccgcaatcgtggacggggctgagccogctgtagcgcagctactacggcgtgtgcccgtcaaacacgacgcagacgacg

ZmPox1_W64     810 cggatcacgacggccatggacccgggaacgcccaacgtgctggacaacaactactacaagc-tcctgcctcggcgatggg-ctcttctt
ZmPrx01_W22    804 cggatcacgacggccatggacccgggaacgcccaacgtgctggacaacaactactacaagc-tcctgcctcggcgatgggctctcttctt
ZmPrx01_HiII   757 cggatcacgacggccatggacccgggaacgcccaacgtgctggacaacaactactacaagc-tcctgcctcggcgatgggctctcttctt

ZmPox1_W64     899 ctccgacaaccgctgocggtgaaccocgagatggccgocgtggtgagcagcttcogctccaacgagacgctgtggaaggagaaattcgc
ZmPrx01_W22    893 ctccgacaaccgctgocggtgaaccocgagatggccgocgtggtgagcagcttcogctccaacgagacgctgtggaaggagaaattcgc
ZmPrx01_HiII   846 ctccgacaaccgctgocggtgaaccocgagatggccgocgtggtgagcagcttcogctccaacgagacgctgtggaaggagaaattcgc

ZmPox1_W64     989 gggggccatggttaaagatgggacgcatccagggtcagacagggacgtgocggagaggtccgtctcaactcggcgctcgtcaaccogagttc
ZmPrx01_W22    983 gggggccatggttaaagatgggacgcatccagggtcagacagggacgtgocggagaggtccgtctcaactcggcgctcgtcaaccogagttt
ZmPrx01_HiII   936 gggggccatggttaaagatgggacgcatccagggtcagacagggacgtgocggagaggtccgtctcaactcggcgctcgtcaaccogagttc

ZmPox1_W64     1079 gtactcgtcgtcgtcggcgggtggagctgggttcgagcgcgccagcagccgtcggtagaagggttacgcccggagctagtactcgcata
ZmPrx01_W22    1073 gtactcgtcgtcgtcggcgggtggagctgggttcgagcgcgccagcagccgtcggtagaagggttacgcccggagctagtactcgcata
ZmPrx01_HiII   1026 gtactcgtcgtcgtcggcgggtggagctgggttcgagcgcgccagcagccgtcggtagaagggttacgcccggagctagtactcgcata

ZmPox1_W64     1169 ccagttctcggcccgctcgttctgagatcaatgatttttttctctctcctcgcgatccctctctctcttttttttttttttctcgtg
ZmPrx01_W22    1163 ccagttctcggcccgctcgttctgagatcaat-----
ZmPrx01_HiII   -----

ZmPox1_W64     1259 actgtggtttttgtgtgctgatgatcttgtgtgtgcccagtgccactaaacgtacgcatgccggccggcgaactcttaactcgtggtg
ZmPrx01_W22    -----
ZmPrx01_HiII   -----

```

Abb. 91: Sequenzvergleich der codierenden Sequenz von *zmpxr01* aus den Maislinien W64A, W22 und Hi-II A x Hi-II B.

Anhang

Global Protein alignment. Reference molecule: ZmPox1_W64, Region 1 to 344
Sequences: 3. Scoring matrix: BLOSUM 62

Sequence View: Similarity Format, Color areas of high matches at same base position

ZmPox1_W64	1	-----mpaaaggdgp ra -vrvgfydtscpnaealvrqavaafakd gia aaglr l rhfhd c fvrgcdgsv
ZmPrx01_W22	1	makeskltagvaaal t vaacalc l llpata ---- raqlrvgydtscpnaealvrqavaafakd gia aaglr l rhfhd c fvrgcdgsv
ZmPrx01_HiII	1	makeskltagvaaal t vaacalc l llpata ---- raqlrvgydtscpnaealvrqavaafakd gia aaglr l rhfhd c fvrgcdgsv
ZmPox1_W64	64	lltvpngggqterdalpnnpslrgfdv ida aktaveqscprt v scadivafaardsisltgsvsyqvpagr r rdgrvsnatetvdlpppts
ZmPrx01_W22	87	lltvpngggqterdalpnnpslrgfdv ida aktaveqscprt v scadivafaardsisltgsvsyqvpagr r rdgrvsnatetvdlpppts
ZmPrx01_HiII	87	lltvpngggqterdalpnnpslrgfdv ida aktaveqscprt v scadivafaardsisltgsvsyqvpagr r rdgrvsnatetvdlpppts
ZmPox1_W64	154	taqsltdl f ka k elsvedm v lvs g ah t vg r sf c as f fk r vw n st n pataivdagl s psyaq l lralc p sn t t t g t pittam d pg t pn v l
ZmPrx01_W22	177	taqsltdl f ka k elsvedm v lvs g ah t vg r sf c as f fk r vw n st n pataivdagl s psyaq l lralc p sn t t t g t pittam d pg t pn v l
ZmPrx01_HiII	177	taqsltdl f ka k elsvedm v lvs g ah t vg r sf c as f fk r vw n st n pataivdagl s psyaq l lralc p sn t t t g t pittam d pg t pn v l
ZmPox1_W64	244	dnnyyk l pas r h g l f fs d np l r v np g ma l v s sf a ne t l w ke k faa m v k m g r i q v q t g t g e v r l n o g v v np s sy s s s s s avel g ss a p
ZmPrx01_W22	267	dnnyyk l l p r g m g l f fs d n q l r v n p g ma l v s sf a ne t l w ke k faa m v k m g r i q v q t g t g e v r l n o g v v np s sy s s s avel g ss a p
ZmPrx01_HiII	267	dnnyyk l l p r g m g l f fs d n q l r v n p g ma l v s sf a ne t l w ke k faa m v k m g r i q v q t g t g e v r l n o g v v np s sy s s s avel g ss a p
ZmPox1_W64	334	aavgeegy a as
ZmPrx01_W22	357	aavgeegy a as
ZmPrx01_HiII	357	aavgeegy a as

Abb. 92: Sequenzvergleich der Aminosäuresequenz von ZmPrx01 aus den Maislinien W64A, W22 und Hi-II A x Hi-II B.

Global DNA alignment. Reference molecule: ZmPrx70 B73, Region 1 to 966
Sequences: 3. Scoring matrix: Linear (Mismatch 2, OpenGap 4, ExtGap 1)

Sequence View: Similarity Format, Color areas of high matches at same base position

ZmPrx70_B73	1	atggctctctctctctcttacttcccttctcagtgatggtgctctcttctgcttagcggcgccggcggtggcctcggcgcaactgtcgccgaca
ZmPrx70_W22	1	atggctctctctctctcttacttcccttctcagtgatggtgctctcttctgcttagcggcgccggcggtggcctcggcgcaactgtcgccgaca
ZmPrx70_HiII	1	atggctctctctctctcttacttcccttctcagtgatggtgctctcttctgcttagcggcgccggcggtggcctcggcgcaactgtcgccgaca
ZmPrx70_B73	91	ttctactccaggctcgtgtcccagagctctcggccaccatcaaggccgcgctgacggccgctggtgocgaggagctcgcattggggcctcc
ZmPrx70_W22	91	ttctactccaggctcgtgtcccagagctctcggccaccatcaaggccgcgctgacggccgctggtgocgaggagctcgcattggggcctcc
ZmPrx70_HiII	91	ttctactccaggctcgtgtcccagagctctcggccaccatcaaggccgcgctgacggccgctggtgocgaggagctcgcattggggcctcc
ZmPrx70_B73	181	ctgctcaggctccactccatgactgcttcttccaaggttgogattgggtcggtgctgctgaatgacacggccacctccaccggcgagcag
ZmPrx70_W22	181	ctgctcaggctccactccatgactgcttcttccaaggttgogattgggtcggtgctgctgaatgacacggccacctccaccggcgagcag
ZmPrx70_HiII	181	ctgctcaggctccactccatgactgcttcttccaaggttgogattgggtcggtgctgctgaatgacacggccacctccaccggcgagcag
ZmPrx70_B73	271	accgtaataccgaacgtcggctccatcagagctctcggcgtcgtcgacaaacatcaaggccgaggtggaggcgtgtgccggcgctcgtc
ZmPrx70_W22	271	accgtaataccgaacgtcggctccatcagagctctcggcgtcgtcgacaaacatcaaggccgaggtggaggcgtgtgccggcgctcgtc
ZmPrx70_HiII	271	accgtaataccgaacgtcggctccatcagagctctcggcgtcgtcgacaaacatcaaggccgaggtggaggcgtgtgccggcgctcgtc
ZmPrx70_B73	361	tctgocggcagatcctcgcgctcgcgcccgcgactccgtcgtcgcgctgggaggcctctcgtggagggtgcttctcggcgaggggac
ZmPrx70_W22	361	tctgocggcagatcctcgcgctcgcgcccgcgactccgtcgtcgcgctgggaggcctctcgtggagggtgcttctcggcgaggggac
ZmPrx70_HiII	361	tctgocggcagatcctcgcgctcgcgcccgcgactccgtcgtcgcgctgggaggcctctcgtggagggtgcttctcggcgaggggac
ZmPrx70_B73	451	tgcagcagcggcagcctaaactctagccaacacagcagcctgccagcgcgctccctggacctcgccaaacctcaccgctcgttcgccagaag
ZmPrx70_W22	451	tgcagcagcggcagcctaaactctagccaacacagcagcctgccagcgcgctccctggacctcgccaaacctcaccgctcgttcgccagaag
ZmPrx70_HiII	451	tgcagcagcggcagcctaaactctagccaacacagcagcctgccagcgcgctccctggacctcgccaaacctcaccgctcgttcgccagaag
ZmPrx70_B73	541	cggctcagcaggaccgacctggtcgtctctcaggcgcgacacagatcgggctggcagctgcaagaactccggcgccacatatacaac
ZmPrx70_W22	541	cggctcagcaggaccgacctggtcgtctctcaggcgcgacacagatcgggctggcagctgcaagaactccggcgccacatatacaac
ZmPrx70_HiII	541	cggctcagcaggaccgacctggtcgtctctcaggcgcgacacagatcgggctggcagctgcaagaactccggcgccacatatacaac
ZmPrx70_B73	631	gacaccaactgaaacggcgttcgcaagcgtcgcagggccaaactgcccggcgccggcgaacggcgagcggcaacctggcgccgtg
ZmPrx70_W22	631	gacaccaactgaaacggcgttcgcaagcgtcgcagggccaaactgcccggcgccggcgaacggcgagcggcaacctggcgccgtg
ZmPrx70_HiII	631	gacaccaactgaaacggcgttcgcaagcgtcgcagggccaaactgcccggcgccggcgaacggcgagcggcaacctggcgccgtg
ZmPrx70_B73	721	gacacggccacccacccgcttcgacaacgctactacaccaactgctggcgagagagggctgctacactccgaccagcagctcttc
ZmPrx70_W22	721	gacacggccacccacccgcttcgacaacgctactacaccaactgctggcgagagagggctgctacactccgaccagcagctcttc
ZmPrx70_HiII	721	gacacggccacccacccgcttcgacaacgctactacaccaactgctggcgagagagggctgctacactccgaccagcagctcttc
ZmPrx70_B73	811	aacggcgccgcccacggcggcctggtccgcagctacgcgtccacggcggagggttcagcggggacttcggcgggccatgatcaggatg
ZmPrx70_W22	811	aacggcgccgcccacggcggcctggtccgcagctacgcgtccacggcggagggttcagcggggacttcggcgggccatgatcaggatg
ZmPrx70_HiII	811	aacggcgccgcccacggcggcctggtccgcagctacgcgtccacggcggagggttcagcggggacttcggcgggccatgatcaggatg
ZmPrx70_B73	901	ggcaacatcagcccgtcaccgggacgcaggccagatcaggcgcgctgtccagggtcaactag
ZmPrx70_W22	901	ggcaacatcagcccgtcaccgggacgcaggccagatcaggcgcgctgtccagggtcaactag
ZmPrx70_HiII	901	ggcaacatcagcccgtcaccgggacgcaggccagatcaggcgcgctgtccagggtcaactag

Abb. 93: Sequenzvergleich der codierenden Sequenz von *zmprx70* aus den Maislinien B73, W22 und Hi-II A x Hi-II B.

Global Protein alignment. Reference molecule: ZmPrx70 B73, Region 1 to 321
Sequences: 3. Scoring matrix: BLOSUM 62

Sequence View: Similarity Format, Color areas of high matches at same base position

ZmPrx70_B73	1	masssftslsvmvllclaaaavasaqlsptfysrscpralatikaavtaavaqearmgasllrlhfhdcfvqgcdgsvllndtatftgqg
ZmPrx70_W22	1	masssftslsvmvllclaaaavasaqlsptfysrscpralatikaavtaavaqearmgasllrlhfhdcfvqgcdgsvllndtatftgqg
ZmPrx70_HiII	1	masssftslsvmvllclaaaavasaqlsptfysrscpralatikaavtaavaqearmgasllrlhfhdcfvqgcdgsvllndtatftgqg
ZmPrx70_B73	91	tanpnvgsirgfgvvdnikaqveavcpgvvscadilavaardsvvalggpswrvllgrddsttasltlansdlpapsldlanltaafakk
ZmPrx70_W22	91	tanpnvgsirgfgvvdnikaqveavcpgvvscadilavaardsvvalggpswrvllgrddsttaslansdlpapsldlanltaafakk
ZmPrx70_HiII	91	tanpnvgsirgfgvvdnikaqveavcpgvvscadilavaardsvvalggpswrvllgrddsttaslansdlpapsldlanltaafakk
ZmPrx70_B73	181	rlsrtdlvalsgahtiglaqcknfrahiyndtnvnaafatrrancpaaagngdgnlapldtatptafdnayytnllaqrllhsdqqlf
ZmPrx70_W22	181	rlsrtdlvalsgahtiglaqcknfrahiyndtnvnaafatrrancpaaagngdgnlapldtatptafdnayytnllaqrllhsdqqlf
ZmPrx70_HiII	181	rlsrtdlvalsgahtiglaqcknfrahiyndtnvnaafatrrancpaaagngdgnlapldtatptafdnayytnllaqrllhsdqqlf
ZmPrx70_B73	271	nggatdglvrtyastprfrsrdfaaamirmgnisplgtgqgqirracsrvn
ZmPrx70_W22	271	nggatdglvrtyastprfrsrdfaaamirmgnisplgtgqgqirracsrvn
ZmPrx70_HiII	271	nggatdglvrtyastprfrsrdfaaamirmgnisplgtgqgqirracsrvn

Abb. 94: Sequenzvergleich der Aminosäuresequenz von ZmPrx70 aus den Maislinien B73, W22 und Hi-II A x Hi-II B.

Global DNA alignment. Reference molecule: ZmPrx66 B73, Region 1 to 963
Sequences: 3. Scoring matrix: Linear (Mismatch 2, OpenGap 4, ExtGap 1)

Sequence View: Similarity Format, Color areas of high matches at same base position

ZmPrx66_B73	1	atggcgccctctgtttctgcctcttgccctattagcctgtcgtcgttggcgggtggtgctggtggcgctggcgctggcgccgtcgccgcag
ZmPrx66_W22	1	atggcgccctctgtttctgcctcttgccctaaataggctgtcgtcgttggcgggtggtgctggtggcgctggcgctggcgccgtcgccgcag
ZmPrx66_HiII	1	atggcgccctctgtttctgcctcttgccctattagcctgtcgtcgttggcgggtggtgctggtggcgctggcgctggcgccgtcgccgcag
ZmPrx66_B73	91	ctgtcgtcagcgtttctacgacaggtcactgcccacacgcgctgtccaccatcaggagcggcgctgaactccgcggtgaggcaggagcctcgc
ZmPrx66_W22	91	ctgtcgtcagcgtttctacgacaggtcactgcccacacgcgctgtccaccatcaggagcggcgctgaactccgcggtgaggcaggaaacctcgc
ZmPrx66_HiII	91	ctgtcgtcagcgtttctacgacaggtcactgcccacacgcgctgtccaccatcaggagcggcgctgaactccgcggtgaggcaggagcctcgc
ZmPrx66_B73	181	gtggggcgctcgtcgtcaggctccatttccacgactgctttgtccggggctgcgacgcgctccctctcgtcgaacgacacgtcaggggag
ZmPrx66_W22	181	gtggggcgctcgtcgtcaggctccatttccacgactgctttgtccggggatgcgacgcgctccctctcgtcgaacgacacgtcaggggag
ZmPrx66_HiII	181	gtggggcgctcgtcgtcaggctccatttccacgactgctttgtccggggctgcgacgcgctccctctcgtcgaacgacacgtcaggggag
ZmPrx66_B73	271	cagagccaggcccgcaatctaactctgaaccccgaggggcttcgttgcgtgacacagcatcaaggcgcaggtggagtcctgtgtcccgggg
ZmPrx66_W22	271	cagagccaggcccgcaatctaactctgaaccccgaggggcttcgttgcgtgacacagcatcaaggcgcaggtggagtcctgtgtcccgggg
ZmPrx66_HiII	271	cagagccaggcccgcaatctaactctgaaccccgaggggcttcgttgcgtgacacagcatcaaggcgcaggtggagtcctgtgtcccgggg
ZmPrx66_B73	361	atcgtctcctgcgcccacatactcgcctggcgcggcgacggagtcgtagcgtcggcgggccttcgtggacagttctactagggcga
ZmPrx66_W22	361	atcgtctcctgcgcccacatactcgcctggcgcggcgacggagtcgtagcgtcggcgggccttcgtggacagttctactagggcga
ZmPrx66_HiII	361	atcgtctcctgcgcccacatactcgcctggcgcggcgacggagtcgtagcgtcggcgggccttcgtggacagttctactagggcga
ZmPrx66_B73	451	agggactctaccgcttcatctccagggccagacaagcgcactcccacctccgacgtctagcctccgacagcttttgcctgcgtataacaag
ZmPrx66_W22	451	agggactctaccgcttcatctccagggccagacaagcgcactcccacctccgacgtctagcctccgacagcttttgcctgcgtataacaag
ZmPrx66_HiII	451	agggactctaccgcttcatctccagggccagacaagcgcactcccacctccgacgtctagcctccgacagcttttgcctgcgtataacaag
ZmPrx66_B73	541	aagaacctcaacccaaccgacatggttgcaactctcaggagctcacacgatcggacagggcgcagtgcctcagacttcaacgaccacatctac
ZmPrx66_W22	541	aagaacctcaacccaaccgacatggttgcaactctcaggagctcacacgatcggacagggcgcagtgcctcagacttcaacgaccacatctac
ZmPrx66_HiII	541	aagaacctcaacccaaccgacatggttgcaactctcaggagctcacacgatcggacagggcgcagtgcctcagacttcaacgaccacatctac
ZmPrx66_B73	631	aacgacaccaacatcaactccgcttcggcgctcgtcaggcccaactgcccaggggcaggcagcaccgccccttgcgcccgtggacacc
ZmPrx66_W22	631	aacgacaccaacatcaactccgcttcggcgctcgtcaggcccaactgcccaggggcaggcagcaccgccccttgcgcccgtggacacc
ZmPrx66_HiII	631	aacgacaccaacatcaactccgcttcggcgctcgtcaggcccaactgcccaggggcaggcagcaccgccccttgcgcccgtggacacc
ZmPrx66_B73	721	acgacgccccaacgcgttcgacaaacgcctactacaccaactgctgtcccagaaggggctcctgcactcggaccaggagctcttcaacagc
ZmPrx66_W22	721	acgacgccccaacgcgttcgacaaacgcctactacaccaactgctgtcccagaaggggctcctgcactcggaccaggagctcttcaacagc
ZmPrx66_HiII	721	acgacgccccaacgcgttcgacaaacgcctactacaccaactgctgtcccagaaggggctcctgcactcggaccaggagctcttcaacagc
ZmPrx66_B73	811	ggcagcacccgacagcagcgggtcaggagcttcgcgtccagcagcgtcggccttcaacagcgccttcgcccagggccttggcagatgggcaac
ZmPrx66_W22	811	ggcagcacccgacagcagcgggtcaggagcttcgcgtccagcagcgtcggccttcaacagcgccttcgcccagggccttggcagatgggcaac
ZmPrx66_HiII	811	ggcagcacccgacagcagcgggtcaggagcttcgcgtccagcagcgtcggccttcaacagcgccttcgcccagggccttggcagatgggcaac
ZmPrx66_B73	901	ctcagccccagaccggaaacccaggggcagatcaggcgcagctgctggaaggtcaactcgtaa
ZmPrx66_W22	901	ctcagccccagaccggaaacccaggggcagatcaggcgcagctgctggaaggtcaactcgtaa
ZmPrx66_HiII	901	ctcagccccagaccggaaacccaggggcagatcaggcgcagctgctggaaggtcaactcgtaa

Abb. 95: Sequenzvergleich der codierenden Sequenz von *zmpvx66* aus den Maislinien B73, W22 und Hi-II A x Hi-II B.

Anhang

Global Protein alignment. Reference molecule: ZmPrx66 B73, Region 1 to 320
Sequences: 3. Scoring matrix: BLOSUM 62

Sequence View: Similarity Format, Color areas of high matches at same base position

```
ZmPrx66_B73          1  maasvsasclislsllavvlvalasaasaqlsstfydrscpnalstirsgvnsavrqepvrgasllrlhfhdcfvrgcdaslllndtsge
EF059719.1         1  maasvsasclnrllsllavvlvalasaasaqlsstfydrscpnalstirsgvnsavrqepvrgasllrlhfhdcfvrgcdaslllndtsge
ZmPrx66_HiII       1  maasvsasclislsllavvlvalasaasaqlsstfydrscpnalstirsgvnsavrqepvrgasllrlhfhdcfvrgcdaslllndtsge

ZmPrx66_B73          91  qsqqpnltlnprgfvvnsikaqvesvcpgivscadilavaardgvvalggpewtvlgrrdstasfpgqtsdlpppteslrqllsaynk
EF059719.1         91  qsqqpnltlnprgfvvnsikaqvesvcpgivscadilavaardgvvalggpewtvlgrrdstasfagqtsdlpppteslrqllsaynk
ZmPrx66_HiII       91  qsqqpnltlnprgfvvnsikaqvesvcpgivscadilavaardgvvalggpewtvlgrrdstasfpgqtsdlpppteslrqllsaynk

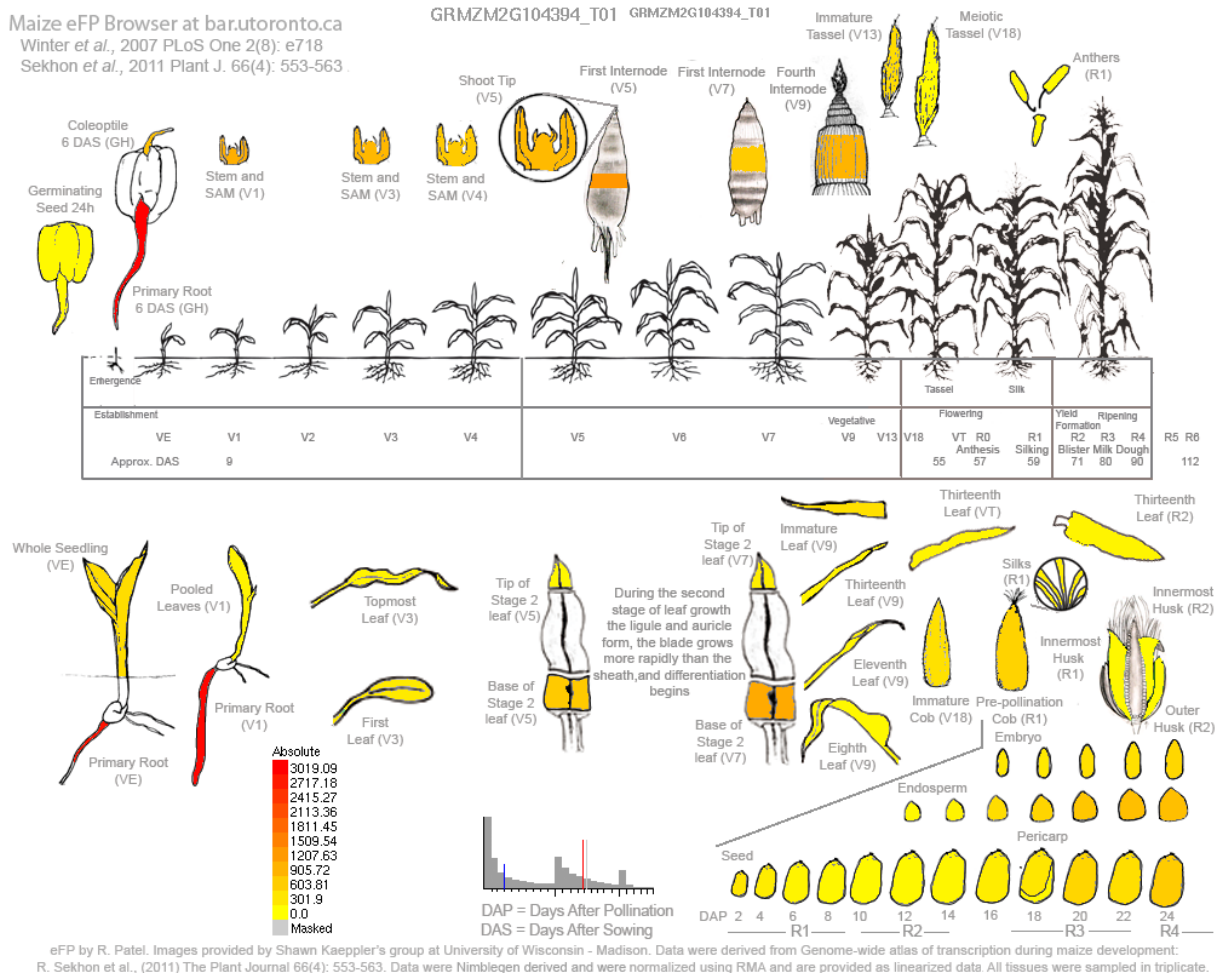
ZmPrx66_B73          181 knlnptdmvalsgahtigqaqcscsfndhiyndtninsafaaslrancpragstalapldtttfnafdnayytnllsqkllhsdqelfns
EF059719.1         181 knlnptdmvalsgahtigqaqcscsfndhiyndtninsafaaslrancpragstalapldtttfnafdnayytnllsqkllhsdqelfns
ZmPrx66_HiII       181 knlnptdmvalsgahtigqaqcscsfndhiyndtninsafaaslrancpragstalapldtttfnafdnayytnllsqkllhsdqelfns

ZmPrx66_B73          271 gstdstvrsvfasstsafnsafatamvkmgnlspqtgtqqqirrcwkvns
EF059719.1         271 gstdstvrsvfasstsafnsafatamvkmgnlspqtgtqqqirrcwkvns
ZmPrx66_HiII       271 gstdstvrsvfasstsafnsafatamvkmgnlspqtgtqqqirrcwkvns
```

Abb. 96: Sequenzvergleich der Aminosäuresequenz von ZmPrx66 aus den Maislinien B73, W22 und Hi-II A x Hi-II B.

Maize eFP Browser at bar.utoronto.ca
 Winter *et al.*, 2007 PLoS One 2(8): e718
 Sekhon *et al.*, 2011 Plant J. 66(4): 553-563.

GRMZM2G104394_T01 GRMZM2G104394_T01



eFP by R. Patel. Images provided by Shawn Kaeppeler's group at University of Wisconsin - Madison. Data were derived from Genome-wide atlas of transcription during maize development: R. Sekhon *et al.*, (2011) The Plant Journal 66(4): 553-563. Data were Nimblegen derived and were normalized using RMA and are provided as linearized data. All tissues were sampled in triplicate.

Abb. 97: Analyse der Expressionsstärke von *zmprx01* in verschiedenen Geweben während der Maisentwicklung basierend auf ESTs (Sekhon *et al.*, 2011). Dargestellt wird diese durch den eFP Browser (Winter *et al.*, 2007).

