

**Biosynthese der Luteolin-Glucuronide
im Roggenprimärblatt-Mesophyll:
Charakterisierung der Glucuronosyltransferasen**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Konstanze Freiesleben

aus Köln

2004

Berichterstatter: Prof. Dr. G. Weissenböck
Prof. Dr. B. Weisshaar

Prüfungsvorsitzender: Prof. Dr. W. Werr

Tag der mündlichen Prüfung: 06.02.04

Herrn Prof. Dr. F. Salamini danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes in seiner Abteilung.

Prof. G. Weissenböck danke ich für die Themenstellung und sehr gute Betreuung während der Arbeit. Sein reges Interesse, die ständige Ansprechbarkeit und seine Diskussionsbereitschaft haben mich stets ermutigt und voran gebracht.

Herrn Prof. Dr. W. Rohde danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, für die fantastischen Arbeitsbedingungen und seine engagierte Betreuung.

Prof. Dr. B. Weisshaar danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferats und Prof. Dr. W. Werr für die Übernahme des Prüfungsvorsitz.

Desweiteren möchte ich mich bei Dr. M. Schulz (Institut für Landwirtschaftliche Botanik der Universität Bonn) die mir eine große Hilfe bei der 2D-Gelelektrophorese war, bei Dr. P. Bednarek (MPIZ-Köln) der immer seine Zeit für meine HPLC-Fragen geopfert hat, bei Dr. N. von Neuhoff (Institut für Zell- und Molekularpathologie der Medizinischen Hochschule Hannover) ohne dessen große Hilfe die SELDI-Analysen nicht realisierbar gewesen wären, bei R. Bhat (MPIZ-Köln) für die Hilfe bei der Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen, bei R. Stracke und M. Jackoby (MPIZ-Köln) die mir bei der Erstellung transgener Pflanzen zur Seite standen und bei Dr. T. Vogt (Leibnitz-Institut für Pflanzenbiochemie, Halle (Saale)), Dr. C. Ford (*Department of Horticulture, Viticulture and Oenology, University of Adelaide, Australien*), Dr. A. Bélanger (*Medical Research Council Group in Molecular Endocrinology, Laval University, Quebec, Canada*), Dr. S. Waffenschmidt (Institut für Biochemie der Universität zu Köln), Dr. C. Strassburg (Zentrum Innere Medizin, Abteilung Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie der Medizinischen Hochschule Hannover) und Dr. S. Nagashima (*School of Pharmaceutical Sciences, Kitasato University, Tokyo, Japan*) für die Bereitstellung von DNA- und / oder Protein-Proben bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen lieben Laborkollegen Katja Kleinschmidt, Dieter Becker, Birgitta Barion und Volker Sniady ohne deren Unterstützung meine Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Hierbei möchte ich Katja für ihre hervorragende technische Hilfe ganz besonders hervorheben.

Danken möchte ich der Deutsche Forschungsgemeinschaft (Az. We 360 / 13-1 / 13-2) ohne deren finanzielle Unterstützung (Sach- und Personalmittel) die Durchführung vorliegender Arbeit unmöglich gewesen wäre.

<u>I. EINLEITUNG</u>	1
<u>1. Flavonoide</u>	1
1.1. Biosynthese	1
1.1.1. Die Regulation der Flavonoidbiosynthese	
1.2. Funktion der Flavonoide	3
1.2.1. Abwehr gegen Fraßfeinde und Pathogene	
1.2.2. UV-Schutzfunktion	
1.2.3. Anlockung durch Anthocyane in Blüten	
1.2.4. Signale zwischen Leguminosenwurzeln und den Stickstoff-fixierenden Bakterien	
1.2.5. Fortpflanzung	
1.3. Wirkung der Flavonoide auf den Menschen	5
1.3.1. Antimikrobielle Wirkung	
1.3.2. Antivirale Wirkung	
1.3.3. Antioxidantien	
1.3.4. Koronare Herzerkrankungen	
1.3.5. Antiinflammatorische Wirkung der Flavonoide	
1.3.6. Vaskuläre und hämatologische Effekte	
1.3.7. Flavonoide mit Östrogenwirkung	
1.3.8. Cytotoxische Antitumoraktivität	
1.4. Flavonoide im Roggen	8
<u>2. Detoxifikation endogener und exogener Substanzen</u>	9
2.1. Phase I: Aktivierung durch Hydroxylierung	10
2.2. Phase II: Modifikation	11
2.2.1. Konjugation mit Glutathion	
2.2.2. Konjugation mit aktivierten Zuckern durch Glycosyltransferasen	
2.3. Phase III: Kompartimentierung	13
<u>3. Glycosyltransferase-Multigenfamilie</u>	13
3.1. Reaktionsmechanismus	13
3.2. Tertiärstrukturen von Glycosyltransferasen	14

<u>4. UDP-Glycosyltransferasen (GT-1)</u>	15
4.1. UGTs bei Pflanzen	16
4.1.1. Funktion der UGT bei Pflanzen	
Anthocyanoglycoside	
Glucosinolate und cyanogene Glucoside	
UGTs induziert durch Pathogene / Herbivoren	
Pflanzenhormone	
Glycosylierung von Phenylpropanoiden	
Beispiele für Xenobiotika-Detoxifikation, katalysiert durch UGTs	
4.1.2. Bereits charakterisierte pflanzliche UGTs	
4.1.3. UGTs bei <i>Arabidopsis thaliana</i>	
4.2. UGT bei Tieren	22
<u>5. Glucuronosyltransferasen beim Menschen</u>	22
5.1. Lokalisation und Struktur der hUGTs	23
5.2. UGT1 und UGT2	24
5.3. Defekte in der UGT-Expression	25
5.3.1. Crigler-Najar-Syndrom (CNS)	
5.3.2. Gilbert-Syndrom	
<u>6. Glucuronosyltransferasen bei Pflanzen</u>	26
6.1. Sekundärstoffwechsel-Glucuronosyltransferasen	26
6.2. Andere Glucuronosyltransferasen (GT-47)	28
<u>II. ZIELSETZUNG</u>	29
<u>III. MATERIAL & METHODEN</u>	32
<u>1. Molekularbiologische Methoden</u>	32
1.1. Genomische- / Phagen- und Plasmid-DNA	32
1.1.1. Allgemeine Methoden	
SOUTHERN- <i>blot</i> -Hybridisierungsanalyse	
Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten / Oligonukleotiden	
DNA-Extraktion aus Agarosegelen	
Polymerasekettenreaktion (PCR)	

1.1.2. Genomische DNA

Extraktion genomischer DNA zur Erstellung der Phagenbank

Schnellpräparation genomischer DNA aus Pflanzengewebe

1.1.3. Phagen-DNA

Erstellung einer EMBL3-Phagenbank aus genomischer Roggen-DNA

Durchsuchung (*screening*) einer genomischen Phagen-DNA-Bank

Isolierung von EMBL3- λ -Bakteriophagen-DNA

ZAP-Library (STRATAGENE)

1.1.4. Plasmid-DNA

Isolierung von Plasmid-DNA

Herstellung elektrisch kompetenter DH10B-Zellen

Transformation von elektrokompenten Bakterien

1.1.5. Erstellung der Plasmide zur Proteinexpression

entry-Klone / BP-Reaktion

Destination-Vektoren / LR-Reaktion

1.2. RNA..... 38

1.2.1. Allgemeine Methoden

Gesamt-RNA-Präparationen

NORTHERN-*blot*-Analyse

mRNA-Präparationen

1.2.2. cDNA-Synthese

1.2.3. RT-PCR

1.2.4. 5'- bzw. 3'-RACE

2. Biochemische Methoden..... 39

2.1. Allgemeine biochemische Methoden..... 39

2.1.1. Roggenprimärblattprotein-Präparation

2.1.2. Proteinquantifizierung

2.1.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

2.1.4. WESTERN-*blot*-Analyse

2.2. Proteinexpression rekombinanter scUGT in *E.coli* 40

2.3. Zweidimensionale Gelelektrophorese..... 41

2.2.1. Proteinpräparation

2.2.2. Isoelektrische Fokussierung (IEF)

2.4. Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC: <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)	42
2.4.1. Gradienten	
2.5. UGT-Aktivitätsmessungen / Differenzialzentrifugation	44
2.5.1. Waschversuch	
2.6. Flavonol 3-<i>O</i>-Glucosyltransferase-Aktivitätsmessungen	46
2.7. Inkubationen von Roggenwurzeln mit Luteolin	47
2.7.1. Inkubationsbedingungen	
2.7.2. Analyse der Methanolextrakte	
2.7.3. Analyse der Proteine	
2.8. SELDI-Analysen	48
2.8.1. SAX2- <i>chip</i> / Vergleiche von Wurzel- bzw. Blattproteinen	
2.8.2. <i>Antibody-capture</i>	
NP20- <i>chip</i>	
PG20- <i>chip</i>	
PS20- <i>chip</i>	
2.8.3. Lectinbindungsassay	
<u>3. Pflanzen und Pflanzenanzucht</u>	49
3.1. Kultivierung von Roggen und Gerste	49
3.2. Herstellung und Analyse transgener <i>A.thaliana</i>	50
3.2.1. Transformation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	
3.2.2. Stabile Transformation von <i>A. thaliana</i>	
3.3. Kultivierung von Tabak	51
3.3.1. Transformation von SR1 durch Vakuuminfiltration von Agrobakterien	
3.3.2. Isolierung von Protoplasten aus <i>Nicotiana tabacum</i> L. cv. BY2	
Transfektion von Tabak-Protoplasten für GFP-Fusionen	
3.4. Transiente Transformation von Gersteblättern durch <i>particle bombardment</i>	52
3.4.1. Kultivierung der Gersteprimärblätter	
3.4.2. <i>Particle bombardment</i>	
<u>4. Rechnergestützte Sequenzanalysen</u>	53
4.1. DNA-Sequenzierung und Auswertung	53

<u>5. Mikroskopie</u>	54
<u>6. Puffer</u>	55
<u>IV. ERGEBNISSE</u>	56
<u>1. Screening einer genomischen Roggen-DNA-Bank mit heterologen Sonden</u>	56
1.1. Wahl der heterologen Sonden	56
1.1.1. Aminosäure-Homologie-Untersuchungen	
1.1.2. Stereochemie	
1.2. Wahl der Roggen-DNA-Bank	59
1.3. Erstellung einer EMBL3-Phagenbank aus partiell geschnittener genomischer Roggen-DNA	60
1.4. Screening der λ-EMBL3-Phagenbank mit heterologen Sonden	60
1.5. Analyse der Subklone	62
<u>2. RT-PCR mit Konsensus-Primern</u>	64
2.1. Erstellung der RNA / cDNA	64
2.2. Primerdesign	64
<u>3. Analyse der putativen Zuckertransferasen</u>	65
3.1. phylogenetische Untersuchungen	65
3.1.1. Substratbindung	
3.1.2. Zuckerbindungsbox (PSPG-Box)	
3.1.3. Transmembrandomäne	
3.2. Transkriptionskontrolle	68
3.2.1. 5'-3'RACE	
3.2.2. NORTHERN- <i>blot</i> -Analysen	
3.2.3. Roggen-cDNA-Bank	
3.2.4. <i>Overlap</i> -PCR	
<u>4. Heterologe Expression putativer scUGT</u>	71
4.1. Heterologe Expression rekombinanter scUGT in <i>E.coli</i>	71
4.2. Heterologe Expression rekombinanter scUGT in Eukaryoten	72
4.2.1. Agrobakterien-Vakuuminfiltration von Tabakblättern	

4.2.2. Erstellung transgener *Arabidopsis thaliana*

<u>5. Biochemische Charakterisierung der Roggen- (Flavonoid-) Glycosyltransferasen</u>	75
5.1. Etablierung der Enzymtests	75
5.1.1. UGT-Enzymaktivitätstests mit Roggenprimärblattproteinen	
5.1.2. Aktivitätsmessungen der Flavonol-3- <i>O</i> -Glucosyltransferase	
5.2. Immunblotanalysen mit heterologen 3FGT- und UGT-Antikörpern	80
5.3. SELDI (Surface-Enhanced Laser Desorption / Ionization) -TOF (Time Of Flight) -MS (Massenspektrometer) -Analysen von Roggenproteinen	81
5.3.1. Immunpräzipitation auf dem Proteinchip	
5.3.2. Lectinbindungsassay	
5.4. Induktion der Enzymaktivität durch "Luteolinfütterungen"	85
5.4.1. MeOH-Extrakte	
5.4.2. Analyse der Proteinextrakte "gefütterter" Wurzeln / UGT-assay	
5.4.2. SELDI-Analyse	
<u>6. Subzelluläre Lokalisation</u>	87
6.1. Differenzialzentrifugation	88
6.2. fluoreszierende UGT-Fusionsproteine / Colokalisation	90
6.2.1. Kontrollen / Colokalisation	
6.2.2. verkürzte fluoreszierende UGT-Fusionsproteine	
<u>7. UGT-Komplex</u>	98
7.1. Immunblotanalysen von 2D-Gelen	98
7.2. Homodimerisierung / Heterodimerisierung	99
7.2.1. Homodimerisierung	
7.2.2. Heterodimerisierung	
<u>V. DISKUSSION</u>	104
<u>1. Screening einer genomischen Roggen-DNA-Bank mit heterologen Sonden</u>	104
Vergleichende Analysen der verwendeten Sonden	
<u>2. RT-PCR mit Konsensus-Primern</u>	106

<u>3. Analyse der putativen Zuckertransferasen</u>	107
Phylogenetische Untersuchungen	
Transkriptionskontrolle	
<u>4. Heterologe Expression putativer scUGT</u>	109
Heterologe Expression in <i>E.coli</i> rekombinanter scUGTb	
Heterologe Expression rekombinanter scUGT in Eukaryoten	
<u>5. Biochemische Charakterisierung der Roggen-Zuckertransferasen</u>	112
Etablierung der Enzymtests	
Immunblotanalysen mit heterologen 3FGT- und UGT-Antikörpern	
SELDI-Analysen von Roggenproteinen	
Induktion der Enzymaktivität durch "Luteolinfütterungen"	
<u>6. Subzelluläre Lokalisation</u>	115
<u>7. UGT-Komplex</u>	118
2D-Gelelektrophorese	
Homodimerisierung / Heterodimerisierung	
<u>VI. AUSBLICK</u>	120
<u>VII. ZUSAMMENFASSUNG</u>	122
<u>VIII. ANHANG</u>	124
<u>1. Abkürzungen</u>	124
<u>2. Oligonukleotide</u>	125
2.1. Oligonukleotid-Liste.....	125
2.2. Oligonukleotide der Sequenz scUGTb.....	127
2.2.1. Sequenz	
2.2.2. Schematische Darstellung	

<u>3. Vektoren</u>	128
3.1. Vektoren allgemein	128
3.2. Gateway-Expressionsvektoren (Karten)	129
3.3. hUGT-Vektoren	128
<u>4. Bakterienstämme</u>	130
<u>5. Antikörper</u>	130
<u>6. Alignments</u>	130
6.1. Substratbindung	131
6.2. Zuckerbindungsbox	132
6.3. Transmembrandomäne	132
6.4. scUGTa-c	133
6.5. Tabelle der verwendeten Vertebraten-UGTs	133
<u>IX. LITERATURVERZEICHNIS</u>	134
<u>KURZZUSAMMENFASSUNG / ABSTRACT</u>	151

I. EINLEITUNG

1. Flavonoide

Historisch bedingt unterscheidet man zwischen Sekundär- und Primärstoffwechsel. Den Verbindungen des Sekundärstoffwechsels sprach man zuerst eine geringe Bedeutung für die elementaren Lebensprozesse der Pflanze zu. Inzwischen kennt man über 200.000 Verbindungen [SITTE et al., 2002], die man dem Sekundärstoffwechsel zuordnet. Primärstoffwechselverbindungen sind praktisch in allen Spezies in annähernd gleicher Verteilung vorhanden. Die Verbindung zwischen beiden Stoffwechselwegen besteht zum Beispiel über die aromatische Aminosäure Phenylalanin, ein Produkt des Primärstoffwechsels, das der Biosynthese vieler sekundärer Pflanzenstoffe dient, unter anderem der der Flavonoide.

Flavonoide sind die wichtigste und umfangreichste Gruppe pflanzlicher Phenole. Trotz ihres Namens (*flavus*, lat.: gelb) gehören dieser Gruppe nicht nur Stoffe mit gelber Färbung an, sondern auch farblose bzw. rot bis blau gefärbte. Gemein ist allen das Molekülgerüst des Flavans (C₆-C₃-C₆-Struktur, siehe Abb. 1). Zu den Verbindungen, die den Flavangrundkörper tragen, zählen die Flavanone (z.B. Naringenin), die Flavone (z.B. Luteolin), die Flavan-3,4-diole, die Flavonole (z.B. Kämpferol und Quercetin), die Flavan-3-ole (z.B. Catechin), die Chalcone (z.B. Butein) und die Anthocyane (z.B. Cyanidin).

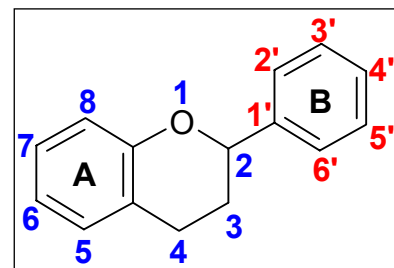


Abb. 1: Molekülgerüst des Flavans (C₆-C₃-C₆-Struktur). Der aromatische Ring A ist um einen Heterozyklus mit dem zweiten aromatischen Ring B erweitert (siehe Text).

1.1. Biosynthese

Die Flavonoide sind sekundäre Pflanzenstoffe, die sich von der aromatischen Aminosäure Phenylalanin ableiten. Im Phenylpropanoid-*pathway* wird sie zur Zimtsäure desaminiert, katalysiert durch die Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL). Diese Säure wird, durch eine Zimtsäure-4-Hydroxylase katalysiert, in die *p*-Cumarsäure überführt.

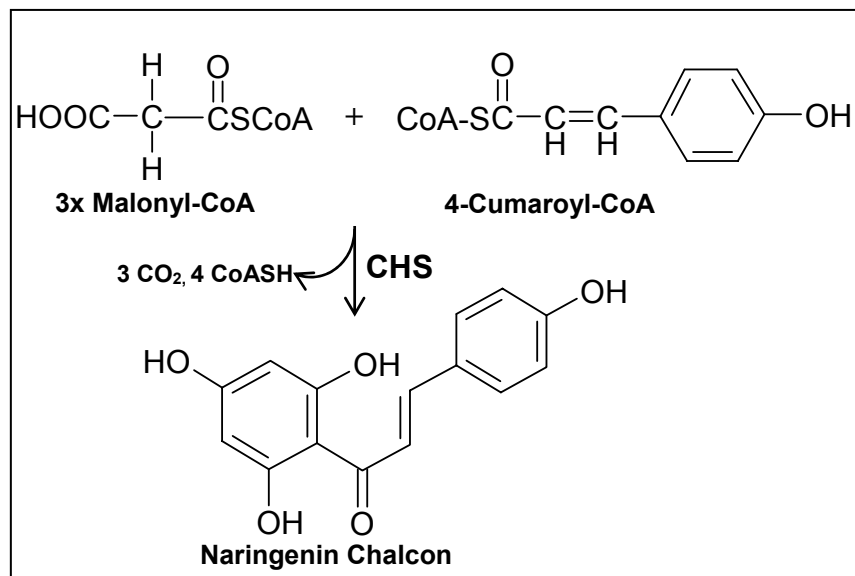


Abb. 2: Eingangsreaktion der Biosynthese von Flavan-Derivaten. Die Reaktion wird durch die Chalconsynthase (CHS) katalysiert. Als Ausgangsverbindungen dienen Malonyl-CoA und 4-Cumaroyl-CoA.

Vermittelt durch die 4-Cumaroyl:CoA-Ligase entsteht 4-Cumaroyl-CoA. Das Schlüsselenzym der Flavonoidbiosynthese ist die Chalconsynthase (CHS). Die CHS katalysiert die Reaktion von 4-Cumaroyl-CoA mit 3-Malonyl-CoA (siehe Abb. 2), welche nach Decarboxylierung zu Acetyl-CoA in die Reaktion zum Naringenin-Chalcon eingehen. Es entstehen drei CO₂- und vier Co-enzymA-Moleküle. Das freigesetzte Chalcon wird durch die Chalconisomerase (CHI) zum entsprechenden Flavanon zyklisiert. Aus dieser Struktur werden die verschiedenen Gruppen der Flavonoide gebildet, wie z.B. Flavone, Isoflavone und die Flavanonole / Dihydroflavonole, aus denen wiederum die Anthocyane, die Flavan-3,4-diole, die Flavan-3-ole und die Flavonole entstehen. Die meisten Flavonoide liegen in ihrer zuckergebundenen, wasserlöslichen Form in der Zentralvakuole der Zelle vor [Übersichtsartikel: WINKEL-SHIRLEY, 2001; WINKEL-SHIRLEY, 2002]. Diese Glycosylierung wird durch Glycosyltransferasen katalysiert (siehe unten).

1.1.1. Die Regulation der Flavonoidbiosynthese

Die Flavonoidbiosynthese kann an nahezu jedem Punkt des *pathways* durch Transkriptionsfaktoren spezifisch reguliert werden. Die Dihydroflavonolreduktase z.B. kann durch die - kürzlich aus Petunien isolierten - Transkriptionsfaktoren AN1 (*anthocyanin1* [SPELT et al., 2000]) und TT8 (*transparent testa*) [NESI et al., 2000] reguliert werden. Dabei handelt es sich um Transkriptionsfaktoren der bHLH-Familie (*basic helix-loop-helix*). Ein weiterer bHLH-Faktor ist der an der Anthocyanbiosynthese bei Mais beteiligte Faktor R. Auch diverse Transkriptionsfaktoren, die die *myb*-Domäne beinhalten, sind an der Flavonoidbiosynthese beteiligt, wie z.B. der Faktor TT2 [NESI et al., 2001], PAP1 (*production of anthocyanin*

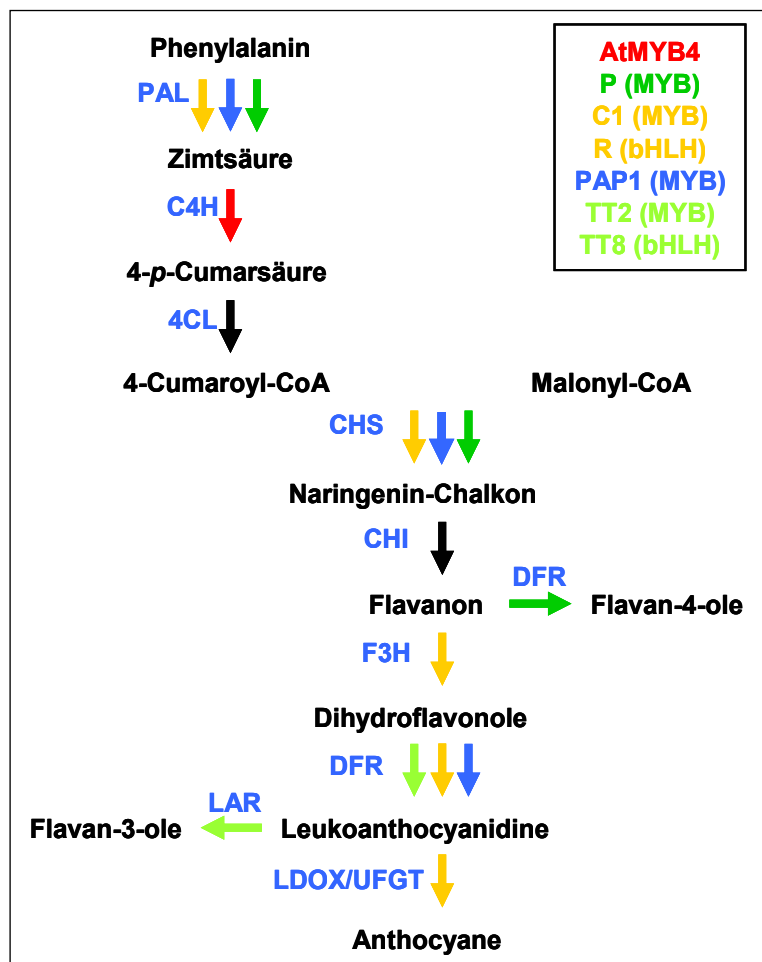


Abb. 3: Regulation des Phenylpropan- / Flavonoid-Stoffwechsels durch Transkriptionsfaktoren [Abgewandelt, siehe NESI et al., 2001 und VOM ENDT et al., 2002]. PAL, CHS, CHI und Transkriptionsfaktoren (AtMYB4, P, C1, R, PAP1, TT2, TT8) siehe Text. DFR = Dihydroflavonol-4-Reduktase, F3H = Flavonol-3-Hydroxylase, LDOX = Leukoanthocyanidin-Dioxygenase, UFGT = UDP-Glucose: Flavonol-Glucosyltransferase, LAR = Leukoanthocyanidin-Reduktase.

pigment 1) oder das Protein C1 aus Mais. Die Produktion von 3-Deoxyflavonoiden in Mais scheint den Faktor P zu benötigen. Die Phenylpropanoidbiosynthese wird von AtMYB4 kontrolliert (Abb. 3). Die meisten pflanzlichen MYB-Faktoren enthalten zwei zusammenhängende Helix-*turn*-Helix-Motive (R2 und R3) [VOM ENDT et al., 2002]. Eine neue Gruppe regulatorischer Proteine, die mit der CHS und mit anderen Enzymen der Flavonoidbiosynthese interagieren, wurde kürzlich charakterisiert bei der Beschreibung der Arabidopsismutante *icx1* (*increased chalcone synthase expression 1*) [WADE et al., 2003]. Sie hat eine erhöhte CHS-Expression in weißem Licht, die CHS-Expression im Dunkeln erfolgt aber wie im Wildtyp. Außerdem waren die Transkriptlevel der Flavonoidbiosynthese-Enzyme stark erhöht. Das heißt, ICX1 dient als negativer Regulator bei der durch Licht induzierten Flavonoidbiosynthese [WADE et al., 2003].

1.2. Funktion der Flavonoide

Die Funktion der Flavonoide schließt unter anderem die Abwehr gegen Fraßfeinde und Pathogene (1.2.1.), den UV-Schutz (1.2.2.) und die Anlockung tierischer Bestäuber durch Flavone, Flavonole und durch Anthocyane in den Blüten (1.2.3.) ein. Des weiteren dienen bestimmte Flavonoide als Signalmoleküle, die für die Interaktion von Leguminosen-Wurzeln mit Stickstoff-fixierenden-Bakterien (1.2.4.) sowie für Fortpflanzungsprozesse wichtig sind (1.2.5.) [zur Übersicht siehe HARBORNE & WILLIAMS, 1988; HARBORNE & WILLIAMS 2000].

1.2.1. Abwehr gegen Fraßfeinde und Pathogene

Eine wichtige Funktion von Flavonoiden und anderen Polyphenolen ist der Schutz der Pflanze gegen mikrobielle Invasion. Sie können z.B. die Keimung von Pilzsporen inhibieren. Gut untersucht ist das Isoflavonoid Maackiain oder das Phytoalexin Mucronulatol, welches in *Astragalus* spp. produziert wird. Des weiteren spielen Flavonoide eine wichtige Rolle beim Angriff von Fraßfeinden (Insekten, Säugern). Drei Glycoflavone (Schafotosid, Isoschafotosid und Neoschafotosid) wurden im Phloemsaft von Reis gefunden. Dort wirken sie gegen den braunen *plant hopper Nilaparvata lugens*. Hohe Konzentrationen dieser Glycoflavone sind in resistenten Pflanzen zu finden. Der Nematode *Ditylenchus angustus* greift auch Reispflanzen an, die darauf hin das Flavon Sakuranetin und das Phenylpropanoid Chlorogensäure in höherer Konzentration in den befallenen Blättern akkumulieren [GRAYER & KOKUBUN, 2001].

1.2.2. UV-Schutzfunktion [WINKEL-SHIRLEY, 2002]

Ultraviolette Strahlung ist physikalisch in drei "Banden" unterteilt (UV-C, -B, -A). Ökologische Bedeutung weisen aber nur UV-B (290-315 nm und damit die Bande mit der höchsten Energie, die auf die Erdoberfläche trifft) und -A (315-400 nm) auf.

UV-B-Resistenz von Pflanzen ist auf eine Anzahl von Faktoren zurückzuführen. Einer dieser Faktoren sind die Flavonoide in den Epidermiszellen grüner Blätter und den Blatthaaren. Die Ausprägung der Blattepidermis als Strahlungsbarriere ist allerdings aufgrund variierender Schutzpigment-Gehalte und -Lokalisation in den einzelnen systematischen Gruppen unterschiedlich. So zeigte sich bei verschiedenen Baumspesies (*Pinus ponderosa*, *Quercus ruba* und *Pseudotsuga menziesii*), dass die Wirkung von UV-B in Bezug auf die Menge und die Komposition der Flavonoide unterschiedlich sein kann [WARREN et al., 2002]. Flavonoide, insbesondere Flavone und Flavonole, absorbieren UV-Strahlung im Bereich von 280 nm und darüber und schützen so das photosynthetisch aktive Gewebe vor Schädigung. Im Photosystem II ist das Protein D1 des Reaktionszentrums und das wasseroxidierende System besonders empfindlich gegen UV-B-Strahlung. In einer neueren Studie konnte die Flavonoid-Akkumulation unter UV-B-Strahlung bei Äpfeln (*Malus domestica* Borkh) mit dem Schutz des photosynthetischen Apparates korreliert werden [SOLOVCHENKO & SCHMITZ-EIBERGER, 2003]. Ein Beispiel für die Wichtigkeit von Flavonoiden für die UV-B-Abschirmung sind Arabidopsismutanten, die weniger epidermale Flavonole produzieren (Vergleichbares gilt für Gerste-Mutanten [SCHMITZ-HOERNER & WEISSENBOCK, 2003]). Sie sind sehr sensitiv gegenüber UV-B-Strahlung [LI et al., 1993]. Obwohl VAN DE STAALJ *et al.* 2002 gezeigt haben, dass UV-B keinen steigernden Effekt auf die Flavonoid-Menge oder -Zusammensetzung bei drei Gräsern hatte (*Deschampsia antarctica*, *Deschampsia borealis* und *Calamagrostis epigeios*) [VAN DE STAALJ et al., 2002], weisen speziesspezifisch Flavonoide eine maßgebliche Funktion beim UV-Schutz auf [SCHMITZ-HOERNER & WEISSENBOCK, 2003].

1.2.3. Anlockung durch Anthocyane in Blüten

Die blaue Farbe der Petalen ist häufig durch - auf Delphinin oder Cyanidin basierende - Anthocyane verursacht. Die meisten ihrer Glycoside sind jedoch malven- bzw. magentafarben, ihr blau-*shift* ist meist auf die Anwesenheit eines Flavon-Kopigments bzw. eines oder mehrerer Metallionen zurückzuführen. Bienen und auch andere Insekten bevorzugen blaue Blüten und bestäuben somit die Pflanze [HOLTON & CORNISH, 1995].

1.2.4. Signale zwischen Leguminosenwurzeln und den Stickstoff-fixierenden-Bakterien

Die *gram negative* Bodenbakterien z.B. *Rhizobium* spp. infizieren Leguminosenwurzeln (z.B. Erbsen, Linsen, Klee, Bohnen) und gehen mit ihnen eine Symbiose ein. Dies erfordert Signalmoleküle. Der erste messbare Austausch von Signalen läuft über die Sekretion von phenolischen Verbindungen, Flavonoiden und / oder Isoflavonoiden durch die Pflanzen (z.B. Naringenin, Luteolin, Hesperetin). Diese spezifischen Exsudate aktivieren die *Nod*-Genexpression. Der Nod-Faktor wiederum induziert die Wurzelhaarentwicklung und Knöllchenbildung [BEGUM et al., 2001]. Als Repressor des *Nod*-Gens dienen z.B. Quercetin und Luteolin [NOVAK et al., 2002].

1.2.5. Fortpflanzung

Die Pollenflavonoide machen in der blühenden Pflanze 2-4% des Pollen-Trockengewichts aus. Rezessive Mutationen in beiden CHS-Genen produzieren weiße anstatt gelber Pollen. Diese Pollen ohne Flavonoide können nicht keimen. Dies konnte durch die Applikation von z.B. Kämpferol oder Quercetin komplementiert werden [MO et al., 1992]. Maispollen z.B. produzieren mindestens 10 verschiedene Kämpferol-, Quercetin- und Isorhamnetinglycoside.

1.3. Wirkung der Flavonoide auf den Menschen

1.3.1. Antimikrobielle Wirkung

Es gibt viele neuere Publikationen, die über die antimikrobielle Wirkung von Flavonoiden gegen *gram positive* Bakterien berichten. So sind z.B. die Retrochalcone Licochalcon A-C aus *Glycyrrhiza inflata*-Wurzeln bereits in sehr geringen Konzentrationen gegen *Staphylococcus aureus* wirksam. Sie inhibieren dort die Sauerstoffaufnahme und die Oxidation von NADH in der Bakterienmembran. Diese Flavonoide scheinen die bakterielle Atmungskette zwischen CoQ und Cytochrom C anzugreifen. Des Weiteren zeigt die Verbindung 5,7-Dihydroxy-3,8-Dimethoxyflavon eine antibiotische Wirksamkeit gegen *Staphylococcus epidermidis* [HARAGUCHI et al., 1998].

1.3.2. Antivirale Wirkung

Flavonoide können auch antivirale Eigenschaften zeigen, etwa durch Inhibition von Enzymen der viralen Replikation. Als Beispiele seien die zwei Biflavone Robustaflavon und Hinokiflavon aus *Rhus succedanea*, aktiv gegen die HIV-1-Reverse-Transkriptase, und Quercetin, wirksam gegen die HIV-1-Integrase, genannt [KIM et al., 1998].

1.3.3. Antioxidantien

Innerhalb der letzten Jahre wurden immer mehr Schädigungsmechanismen durch freie Sauerstoff-Radikale bekannt, die eine wichtige Rolle in der Pathogenese verschiedener degenerativer Erkrankungen des Zentralnervensystems sowie im physiologischen Alterungsprozess spielen. Deshalb wurde das Augenmerk zunehmend auf Antioxidantien gerichtet, Verbindungen, die die Initiation bzw. die Fortpflanzung der Radikalkettenreaktion verhindern oder verlangsamen. Flavonoide dienen u. a. als Fänger von Superoxidanionen, Hydroxy- und Peroxyradikalen [TOURNAIRE et al., 1993]. Z.B. das Leberenzym Xanthinoxidase (XO) produziert Harnsäure und reaktive Sauerstoffspezies (ROS) während des Katabolismus der Purine. XO kann durch fünf im grünen Tee (*Camellia sinensis*) vorkommende Catechine inhibiert werden [WANG, 2000; HARBORNE & WILLIAMS, 2000].

NAO ist ein in Spinat (*Spinacia oleracea*) vorkommendes wasserlösliches und sowohl *in vitro* als auch *in vivo* sehr effektives Antioxidanz-Gemisch. Die Hauptkomponenten von NAO sind Flavonoide und *p*-Cumarsäure-Derivate. Eines dieser Flavonoide ist glucuronidiert und scheint bessere antioxidative Wirkung zu zeigen als bereits etablierte Wirkstoffe wie z.B. das Vitamin E-Homolog Trolox [BERGMAN et al., 2003].

1.3.4. Koronare Herzerkrankungen

Viele Substanzen aus der Gruppe der Flavonoide, besonders Flavonole und Anthocyane, werden mit der Nahrung durch den Verzehr von Früchten, Gemüse, Tee und Wein aufgenommen. Es ist dennoch nicht ganz geklärt, in welchen Mengen, und ob sie strukturell verändert über den Darm resorbiert werden (bis zu einigen hundert mg pro Tag). Studien, die die Einnahme von reinem Quercetin im Vergleich zu glycosyliertem untersuchten, zeigten, dass die Präsenz des Zuckerrests für die Resorption des Flavonoids wichtig ist [HOLLMAN & KATAN, 1999-c]. Des Weiteren ist wichtig, mit welchem Zucker Quercetin konjugiert ist [HOLLMAN et al., 1999-a].

Diese mit der Nahrung aufgenommenen Flavonoide inhibieren *in vitro* die Oxidation des *low density lipoproteins* (LDL). In vielen Ländern führt die übermäßige Einnahme von gesättigten Fettsäuren zu einer erhöhten Inzidenz der koronaren Herzerkrankung (KHK). Der reguläre Verzehr von flavonoidreichem Essen kann das Risiko, an einer kardiovaskulären Erkrankung zu sterben, verringern (Rotwein, Tee, Zwiebeln, Äpfel [HOLLMAN et al., 1999-b]). In einer niederländischen Studie konnte die gesteigerte Einnahme von Flavonoiden und Flavonen (23 mg pro Tag und Person) mit dem Rückgang koronarer Herzerkrankungen assoziiert werden [HOLLMAN & KATAN, 1999-c].

1.3.5. Antiinflammatorische Wirkung der Flavonoide

Flavonoide scheinen sowohl den Cyclooxygenase- als auch den 5-Lipoxygenase-*pathway* zu hemmen. Flavonoide wie Apigenin und Quercetin zeigen eine signifikante Inhibierung des Fibroblastenwachstums [KOGANOV et al., 1999].

1.3.6. Vaskuläre und hämatologische Effekte

Blutplättchen, die eine Schlüsselrolle in der Atherogenese einnehmen, werden durch Flavonoide in der Adhäsion, Aggregation und ihrer Produktion gehemmt. Des Weiteren wird die Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren wie Thromboxan A₂, *platelet activating factor* (PAF) und Serotonin sowie die Interleukin-1-induzierte Expression von Gewebefaktoren humaner Monocyten, die das Gerinnungssystem aktivieren, gehemmt. Flavonoide verhindern außerdem die oxidative Modifizierung von LDL durch Makrophagen, die in atherosklerotischen Läsionen charakteristisch sind [WANG, 2000].

1.3.7. Flavonoide mit Östrogenwirkung

Das bekannteste Flavonoid, das Östrogenaktivität vermittelt, ist das Isoflavon Genistein aus verschiedenen Fabaceae. Es hat zwar eine nicht so starke Wirkung wie das endogene 17- β -Östradiol, besitzt jedoch, verabreicht in der richtigen Konzentration, eine große pharmakologische Bedeutung. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die geringere Anhäufung diverser Krankheiten (wie Brustkrebs, Prostatakrebs, postmenopausale Osteoporose usw.) in asiatischen Ländern auf der erhöhten Aufnahme von Soja-Phytohormonen basiert [HUMPHREYS & CHAPPLE, 2000]. In normaler Ernährung sind die Phytohormone nicht bedenklich, da sie meist nicht in schädlichen Mengen in Pflanzen vorkommen (trotzdem sollten Vegetarier Produkte mit hohem Isoflavonoid-Anteil wie Soja vermeiden) [BAKER, 1998].

1.3.8. Cytotoxische Antitumoraktivität

Die Hauptnahrungsflavonoide in Ländern wie Holland, England und Japan befinden sich im grünen Tee (Epicatechin, Epicatechin-Gallat, Epigallocatechin und Epigallocatechin-Gallat). Diese Flavonoide zeigten in Tierversuchen einen antiproliferativen Effekt [HOLLMAN & KATAN, 1999-d]. In Zellkulturstudien [Tests mit Karzinomzelllinien: P-388 (murine Leukämie), A-549 (humanes nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom) und HT-29 (humanes kolorektales Karzinom)] wurden viele weitere Flavonoidkomponenten identifiziert, die das Tumorwachstum hemmen sollen, unter anderem die Dihydrochalcone 4,2',6'-Trihydroxy-4'-methoxydihydrochalcon und 2',6'-Dihydroxy-4'-methoxydihydrochalcon und das Chalcon-2',4'-diacetoxychalcon aus *Ononis natrix* ssp. *ramosissima*.