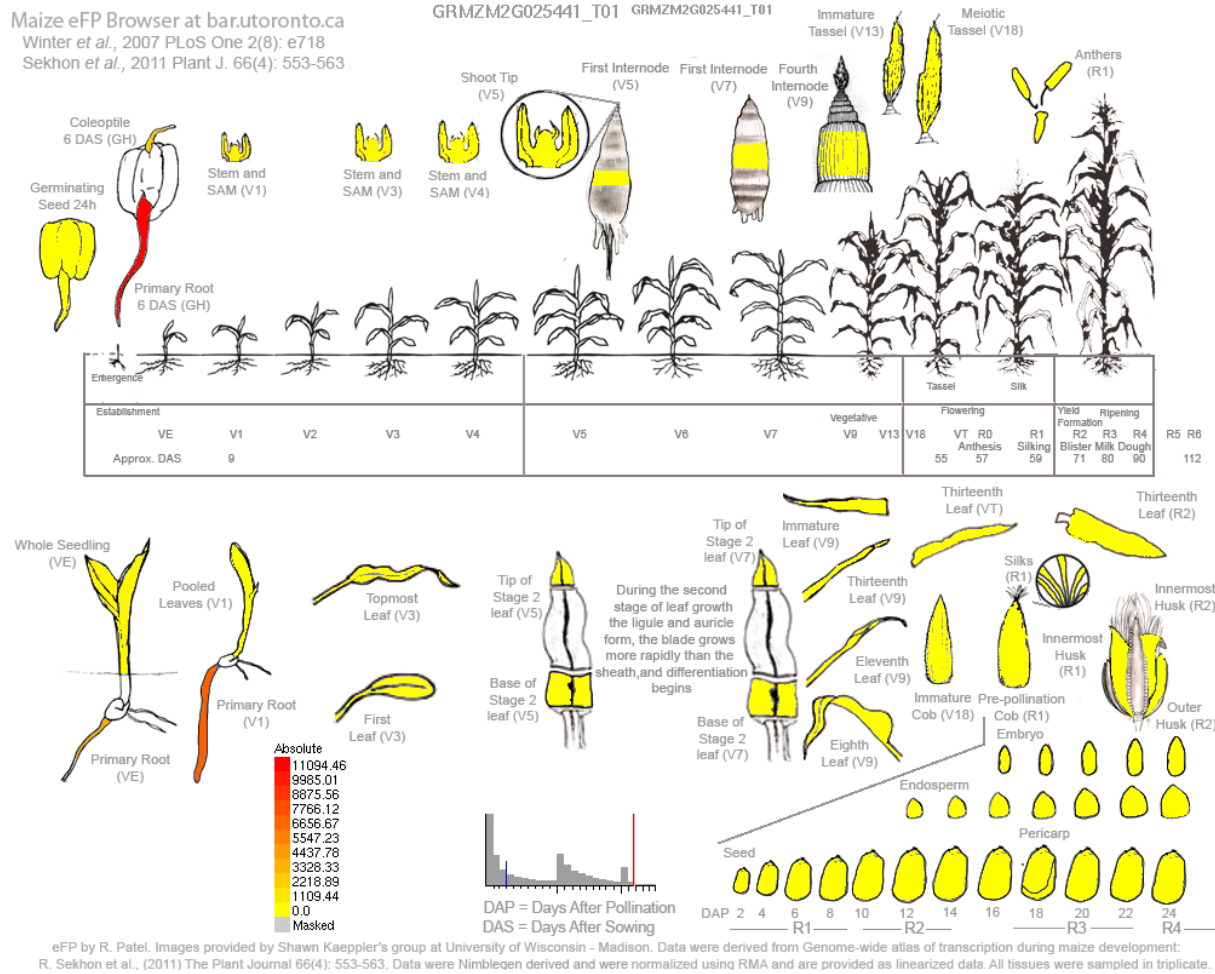


Abb. 98: Analyse der Expressionsstärke von *zmprx70* in verschiedenen Geweben während der Maisentwicklung basierend auf ESTs (Sekhon *et al.*, 2011). Dargestellt wird diese durch den eFP Browser (Winter *et al.*, 2007).

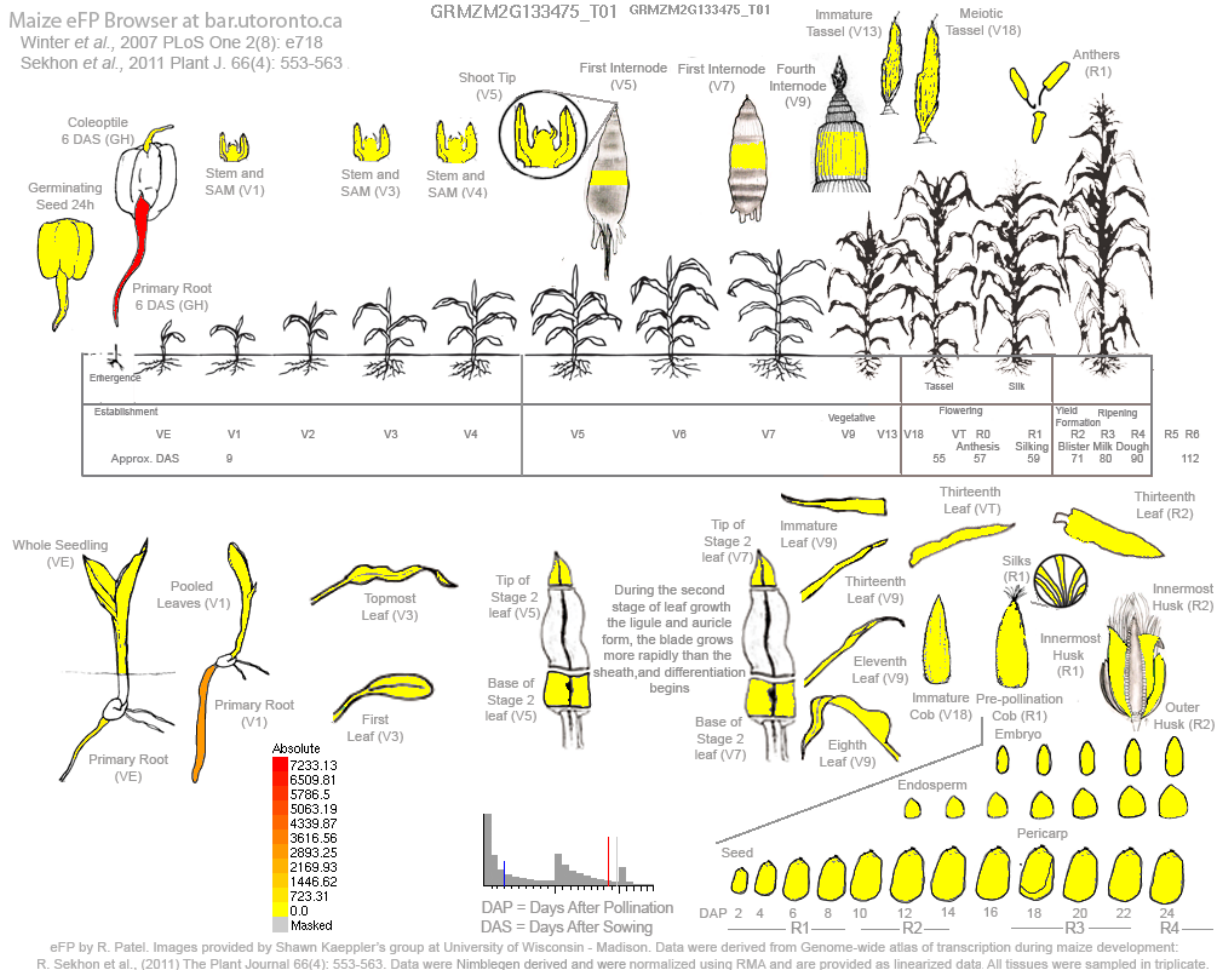


Abb. 99: Analyse der Expressionsstärke von *zmprx66* in verschiedenen Geweben während der Maisentwicklung basierend auf ESTs (Sekhon *et al.*, 2011). Dargestellt wird diese durch den eFP Browser (Winter *et al.*, 2007).

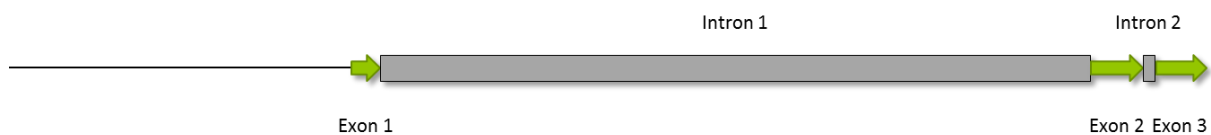


Abb. 100: Darstellung der gDNA von *ZmPrx01* auf Basis der Maislinie B73 (GRMZM2G104394). Zu erkennen ist die Intron- und Exonstruktur und die Größe der einzelnen Elemente.

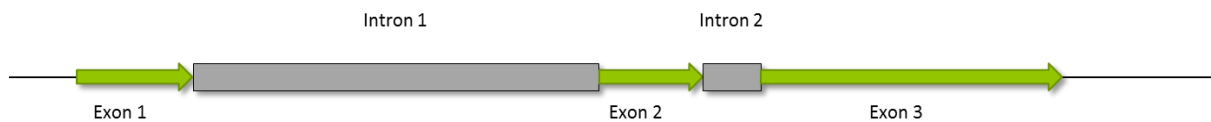


Abb. 101: Darstellung der gDNA von *ZmPrx70* auf Basis der Maislinie B73 (GRMZM2G025441). Zu erkennen ist die Intron- und Exonstruktur und die Größe der einzelnen Elemente.

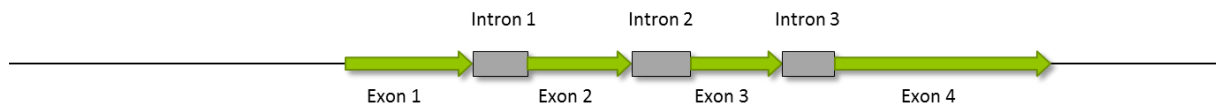


Abb. 102: Darstellung der gDNA von ZmPrx66 auf Basis der Maislinie B73 (GRMZM2G133475). Zu erkennen ist die Intron- und Exonstruktur und die Größe der einzelnen Elemente.

Tab. 25: Analyse der Region 2 kbp stromaufwärts (-2000) des *zmprx01*-Gens durch PLACE.

Element	Position	Strang	Motiv	Funktion
-10PEHVPSBD	667	(-)	TATTCT	psbD; chloroplast gene expression; circadian rhythms; light regulation
-10PEHVPSBD	1305	(-)	TATTCT	psbD; chloroplast gene expression; circadian rhythms; light regulation
-10PEHVPSBD	1330	(-)	TATTCT	psbD; chloroplast gene expression; circadian rhythms; light regulation
-300ELEMENT	1042	(+)	TGHAARK	-300 element; hordein; gliadin; glutenin; seed;
2SSEEDPROTB ANAPA	1699	(+)	CAAACAC	storage protein; ABRE; napA; 2S; seed;
2SSEEDPROTB ANAPA	1370	(-)	CAAACAC	storage protein; ABRE; napA; 2S; seed;
ABRELATERD 1	1266	(+)	ACGTG	ABRE; etiolation; erd;
ABRELATERD 1	1368	(+)	ACGTG	ABRE; etiolation; erd;
ABRELATERD 1	1265	(-)	ACGTG	ABRE; etiolation; erd;
ABRELATERD 1	1367	(-)	ACGTG	ABRE; etiolation; erd;
ABRELATERD 1	1703	(-)	ACGTG	ABRE; etiolation; erd;
ABRELATERD 1	1759	(-)	ACGTG	ABRE; etiolation; erd;
ABRERATCAL	1265	(+)	MACGYGB	ABRE; calcium;
ABRERATCAL	1367	(+)	MACGYGB	ABRE; calcium;
ACGTATERD1	171	(+)	ACGT	ACGT; etiolation; erd;
ACGTATERD1	870	(+)	ACGT	ACGT; etiolation; erd;
ACGTATERD1	1266	(+)	ACGT	ACGT; etiolation; erd;
ACGTATERD1	1368	(+)	ACGT	ACGT; etiolation; erd;
ACGTATERD1	1704	(+)	ACGT	ACGT; etiolation; erd;
ACGTATERD1	1760	(+)	ACGT	ACGT; etiolation; erd;
ACGTATERD1	1922	(+)	ACGT	ACGT; etiolation; erd;
ACGTATERD1	171	(-)	ACGT	ACGT; etiolation; erd;
ACGTATERD1	870	(-)	ACGT	ACGT; etiolation; erd;
ACGTATERD1	1266	(-)	ACGT	ACGT; etiolation; erd;
ACGTATERD1	1368	(-)	ACGT	ACGT; etiolation; erd;
ACGTATERD1	1704	(-)	ACGT	ACGT; etiolation; erd;
ACGTATERD1	1760	(-)	ACGT	ACGT; etiolation; erd;
ACGTATERD1	1922	(-)	ACGT	ACGT; etiolation; erd;
ACGTCBOX	1921	(+)	GACGTC	C-box; ACGT element; seed;
ACGTCBOX	1921	(-)	GACGTC	C-box; ACGT element; seed;
AGCBOXNPGL B	144	(-)	AGCCGCC	AGC box; GLB; ERE; ERFs; Ethylene; GCC-box; Neutral PR-5; osmotin-like protein; EREBP2; MAPK; BWMK1; PR box;
AGCBOXNPGL B	544	(-)	AGCCGCC	AGC box; GLB; ERE; ERFs; Ethylene; GCC-box; Neutral PR-5; osmotin-like protein; EREBP2; MAPK; BWMK1; PR box;
AGCBOXNPGL B	948	(-)	AGCCGCC	AGC box; GLB; ERE; ERFs; Ethylene; GCC-box; Neutral PR-5; osmotin-like protein; EREBP2; MAPK; BWMK1; PR box;

AMYBOX1	1279	(-)	TAACARA	amylase; seed;
ANAERO1CO NSENSUS	1545	(-)	AAACAAA	anaerobic
ARR1AT	1540	(+)	NGATT	ARR1; Response regulator; Cytokinin
ARR1AT	939	(-)	NGATT	ARR1; Response regulator; Cytokinin
ARR1AT	1135	(-)	NGATT	ARR1; Response regulator; Cytokinin
ARR1AT	1188	(-)	NGATT	ARR1; Response regulator; Cytokinin
ARR1AT	1649	(-)	NGATT	ARR1; Response regulator; Cytokinin
ARR1AT	1786	(-)	NGATT	ARR1; Response regulator; Cytokinin
ASF1MOTIFC AMV	499	(+)	TGACG	TGACG; root; leaf; CaMV; 35S; promoter; auxin; salicylic acid; light; as-1; TGA1a, TGA1b; CREB; ASF1; TGA6; shoot; xenobiotic; stress; SAR; SA; Disease resistance;
ASF1MOTIFC AMV	1024	(+)	TGACG	TGACG; root; leaf; CaMV; 35S; promoter; auxin; salicylic acid; light; as-1; TGA1a, TGA1b; CREB; ASF1; TGA6; shoot; xenobiotic; stress; SAR; SA; Disease resistance;
ASF1MOTIFC AMV	1257	(+)	TGACG	TGACG; root; leaf; CaMV; 35S; promoter; auxin; salicylic acid; light; as-1; TGA1a, TGA1b; CREB; ASF1; TGA6; shoot; xenobiotic; stress; SAR; SA; Disease resistance;
BIHD1OS	1409	(+)	TGTCA	HD; homeodomain;
BIHD1OS	1437	(+)	TGTCA	HD; homeodomain;
BIHD1OS	214	(-)	TGTCA	HD; homeodomain;
BIHD1OS	289	(-)	TGTCA	HD; homeodomain;
BIHD1OS	768	(-)	TGTCA	HD; homeodomain;
BIHD1OS	1450	(-)	TGTCA	HD; homeodomain;
BOXCPSAS1	629	(-)	CTCCAC	BOX C; AS; AS1; AS1 is negatively regulated by light;
BOXIINTPATP B	221	(+)	ATAGAA	plastid; NEP; atpB; PatpB; NCII; Box I; Box II;
BOXIINTPATP B	621	(+)	ATAGAA	plastid; NEP; atpB; PatpB; NCII; Box I; Box II;
BOXIINTPATP B	665	(+)	ATAGAA	plastid; NEP; atpB; PatpB; NCII; Box I; Box II;
BOXIINTPATP B	1031	(+)	ATAGAA	plastid; NEP; atpB; PatpB; NCII; Box I; Box II;
BOXIINTPATP B	1397	(+)	ATAGAA	plastid; NEP; atpB; PatpB; NCII; Box I; Box II;
BOXLCOREDC PAL	899	(+)	ACCWWCC	MYB; R2R3 type; PAL: Elicitor; UV-B; Dilution;
BS1EGCCR	140	(+)	AGCGGG	cinnamoyl-CoA reductase; vascular; BS1; stem;
BS1EGCCR	944	(+)	AGCGGG	cinnamoyl-CoA reductase; vascular; BS1; stem;
CAATBOX1	1291	(+)	CAAT	CAAT; legA; seed;
CAATBOX1	1395	(+)	CAAT	CAAT; legA; seed;
CAATBOX1	1558	(+)	CAAT	CAAT; legA; seed;
CAATBOX1	6	(-)	CAAT	CAAT; legA; seed;
CAATBOX1	285	(-)	CAAT	CAAT; legA; seed;
CAATBOX1	304	(-)	CAAT	CAAT; legA; seed;
CAATBOX1	687	(-)	CAAT	CAAT; legA; seed;
CAATBOX1	703	(-)	CAAT	CAAT; legA; seed;
CAATBOX1	1100	(-)	CAAT	CAAT; legA; seed;
CAATBOX1	1495	(-)	CAAT	CAAT; legA; seed;
CAATBOX1	1537	(-)	CAAT	CAAT; legA; seed;
CAATBOX1	1822	(-)	CAAT	CAAT; legA; seed;
CAATBOX1	1913	(-)	CAAT	CAAT; legA; seed;
CAATBOX1	1929	(-)	CAAT	CAAT; legA; seed;
CACGTGMOTI F	1265	(+)	CACGTG	G box; G-box; rbcs; chs; ACGT element; adh; Bz-2; R-motif; STR; GT-1; GBF; elicitor; bZIP; napin; strictosidine synthase; cell; leaf; shoot; Pti4; ERF; PR;

Anhang

CACGTGMOTI F	1367	(+)	CACGTG	G box; G-box; rbc; chs; ACGT element; adh; Bz-2; R-motif; STR; GT-1; GBF; elicitor; bZIP; napin; strictosidine synthase; cell; leaf; shoot; Pti4; ERF; PR;
CACGTGMOTI F	1265	(-)	CACGTG	G box; G-box; rbc; chs; ACGT element; adh; Bz-2; R-motif; STR; GT-1; GBF; elicitor; bZIP; napin; strictosidine synthase; cell; leaf; shoot; Pti4; ERF; PR;
CACGTGMOTI F	1367	(-)	CACGTG	G box; G-box; rbc; chs; ACGT element; adh; Bz-2; R-motif; STR; GT-1; GBF; elicitor; bZIP; napin; strictosidine synthase; cell; leaf; shoot; Pti4; ERF; PR;
CACTFTPPCA1	58	(+)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	78	(+)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	325	(+)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	401	(+)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	454	(+)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	474	(+)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	530	(+)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	803	(+)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	856	(+)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	876	(+)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	881	(+)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	1412	(+)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	1447	(+)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	1195	(+)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	218	(-)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	228	(-)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	281	(-)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	293	(-)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	313	(-)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	540	(-)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	618	(-)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	628	(-)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	683	(-)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	715	(-)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	778	(-)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	1038	(-)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	1096	(-)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	1128	(-)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	1167	(-)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	1336	(-)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	1534	(-)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	1797	(-)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	1853	(-)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	1951	(-)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	1960	(-)	YACT	mesohpyll; CACT;
CANBNNAPA	1699	(+)	CNAACAC	(CA)n element; napA; napin; seed; storage protein;
CANBNNAPA	1370	(-)	CNAACAC	(CA)n element; napA; napin; seed; storage protein;
CAREOSREP1	1082	(-)	CAACTC	aleurone; GARE; gibberellin; seed;
CARGCW8GA T	1569	(+)	CWWWWWWW WG	CArG; AGL15; AGAMOUS; MADS;
CARGCW8GA T	1789	(+)	CWWWWWWW WG	CArG; AGL15; AGAMOUS; MADS;

CARGCW8GAT	1569	(-)	CWWWWWWW WG	CArG; AGL15; AGAMOUS; MADS;
CARGCW8GAT	1789	(-)	CWWWWWWW WG	CArG; AGL15; AGAMOUS; MADS;
CBFHV	1873	(+)	RYCGAC	CBF; AP2 domain; CRT/DRE; low temperature;
CBFHV	1241	(+)	RYCGAC	CBF; AP2 domain; CRT/DRE; low temperature;
CCAATBOX1	1394	(+)	CCAAT	HSE (Heat shock element); CCAAT box;
CCAATBOX1	6	(-)	CCAAT	HSE (Heat shock element); CCAAT box;
CCAATBOX1	1495	(-)	CCAAT	HSE (Heat shock element); CCAAT box;
CCAATBOX1	1537	(-)	CCAAT	HSE (Heat shock element); CCAAT box;
CEREGLUBOX 1PSLEGA	1245	(-)	TGTTAAAGT	cereal; glutenin; legumin; legA; seed;
CGACGOSAM Y3	169	(+)	CGACG	amylase
CGACGOSAM Y3	905	(+)	CGACG	amylase
CGACGOSAM Y3	1920	(+)	CGACG	amylase
CGACGOSAM Y3	1979	(+)	CGACG	amylase
CMSRE1IBSP OA	565	(+)	TGGACGG	sucrose; sporamin; sugar-induced; SpoA;
CPBCSPOR	1530	(+)	TATTAG	cytokinin; chlorophyll; chloroplast;
CTRMCAV3 5S	884	(+)	TCTCTCTCT	CaMV 35S; enhancer;
CTRMCAV3 5S	886	(+)	TCTCTCTCT	CaMV 35S; enhancer;
CTRMCAV3 5S	888	(+)	TCTCTCTCT	CaMV 35S; enhancer;
CURECORECR	1961	(+)	GTAC	copper; oxygen; hypoxic;
CURECORECR	1961	(-)	GTAC	copper; oxygen; hypoxic;
DOFCOREZM	20	(+)	AAAG	Dof; C4PEPC; CyPPDK; PEPC; C4; leaf; shoot;
DOFCOREZM	50	(+)	AAAG	Dof; C4PEPC; CyPPDK; PEPC; C4; leaf; shoot;
DOFCOREZM	226	(+)	AAAG	Dof; C4PEPC; CyPPDK; PEPC; C4; leaf; shoot;
DOFCOREZM	416	(+)	AAAG	Dof; C4PEPC; CyPPDK; PEPC; C4; leaf; shoot;
DOFCOREZM	446	(+)	AAAG	Dof; C4PEPC; CyPPDK; PEPC; C4; leaf; shoot;
DOFCOREZM	616	(+)	AAAG	Dof; C4PEPC; CyPPDK; PEPC; C4; leaf; shoot;
DOFCOREZM	626	(+)	AAAG	Dof; C4PEPC; CyPPDK; PEPC; C4; leaf; shoot;
DOFCOREZM	818	(+)	AAAG	Dof; C4PEPC; CyPPDK; PEPC; C4; leaf; shoot;
DOFCOREZM	1036	(+)	AAAG	Dof; C4PEPC; CyPPDK; PEPC; C4; leaf; shoot;
DOFCOREZM	1311	(+)	AAAG	Dof; C4PEPC; CyPPDK; PEPC; C4; leaf; shoot;
DOFCOREZM	1386	(+)	AAAG	Dof; C4PEPC; CyPPDK; PEPC; C4; leaf; shoot;
DOFCOREZM	1730	(+)	AAAG	Dof; C4PEPC; CyPPDK; PEPC; C4; leaf; shoot;
DOFCOREZM	1740	(+)	AAAG	Dof; C4PEPC; CyPPDK; PEPC; C4; leaf; shoot;
DOFCOREZM	1826	(+)	AAAG	Dof; C4PEPC; CyPPDK; PEPC; C4; leaf; shoot;
DOFCOREZM	347	(-)	AAAG	Dof; C4PEPC; CyPPDK; PEPC; C4; leaf; shoot;
DOFCOREZM	749	(-)	AAAG	Dof; C4PEPC; CyPPDK; PEPC; C4; leaf; shoot;
DOFCOREZM	966	(-)	AAAG	Dof; C4PEPC; CyPPDK; PEPC; C4; leaf; shoot;
DOFCOREZM	1138	(-)	AAAG	Dof; C4PEPC; CyPPDK; PEPC; C4; leaf; shoot;
DOFCOREZM	1246	(-)	AAAG	Dof; C4PEPC; CyPPDK; PEPC; C4; leaf; shoot;
DOFCOREZM	1414	(-)	AAAG	Dof; C4PEPC; CyPPDK; PEPC; C4; leaf; shoot;
DOFCOREZM	1710	(-)	AAAG	Dof; C4PEPC; CyPPDK; PEPC; C4; leaf; shoot;

Anhang

DOFCOREZM	1782	(-)	AAAG	Dof; C4PEPC; CyPPDK; PEPC; C4; leaf; shoot;
DOFCOREZM	1789	(-)	AAAG	Dof; C4PEPC; CyPPDK; PEPC; C4; leaf; shoot;
DOFCOREZM	1844	(-)	AAAG	Dof; C4PEPC; CyPPDK; PEPC; C4; leaf; shoot;
DPBFCOREDC DC3	1367	(-)	ACACNNG	Dc3; lea class gene; embryo; ABA; DPBF-1, DPBF-2; bZIP; GIA1;
DRECRTORE AT	1241	(+)	RCCGAC	DRE/CRT; drought; high-light; cold; DREB; DREB1; DREB2; CBF;
EBOXBNNAPA	200	(+)	CANNTG	napA; storage protein; ABRE; E-box; seed;
EBOXBNNAPA	437	(+)	CANNTG	napA; storage protein; ABRE; E-box; seed;
EBOXBNNAPA	552	(+)	CANNTG	napA; storage protein; ABRE; E-box; seed;
EBOXBNNAPA	600	(+)	CANNTG	napA; storage protein; ABRE; E-box; seed;
EBOXBNNAPA	839	(+)	CANNTG	napA; storage protein; ABRE; E-box; seed;
EBOXBNNAPA	856	(+)	CANNTG	napA; storage protein; ABRE; E-box; seed;
EBOXBNNAPA	956	(+)	CANNTG	napA; storage protein; ABRE; E-box; seed;
EBOXBNNAPA	1004	(+)	CANNTG	napA; storage protein; ABRE; E-box; seed;
EBOXBNNAPA	1010	(+)	CANNTG	napA; storage protein; ABRE; E-box; seed;
EBOXBNNAPA	1208	(+)	CANNTG	napA; storage protein; ABRE; E-box; seed;
EBOXBNNAPA	1265	(+)	CANNTG	napA; storage protein; ABRE; E-box; seed;
EBOXBNNAPA	1367	(+)	CANNTG	napA; storage protein; ABRE; E-box; seed;
EBOXBNNAPA	1851	(+)	CANNTG	napA; storage protein; ABRE; E-box; seed;
EBOXBNNAPA	200	(-)	CANNTG	napA; storage protein; ABRE; E-box; seed;
EBOXBNNAPA	437	(-)	CANNTG	napA; storage protein; ABRE; E-box; seed;
EBOXBNNAPA	552	(-)	CANNTG	napA; storage protein; ABRE; E-box; seed;
EBOXBNNAPA	600	(-)	CANNTG	napA; storage protein; ABRE; E-box; seed;
EBOXBNNAPA	839	(-)	CANNTG	napA; storage protein; ABRE; E-box; seed;
EBOXBNNAPA	856	(-)	CANNTG	napA; storage protein; ABRE; E-box; seed;
EBOXBNNAPA	956	(-)	CANNTG	napA; storage protein; ABRE; E-box; seed;
EBOXBNNAPA	1004	(-)	CANNTG	napA; storage protein; ABRE; E-box; seed;
EBOXBNNAPA	1010	(-)	CANNTG	napA; storage protein; ABRE; E-box; seed;
EBOXBNNAPA	1208	(-)	CANNTG	napA; storage protein; ABRE; E-box; seed;
EBOXBNNAPA	1265	(-)	CANNTG	napA; storage protein; ABRE; E-box; seed;
EBOXBNNAPA	1367	(-)	CANNTG	napA; storage protein; ABRE; E-box; seed;
EBOXBNNAPA	1851	(-)	CANNTG	napA; storage protein; ABRE; E-box; seed;
ECCRCAH1	1132	(-)	GANTTNC	low-CO ₂ ;
ELRECOREPCR P1	1374	(+)	TTGACC	Elicitor; PR1; EIRE; ELRE; ERE; W box; WRKY1; palindrome; salicylic acid; TMV;
ERELEE4	1695	(+)	AWTTCAAA	Ethylene; E4; GST1; senescence; ERE; fruit;
GAREAT	1249	(+)	TAACAAR	GARE; GA;
GAREAT	1279	(-)	TAACAAR	GARE; GA;
GATABOX	272	(+)	GATA	ASF-2; GATA box; Cab; chlorophyll a/b binding protein; leaf; shoot;
GATABOX	382	(+)	GATA	ASF-2; GATA box; Cab; chlorophyll a/b binding protein; leaf; shoot;
GATABOX	673	(+)	GATA	ASF-2; GATA box; Cab; chlorophyll a/b binding protein; leaf; shoot;
GATABOX	710	(+)	GATA	ASF-2; GATA box; Cab; chlorophyll a/b binding protein; leaf; shoot;
GATABOX	784	(+)	GATA	ASF-2; GATA box; Cab; chlorophyll a/b binding protein; leaf; shoot;
GATABOX	1028	(+)	GATA	ASF-2; GATA box; Cab; chlorophyll a/b binding protein; leaf; shoot;
GATABOX	1069	(+)	GATA	ASF-2; GATA box; Cab; chlorophyll a/b binding protein; leaf; shoot;
GATABOX	1087	(+)	GATA	ASF-2; GATA box; Cab; chlorophyll a/b binding protein; leaf; shoot;

GATABOX	1123	(+)	GATA	ASF-2; GATA box; Cab; chlorophyll a/b binding protein; leaf; shoot;
GATABOX	1145	(+)	GATA	ASF-2; GATA box; Cab; chlorophyll a/b binding protein; leaf; shoot;
GATABOX	1173	(+)	GATA	ASF-2; GATA box; Cab; chlorophyll a/b binding protein; leaf; shoot;
GATABOX	1635	(+)	GATA	ASF-2; GATA box; Cab; chlorophyll a/b binding protein; leaf; shoot;
GATABOX	1655	(+)	GATA	ASF-2; GATA box; Cab; chlorophyll a/b binding protein; leaf; shoot;
GATABOX	1768	(+)	GATA	ASF-2; GATA box; Cab; chlorophyll a/b binding protein; leaf; shoot;
GATABOX	95	(-)	GATA	ASF-2; GATA box; Cab; chlorophyll a/b binding protein; leaf; shoot;
GATABOX	1478	(-)	GATA	ASF-2; GATA box; Cab; chlorophyll a/b binding protein; leaf; shoot;
GATABOX	1869	(-)	GATA	ASF-2; GATA box; Cab; chlorophyll a/b binding protein; leaf; shoot;
GCCCORE	144	(-)	GCCGCC	GCC; GCC-box; ERE; JA; Pti4; ERF; PR;
GCCCORE	544	(-)	GCCGCC	GCC; GCC-box; ERE; JA; Pti4; ERF; PR;
GCCCORE	579	(-)	GCCGCC	GCC; GCC-box; ERE; JA; Pti4; ERF; PR;
GCCCORE	948	(-)	GCCGCC	GCC; GCC-box; ERE; JA; Pti4; ERF; PR;
GT1CONSENSUS	17	(+)	GRWAAW	GT-1; light; TATA; TFIIA; TBP; HR; SAR; TMV; leaf; shoot;
GT1CONSENSUS	29	(+)	GRWAAW	GT-1; light; TATA; TFIIA; TBP; HR; SAR; TMV; leaf; shoot;
GT1CONSENSUS	30	(+)	GRWAAW	GT-1; light; TATA; TFIIA; TBP; HR; SAR; TMV; leaf; shoot;
GT1CONSENSUS	233	(+)	GRWAAW	GT-1; light; TATA; TFIIA; TBP; HR; SAR; TMV; leaf; shoot;
GT1CONSENSUS	234	(+)	GRWAAW	GT-1; light; TATA; TFIIA; TBP; HR; SAR; TMV; leaf; shoot;
GT1CONSENSUS	413	(+)	GRWAAW	GT-1; light; TATA; TFIIA; TBP; HR; SAR; TMV; leaf; shoot;
GT1CONSENSUS	425	(+)	GRWAAW	GT-1; light; TATA; TFIIA; TBP; HR; SAR; TMV; leaf; shoot;
GT1CONSENSUS	426	(+)	GRWAAW	GT-1; light; TATA; TFIIA; TBP; HR; SAR; TMV; leaf; shoot;
GT1CONSENSUS	635	(+)	GRWAAW	GT-1; light; TATA; TFIIA; TBP; HR; SAR; TMV; leaf; shoot;
GT1CONSENSUS	815	(+)	GRWAAW	GT-1; light; TATA; TFIIA; TBP; HR; SAR; TMV; leaf; shoot;
GT1CONSENSUS	827	(+)	GRWAAW	GT-1; light; TATA; TFIIA; TBP; HR; SAR; TMV; leaf; shoot;
GT1CONSENSUS	828	(+)	GRWAAW	GT-1; light; TATA; TFIIA; TBP; HR; SAR; TMV; leaf; shoot;