1.4. Flavonoide im Roggen

Während der ersten sechs Tage der Roggen-Primärblattentwicklung akkumulieren sechs verschiedene Flavonoide dreier Klassen [STRACK & MEURER, 1982] (Abb. 4). In der Epidermis akkumulieren die C-Glycosylflavon-*O*-glycoside Isovitexin-2''-*O*-arabinosid (R₃) und Isovitexin-2''-*O*-galaktosid (R₄) und mehr als 20 verschiedene Hydroxyzimtsäurederivate [STRACK et al., 1987]. Im Mesophyll sind die Anthocyane Cyanidin-3-*O*-glucosid (R_I) und Cyanidin-3-*O*-diglucosid (R_{II}) [BUSCH et al., 1986] und die Luteolinderivate Luteolin-7-*O*-diglucuronid-4'-*O*-glucuronid (R₁) und Luteolin-7-*O*-diglucuronid (R₂) zu finden [SCHULZ et al., 1985]. Bei den Hydroxyzimtsäurederivaten handelt es sich hauptsächlich um Ester von *p*-Cumar- und Ferulasäure mit verschiedenen Zuckersäuren. Zellwandgebunden wurden *p*-Cumarsäure und Ferulasäure nachgewiesen. Die

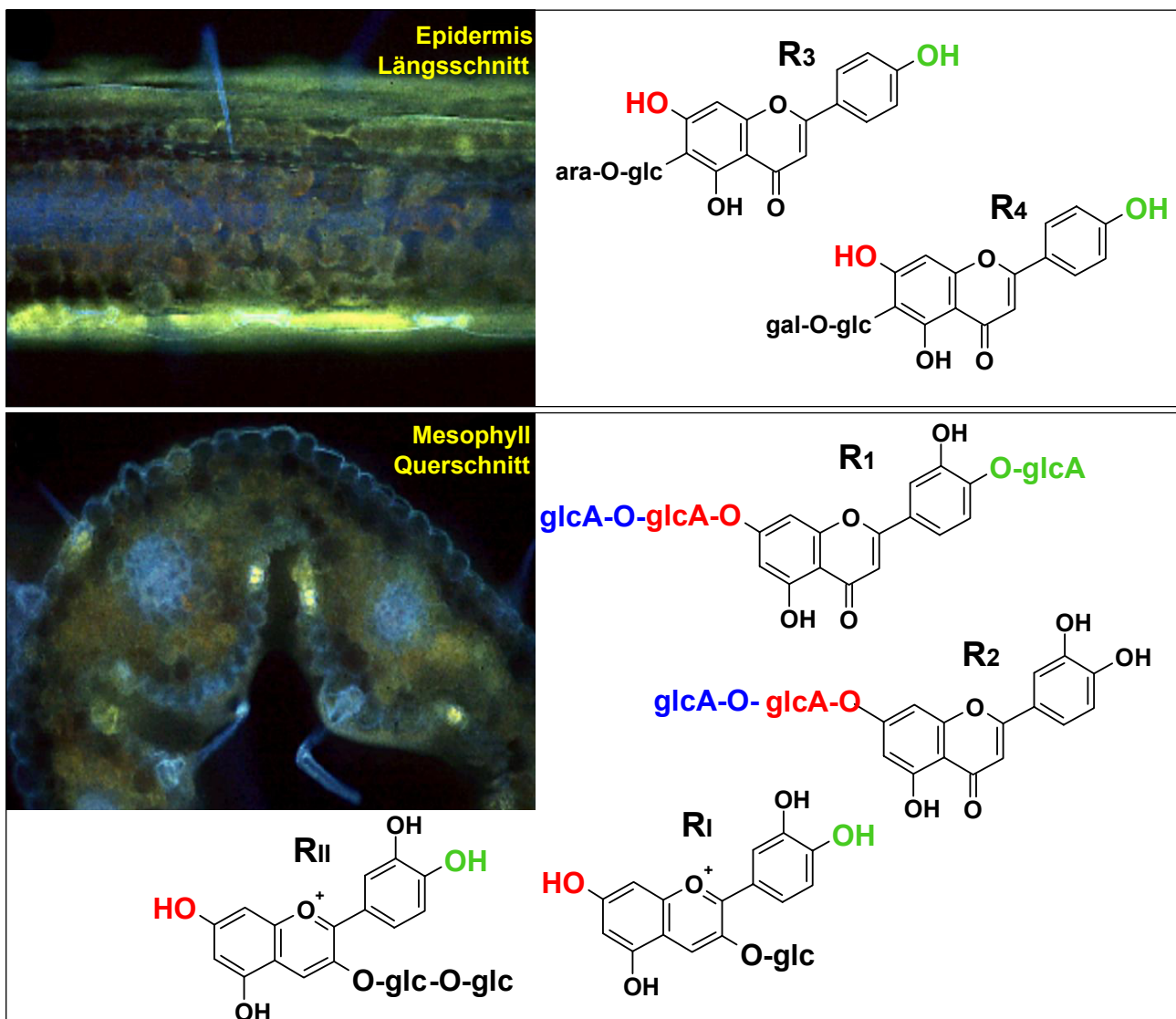


Abb. 4: Sekundär-gelb- / -orange-Fluoreszenz der Flavone im Roggen-Primärblatt.

Abgebildet sind ein Querschnitt und ein Längsschnitt von Primärblättern 6 Tage alter Roggen-Keimlinge [R. SCHMITZ Doktorarbeit]. Die Schnitte wurden auf Objektträgern in Puffer (100 mM NaKPi pH 5,8, 1 mM CaCl₂, 0,5 M Sorbitol) mit 0,1 % Naturstoffreagenz A inkubiert. Die Mikroskopie erfolgte an einem konventionellen Epifluoreszenz-Mikroskop (Anregung: 340 - 380 nm). ara = Arabinose, gal = Galactose, glc = Glucose, glcA = Glucuronsäure.

Gewebelokalisation wurde an Gewebeschnitten (siehe Abb. 4) und an isolierten Epidermis- und Mesophyll-Protoplasten bestimmt [SCHULZ & WEISENBÖCK, 1986]. Für das Mesophyll konnte die vakuoläre Speicherung an isolierten Vakuolen bestätigt werden [KLEIN et al., 1998]. Die Akkumulation der Flavonoide im Primärblatt ist unter Kulturkammerbedingungen wie auch im Freiland entwicklungsabhängig: R₁ akkumuliert nur vorübergehend, die Menge der anderen Flavonoide erhöht sich kontinuierlich während der Entwicklung bis zu einem bestimmten Niveau. Die Akkumulation erfolgt auch im etiolierten Primärblatt, wobei vor allem die Akkumulation der Mesophyll-Flavonoide zunimmt.

Der Vergleich der UV-B-Absorptionskapazitäten auf Gewebeebene wies die Epidermis als potenziellen Hauptabsorber der UV-B-Strahlung aus. Schon das junge Primärblatt hat in der Epidermis eine hohe potenzielle UV-B-Absorptionskapazität durch lösliche Flavonglycoside und Hydroxyzimtsäurederivate, die sich nur wenig während der weiteren Entwicklung steigerte [BURCHARD et al., 2000]. Mesophyllflavone und zellwandgebundene Hydroxyzimtsäuren spielen für den UV-Schutz eine untergeordnete oder keine Rolle [Dissertation R. SCHMITZ, 2001, Universität zu Köln].

2. Detoxifikation endogener und exogener Substanzen

Pflanzen sind, wie andere Organismen auch, ständig stoffwechselfremden, zum Teil toxischen Chemikalien ausgesetzt. Diese Stoffe, die nicht der Ernährung der Pflanze dienen, werden aber trotzdem von ihr aufgenommen und akkumulieren. Man unterscheidet pflanzeneigene und -fremde Stoffe. Die pflanzenfremden Substanzen werden ihrerseits in Allelochemikalien und Xenobiotika unterteilt [VOGT & JONES, 2000]. Nach MOLISCH (1937) [HOCK & ELSTNER, 1999] versteht man unter Allelopathie die gegenseitige Beeinflussung von Pflanzen durch stoffliche Ausscheidungen, die meist hemmend, teilweise aber auch fördernd wirken. Diese Definition erfasst sowohl Pflanzen als auch Mikroorganismen. Die heute gängige Definition von MULLER (1970) [HOCK & ELSTNER, 1999] beschreibt nur die Wechselwirkungen zwischen höheren Pflanzen (bezüglich Allelochemikalien). Substanzen, die in biologischen Systemen stoffwechselfremd und praktisch nicht biologisch abbaubar sind, nennt man Xenobiotika [HARBORNE & WILLIAMS, 1988]. Um eine Akkumulation dieser Stoffe in der Vakuole zu ermöglichen, muss die Wasserlöslichkeit der Substanzen erhöht werden [KLEIN et al., 2000]. Die Zunahme der Polarität wird durch Hydroxylierung, Dealkylierung und / oder durch Konjugation mit Primärstoffmetaboliten (Zuckern und Aminosäuren) erreicht. Verantwortliche Enzyme sind also: Oxidasen, Peroxidasen und Transferasen [SCHULZ & FRIEBE, 1999].

Eine andere, nicht so weit verbreitete Strategie ist es, die absorbierten Verbindungen zu polymerisieren und sie dann in der Zellwand zu speichern (z.B. Ferulasäure oder polymethylierte

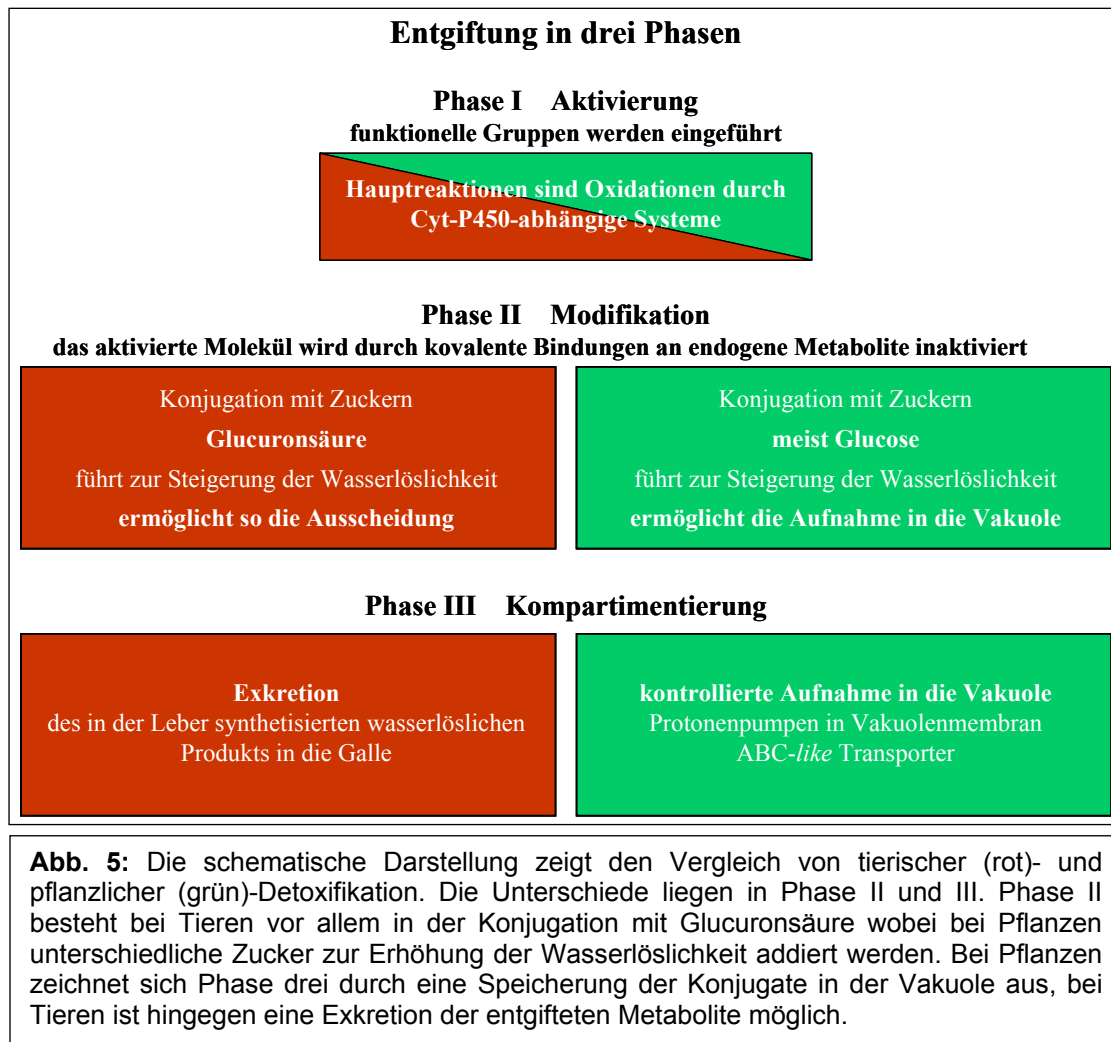
Flavonolglucoside in *Chrysosplenium americanum* [SCHULZ & FRIEBE, 1999]). Da die Vakuole aber meist mehr als 90 % des Zellvolumens einnimmt, ist der Speicherplatz dort größer.

In einigen Fällen sind Mikroorganismen an der Entgiftung beteiligt (z.B. Hydroxamsäure-Abbau) [SCHULZ & FRIEBE, 1999]. Generell unterteilt man die Detoxifikation in drei Phasen, dies trifft mit kleinen Abwandlungen auch auf die Detoxifikationsreaktionen im Tierreich zu (siehe dazu Abb. 5, genauer siehe unten). Aufgrund der Ähnlichkeiten der Entgiftungsschritte endogener und exogener Substanzen bei Tieren und Pflanzen postulierte SANDERMANN 1994 das 'green liver'-Konzept [SANDERMANN, 1994, 1999]. Dieses basiert auf der Beobachtung, dass z.B. der polychlorierte Kohlenwasserstoff DDT, der polyzyklische Kohlenwasserstoff Benzo[α]pyren und das *plasticizer chemical* DEHP bei Tieren und Pflanzen, bis auf die Verwendung eines anderen Zuckers, ähnlich metabolisiert werden. SANDERMANN beschreibt die Ähnlichkeit der mikrosomalen Zimtsäure-4-hydroxylase und des Cytochrom-P450-Systems der Leber (Anwesenheit einer Cytochrom-P450-Komponente, Induzierbarkeit, obligatorische Abhängigkeit von einem Phospholipidcofaktor, Sensitivität für typische Inhibitoren, Auftreten eines NIH-*shift* des Wasserstoffs aufgrund einer Epoxidzwischenstufe). Außerdem stellt er ähnliche Molekulargewichte und ähnliche isoelektrische Punkte der pflanzlichen Enzyme im Vergleich zu den korrespondierenden Leberenzymen fest. Auch auf cDNA-Ebene sind hohe Übereinstimmungen festzustellen.

2.1. Phase I: Aktivierung

Phase I dient dazu, funktionelle Gruppen in unpolare Moleküle einzufügen oder die vorhandenen funktionellen Gruppen umzuwandeln. In der Regel hat dies eine Erhöhung der Polarität und eine Verringerung der biologischen Aktivität zur Folge. Allerdings werden in bestimmten Fällen (einige Pharmaka und manche Carcinogene) die Fremdstoffe erst durch die Umwandlungsreaktionen biologisch aktiv. Wichtige Biotransformationsreaktionen der Phase I sind z.B. die hydrolytischen Spaltungen (Ester- und Peptid-Spaltungen, z.B. die Hydrolyse des Schmerzmittels Acetylsalicylat), die Oxidationsreaktionen (Hydroxylierungen, Epoxid-Bildungen, Sulfoxid-Bildungen, Dealkylierungen, Desaminierungen), die Reduktionsreaktionen (Reduktionen von Carbonyl-, Azo-, Nitroverbindungen, Dehalogenierung), die Methylierungen (z.B. bei der Inaktivierung des Catecholamins Nor-adrenalin) und die Desulfurierungen. Die hydroxylierenden Enzyme sind im allgemeinen Mono-oxygenasen, die als redoxaktives Coenzym ein Häm enthalten. In der reduzierten Form kann dieses Häm CO binden und zeigt dann eine charakteristische Lichtabsorption bei 450 nm. Dies führte zu der Bezeichnung Cytochrom P450-Systeme. Sie katalysieren die reduktive Spaltung von molekularem Sauerstoff. Eines der beiden Sauerstoffatome wird auf das Substrat übertragen, das zweite als Wassermolekül freigesetzt. Die notwendigen

Reduktionsäquivalente werden durch ein FAD-haltiges Hilfsprotein vom Coenzym NADPH+H⁺ auf die eigentliche Monooxygenase übertragen. Allgemein werden die betreffenden Enzymsysteme von ihren Substraten induziert. Sie zeigen eine breite Spezifität und sie akzeptieren meist viele Substrate.



2.2. Phase II: Modifikation

In Phase II wird das aktivierte Molekül durch kovalente Bindungen an endogene, hydrophile Substanzen wie Glucose (bei Tieren Glucuronsäure), Malonat oder Glutathion deaktiviert. Glucose kann an Hydroxyl-, Sulphydryl-, Amino- und Carboxyl-Gruppen addiert werden. Malonat wird mit Hydroxyl- und Aminogruppen, Glutathion mit elektrophilen Regionen konjugiert [JONES & VOGT, 2001; COLEMAN et al., 1997]

2.2.1. Konjugation mit Glutathion

Glutathion wirkt sowohl als reduzierendes Agens - es schützt die Zelle gegen oxidativen Stress - als auch als Nukleophil (Abb. 6). Glutathion kann spontane

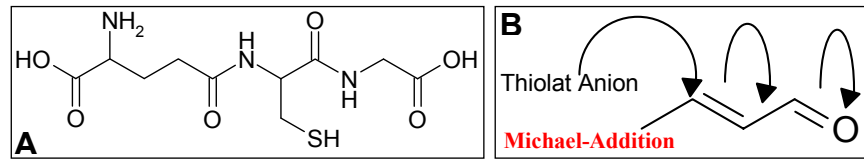


Abb. 6: abgewandelt siehe COLEMAN *et al.*, 1997. Die Addition von Glutathion (A) an ein konjugiertes System erfolgt nach einem Michael-Mechanismus (B).

oder mit Hilfe der Glutathion-S-Transferase (GST) katalysierte Konjugationen eingehen. Dadurch wird die Wasserlöslichkeit erhöht und somit die Exkretion aus der Zelle ermöglicht [VONTAS *et al.*, 2002]. Die GSTs prozessieren eine große Anzahl unterschiedlicher endogener Substanzen wie z.B. reaktive, ungesättigte Kohlenwasserstoffe, elektrophile Aldehyde, reaktive DNA-Basen, Epoxide und organische Hydroperoxide. Bei pyrethroidresistenten Insekten scheint die Detoxifikation unter anderem über GST zu laufen [VONTAS *et al.*, 2002]. GSTs werden in Pflanzen als Antwort auf endogenen und exogenen Stress exprimiert [RIECHERS *et al.*, 2003].

2.2.2. Konjugation mit aktivierten Zuckern durch Glycosyltransferasen

Glycosyltransferasen (EC 2.4.x.y.) gehören zur Gruppe der *Carbohydrate Active EnZymes* (CAZY). Diese Gruppe wird in fünf Untergruppen unterteilt: 1. die Glycosidasen / Transglycosidasen, 2. die Glycosyltransferasen, 3. die Polysaccharidlyasen, 4. die Carbohydrat-esterasen und 5. die carbohydrate-bindenden Moleküle. Glycosyltransferasen sind eine hoch divergente, polyphyletische Multigenfamilie [MACKENZIE *et al.*, 1997]. Sie sind für Glycosylierungsreaktionen, z.B. für die Konjugation eines Glycoseresests, eines aktivierten Zuckers, an ein Akzeptormolekül (Aglycon), verantwortlich. Diese Glycosylierung kann an der OH-, der NH₂-, der SH- oder der CH- Gruppe geschehen [JONES & VOGT, 2001]. Die Glycosylierung kann in der Bildung eines Mono- / Oligo- / Polyglycosids bzw. in Glycosiden von Proteinen, Lipiden, Steroiden und anderen Verbindungen münden [KEEGSTRA & RAIKHEL, 2001]. Die Glycosyltransferase-Multigenfamilie ist, basierend auf Sequenz-homologie, Signatur der Motive, Stereochemie der entstehenden Zuckerbindung und bekannten Substratspezifitäten, in 69 Untergruppen unterteilt (*last update* 06.10.2003, <http://afmb.cnrs-mrs.fr/~cazy/CAZY/index.html>) [CAMPBELL *et al.*, 1997]. Diese Glycosylierungsreaktionen können sehr vielseitig sein, es gibt z.B. ca. 300 verschiedene Glycoside allein des Flavonoids Quercetin. Diese Arbeit wird sich in weiten Teilen mit der Untergruppe GT-1 befassen (siehe unten).

2.3. Phase III: Kompartimentierung

Die Konjugation mit Gluthathion z.B. findet im Cytosol statt, die Akkumulation der Produkte dort könnte aber zu einer Inhibierung der GST führen, was dann zu einer Ansammlung ungebundener Elektrophile führen würde. Deshalb ist es wichtig, die Metabolite aus dem Cytosol in die Vakuole oder den Apoplasten zu schleusen. Dasselbe gilt für glycosylierte Metabolite. Diese könnten auch ihre eigene Neusynthese und somit die Detoxifikation neuer giftiger Substanzen verhindern.

Es gibt zwei Mechanismen der Energetisierung, die den Transport der Konjugate in die Vakuole gewährleisten: erstens produzieren zwei verschiedene Protonen-Pumpen in der Vakuolenmembran (eine H⁺-ATPase und eine H⁺-PPiase) einen elektrochemischen Gradienten (sekundär energetisiert, Antiport) und zweitens gibt es ABC-like-Transporter, die direkt durch ATP angetrieben werden (direkt energetisiert) [KLEIN et al., 2000; DEBEAUJON et al., 2001; MARTINOIA et al., 2000].

3. Glycosyltransferase-Multigenfamilie

3.1. Reaktionsmechanismus

Die ersten Berichte über Glycosyltransferasen stammen von Bakterien. Seitdem bekannt ist, dass das Bakterium *Acetobacter xylinum* eine Cellulose produziert, die der von Pflanzen ähnlich ist, wurde es als Modellorganismus benutzt, um die Cellulosesynthese (die Cellulose-Synthase ist eine Glucosyltransferase) besser zu verstehen. Bereits vor 40 Jahren konnte in diesem Modellsystem die Synthese von Cellulose aus UDP-Glucose in der Anwesenheit von löslichem Cellodextrin nachgewiesen [GLASER, 1958] und die Primärsequenz der Cellulose-Synthase einige Jahrzehnte später aufgeklärt werden [WONG et al., 1990].

Generell, abhängig von der jeweiligen Glycosyltransferase, kann eine Inversion oder Retention der Stereochemie am C1-Atom des Zuckerdonors stattfinden. In einer SN₂-Reaktion greift das Nucleophil das C1-Atom an, was zu einer Inversion der Stereochemie führt (siehe Abb. 7). Zu einer Retention kommt es durch eine Folge von zwei Inversionen mit einem Glycosylenzym-Intermediat [ÜNLIGIL & RINI, 2000]. Der invertierende Mechanismus ist aufgrund der Strukturaufklärung einer

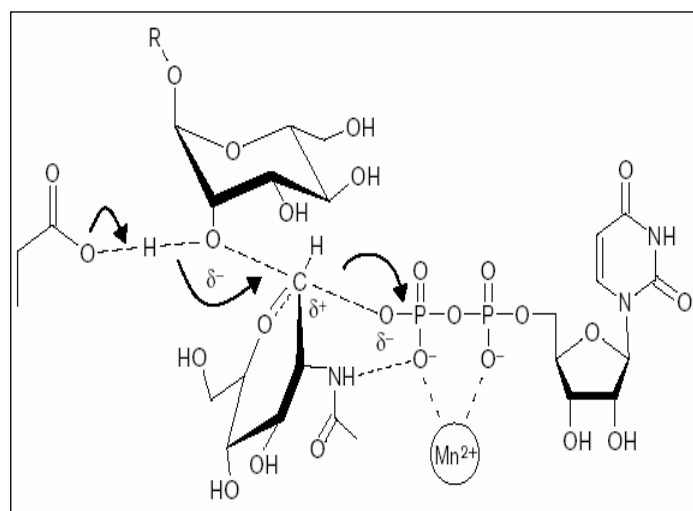


Abb. 7: SN₂-Mechanismus einer invertierenden Glycosyltransferase, Erklärung siehe Text [Abb. aus ÜNLIGIL und RINI, 2000]

Glycosyltransferase aus *Bacillus subtilis* der SpsA relativ gut verstanden [CHARNOCK et al., 2001]. Die SpsA gehört der Subfamilie GT-2 an und ist für die Biosynthese von Polysacchariden wichtig. Der

Mechanismus verlangt mindestens zwei katalytische Carboxylate eines, das als Base fungiert, um die Akzeptorspezies zu aktivieren, und eines, um das divalente Metallion (Mn^{2+}) zu koordinieren, das mit dem UDP assoziiert. Es wird vermutet, dass das konservierte Histidin und die Glutaminsäure innerhalb der Zuckerbindungsbox in den SN_2 -Mechanismus involviert sind. Selektive Mutationsstudien zeigten, dass sowohl Histidine wie auch Dicarboxylaminosäuren eine wichtige Funktion im Zuckertransferprozess einnehmen [NAWLOKA et al., 2003]. Die N-terminale UDP-Bindungsdomäne ist hoch konserviert und die kritischen Aminosäuren, die mit dem UDP interagieren, sind invariant [ÜNLIGIL & RINI, 2000].

3.2. Tertiärstrukturen von Glycosyltransferasen

Die Aufklärung der Tertiärstruktur der SpsA führte zur schnellen Aufklärung weiterer Glycosyltransferasen unterschiedlicher Untergruppen [Übersicht ÜNLIGIL & RINI, 2000]. Die T4- β -Glucosyltransferase (BGT) überträgt Glucose von Uridindiphosphat- α -D-glucose auf 5-Hydroxymethylcytosinreste seiner eigenen Phagen-DNA. Dadurch schützt er seine DNA gegen Wirtsnukleasen (diese Glucosyltransferase ist bisher unklassifiziert) [MORÉRA et al., 1999]. MurG (GT 28) ist eine N-Acetylglucosaminyltransferase aus *E.coli*, die in die Peptidoglycanbiosynthese eingebunden ist. Sie transferiert N-Acetyl-D-glucosamin von UDP-GlcNAc auf die C4-OH-Gruppe einer Lipid-linked-N-Acetylglucosamin- β -1,4-N-acetylmuraminsäure [HA et al., 2000]. Am Beispiel von MurG konnte gezeigt werden, welche Aminosäuren für die Bindung des Zuckers von Bedeutung sind [HU et al., 2003]. Des Weiteren konnte die Struktur einer *bovinen* β -1,4-Galaktosyltransferase 1 der Untergruppe GT-7, ein im Golgi-Apparat befindliches Enzym [GASTINEL et al., 1999], welches für die Galaktosylierung von Glycoproteinen und -lipiden verantwortlich ist, aufgeklärt werden, ebenso eine N-Acetylglucosaminyltransferase I (GnT I) der Untergruppe GT-13 vom Kaninchen, sie transferiert das erste GlcNAc auf die Oligomannose-Grundstruktur [ÜNLIGIL et al., 2000], und eine humane β -1,3-Glucuronosyltransferase I der Untergruppe GT-43. Alle bisher beschriebenen Enzyme folgen einem invertierenden Mechanismus.

Erst vor kurzem konnten auch zwei Enzyme kristallisiert werden, die einem *retaining*-Mechanismus folgen, eine GT-6 (α -1,3-Galactosyltransferase (*bovine*)) und eine GT-8 (α -1,4-Galactosyltransferase LgtC (*Neisseria meningitidis*)). Mittlerweile sind im Internet weitere 3D-Strukturen einzusehen (<http://afmb.cnrs-mrs.fr/~cazy/CAZY/index.html>).

Bei den Glycosyltransferasen wurden bisher zwei Grundfaltungsmuster beschrieben: die A- und die B-Faltung. Die A-Faltung, am besten beschrieben durch SpsA, hat zwei dissimilare Domänen, die eine ist in die Nucleotidbindung involviert (SGC Domäne) und die andere ist für die Bindung des Akzeptors verantwortlich (Die oben beschriebenen Proteine GT-6, GT-7, GT-8, GT-13 und GT-43 gehören zu dieser Gruppe). Hier wird das Metallion von zwei Phosphaten des Zuckers und von

Aminosäuren des Proteins koordiniert. Die dafür nötige Aminosäuresequenz nennt man das DXD-Motiv, obwohl die Aspartate auch durch andere Aminosäuren substituiert werden können. Diese Gruppe beinhaltet vor allem Enzyme, die am Golgi-Apparat oder am ER lokalisiert sind [HU et al., 2003].

Die B-Faltung, die durch zwei ähnliche ROSSMAN-gefaltete Subdomänen charakterisiert ist, wird gut durch die Glycosyltransferase des T4-Phagen beschrieben. Zu dieser Gruppe gehören vor allem prokaryotische Enzyme, z.B. solche, die daran beteiligt sind, Sekundärstoffwechselmetabolite zu glycosylieren, oder Enzyme der Zellwandbiosynthese. Zu dieser Gruppe gehören aber auch die tierischen Glucuronosyltransferasen (GT-1, GT-28 folgen dieser Faltung) [BOURNE & HENRISSAT, 2001].

4. UDP-Glycosyltransferasen (GT-1)

Heute unterteilt man die Glycosyltransferase-Multigenfamilie in 69 Untergruppen (GT-1 bis GT-69, siehe oben). Die erste dieser Untergruppen stellen die UDP-GlycosylTransferasen (UGTs, GlycosylTransferase Untergruppe-1 = GT-1) dar. Diese Gruppe ist ubiquitär vertreten (http://www.unisa.edu.au/pharm_medsci/Gluc_trans). Erste Bemühungen, die UDP-Glycosyltransferasen zu klassifizieren, stammen von Campbell [CAMPBELL et al., 1997]. Er machte sich von der *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (IUBMB) unabhängig, indem er für die Klassifikation der GTs nicht mehr nur deren Reaktionsmechanismus (*retainig / inverting*) und ihre Substratspezifität berücksichtigte, sondern auch deren Aminosäuresequenz. Die ursprüngliche Nomenklatur stieß, z.B. bei Enzymen mit gleicher Substratspezifität, an ihre Grenzen. Für seine Datenbanksuche dienten ihm 35 - bereits von IUBMB klassifizierte - NDP-Zucker-Glycosyltransferasen als *template*. Auf diese Weise wurden 555 Sequenzen analysiert. Eine Gruppe wurde definiert, wenn mindestens zwei Sequenzen mit signifikanter Homologie über eine Länge von 100 Aminosäuren auftraten und diese keine Homologie zu einer anderen Sequenz zeigten (er definierte so 26 Gruppen). Mackenzie definierte kurze Zeit später ein hochkonserviertes Sequenzmotiv am C-Terminus der UGTs, die Zuckerbindungsbox (PROSITE PS00375: siehe Abb. 8, <http://www.expasy.org/prosite/>) [MACKENZIE et al., 1997, Übersicht siehe PAQUETTE et al., 2003].

[FW] -x (2) -Q-x (2) - [LIVMYA] - [LIMV] -x (4, 6) - [LVGAC] - [LVFYA] - [LIVMF] - [STAGCM] - [HNQ] - [STAGC] -G-x (2) - [STAG] -x (3) - [STAGL] - [LIVMFA] -x (4) - [PQR] - [LIVMT] -x (3) - [PA] -x (3) - [DES] - [QEHN]

Abb. 8: Die Abbildung zeigt die von Mackenzie veröffentlichte Zuckerbindungsbox (prosite PS00375, <http://www.expasy.org/prosite/>). Diese Konsensussequenz basiert auf den phylogenetischen Untersuchungen von 555 pflanzlichen und tierischen UDP-Glycosyltransferasen.

Während UDP-Glucose und -Glucuronsäure die typischsten Donormoleküle für Glycosylierungsreaktionen sind, werden aber auch UDP-Rhamnose, -Xylose und -Galaktose beschrieben. In Glycosylierungsreaktionen werden reaktive und toxische Aglyca in stabilere, nichtreaktive Konjugate überführt, die als Speicherformen dienen können. Kürzlich konnte die Kristallstruktur einer GT-1 aufgeklärt werden, GtfB (Chloroeremomycin, *Amycolatopsis orientalis*) [siehe Abb. 9, MULICHAK et al., 2001].

Diese Glucosyltransferase überträgt die Glucose von UDP-Glucose auf die 4-OH-Phe-gly₄-Position von Vancomycinen. Dabei handelt es sich um Glycopeptidantibiotika, die effektiv gegen *gram positive* Bakterien wirken. Das Enzym hat eine zwei-Domänen-Struktur, sowie die oben beschriebene B-Faltung, mit einer tiefen Interdomänenkluft. Beide Domänen haben eine ähnliche Kernstruktur von β -Faltblättern, verbunden mit α -Helices.

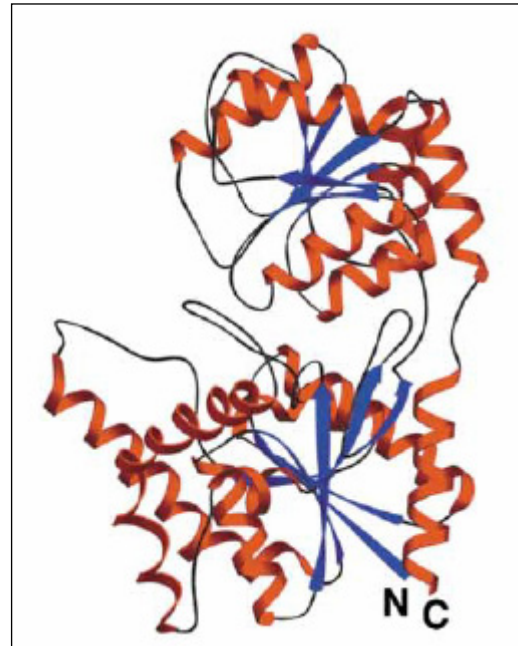


Abb. 9: Kristallstruktur der GT-1 GtfB (Chloroeremomycin, *Amycolatopsis orientalis*) [MULICHAK et al., 2001]

4.1. UGTs bei Pflanzen

Die pflanzlichen UGTs übertragen die Zuckerreste auf nahezu alle Klassen sekundärer Pflanzenstoffe (Phenole, Terpenoide, Cyanohydrine, Thiohydroximate, Alkaloide usw.). Die Glycosylierung erfolgt regioselektiv [LIM et al., 2003]. Sie sind in der Lage, eine große Palette unterschiedlicher Substrate zu akzeptieren [JONES et al., 1999].

Diese Enzyme sind NICHT zu verwechseln mit den Glucosyltransferasen, die 1. am Glycolipidstoffwechsel [JARVIS et al., 2000; JORASCH et al., 2000], 2. an der Stärkesynthese [MYERS et al., 2000], 3. an der Saccharose-Biosynthese [KEEGSTRA & RAIKHEL, 2001], 4. an der Zellwandsynthese [PERRIN et al., 2001] und 5. an der Modifikation von Glycoproteinen beteiligt sind [MAJEWSKA-SAWKA & NOTHNAGEL, 2000; SHOWALTER, 1993; SHOWALTER, 2001; zur Übersicht siehe KEEGSTRA & RAIKHEL, 2001].

Vergleicht man die pflanzlichen UGTs mit den nicht-pflanzlichen, so kann man erstere in drei distinkte Cluster teilen [PAQUETTE et al., 2003].

4.1.1. Funktion der UGT bei Pflanzen

Anthocyanglycoside

Die wohl am besten untersuchten Glycoside sind die der wasserlöslichen, in der Vakuole befindlichen Anthocyane [HOLTON & CORNISH, 1995]. Dort ist z.B. die Stabilisierung des Flavylium-Kations durch Glycosylierung für die anschließende Konjugation mit Acylgruppen notwendig [VOGT & JONES, 2000]. Studien mit Weinmutanten (*Vitis vinifera*) zeigten, dass die Abwesenheit der Anthocyanglycosyltransferase zur Akkumulation des farblosen Flavylium-Kations führt [FORD et al., 1998].

Glucosinolate und cyanogene Glucoside

Bei Glucosinolaten und cyanogenen Glucosiden führt das Anhängen der Glucose zur erhöhten Stabilität der Metabolite und verhindert so die spontane Degradierung zu HCN und entsprechenden Aldehyden bzw. Isothiocyanaten (am Beispiel des cyanogenen Glucosids Dhurrin bei *Sorghum bicolor* am besten untersucht) [KAHN et al., 1997]. Die Hydrolyse der cyanogenen Glucoside, katalysiert durch β -Glucosidasen und α -Hydroxynitrilasen, führt zur Freisetzung des toxischen HCN, welches in der Pathogenabwehr eine wichtige Rolle spielt [VOGT & JONES, 2000]. Eine erhöhte Konzentration cyanogener Glycoside bei Gerste z.B. führte zu einer eingeschränkten Resistenz gegen Pilze [JONES et al., 1999]. Das heißt, die Glycosylierung verhindert auf der einen Seite die Speicherung toxischer Metabolite, auf der anderen Seite ermöglicht sie die Speicherung potentiell toxischer Substanzen [JONES & VOGT, 2000].

UGTs induziert durch Pathogene / Herbivoren

Resistenz von Pflanzen gegenüber Pathogenen ist oft mit einer *hypersensitive response* (HR) assoziiert. Die HR ist durch Bildung von nekrotischen Läsionen an der Infektionsseite charakterisiert, wodurch eine Ausbreitung des Pathogens verhindert wird. Frühe Zeichen einer HR sind, 1. die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies, 2. der Ionen *flux* über die Plasmamembran und 3. die Produktion von Signalmolekülen wie z.B. Salicylsäure (SA), welche *defence-related*-Gene kontrolliert.

Eines dieser durch Salicylsäure kontrollierten Gene ist eine Glucosyltransferase, die in Tomatenblättern (Tw1) 15 min nach einem mechanischen Reiz oder einer Infektion detektiert werden kann. Der Unterscheid zu anderen Wund-*response*-Genen besteht darin, dass diese Expression von Systemin, Jasmonsäure (JA) und Ethylen unabhängig ist [O'DONNELL et al., 1998].

Ähnliche Gene, die hohe Homologie zu Glucosyltransferasen haben, konnten kurze Zeit später auch aus Tabak isoliert werden (togt1 und 2). Dort wird die Genexpression auch durch SA [TAGUSHI et al., 2001] und Pilz-*Elicitoren*, sowie durch avirulente Pathogene induziert. Heterologe Expression in

E. coli zeigte eine hohe Aktivität dieser Enzyme gegenüber hydroxylierten Cumarinen (Scopoletin) und (Hydroxy)-Zimtsäuren [FRAISSINET-TACHET et al., 1998]. Ein weiteres Indiz dafür, dass diese Enzyme wesentlich an der HR beteiligt sind, zeigten Experimente an Tabakpflanzen, in denen die TOGT-Expression unterdrückt wird. Nach der Inokulation mit TMV zeigten die Pflanzen keine Glucosidakkumulation, was mit einer schwächeren Resistenz gegenüber TMV verbunden war [CHONG et al., 2002]. Benzoxazinoidacetalglucoside sind die Hauptverbindung, die für die chemische Abwehr bei Gräsern (Mais, Weizen und Roggen) verantwortlich sind. Zu dieser Gruppe gehören z.B. DIBOA (2,4-Dihydroxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-on) aus Roggen und sein 7-Methoxyl-Derivat DIMBOA (2,4-Dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-on) aus Weizen und Mais. Der letzte Schritt der Biosynthese dieser beiden Verbindungen ist ihre Glucosylierung an der C2-Position durch die Glucosyltransferasen BX8 und BX9. Diese Enzyme sind sehr substratspezifisch [VON RAD et al., 2001].

Pflanzenhormone

Auch Pflanzenhormone können glycosyliert werden. Indol-3-essigsäure (IAA) z.B. kann in freier, aber auch in an Aminosäuren, Peptiden, Proteinen oder Zucker konjugierter Form vorliegen. IAGLU ist die Glucosyltransferase, die in Mais 1-O-Indolacetylglucoseester (IAGlc) produziert [SZERSZEN et al., 1994]. Dieser Glucoseester ist ein Intermediat in der IAA-Myoinositol synthese, eine Speicherform des Hormons. Auch IAA-Myoinositol kann seinerseits wieder glycosyliert werden. Alle diese Speicherformen dienen dazu, die Konzentration an freier IAA schnell und fein regulieren zu können. Kürzlich konnte ein homologes Gen aus *Arabidopsis thaliana* identifiziert werden (ugt84b1) [JACKSON et al., 2002].

Cytokinine sind Pflanzenhormone, beteiligt an Zellteilungs- und Differenzierungsprozessen. Natürlich vorkommende Cytokinine sind Adeninderivate mit einer N⁶-Isoprenoidseitenkette. Zeatin ist ein hoch aktives Cytokinin. Die *trans*-hydroxylierte Isoprenoidseitenkette ist für die Cytokininaktivität von besonderer Bedeutung. Um einem Angriff durch degenerative Enzyme zu entgehen, wird diese Seitenkette entweder reduziert zu Dihydrozeatin oder O-glycosyliert (entweder durch Glucosyl- [MARTIN et al., 1999-b] oder durch Xylosyltransferasen [MARTIN et al., 1999-a]). Dihydrozeatin ist selber aktiv, das Zeatinglucosid hingegen dient als Transport- und Speicherform des Zeatins.

Salicylsäure wird ebenfalls glycosyliert; das 2-O-β-D-Glucosid ist das dominante Konjugat in Tabak. Es befindet sich vor allem in der nekrotischen Läsion. Die SA-Glucosyltransferase (SAG) konnte erst kürzlich isoliert und charakterisiert werden. Die Enzymaktivität ist in pathogeninduzierten Blättern erhöht [LEE & RASKIN, 1999]. Das Homolog dieses Gens konnte auch in *A. thaliana* gefunden werden [LIM et al., 2002].

Glycosylierung von Phenylpropanoiden

Glucosyltransferasen katalysieren die Synthese von 1-*O*-Sinapoylglucose und Sinapoylalkohol-4-*O*-glucosid, letzteres wird zu den Syringyleinheiten des Lignins [LIM et al., 2001]. 1-*O*-Sinapoylglucose wird zu Sinapoylmalat oder Sinapoylcholin umgesetzt. Sinapoylmalat soll die Epidermis von *A. thaliana* z.B. gegen UV-Strahlung schützen und Sinapoylcholin ist die Speicherform der Sinapinsäure, die vor allem während der Keimung benötigt wird [LANDRY et al., 1995].

Beispiele für Xenobiotika-Detoxifikation, katalysiert durch UGTs

Die Glycosylierung beschränkt sich nicht nur auf endogene Substrate, sondern dient auch der Detoxifikation exogener Substanzen (Xenobiotika) [SANDERMANN, 1994]. Es gibt Berichte, in denen pflanzliche Glucosyltransferasen erfolgreich Xenobiotika (wie z.B. 2,4,5-Trichlorophenol (TCP), Pentachlorophenol, chlorierte Aniline oder Herbizidmetabolite wie 6-Hydroxybentazon) entgiften können [BRAZIER et al., 2002]. In einer neuen Untersuchung wurden sieben Glucosyltransferasen, aus *A. thaliana* auf ihre Aktivität hin getestet, die exogene phytotoxische Substanz TCP (2,4,5,-Trichlorophenol) zu entgiften [MESSNER et al., 2003].