GT1CONSENSUS	1043	(+)	GRWAAW	GT-1; light; TATA; TFIIA; TBP; HR; SAR; TMV; leaf; shoot;
GT1CONSENSUS	1132	(+)	GRWAAW	GT-1; light; TATA; TFIIA; TBP; HR; SAR; TMV; leaf; shoot;
GT1CONSENSUS	1491	(+)	GRWAAW	GT-1; light; TATA; TFIIA; TBP; HR; SAR; TMV; leaf; shoot;
GT1CONSENSUS	1635	(+)	GRWAAW	GT-1; light; TATA; TFIIA; TBP; HR; SAR; TMV; leaf; shoot;
GT1CONSENSUS	1655	(+)	GRWAAW	GT-1; light; TATA; TFIIA; TBP; HR; SAR; TMV; leaf; shoot;
GT1CONSENSUS	1457	(-)	GRWAAW	GT-1; light; TATA; TFIIA; TBP; HR; SAR; TMV; leaf; shoot;
GT1CONSENSUS	1476	(-)	GRWAAW	GT-1; light; TATA; TFIIA; TBP; HR; SAR; TMV; leaf; shoot;
GT1CORE	896	(-)	GGTTAA	rbcS; box II; GT-1; rbcS-3; leaf; shoot;
GT1CORE	1429	(-)	GGTTAA	rbcS; box II; GT-1; rbcS-3; leaf; shoot;
GT1CORE	1846	(-)	GGTTAA	rbcS; box II; GT-1; rbcS-3; leaf; shoot;
GT1GMSCAM 4	1043	(+)	GAAAAA	GT-1 box; Plays a role in pathogen- and salt-induced SCaM-4 gene expression; See also S000198 (GT-1 consensus)
GTGANTG10	288	(+)	GTGA	g10; pollen; pectate lyase
GTGANTG10	498	(+)	GTGA	g10; pollen; pectate lyase
GTGANTG10	690	(+)	GTGA	g10; pollen; pectate lyase

Anhang

GTGANTG10	1041	(+)	GTGA	g10; pollen; pectate lyase
GTGANTG10	1103	(+)	GTGA	g10; pollen; pectate lyase
GTGANTG10	1109	(+)	GTGA	g10; pollen; pectate lyase
GTGANTG10	1937	(+)	GTGA	g10; pollen; pectate lyase
GTGANTG10	1952	(+)	GTGA	g10; pollen; pectate lyase
GTGANTG10	77	(-)	GTGA	g10; pollen; pectate lyase
GTGANTG10	324	(-)	GTGA	g10; pollen; pectate lyase
GTGANTG10	400	(-)	GTGA	g10; pollen; pectate lyase
GTGANTG10	473	(-)	GTGA	g10; pollen; pectate lyase
GTGANTG10	875	(-)	GTGA	g10; pollen; pectate lyase
GTGANTG10	1264	(-)	GTGA	g10; pollen; pectate lyase
GTGANTG10	1366	(-)	GTGA	g10; pollen; pectate lyase
GTGANTG10	1411	(-)	GTGA	g10; pollen; pectate lyase
GTGANTG10	1758	(-)	GTGA	g10; pollen; pectate lyase
HEXAMERAT H4	1979	(-)	CCGTCG	hexamer; histone; H4; meristem;
IBOXCORE	1635	(+)	GATAA	I box; I-box; rbcS; light regulation; light; leaf; shoot;
IBOXCORE	1655	(+)	GATAA	I box; I-box; rbcS; light regulation; light; leaf; shoot;
IBOXCORE	1477	(-)	GATAA	I box; I-box; rbcS; light regulation; light; leaf; shoot;
INRNTPSADB	76	(+)	YTCANTYY	initiator; light-responsive transcription; TATA-less promoter;
INRNTPSADB	472	(+)	YTCANTYY	initiator; light-responsive transcription; TATA-less promoter;
INRNTPSADB	874	(+)	YTCANTYY	initiator; light-responsive transcription; TATA-less promoter;
INRNTPSADB	1820	(-)	YTCANTYY	initiator; light-responsive transcription; TATA-less promoter;
INTRONLOWE R	126	(-)	TGCAGG	intron; splice junction;
INTRONLOWE R	526	(-)	TGCAGG	intron; splice junction;
INTRONLOWE R	799	(-)	TGCAGG	intron; splice junction;
LTRECOREATC OR15	904	(+)	CCGAC	low temperature; cold; LTRE; drought; ABA; cor15a; BN115; leaf; shoot; phytochrome;
LTRECOREATC OR15	1242	(+)	CCGAC	low temperature; cold; LTRE; drought; ABA; cor15a; BN115; leaf; shoot; phytochrome;
MARTBOX	1044	(-)	TTWTWTTWTT	MAR; SAR; T-box; scaffold; matrix;
MARTBOX	1559	(-)	TTWTWTTWTT	MAR; SAR; T-box; scaffold; matrix;
MARTBOX	1639	(-)	TTWTWTTWTT	MAR; SAR; T-box; scaffold; matrix;
MYB1AT	1904	(+)	WAACCA	MYB; rd22BP1; ABA; leaf; seed; stress;
MYB1AT	1847	(+)	WAACCA	MYB; rd22BP1; ABA; leaf; seed; stress;
MYB1AT	1198	(-)	WAACCA	MYB; rd22BP1; ABA; leaf; seed; stress;
MYB2AT	41	(-)	TAACCTG	MYB; myb; SV40; enhancer; bronze; bronze-1; leaf; shoot;
MYB2CONSE NSUSAT	41	(-)	YAACKG	MYB; rd22BP1; ABA; leaf; seed; stress;
MYB2CONSE NSUSAT	437	(-)	YAACKG	MYB; rd22BP1; ABA; leaf; seed; stress;
MYB2CONSE NSUSAT	839	(-)	YAACKG	MYB; rd22BP1; ABA; leaf; seed; stress;
MYBCORE	41	(+)	CNGTTR	MYB; myb; dehydration; water; stress; flavonoid biosynthesis; leaf; shoot;
MYBCORE	437	(+)	CNGTTR	MYB; myb; dehydration; water; stress; flavonoid biosynthesis; leaf; shoot;
MYBCORE	610	(+)	CNGTTR	MYB; myb; dehydration; water; stress; flavonoid biosynthesis; leaf; shoot;
MYBCORE	839	(+)	CNGTTR	MYB; myb; dehydration; water; stress; flavonoid biosynthesis; leaf; shoot;
MYBCORE	1020	(+)	CNGTTR	MYB; myb; dehydration; water; stress; flavonoid biosynthesis; leaf; shoot;

MYBGAHV	1279	(-)	TAACAAA	myb; Myb; GAmYb; GA; gibberellin; GARC; alph-amylase; amylase;
MYBPZM	1839	(+)	CCWACC	P; P gene: P-gene; MYB; myb; seed;
MYBST1	381	(+)	GGATA	MYB; myb; Myb;
MYBST1	709	(+)	GGATA	MYB; myb; Myb;
MYBST1	783	(+)	GGATA	MYB; myb; Myb;
MYBST1	1144	(+)	GGATA	MYB; myb; Myb;
MYBST1	95	(-)	GGATA	MYB; myb; Myb;
MYBST1	1478	(-)	GGATA	MYB; myb; Myb;
MYCATERD1	200	(-)	CATGTG	water-stress; erd;
MYCATERD1	600	(-)	CATGTG	water-stress; erd;
MYCATERD1	956	(-)	CATGTG	water-stress; erd;
MYCATERD1	1004	(-)	CATGTG	water-stress; erd;
MYCATERD1	1010	(-)	CATGTG	water-stress; erd;
MYCATRD22	200	(+)	CACATG	Dehydration; Water stress; ABA; MYC; myc; leaf; shoot;
MYCATRD22	600	(+)	CACATG	Dehydration; Water stress; ABA; MYC; myc; leaf; shoot;
MYCATRD22	956	(+)	CACATG	Dehydration; Water stress; ABA; MYC; myc; leaf; shoot;
MYCATRD22	1004	(+)	CACATG	Dehydration; Water stress; ABA; MYC; myc; leaf; shoot;
MYCATRD22	1010	(+)	CACATG	Dehydration; Water stress; ABA; MYC; myc; leaf; shoot;
MYCCONSENS USAT	200	(+)	CANNTG	MYC; rd22BP1; ABA; leaf; seed; stress; CBF3; cold; CBF/DREB1; ICE1; RRE;
MYCCONSENS USAT	437	(+)	CANNTG	MYC; rd22BP1; ABA; leaf; seed; stress; CBF3; cold; CBF/DREB1; ICE1; RRE;
MYCCONSENS USAT	552	(+)	CANNTG	MYC; rd22BP1; ABA; leaf; seed; stress; CBF3; cold; CBF/DREB1; ICE1; RRE;
MYCCONSENS USAT	600	(+)	CANNTG	MYC; rd22BP1; ABA; leaf; seed; stress; CBF3; cold; CBF/DREB1; ICE1; RRE;
MYCCONSENS USAT	839	(+)	CANNTG	MYC; rd22BP1; ABA; leaf; seed; stress; CBF3; cold; CBF/DREB1; ICE1; RRE;
MYCCONSENS USAT	856	(+)	CANNTG	MYC; rd22BP1; ABA; leaf; seed; stress; CBF3; cold; CBF/DREB1; ICE1; RRE;
MYCCONSENS USAT	956	(+)	CANNTG	MYC; rd22BP1; ABA; leaf; seed; stress; CBF3; cold; CBF/DREB1; ICE1; RRE;
MYCCONSENS USAT	1004	(+)	CANNTG	MYC; rd22BP1; ABA; leaf; seed; stress; CBF3; cold; CBF/DREB1; ICE1; RRE;
MYCCONSENS USAT	1010	(+)	CANNTG	MYC; rd22BP1; ABA; leaf; seed; stress; CBF3; cold; CBF/DREB1; ICE1; RRE;
MYCCONSENS USAT	1208	(+)	CANNTG	MYC; rd22BP1; ABA; leaf; seed; stress; CBF3; cold; CBF/DREB1; ICE1; RRE;
MYCCONSENS USAT	1265	(+)	CANNTG	MYC; rd22BP1; ABA; leaf; seed; stress; CBF3; cold; CBF/DREB1; ICE1; RRE;
MYCCONSENS USAT	1367	(+)	CANNTG	MYC; rd22BP1; ABA; leaf; seed; stress; CBF3; cold; CBF/DREB1; ICE1; RRE;
MYCCONSENS USAT	1851	(+)	CANNTG	MYC; rd22BP1; ABA; leaf; seed; stress; CBF3; cold; CBF/DREB1; ICE1; RRE;
MYCCONSENS USAT	200	(-)	CANNTG	MYC; rd22BP1; ABA; leaf; seed; stress; CBF3; cold; CBF/DREB1; ICE1; RRE;
MYCCONSENS USAT	437	(-)	CANNTG	MYC; rd22BP1; ABA; leaf; seed; stress; CBF3; cold; CBF/DREB1; ICE1; RRE;
MYCCONSENS USAT	552	(-)	CANNTG	MYC; rd22BP1; ABA; leaf; seed; stress; CBF3; cold; CBF/DREB1; ICE1; RRE;
MYCCONSENS USAT	600	(-)	CANNTG	MYC; rd22BP1; ABA; leaf; seed; stress; CBF3; cold; CBF/DREB1; ICE1; RRE;
MYCCONSENS USAT	839	(-)	CANNTG	MYC; rd22BP1; ABA; leaf; seed; stress; CBF3; cold; CBF/DREB1; ICE1; RRE;
MYCCONSENS USAT	856	(-)	CANNTG	MYC; rd22BP1; ABA; leaf; seed; stress; CBF3; cold; CBF/DREB1; ICE1; RRE;
MYCCONSENS USAT	956	(-)	CANNTG	MYC; rd22BP1; ABA; leaf; seed; stress; CBF3; cold; CBF/DREB1; ICE1; RRE;
MYCCONSENS USAT	1004	(-)	CANNTG	MYC; rd22BP1; ABA; leaf; seed; stress; CBF3; cold; CBF/DREB1; ICE1; RRE;

Anhang

MYCCONSENS USAT	1010	(-)	CANNTG	MYC; rd22BP1; ABA; leaf; seed; stress; CBF3; cold; CBF/DREB1; ICE1; RRE;
MYCCONSENS USAT	1208	(-)	CANNTG	MYC; rd22BP1; ABA; leaf; seed; stress; CBF3; cold; CBF/DREB1; ICE1; RRE;
MYCCONSENS USAT	1265	(-)	CANNTG	MYC; rd22BP1; ABA; leaf; seed; stress; CBF3; cold; CBF/DREB1; ICE1; RRE;
MYCCONSENS USAT	1367	(-)	CANNTG	MYC; rd22BP1; ABA; leaf; seed; stress; CBF3; cold; CBF/DREB1; ICE1; RRE;
MYCCONSENS USAT	1851	(-)	CANNTG	MYC; rd22BP1; ABA; leaf; seed; stress; CBF3; cold; CBF/DREB1; ICE1; RRE;
NODCON1GM	1136	(-)	AAAGAT	One of two putative nodulin consensus sequences;
NODCON1GM	1787	(-)	AAAGAT	One of two putative nodulin consensus sequences;
NODCON2GM	485	(+)	CTCTT	One of two putative nodulin consensus sequences;
NODCON2GM	893	(+)	CTCTT	One of two putative nodulin consensus sequences;
NODCON2GM	1897	(+)	CTCTT	One of two putative nodulin consensus sequences;
NODCON2GM	1731	(-)	CTCTT	One of two putative nodulin consensus sequences;
NTBBF1ARRO LB	1245	(+)	ACTTTA	rolB; Dof; auxin; domain B; root; shoot; meristem; vascular;
OSE1ROOTN ODULE	1136	(-)	AAAGAT	leghemoglobin; Lb29; root; nodule; arbuscule
OSE1ROOTN ODULE	1787	(-)	AAAGAT	leghemoglobin; Lb29; root; nodule; arbuscule
OSE2ROOTN ODULE	485	(+)	CTCTT	leghemoglobin; Lb29; root; nodule; arbuscule
OSE2ROOTN ODULE	893	(+)	CTCTT	leghemoglobin; Lb29; root; nodule; arbuscule
OSE2ROOTN ODULE	1897	(+)	CTCTT	leghemoglobin; Lb29; root; nodule; arbuscule
OSE2ROOTN ODULE	1731	(-)	CTCTT	leghemoglobin; Lb29; root; nodule; arbuscule
P1BS	339	(+)	GNATATNC	phosphate; starvation; MYB;
P1BS	741	(+)	GNATATNC	phosphate; starvation; MYB;
P1BS	339	(-)	GNATATNC	phosphate; starvation; MYB;
P1BS	741	(-)	GNATATNC	phosphate; starvation; MYB;
PALBOXAPC	566	(-)	CCGTCC	Box A; PAL; "None of these elements (boxes P, A, and L) alone, or the promoter region containing all of them together, conferred elicitor or light responsiveness.
POLASIG1	1307	(+)	AATAAA	poly A; polyadenylation;
POLASIG1	1562	(+)	AATAAA	poly A; polyadenylation;
POLASIG1	1639	(+)	AATAAA	poly A; polyadenylation;
POLASIG1	1737	(+)	AATAAA	poly A; polyadenylation;
POLASIG1	1615	(-)	AATAAA	poly A; polyadenylation;
POLASIG1	1790	(-)	AATAAA	poly A; polyadenylation;
POLASIG3	1559	(+)	AATAAT	poly A; polyadenylation;
POLASIG3	301	(-)	AATAAT	poly A; polyadenylation;
POLASIG3	1116	(-)	AATAAT	poly A; polyadenylation;
POLASIG3	1454	(-)	AATAAT	poly A; polyadenylation;
POLLEN1LELA T52	223	(+)	AGAAA	pollen; lat52; endo-beta-mannanase; MAN;
POLLEN1LELA T52	316	(+)	AGAAA	pollen; lat52; endo-beta-mannanase; MAN;
POLLEN1LELA T52	359	(+)	AGAAA	pollen; lat52; endo-beta-mannanase; MAN;
POLLEN1LELA T52	623	(+)	AGAAA	pollen; lat52; endo-beta-mannanase; MAN;
POLLEN1LELA T52	634	(+)	AGAAA	pollen; lat52; endo-beta-mannanase; MAN;
POLLEN1LELA T52	718	(+)	AGAAA	pollen; lat52; endo-beta-mannanase; MAN;

POLLEN1LELA T52	761	(+)	AGAAA	pollen; lat52; endo-beta-mannanase; MAN;
POLLEN1LELA T52	1033	(+)	AGAAA	pollen; lat52; endo-beta-mannanase; MAN;
POLLEN1LELA T52	1131	(+)	AGAAA	pollen; lat52; endo-beta-mannanase; MAN;
POLLEN1LELA T52	1150	(+)	AGAAA	pollen; lat52; endo-beta-mannanase; MAN;
POLLEN1LELA T52	1734	(+)	AGAAA	pollen; lat52; endo-beta-mannanase; MAN;
PREATPRODH	775	(-)	ACTCAT	proline; ProDH; hypoosmolarity; bZIP;
PREATPRODH	1164	(-)	ACTCAT	proline; ProDH; hypoosmolarity; bZIP;
PRECONSCRH SP70A	11	(+)	SCGAYNRNNNNN NNNNNNNNNNH D	HSP; chlorophyl; MgProto;
PRECONSCRH SP70A	407	(+)	SCGAYNRNNNNN NNNNNNNNNNH D	HSP; chlorophyl; MgProto;
PRECONSCRH SP70A	809	(+)	SCGAYNRNNNNN NNNNNNNNNNH D	HSP; chlorophyl; MgProto;
PRECONSCRH SP70A	1978	(+)	SCGAYNRNNNNN NNNNNNNNNNH D	HSP; chlorophyl; MgProto;
PYRIMIDINEB OXOSRAMY1 A	346	(+)	CCTTTT	alpha-amylase; sugar repression; GARE; pyrimidine box; feed-back metabolic repression; embryo; seed; Dof; BPBF; pbf;
PYRIMIDINEB OXOSRAMY1 A	748	(+)	CCTTTT	alpha-amylase; sugar repression; GARE; pyrimidine box; feed-back metabolic repression; embryo; seed; Dof; BPBF; pbf;
RAV1AAT	1288	(+)	CAACA	RAV1; AP2; VP1; B3; root; leaf; shoot
RAV1AAT	208	(-)	CAACA	RAV1; AP2; VP1; B3; root; leaf; shoot
RAV1AAT	211	(-)	CAACA	RAV1; AP2; VP1; B3; root; leaf; shoot
RAV1AAT	611	(-)	CAACA	RAV1; AP2; VP1; B3; root; leaf; shoot
RAV1AAT	705	(-)	CAACA	RAV1; AP2; VP1; B3; root; leaf; shoot
RAV1AAT	1021	(-)	CAACA	RAV1; AP2; VP1; B3; root; leaf; shoot
RAV1AAT	1169	(-)	CAACA	RAV1; AP2; VP1; B3; root; leaf; shoot
RAV1AAT	1603	(-)	CAACA	RAV1; AP2; VP1; B3; root; leaf; shoot
RAV1AAT	1933	(-)	CAACA	RAV1; AP2; VP1; B3; root; leaf; shoot
RBCSCONSEN SUS	1538	(-)	AATCCAA	rbcS; G box; I box; leaf; shoot;
REALPHALGL HCB21	1848	(+)	AACCAA	REalpha; Lhcb21; phytochrome; REbeta;
REBETALGLHC B21	380	(+)	CGGATA	REalpha; Lhcb21; phytochrome; REbeta;
REBETALGLHC B21	1478	(-)	CGGATA	REalpha; Lhcb21; phytochrome; REbeta;
RHERPATEXP A7	1264	(+)	KCACGW	root; hair;
RHERPATEXP A7	1366	(+)	KCACGW	root; hair;
RHERPATEXP A7	1758	(+)	KCACGW	root; hair;
RHERPATEXP A7	1266	(-)	KCACGW	root; hair;
ROOTMOTIFT APOX1	341	(+)	ATATT	root; roID;
ROOTMOTIFT APOX1	743	(+)	ATATT	root; roID;
ROOTMOTIFT APOX1	1659	(+)	ATATT	root; roID;
ROOTMOTIFT APOX1	237	(-)	ATATT	root; roID;

Anhang

ROOTMOTIFT APOX1	242	(-)	ATATT	root; roLD;
ROOTMOTIFT APOX1	247	(-)	ATATT	root; roLD;
ROOTMOTIFT APOX1	340	(-)	ATATT	root; roLD;
ROOTMOTIFT APOX1	362	(-)	ATATT	root; roLD;
ROOTMOTIFT APOX1	638	(-)	ATATT	root; roLD;
ROOTMOTIFT APOX1	648	(-)	ATATT	root; roLD;
ROOTMOTIFT APOX1	742	(-)	ATATT	root; roLD;
ROOTMOTIFT APOX1	764	(-)	ATATT	root; roLD;
ROOTMOTIFT APOX1	1047	(-)	ATATT	root; roLD;
ROOTMOTIFT APOX1	1052	(-)	ATATT	root; roLD;
ROOTMOTIFT APOX1	1057	(-)	ATATT	root; roLD;
ROOTMOTIFT APOX1	1062	(-)	ATATT	root; roLD;
ROOTMOTIFT APOX1	1153	(-)	ATATT	root; roLD;
ROOTMOTIFT APOX1	1597	(-)	ATATT	root; roLD;
ROOTMOTIFT APOX1	1658	(-)	ATATT	root; roLD;
RYREPEATBN NAPA	154	(+)	CATGCA	ABRE mediated transactivation by ABI3 and ABI3-dependent response to ABA;
RYREPEATBN NAPA	202	(+)	CATGCA	ABRE mediated transactivation by ABI3 and ABI3-dependent response to ABA;
RYREPEATBN NAPA	958	(+)	CATGCA	ABRE mediated transactivation by ABI3 and ABI3-dependent response to ABA;
RYREPEATBN NAPA	1006	(+)	CATGCA	ABRE mediated transactivation by ABI3 and ABI3-dependent response to ABA;
RYREPEATBN NAPA	1012	(+)	CATGCA	ABRE mediated transactivation by ABI3 and ABI3-dependent response to ABA;
RYREPEATBN NAPA	156	(-)	CATGCA	ABRE mediated transactivation by ABI3 and ABI3-dependent response to ABA;
RYREPEATBN NAPA	204	(-)	CATGCA	ABRE mediated transactivation by ABI3 and ABI3-dependent response to ABA;
RYREPEATBN NAPA	556	(-)	CATGCA	ABRE mediated transactivation by ABI3 and ABI3-dependent response to ABA;
RYREPEATBN NAPA	960	(-)	CATGCA	ABRE mediated transactivation by ABI3 and ABI3-dependent response to ABA;
RYREPEATBN NAPA	1014	(-)	CATGCA	ABRE mediated transactivation by ABI3 and ABI3-dependent response to ABA;
RYREPEATGM GY2	154	(+)	CATGCAT	glycinin; CATGCAT; Gy2; seed
RYREPEATGM GY2	202	(+)	CATGCAT	glycinin; CATGCAT; Gy2; seed
RYREPEATGM GY2	958	(+)	CATGCAT	glycinin; CATGCAT; Gy2; seed
RYREPEATGM GY2	1012	(+)	CATGCAT	glycinin; CATGCAT; Gy2; seed
RYREPEATGM GY2	155	(-)	CATGCAT	glycinin; CATGCAT; Gy2; seed
RYREPEATGM GY2	203	(-)	CATGCAT	glycinin; CATGCAT; Gy2; seed
RYREPEATGM GY2	555	(-)	CATGCAT	glycinin; CATGCAT; Gy2; seed
RYREPEATGM GY2	959	(-)	CATGCAT	glycinin; CATGCAT; Gy2; seed
RYREPEATGM GY2	1013	(-)	CATGCAT	glycinin; CATGCAT; Gy2; seed
RYREPEATLEG UMINBOX	154	(+)	CATGCAY	RY repeat; legumin box; seed; storage protein;

RYREPEATLEG UMINBOX	202	(+)	CATGCAY	RY repeat; legumin box; seed; storage protein;
RYREPEATLEG UMINBOX	958	(+)	CATGCAY	RY repeat; legumin box; seed; storage protein;
RYREPEATLEG UMINBOX	1006	(+)	CATGCAY	RY repeat; legumin box; seed; storage protein;
RYREPEATLEG UMINBOX	1012	(+)	CATGCAY	RY repeat; legumin box; seed; storage protein;
RYREPEATLEG UMINBOX	155	(-)	CATGCAY	RY repeat; legumin box; seed; storage protein;
RYREPEATLEG UMINBOX	203	(-)	CATGCAY	RY repeat; legumin box; seed; storage protein;
RYREPEATLEG UMINBOX	555	(-)	CATGCAY	RY repeat; legumin box; seed; storage protein;
RYREPEATLEG UMINBOX	959	(-)	CATGCAY	RY repeat; legumin box; seed; storage protein;
RYREPEATLEG UMINBOX	1013	(-)	CATGCAY	RY repeat; legumin box; seed; storage protein;
RYREPEATVFL EB4	154	(+)	CATGCATG	RY repeat motif; LeB4; Gy2; seed; Sph; ABA; VP1; Osem; Em; ABRE; FUS3; embryo; B3; GA
RYREPEATVFL EB4	202	(+)	CATGCATG	RY repeat motif; LeB4; Gy2; seed; Sph; ABA; VP1; Osem; Em; ABRE; FUS3; embryo; B3; GA
RYREPEATVFL EB4	958	(+)	CATGCATG	RY repeat motif; LeB4; Gy2; seed; Sph; ABA; VP1; Osem; Em; ABRE; FUS3; embryo; B3; GA
RYREPEATVFL EB4	1012	(+)	CATGCATG	RY repeat motif; LeB4; Gy2; seed; Sph; ABA; VP1; Osem; Em; ABRE; FUS3; embryo; B3; GA
RYREPEATVFL EB4	154	(-)	CATGCATG	RY repeat motif; LeB4; Gy2; seed; Sph; ABA; VP1; Osem; Em; ABRE; FUS3; embryo; B3; GA
RYREPEATVFL EB4	202	(-)	CATGCATG	RY repeat motif; LeB4; Gy2; seed; Sph; ABA; VP1; Osem; Em; ABRE; FUS3; embryo; B3; GA
RYREPEATVFL EB4	958	(-)	CATGCATG	RY repeat motif; LeB4; Gy2; seed; Sph; ABA; VP1; Osem; Em; ABRE; FUS3; embryo; B3; GA
RYREPEATVFL EB4	1012	(-)	CATGCATG	RY repeat motif; LeB4; Gy2; seed; Sph; ABA; VP1; Osem; Em; ABRE; FUS3; embryo; B3; GA
S1FBOXSORP S1L21	365	(+)	ATGGTA	S1F; S1F box; S1F-box; S1; plastid protein; RPS1; RPL21; leaf; negative;
S1FBOXSORP S1L21	653	(+)	ATGGTA	S1F; S1F box; S1F-box; S1; plastid protein; RPS1; RPL21; leaf; negative;
S1FBOXSORP S1L21	1156	(+)	ATGGTA	S1F; S1F box; S1F-box; S1; plastid protein; RPS1; RPL21; leaf; negative;
S2FSORPL21	1907	(+)	CCATACATT	S2F; S2; plastid protein; RPL21; leaf-specific;
SEBFCONSSTP R10A	1408	(+)	YTGTCWC	PR-10a; SEBF; pathogenesis; silencing;
SEBFCONSSTP R10A	288	(-)	YTGTCWC	PR-10a; SEBF; pathogenesis; silencing;