Auch bei Tabak konnten heterolog exprimierte Glucosyltransferasen (NtGT1a, NtGT1b und NtGT3) exogene Verbindungen, wie z.B. Naphthole, entgiften [TAGUCHI & NAKAMURA, 2003].

Auch Herbizide, wie Chlorsulfuron (CS) [BARTHOLOMEW et al., 2002] oder Hydroxyprimisulfuron [KLEIN et al., 1996], konnten glucosyliert werden.

4.1.2. Bereits charakterisierte pflanzliche UGTs

Die erste Glucosyltransferase bei Pflanzen wurde aus Mais isoliert, der *bronze* Lokus. Das Genprodukt stellt eine UDP-Glucose-Flavonol-3-*O*-Glucosyltransferase dar. Sie katalysiert den letzten Schritt der Flavonol- und wahrscheinlich der Anthocyanbiosynthese, die Addition von Glucose an die 3-Hydroxylgruppe des Flavonoids [RALSTON et al., 1988]. Bald konnten weitere Homologe dieses Enzyms aus anderen pflanzlichen Organismen isoliert werden (siehe Tabelle). Auch Proteine, die die Zucker an andere Positionen der Aglyca addieren, konnten bald isoliert werden, z.B. eine Anthocyan-5-*O*-Glucosyltransferase aus *Perilla frutescens* [YAMAZAKI et al., 1999], eine Betanidin-5- bzw. 6-*O*-Glucosyltransferase aus *Dorotheanthus bellidiformis* [VOGT et al., 1999; VOGT, 2002] und schließlich eine Baicalein-7-*O*-Glucosyltransferase aus *Scutellaria baicalensis* [HIROTANI et al., 2000]. Es gibt auch Sekundärstoff-Glucosyltransferasen, die nicht UDP-Glucose als Cosubstrat verwenden, wie z.B. die Flavonol-3-*O*-Galactosyltransferase von *Petunia hybrida* [MILLER et al., 1999] (siehe Tabelle 1, sie zeigt eine Zusammenfassung der biochemisch und molekularbiologisch charakterisierten UDP-Glucosyltransferasen, die bis heute veröffentlicht werden konnten).

UGT	Synonym	Spezies	Gen-Bank™ Nummer	Swiss Prot Nummer	Ref.	Haupt-aglycon-substrat	Produkte
	UDP-Glucose-Sterolglucosyltransferase (ATSGT)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Z83833		Warnecke et al., 1997	Sterole (βSitosterol, Stigmasterol, Cholesterol, Ergosterol)	Sterylglucoside
84B1	Indolessigsäureglucosyltransferase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AC002391		Jackson et al. 2001	Indolessigsäure	Indolessigsäureglucosid (1-O-IAGlc)
	UDP-Glucose-Sterolglucosyltransferase (ASSGT)	<i>Avena sativa</i>	Z83832	O22678	Warnecke et al., 1997	Sterole	Sterylglucoside
	Limnoid-UDP-Glucosyltransferase (CitLGT)	<i>Citrus unshiu</i> Marc.	AB033758	Q9MB73	Kita et al., 2000	Limnoid(e)	Limnoidglucoside
	Betanidin-5-O-Glucosyltransferase (B5GT)	<i>Dorotheanthus bellidiformis</i>	Y18871	Q9SMG6	Vogt et al. 1999	Betanidin	Betanidin-5-O-glucosid
	Betanidin-6-O-Glucosyltransferase (6GT)	<i>Dorotheanthus bellidiformis</i>	AF374004		Vogt, 2002	Betanidin	Betanidin-6-O-glucosid
78B1	Flavonoid-3-O-Glucosyltransferase (UF3GT)	<i>Gentiana triflora</i>	D85186	Q96493	Tanaka et al., 1996	Flavonole	Flavonole-3-O-glucoside
	UDP-Glucose-Anthocyan-3'-O-Glucosyltransferase	<i>Gentiana triflora</i>	AB076697		Fukuchi-Mizutani et al., 2003	Anthocyanidine	Gentiodelphin
	Flavonoid-O-3-Glucosyltransferase	<i>Hordeum vulgare</i>	X15694	P14726	Wise et al., 1990	Flavonole	Flavonole-3-O-glucoside
	Glucosyltransferase (NtGT1a)	<i>Nicotiana tabacum</i>	AB052557		Taguchi et al., 2001	Scopoletin	Scopolin
	Glucosyltransferase (NtGT1b)	<i>Nicotiana tabacum</i>	AB052558		Taguchi et al., 2001	Scopoletin	Scopolin
73A1	Phenylpropanoidglucosyltransferase (TOGT1)	<i>Nicotiana tabacum</i>	U32644	P93365	Fraissinet-Tachet et al., 1998	Cumarine	Scopolin, Esculin
73A2	Phenylpropanoidglucosyltransferase (TOGT2)	<i>Nicotiana tabacum</i>	U32643	P93364	Fraissinet-Tachet et al., 1998	Cumarine	Scopolin, Esculin
	UDP-Glucose-Salicylsäureglucosyltransferase (SA-GTase / SAGT)	<i>Nicotiana tabacum</i>	AF190634	Q9M6E7	Lee & Raskin, 1999	Salicylsäure	Glucoseester
75 A1	UDP-Glucose-Hydroxycumarin-7-O-Glucosyltransferase (CGTase)	<i>Nicotiana tabacum</i>	AB000623		Taguchi et al., 2001	Scopoletin	Scopolin
	Flavonoid-3-O-Glucosyltransferase (PfF3GT)	<i>Perilla frutescens</i>	AB002818	O04114	Gong et al., 1997	Anthocyanidine	Anthocyan-3-O-glucosid
	Anthocyan-5-O-Glucosyltransferase (A5GT)	<i>Perilla frutescens</i>	AB013596	Q9ZR27	Yamazaki et al., 1999	Anthocyanidine	Anthocyan-3,5-O-di-glucosid
	Anthocyan-3-O-Glucosyltransferase (PGT8 / PhF3GT)	<i>Petunia hybrida</i>	AB027454	Q9SBQ3	Yamazaki et al., 2002	Anthocyanidine	Anthocyan-3-O-glucosid
	Anthocyan-5-O-Glucosyltransferase (PH1)	<i>Petunia hybrida</i>	AB027455	Q9SBQ2	Yamazaki et al., 2002	Anthocyanidine	Anthocyan-5-O-glucosid
	Zeatin-O-β-Glucosyltransferase (ZOG1)	<i>Phaseolus lanatus</i>	AF101972	Q9ZSK5	Martin et al., 1999-b	Zeatin	Zeatin-O-glucosid
	Solanidinglucosyltransferase (SGT)	<i>Solanum tuberosum</i>	U82367		Moehs et al., 1997	Solanidin	α-Chaconine
	UDP-Glucose-Baicalein-7-O-Glucosyltransferase (UBGT / 7FGT)	<i>Scutellaria baicalensis</i>	AB031274	Q9SXF2	Hirotsu et al., 1999	Baicalein	Baicalein-7-O-glucosid

	UDP-Glucose p-Hydroxymandelo- nitril-O- Glucosyltransferase (HMNGT)	<i>Sorghum bicolor</i>	AF199453	Q9SBL1	Jones et al., 1999	Hydroxymandel onitril	Dhurrin
	Anthocyan-5-O- Glucosyltransferase	<i>Verbena</i>	AB013598	Q9ZR25	Yamazaki et al., 1999	Anthocyanidine	Anthocyan-5- O-glucosid
	Flavonoidglycosyl- transferase (UFGlyT)	<i>Vigna mungo</i>	AB012114	Q9ZWQ5	Mato et al., 1998	Flavonole	Flavonole-3- O-glucoside
	Flavonoid-3-O- Glucosyltransferase	<i>Vitis vinifera</i>	AF000371	O22303	Ford et al., 1998	Anthocyanidine, Flavonole	Anthocyan- (Flavonole)-3- O-glucosid
	Flavonoid-3-O- Glucosyltransferase (UF3GT)	<i>Vitis vinifera</i>	AF000372	O22304	Ford et al., 1998	Anthocyanidine, Flavonole	Anthocyan- (Flavonole)-3- O-glucosid
	Flavonoid-3-O- Glucosyltransferase 1	<i>Zea mays</i>	AF448416	P16165	Ralston et al., 1988	Anthocyanidine, Flavonole	Anthocyan- (Flavonole)-3- O-glucosid
77A1	Flavonoid-3-O- Glucosyltransferase 2	<i>Zea mays</i>	X13500	P16166	Ralston et al., 1988	Anthocyanidine, Flavonole	Anthocyan- (Flavonole)-3- O-glucosid
	Flavonoid-3-O- Glucosyltransferase 3	<i>Zea mays</i>	X13502	P16167	Ralston et al., 1988	Anthocyanidine, Flavonole	Anthocyan- (Flavonole)-3- O-glucosid
74A1	Indol-3-Acetat- β - Glucosyltransferase (IAGLU)	<i>Zea mays</i>	L34847	Q41819	Szerszen et al., 1994	Indolessigsäure	Indolessig- säure- glucosid
	UDP-Galaktose- Flavonoid-3-O- Galaktosyltrans- ferase (F3GalTase)	<i>Petunia hybrida</i>	AF165148	Q9SBQ8	Miller et al., 1999	Flavonole	Flavonol-3-O- galaktoside
93A1	Zeatin-O- β - Xylosyltransferase (ZOX1)	<i>Phaseolus vulgaris</i>	AF116859	P56725	Martin et al., 1999-a	Zeatin	Zeatin-O- xyloside
	Flavonoid-3-O- Galaktosyltrans- ferase	<i>Vigna mungo</i>	AB009370	Q9ZWS2	Mato et al., 1998	Flavonole	Flavonol-3-O- galaktoside

Tabelle 1: Zusammenfassung der biochemisch und molekularbiologisch charakterisierten UDP-Glycosyltransferasen, die bis heute veröffentlicht wurden (hell grau: Glucosyltransferasen, dunkel grau: andere Zuckertransferasen).

4.1.3. UGTs bei *Arabidopsis thaliana*

Bei den drei Hauptflavonoiden von *Arabidopsis thaliana* handelt es sich um Kämpferolglycoside [VEIT & PAULI, 1999]. Durch die vollständige Sequenzierung des Modellorganismus war es möglich, die komplette UGT-Familie zu erfassen. Der Datenbanksuche diente die Aminosäurekonsensussequenz (siehe Abb. 8) der UDP-Glycosyltransferasen [PROSITE, ExPASy homepage]. Es kam zur Identifizierung von 112 putativen UGT-Genen und 8 Pseudogenen [PAQUETTE et al., 2003; ROSS et al. 2001, LI et al., 2001]. Die Gene fallen in 14 distinkte Gruppen (A-N). Sie sind über das ganze Genom verteilt und meist in Clustern von 2-7 Genen angeordnet. Die Gene innerhalb der Cluster zeigen eine sehr hohe Aminosäurehomologie untereinander. Sie enthalten bis zu zwei Introns, die meisten jedoch enthalten keines (58 von 107). Ihre Länge beträgt 435 bis 507 Aminosäuren. Die Homologie variiert zwischen 30 und 95% [BOWLES, 2002]. Die aminoternale Sequenz variiert stärker als die carboxyterminale (genauer siehe unten) [HENRISSAT et al., 2001]. Innerhalb der Säuger-UGTs wurden zwei Motive beschrieben, die für deren ER-Membran-Lokalisation verantwortlich sein dürften, die C-terminale

Transmembransequenz und N-terminale Signalsequenz. Beide Regionen wurden bei *Arabidopsis thaliana* NICHT gefunden (Analyse mit TopPred2, SignalP, Psort), was die cytoplasmatische Lokalisation der pflanzlichen UGTs aus früheren Berichten bestätigt [LI et al., 2001]. Aufgrund der schon publizierten Substratspezifitäten anderer UGTs können den verschiedenen Untergruppen putative Substrate zugeordnet werden.

4.2. UGT bei Tieren

Viele putative Glycosyltransferasen von *Drosophila melanogaster* konnten bereits veröffentlicht werden. Biochemisch charakterisiert sind bis heute vier Glycosyltransferasen, die für die N-Glycan-Synthese wichtig sind: die α -Mannosidase I und II, β 1,2-N-Acetylglucosaminyltransferase I und eine α 1,3-Fucosyltransferase. Sie gehören nicht zur Gruppe GT-1, obwohl auch in dieser Gruppe viele Homologe detektiert werden konnten [GUSTAV & WILSON, 2001; KIM et al., 2003].

Auch in *Cenorhabditis elegans* gibt es Glycosyltransferasen. Die UDP-N-Acetyl-D-glucosamin: α -3-D-mannosid- β -1,2-N-acetylglucosaminyltransferase I konnte kürzlich charakterisiert werden. Sie ist essentiell für die Bildung von hybriden und komplexen N-Glycanen [ZHANG et al., 2003]. Beim Menschen sind nahezu alle UGTs Glucuronosyltransferasen (siehe nächstes Kapitel).

5. Glucuronosyltransferasen beim Menschen

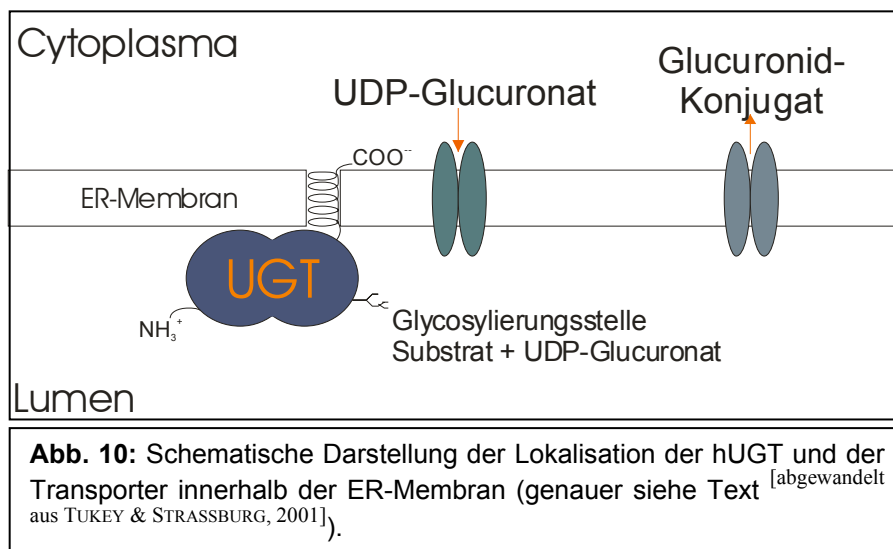
Glucuronidierung ist der Hauptdetoxifikationsweg in Vertebraten. Die humanen UDP-Glucuronosyltransferasen (hUGTs, Nomenklatur siehe unten) sind membrangebundene Enzyme, verantwortlich für den Transfer einer Glucuronsäure auf eine große Anzahl biologisch und pharmakologisch aktiver endogener und exogener Moleküle wie: Steroide [ALBERT et al., 1999; LEVESQUE et al., 2001; BARBIER et al., 1999], Gallensäuren, Bilirubin, Hormone [ANTONIO et al., 2003], Xenobiotika, Medikamente [BOCK, 2003], Umweltgifte, Carcinogene [KONDOH et al., 1999] usw. [zur Übersicht siehe TUKEY & STRASSBURG, 2000].

Anmerkung zur Nomenklatur: Nach der heute gültigen Nomenklatur bezeichnet man die **UDP-GlycosylTransferasen** (die Untergruppe 1 der **GlycosylTransferasen**, (**GT-1**) als **UGTs**. Dies ist nicht zu verwechseln mit den in der Literatur beschriebenen humanen UGTs (damit sind die **UDP-GlucuronosylTransferasen** gemeint). Diese gehören auch zur Gruppe der UGTs (GT-1), sollten aber noch extra als solche, die als Cosubstrat UDP-Glucuronsäure verwenden, gekennzeichnet werden. Zu dieser Überschneidung kam es, da in Säugern fast immer Glucuronsäure übertragen wird, eine Spezifikation also, die nicht dringend nötig war. Um Verwechslungen zu vermeiden, werden im folgenden Text die humanen UDP-Glucuronosyltransferasen als **hUGTs** bezeichnet.

5.1. Lokalisation und Struktur der hUGTs

Von allen tierischen Organen ist die Leber das, in dem die meisten Glucuronidierungen stattfinden. In den letzten Jahren stellte sich jedoch heraus, dass auch andere Gewebe in der Lage sind, endogene und exogene Verbindungen zu entgiften, wie z.B. die Niere [PARQUET et al., 1985], die Lunge und das olfaktorische Epithel [JEDLITSCHKY et al., 1999], das Gehirn [NAGANO et al., 2000], das Fettgewebe [BEAULIEU et al., 1998], die Prostata [BARBIER et al., 2000; GUILLEMETTE et al., 1997], die Brust [ROY et al., 1992], und der Gastrointestinaltrakt [TUKEY & STRASSBURG, 2001; HUANG et al., 2002].

Die Substrate der hUGTs gelangen entweder durch passive Diffusion oder durch ATP-abhängige Transporter der MRP-Familie (*multidrug resistant proteins*) in die Zelle [LOE et al., 1996]. Die hUGTs durchspannen die Membran des endoplasmatischen Retikulums, wobei sich deren *active site* im Lumen des ERs befindet. Durch die Produktion des Cosubstrats im Cytoplasma verlangt die Lokalisation der *active site* zwei Transporter, einen, der die UDP-Glucuronsäure ins Lumen transportiert, und einen, der das glucuronidierte Produkt ausschleust (siehe Abb. 10).



UGTs können z.B. durch Flavonoide wie Chrysin, Acacetin, Apigenin, Luteolin und Diosmetin induziert [WALLE & WALLE, 2002] und durch endogene Verbindungen wie Hormone, Coenzym A und Nukleotide, sowie durch exogene Verbindungen wie z.B. das Antibiotikum Novobiocin, das eine Hyperbilirubinämie induziert, gehemmt werden [GRANCHAROV et al., 2001]. Aber auch industrielle Gifte wie Pestizide und Schwermetalle können die UGT hemmen [GRANCHAROV et al., 2001]. Die Glucuronidierung verläuft regioselektiv. Dies konnte am Beispiel der Glucuronidierung von Luteolin gezeigt werden: je nach Isoenzym wurden entweder Luteolin 7-O-Glucuronide bzw. Luteolin 4'-O- oder 3'-O-Glucuronide produziert [BOERSMA et al., 2002].

Bis jetzt konnte noch keine Glucuronosyltransferase, die an Detoxifikationsprozessen beteiligt ist, kristallisiert werden (sie dürften Homologie zur oben beschriebenen GT-1 haben). Es konnte

jedoch eine an der Biosynthese der Glycosaminoglycane beteiligte, der Gruppe GT-47 zugehörige Glucuronosyltransferase kürzlich kristallisiert werden [OUZZINE et al., 2002; PEDERSEN et al., 2002].

5.2. UGT1 und UGT2

Durch den Vergleich der Aminosäuresequenz 26 verschiedener hUGTs teilte BURCHELL et al. 1991 die Glucuronosyltransferasen in zwei Familien ein, UGT1 und UGT2. Diese Unterteilung konnte man bereits aufgrund der Substratspezifitäten vornehmen, Enzyme der Gruppe UGT1 metabolisieren eher Phenole oder Bilirubin, wohingegen es sich bei denen der Gruppe UGT2 um die steroidmetabolisierenden Isoformen handelte.

Allen gemeinsam ist das bereits oben beschriebene Zuckerbindungsmotiv (Konsensussequenz PS300375, siehe Abb. 11). Des weiteren haben sie alle eine Länge von 526 bis 533 Aminosäuren. Generell kann man die Proteine in zwei fast gleich große Teile einteilen, die variable Region am N-Terminus, wo die Substratbindungstelle ist, und eine konservierte Region am C-Terminus, wo sich die Zuckerbindungsdomäne befindet. Die meisten hUGTs tragen eine hydrophobe Signalsequenz und eine stark hydrophobe Region, welche für Transmembranproteine charakteristisch ist [TUKEY & STRASSBURG, 2001].

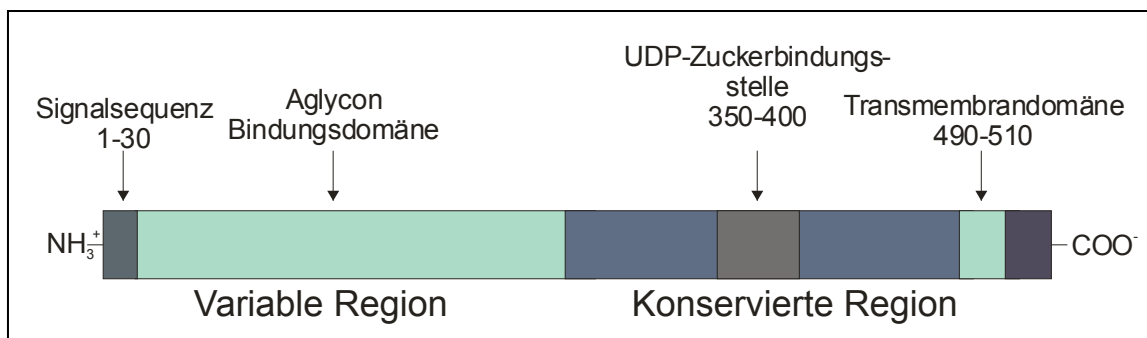


Abb. 11: zeigt die variable Region am N-Terminus (Substratbindung), die konservierte Region am C-Terminus (Zuckerbindung), die Signalsequenz und die Transmembrandomäne [abgewandelt aus TUKEY & STRASSBURG, 2001].

Des weiteren scheint es eine noch wenig untersuchte Dimerisierungsdomäne am Aminoterminus zu geben. Die am besten untersuchte Glucuronosyltransferase ist die UGT1A1, sie katalysiert die Bildung des Bilirubin-Diglucuronids aus Bilirubin (Produkt des Häm-Katabolismus).

Alle UGT1 haben einen identischen C-Terminus, kodiert durch Exon 2-5 und einen unterschiedlichen N-Terminus, dargestellt durch 13 verschiedenen Exons 1. Diese werden durch jeweils unterschiedliche Promotoren reguliert [GONG et al., 2001]. Manche Gene haben zwei unterschiedliche Promotoren, die die Expression in unterschiedlichen Geweben regulieren, wie z.B bei der Phenol-UGT1A6 [AUYEUNG et al., 2003], die einen Promotor für die Expression im hepatischen

Gewebe, im Gastrointestinaltrakt und in der Niere und einen für die Expression in anderen Geweben hat. Der erste wird durch den Transkriptionsfaktor *hepatic nuclear factor 1* (HNF1) reguliert [GREGORY & MACKENZIE, 2002].

Die Gene der Gruppe 2 sind in *clustern* im Genom angeordnet, jedes Protein stammt von einer anderen mRNA [KING et al., 2000].

5.3. Defekte in der UGT Expression

5.3.1. Crigler-Najjar-Syndrom (CNS)

Patienten mit dem CNS leiden unter einer Akkumulation von nicht konjugiertem Bilirubin (Hyperbilirubinämie), verursacht durch eine defekte Bilirubin-UDP-Glucuronosyltransferase (B-UGT). Dies führt zu einem intrahepatischen Ikterus sowie zu einer Akkumulation von zytotoxischem Bilirubin in den Ganglienzellen des Stammhirns beim Neugeborenen, den Nervenendigungen und den Gliazellen. Man unterscheidet CNS Typ I und II. Bei Typ I liegt aufgrund einer Deletion oder der Einführung eines Stopcodons kein B-UGT Transkript vor. Typ II weist eine Mutation in Exon 1 auf, was zu einer eingeschränkten Substraterkennung führt [JANSEN, 1999].

5.3.2. Gilbert-Syndrom

Patienten mit dem Gilbert-Syndrom leiden aufgrund einer Reduktion der hepatischen Glucuronidierung unter einer milden chronischen Hyperbilirubinämie ohne Krankheitswert. Sie haben ein intaktes UGT-Gen, jedoch der für die korrekte Expression benötigte Promotor weist innerhalb seiner TATA-Box zwei Basen (TA) mehr auf. Dies führt zu einer reduzierten Expression, was in Luciferase-*assays* bestätigt werden konnte [BOSMA et al., 1995].

6. Glucuronosyltransferasen bei Pflanzen

6.1. Sekundärstoffwechsel-Glucuronosyltransferasen

Trotz der enormen Fülle an Flavonoidglucuroniden, die innerhalb der letzten Jahre aus Pflanzen wie *Elodea canadensis*, *Centaurea cyanus*, *Holmskioldia sanguinea*, *Bucegia romanica*, *Torilis arvensis*, *Digitalis lanata*, *Fuchsia excorticata*, *Cyperus polystachyos*, *Tamarix nilotica*, *Spinacia oleracea*, *Hibiscus vitifolius*, *Malva sylvestris* [HARBORNE & WILLIAMS, 1988] isoliert werden

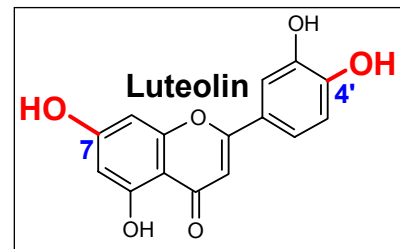


Abb. 12: Haupt-Flavonaglycon von Roggen-Mesophyllzellen.

konnten, gibt es kaum Berichte über die für ihre Biosynthese nötigen Glucuronosyltransferasen. Bei den aus Roggenprimärblättern stammenden Flavonoiden handelt es sich um Luteolinglycoside (Luteolin siehe Abb. 12, 13), die im Primärblatt gewebe- und entwicklungsabhängig akkumulieren (siehe unten und Abschnitt 1) [SCHULZ et al., 1985]. Glucuronide des Luteolins treten aber auch bei anderen Pflanzen wie *Salvia officinalis* [LU & FOO, 2000] und *Rosmarinus officinalis* auf [OKAMURA et al., 1994].

Bei den pflanzlichen Glucuronosyltransferasen handelt es sich um Enzyme, die, wie die Säuger-UGTs, zur Detoxifikation endogener und vermutlich auch exogener Metabolite dienen (die Luteolinglucuronide akkumulieren in der Vakuole). Da diese Aufgabe bei Pflanzen eher den Glucosyltransferasen zugesprochen wurde, lässt eine Isolierung der für diese Proteine kodierenden Gene noch auf sich warten. Auch hier ist es wichtig, diese Enzyme, die zur Gruppe der UGT (GT-1) gehören, von den übrigen pflanzlichen Glucuronosyltransferasen (es liegt noch keine veröffentlichte Sequenz vor, siehe unten) zu unterscheiden.

Bisher konnten aus drei pflanzlichen Organismen Glucuronosyltransferasen isoliert werden, deren Funktion darin besteht, endogene Metabolite in ihre wasserlösliche Form zu überführen [SCHULZ & WEISSENBÖCK, 1988; NAGASHIMA et al., 2000; KUROSAWA et al., 2002] (siehe aber auch unten Anmerkung zur UDP-Glucuronosyltransferase aus *Pisum sativum* [WOO et al., 1999] und Ergebnisteil). Alle drei konnten leider nicht bis zur 'sequenzierbaren' Reinheit aus dem Rohextrakt isoliert werden, weswegen bis heute keine Aminosäuresequenz eines dieser Proteine vorliegt.

Erste Berichte über eine Teilreinigung dieser Enzyme stammen von Roggenprimärblättern. Dort wurden die Luteolin-Mono-, -Di- und -Triglucuronide N , R_2 bzw. R_1 beschrieben (siehe Abb. 13), deren Synthese katalysiert wird durch die UGTs LGT, LMT und LDT (N = Luteolin-7-*O*- β -D-glucuronid, R_2 = Luteolin-7-*O*-[β -D-glucuronosyl (1 \rightarrow 2)]- β -D-glucuronid, und R_1 = Luteolin-7-*O*-[β -D-glucuronosyl (1 \rightarrow 2)]- β -D-glucuronid-4'-*O*- β -D-glucuronid [SCHULZ et al., 1985], **LGT** = UDP-Glucuronat:Luteolin-7-*O*-Glucuronosyltransferase, **LMT** = UDP-Glucuronat:Luteolin-7-*O*-glucuronid-Glucuronosyltransferase, **LDT** = UDP-Glucuronat:Luteolin-7-*O*-diglucuronid-4'-*O*-

Glucuronosyltransferase [SCHULZ & WEISSENBOCK, 1988] (Ob es sich hierbei wirklich um drei Enzyme handelt, wird im Ergebnis- bzw. Diskussionsteil besprochen).

Später wurde eine Glucuronosyltransferase aus der Heilpflanze *Scutellaria baicalensis* teilgereinigt und biochemisch charakterisiert [NAGASHIMA et al., 2000]. Die große Bedeutung der getrockneten Wurzeln dieser Pflanze für die chinesische Medizin ist auf ihr Hauptflavonoid Baicalin, welches antiallergische-, antineoplastische- und anti-HIV-Effekte haben soll, zurückzuführen. Die UDP:Glucuronat-Baicalein-7-O-Glucuronosyltransferase [UBGAT = diese wird im folgenden als *Scutellaria baicalensis* UDP-Glucuronosyltransferase

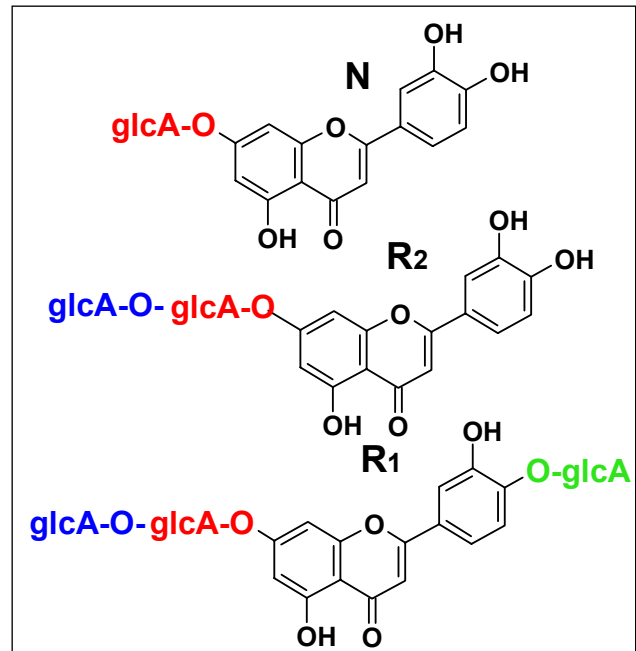


Abb. 13: Flavonoide der Roggenprimärblätter: **N** = Luteolin-7-O-β-D-glucuronid, **R₂** = Luteolin-7-O-[β-D-glucuronosyl (1→2)]-β-D-glucuronid, und **R₁** = Luteolin-7-O-[β-D-glucuronosyl (1→2)]-β-D-glucuronid]-4'-O-β-D-glucuronid

(sbUGT) bezeichnet] katalysiert den Transfer von Glucuronsäure, ausgehend von UDP-Glucuronat, auf die 7-OH-Gruppe des Baicaleins; das Produkt ist Baicalin.

Die in Soja vorkommenden Sojasapogenol-A-, -B-, -E- und 2,3-Dihydro-2,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-on (DDMP)-Glucuronide werden mittels der membrangebundenen Glucuronosyltransferase *UDP-glucuronic acid:soyasapogenol glucuronosyltransferase* (UGASGT) synthetisiert. Die entstehenden Saponine sind alle an der C3-Position glucuronidiert. Die Spezifität der transferierten Zuckersäure ist sehr hoch und die Akzeptanz des Enzyms für andere Substrate wie z.B. Flavonoide gering.

Bei allen fünf oben beschriebenen Enzymen dürfte es sich aufgrund ihrer Funktionen und ihrer Substratspezifitäten um Enzyme der Gruppe GT-1 handeln, obwohl dies noch durch keine Aminosäuresequenz bestätigt werden konnte.

Anmerkung zur UDP-Glucuronosyltransferase aus *Pisum sativum*: Kürzlich konnte eine putative Glucuronosyltransferase (*Pisum sativum* UDP-Glucuronosyltransferase 1 = PsUGT1), die an Zellteilungs- und Differenzierungsprozessen beteiligt ist, isoliert werden. Sie wird in Wurzelhaube schon 5 min nach Induktion der Mitose exprimiert. Das Protein konnte heterolog exprimiert werden (in *Neurospora crassa* unter der Kontrolle des *N. crassa* cpc-1- (*cross pathway control*) Promotors) und der Enzymassay etabliert werden. Dabei war es möglich, glucuronidierte Produkte zu detektieren. Leider ist die Validität dieses Ergebnisses nicht ganz geklärt, da sowohl die Publikation als auch die DNA- bzw. Proteinsequenz am Anfang unseres Projektes nicht mehr zugänglich war. Mittlerweile ist die Proteinsequenz wieder in der Datenbank erhältlich (*accession* AF034743), aber die Kommission zur Klassifizierung der UDP-Glycosyltransferasen (CAZY *homepage*) war bis jetzt noch nicht bereit, die Sequenz in die Liste der putativen UGT Gene aufzunehmen.

6.2. Andere Glucuronosyltransferasen (GT-47)

Eine Glucuronosyltransferase, die nicht zur Gruppe GT-1 gehört und die an der Pektinbiosynthese beteiligt ist, konnte kürzlich aus Tabak isoliert werden. Man vermutet, dass Pektin eine wichtige Rolle beim interzellulären *attachment* innerhalb der Morphogenese vielzelliger Organismen einnimmt. Pektin besteht aus Homogalacturonanen (HRs) und aus hoch verzweigten Rhamnogalacturonanen I und II. Die Biosynthese von HR, RGI und II erfordert mindestens 41 unabhängige Glycosyltransferasen ^[RIDLEY et al., 2001]. Es gibt eine T-DNA Mutante von *Nicotiana plumbaginifolia* (*nolac-H18 = non organogenic callus with loosely attached cells*), die ihre Fähigkeit des festen Zellzusammenhalts verloren hat. Dies basiert auf einem Defekt in den Glucuronsäuren des RGIIs, was zu einer reduzierten Bildung von Borat-Brücken und somit zu einer schlechten Vernetzung von HR, RGI und RGIi führt ^[IWAJ et al., 2002]. Das Gen, das für diesen Phänotyp verantwortlich ist, eine Glucuronosyltransferase (NpGUT1), wird hauptsächlich im Spross- und Wurzelmeristem exprimiert. Sie hat hohe Homologie zu tierischen β -Glucuronosyltransferasen, die NICHT an der Detoxifikation endogener oder exogener Substanzen beteiligt sind. Diese Enzyme gehören im Gegensatz zur Untergruppe der detoxifizierenden Enzyme (GT-1) zur Untergruppe GT-47 (http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/GT_47.html).

II. ZIELSETZUNG

Ziel des Projektes "Modell: Roggenprimärblatt" war es, die für die Synthese der Luteolinglucuronide verantwortlichen UDP-Glucuronat:Flavon-Glucuronosyltransferasen biochemisch und molekularbiologisch zu charakterisieren.

1. Geplant war, eine genomische Roggen-DNA-Phagenbank zu erstellen und diese mit heterologen Sonden zu durchmustern. Die Wahl der Sonden sollte einerseits auf Aminosäure-Homologien zu anderen Detoxifikations-Zuckertransferasen (Zuckerbindungsmotiv) und andererseits auf funktionellen Übereinstimmungen (Stereospezifität) basieren.
2. Da die maximale Luteolin-Triglucuronid-Akkumulation am 5. bis 7. Tag der Primärblatt-Entwicklung zu beobachten ist und deshalb dann von einer hohen mRNA-Konzentration ausgegangen werden kann, sollte cDNA von Blättern dieses Stadiums als *template* für PCR-Analysen dienen. Die Zuckerbindungsbox ähnlicher pflanzlicher bzw. tierischer Enzyme war als Grundlage für die Erstellung von Konsensus-Oligonukleotiden vorgesehen.
3. Falls sich aus 1. oder 2. Zuckertransferase-Gene ergeben, war deren mögliche Glucuronosyltransferase-Aktivität mittels phylogenetischer Untersuchungen vorherzusagen und die Expression der bestmöglichen Kandidaten zu überprüfen. Dies war durch PCRs mit spezifischen Oligonukleotiden (*template*-cDNA siehe oben), NORTHERN-*blot* und durch *screening* einer cDNA-Bank aus 5d alten Primärblättern mit homologen Sonden zu bestätigen. Der Transkriptionsstart sollte durch 5'RACE, der *polyA-tail* durch 3'RACE ermittelt werden.
4. Da die bisherigen Publikationen von Schwierigkeiten bei der heterologen Expression pflanzlicher Detoxifikations-Enzyme in *E.coli* berichten, sollten gleichzeitig auch andere Expressionssysteme für die biochemische Charakterisierung der oben erwähnten Gene getestet werden. Die heterologe Expression sollte auch noch in *Arabidopsis thaliana* (Erstellung von Überexpressionslinien durch Agrobakteriuminfektion) und in Tabakblättern (transiente Expression durch Vakuuminfiltration mit Agrobakterium) durchgeführt werden. Ziel war es, in allen drei Systemen die Funktionsvorhersage im enzymatischen *assay* zu bestätigen.

5. Da UGTs und 3FGTs hohe funktionelle und Sequenz-Ähnlichkeiten aufweisen, war eine Charakterisierung dieser Enzyme im Roggensystem notwendig (um später die biochemischen Unterschiede genau zu kennen). Es war nicht auszuschließen, dass im *screening* Enzyme beider Gruppen isoliert werden. Deshalb sollte im Roggensystem ein *in vitro* UGT- und 3FGT-Enzymassay und die anschließende Detektion der Produkte mittels HPLC etabliert werden. Zur weiteren Charakterisierung (Immunblot-Analysen) beider Enzymgruppen im Roggen standen heterologe pflanzliche 3FGT- und humane UGT-Antikörper zur Verfügung. Außerdem war geplant, eine Protein-A-vermittelte Co-Immünpräzipitationen bzw. ein Lectinbindungsassay auf einem Proteinchip durchzuführen. Das *chip*-System in Verbindung mit einem Proteinchip-reader (SELDI, CIPHERGEN), das zur Verwendung kommen sollte, ermöglicht die genaue Massenbestimmung der an den *chip* gekoppelten Proteine (MALDI). Außerdem besteht die Möglichkeit, die Aminosäuresequenz der Proteine direkt auf dem *chip* (Q-TOF) zu ermitteln. Es sollte weiterhin der Versuch unternommen werden, die UGT-Aktivität in Wurzeln bzw. Blättern durch "Fütterungen" mit Luteolin zu induzieren (Analyse der Methanolextrakte der Pflanzen mittels HPLC und deren Proteine durch eine SELDI-Analyse).

6. Die subzelluläre Lokalisation der bekannten pflanzlichen Detoxifikationsenzyme ist, im Vergleich zu tierischen, die sich in der Membran des endoplasmatischen Retikulums befinden, cytosolisch. Da die toxischen Intermediate jedoch nicht im Cytoplasma akkumulieren, sondern die Luteolin-Glucuronide im Roggen-Primärblatt über einen effizienten ATP-abhängigen Transportmechanismus in die Vakuole transportiert werden und dort vermutlich der Phytopathogenabwehr dienen, liegt eine Vakuolenmembran-Assoziation von Flavonoidbiosynthese-Enzymen -evt. UGTs-nahe (*metabolic channeling*). Um die subzelluläre Lokalisation der Roggen-UGTs *in vitro* zu ermitteln, war die Durchführung von Differenzialzentrifugationen geplant. Da diese Methode jedoch nicht zwischen einem cytosolischen und einem mit der Vakuolenmembran assoziierten (*loosely attached*) Protein unterscheiden kann, sollten auch noch fluoreszierende UGT-Fusionsproteine erstellt werden. Diese sollten in Gerstebältern bzw. Tabakprotoplasten exprimiert und deren Lokalisation am Fluoreszenz-Mikroskop verfolgt werden. Als Vakuolenmembran- / ER- bzw. cytosolischer Marker standen das TIP (*tonoplast intrinsic protein*) aus Gerste, die humane UGT1a1 und Calmodulin aus Gerste zur Verfügung. Wenn sich eine Colokalisation mit einem der oben beschriebenen Faktoren ergäbe, war es geplant, verkürzte fluoreszierende Fusionsproteine zu erstellen, um den Teil des Proteins, der für die Lokalisation verantwortlich ist (die Transmembrandomäne beim Menschen liegt im C-Terminus, das ER-Lokalisierungssignal im N-Terminus), auszumachen.

7. Der UGT-Enzymkomplex (bestehend aus den LGT-, LMT- und LDT-Aktivitäten) sollte biochemisch charakterisiert werden. Beim Menschen katalysiert EIN Enzym, die UGT1a1, die Reaktion zum Bilirubin-Diglucuronid. Aufgrund dieser Tatsache schien es interessant, Hinweise dafür zu finden, ob es sich bei der Glucuronidierung von Luteolin zum Luteolin-Triglucuronid im Roggen um weniger als drei Enzyme handelt (würde es sich z.B. um zwei Enzyme handeln, so würde dies die fehlende Akkumulation des Monoglucuronids N im UGT-*assay* sowie *in plant* erklären). Die Anzahl der Roggen-UGTs sollte durch Immun*blot*-Analysen mit einem humanen UGT-Antikörper von durch zweidimensionale Gelelektrophorese aufgetrennten Roggenproteinen ermittelt werden. Beim Menschen konnte gezeigt werden, dass eine Homodimerisierung der UGT-Enzyme zu einer Steigerung der Enzymaktivität führt. Da wir eine Aussage darüber treffen wollten, ob die Roggenenzyme im Enzymkomplex vorliegen, erschien uns eine Homo- / Heterodimerisierungsstudie (mittels FRET) sinnvoll.