SEF3MOTIFG M	1443	(+)	AACCCA	SEF3; beta-conglycinin; 7S; globulin; seed;
SEF4MOTIFG M7S	34	(+)	RTTTTTR	soybean; seed; storage protein; 7S; globulin; beta-conglycinin; SEF;
SEF4MOTIFG M7S	430	(+)	RTTTTTR	soybean; seed; storage protein; 7S; globulin; beta-conglycinin; SEF;
SEF4MOTIFG M7S	832	(+)	RTTTTTR	soybean; seed; storage protein; 7S; globulin; beta-conglycinin; SEF;
SEF4MOTIFG M7S	1542	(+)	RTTTTTR	soybean; seed; storage protein; 7S; globulin; beta-conglycinin; SEF;
SEF4MOTIFG M7S	1618	(+)	RTTTTTR	soybean; seed; storage protein; 7S; globulin; beta-conglycinin; SEF;
SEF4MOTIFG M7S	1276	(+)	RTTTTTR	soybean; seed; storage protein; 7S; globulin; beta-conglycinin; SEF;
SEF4MOTIFG M7S	1628	(-)	RTTTTTR	soybean; seed; storage protein; 7S; globulin; beta-conglycinin; SEF;
SITEIIAOSPCN A	183	(-)	TGGGCCCGT	PCNA; Site IIa; meristem; tissue-specific;
SITEIIATCYTC	186	(-)	TGGGCGY	cytochrome; TCP-domain; meristem; oxidative phosphorylation;
SITEIIATCYTC	592	(-)	TGGGCGY	cytochrome; TCP-domain; meristem; oxidative phosphorylation;
SITEIIATCYTC	996	(-)	TGGGCGY	cytochrome; TCP-domain; meristem; oxidative phosphorylation;
SORLIP1AT	1578	(+)	GCCAC	phyA; phytochrome; light;

Anhang

SORLIP1AT	577	(-)	GCCAC	phyA; phytochrome; light;
SORLIP2AT	185	(+)	GGGCC	phyA; phytochrome; light;
SORLIP2AT	585	(+)	GGGCC	phyA; phytochrome; light;
SORLIP2AT	989	(+)	GGGCC	phyA; phytochrome; light;
SORLIP2AT	1996	(+)	GGGCC	phyA; phytochrome; light;
SORLIP2AT	186	(-)	GGGCC	phyA; phytochrome; light;
SORLIP2AT	592	(-)	GGGCC	phyA; phytochrome; light;
SORLIP2AT	996	(-)	GGGCC	phyA; phytochrome; light;
SORLIP5AT	76	(-)	GAGTGAG	phyA; phytochrome; light;
SORLIP5AT	472	(-)	GAGTGAG	phyA; phytochrome; light;
SORLIP5AT	874	(-)	GAGTGAG	phyA; phytochrome; light;
SREATMSD	1477	(+)	TTATCC	Axillary bud outgrowth;
SURE2STPAT2 1	1531	(-)	AATACTAAT	SURE; SURE 2; patatin; sucrose; tuber; root;
SURECOREAT SULTR11	180	(+)	GAGAC	sulfate uptake; sulfate transporter; ARF; -S; S;
SURECOREAT SULTR11	1776	(+)	GAGAC	sulfate uptake; sulfate transporter; ARF; -S; S;
SURECOREAT SULTR11	872	(-)	GAGAC	sulfate uptake; sulfate transporter; ARF; -S; S;
SURECOREAT SULTR11	1762	(-)	GAGAC	sulfate uptake; sulfate transporter; ARF; -S; S;
SV40COREEN HAN	781	(+)	GTGGWWHG	enhancer; SV40; core;
TAAAGSTKST1	49	(+)	TAAAG	KST1; Dof; guard cell;
TAAAGSTKST1	445	(+)	TAAAG	KST1; Dof; guard cell;
TAAAGSTKST1	1729	(+)	TAAAG	KST1; Dof; guard cell;
TAAAGSTKST1	1739	(+)	TAAAG	KST1; Dof; guard cell;
TAAAGSTKST1	1246	(-)	TAAAG	KST1; Dof; guard cell;
TAAAGSTKST1	1782	(-)	TAAAG	KST1; Dof; guard cell;
TAAAGSTKST1	1789	(-)	TAAAG	KST1; Dof; guard cell;
TAAAGSTKST1	1844	(-)	TAAAG	KST1; Dof; guard cell;
TATABOX4	249	(+)	TATATAA	TATA; sporamin; phaseolin;
TATABOX5	1117	(+)	TTATTT	TATA; glutamine; synthetase;
TATABOX5	1455	(+)	TTATTT	TATA; glutamine; synthetase;
TATABOX5	1616	(+)	TTATTT	TATA; glutamine; synthetase;
TATABOX5	1791	(+)	TTATTT	TATA; glutamine; synthetase;
TATABOX5	1638	(-)	TTATTT	TATA; glutamine; synthetase;
TATABOX5	1736	(-)	TTATTT	TATA; glutamine; synthetase;
TATCCACHVA L21	781	(-)	TATCCAC	gibberellin; GA; GARC;
TATCCAOSAM Y	708	(-)	TATCCA	alpha-amylase; MYB proteins; gibberellin; GA; sugar starvation;
TATCCAOSAM Y	782	(-)	TATCCA	alpha-amylase; MYB proteins; gibberellin; GA; sugar starvation;
TATCCAYMOT IFOSRAMY3D	781	(-)	TATCCAY	GATA; amylase; sugar; repression;
TGTCACACMC UCUMISIN	287	(-)	TGTCACA	cucumisins; fruit;
WBOXPCWR KY1	1373	(+)	TTTGACY	W box; WRKY;
WBOXATNPR 1	213	(+)	TTGAC	NPR1; WRKY; WRKY18; disease resistance; SA; W box;

WBOXATNPR 1	440	(+)	TTGAC	NPR1; WRKY; WRKY18; disease resistance; SA; W box;
WBOXATNPR 1	842	(+)	TTGAC	NPR1; WRKY; WRKY18; disease resistance; SA; W box;
WBOXATNPR 1	1023	(+)	TTGAC	NPR1; WRKY; WRKY18; disease resistance; SA; W box;
WBOXATNPR 1	1256	(+)	TTGAC	NPR1; WRKY; WRKY18; disease resistance; SA; W box;
WBOXATNPR 1	1374	(+)	TTGAC	NPR1; WRKY; WRKY18; disease resistance; SA; W box;
WBOXATNPR 1	1438	(-)	TTGAC	NPR1; WRKY; WRKY18; disease resistance; SA; W box;
WBOXHVIS01	328	(+)	TGACT	sugar; SURE; patatin; WRKY; isoamylase; SUSIBA2;
WBOXHVIS01	441	(+)	TGACT	sugar; SURE; patatin; WRKY; isoamylase; SUSIBA2;
WBOXHVIS01	730	(+)	TGACT	sugar; SURE; patatin; WRKY; isoamylase; SUSIBA2;
WBOXHVIS01	843	(+)	TGACT	sugar; SURE; patatin; WRKY; isoamylase; SUSIBA2;
WBOXHVIS01	1226	(-)	TGACT	sugar; SURE; patatin; WRKY; isoamylase; SUSIBA2;
WBOXNTCHN 48	327	(+)	CTGACY	W-box; W box; WRKY; elicitor;
WBOXNTCHN 48	729	(+)	CTGACY	W-box; W box; WRKY; elicitor;
WBOXNTERF3	328	(+)	TGACY	W box; ERF3; wounding
WBOXNTERF3	441	(+)	TGACY	W box; ERF3; wounding
WBOXNTERF3	691	(+)	TGACY	W box; ERF3; wounding
WBOXNTERF3	730	(+)	TGACY	W box; ERF3; wounding
WBOXNTERF3	843	(+)	TGACY	W box; ERF3; wounding
WBOXNTERF3	1104	(+)	TGACY	W box; ERF3; wounding
WBOXNTERF3	1375	(+)	TGACY	W box; ERF3; wounding
WBOXNTERF3	1226	(-)	TGACY	W box; ERF3; wounding
WRKY71OS	214	(+)	TGAC	WRKY; GA; MYB; W box; TGAC; PR proteins;
WRKY71OS	289	(+)	TGAC	WRKY; GA; MYB; W box; TGAC; PR proteins;
WRKY71OS	328	(+)	TGAC	WRKY; GA; MYB; W box; TGAC; PR proteins;
WRKY71OS	441	(+)	TGAC	WRKY; GA; MYB; W box; TGAC; PR proteins;
WRKY71OS	499	(+)	TGAC	WRKY; GA; MYB; W box; TGAC; PR proteins;
WRKY71OS	691	(+)	TGAC	WRKY; GA; MYB; W box; TGAC; PR proteins;
WRKY71OS	730	(+)	TGAC	WRKY; GA; MYB; W box; TGAC; PR proteins;
WRKY71OS	768	(+)	TGAC	WRKY; GA; MYB; W box; TGAC; PR proteins;
WRKY71OS	843	(+)	TGAC	WRKY; GA; MYB; W box; TGAC; PR proteins;
WRKY71OS	1024	(+)	TGAC	WRKY; GA; MYB; W box; TGAC; PR proteins;
WRKY71OS	1104	(+)	TGAC	WRKY; GA; MYB; W box; TGAC; PR proteins;
WRKY71OS	1257	(+)	TGAC	WRKY; GA; MYB; W box; TGAC; PR proteins;
WRKY71OS	1375	(+)	TGAC	WRKY; GA; MYB; W box; TGAC; PR proteins;
WRKY71OS	1450	(+)	TGAC	WRKY; GA; MYB; W box; TGAC; PR proteins;
WRKY71OS	1227	(-)	TGAC	WRKY; GA; MYB; W box; TGAC; PR proteins;
WRKY71OS	1410	(-)	TGAC	WRKY; GA; MYB; W box; TGAC; PR proteins;
WRKY71OS	1438	(-)	TGAC	WRKY; GA; MYB; W box; TGAC; PR proteins;

Tab. 26: Analyse der Region 2 kbp stromaufwärts (-2000) des *zmpx66*-Gens durch PLACE.

Element	Position	Strang	Motiv	Funktion
---------	----------	--------	-------	----------

Anhang

-300CORE	1462	(+)	TGTAAAG	zein; core motif; maize; -300 element; promoter; prolamin-box; P-box; seed; endosperm;
-300ELEMENT	1164	(+)	TGHAAARK	-300 element; hordein; gliadin; glutenin; seed;
-300ELEMENT	1329	(+)	TGHAAARK	-300 element; hordein; gliadin; glutenin; seed;
-300ELEMENT	1387	(+)	TGHAAARK	-300 element; hordein; gliadin; glutenin; seed;
-300ELEMENT	1462	(+)	TGHAAARK	-300 element; hordein; gliadin; glutenin; seed;
AACACOREOSG LUB1	333	(+)	AACAAAC	glutelin; AACA; GCN4; seed; endosperm;
AACACOREOSG LUB1	1570	(+)	AACAAAC	glutelin; AACA; GCN4; seed; endosperm;
AACACOREOSG LUB1	732	(-)	AACAAAC	glutelin; AACA; GCN4; seed; endosperm;
ABRERATCAL	1223	(+)	MACGYGB	ABRE; calcium;
ABRERATCAL	1190	(-)	MACGYGB	ABRE; calcium;
ABRERATCAL	1098	(-)	MACGYGB	ABRE; calcium;
ACGTATERD1	1019	(+)	ACGT	ACGT; etiolation; erd;
ACGTATERD1	1659	(+)	ACGT	ACGT; etiolation; erd;
ACGTATERD1	1774	(+)	ACGT	ACGT; etiolation; erd;
ACGTATERD1	1019	(-)	ACGT	ACGT; etiolation; erd;
ACGTATERD1	1659	(-)	ACGT	ACGT; etiolation; erd;
ACGTATERD1	1774	(-)	ACGT	ACGT; etiolation; erd;
ACGTCBOX	1018	(+)	GACGTC	C-box; ACGT element; seed;
ACGTCBOX	1018	(-)	GACGTC	C-box; ACGT element; seed;
AGMOTIFNTMY B2	900	(+)	AGATCCA	MYB; Tto1; PAL; AGP1; GATA; induced by various stress such as wounding or elicitor treatment
AMMORESIVDC RNIA1	1168	(-)	CGAACTT	nitrate reductase; ammonium response;
AMYBOX1	260	(+)	TAACARA	amylase; seed;
AMYBOX1	1569	(+)	TAACARA	amylase; seed;
AMYBOX1	597	(-)	TAACARA	amylase; seed;
ANAERO1CONS ENSUS	84	(+)	AAACAAA	anaerobic
ANAERO1CONS ENSUS	733	(-)	AAACAAA	anaerobic
ANAERO1CONS ENSUS	1516	(-)	AAACAAA	anaerobic
ANAERO2CONS ENSUS	620	(+)	AGCAGC	anaerobic
ARR1AT	1612	(+)	NGATT	ARR1; Response regulator; Cytokinin
ARR1AT	533	(+)	NGATT	ARR1; Response regulator; Cytokinin
ARR1AT	1533	(+)	NGATT	ARR1; Response regulator; Cytokinin
ARR1AT	89	(-)	NGATT	ARR1; Response regulator; Cytokinin
ARR1AT	152	(-)	NGATT	ARR1; Response regulator; Cytokinin
ARR1AT	187	(-)	NGATT	ARR1; Response regulator; Cytokinin
ARR1AT	521	(-)	NGATT	ARR1; Response regulator; Cytokinin
ARR1AT	775	(-)	NGATT	ARR1; Response regulator; Cytokinin
ARR1AT	796	(-)	NGATT	ARR1; Response regulator; Cytokinin
ARR1AT	835	(-)	NGATT	ARR1; Response regulator; Cytokinin
ARR1AT	886	(-)	NGATT	ARR1; Response regulator; Cytokinin
ARR1AT	891	(-)	NGATT	ARR1; Response regulator; Cytokinin

ASF1MOTIFCA MV	1720	(+)	TGACG	TGACG; root; leaf; CaMV; 35S; promoter; auxin; salicylic acid; light; as-1; TGA1a, TGA1b; CREB; ASF1; TGA6; shoot; xenobiotic; stress; SAR; SA; Disease resistance;
BIHD1OS	1196	(+)	TGTCA	HD; homeodomain;
BIHD1OS	1621	(+)	TGTCA	HD; homeodomain;
BIHD1OS	1796	(-)	TGTCA	HD; homeodomain;
BIHD1OS	1847	(-)	TGTCA	HD; homeodomain;
CAATBOX1	35	(+)	CAAT	CAAT; legA; seed;
CAATBOX1	151	(+)	CAAT	CAAT; legA; seed;
CAATBOX1	244	(+)	CAAT	CAAT; legA; seed;
CAATBOX1	795	(+)	CAAT	CAAT; legA; seed;
CAATBOX1	838	(+)	CAAT	CAAT; legA; seed;
CAATBOX1	885	(+)	CAAT	CAAT; legA; seed;
CAATBOX1	1403	(+)	CAAT	CAAT; legA; seed;
CAATBOX1	1335	(-)	CAAT	CAAT; legA; seed;
CAATBOX1	1438	(-)	CAAT	CAAT; legA; seed;
CAATBOX1	1535	(-)	CAAT	CAAT; legA; seed;
CAATBOX1	1665	(-)	CAAT	CAAT; legA; seed;
CAATBOX1	1734	(-)	CAAT	CAAT; legA; seed;
CACTFTPPCA1	158	(+)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	195	(+)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	1152	(+)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	1339	(+)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	1398	(+)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	1416	(+)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	1434	(+)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	1713	(+)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	143	(+)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	1280	(+)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	1293	(+)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	1384	(+)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	1469	(+)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	1777	(+)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	23	(-)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	77	(-)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	343	(-)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	374	(-)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	827	(-)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	850	(-)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	943	(-)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	969	(-)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	1094	(-)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	1271	(-)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	1278	(-)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	1327	(-)	YACT	mesohpyll; CACT;

Anhang

CACTFTPPCA1	1373	(-)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	1467	(-)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	1499	(-)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	1507	(-)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	1685	(-)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	1842	(-)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	1845	(-)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	1913	(-)	YACT	mesohpyll; CACT;
CATATGGMSAU R	1635	(+)	CATATG	SAUR; NDE; auxin;
CATATGGMSAU R	1635	(-)	CATATG	SAUR; NDE; auxin;
CBFHV	744	(+)	RYCGAC	CBF; AP2 domain; CRT/DRE; low temperature;
CBFHV	818	(+)	RYCGAC	CBF; AP2 domain; CRT/DRE; low temperature;
CBFHV	1145	(+)	RYCGAC	CBF; AP2 domain; CRT/DRE; low temperature;
CBFHV	1003	(+)	RYCGAC	CBF; AP2 domain; CRT/DRE; low temperature;
CBFHV	997	(-)	RYCGAC	CBF; AP2 domain; CRT/DRE; low temperature;
CBFHV	1003	(-)	RYCGAC	CBF; AP2 domain; CRT/DRE; low temperature;
CCAATBOX1	884	(+)	CCAAT	HSE (Heat shock element); CCAAT box;
CGACGOSAMY3	1	(+)	CGACG	amylase
CGACGOSAMY3	516	(+)	CGACG	amylase
CGACGOSAMY3	1005	(+)	CGACG	amylase
CGACGOSAMY3	1017	(+)	CGACG	amylase
CGACGOSAMY3	1066	(+)	CGACG	amylase
CGACGOSAMY3	1147	(+)	CGACG	amylase
CGACGOSAMY3	996	(-)	CGACG	amylase
CGACGOSAMY3	1002	(-)	CGACG	amylase
CGACGOSAMY3	1020	(-)	CGACG	amylase
CGACGOSAMY3	1980	(-)	CGACG	amylase
CGCGBOXAT	1190	(+)	VCGCGB	calmodulin
CGCGBOXAT	1224	(+)	VCGCGB	calmodulin
CGCGBOXAT	529	(+)	VCGCGB	calmodulin
CGCGBOXAT	863	(+)	VCGCGB	calmodulin
CGCGBOXAT	1098	(+)	VCGCGB	calmodulin
CGCGBOXAT	1190	(-)	VCGCGB	calmodulin
CGCGBOXAT	1224	(-)	VCGCGB	calmodulin
CGCGBOXAT	529	(-)	VCGCGB	calmodulin
CGCGBOXAT	863	(-)	VCGCGB	calmodulin
CGCGBOXAT	1098	(-)	VCGCGB	calmodulin
CIACADIANLELH C	83	(+)	CAANNNNAT C	ircadian; light; Lhc; leaf; shoot;
CIACADIANLELH C	885	(+)	CAANNNNAT C	ircadian; light; Lhc; leaf; shoot;
CIACADIANLELH C	1138	(+)	CAANNNNAT C	ircadian; light; Lhc; leaf; shoot;
CIACADIANLELH C	1613	(-)	CAANNNNAT C	ircadian; light; Lhc; leaf; shoot;
CMSRE1IBSPOA	434	(+)	TGGACGG	sucrose; sporamin; sugar-induced; SpoA;

CPBCSPOR	1779	(-)	TATTAG	cytokinin; chlorophyll; chloroplast;
CPBCSPOR	1896	(-)	TATTAG	cytokinin; chlorophyll; chloroplast;
CRTDREHVCBF2	1003	(+)	GTCGAC	cold; AP2; CRT/DRE; CBF;
CRTDREHVCBF2	1003	(-)	GTCGAC	cold; AP2; CRT/DRE; CBF;
CURECORECR	6	(+)	GTAC	copper; oxygen; hypoxic;
CURECORECR	1213	(+)	GTAC	copper; oxygen; hypoxic;
CURECORECR	1272	(+)	GTAC	copper; oxygen; hypoxic;
CURECORECR	1279	(+)	GTAC	copper; oxygen; hypoxic;
CURECORECR	1395	(+)	GTAC	copper; oxygen; hypoxic;
CURECORECR	1468	(+)	GTAC	copper; oxygen; hypoxic;
CURECORECR	1500	(+)	GTAC	copper; oxygen; hypoxic;
CURECORECR	1508	(+)	GTAC	copper; oxygen; hypoxic;
CURECORECR	1706	(+)	GTAC	copper; oxygen; hypoxic;
CURECORECR	1776	(+)	GTAC	copper; oxygen; hypoxic;
CURECORECR	1916	(+)	GTAC	copper; oxygen; hypoxic;
CURECORECR	6	(-)	GTAC	copper; oxygen; hypoxic;
CURECORECR	1213	(-)	GTAC	copper; oxygen; hypoxic;
CURECORECR	1272	(-)	GTAC	copper; oxygen; hypoxic;
CURECORECR	1279	(-)	GTAC	copper; oxygen; hypoxic;
CURECORECR	1395	(-)	GTAC	copper; oxygen; hypoxic;
CURECORECR	1468	(-)	GTAC	copper; oxygen; hypoxic;
CURECORECR	1500	(-)	GTAC	copper; oxygen; hypoxic;
CURECORECR	1508	(-)	GTAC	copper; oxygen; hypoxic;
CURECORECR	1706	(-)	GTAC	copper; oxygen; hypoxic;
CURECORECR	1776	(-)	GTAC	copper; oxygen; hypoxic;
CURECORECR	1916	(-)	GTAC	copper; oxygen; hypoxic;
DOFCOREZM	265	(+)	AAAG	Dof; C4PEPC; CyPPDK; PEPC; C4; leaf; shoot;
DOFCOREZM	411	(+)	AAAG	Dof; C4PEPC; CyPPDK; PEPC; C4; leaf; shoot;
DOFCOREZM	708	(+)	AAAG	Dof; C4PEPC; CyPPDK; PEPC; C4; leaf; shoot;
DOFCOREZM	809	(+)	AAAG	Dof; C4PEPC; CyPPDK; PEPC; C4; leaf; shoot;
DOFCOREZM	1167	(+)	AAAG	Dof; C4PEPC; CyPPDK; PEPC; C4; leaf; shoot;
DOFCOREZM	1241	(+)	AAAG	Dof; C4PEPC; CyPPDK; PEPC; C4; leaf; shoot;
DOFCOREZM	1359	(+)	AAAG	Dof; C4PEPC; CyPPDK; PEPC; C4; leaf; shoot;
DOFCOREZM	1465	(+)	AAAG	Dof; C4PEPC; CyPPDK; PEPC; C4; leaf; shoot;
DOFCOREZM	1971	(+)	AAAG	Dof; C4PEPC; CyPPDK; PEPC; C4; leaf; shoot;
DOFCOREZM	590	(-)	AAAG	Dof; C4PEPC; CyPPDK; PEPC; C4; leaf; shoot;
DOFCOREZM	605	(-)	AAAG	Dof; C4PEPC; CyPPDK; PEPC; C4; leaf; shoot;
DOFCOREZM	1307	(-)	AAAG	Dof; C4PEPC; CyPPDK; PEPC; C4; leaf; shoot;
DOFCOREZM	1742	(-)	AAAG	Dof; C4PEPC; CyPPDK; PEPC; C4; leaf; shoot;
DPBFCORED CD C3	822	(+)	ACACNNG	Dc3; lea class gene; embryo; ABA; DPBF-1, DPBF-2; bZIP; GIA1;
DPBFCORED CD C3	1502	(+)	ACACNNG	Dc3; lea class gene; embryo; ABA; DPBF-1, DPBF-2; bZIP; GIA1;
DPBFCORED CD C3	1598	(-)	ACACNNG	Dc3; lea class gene; embryo; ABA; DPBF-1, DPBF-2; bZIP; GIA1;
DPBFCORED CD C3	1683	(-)	ACACNNG	Dc3; lea class gene; embryo; ABA; DPBF-1, DPBF-2; bZIP; GIA1;

Anhang

C3				
DPBFCORED CD C3	1701	(-)	ACACNNG	Dc3; lea class gene; embryo; ABA; DPBF-1, DPBF-2; bZIP; GIA1;
DRECR COREAT	997	(-)	RCCGAC	DRE/CRT; drought; high-light; cold; DREB; DREB1; DREB2; CBF;
E2FCONSENSUS	1734	(+)	WTTSSCSS	E2F
E2FCONSENSUS	608	(+)	WTTSSCSS	E2F
E2FCONSENSUS	147	(-)	WTTSSCSS	E2F
EBOXBNNAPA	104	(+)	CANNTG	napA; storage protein; ABRE; E-box; seed;
EBOXBNNAPA	163	(+)	CANNTG	napA; storage protein; ABRE; E-box; seed;
EBOXBNNAPA	354	(+)	CANNTG	napA; storage protein; ABRE; E-box; seed;
EBOXBNNAPA	751	(+)	CANNTG	napA; storage protein; ABRE; E-box; seed;
EBOXBNNAPA	1458	(+)	CANNTG	napA; storage protein; ABRE; E-box; seed;
EBOXBNNAPA	1529	(+)	CANNTG	napA; storage protein; ABRE; E-box; seed;
EBOXBNNAPA	1635	(+)	CANNTG	napA; storage protein; ABRE; E-box; seed;
EBOXBNNAPA	1672	(+)	CANNTG	napA; storage protein; ABRE; E-box; seed;
EBOXBNNAPA	1674	(+)	CANNTG	napA; storage protein; ABRE; E-box; seed;
EBOXBNNAPA	104	(-)	CANNTG	napA; storage protein; ABRE; E-box; seed;
EBOXBNNAPA	163	(-)	CANNTG	napA; storage protein; ABRE; E-box; seed;
EBOXBNNAPA	354	(-)	CANNTG	napA; storage protein; ABRE; E-box; seed;
EBOXBNNAPA	751	(-)	CANNTG	napA; storage protein; ABRE; E-box; seed;
EBOXBNNAPA	1458	(-)	CANNTG	napA; storage protein; ABRE; E-box; seed;
EBOXBNNAPA	1529	(-)	CANNTG	napA; storage protein; ABRE; E-box; seed;
EBOXBNNAPA	1635	(-)	CANNTG	napA; storage protein; ABRE; E-box; seed;
EBOXBNNAPA	1672	(-)	CANNTG	napA; storage protein; ABRE; E-box; seed;
EBOXBNNAPA	1674	(-)	CANNTG	napA; storage protein; ABRE; E-box; seed;
EECCRAH1	832	(-)	GANTTNC	low-CO2;
ELRECOREPCR 1	39	(+)	TTGACC	Elicitor; PR1; EIRE; ELRE; ERE; W box; WRKY1; palindrome; salicylic acid; TMV;
EMHVCHORD	1462	(+)	TGTAAAGT	EM; endosperm; hordein; nitrogen;
GARE1OSREP1	597	(-)	TAACAGA	aleurone; GARE; gibberellin; seed;
GARE2OSREP1	1657	(+)	TAACGTA	aleurone; GARE; gibberellin; seed;
GAREAT	260	(+)	TAACAAR	GARE; GA;
GAREAT	1569	(+)	TAACAAR	GARE; GA;
GATABOX	67	(+)	GATA	ASF-2; GATA box; Cab; chlorophyll a/b binding protein; leaf; shoot;
GATABOX	136	(+)	GATA	ASF-2; GATA box; Cab; chlorophyll a/b binding protein; leaf; shoot;
GATABOX	175	(+)	GATA	ASF-2; GATA box; Cab; chlorophyll a/b binding protein; leaf; shoot;
GATABOX	184	(+)	GATA	ASF-2; GATA box; Cab; chlorophyll a/b binding protein; leaf; shoot;
GATABOX	389	(+)	GATA	ASF-2; GATA box; Cab; chlorophyll a/b binding protein; leaf; shoot;
GATABOX	1266	(+)	GATA	ASF-2; GATA box; Cab; chlorophyll a/b binding protein; leaf; shoot;
GATABOX	1324	(+)	GATA	ASF-2; GATA box; Cab; chlorophyll a/b binding protein; leaf; shoot;
GATABOX	1810	(+)	GATA	ASF-2; GATA box; Cab; chlorophyll a/b binding protein; leaf; shoot;
GATABOX	110	(-)	GATA	ASF-2; GATA box; Cab; chlorophyll a/b binding protein; leaf; shoot;
GATABOX	595	(-)	GATA	ASF-2; GATA box; Cab; chlorophyll a/b binding protein; leaf; shoot;
GATABOX	1342	(-)	GATA	ASF-2; GATA box; Cab; chlorophyll a/b binding protein; leaf; shoot;
GATABOX	1645	(-)	GATA	ASF-2; GATA box; Cab; chlorophyll a/b binding protein; leaf; shoot;

GATABOX	1669	(-)	GATA	ASF-2; GATA box; Cab; chlorophyll a/b binding protein; leaf; shoot;
GATABOX	1874	(-)	GATA	ASF-2; GATA box; Cab; chlorophyll a/b binding protein; leaf; shoot;
GATABOX	1941	(-)	GATA	ASF-2; GATA box; Cab; chlorophyll a/b binding protein; leaf; shoot;
GT1CONSENSUS	184	(+)	GRWAAW	GT-1; light; TATA; TFIIA; TBP; HR; SAR; TMV; leaf; shoot;
GT1CONSENSUS	389	(+)	GRWAAW	GT-1; light; TATA; TFIIA; TBP; HR; SAR; TMV; leaf; shoot;
GT1CONSENSUS	832	(+)	GRWAAW	GT-1; light; TATA; TFIIA; TBP; HR; SAR; TMV; leaf; shoot;
GT1CONSENSUS	1724	(+)	GRWAAW	GT-1; light; TATA; TFIIA; TBP; HR; SAR; TMV; leaf; shoot;
GT1CONSENSUS	1820	(-)	GRWAAW	GT-1; light; TATA; TFIIA; TBP; HR; SAR; TMV; leaf; shoot;
GT1CONSENSUS	593	(-)	GRWAAW	GT-1; light; TATA; TFIIA; TBP; HR; SAR; TMV; leaf; shoot;
GT1CONSENSUS	854	(-)	GRWAAW	GT-1; light; TATA; TFIIA; TBP; HR; SAR; TMV; leaf; shoot;
GTGANTG10	114	(+)	GTGA	g10; pollen; pectate lyase
GTGANTG10	430	(+)	GTGA	g10; pollen; pectate lyase
GTGANTG10	868	(+)	GTGA	g10; pollen; pectate lyase
GTGANTG10	944	(+)	GTGA	g10; pollen; pectate lyase
GTGANTG10	986	(+)	GTGA	g10; pollen; pectate lyase
GTGANTG10	1846	(+)	GTGA	g10; pollen; pectate lyase
GTGANTG10	103	(-)	GTGA	g10; pollen; pectate lyase
GTGANTG10	350	(-)	GTGA	g10; pollen; pectate lyase
GTGANTG10	364	(-)	GTGA	g10; pollen; pectate lyase
GTGANTG10	422	(-)	GTGA	g10; pollen; pectate lyase
GTGANTG10	1198	(-)	GTGA	g10; pollen; pectate lyase
GTGANTG10	1472	(-)	GTGA	g10; pollen; pectate lyase
GTGANTG10	1609	(-)	GTGA	g10; pollen; pectate lyase
GTGANTG10	1671	(-)	GTGA	g10; pollen; pectate lyase
GTGANTG10	1943	(-)	GTGA	g10; pollen; pectate lyase
HEXAMERATH4	1	(-)	CCGTCG	hexamer; histone; H4; meristem;
HEXAMERATH4	1005	(-)	CCGTCG	hexamer; histone; H4; meristem;
IBOXCORE	136	(+)	GATAA	I box; I-box; rbcS; light regulation; light; leaf; shoot;
IBOXCORE	184	(+)	GATAA	I box; I-box; rbcS; light regulation; light; leaf; shoot;
IBOXCORE	389	(+)	GATAA	I box; I-box; rbcS; light regulation; light; leaf; shoot;
IBOXCORE	594	(-)	GATAA	I box; I-box; rbcS; light regulation; light; leaf; shoot;
IBOXCORE	1644	(-)	GATAA	I box; I-box; rbcS; light regulation; light; leaf; shoot;
INRNTPSADB	1156	(-)	YTCANTYY	initiator; light-responsive transcription; TATA-less promoter; psaDb; Inr element;
INRNTPSADB	941	(-)	YTCANTYY	initiator; light-responsive transcription; TATA-less promoter; psaDb; Inr element;
INTRONLOWER	221	(+)	TGCAGG	intron; splice junction;
INTRONLOWER	219	(-)	TGCAGG	intron; splice junction;
LTRECOREATCO R15	997	(-)	CCGAC	low temperature; cold; LTRE; drought; ABA; cor15a; BN115; leaf; shoot; phytochrome;
MYB1AT	547	(+)	WAACCA	MYB; rd22BP1; ABA; leaf; seed; stress;
MYB1AT	490	(-)	WAACCA	MYB; rd22BP1; ABA; leaf; seed; stress;
MYB1AT	688	(-)	WAACCA	MYB; rd22BP1; ABA; leaf; seed; stress;
MYB1AT	1729	(-)	WAACCA	MYB; rd22BP1; ABA; leaf; seed; stress;
MYB2AT	249	(-)	TAACGT	MYB; myb; SV40; enhancer; bronze; bronze-1; leaf; shoot;
MYB2CONSENS USAT	727	(+)	YAACKG	MYB; rd22BP1; ABA; leaf; seed; stress;

Anhang

MYB2CONSENSUSAT	905	(+)	YAACKG	MYB; rd22BP1; ABA; leaf; seed; stress;
MYB2CONSENSUSAT	249	(-)	YAACKG	MYB; rd22BP1; ABA; leaf; seed; stress;
MYBCORE	249	(+)	CNGTTR	MYB; myb; dehydration; water; stress; flavonoid biosynthesis; leaf; shoot;
MYBCORE	598	(+)	CNGTTR	MYB; myb; dehydration; water; stress; flavonoid biosynthesis; leaf; shoot;
MYBCORE	701	(-)	CNGTTR	MYB; myb; dehydration; water; stress; flavonoid biosynthesis; leaf; shoot;
MYBCORE	727	(-)	CNGTTR	MYB; myb; dehydration; water; stress; flavonoid biosynthesis; leaf; shoot;
MYBCORE	905	(-)	CNGTTR	MYB; myb; dehydration; water; stress; flavonoid biosynthesis; leaf; shoot;
MYBCOREATCYCB1	728	(+)	AACGG	MYB; rd22BP1; ABA; leaf; seed; stress;
MYBCOREATCYCB1	906	(+)	AACGG	MYB; rd22BP1; ABA; leaf; seed; stress;
MYBCOREATCYCB1	1364	(+)	AACGG	MYB; rd22BP1; ABA; leaf; seed; stress;
MYBCOREATCYCB1	1301	(-)	AACGG	MYB; rd22BP1; ABA; leaf; seed; stress;
MYBGAHV	260	(+)	TAACAAA	myb; Myb; GAmyb; GA; gibberellin; GARC; alph-amylase; amylase;
MYBGAHV	1569	(+)	TAACAAA	myb; Myb; GAmyb; GA; gibberellin; GARC; alph-amylase; amylase;
MYBPLANT	1653	(+)	MACCWAMC	Myb; MYB; Myb305; AmMYB308; AmMYB330; flower; PAL; CHS; DFR; Candi; Bz1; phenylpropanoid; lignin; leaf; shoot;
MYBPZM	398	(-)	CCWACC	P; P gene: P-gene; MYB; myb; seed;
MYBST1	66	(+)	GGATA	MYB; myb; Myb;
MYBST1	135	(+)	GGATA	MYB; myb; Myb;
MYBST1	183	(+)	GGATA	MYB; myb; Myb;
MYBST1	1323	(+)	GGATA	MYB; myb; Myb;
MYBST1	1809	(+)	GGATA	MYB; myb; Myb;
MYBST1	1342	(-)	GGATA	MYB; myb; Myb;
MYBST1	1645	(-)	GGATA	MYB; myb; Myb;
MYCATERD1	1674	(+)	CATGTG	water-stress; erd;
MYCATERD1	104	(-)	CATGTG	water-stress; erd;
MYCATERD1	354	(-)	CATGTG	water-stress; erd;
MYCATERD1	1672	(-)	CATGTG	water-stress; erd;
MYCATRD22	104	(+)	CACATG	Dehydration; Water stress; ABA; MYC; myc; leaf; shoot;
MYCATRD22	354	(+)	CACATG	Dehydration; Water stress; ABA; MYC; myc; leaf; shoot;
MYCATRD22	1672	(+)	CACATG	Dehydration; Water stress; ABA; MYC; myc; leaf; shoot;
MYCATRD22	1674	(-)	CACATG	Dehydration; Water stress; ABA; MYC; myc; leaf; shoot;
MYCCONSENSUSAT	104	(+)	CANNTG	MYC; rd22BP1; ABA; leaf; seed; stress; CBF3; cold; CBF/DREB1; ICE1; RRE;
MYCCONSENSUSAT	163	(+)	CANNTG	MYC; rd22BP1; ABA; leaf; seed; stress; CBF3; cold; CBF/DREB1; ICE1; RRE;
MYCCONSENSUSAT	354	(+)	CANNTG	MYC; rd22BP1; ABA; leaf; seed; stress; CBF3; cold; CBF/DREB1; ICE1; RRE;
MYCCONSENSUSAT	751	(+)	CANNTG	MYC; rd22BP1; ABA; leaf; seed; stress; CBF3; cold; CBF/DREB1; ICE1; RRE;
MYCCONSENSUSAT	1458	(+)	CANNTG	MYC; rd22BP1; ABA; leaf; seed; stress; CBF3; cold; CBF/DREB1; ICE1; RRE;
MYCCONSENSUSAT	1529	(+)	CANNTG	MYC; rd22BP1; ABA; leaf; seed; stress; CBF3; cold; CBF/DREB1; ICE1; RRE;
MYCCONSENSUSAT	1635	(+)	CANNTG	MYC; rd22BP1; ABA; leaf; seed; stress; CBF3; cold; CBF/DREB1; ICE1; RRE;
MYCCONSENSUSAT	1672	(+)	CANNTG	MYC; rd22BP1; ABA; leaf; seed; stress; CBF3; cold; CBF/DREB1; ICE1; RRE;
MYCCONSENSUSAT	1674	(+)	CANNTG	MYC; rd22BP1; ABA; leaf; seed; stress; CBF3; cold; CBF/DREB1; ICE1; RRE;

MYCCONSENSU SAT	104	(-)	CANNTG	MYC; rd22BP1; ABA; leaf; seed; stress; CBF3; cold; CBF/DREB1; ICE1; RRE;
MYCCONSENSU SAT	163	(-)	CANNTG	MYC; rd22BP1; ABA; leaf; seed; stress; CBF3; cold; CBF/DREB1; ICE1; RRE;
MYCCONSENSU SAT	354	(-)	CANNTG	MYC; rd22BP1; ABA; leaf; seed; stress; CBF3; cold; CBF/DREB1; ICE1; RRE;
MYCCONSENSU SAT	751	(-)	CANNTG	MYC; rd22BP1; ABA; leaf; seed; stress; CBF3; cold; CBF/DREB1; ICE1; RRE;
MYCCONSENSU SAT	1458	(-)	CANNTG	MYC; rd22BP1; ABA; leaf; seed; stress; CBF3; cold; CBF/DREB1; ICE1; RRE;
MYCCONSENSU SAT	1529	(-)	CANNTG	MYC; rd22BP1; ABA; leaf; seed; stress; CBF3; cold; CBF/DREB1; ICE1; RRE;
MYCCONSENSU SAT	1635	(-)	CANNTG	MYC; rd22BP1; ABA; leaf; seed; stress; CBF3; cold; CBF/DREB1; ICE1; RRE;
MYCCONSENSU SAT	1672	(-)	CANNTG	MYC; rd22BP1; ABA; leaf; seed; stress; CBF3; cold; CBF/DREB1; ICE1; RRE;
MYCCONSENSU SAT	1674	(-)	CANNTG	MYC; rd22BP1; ABA; leaf; seed; stress; CBF3; cold; CBF/DREB1; ICE1; RRE;
NODCON2GM	1071	(-)	CTCTT	One of two putative nodulin consensus sequences;
NONAMERATH4	1143	(+)	AGATCGACG	nonamer; histone; H4; meristem;
NTBBF1ARROLB	410	(-)	ACTTTA	rolB; Dof; auxin; domain B; root; shoot; meristem; vascular;
NTBBF1ARROLB	1464	(-)	ACTTTA	rolB; Dof; auxin; domain B; root; shoot; meristem; vascular;
OSE2ROOTNOD ULE	1071	(-)	CTCTT	leghemoglobin; Lb29; root; nodule; arbuscule
PALBOXAPC	874	(+)	CCGTCC	Box A; PAL; These elements appear to be necessary but not sufficient for elicitor or light-mediated PAL gene activation.
PALBOXAPC	435	(-)	CCGTCC	Box A; PAL; These elements appear to be necessary but not sufficient for elicitor or light-mediated PAL gene activation.
POLASIG1	1354	(+)	AATAAA	poly A; polyadenylation;
POLASIG1	1759	(+)	AATAAA	poly A; polyadenylation;
POLASIG1	1898	(+)	AATAAA	poly A; polyadenylation;
POLASIG1	1310	(-)	AATAAA	poly A; polyadenylation;
POLASIG2	1754	(+)	AATTAAA	poly A; polyadenylation;
POLASIG3	1781	(+)	AATAAT	poly A; polyadenylation;
POLASIG3	1614	(-)	AATAAT	poly A; polyadenylation;
POLLEN1LELAT5 2	326	(+)	AGAAA	pollen; lat52; endo-beta-mannanase; MAN;
POLLEN1LELAT5 2	1361	(+)	AGAAA	pollen; lat52; endo-beta-mannanase; MAN;
POLLEN1LELAT5 2	1969	(+)	AGAAA	pollen; lat52; endo-beta-mannanase; MAN;
POLLEN1LELAT5 2	54	(-)	AGAAA	pollen; lat52; endo-beta-mannanase; MAN;
POLLEN1LELAT5 2	691	(-)	AGAAA	pollen; lat52; endo-beta-mannanase; MAN;
POLLEN1LELAT5 2	737	(-)	AGAAA	pollen; lat52; endo-beta-mannanase; MAN;
POLLEN1LELAT5 2	1304	(-)	AGAAA	pollen; lat52; endo-beta-mannanase; MAN;
POLLEN1LELAT5 2	1822	(-)	AGAAA	pollen; lat52; endo-beta-mannanase; MAN;
PRECONSCRHSP 70A	515	(+)	SCGAYNRNN NNNNNNNN NNNNNH	HSP; chlorophyl; MgProto;
PRECONSCRHSP 70A	664	(+)	SCGAYNRNN NNNNNNNN NNNNNH	HSP; chlorophyl; MgProto;
PYRIMIDINEBOX OSRAMY1A	604	(+)	CCTTTT	alpha-amylase; sugar repression; GARE; pyrimidine box; feed-back metabolic repression; embryo; seed; Dof; BPBF; pbf;
PYRIMIDINEBOX OSRAMY1A	1240	(-)	CCTTTT	alpha-amylase; sugar repression; GARE; pyrimidine box; feed-back metabolic repression; embryo; seed; Dof; BPBF; pbf;

Anhang

RAV1AAT	277	(+)	CAACA	RAV1; AP2; VP1; B3; root; leaf; shoot
RAV1AAT	332	(+)	CAACA	RAV1; AP2; VP1; B3; root; leaf; shoot
RAV1AAT	701	(+)	CAACA	RAV1; AP2; VP1; B3; root; leaf; shoot
RAV1AAT	934	(+)	CAACA	RAV1; AP2; VP1; B3; root; leaf; shoot
RAV1AAT	1036	(+)	CAACA	RAV1; AP2; VP1; B3; root; leaf; shoot
RAV1AAT	632	(-)	CAACA	RAV1; AP2; VP1; B3; root; leaf; shoot
RAV1BAT	751	(-)	CACCTG	RAV1; AP2; VP1; B3; root; leaf; shoot
REBETALGLHCB 21	182	(+)	CGGATA	REalpha; Lhcb21; phytochrome; REbeta;
RHERPATEXPA7	1609	(+)	KCACGW	root; hair;
RHERPATEXPA7	112	(-)	KCACGW	root; hair;
ROOTMOTIFTA POX1	285	(+)	ATATT	root; rolD;
ROOTMOTIFTA POX1	1378	(+)	ATATT	root; rolD;
ROOTMOTIFTA POX1	1663	(+)	ATATT	root; rolD;
ROOTMOTIFTA POX1	282	(-)	ATATT	root; rolD;
ROOTMOTIFTA POX1	1494	(-)	ATATT	root; rolD;
ROOTMOTIFTA POX1	1902	(-)	ATATT	root; rolD;
RYREPEATBNN PA	1709	(+)	CATGCA	ABRE mediated transactivation by ABI3 and ABI3-dependent response to ABA;
RYREPEATBNN PA	1850	(+)	CATGCA	ABRE mediated transactivation by ABI3 and ABI3-dependent response to ABA;
RYREPEATBNN PA	1854	(+)	CATGCA	ABRE mediated transactivation by ABI3 and ABI3-dependent response to ABA;
RYREPEATBNN PA	1716	(-)	CATGCA	ABRE mediated transactivation by ABI3 and ABI3-dependent response to ABA;
RYREPEATBNN PA	1852	(-)	CATGCA	ABRE mediated transactivation by ABI3 and ABI3-dependent response to ABA;
RYREPEATBNN PA	1856	(-)	CATGCA	ABRE mediated transactivation by ABI3 and ABI3-dependent response to ABA;
RYREPEATBNN PA	1906	(-)	CATGCA	ABRE mediated transactivation by ABI3 and ABI3-dependent response to ABA;
RYREPEATGMG Y2	1850	(+)	CATGCAT	glycinin; CATGCAT; Gy2; seed
RYREPEATGMG Y2	1854	(+)	CATGCAT	glycinin; CATGCAT; Gy2; seed
RYREPEATGMG Y2	1851	(-)	CATGCAT	glycinin; CATGCAT; Gy2; seed
RYREPEATGMG Y2	1855	(-)	CATGCAT	glycinin; CATGCAT; Gy2; seed
RYREPEATGMG Y2	1905	(-)	CATGCAT	glycinin; CATGCAT; Gy2; seed
RYREPEATLEGU MINBOX	1709	(+)	CATGCAY	RY repeat; legumin box; seed; storage protein;
RYREPEATLEGU MINBOX	1850	(+)	CATGCAY	RY repeat; legumin box; seed; storage protein;
RYREPEATLEGU MINBOX	1854	(+)	CATGCAY	RY repeat; legumin box; seed; storage protein;
RYREPEATLEGU MINBOX	1851	(-)	CATGCAY	RY repeat; legumin box; seed; storage protein;
RYREPEATLEGU MINBOX	1855	(-)	CATGCAY	RY repeat; legumin box; seed; storage protein;
RYREPEATLEGU MINBOX	1905	(-)	CATGCAY	RY repeat; legumin box; seed; storage protein;
RYREPEATVFL 4	1850	(+)	CATGCATG	RY repeat motif; LeB4; Gy2; seed; Sph; ABA; VP1; Osem; Em; ABRE; FUS3; embryo; B3; GA
RYREPEATVFL 4	1854	(+)	CATGCATG	RY repeat motif; LeB4; Gy2; seed; Sph; ABA; VP1; Osem; Em; ABRE; FUS3; embryo; B3; GA

RYREPEATVFLEB4	1850	(-)	CATGCATG	RY repeat motif; LeB4; Gy2; seed; Sph; ABA; VP1; Osem; Em; ABRE; FUS3; embryo; B3; GA
RYREPEATVFLEB4	1854	(-)	CATGCATG	RY repeat motif; LeB4; Gy2; seed; Sph; ABA; VP1; Osem; Em; ABRE; FUS3; embryo; B3; GA
S1FBOXSORPS1L21	301	(-)	ATGGTA	S1F; S1F box; S1F-box; S1; plastid protein; RPS1; RPL21; leaf; negative;
SBOXATRBCS	365	(+)	CACCTCCA	rbcS; sugar; ABA; ABI4;
SEBFCONSSTPR10A	1195	(+)	YGTGCWC	PR-10a; SEBF; pathogenesis; silencing;
SEF1MOTIF	1898	(-)	ATATTTAWW	SOYBEAN; STORAGE PROTEIN; 7S; GLOBULIN; BETA-CONGLICININ; seed;
SEF4MOTIFGM7S	289	(-)	RTTTTTR	soybean; seed; storage protein; 7S; globulin; beta-conglycinin; SEF;
SITEIATCYTC	649	(+)	TGGGCY	cytochrome; TCP-domain; meristem; oxidative phosphorylation;
SITEIATCYTC	1445	(+)	TGGGCY	cytochrome; TCP-domain; meristem; oxidative phosphorylation;
SITEIATCYTC	881	(-)	TGGGCY	cytochrome; TCP-domain; meristem; oxidative phosphorylation;
SORLIP1AT	454	(+)	GCCAC	phyA; phytochrome; light;
SORLIP1AT	574	(+)	GCCAC	phyA; phytochrome; light;
SORLIP1AT	615	(-)	GCCAC	phyA; phytochrome; light;
SORLIP1AT	992	(-)	GCCAC	phyA; phytochrome; light;
SORLIP1AT	1694	(-)	GCCAC	phyA; phytochrome; light;
SORLIP2AT	1446	(+)	GGGCC	phyA; phytochrome; light;
SORLIP2AT	1883	(+)	GGGCC	phyA; phytochrome; light;
SORLIP2AT	1884	(-)	GGGCC	phyA; phytochrome; light;
SORLREP3AT	1427	(-)	TGTATATAT	phyA; phytochrome; light;
SREATMSD	1644	(+)	TTATCC	Axillary bud outgrowth;
SREATMSD	135	(-)	TTATCC	Axillary bud outgrowth;
SREATMSD	183	(-)	TTATCC	Axillary bud outgrowth;
SURECOREATSULTR11	977	(+)	GAGAC	sulfate uptake; sulfate transporter; ARF; -S; S;
SURECOREATSULTR11	268	(-)	GAGAC	sulfate uptake; sulfate transporter; ARF; -S; S;
TAAAGSTKST1	410	(+)	TAAAG	KST1; Dof; guard cell;
TAAAGSTKST1	1464	(+)	TAAAG	KST1; Dof; guard cell;
TATABOX5	1311	(+)	TTATTT	TATA; glutamine; synthetase;
TATABOX5	1615	(+)	TTATTT	TATA; glutamine; synthetase;
TATABOX5	1818	(+)	TTATTT	TATA; glutamine; synthetase;
TATABOX5	257	(-)	TTATTT	TATA; glutamine; synthetase;
TATABOX5	1353	(-)	TTATTT	TATA; glutamine; synthetase;
TATABOX5	1758	(-)	TTATTT	TATA; glutamine; synthetase;
TATABOXOSPAL	1756	(-)	TATTTAA	TBP; TFIIB; pal; DNA binding and bending;
TATCCAOSAMY	1342	(+)	TATCCA	alpha-amylase; MYB proteins; gibberellin; GA; sugar starvation;
TATCCAOSAMY	1645	(+)	TATCCA	alpha-amylase; MYB proteins; gibberellin; GA; sugar starvation;
TATCCAOSAMY	1322	(-)	TATCCA	alpha-amylase; MYB proteins; gibberellin; GA; sugar starvation;
TATCCAOSAMY	1808	(-)	TATCCA	alpha-amylase; MYB proteins; gibberellin; GA; sugar starvation;
WBOXPCWRKY1	38	(+)	TTTGACY	W box; WRKY;
WBOXATNPR1	39	(+)	TTGAC	NPR1; WRKY; WRKY18; disease resistance; SA; W box;
WBOXATNPR1	1795	(+)	TTGAC	NPR1; WRKY; WRKY18; disease resistance; SA; W box;
WBOXHVIS01	1607	(-)	TGACT	sugar; SURE; patatin; WRKY; isoamylase; SUSIBA2;

Anhang

WBOXNTCHN48	1246	(-)	CTGACY	W-box; W box; WRKY; elicitor;
WBOXNTERF3	40	(+)	TGACY	W box; ERF3; wounding
WBOXNTERF3	1607	(-)	TGACY	W box; ERF3; wounding
WBOXNTERF3	1246	(-)	TGACY	W box; ERF3; wounding
WRKY71OS	40	(+)	TGAC	WRKY; GA; MYB; W box; TGAC; PR proteins;
WRKY71OS	1720	(+)	TGAC	WRKY; GA; MYB; W box; TGAC; PR proteins;
WRKY71OS	1796	(+)	TGAC	WRKY; GA; MYB; W box; TGAC; PR proteins;
WRKY71OS	1847	(+)	TGAC	WRKY; GA; MYB; W box; TGAC; PR proteins;
WRKY71OS	1197	(-)	TGAC	WRKY; GA; MYB; W box; TGAC; PR proteins;
WRKY71OS	1247	(-)	TGAC	WRKY; GA; MYB; W box; TGAC; PR proteins;
WRKY71OS	1608	(-)	TGAC	WRKY; GA; MYB; W box; TGAC; PR proteins;
WRKY71OS	1622	(-)	TGAC	WRKY; GA; MYB; W box; TGAC; PR proteins;

Tab. 27: Analyse der Region 2 kbp stromaufwärts (-2000) des *zmp70*-Gens durch PLACE.