III. MATERIAL & METHODEN

Alle Laborchemikalien wurden im analytischen Reinheitsgrad verwendet. Sie wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen BIORAD (München), MERCK (Darmstadt), PHARMACIA (Freiburg), SERVA (Heidelberg) und SIGMA (Deisenhofen) bezogen. Organische Lösungsmittel stammten von den Firmen RIEDEL-DE HAEN (Hannover) und MERCK (Darmstadt). Die Substrate IPTG und X-Gal wurden von der Firma BIOMOL (Hamburg) verwendet. Chemikalien für die Herstellung von Kulturmedien lieferten die Firmen DIFCO LAB (Detroit, USA), GIBCOBRL (Paesley, GB) und SIGMA (Deisenhofen). Das Herbizid Glufosinat (BASTA) zur Selektion transgener Linien wurde von AGREVO (Hoechst und Schering) bezogen.

Restriktionsendonukleasen, T4-DNA-Ligase, alkalische Phosphatase, DNAPolymerasen, DNaseI, RNase, Lysozym sowie DNA-, RNA- und Protein-Größenmarker lieferten die Firmen AMERSHAM (Buckinghamshire, UK), ROCHE (Mannheim), GIBCOBRL (Paesley, GB), NEW ENGLAND BIOLABS (New England, USA) und SERVA (Heidelberg). Hersteller des eingesetzten Radioisotops $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (3000 Ci/mmol) war die Firma AMERSHAM (Buckinghamshire, UK). Röntgenfilme lieferte die Firma KODAK (Rochester, NY, USA).

Alle Methoden sowie Medien, Puffer und Lösungen wurden, sofern nicht anders angegeben, SAMBROOK *et al.* (1989) entnommen. Sofern nicht anders vermerkt, wurden alle Lösungen mit hoch entionisiertem Millipore-Wasser angesetzt. Die meisten Lösungen wurden autoklaviert oder steril filtriert.

1. Molekularbiologische Methoden

1.1. Genomische- / Phagen- und Plasmid-DNA

1.1.1. Allgemeine Methoden

SOUTHERN-*blot*-Hybridisierungsanalyse

Nach Restriktion und gelelektrophoretischer Auftrennung der zu untersuchenden DNA wurde diese mittels Kapillar-*blot* auf eine Hybond-N-Membran (AMERSHAM) transferiert ^[SOUTHERN, 1992]. Die Prähybridisierung erfolgte in Gegenwart von Heringssperma-DNA (100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 3 - 4 h bei 60 - 65°C) in 50 ml Prähybridisierungslösung. Die Membran wurde mit den markierten Fragmenten / Oligonukleotiden (30 bis 50 ng / 20 bis 200 pmol) in Hybridisierungslösung über Nacht bei 50 bis 65°C hybridisiert (variierte je nach verwendeter Sonde). Die Membran wurde mit 2 x SSPE / 1 % SDS bei 50 bis 65°C 20 bis 30 min und anschließend mit 2 x SSPE gewaschen. Die Filter wurden auf Röntgenfilm (Kodak) oder einem Phosphoscreen exponiert. Die Analyse erfolgte mit dem *Phosphoimager* (MOLECULAR DYNAMICS) und der *ImageQuant Software* (MOLECULAR DYNAMICS).

Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten / Oligonukleotiden

Die Markierung von DNA-Hybridisierungssonden erfolgte durch den Einbau von α -[^{32}P]-dATP (30 μCi pro Ansatz, AMERSHAM) mit dem *random primed DNA labeling kit* nach Angaben des Herstellers (BOEHRINGER). Die markierten Fragmente wurden über eine Entsalzungssäule (Biogel P30, BIORAD) oder mit dem PCR-Fragment-Reinigungskit von QIAGEN von nicht eingebauten Nukleotiden getrennt.

Die radioaktive Markierung von Oligonukleotiden (30 μCi γ -[^{32}P]-dATP pro Ansatz, AMERSHAM) erfolgte durch Phosphorylierung des 5'-Endes durch die T4-Polynukleotidkinase (GIBCO-BRL).

DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Aufgrund großer Mengen genomischer DNA erfolgte die Extraktion der genomischen DNA zur Erstellung der EMBL3 Bank mit QiaexII nach Angaben des Herstellers (QIAGEN). Extraktion von Plasmid-DNA-Fragmenten aus TBE-Agarose-Gelen (siehe Abschnitt 6. Puffer, Lösungen und Medien, Seite 55) erfolgte über *Nucleospin*-Säulen (MACHEREY & NAGEL) nach Herstellerangaben.

Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR-Reaktion wurde zur Amplifikation von Plasmid-DNA mit der Taq-Polymerase von INVITROGEN in einem *Peltier Thermal Cycler* (BIOMETRA) durchgeführt. Zur Amplifikation längerer DNA-Fragmente wurde das *Expand High Fidelity System* (BOEHRINGER) oder die Arrow Taq DNA Polymerase (APPLIGENE) benutzt. PCR-Fragmente wurden durch Extraktion aus Agarose-gelen gereinigt und entweder *blunt-end* in die SmaI Schnittstelle des pUC 18-Vektors oder in den pGEM-T-*easy* (PROMEGA) Vektor kloniert.

PCR: 20 bis 50 ng *template*-DNA, 1 x PCR-Puffer ohne Mg, 0.2 mM dNTP-Mix (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 1.5 mM MgCl_2 , 0.5 μM jedes *primers*, 1 U INVITROGEN Taq-Polymerase.

PCR-Programm: 1 x 5 min Denaturierung bei 95°C / Zyklus 30 - 35 x: 1 min 94°C, 30 sec *annealing* bei 50 bis 72 °C (je nach Schmelztemperatur des Oligonucleotids), x min Elongation (je nach Länge des zu amplifizierenden Fragmentes, ungefähr 1 min pro 1 kb) bei 72°C / 1 x 72°C für 10 min, Abkühlung auf 15°C.

1.1.2. Genomische DNA

Extraktion genomischer DNA zur Erstellung der genomischen Phagenbank

Die Extraktion genomischer DNA aus 7 Tage alten Roggenprimärblättern erfolgte nach der Methode von DOYLE (1990). Dabei wurden 10 g Pflanzenmaterial verwendet. Das nach der DNA-Fällung entstandene Sediment wurde in 500 µl TE (siehe Abschnitt 6. Puffer, Lösungen und Medien, Seite 55) resuspendiert (Konzentration: 1 µg/µl).

Schnellpräparation genomischer DNA aus Pflanzengewebe nach EDWARDS et al. (1991)

Mindestens 10 mg Blattmaterial wurde in QUIAGEN-Mixer-Mill-Gefäße geerntet, pro Probe wurden je eine Metallkugel und 400 µl Aufschlußpuffer (200 mM Tris-HCl pH 7.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,5 % SDS) hinzugefügt. Die Gefäße wurden verschlossen und 3 x 1,5 min geschüttelt. Nach einer Inkubation für 5 min bei RT wurden die Gewebetrümmer durch eine Zentrifugation von 1 min bei 10.000 rpm sedimentiert. Die DNA der Überstände wurde mit gleichem Volumen Isopropanol gefällt und mit 70 % EtOH gewaschen. Das Sediment wurde in 30 µl 1 x TE (siehe Abschnitt 6. Puffer, Lösungen und Medien, Seite 55) aufgenommen und bis zur PCR-Analyse bei –20°C aufbewahrt.

1.1.3. Phagen-DNA

Erstellung einer EMBL3-Phagenbank aus genomischer Roggen-DNA

Zur präparativen NdeII-Restriktion wurden 70 µg genomische DNA in 700 µl Gesamtvolumen eingesetzt. Die Restriktion wurde nach 45 min gestoppt, die entstandenen Fragmente mit dem Nucleospin-System von MACHEREY und NAGEL aus dem Gel extrahiert, in den BamHI-geschnittenen EMBL3-Vektor ligiert und dieser in Phagen verpackt (siehe hierzu STRATAGENE Protokoll für *Gigapack III XL Packaging Extract*). Die so erstellte Phagenbank wurde bei 4°C gelagert.

Durchsuchung (*screening*) einer genomischen Phagen-DNA-Bank

Die Kultur der Phagen und des Bakterienstammes erfolgte nach Angaben des Herstellers (STRATAGENE). Von den 90mm-Platten wurden Replikafilter angefertigt. Diese Nitrozellulose-Filter (SCHLEICHER & SCHNELL, Dassel) wurden mit der Plaquesseite nach oben für fünf Minuten auf je ein in Denaturierungslösung, in Neutralisationslösung und in 20 x SSPE getränktes Whatman-Filterpapier gelegt (siehe Abschnitt 6. Puffer, Lösungen und Medien, Seite 55). Die Phagen-DNA wurde durch eine zweistündige Inkubation bei 80°C an die Membranen gebunden. Prähybridisierung und Hybridisierung erfolgten nach dem Protokoll des SOUTHERN-*blots*.

Nach dem Auffinden positiver Klone wurden diese mit der großen Öffnung der Pasteurpipette stumpf gestochen und in 1 ml SM-Puffer (siehe Abschnitt 6. Puffer, Lösungen und Medien, Seite 55) aufgenommen. Nach 2h Inkubationszeit bei RT und wiederholtem *vortexen* wurden die so eluierten Phagen in unterschiedlichen Konzentrationen erneut zur Infektion der kompetenten Bakterien eingesetzt. Wiederum wurden Replikafilter der Platten angefertigt und diese mit spezifischen Sonden inkubiert. Dieser Prozess wurde so lange wiederholt, bis das Stechen einzelner Phagenklone möglich war.

Isolierung von EMBL3- λ -Bakteriophagen-DNA

Einzelne positive Phagen-Plaques wurden aus den NZCYM-Platten (siehe Abschnitt 6. Puffer, Lösungen und Medien, Seite 55) ausgestochen und in 1 ml SM-Puffer gegeben. Nach Zugabe eines Tropfens Chloroform wurde der Ansatz für mindestens 2 Stunden bei RT inkubiert und zwischendurch ständig *gevortext*. Parallel wurden kompetente Bakterien des Stammes XL1-Blue angefertigt (STRATAGENE-Protokoll). Es wurden, je nach Titer der Phagensuspensionen, unterschiedliche Volumina zur Infektion der kompetenten Bakterien eingesetzt, so dass dies in jedem Fall zu einer konfluent lysierten Platte führte (Inkubation der Platte ÜN 37°C).

Die Phagen wurden durch Schwenken mit 5 ml SM-Puffer (2 h, RT) aus der Topagarose eluiert. Dem Eluat wurden 5 % Chloroform zugesetzt und die Bakterien durch Zentrifugation sedimentiert (10 min, 4000 x g und 4°C). Die DNA wurde anschließend mit Hilfe des QIAGEN-Lambda-Midi-*kits* (QIAGEN) isoliert und bei -20°C gelagert.

ZAP-Library (STRATAGENE)

Zur Infektion von 4×10^6 Bakterien (XL1-Blue MRF') wurden 4×10^5 rekombinante Lambda-Phagen und 4×10^7 ExAssist-Helfer-Phagen eingesetzt. Die Inokulation erfolgte für 15 Minuten bei 37°C und dann für weitere 3 Stunden mit 20 ml Medium bei 37°C im Bakterienschüttler.

Anschließend wurde die Suspension 20 min bei 70°C

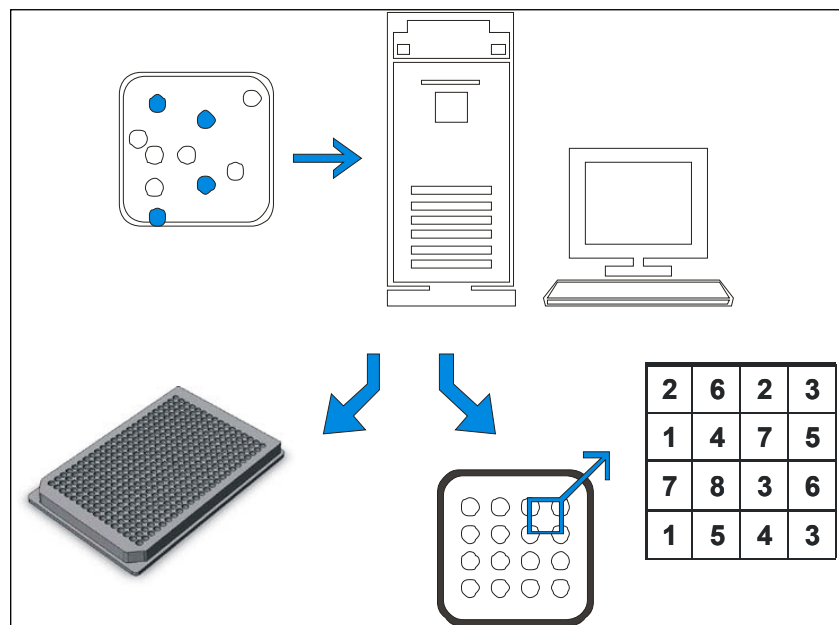


Abb. 14: Schematische Darstellung der Erstellung der cDNA-Bank-Filter (siehe Text).

inkubiert, zentrifugiert und der Überstand für die Infektion der XLOLR Zellen eingesetzt.

Die Bakterien wurden in geeigneter Konzentration auf 22 x 22 cm große GENETIX-Platten ausplattiert. Die weißen Kolonien wurden durch den *bio-gridder-robot* (BioGrid / MicroGrid, BioRobotics) auf 384-well-Microtiter-Platten (NUNC 12.5 x 8 cm²) sowie auf Nylonmembranen (Replikafilter, Hybond N+ *nylon filter* 22 cm²) übertragen. Der *bio-gridder* war so programmiert, dass ein 4 x 4 Muster entstand (Abb. 14). Dieses Muster produziert Replikationen jedes einzelnen Klons. Die Nummern 1 bis 8 repräsentieren die acht 384er Microtiterplatten. Die so entstandenen Nitrozellulose-Membranen wurden so behandelt wie die Filter des EMBL3-Phagenbank-*screenings* (siehe oben). Die Filter wurden mit unterschiedlichen Sonden hybridisiert (Hybridisierung siehe SOUTHERN-*blot*, Wahl der Sonden siehe Ergebnisteil). Anschließend wurden sie eine Nacht auf einen *PhosphoImager-screen* gelegt, dieser mit dem Storm-860-Scanner gescannt und die Daten mit der *PhosphoImager-software* ausgewertet.

1.1.4. Plasmid-DNA

Isolierung von Plasmid-DNA

Plasmid-Mini-Präparationen aus 2 ml Übernachtskultur erfolgten nach der Methode von BIRNBOIM (1983). Plasmid-Maxi / Midi-Präparationen wurden mittels Qiagen-tip-500- / -100-Säulen nach Angaben des Herstellers durchgeführt (QIAGEN).

Die Transformation von Plasmid-DNA in kompetente *E. coli* erfolgte durch Elektroporation.

Herstellung elektrisch kompetenter DH10B-Zellen

Eine 5 ml Kultur (DYT-Medium, siehe Abschnitt 6. Puffer, Lösungen und Medien, Seite 55) wurde aus einer Einzelkolonie DH10B-Zellen angeimpft. Die Bakterien wurden ÜN bei 37°C geschüttelt. Mit dieser Kultur wurden 500 ml Medium angeimpft, die etwa 4 h bei 37°C geschüttelt wurden (bis die OD₆₀₀ etwa 0.8 - 1 betrug). Der Ansatz wurde 15 min mit 4000 x g zentrifugiert und das Pellet in 250 ml kaltem H₂O gewaschen. In vier weiteren Waschschritten wurde das Volumen jeweils um die Hälfte verringert. Anschließend wurde das Pellet mit 10 ml 10 % Glycerin gewaschen und in 2 ml 10 % Glycerin aufgenommen. Aliquots zu je 40 µl wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Transformation von elektrokompentenen Bakterien

Zu 40 µl elektrokompentenen Zellen wurde je 1 µl Ligationsansatz gegeben. Das Eindringen der DNA wurde durch einen 5 sec langen Spannungsimpuls von 1.6 kV möglich. Sofort wurden 250 µl SOC-Medium (siehe Abschnitt 6. Puffer, Lösungen und Medien, Seite 55) zu den Zellen gegeben

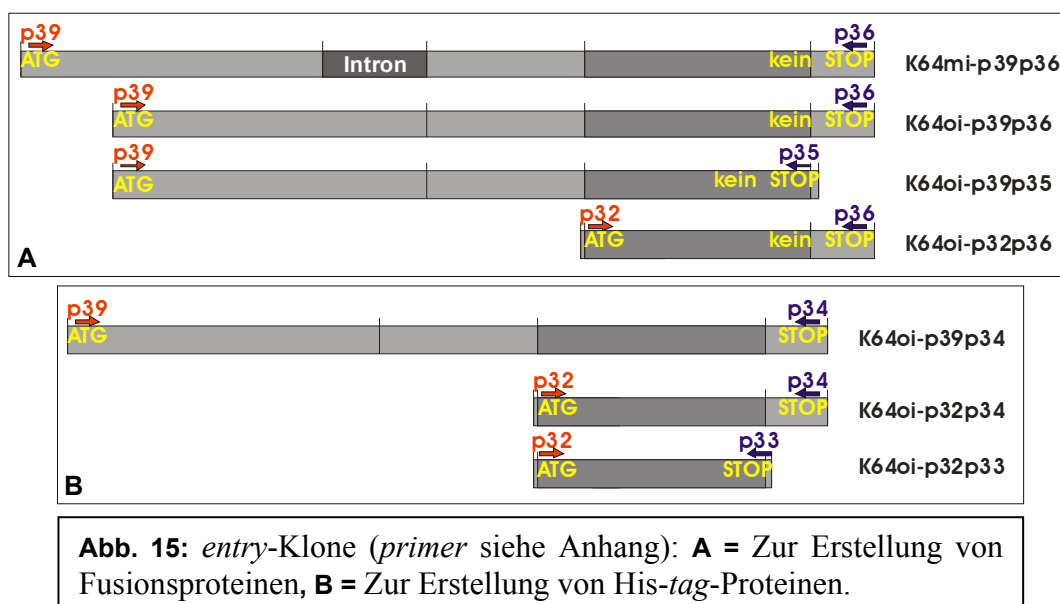
und diese für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Bakterien wurden in unterschiedlichen Konzentrationen auf DYT-Platten (mit Selektion und evt. IPTG / X-Gal, siehe Abschnitt 6. Puffer, Lösungen und Medien, Seite 55) ausplattiert und ÜN bei 37 °C inkubiert.

1.1.5. Erstellung der Plasmide zur Proteinexpression

entry-Klone / BP-Reaktion (INVITROGEN)

Die Plasmide, die zur Proteinexpression dienen sollten, wurden mittels des *gateway*-Systems der Firma INVITROGEN erstellt.

Dafür wurden mittels PCR anhand von spezifischen *primern* (Erstellung der *primer* siehe INVITROGEN-*manual*) Fragmente erstellt, die zur BP-Rekombination mit dem pDONR-221-Vector eingesetzt wurden. Sowohl *forward*- als auch *reverse-primer* müssen dafür die Rekombinations-*site* des Lambda-Phagen enthalten (*attB1*- bzw. *attB2-site*). Als *template*-DNA für die Polymerase-Ketten-Reaktionen wurde der Klon K64 (scUGTb) mit und ohne Intron verwendet (K64mi oder K64oi). In der PCR wurden 50 pmol Oligonukleotid verwendet. Die Fragmente wurden nach gelelektro-phoretischer Auftrennung extrahiert (Nucleospin, M&N) und in äquimolaren Mengen mit dem Vektor zur BP-Reaktion bei RT ÜN eingesetzt. Abweichend vom Protokoll wurde der gesamte Reaktionsansatz in 5 statt in 20 µl durchgeführt (dem entsprechend wurde von allem nur 1/4 der im Protokoll angegebenen Mengen eingesetzt). Zur Transformation elektrokompenter *E.coli* wurde davon je 1 µl verwendet. Es wurde keine ProteinaseK-Restriktion vorgenommen. Folgende *entry*-Klone wurden erstellt (siehe Abb. 15, *primer* siehe Anhang):



Die Extraktion der *inserts* erfolgte mit Bsp1407i; überprüft wurden die einzelnen Klone mittels DNA-Sequenzierung.