Element	Position	Strang	Motiv	Funktion
-300ELEMENT	1503	(+)	TGHAAARK	-300 element; hordein; gliadin; glutenin; seed;
2SSEEDPROTB ANAPA	1730	(+)	CAAACAC	storage protein; ABRE; napA; 2S; seed;
ABRELATERD1	1804	(+)	ACGTG	ABRE; etiolation; erd;
ABRELATERD1	277	(-)	ACGTG	ABRE; etiolation; erd;
ABRELATERD1	773	(-)	ACGTG	ABRE; etiolation; erd;
ABRERATCAL	698	(+)	MACGYGB	ABRE; calcium;
ABRERATCAL	1803	(+)	MACGYGB	ABRE; calcium;
ACGTABOX	165	(+)	TACGTA	A-box; ACGT element; G motif; sugar; repression; seed;
ACGTABOX	1536	(+)	TACGTA	A-box; ACGT element; G motif; sugar; repression; seed;
ACGTABOX	165	(-)	TACGTA	A-box; ACGT element; G motif; sugar; repression; seed;
ACGTABOX	1536	(-)	TACGTA	A-box; ACGT element; G motif; sugar; repression; seed;
ACGTATERD1	166	(+)	ACGT	ACGT; etiolation; erd;
ACGTATERD1	278	(+)	ACGT	ACGT; etiolation; erd;
ACGTATERD1	774	(+)	ACGT	ACGT; etiolation; erd;
ACGTATERD1	908	(+)	ACGT	ACGT; etiolation; erd;
ACGTATERD1	989	(+)	ACGT	ACGT; etiolation; erd;
ACGTATERD1	1537	(+)	ACGT	ACGT; etiolation; erd;
ACGTATERD1	1804	(+)	ACGT	ACGT; etiolation; erd;
ACGTATERD1	166	(-)	ACGT	ACGT; etiolation; erd;
ACGTATERD1	278	(-)	ACGT	ACGT; etiolation; erd;
ACGTATERD1	774	(-)	ACGT	ACGT; etiolation; erd;
ACGTATERD1	908	(-)	ACGT	ACGT; etiolation; erd;
ACGTATERD1	989	(-)	ACGT	ACGT; etiolation; erd;
ACGTATERD1	1537	(-)	ACGT	ACGT; etiolation; erd;
ACGTATERD1	1804	(-)	ACGT	ACGT; etiolation; erd;
ANAERO2CON SENSUS	1913	(+)	AGCAGC	anaerobic
ANAERO2CON SENSUS	720	(-)	AGCAGC	anaerobic

ARFAT	1168	(+)	TGTCTC	auxin; AuxRE; ARF; ARF1; Aux/IAA; SAUR; NDE; GH3; D1; D4;
ARR1AT	66	(+)	NGATT	ARR1; Response regulator;
ARR1AT	640	(+)	NGATT	ARR1; Response regulator;
ARR1AT	1633	(+)	NGATT	ARR1; Response regulator;
ARR1AT	427	(+)	NGATT	ARR1; Response regulator;
ARR1AT	83	(-)	NGATT	ARR1; Response regulator;
ARR1AT	99	(-)	NGATT	ARR1; Response regulator;
ARR1AT	543	(-)	NGATT	ARR1; Response regulator;
ARR1AT	623	(-)	NGATT	ARR1; Response regulator;
ARR1AT	961	(-)	NGATT	ARR1; Response regulator;
ARR1AT	1226	(-)	NGATT	ARR1; Response regulator;
ASF1MOTIFCA MV	270	(-)	TGACG	TGACG; root; leaf; CaMV; 35S; promoter; auxin; salicylic acid; light; as-1; TGA1a, TGA1b; CREB; ASF1; TGA6; shoot; xenobiotic; stress; SAR; SA; Disease resistance;
ASF1MOTIFCA MV	1004	(-)	TGACG	TGACG; root; leaf; CaMV; 35S; promoter; auxin; salicylic acid; light; as-1; TGA1a, TGA1b; CREB; ASF1; TGA6; shoot; xenobiotic; stress; SAR; SA; Disease resistance;
ASF1MOTIFCA MV	1715	(-)	TGACG	TGACG; root; leaf; CaMV; 35S; promoter; auxin; salicylic acid; light; as-1; TGA1a, TGA1b; CREB; ASF1; TGA6; shoot; xenobiotic; stress; SAR; SA; Disease resistance;
ASF1MOTIFCA MV	1765	(-)	TGACG	TGACG; root; leaf; CaMV; 35S; promoter; auxin; salicylic acid; light; as-1; TGA1a, TGA1b; CREB; ASF1; TGA6; shoot; xenobiotic; stress; SAR; SA; Disease resistance;
BIHD1OS	480	(+)	TGTCA	HD; homeodomain;
BIHD1OS	760	(+)	TGTCA	HD; homeodomain;
BIHD1OS	680	(-)	TGTCA	HD; homeodomain;
BIHD1OS	689	(-)	TGTCA	HD; homeodomain;
BIHD1OS	836	(-)	TGTCA	HD; homeodomain;
BIHD1OS	1452	(-)	TGTCA	HD; homeodomain;
BOXIINTPATPB BOXLCORED CPAL	1681 1409	(-) (-)	ATAGAA ACCCWCC	plastid; NEP; atpB; PatpB; NCII; Box I; Box II; MYB; R2R3 type; PAL; Elicitor; UV-B; Dilution;
BS1EGCCR	300	(-)	AGCGGG	cinnamoyl-CoA reductase; vascular; BS1; stem;
CAATBOX1	36	(+)	CAAT	CAAT; legA; seed;
CAATBOX1	960	(+)	CAAT	CAAT; legA; seed;
CAATBOX1	1691	(+)	CAAT	CAAT; legA; seed;
CAATBOX1	1787	(+)	CAAT	CAAT; legA; seed;
CAATBOX1	373	(-)	CAAT	CAAT; legA; seed;
CAATBOX1	633	(-)	CAAT	CAAT; legA; seed;
CAATBOX1	931	(-)	CAAT	CAAT; legA; seed;
CAATBOX1	1210	(-)	CAAT	CAAT; legA; seed;
CAATBOX1	1220	(-)	CAAT	CAAT; legA; seed;
CAATBOX1	1841	(-)	CAAT	CAAT; legA; seed;
CAATBOX1	1908	(-)	CAAT	CAAT; legA; seed;
CAATBOX1	1948	(-)	CAAT	CAAT; legA; seed;
CAATBOX1	1956	(-)	CAAT	CAAT; legA; seed;
CACTFTPPCA1	129	(+)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	208	(+)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	757	(+)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	952	(+)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	964	(+)	YACT	mesohpyll; CACT;

Anhang

CACTFTPPCA1	1600	(+)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	1609	(+)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	1720	(+)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	1816	(+)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	1885	(+)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	1904	(+)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	211	(+)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	214	(+)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	559	(+)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	660	(+)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	822	(+)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	904	(+)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	1131	(+)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	1136	(+)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	233	(-)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	366	(-)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	581	(-)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	598	(-)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	601	(-)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	604	(-)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	687	(-)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	847	(-)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	928	(-)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	1088	(-)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	1186	(-)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	1321	(-)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	1919	(-)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	1939	(-)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	1964	(-)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	1967	(-)	YACT	mesohpyll; CACT;
CACTFTPPCA1	1975	(-)	YACT	mesohpyll; CACT;
CANBNNAPA	1730	(+)	CNAACAC	(CA)n element; napA; napin; seed; storage protein;
CANBNNAPA	1976	(-)	CNAACAC	(CA)n element; napA; napin; seed; storage protein;
CAREOSREP1	740	(+)	CAACTC	aleurone; GARE; gibberellin; seed;
CARGATCONSE NSUS	1690	(+)	CCWWWWW WGG	SOC1; Flowering time; CONSTANS; FLC;
CARGATCONSE NSUS	1690	(-)	CCWWWWW WGG	SOC1; Flowering time; CONSTANS; FLC;
CARGCW8GAT	354	(+)	CWWWWW WWG	CArG; AGL15; AGAMOUS; MADS;
CARGCW8GAT	354	(-)	CWWWWW WWG	CArG; AGL15; AGAMOUS; MADS;
CBFHV	802	(+)	RYCGAC	CBF; AP2 domain; CRT/DRE; low temperature;
CBFHV	1373	(+)	RYCGAC	CBF; AP2 domain; CRT/DRE; low temperature;
CBFHV	433	(-)	RYCGAC	CBF; AP2 domain; CRT/DRE; low temperature;
CBFHV	1467	(-)	RYCGAC	CBF; AP2 domain; CRT/DRE; low temperature;

CBFHV	1631	(-)	RYCGAC	CBF; AP2 domain; CRT/DRE; low temperature;
CCAATBOX1	1690	(+)	CCAAT	HSE (Heat shock element); CCAAT box;
CCAATBOX1	1786	(+)	CCAAT	HSE (Heat shock element); CCAAT box;
CCAATBOX1	373	(-)	CCAAT	HSE (Heat shock element); CCAAT box;
CCAATBOX1	931	(-)	CCAAT	HSE (Heat shock element); CCAAT box;
CCAATBOX1	1956	(-)	CCAAT	HSE (Heat shock element); CCAAT box;
CGACGOSAMY 3	457	(+)	CGACG	amylase
CGACGOSAMY 3	984	(+)	CGACG	amylase
CGACGOSAMY 3	987	(+)	CGACG	amylase
CGACGOSAMY 3	290	(-)	CGACG	amylase
CGACGOSAMY 3	432	(-)	CGACG	amylase
CGACGOSAMY 3	775	(-)	CGACG	amylase
CGACGOSAMY 3	780	(-)	CGACG	amylase
CGACGOSAMY 3	783	(-)	CGACG	amylase
CGACGOSAMY 3	786	(-)	CGACG	amylase
CGACGOSAMY 3	909	(-)	CGACG	amylase
CGACGOSAMY 3	1627	(-)	CGACG	amylase
CGACGOSAMY 3	1630	(-)	CGACG	amylase
CGCGBOXAT	185	(+)	VCGCGB	calmodulin
CGCGBOXAT	699	(+)	VCGCGB	calmodulin
CGCGBOXAT	1462	(+)	VCGCGB	calmodulin
CGCGBOXAT	335	(+)	VCGCGB	calmodulin
CGCGBOXAT	472	(+)	VCGCGB	calmodulin
CGCGBOXAT	701	(+)	VCGCGB	calmodulin
CGCGBOXAT	185	(-)	VCGCGB	calmodulin
CGCGBOXAT	699	(-)	VCGCGB	calmodulin
CGCGBOXAT	1462	(-)	VCGCGB	calmodulin
CGCGBOXAT	335	(-)	VCGCGB	calmodulin
CGCGBOXAT	472	(-)	VCGCGB	calmodulin
CGCGBOXAT	701	(-)	VCGCGB	calmodulin
CIACADIANLEL HC	641	(-)	CAANNNNATC	ircadian; light; Lhc; leaf; shoot;
CPBCSPOR	6	(-)	TATTAG	cytokinin; chlorophyll; chloroplast;
CURECORECR	164	(+)	GTAC	copper; oxygen; hypoxic;
CURECORECR	176	(+)	GTAC	copper; oxygen; hypoxic;
CURECORECR	659	(+)	GTAC	copper; oxygen; hypoxic;
CURECORECR	1060	(+)	GTAC	copper; oxygen; hypoxic;
CURECORECR	1135	(+)	GTAC	copper; oxygen; hypoxic;
CURECORECR	164	(-)	GTAC	copper; oxygen; hypoxic;
CURECORECR	176	(-)	GTAC	copper; oxygen; hypoxic;
CURECORECR	659	(-)	GTAC	copper; oxygen; hypoxic;

Anhang

CURECORECR	1060	(-)	GTAC	copper; oxygen; hypoxic;
CURECORECR	1135	(-)	GTAC	copper; oxygen; hypoxic;
DOFCOREZM	514	(+)	AAAG	Dof; C4PEPC; CyPPDK; PEPC; C4; leaf; shoot;
DOFCOREZM	1319	(+)	AAAG	Dof; C4PEPC; CyPPDK; PEPC; C4; leaf; shoot;
DOFCOREZM	1386	(+)	AAAG	Dof; C4PEPC; CyPPDK; PEPC; C4; leaf; shoot;
DOFCOREZM	1439	(+)	AAAG	Dof; C4PEPC; CyPPDK; PEPC; C4; leaf; shoot;
DOFCOREZM	1506	(+)	AAAG	Dof; C4PEPC; CyPPDK; PEPC; C4; leaf; shoot;
DOFCOREZM	91	(-)	AAAG	Dof; C4PEPC; CyPPDK; PEPC; C4; leaf; shoot;
DOFCOREZM	159	(-)	AAAG	Dof; C4PEPC; CyPPDK; PEPC; C4; leaf; shoot;
DOFCOREZM	354	(-)	AAAG	Dof; C4PEPC; CyPPDK; PEPC; C4; leaf; shoot;
DOFCOREZM	411	(-)	AAAG	Dof; C4PEPC; CyPPDK; PEPC; C4; leaf; shoot;
DOFCOREZM	452	(-)	AAAG	Dof; C4PEPC; CyPPDK; PEPC; C4; leaf; shoot;
DOFCOREZM	1115	(-)	AAAG	Dof; C4PEPC; CyPPDK; PEPC; C4; leaf; shoot;
DOFCOREZM	1149	(-)	AAAG	Dof; C4PEPC; CyPPDK; PEPC; C4; leaf; shoot;
DOFCOREZM	1299	(-)	AAAG	Dof; C4PEPC; CyPPDK; PEPC; C4; leaf; shoot;
DOFCOREZM	1353	(-)	AAAG	Dof; C4PEPC; CyPPDK; PEPC; C4; leaf; shoot;
DOFCOREZM	1443	(-)	AAAG	Dof; C4PEPC; CyPPDK; PEPC; C4; leaf; shoot;
DOFCOREZM	1486	(-)	AAAG	Dof; C4PEPC; CyPPDK; PEPC; C4; leaf; shoot;
DOFCOREZM	1497	(-)	AAAG	Dof; C4PEPC; CyPPDK; PEPC; C4; leaf; shoot;
DPBFCORED CD C3	297	(+)	ACACNNG	Dc3; lea class gene; embryo; ABA; DPBF-1, DPBF-2; bZIP; GIA1;
DPBFCORED CD C3	682	(+)	ACACNNG	Dc3; lea class gene; embryo; ABA; DPBF-1, DPBF-2; bZIP; GIA1;
DPBFCORED CD C3	1008	(+)	ACACNNG	Dc3; lea class gene; embryo; ABA; DPBF-1, DPBF-2; bZIP; GIA1;
DPBFCORED CD C3	1719	(+)	ACACNNG	Dc3; lea class gene; embryo; ABA; DPBF-1, DPBF-2; bZIP; GIA1;
DPBFCORED CD C3	1733	(+)	ACACNNG	Dc3; lea class gene; embryo; ABA; DPBF-1, DPBF-2; bZIP; GIA1;
DPBFCORED CD C3	1063	(-)	ACACNNG	Dc3; lea class gene; embryo; ABA; DPBF-1, DPBF-2; bZIP; GIA1;
DRE1COREZM RAB17	994	(-)	ACCGAGA	rab17; ABA; drought response;
DRE2COREZM RAB17	1373	(+)	ACCGAC	rab17; ABA; drought response; DBF1; DBF2;
DRECRTCOREA T	1373	(+)	RCCGAC	DRE/CRT; drought; high-light; cold; DREB; DREB1; DREB2; CBF;
DRECRTCOREA T	1467	(-)	RCCGAC	DRE/CRT; drought; high-light; cold; DREB; DREB1; DREB2; CBF;
E2FCONSENSU S	532	(+)	WTTSSCSS	E2F
E2FCONSENSU S	1774	(-)	WTTSSCSS	E2F
EBOXBNNAPA	225	(+)	CANNTG	napA; storage protein; ABRE; E-box; seed;
EBOXBNNAPA	264	(+)	CANNTG	napA; storage protein; ABRE; E-box; seed;
EBOXBNNAPA	572	(+)	CANNTG	napA; storage protein; ABRE; E-box; seed;
EBOXBNNAPA	685	(+)	CANNTG	napA; storage protein; ABRE; E-box; seed;
EBOXBNNAPA	952	(+)	CANNTG	napA; storage protein; ABRE; E-box; seed;
EBOXBNNAPA	1063	(+)	CANNTG	napA; storage protein; ABRE; E-box; seed;
EBOXBNNAPA	1197	(+)	CANNTG	napA; storage protein; ABRE; E-box; seed;
EBOXBNNAPA	1600	(+)	CANNTG	napA; storage protein; ABRE; E-box; seed;
EBOXBNNAPA	225	(-)	CANNTG	napA; storage protein; ABRE; E-box; seed;

EBOXBNNAPA	264	(-)	CANNTG	napA; storage protein; ABRE; E-box; seed;
EBOXBNNAPA	572	(-)	CANNTG	napA; storage protein; ABRE; E-box; seed;
EBOXBNNAPA	685	(-)	CANNTG	napA; storage protein; ABRE; E-box; seed;
EBOXBNNAPA	952	(-)	CANNTG	napA; storage protein; ABRE; E-box; seed;
EBOXBNNAPA	1063	(-)	CANNTG	napA; storage protein; ABRE; E-box; seed;
EBOXBNNAPA	1197	(-)	CANNTG	napA; storage protein; ABRE; E-box; seed;
EBOXBNNAPA	1600	(-)	CANNTG	napA; storage protein; ABRE; E-box; seed;
ECCRCAH1	530	(+)	GANTTNC	low-CO ₂ ;
ECCRCAH1	641	(+)	GANTTNC	low-CO ₂ ;
ECCRCAH1	1274	(+)	GANTTNC	low-CO ₂ ;
ECCRCAH1	620	(-)	GANTTNC	low-CO ₂ ;
ECCRCAH1	739	(-)	GANTTNC	low-CO ₂ ;
ECCRCAH1	1223	(-)	GANTTNC	low-CO ₂ ;
ELRECOREPCR P1	259	(+)	TTGACC	Elicitor; PR1; EIRE; ELRE; ERE; W box; WRKY1; palindrome; salicylic acid; TMV;
GATABOX	902	(+)	GATA	ASF-2; GATA box; Cab; chlorophyll a/b binding protein; leaf; shoot;
GATABOX	1107	(+)	GATA	ASF-2; GATA box; Cab; chlorophyll a/b binding protein; leaf; shoot;
GATABOX	1140	(+)	GATA	ASF-2; GATA box; Cab; chlorophyll a/b binding protein; leaf; shoot;
GATABOX	1193	(+)	GATA	ASF-2; GATA box; Cab; chlorophyll a/b binding protein; leaf; shoot;
GATABOX	1834	(+)	GATA	ASF-2; GATA box; Cab; chlorophyll a/b binding protein; leaf; shoot;
GATABOX	30	(-)	GATA	ASF-2; GATA box; Cab; chlorophyll a/b binding protein; leaf; shoot;
GATABOX	1348	(-)	GATA	ASF-2; GATA box; Cab; chlorophyll a/b binding protein; leaf; shoot;
GATABOX	1446	(-)	GATA	ASF-2; GATA box; Cab; chlorophyll a/b binding protein; leaf; shoot;
GATABOX	1651	(-)	GATA	ASF-2; GATA box; Cab; chlorophyll a/b binding protein; leaf; shoot;
GATABOX	1727	(-)	GATA	ASF-2; GATA box; Cab; chlorophyll a/b binding protein; leaf; shoot;
GCCCORE	732	(-)	GCCGCC	GCC; GCC-box; ERE; JA; Pti4; ERF; PR;
GT1CONSENS US	504	(+)	GRWAAW	GT-1; light; TATA; TFIIA; TBP; HR; SAR; TMV; leaf; shoot;
GT1CONSENS US	505	(+)	GRWAAW	GT-1; light; TATA; TFIIA; TBP; HR; SAR; TMV; leaf; shoot;
GT1CONSENS US	28	(-)	GRWAAW	GT-1; light; TATA; TFIIA; TBP; HR; SAR; TMV; leaf; shoot;
GT1CONSENS US	642	(-)	GRWAAW	GT-1; light; TATA; TFIIA; TBP; HR; SAR; TMV; leaf; shoot;
GT1CONSENS US	1110	(-)	GRWAAW	GT-1; light; TATA; TFIIA; TBP; HR; SAR; TMV; leaf; shoot;
GT1CONSENS US	1144	(-)	GRWAAW	GT-1; light; TATA; TFIIA; TBP; HR; SAR; TMV; leaf; shoot;
GT1CONSENS US	1151	(-)	GRWAAW	GT-1; light; TATA; TFIIA; TBP; HR; SAR; TMV; leaf; shoot;
GT1CONSENS US	1444	(-)	GRWAAW	GT-1; light; TATA; TFIIA; TBP; HR; SAR; TMV; leaf; shoot;
GT1CORE	1888	(-)	GGTTAA	rbcS; box II; GT-1; rbcS-3; leaf; shoot;
GT1GMSCAM4	505	(+)	GAAAAA	GT-1 box;
GT1GMSCAM4	1144	(-)	GAAAAA	GT-1 box;
GTGANTG10	468	(+)	GTGA	g10; pollen; pectate lyase
GTGANTG10	688	(+)	GTGA	g10; pollen; pectate lyase
GTGANTG10	913	(+)	GTGA	g10; pollen; pectate lyase
GTGANTG10	1187	(+)	GTGA	g10; pollen; pectate lyase
GTGANTG10	1200	(+)	GTGA	g10; pollen; pectate lyase

Anhang

GTGANTG10	195	(-)	GTGA	g10; pollen; pectate lyase
GTGANTG10	272	(-)	GTGA	g10; pollen; pectate lyase
GTGANTG10	407	(-)	GTGA	g10; pollen; pectate lyase
GTGANTG10	963	(-)	GTGA	g10; pollen; pectate lyase
GTGANTG10	1006	(-)	GTGA	g10; pollen; pectate lyase
GTGANTG10	1717	(-)	GTGA	g10; pollen; pectate lyase
GTGANTG10	1767	(-)	GTGA	g10; pollen; pectate lyase
IBOXCORE	29	(-)	GATAA	I box; I-box; rbcS; light regulation; light; leaf; shoot;
IBOXCORE	1445	(-)	GATAA	I box; I-box; rbcS; light regulation; light; leaf; shoot;
INTRONLOWE R	1856	(+)	TGCAGG	intron; splice junction;
INTRONLOWE R	1592	(-)	TGCAGG	intron; splice junction;
L1BOXATPDF1	1569	(-)	TAAATGYA	PDF1; L1 box; L1 layer-specific expression; Shoot apical; meristem; SAM; organ primordia; cotton fiber; HDZip; homeodomain; leucine zipper;
LEAFYATAG	371	(-)	CCAATGT	LEAFY; AGAMOUS;
LTRE1HVBLT49	324	(+)	CCGAAA	low temperature; LTRE;
LTRE1HVBLT49	539	(+)	CCGAAA	low temperature; LTRE;
LTRECOREATC OR15	71	(+)	CCGAC	low temperature; cold; LTRE; drought; ABA; cor15a; BN115; leaf; shoot; phytochrome;
LTRECOREATC OR15	1374	(+)	CCGAC	low temperature; cold; LTRE; drought; ABA; cor15a; BN115; leaf; shoot; phytochrome;
LTRECOREATC OR15	1467	(-)	CCGAC	low temperature; cold; LTRE; drought; ABA; cor15a; BN115; leaf; shoot; phytochrome;
MARTBOX	506	(-)	TTWTWTTWTT	MAR; SAR; T-box; scaffold; matrix;
MYB1AT	1049	(+)	WAACCA	MYB; rd22BP1; ABA; leaf; seed; stress;
MYB1AT	1675	(+)	WAACCA	MYB; rd22BP1; ABA; leaf; seed; stress;
MYB1AT	1900	(+)	WAACCA	MYB; rd22BP1; ABA; leaf; seed; stress;
MYB1AT	1563	(+)	WAACCA	MYB; rd22BP1; ABA; leaf; seed; stress;
MYB1AT	1783	(+)	WAACCA	MYB; rd22BP1; ABA; leaf; seed; stress;
MYB1LEPR	1780	(-)	GTTAGTT	Pti4; ERF; PR; MYB;
MYB2AT	832	(+)	TAACTG	MYB; myb; SV40; enhancer; bronze; bronze-1; leaf; shoot;
MYB2CONSEN SUSAT	1927	(+)	YAACKG	MYB; rd22BP1; ABA; leaf; seed; stress;
MYB2CONSEN SUSAT	832	(+)	YAACKG	MYB; rd22BP1; ABA; leaf; seed; stress;
MYB2CONSEN SUSAT	676	(-)	YAACKG	MYB; rd22BP1; ABA; leaf; seed; stress;
MYBATRD22	1562	(+)	CTAACCA	Dehydration; Water stress; ABA; MYC; leaf; shoot;
MYBATRD22	1782	(+)	CTAACCA	Dehydration; Water stress; ABA; MYC; leaf; shoot;
MYBCORE	676	(+)	CNGTTR	MYB; myb; dehydration; water; stress; flavonoid biosynthesis; leaf; shoot;
MYBCORE	1846	(+)	CNGTTR	MYB; myb; dehydration; water; stress; flavonoid biosynthesis; leaf; shoot;
MYBCORE	1754	(-)	CNGTTR	MYB; myb; dehydration; water; stress; flavonoid biosynthesis; leaf; shoot;
MYBCORE	1927	(-)	CNGTTR	MYB; myb; dehydration; water; stress; flavonoid biosynthesis; leaf; shoot;
MYBCORE	832	(-)	CNGTTR	MYB; myb; dehydration; water; stress; flavonoid biosynthesis; leaf; shoot;
MYBCOREATC YCB1	1	(+)	AACGG	MYB; rd22BP1; ABA; leaf; seed; stress;
MYBCOREATC YCB1	1928	(+)	AACGG	MYB; rd22BP1; ABA; leaf; seed; stress;
MYBCOREATC YCB1	676	(-)	AACGG	MYB; rd22BP1; ABA; leaf; seed; stress;
MYBPZM	1174	(+)	CCWACC	P; P gene: P-gene; MYB; myb; seed;

MYBPZM	1409	(-)	CCWACC	P; P gene: P-gene; MYB; myb; seed;
MYCATERD1	264	(+)	CATGTG	water-stress; erd;
MYCATERD1	1063	(+)	CATGTG	water-stress; erd;
MYCATERD1	572	(-)	CATGTG	water-stress; erd;
MYCATRD22	572	(+)	CACATG	Dehydration; Water stress; ABA; MYC; myc; leaf; shoot;
MYCATRD22	264	(-)	CACATG	Dehydration; Water stress; ABA; MYC; myc; leaf; shoot;
MYCATRD22	1063	(-)	CACATG	Dehydration; Water stress; ABA; MYC; myc; leaf; shoot;
MYCCONSENS USAT	225	(+)	CANNTG	MYC; rd22BP1; ABA; leaf; seed; stress; CBF3; cold; CBF/DREB1; ICE1; RRE;
MYCCONSENS USAT	264	(+)	CANNTG	MYC; rd22BP1; ABA; leaf; seed; stress; CBF3; cold; CBF/DREB1; ICE1; RRE;
MYCCONSENS USAT	572	(+)	CANNTG	MYC; rd22BP1; ABA; leaf; seed; stress; CBF3; cold; CBF/DREB1; ICE1; RRE;
MYCCONSENS USAT	685	(+)	CANNTG	MYC; rd22BP1; ABA; leaf; seed; stress; CBF3; cold; CBF/DREB1; ICE1; RRE;
MYCCONSENS USAT	952	(+)	CANNTG	MYC; rd22BP1; ABA; leaf; seed; stress; CBF3; cold; CBF/DREB1; ICE1; RRE;
MYCCONSENS USAT	1063	(+)	CANNTG	MYC; rd22BP1; ABA; leaf; seed; stress; CBF3; cold; CBF/DREB1; ICE1; RRE;
MYCCONSENS USAT	1197	(+)	CANNTG	MYC; rd22BP1; ABA; leaf; seed; stress; CBF3; cold; CBF/DREB1; ICE1; RRE;
MYCCONSENS USAT	1600	(+)	CANNTG	MYC; rd22BP1; ABA; leaf; seed; stress; CBF3; cold; CBF/DREB1; ICE1; RRE;
MYCCONSENS USAT	225	(-)	CANNTG	MYC; rd22BP1; ABA; leaf; seed; stress; CBF3; cold; CBF/DREB1; ICE1; RRE;
MYCCONSENS USAT	264	(-)	CANNTG	MYC; rd22BP1; ABA; leaf; seed; stress; CBF3; cold; CBF/DREB1; ICE1; RRE;
MYCCONSENS USAT	572	(-)	CANNTG	MYC; rd22BP1; ABA; leaf; seed; stress; CBF3; cold; CBF/DREB1; ICE1; RRE;
MYCCONSENS USAT	685	(-)	CANNTG	MYC; rd22BP1; ABA; leaf; seed; stress; CBF3; cold; CBF/DREB1; ICE1; RRE;
MYCCONSENS USAT	952	(-)	CANNTG	MYC; rd22BP1; ABA; leaf; seed; stress; CBF3; cold; CBF/DREB1; ICE1; RRE;
MYCCONSENS USAT	1063	(-)	CANNTG	MYC; rd22BP1; ABA; leaf; seed; stress; CBF3; cold; CBF/DREB1; ICE1; RRE;
MYCCONSENS USAT	1197	(-)	CANNTG	MYC; rd22BP1; ABA; leaf; seed; stress; CBF3; cold; CBF/DREB1; ICE1; RRE;
MYCCONSENS USAT	1600	(-)	CANNTG	MYC; rd22BP1; ABA; leaf; seed; stress; CBF3; cold; CBF/DREB1; ICE1; RRE;
NODCON2GM	89	(+)	CTCTT	One of two putative nodulin consensus sequences;
NODCON2GM	157	(+)	CTCTT	One of two putative nodulin consensus sequences;
NODCON2GM	1342	(+)	CTCTT	One of two putative nodulin consensus sequences;
NODCON2GM	1351	(+)	CTCTT	One of two putative nodulin consensus sequences;
NODCON2GM	315	(-)	CTCTT	One of two putative nodulin consensus sequences;
OSE2ROOTNO DULE	89	(+)	CTCTT	leghemoglobin; Lb29; root; nodule; arbuscule
OSE2ROOTNO DULE	157	(+)	CTCTT	leghemoglobin; Lb29; root; nodule; arbuscule
OSE2ROOTNO DULE	1342	(+)	CTCTT	leghemoglobin; Lb29; root; nodule; arbuscule
OSE2ROOTNO DULE	1351	(+)	CTCTT	leghemoglobin; Lb29; root; nodule; arbuscule
OSE2ROOTNO DULE	315	(-)	CTCTT	leghemoglobin; Lb29; root; nodule; arbuscule
POLASIG1	509	(+)	AATAAA	poly A; polyadenylation;
POLASIG2	1798	(+)	AATATAA	poly A; polyadenylation;
POLASIG3	1692	(+)	AATAAT	poly A; polyadenylation;
POLASIG3	22	(-)	AATAAT	poly A; polyadenylation;

Anhang

POLASIG3	25	(-)	AATAAT	poly A; polyadenylation;
POLASIG3	1204	(-)	AATAAT	poly A; polyadenylation;
POLASIG3	1207	(-)	AATAAT	poly A; polyadenylation;
POLASIG3	1621	(-)	AATAAT	poly A; polyadenylation;
POLLEN1LELAT 52	1214	(+)	AGAAA	pollen; lat52; endo-beta-mannanase; MAN;
POLLEN1LELAT 52	1384	(+)	AGAAA	pollen; lat52; endo-beta-mannanase; MAN;
POLLEN1LELAT 52	1897	(+)	AGAAA	pollen; lat52; endo-beta-mannanase; MAN;
POLLEN1LELAT 52	488	(-)	AGAAA	pollen; lat52; endo-beta-mannanase; MAN;
POLLEN1LELAT 52	644	(-)	AGAAA	pollen; lat52; endo-beta-mannanase; MAN;
POLLEN1LELAT 52	992	(-)	AGAAA	pollen; lat52; endo-beta-mannanase; MAN;
POLLEN1LELAT 52	1112	(-)	AGAAA	pollen; lat52; endo-beta-mannanase; MAN;
POLLEN1LELAT 52	1146	(-)	AGAAA	pollen; lat52; endo-beta-mannanase; MAN;
POLLEN1LELAT 52	1300	(-)	AGAAA	pollen; lat52; endo-beta-mannanase; MAN;
POLLEN1LELAT 52	1488	(-)	AGAAA	pollen; lat52; endo-beta-mannanase; MAN;
POLLEN1LELAT 52	1499	(-)	AGAAA	pollen; lat52; endo-beta-mannanase; MAN;
PRECONSCRHS P70A	1531	(-)	SCGAYNRNNN NNNNNNNN NNNHD	HSP; chlorophyl; MgProto;
PRECONSCRHS P70A	768	(-)	SCGAYNRNNN NNNNNNNN NNNHD	HSP; chlorophyl; MgProto;
PYRIMIDINEBO XOSRAMY1A	513	(-)	CCTTTT	alpha-amylase; sugar repression; GARE; pyrimidine box; feed-back metabolic repression; embryo; seed; Dof; BPBF; pbf;
PYRIMIDINEBO XOSRAMY1A	1505	(-)	CCTTTT	alpha-amylase; sugar repression; GARE; pyrimidine box; feed-back metabolic repression; embryo; seed; Dof; BPBF; pbf;
RAV1AAT	33	(+)	CAACA	RAV1; AP2; VP1; B3; root; leaf; shoot
RAV1AAT	51	(+)	CAACA	RAV1; AP2; VP1; B3; root; leaf; shoot
RAV1AAT	190	(+)	CAACA	RAV1; AP2; VP1; B3; root; leaf; shoot
RAV1AAT	1754	(+)	CAACA	RAV1; AP2; VP1; B3; root; leaf; shoot
RAV1AAT	349	(-)	CAACA	RAV1; AP2; VP1; B3; root; leaf; shoot
RAV1AAT	1977	(-)	CAACA	RAV1; AP2; VP1; B3; root; leaf; shoot
RAV1BAT	1197	(-)	CACCTG	RAV1; AP2; VP1; B3; root; leaf; shoot
REALPHALGLH CB21	1784	(+)	AACCAA	REalpha; Lhcb21; phytochrome; REbeta;
RHERPATEXPA 7	276	(+)	KCACGW	root; hair;
RHERPATEXPA 7	584	(+)	KCACGW	root; hair;
RHERPATEXPA 7	772	(+)	KCACGW	root; hair;
RHERPATEXPA 7	1804	(-)	KCACGW	root; hair;
RHERPATEXPA 7	911	(-)	KCACGW	root; hair;
ROOTMOTIFTA POX1	631	(+)	ATATT	root; roLD;
ROOTMOTIFTA POX1	1108	(+)	ATATT	root; roLD;
ROOTMOTIFTA POX1	1141	(+)	ATATT	root; roLD;

ROOTMOTIFTA POX1	1218	(+)	ATATT	root; roLD;
ROOTMOTIFTA POX1	1520	(+)	ATATT	root; roLD;
ROOTMOTIFTA POX1	8	(-)	ATATT	root; roLD;
ROOTMOTIFTA POX1	1217	(-)	ATATT	root; roLD;
ROOTMOTIFTA POX1	1788	(-)	ATATT	root; roLD;
RYREPEATBNN APA	54	(+)	CATGCA	ABRE mediated transactivation by ABI3 adn ABI3-dependent response to ABA;
RYREPEATBNN APA	496	(+)	CATGCA	ABRE mediated transactivation by ABI3 adn ABI3-dependent response to ABA;
RYREPEATBNN APA	574	(+)	CATGCA	ABRE mediated transactivation by ABI3 adn ABI3-dependent response to ABA;
RYREPEATBNN APA	1325	(+)	CATGCA	ABRE mediated transactivation by ABI3 adn ABI3-dependent response to ABA;
RYREPEATBNN APA	1708	(+)	CATGCA	ABRE mediated transactivation by ABI3 adn ABI3-dependent response to ABA;
RYREPEATBNN APA	56	(-)	CATGCA	ABRE mediated transactivation by ABI3 adn ABI3-dependent response to ABA;
RYREPEATBNN APA	171	(-)	CATGCA	ABRE mediated transactivation by ABI3 adn ABI3-dependent response to ABA;
RYREPEATBNN APA	498	(-)	CATGCA	ABRE mediated transactivation by ABI3 adn ABI3-dependent response to ABA;
RYREPEATBNN APA	1036	(-)	CATGCA	ABRE mediated transactivation by ABI3 adn ABI3-dependent response to ABA;
RYREPEATBNN APA	1323	(-)	CATGCA	ABRE mediated transactivation by ABI3 adn ABI3-dependent response to ABA;
RYREPEATBNN APA	1327	(-)	CATGCA	ABRE mediated transactivation by ABI3 adn ABI3-dependent response to ABA;
RYREPEATBNN APA	1666	(-)	CATGCA	ABRE mediated transactivation by ABI3 adn ABI3-dependent response to ABA;
RYREPEATBNN APA	1807	(-)	CATGCA	ABRE mediated transactivation by ABI3 adn ABI3-dependent response to ABA;
RYREPEATGM GY2	54	(+)	CATGCAT	glycinin; CATGCAT; Gy2; seed
RYREPEATGM GY2	496	(+)	CATGCAT	glycinin; CATGCAT; Gy2; seed
RYREPEATGM GY2	574	(+)	CATGCAT	glycinin; CATGCAT; Gy2; seed
RYREPEATGM GY2	1325	(+)	CATGCAT	glycinin; CATGCAT; Gy2; seed
RYREPEATGM GY2	55	(-)	CATGCAT	glycinin; CATGCAT; Gy2; seed
RYREPEATGM GY2	170	(-)	CATGCAT	glycinin; CATGCAT; Gy2; seed
RYREPEATGM GY2	497	(-)	CATGCAT	glycinin; CATGCAT; Gy2; seed
RYREPEATGM GY2	1326	(-)	CATGCAT	glycinin; CATGCAT; Gy2; seed
RYREPEATGM GY2	1665	(-)	CATGCAT	glycinin; CATGCAT; Gy2; seed
RYREPEATLEG UMINBOX	54	(+)	CATGCAY	RY repeat; legumin box; seed; storage protein;
RYREPEATLEG UMINBOX	496	(+)	CATGCAY	RY repeat; legumin box; seed; storage protein;
RYREPEATLEG UMINBOX	574	(+)	CATGCAY	RY repeat; legumin box; seed; storage protein;
RYREPEATLEG UMINBOX	1325	(+)	CATGCAY	RY repeat; legumin box; seed; storage protein;
RYREPEATLEG UMINBOX	55	(-)	CATGCAY	RY repeat; legumin box; seed; storage protein;
RYREPEATLEG UMINBOX	170	(-)	CATGCAY	RY repeat; legumin box; seed; storage protein;
RYREPEATLEG UMINBOX	497	(-)	CATGCAY	RY repeat; legumin box; seed; storage protein;

Anhang

RYREPEATLEG UMINBOX	1326	(-)	CATGCAY	RY repeat; legumin box; seed; storage protein;
RYREPEATLEG UMINBOX	1665	(-)	CATGCAY	RY repeat; legumin box; seed; storage protein;
RYREPEATLEG UMINBOX	1322	(-)	CATGCAY	RY repeat; legumin box; seed; storage protein;
RYREPEATLEG UMINBOX	1806	(-)	CATGCAY	RY repeat; legumin box; seed; storage protein;
RYREPEATVFLE B4	54	(+)	CATGCATG	RY repeat motif; LeB4; Gy2; seed; Sph; ABA; VP1; Osem; Em; ABRE; FUS3; embryo; B3; GA
RYREPEATVFLE B4	496	(+)	CATGCATG	RY repeat motif; LeB4; Gy2; seed; Sph; ABA; VP1; Osem; Em; ABRE; FUS3; embryo; B3; GA
RYREPEATVFLE B4	1325	(+)	CATGCATG	RY repeat motif; LeB4; Gy2; seed; Sph; ABA; VP1; Osem; Em; ABRE; FUS3; embryo; B3; GA
RYREPEATVFLE B4	54	(-)	CATGCATG	RY repeat motif; LeB4; Gy2; seed; Sph; ABA; VP1; Osem; Em; ABRE; FUS3; embryo; B3; GA
RYREPEATVFLE B4	496	(-)	CATGCATG	RY repeat motif; LeB4; Gy2; seed; Sph; ABA; VP1; Osem; Em; ABRE; FUS3; embryo; B3; GA
RYREPEATVFLE B4	1325	(-)	CATGCATG	RY repeat motif; LeB4; Gy2; seed; Sph; ABA; VP1; Osem; Em; ABRE; FUS3; embryo; B3; GA
S1FBOXSORPS 1L21	1577	(-)	ATGGTA	S1F; S1F box; S1F-box; S1; plastid protein; RPS1; RPL21; leaf; negative;
S2FSORPL21	1566	(+)	CCATACATT	S2F; S2; plastid protein; RPL21; leaf-specific;
SEBFCONSSTP R10A	688	(-)	YTGTCWC	PR-10a; SEBF; pathogenesis; silencing;
SEF4MOTIFGM 7S	255	(+)	RTTTTTR	soybean; seed; storage protein; 7S; globulin; beta-conglycinin; SEF;
SITEIATCYTC	568	(-)	TGGGCY	cytochrome; TCP-domain; meristem; oxidative phosphorylation;
SORLIP1AT	294	(+)	GCCAC	phyA; phytochrome; light;
SORLIP1AT	950	(+)	GCCAC	phyA; phytochrome; light;
SORLIP1AT	137	(-)	GCCAC	phyA; phytochrome; light;
SORLIP1AT	858	(-)	GCCAC	phyA; phytochrome; light;
SORLIP1AT	1970	(-)	GCCAC	phyA; phytochrome; light;
SORLIP2AT	568	(-)	GGGCC	phyA; phytochrome; light;
SURECOREATS ULTR11	246	(+)	GAGAC	sulfate uptake; sulfate transporter; ARF; -S; S;
SURECOREATS ULTR11	650	(+)	GAGAC	sulfate uptake; sulfate transporter; ARF; -S; S;
SURECOREATS ULTR11	280	(-)	GAGAC	sulfate uptake; sulfate transporter; ARF; -S; S;
SURECOREATS ULTR11	935	(-)	GAGAC	sulfate uptake; sulfate transporter; ARF; -S; S;
SURECOREATS ULTR11	1169	(-)	GAGAC	sulfate uptake; sulfate transporter; ARF; -S; S;
T/GBOXATPIN 2	1803	(+)	AACGTG	T/G-box; JA; pin2; LAP; MYC; wounding;
TAAAGSTKST1	1438	(+)	TAAAG	KST1; Dof; guard cell;
TAAAGSTKST1	91	(-)	TAAAG	KST1; Dof; guard cell;
TAAAGSTKST1	1443	(-)	TAAAG	KST1; Dof; guard cell;
TATABOX2	10	(+)	TATAAAT	TATA; legA; phaseolin;
TATABOX2	1572	(-)	TATAAAT	TATA; legA; phaseolin;
TATABOX4	1434	(+)	TATATAA	TATA; sporamin; phaseolin;
TATABOX4	1822	(+)	TATATAA	TATA; sporamin; phaseolin;
TATABOX4	1433	(-)	TATATAA	TATA; sporamin; phaseolin;
TATABOX4	1849	(-)	TATATAA	TATA; sporamin; phaseolin;
TATABOX5	508	(-)	TTATTT	TATA; glutamine; synthetase;
TATAPVTRNAL EU	1434	(-)	TTTATATA	KST1; Dof; guard cell;

TATAPVTRNAL EU	1822	(-)	TTTATATA	KST1; Dof; guard cell;
TBOXATGAPB	451	(+)	ACTTTG	GAPB; glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; light-activated
TE2F2NTPCNA	532	(+)	ATTCCCGC	E2F; PCNA; meristematic tissue; cell cycle;
TRANSINITMO NOCOTS	1553	(-)	RMNAUGGC	Translation; Initiation; monocots
WBOXPCWR KY1	258	(+)	TTTGACY	W box; WRKY;
WBOXATNPR1	259	(+)	TTGAC	NPR1; WRKY; WRKY18; disease resistance; SA; W box;
WBOXATNPR1	679	(+)	TTGAC	NPR1; WRKY; WRKY18; disease resistance; SA; W box;
WBOXATNPR1	813	(+)	TTGAC	NPR1; WRKY; WRKY18; disease resistance; SA; W box;
WBOXATNPR1	761	(-)	TTGAC	NPR1; WRKY; WRKY18; disease resistance; SA; W box;
WBOXATNPR1	1876	(-)	TTGAC	NPR1; WRKY; WRKY18; disease resistance; SA; W box;
WBOXATNPR1	1925	(-)	TTGAC	NPR1; WRKY; WRKY18; disease resistance; SA; W box;
WBOXHVIS01	670	(+)	TGACT	sugar; SURE; patatin; WRKY; isoamylase; SUSIBA2;
WBOXHVIS01	814	(+)	TGACT	sugar; SURE; patatin; WRKY; isoamylase; SUSIBA2;
WBOXHVIS01	218	(-)	TGACT	sugar; SURE; patatin; WRKY; isoamylase; SUSIBA2;
WBOXHVIS01	551	(-)	TGACT	sugar; SURE; patatin; WRKY; isoamylase; SUSIBA2;
WBOXHVIS01	1875	(-)	TGACT	sugar; SURE; patatin; WRKY; isoamylase; SUSIBA2;
WBOXHVIS01	1924	(-)	TGACT	sugar; SURE; patatin; WRKY; isoamylase; SUSIBA2;
WBOXNTCHN4 8	669	(+)	CTGACY	W-box; W box; WRKY; elicitor;
WBOXNTCHN4 8	218	(-)	CTGACY	W-box; W box; WRKY; elicitor;
WBOXNTCHN4 8	551	(-)	CTGACY	W-box; W box; WRKY; elicitor;
WBOXNTERF3	260	(+)	TGACY	W box; ERF3; wounding
WBOXNTERF3	670	(+)	TGACY	W box; ERF3; wounding
WBOXNTERF3	814	(+)	TGACY	W box; ERF3; wounding
WBOXNTERF3	218	(-)	TGACY	W box; ERF3; wounding
WBOXNTERF3	551	(-)	TGACY	W box; ERF3; wounding
WBOXNTERF3	1875	(-)	TGACY	W box; ERF3; wounding
WBOXNTERF3	1924	(-)	TGACY	W box; ERF3; wounding
WBOXNTERF3	1989	(-)	TGACY	W box; ERF3; wounding
WRKY71OS	260	(+)	TGAC	WRKY; GA; MYB; W box; TGAC; PR proteins;
WRKY71OS	670	(+)	TGAC	WRKY; GA; MYB; W box; TGAC; PR proteins;
WRKY71OS	680	(+)	TGAC	WRKY; GA; MYB; W box; TGAC; PR proteins;
WRKY71OS	689	(+)	TGAC	WRKY; GA; MYB; W box; TGAC; PR proteins;
WRKY71OS	814	(+)	TGAC	WRKY; GA; MYB; W box; TGAC; PR proteins;
WRKY71OS	836	(+)	TGAC	WRKY; GA; MYB; W box; TGAC; PR proteins;
WRKY71OS	1452	(+)	TGAC	WRKY; GA; MYB; W box; TGAC; PR proteins;
WRKY71OS	219	(-)	TGAC	WRKY; GA; MYB; W box; TGAC; PR proteins;
WRKY71OS	271	(-)	TGAC	WRKY; GA; MYB; W box; TGAC; PR proteins;
WRKY71OS	481	(-)	TGAC	WRKY; GA; MYB; W box; TGAC; PR proteins;
WRKY71OS	552	(-)	TGAC	WRKY; GA; MYB; W box; TGAC; PR proteins;
WRKY71OS	761	(-)	TGAC	WRKY; GA; MYB; W box; TGAC; PR proteins;
WRKY71OS	1005	(-)	TGAC	WRKY; GA; MYB; W box; TGAC; PR proteins;
WRKY71OS	1716	(-)	TGAC	WRKY; GA; MYB; W box; TGAC; PR proteins;

Anhang

WRKY71OS	1766	(-)	TGAC	WRKY; GA; MYB; W box; TGAC; PR proteins;
WRKY71OS	1876	(-)	TGAC	WRKY; GA; MYB; W box; TGAC; PR proteins;
WRKY71OS	1925	(-)	TGAC	WRKY; GA; MYB; W box; TGAC; PR proteins;
WRKY71OS	1990	(-)	TGAC	WRKY; GA; MYB; W box; TGAC; PR proteins;

Optimierung der ZmPrx_{rec} Produktion: Erreichte Zelldichte während der Fermentation

Zur genaueren Charakterisierung der optimalen Induktionsbedingungen wurde in weiteren Experimenten zusätzlich die erreichte Zelldichte aufgezeichnet, um das Wachstum der Kulturen bis und nach der Induktion zu verfolgen. Die optische Dichte stieg nach einer lag-Phase bis 12 h nach Induktion über den Beobachtungszeitraum gleichmäßig an und erreichte im Durchschnitt nach 144 h einen Wert 47,90 (n= 32) in den Klonen mit Peroxidaseinsert und 51,80 (n= 3) im Kontrollklon mit Leervektor. Das Nassgewicht erreichte bei Peroxidase sekretierenden Klonen durchschnittlich 49,88 g/l und bei der Kontrolle mit Leervektor 53,61 g/l. Die Unterschiede untereinander und im Vergleich zur Hintergrundkontrolle waren nicht signifikant. Die Sekretion der rekombinanten ZmPrx zeigte keinen signifikanten Einfluss auf das Wachstum der Zellen während der Induktion. Unter diesen Induktions- und Kulturbedingungen konnte keine Peroxidaseaktivität im Kulturüberstand detektiert werden.

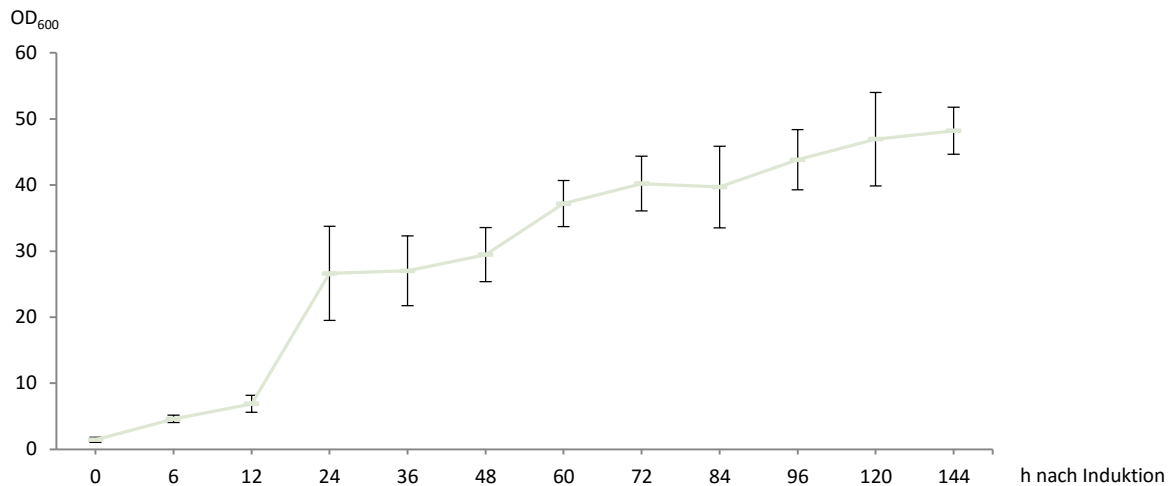


Abb. 103: Auftragung der Kulturdichte (optische Dichte bei 600 nm) gegen die Induktionsdauer. Diese Grafik zeigt den Mittelwert aus 33 Kulturen, die über einen Zeitraum von 144 h mit einer Methanolkonzentration von 1 % (v/v) induziert wurden. Die Start OD₆₀₀ betrug 1,5 ($\pm 0,39$) und erreichte gegen Ende des Versuches einen Wert von 47,9 ($\pm 0,50$). Dargestellt ist das arithmetische Mittel aus n= 3 unabhängigen Versuchen mit entsprechender Standardabweichung.

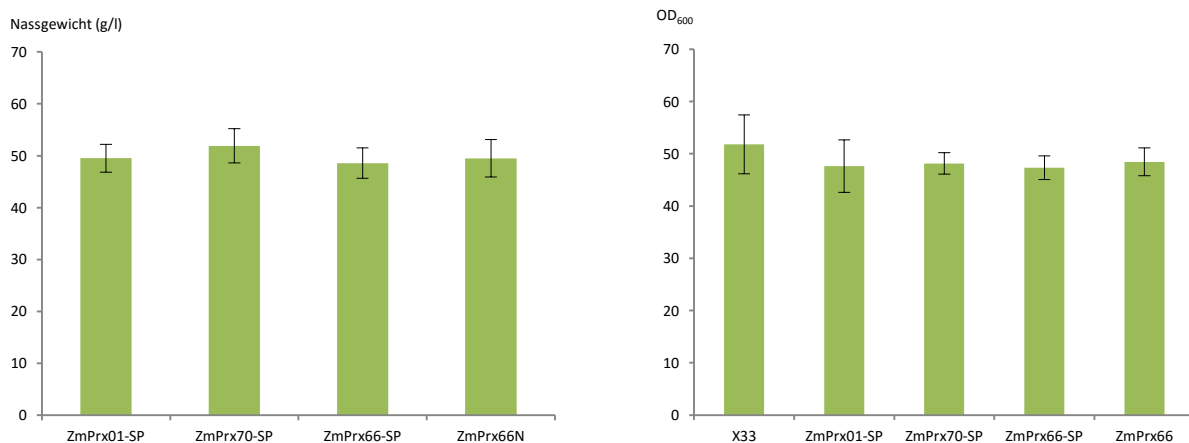


Abb. 104: Übersicht über das erreichte Nassgewicht/optische Dichte nach der Fermentation über 144 h. Dieses Experiment wurde zur Abschätzung des Effektes der Peroxidaseexpression und -sekretion auf die Biomasse der Hefezellen durchgeführt. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen *zmprx* exprimierenden Klonen und den entsprechenden Kontrollen mit Leervektor (X33 transformiert mit pPICZ α A). Dargestellt ist das arithmetische Mittel aus n= 3 unabhängigen Versuchen mit entsprechender Standardabweichung.

Optimierung der *zmprx*-Expression: Minimal- und Komplexmedien

Das Standardmedium für die Expression ist gepuffertes Komplex-Glycerol oder –Methanol-Medium (BMGY oder BMMY). Dieses enthält Hefeextrakt und Pepton, sowie Phosphatpuffer zur Pufferung des Mediums auf einen gewünschten Wert. Diese Eigenschaften führen zu einer Stabilisierung des sekretierten rekombinanten Proteins durch eine Hemmung von extrazellulären Proteasen. Da im Kulturmedium verschiedene Proteasen vorkommen und

andere durch einen niedrigen pH-Wert gehemmt werden, besteht die Möglichkeit der Expression in ungepufferten Komplexmedium (BMG oder BMM). Dabei sinkt während der Induktionsphase der pH-Wert des Mediums unter einen Wert von pH 3. Minimalmedien enthalten kein Hefeextrakt und Pepton, was die spätere Aufreinigung erleichtern kann. Begonnen wurden die Experimente mit dem Standardmedien BMGY und BMMY. Die Methanolkonzentration betrug in dieser Optimierungsphase 0,5 % (v/v). In dieser Medienkomposition konnte mittels Mikroassay keine Peroxidaseaktivität im Überstand detektiert werden. Die Versuche mit BMG- und BMM-Medium ergaben eine geringere Zelldichte am Ende des Versuches und ebenfalls keine detektierbare Peroxidaseaktivität im Überstand.



Abb. 105: Entwicklung der optischen Dichte zweier Kulturen in gepufferten Minimalmedium. Es zeigten sich minimal geringere Kulturdichten am Ende der Fermentation verglichen mit Kulturen in Komplexmedium. Die Signifikanz dieser Abweichungen wurde nicht genauer untersucht, da auch in diesen Experimenten keine Peroxidaseaktivitäten in den Zellüberständen nachweisen ließen. Gezeigt sind die Verläufe zweier angezogener Kulturen. Das Wachstum der Kulturen. Dargestellt ist das arithmetische Mittel aus n= 3 unabhängigen Versuchen mit entsprechender Standardabweichung.

Optimierung der *zmp_{rx}*-Expression: Induktionstemperatur

Die Vorversuche ergaben keine messbare Peroxidaseaktivität im Kulturmedium. Da die Versuche des Kolonie-Blots und Plattenassays eine deutlich zu erkennende Aktivität rund um den selektierten Klon ergaben, schien eine funktionierende Sekretion ins Medium zu

erfolgen. Die ersten Ergebnisse in Flüssigkulturen ließen eine Anfälligkeit der sekretierten Peroxidasen für einen proteolytischen Abbau vermuten. Daher wurden ergänzend Versuche mit Variation der Temperatur und des pH-Wertes des Mediums durchgeführt. Verwendet wurde gepuffertes und ungepuffertes Komplex- und Minimalmedium (BMGY/BMMY, BMG/BMM, MG/MM). Auch in diesen Versuchen konnte keine Aktivität im Überstand gemessen werden. Die Zellen zeigten in Komplexmedium einen Anstieg der optischen Dichte bis auf einen Wert von 40,5 nach 144 h. Dieser Wert lag damit leicht unter dem unter normalen Kulturbedingungen bei 28°C erreichtem Wert. Es wurde ein Parallelversuch mit einer hohen optischen Dichte von 64,6 zu Induktionsbeginn begonnen, um eine hohe Zellzahl unter niedrigen Temperaturen zu induzieren. Diese Kulturen hielten die optische Dichte über den Versuchszeitraum bis 144 h nach Induktion recht konstant und mit geringen Schwankungen. Die Versuche mit gepufferten und ungepufferten Medium ergaben geringe Wachstumsraten und geringe optische Dichten am Versuchsende. In keinem dieser Versuche konnte eine Peroxidaseaktivität im Kulturüberstand beobachtet werden.

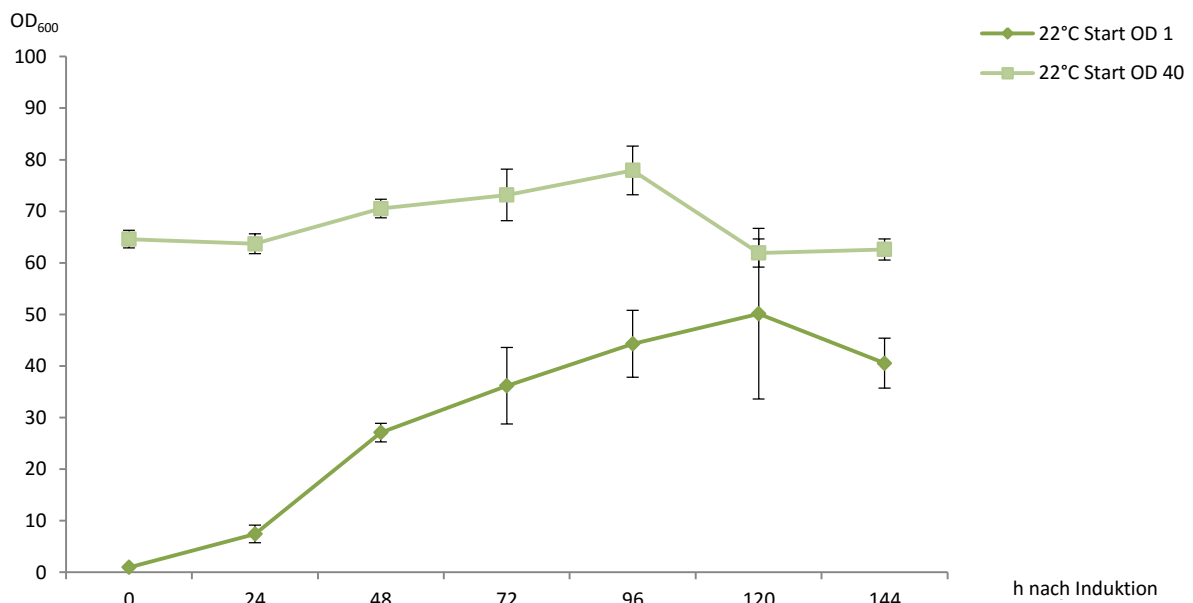


Abb. 106: Entwicklung der optischen Dichte bei Durchführung der Fermentation bei 22°C und 0,5 % Methanolkonzentration in BMMY-Medium. Die Entwicklung der Zelldichten verläuft deutlich langsamer, die erreichten Maximalwerte sind etwas geringer als in Vergleichskulturen bei höheren Temperaturen. Die zweite Kurve zeigt den Verlauf der Fermentation von Zellen mit einer Startdichte von 64,6. Diese blieb über den beobachteten Zeitraum relativ konstant. Dargestellt ist das arithmetische Mittel aus n= 3 unabhängigen Versuchen mit entsprechender Standardabweichung.

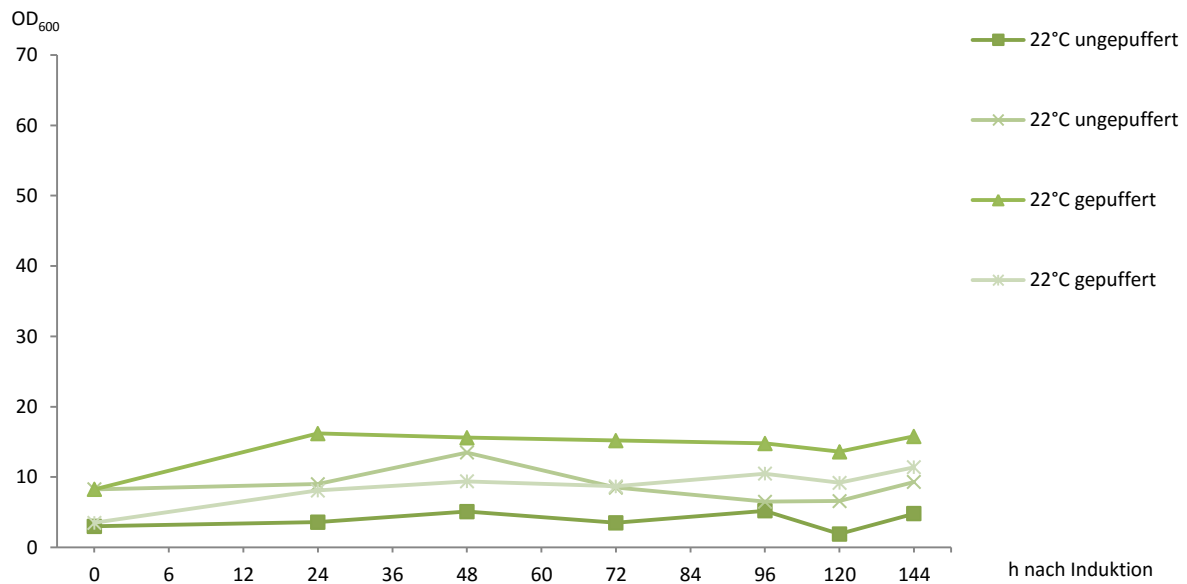


Abb. 107: Fermentation von Klonen in gepufferten und ungepufferten Minimalmedium bei einer Induktionstemperatur von 22°C. Gezeigt sind Einzelkulturen mit Startdichten von etwa 3,5 und etwa 8. Deutlich erkennbar ist eine kaum ansteigende optische Dichte über den Zeitraum der Fermentation und geringe erhaltene Optische Dichten. Aufgrund der geringen Dichten wurde auf eine Wiederholung der Versuche verzichtet. Dargestellt ist das arithmetische Mittel aus $n=3$ unabhängigen Versuchen mit entsprechender Standardabweichung.

Optimierung der *zmprx*-Expression: Dichte bei Induktion

Unter den getesteten Bedingungen konnten befriedigende Aktivitäten für $ZmPrx_{rec}$ erzeugt werden. Diese stieg über den Beobachtungszeitraum stetig bis zum Maximalwert an. Teilweise waren Effekte sichtbar, die möglicherweise auf die Kultur in Kolben zurückzuführen waren.

Die Expression von *zmprx01* und *zmprx66* erreichte gegenüber *zmprx70* keine zufriedenstellende Produktivität. Sie erreichten um den Faktor 170-fach ($ZmPrx01$) bzw. 382-fach ($ZmPrx66$) geringere Aktivitäten im Überstand. Da mögliche Ursachen sowohl in einer geringen Produktivität als auch in einer hohen Empfindlichkeit der sekretierten Proteine für Proteasen zu suchen sind, wurden weiterführende Experimente mit der Induktion von Kulturen bei hohen optischen Dichten durchgeführt.

Die Induktion erfolgte bei einer optischen Dichte von 36,3 bei $ZmPrx01_{rec}$ -Produktion und 46,9 bei $ZmPrx66_{rec}$ -Produktion. Nach 48 h erreichten die Kulturen optische Dichten von 65,6 und 62,4. Trotz der hohen erreichten Zelldichten konnte keine Aktivität im Überstand von *zmprx01* exprimierenden Zellen detektiert werden. Die im Mikroassay erreichten Aktivitäten für $ZmPrx66_{rec}$ bewegten sich auf niedrigem Niveau. Diese war nach einer

Ammoniumsulfatfällung nicht mehr zu detektieren. Weitere Experimente zur Aufreinigung von ZmPrx aus Kulturmedium erfolgten daher mit ZmPrx70_{rec}.

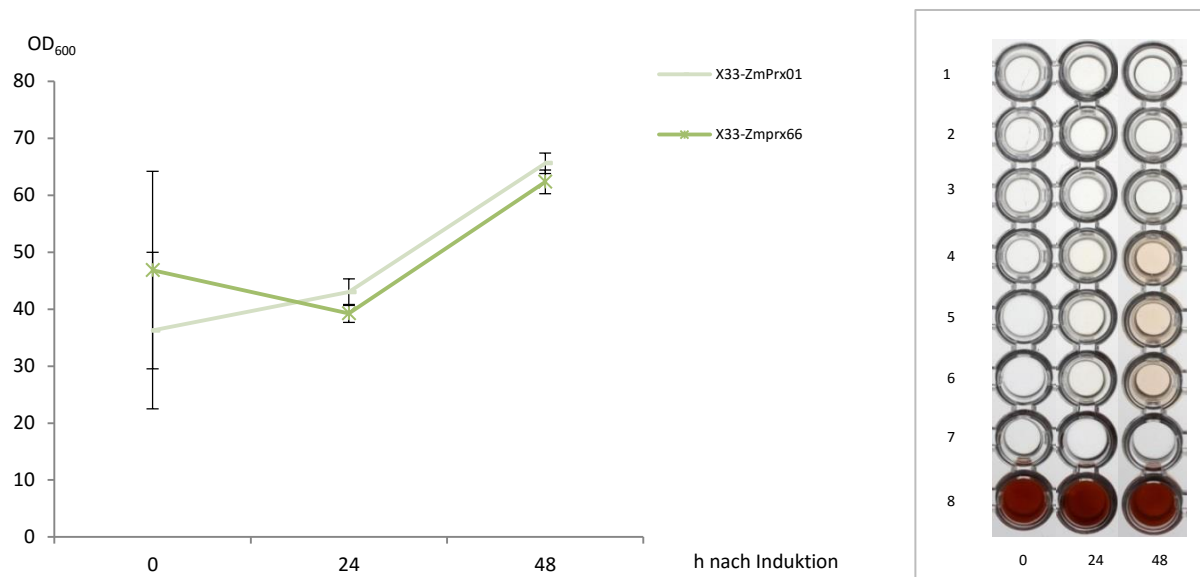
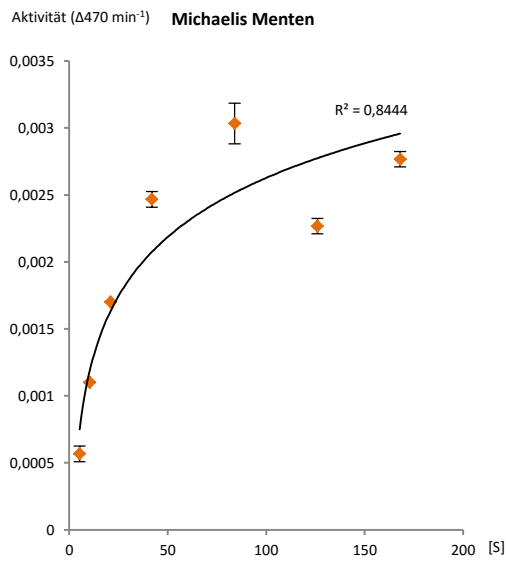
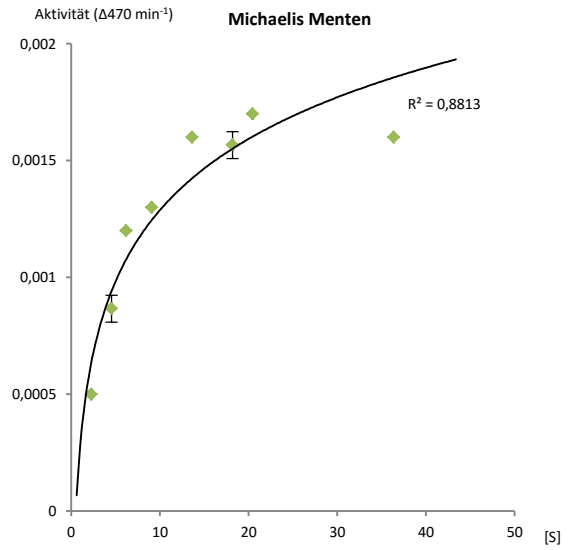


Abb. 108: Induktion der Expression von *zmp_{rx}01* und *zmp_{rx}66* bei hohen Kulturdichten. ZmPrx01_{rec} sekretierende Klone wurden bei einer Kulturdichte von durchschnittlich 36,27 induziert, ZmPrx66_{rec} sekretierende Klone bei durchschnittlich 46,87. Auch in diesen Versuch war keine ZmPrx01_{rec}-Aktivität im Überstand zu beobachten. Die Überstände der *zmp_{rx}66* exprimierenden Kulturen wiesen im Mikroassay gut detektierbare Aktivitäten auf, erreichten aber nicht die Aktivitäten von ZmPrx70_{rec} im Überstand. Dargestellt ist das arithmetische Mittel aus n= 3 unabhängigen Versuchen mit entsprechender Standardabweichung.

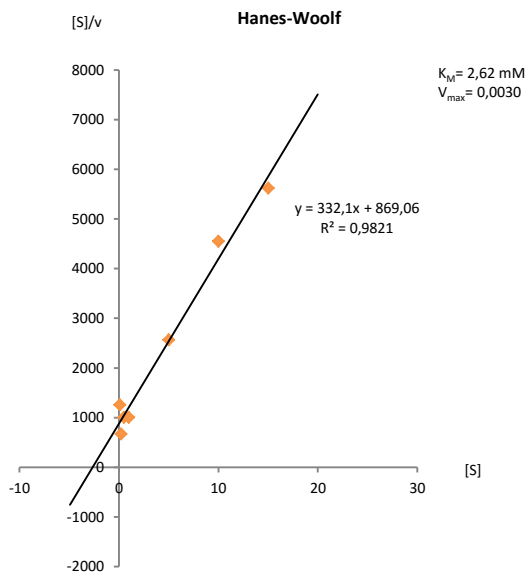
a



b



c



d

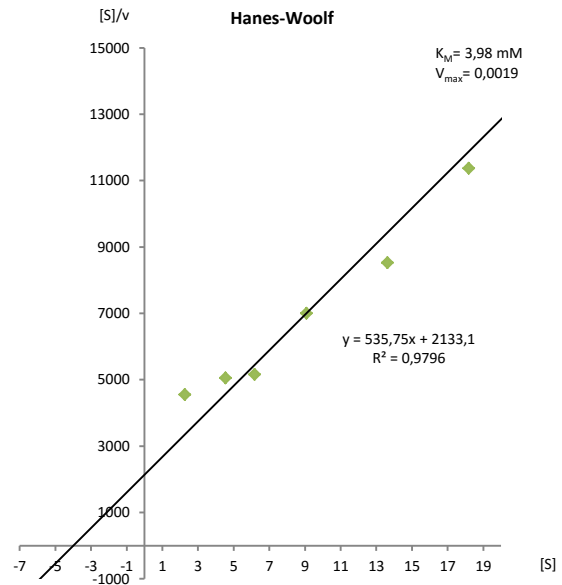
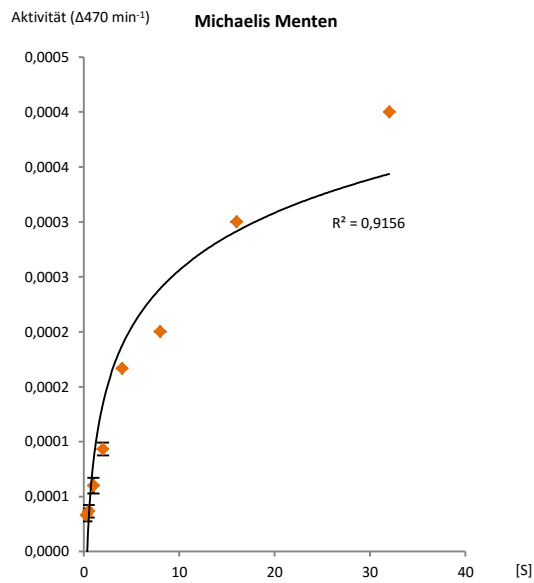
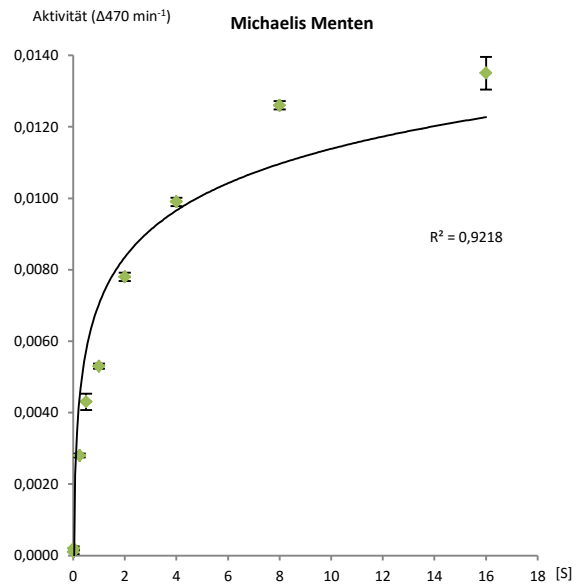


Abb. 109: Darstellung der Michaelis-Menten-Kinetik und entsprechende halbziproke Auftragung vom Umsatz von Guajacol. Erhaltene Werte kinetischer Konstanten und Korrelationskoeffizient sind in der Grafik angegeben. Angabe der Substratkonzentration in Millimolar (mM). a, c: ZmPrx70_{reo}, b, d: HRP. Dargestellt ist das arithmetische Mittel aus n= 3 unabhängigen Versuchen mit entsprechender Standardabweichung.

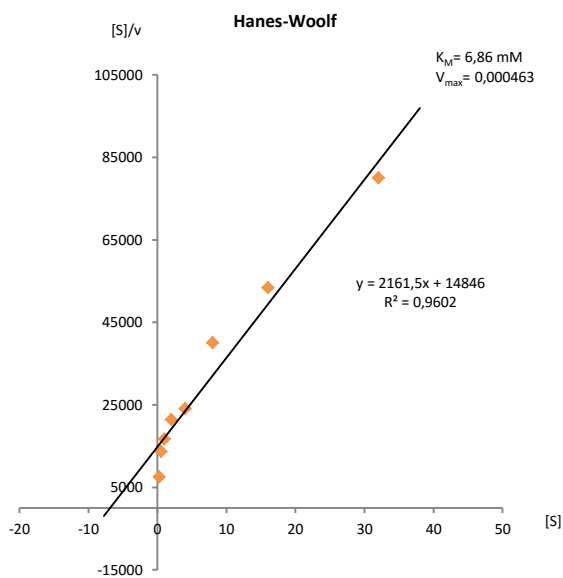
a



b



c



d

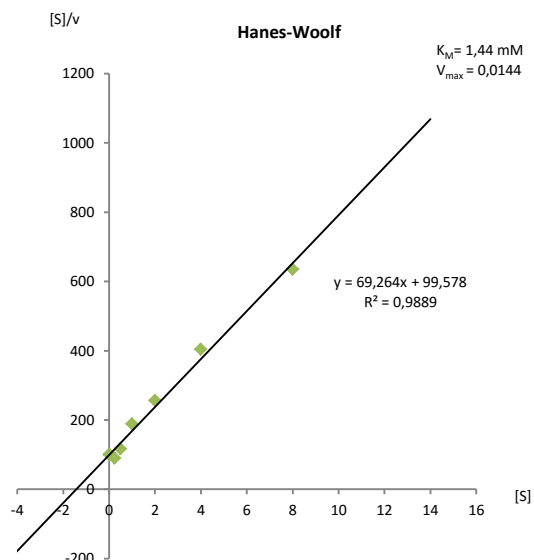


Abb. 110: Darstellung der Michaelis-Menten-Kinetik und entsprechende halbziproke Auftragung vom Umsatz von ABTS. Erhaltene Werte kinetischer Konstanten und Korrelationskoeffizient sind in der Grafik angegeben. Angabe der Substratkonzentration in Millimolar (mM). a, c: ZmPrx70_{rec} b, d: HRP. Dargestellt ist das arithmetische Mittel aus n= 3 unabhängigen Versuchen mit entsprechender Standardabweichung.

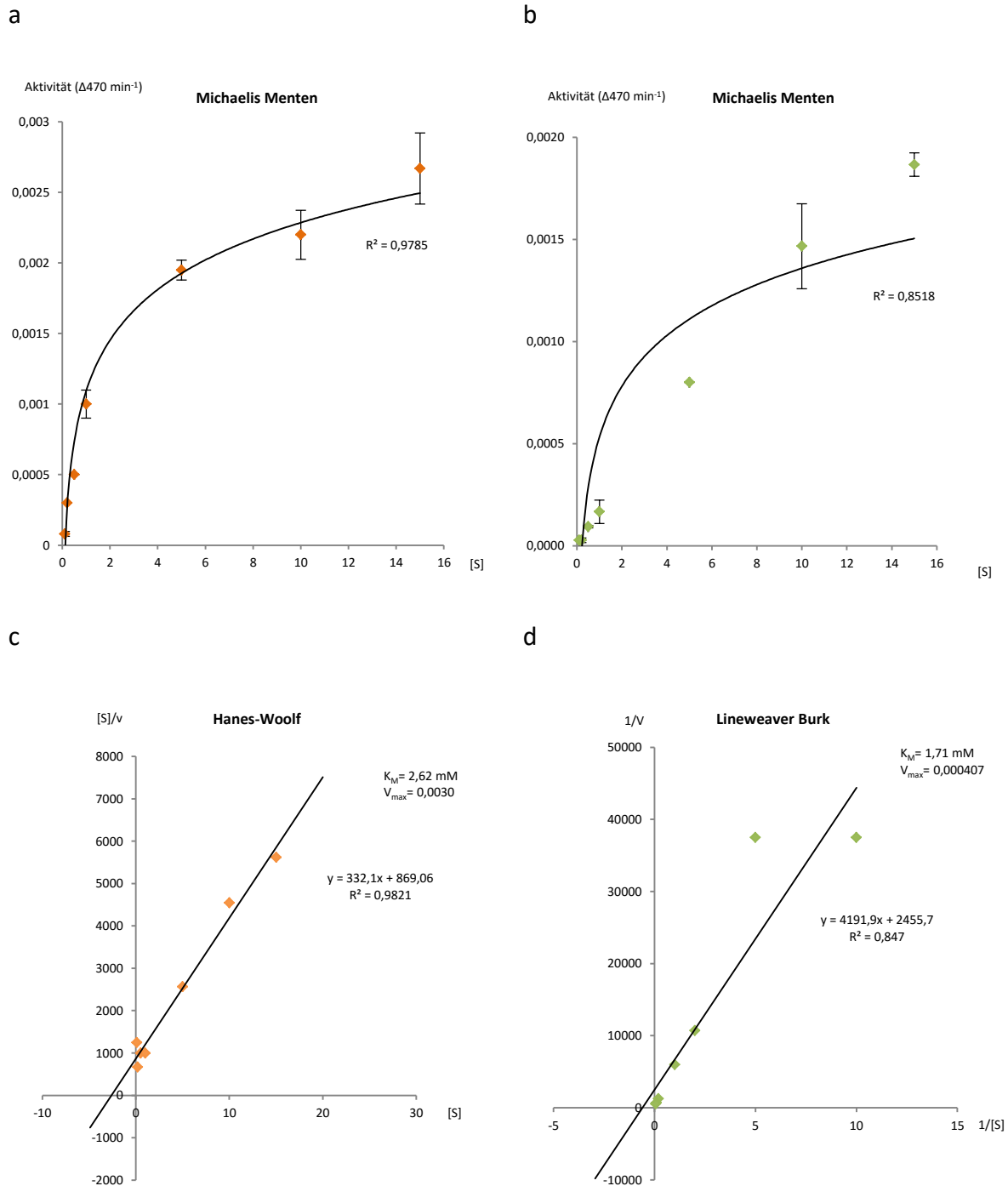


Abb. 111: Darstellung der Michaelis-Menten-Kinetik und entsprechende halbzeiproke Auftragung vom Umsatz von Wasserstoffperoxid. Erhaltene Werte kinetischer Konstanten und Korrelationskoeffizient sind in der Grafik angegeben. Angabe der Substratkonzentration in Millimolar (mM). a, c: ZmPrx70_{recr}, b, d: HRP. Dargestellt ist das arithmetische Mittel aus n = 3 unabhängigen Versuchen mit entsprechender Standardabweichung.

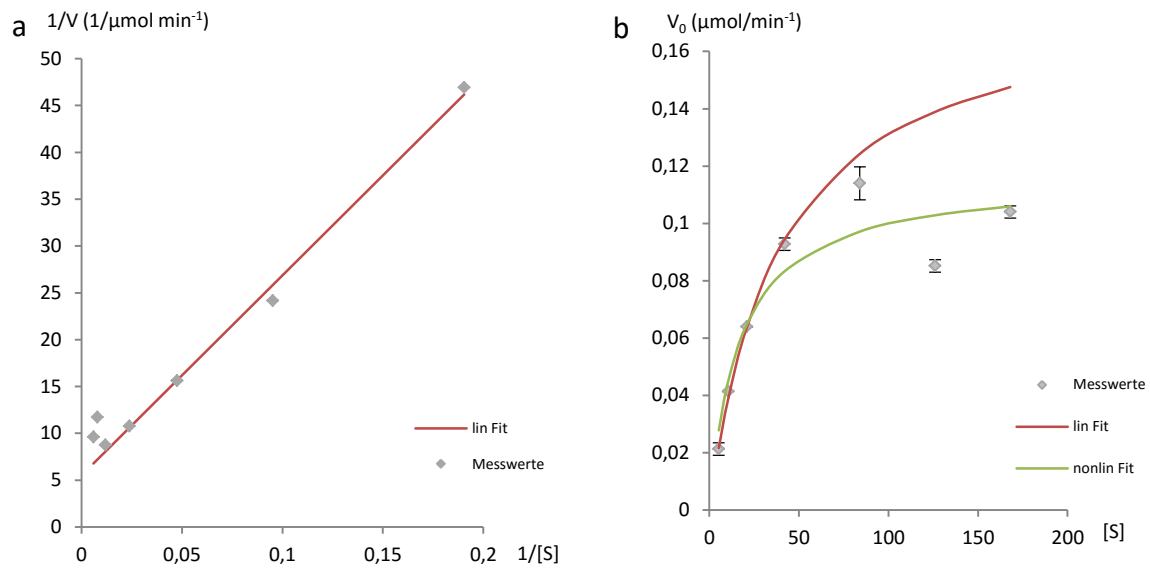


Abb. 112: Darstellung der Michaelis-Menten-Kinetik als Vergleich einer linearen Anpassung (a) und einer nichtlinearen Anpassung nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate (b) beim Umsatz von Guajacol durch $\text{ZmPrx70}_{\text{rec}}$. Angabe der Substratkonzentration in Millimolar (mM). Dargestellt ist das arithmetische Mittel aus $n=3$ unabhängigen Versuchen mit entsprechender Standardabweichung.

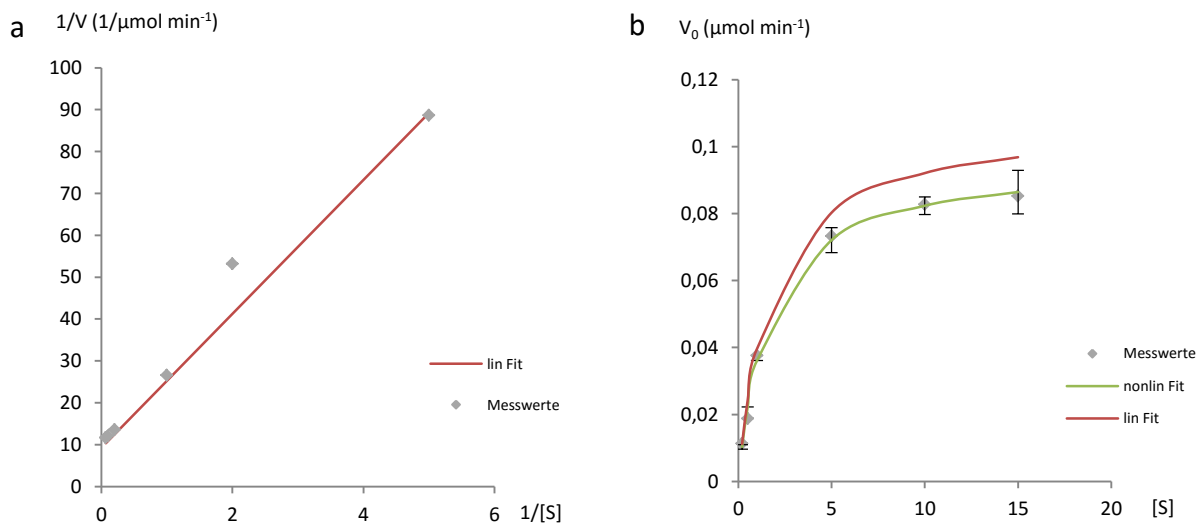


Abb. 113: Darstellung der Michaelis-Menten-Kinetik als Vergleich einer linearen Anpassung (a) und einer nichtlinearen Anpassung nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate (b) beim Umsatz von Wasserstoffperoxid durch $\text{ZmPrx70}_{\text{rec}}$. Angabe der Substratkonzentration in Millimolar (mM). Dargestellt ist das arithmetische Mittel aus $n=3$ unabhängigen Versuchen mit entsprechender Standardabweichung.

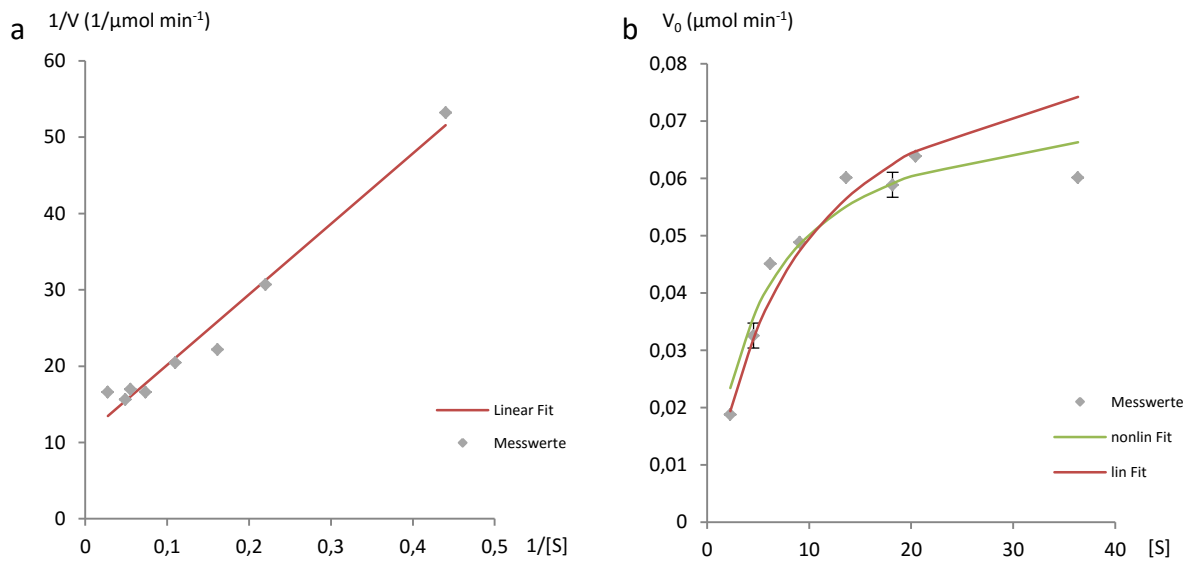


Abb. 114: Darstellung der Michaelis-Menten-Kinetik als Vergleich einer linearen Anpassung (a) und einer nichtlinearen Anpassung (b) nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate beim Umsatz von Guajacol durch HRP. Angabe der Substratkonzentration in Millimolar (mM). Dargestellt ist das arithmetische Mittel aus $n=3$ unabhängigen Versuchen mit entsprechender Standardabweichung.

Danksagung

Ich möchte allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Besonders danken möchte ich Dr. Sabine Lüthje für das Bereitstellen des interessanten Themas sowie der Möglichkeit der Anfertigung dieser Arbeit in ihrem Arbeitskreis. Auch Dr. Dirk Becker möchte ich für die Kooperation und die Bereitstellung von Laborplatz und Ressourcen sowie die gute Betreuung während der Labor- und Schreibphase danken. Prof. Dr. Julia Kehr danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Prof. Dr. Stefan Hoth und Prof. Dr. Kai Jensen danke ich für die Unterstützung während und nach der Gewächshauschließung.

Dr. Hermann Schmidt (DNA Cloning Service, Hamburg) danke ich für die Erstellung der Grundvektoren, sowie sein offenes Ohr in Klonierungsfragen. Dr. Friedrich Buck (Institut für Zellbiochemie und Klinische Neurobiologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Hamburg) danke ich für die schnelle Durchführung der MALDI-TOF-Analysen.

Aus der Abteilung von Dr. Dirk Becker möchte ich allen Mitgliedern für die nette Zusammenarbeit danken. Hervorheben möchte ich dabei Nadja Schmidt für die Unterstützung in Labor- und Sportfragen, Julia Sandberg-Meinhardt und Simone Amati für die Betreuung und das kritische „Auf-die-Hände-Gucken“ während der Maistransformation sowie Dr. Axel Hinze für die Unterstützung in allen denkbaren Fragen und das geduldige Hinführen zum Ziel den „Jedi-Doktoranden“ Status zu erreichen. Die gemeinsame Zeit im „Herrenlabor“ wird mir stets in Erinnerung bleiben.

Aus der Abteilung von Prof. Dr. Stefan Hoth danke ich allen Mitarbeitern für die nette Arbeitsatmosphäre und die hilfreichen Diskussionen während und über die Arbeit. Besonders hervorheben möchte ich hier Tanja Kotur für die regelmäßige Motivation zum sportlichen Ausgleich, Eva-Maria Disch für das gemeinsame Durchleben zahlreicher Bürosituationen und Kerstin Wöltje für die Langzeitbetreuung, auch zu „Randzeiten“.

Besonderer Dank gilt außerdem meinem Projektpartner François Clement Perrineau. In vielen Situationen war es hilfreich sich mit jemandem beraten zu können, der in derselben Lage steckt. Danke Frosti!

Danksagung

Meiner früheren WG, Jan Claussen, Alexandra Schwekendiek und Hinnerk Bartholl möchte ich für die Begleitung auf dem Weg zu dieser Arbeit danken. Durch eure Freundschaft habt ihr zum Gelingen der Arbeit beigetragen. Einen besonderen Dank noch an Alex für das aufmerksame Korrekturlesen.

Auch „meinen“ Biologen Stephanie Vogel, Manija Ghulam, Inga Ludenberg und Marco Schneuer möchte ich für die jahrelange Betreuung danken. Insbesondere Inga für die stetige Ferndiagnose und Unterstützung in allen Lebensfragen.

Meinen Eltern und insbesondere meinem Vater danke ich für die Unterstützung in den verschiedenen Phasen des Studiums und der Dissertation, das sorgte für ein hohes Maß an Sicherheit und trug zum Erfolg des ganzen Unternehmens bei! Auch in schwierigen Zeiten konnten wir stets aufeinander zählen.

Als letztes möchte ich einer mir sehr wichtigen Person danken. Cathi, Du hast mich in den vergangenen Jahren immer begleitet und mich in entscheidenden Situationen unterstützt. Ich konnte mich immer auf dich verlassen, Du hast immer an mich geglaubt und vor allem gibt mir unser gemeinsames Zuhause den nötigen Rückhalt und Möglichkeit mich wieder zu regenerieren.

Lebenslauf

Name	Möller
Vorname	Benjamin
Geburtsdatum	21.11.1981 in Bad Oldesloe
Wissenschaftlicher Werdegang	
Seit Oktober 2010	Promotion am Biozentrum Klein Flottbek, Universität Hamburg, in der Abteilung Molekulare Pflanzenphysiologie, zum Thema „Funktionale Analyse von membrangebundenen Klasse III Peroxidasen aus Mais (<i>Zea mays</i> L.)“
März 2009 - Dezember 2009	Diplomarbeit am Biozentrum Klein Flottbek, Universität Hamburg, in der Abteilung Pflanzenphysiologie, zum Thema „Zur Funktion von Auxinrezeptoren bei der Kontrolle von Gravitropismus, Wachstum und Genexpression“
Oktober 2002 – Dezember 2009	Studium der Biologie an der Universität Hamburg
Schulischer Bildungsweg	
1998 - 2001	Abitur an der Beruflichen Schule Bad Segeberg
1992 - 1998	Realschule am Seminarweg, Bad Segeberg
1988 - 1992	Theodor-Storm-Grundschule, Bad Segeberg

Poster:

10th International Conference on Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Plants, Budapest, Hungary, 2011:

Benjamin Möller und Sabine Lüthje: „*Membrane-bound Class III peroxidases of maize: Phylogenetic relations, Regulation and In silico analysis*“

The 16th biennial meeting for the Society for Free Radical Research International (SFRRRI), London, UK, 2012:

Benjamin Möller, François Clement Perrineau, Dirk Becker, Angela Mika, Sabine Lüthje: „*Regulation and subcellular localization of membrane bound class III peroxidases*“

11th International POG Conference „Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Plants“, Warsaw, Poland, 2013:

Benjamin Möller, Sabine Lüthje: „*Class III peroxidases in maize plasma membranes*“

Vorträge:

OxiZymes and 9th International Symposium on Peroxidases in Marseille, France, 2012:

„*Regulation and subcellular localization of membrane bound class III peroxidases*“

Weitere Konferenzen:

1st INPPO World Congress on Plant Proteomics: Methodology to Biology, 2014

Teilnahme sowie Durchführung und Organisation

Veröffentlichungen:

Lüthje S, Meisrimler CN, Hopff D, Möller B (2011) Phylogeny, topology, structure and functions of membrane-bound class III peroxidases in vascular plants. *Phytochemistry* 72: 1124–1135

Lüthje S, Möller B, Perrineau FC, Wöltje K (2013) Plasma membrane electron pathways and oxidative stress. *Antioxidants & Redox Signaling* 18: 2163–83