Destination-Vektoren / LR-Reaktion (INVITROGEN)

Die oben beschriebenen *entry*-Klone dienen als Grundlage für weitere Rekombinationsereignisse. Auch die LR-Reaktion wurde, wie oben beschrieben, abweichend vom Standard-Protokoll durchgeführt. Als *destination*-Vektoren dienen:

Vektor	Expressions-system	tag	verwendete <i>entry</i> -Klone	Eigenschaften des <i>entry</i> -Klons
pDEST17	Proteinexpression in <i>E.coli</i>	N-terminaler His-Tag	K64oi-p39p34 K64oi-p32p34 K64oi-p32p33	benötigt START- und STOP-Codon
pUbi-GW-YFP	Proteinexpression <i>in planta</i> (Gerste, BY2-Protoplasten)	C-terminale Fusion mit YFP	K64mi-p39p36 K64oi-p39p36 K64oi-p39p35 K64oi-p32p36	benötigt eigenes START-, aber kein STOP-Codon
pUbi-GW-CFP	Proteinexpression <i>in planta</i> (Gerste, BY2-Protoplasten)	C-terminale Fusion mit CFP	K64mi-p39p36 K64oi-p39p36 K64oi-p39p35 K64oi-p32p36	benötigt eigenes START-, aber kein STOP-Codon
SG-GFP	Proteinexpression <i>in planta</i> (<i>A.thaliana</i> , Tabak)	C-terminale Fusion mit GFP	K64mi-p39p36 K64oi-p39p36 K64oi-p32p36	benötigt eigenes START-, aber kein STOP-Codon
pleela	Proteinexpression <i>in planta</i> (<i>A.thaliana</i>)		K64oi-p39p34 K64oi-p32p34 K64oi-p32p33	benötigt START- und STOP-Codon

Tabelle 2: Verwendete *destination*-Vektoren und *entry*-Klone

1.2. RNA

1.2.1. Allgemeine Methoden

Alle Lösungen, die für die Arbeit mit RNA verwendet wurden, wurden ausschließlich mit DEPC-H₂O (siehe Abschnitt 6. Puffer, Lösungen und Medien, Seite 55) angesetzt.

Gesamt-RNA-Präparationen

Gesamt-RNA wurde entweder mit dem *RNeasy Plant Mini Kit* (QIAGEN) oder dem Tri-Reagent (SIGMA, 4.5 g Primärblatt mit 13 ml Lösung) präpariert.

NORTHERN-*blot*-Analyse

Je 40 µg RNA wurden nach gelelektrophoretischer Auftrennung in einem 0.8 bis 1 % Formaldehydhaltigen Agarosegel (1 x MOPS-Puffer, siehe Abschnitt 6. Puffer, Lösungen und Medien, Seite 55, 5 % Formaldehyd) mit der Kapillar-*blot*-Methode auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Der Transfer und die anschließende Hybridisierung mit einem ³²P-markierten Fragment wurden nach den Angaben des Membranherstellers durchgeführt. Die Analyse der *blots* erfolgte mittels eines *PhosphoImagers* 445 SI und der *Imagequant Software* (MOLECULAR DYNAMICS).

mRNA-Präparationen

Zur Präparation der mRNA wurde entweder *Dynalbeads Oligo (dT)₂₅* (DYNAL) verwendet, wobei 40 µg Gesamt-RNA mit 200 µl *beads* gebunden wurden. Es konnten etwa 3 µg polyA-RNA (20 ng/µl) von der Säule eluiert werden. Oder es wurde das *Oligotex Direct mRNA Kit* von QIAGEN verwendet.

1.2.2. cDNA-Synthese

Zur cDNA-Synthese wurden ca. 80 ng mRNA eingesetzt und diese mit 200 *Units* Superscript II (50 min bei 42°C) in cDNA umgeschrieben. Bei den verwendeten Oligonukleotiden handelte es sich entweder um einen OligodT-*primer* oder einen Gen-spezifischen *primer*.

1.2.3. RT-PCR

Die RT-PCR mit Konsensus-*primern* (siehe Ergebnis Teil) wurde wie folgt durchgeführt [FROHMAN *et al.*, 1988].

- 1 µl cDNA Pool (0.001 µg/µl), 25 pmol *primer*, 10 % v/v DMSO, 5 µl 10 x Taq Puffer, jedes dNTP 1.5 mM, ad 50 µl mit Wasser
- 95°C 5 min, 94°C 40 sec, 50 bis 58°C 2 min, 72°C 3 min, 72°C 15 min, 4°C ∞

1.2.4. 5'- bzw. 3'-RACE

Die 5'- bzw. 3'-RACE wurde mit dem *gene racer kit* der Firma INVITROGEN durchgeführt. Für die 5'-RACE wurde die Gesamt-RNA zuerst dephosphoryliert, dann die mRNA-*cap*-Struktur entfernt, an die *decapped* mRNA ein RNA-Oligo ligiert und schließlich eine reverse Transkription durchgeführt (entweder mit OligodT- oder mit genspezifischem *primer*). Der letzte Schritt gilt auch für die 3'RACE. Nun wurden PCRs, mit *nested* und genspezifischen *primern* durchgeführt (genauer siehe Herstelleranweisungen).

2. Biochemische Methoden

2.1. Allgemeine biochemische Methoden

2.1.1. Roggenprimärblatt-Proteinpräparation

Wenn nicht die Proteine, die sich aus der Differenzialzentrifugation ergaben, für die Gelelektrophorese bzw. die WESTERN-*blots* verwendet wurden, so wurden sie aus Roggenprimärblättern durch Proteinprobenpuffer (siehe Pufferliste, Abschnitt 6, Seite 55) extrahiert. Dafür wurden je 1g Pflanzenmaterial mit 5 ml Probenpuffer gemörsert, 10 min gekocht und der Überstand für die Elektrophorese verwendet.

2.1.2. Proteinquantifizierung

Die Proteinbestimmungen wurden nach der Methode von BRADFORD (1976) (0.06 % COOMASSIE G-250 Protein-Komplex in 1.9 % Perchlorsäure) durchgeführt; Messungen bei 595 nm (Proteineichkurve siehe Abb. 17, Seite 43).

2.1.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Eine Größenauftrennung der Proteine entsprechend ihrer Molmasse erfolgte nach LAEMMLI (1970). Die SDS-Polyacrylamidgele (10 bis 15 % Acrylamidkonzentrationen) wurden nach erfolgter Elektrophorese mit COOMASSIE R-250 (0.3 % in 10 % Essigsäure, 40 % Methanol) oder mit Silbernitrat gefärbt. Die Proteinproben wurden unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt (Probenpuffer: 10 % Glycerin, 125 mM Tris-HCl pH 6.8, 4 % SDS, 0.02 % Bromphenolblau, 4 % β -Mercaptoethanol).

2.1.4. WESTERN-*blot*-Analyse ^[SAMBROOK et al., 1989]

Die Proteine wurden nach gelelektrophoretischer Auftrennung mittels *electroblotting* in *blot*-Puffer auf eine Nitrozellulosemembran (SCHLEICHER & SCHÜLL) übertragen. Der *blot* wurde ausgehend von der Kathode wie folgt aufgebaut: zwei Whatman-Filterpapiere, das Gel, mit Wasser befeuchtete Membran, zwei Whatman-Filterpapiere.

Der Transfer der Proteine auf die Membran wurde durch deren Färbung mit Ponceau-S (0.1 % Ponceau-S in 1 % Essigsäure 1 bis 2 min schütteln und mit 1 % Essigsäure sichtbar machen) überprüft. Vollständig entfärbt werden konnte die Membran mit 0.4 N Natronlauge.

Die freien Bindungsstellen wurden mit 5 % fettfreiem Milchpulver in 1 x TTBS (siehe Abschnitt 6. Puffer, Lösungen und Medien, Seite 55) blockiert (1 h, RT oder ÜN 4°C). Nach 1-3 h Inkubation bei RT mit dem jeweils ersten Antikörper (5 % Milchpulver / 1 x TTBS / spezifischer Antikörper) wurde die Membran für 1 h mit dem jeweils zweiten Antikörper (Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper, SIGMA) inkubiert. Nach den Antikörper-Inkubationen wurde die Membran 3 x 5 min mit TTBS gewaschen. Die Membranen für die WESTERN-*blot*-Analysen wurden mit dem ECL-Substrat (AMERSHAM PHARMACIA) nach Angaben des Herstellers angefärbt und die Chemilumineszenz durch einen LumiImager (BOEHRINGER) sichtbar gemacht.

2.2. Proteinexpression rekombinanter scUGT in *E.coli*

Zur Proteinexpression in *E.coli* ^[STUDIER et al., 1990] wurden BL21(DE3)-Zellen mit den die scUGT tragenden pDEST-17-Expressionsvektoren transformiert und unter Ampicillin-Selektion über Nacht kultiviert. Die erfolgreiche Transformation wurde durch Kolonie-PCR überprüft. Positive Klone

wurde bei einer optischen Dichte von 0.4 mit 0.5 mM IPTG induziert und über Nacht bei 37°C in 5 ml M9ZB-Medium (M9ZB: 6 g Na₂HPO₄, 3 g KH₂PO₄, 1 g NH₄Cl, 10 g *Select-Peptone* 140 (GIBCO BRL), 5 g NaCl, 1 ml MgSO₄ (1 M), 20 ml Glucose (20%), 250 µl Ampicillin (200 mg/ml), ad 1l) inkubiert. Aus dieser Kultur wurden 2 ml sedimentiert und in 100 µl Harnstoff-Puffer resuspendiert (10 mM Tris-HCl (pH 8), 100 mM NaCl resuspendiert, 8M Harnstoff). Die Proteinexpression wurde mittels *Immunblot* mit dem Anti-His-Antikörper überprüft.

Cytosolische Proteine wurden durch Inkubation des resuspendierten Sediments (10 mM Tris-HCl (pH 8), 100 mM NaCl resuspendiert) mit Lysozym extrahiert (30 min 37°C). Die nach der Zentrifugation entstandene Membranfraktion wurde in 100 µl denaturierendem Puffer (20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 8 M Harnstoff, 30 mM β-Mercaptoethanol, 1% Triton X-100, 1% SDS) aufgenommen. Aus positiven Kulturen wurde ein *Enzymassay* angesetzt.

2.3. Zweidimensionale Gelelektrophorese

2.3.1. Proteinpräparation [nach Gespräch mit Dr. M. Schulz, Instiut für Landwirtschaftliche Botanik, Uni Bonn]

Der Gesamtproteinextrakt aus 2g 5d alter Roggenprimärblättern wurde mit 5 ml Extraktionspuffer (313 mM Tris-HCl pH 6.8, 6% SDS, 20% Glycerin, 10% β-Mercaptoethanol, pH = 6.8, 75 µl *plant*-Proteaseinhibitoren (SIGMA) pro 5 ml Puffer) extrahiert, 10 min gekocht und nach einer Zentrifugation von 10 min bei 14.000 rpm der Überstand zur Präzipitation mit Methanol eingesetzt. Je 500 µl Probe wurden mit 2 ml Methanol versetzt, gut vermischt und 1 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Dann wurde die Lösung mit 500 µl Chloroform versetzt, wieder gut resuspendiert und 1 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Nun wurden 1.5 ml Wasser zugefügt, gut gemischt und 3 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Nach der Zentrifugation lag eine Phasentrennung vor. Die obere Phase wurde abgenommen und verworfen, die Unter- und Mittelphase mit 1.5 ml Methanol versetzt und 8 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Das Sediment wurde nun unter Stickstoff getrocknet und in 500 µl Resuspensionspuffer (8M Harnstoff, 100 mM DTT, 2% CHAPS, 2% SB14, 0.2% Carrier) resuspendiert. Wurde die Proteinlösung nicht klar, musste noch ein zusätzlicher Zentrifugationsschritt eingefügt werden (10 min bei 14000 rpm).

2.3.2. Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Die Proteine wurden nun 12 - 24 h in einer Protean IEF Cell von BIORAD (4000 V/7 cm, 50 µA/Strip) fokussiert (siehe BIORAD-*manual*).

Die Rehydrierung der Gele erfolgte ohne die Proteinprobe mit 250 µl Rehydrierungspuffer (8 M Urea, 0.5 % CHAPS, 10 mM DTT, 0 bis 0.2 % (w/v) Bio-Lytes, 0.001 % Bromophenol Blue) bei 25°C 16 h vor der Probenbeladung der Gele. Nach der isoelektrischen Fokussierung mussten die

Strips für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese äquilibriert werden. Dafür wurden die Strips erst von überschüssigem Mineralöl befreit. Die Äquilibration erfolgte 10 min in Äquilibrationpuffer A (6 M Urea, 2 % SDS, 0.375 M Tris-HCl pH 8.8, 20 % Glycerin, 130 mM DTT) unter leichtem Schütteln und 10 min in Äquilibrationpuffer B (6 M Urea, 2 % SDS, 0.375 M Tris-HCl pH 8.8, 20 % Glycerin, 135 mM Iodoacetamid), auch unter leichtem Schütteln [RADZIKOWSKI et al., 2002; SANCHEZ et al., 2001; HAJDUCH et al., 2001; OUERGI et al., 2000; BESTEL-CORRE et al., 2002].

2.4. Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC: *High Performance Liquid Chromatography*)

Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) gestattet die schnelle und reproduzierbare qualitative sowie quantitative Untersuchung von löslichen Sekundärmetaboliten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese Methode verwendet, um die im scUGT-Enzymassay (sowie im 3FGT-Enzymtest) entstandenen Intermediate bzw. Produkte und die Exsudate der Wurzel- bzw. Blatt-"Fütterungen" zu untersuchen.

Die Auftrennung der methanolischen Extrakte erfolgte auf einer Nucleosil 100-5 C8-Säule, die Detektion bei 340 nm (bzw. 270, 370, 520 nm). Es wurde ein Laufmittelgradient von 0 % B auf 100 % B in x min verwendet (Gradienten siehe unten, A: Wasser mit 1 % Phosphorsäure, B: Acetonitril). Technisches Methanol wurde von der Firma SCHINDLER (Köln) bezogen. Es wurde in unserem Labor vor der Verwendung als Extraktionsmittel und HPLC-Laufmittel destilliert. Acetonitril (HPLC Grade, > 99.8 % rein) stammte von BAKER CHEMICALS (Deventer, NL).

Die HPLC-Anlage am Botanischen Institut der Universität Köln ist mit zwei Pumpen, einem Autoinjektor, einer Säule, einem UV-Detektor und einem Integrator ausgestattet. Der UV-Detektor ist ein Photodetektor im Wellenlängenbereich von 190 - 900 nm. Mit diesem ist es auch möglich, während des Durchflusses Absorptions-Spektren aufzunehmen. HPLC-System: System Controller SCL-10A; 2 Pumpen LC-10AS; Autoinjector SIL-10A; UV-spektrophotometrischer Detektor SPD-10A; Integrator Chromatopac C-R5A (an SPD-10A) (SHIMADZU, Kyoto); linearer Potentiometerschreiber Servogor S (BBC GOERZ, Baden); Vertex-Säule 125 x 4 mm (BISCHOFF, Leonberg) mit Nucleosil 100-5 C8 (Porengröße 100 µm, Partikelgröße 5 µm) gefüllt (CS CHROMATOGRAPHIE-SERVICE, Langerwehe).

Photometer: Zweistrahl-Spektralphotometer Uvikon 810 mit Drucker LS 48 und analogem Schreiber Recorder 21 (KONTRON HERMLE, Goßheim).

Auf folgendem HPLC-System wurden die Extrakte im MPIZ-Köln analysiert: BioTek Kontron, *sampler* RS232, *diode array detector* DAD540, *system* 522, *degasser* Deagasy DG-1210, Software

KromaSystem 2000. Die Messungen erfolgten mittels Dioden-array-Detektoren bei einem Wellenlängenbereich von 240 bis 400 nm.

Der Integrator gibt das Integral der Signaländerungen des Detektors von Substanz "peaks" nach Injektion einer bestimmten Lösungsmenge in μl an ("peakflächen" in dimensionslosen Einheiten "areas"); diese sind proportional zu der jeweils detektierten Stoffmenge. Die Eichfaktoren für die ermittelten "areas" wurden über die HPLC-Analyse von Referenzsubstanzlösungen bekannter Konzentrationen bestimmt. Für die Flavonoide wurde der molare Extinktionskoeffizient des Aglycons (Luteolin, $355\text{ nm} = 17800\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) [WEAST, 1974] zur photometrischen Bestimmung der Konzentration verwendet.

Als Referenzsubstanzen dienten die Flavonoide R_1 , N und R_2 ; sie wurden in unserem Labor über eine mehrschrittige Säulenchromatographie gereinigt. Laut HPLC-Analyse beträgt ihre Reinheit bei der Detektionswellenlänge von 340 nm über 98% . Luteolin wurde von den Firmen EXTRASYNTHESSE bzw. ROTH bezogen.

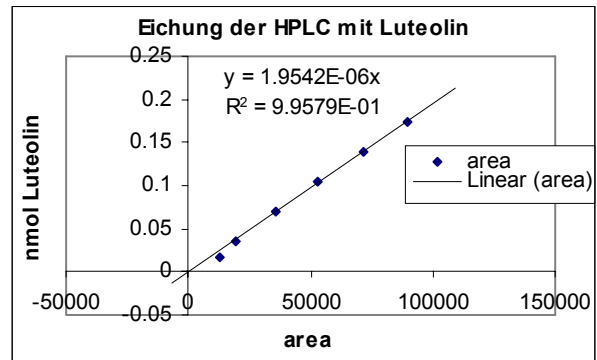


Abb. 16: Die Eichung der HPLC erfolgte mit 5, 10, 20, 30, 40 und 50 μl einer $3.496 \times 10^{-6}\text{ M}$ methanolischen Luteolinlösung. Daraus ergab sich ein Umrechnungsfaktor für Luteolin von $1,95 \times 10^{-6}\text{ nmol pro area}$.

Zur Eichung der HPLC wurden 5, 10, 20, 30, 40 und 50 μl einer $3.496 \times 10^{-6}\text{ M}$ Luteolin-Lösung in MeOH eingesetzt und die entsprechenden Flächeneinheiten (areas) gemessen. Aus der linearen Regression ergab sich ein Umrechnungskoeffizient von $1.95 \times 10^{-6} \frac{\text{nmol}}{\text{area}}$ mit einem

zufriedenstellenden Konfidenzintervall von 0.996.

Da die Extinktionskoeffizienten der Intermediate N, R_2 und des Produkts R_1 nicht bekannt sind und ihre Isolation als Trockensubstanz nur in sehr geringen Mengen möglich ist, wurde in den folgenden Messungen der Umrechnungsfaktor für Luteolin auf die glucuronidierten Produkte übertragen. Dies scheint bis auf weiteres gerechtfertigt, zumal die addierten Glucuronsäurereste den molaren Extinktionskoeffizienten des Chromophors Luteolin voraussichtlich nur in vernachlässigbarem Maße

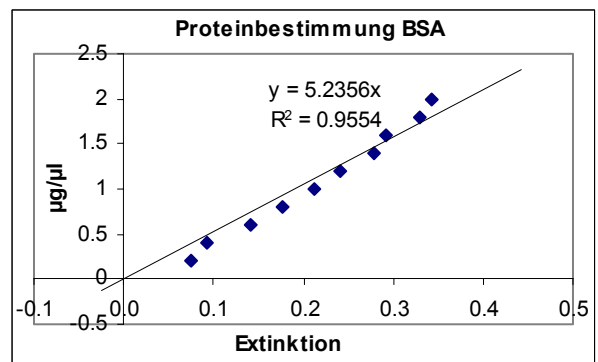


Abb. 17: Proteineichkurve, gemessen für BSA, gelöst in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7. Die y-Achse zeigt die Proteinkonzentration ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$), die x-Achse die bei gegebener Konzentration gemessene Extinktion bei 595 nm .

beeinflussen (Abb. 16). Proteinkonzentrationen von 0,2, 0,4 bis 2,0 µg/µl wurden bei einer Extinktion von 595 nm gemessen. Die durch die Regression der Werte ermittelte Geradengleichung ist gegeben durch: Proteinkonzentration [µg/µl] = 5.235 × Extinktion (Abb. 17).

2.4.1. Gradienten

UGT-Gradient-a		
Laufmittel A: Wasser mit 1 % Phosphorsäure Laufmittel B: Acetonitril Elution: 1 ml/min Detektionswellenlänge: 340 nm	Zeit [min]	Konzentration Laufmittel B in A
	0-1	0-15%
	1-30	15-30%
	30-31	30-100%
	31-33	100-15%
	36	STOP
UGT-Gradient-b		
Laufmittel A: Wasser mit 1 % Phosphorsäure Laufmittel B: Acetonitril Elution: 1 ml/min Detektionswellenlänge: 340 nm	Zeit [min]	Konzentration Laufmittel B in A
	0-1	0-15%
	1-30	15-75%
	30-31	75-100%
	31-33	100-10%
	36	STOP
3FGT-Gradient		
Laufmittel A: Wasser mit 1 % Phosphorsäure Laufmittel B: Acetonitril Elution: 1 ml/min Detektionswellenlänge für Flavonole bzw. Antocyane: 270, 370, 520 nm	Zeit [min]	Konzentration Laufmittel B in A
	0-10	0-5%
	10-11	5-16%
	11-26	16-16%
	26-27	16-100%
	27-29	100-100%
	29-30	100-0%
	30-35	STOP

2.5. UGT-Aktivitätsmessungen / Differenzialzentrifugation

Die Anzucht der Pflanzen (Roggen Cultivar Halo) erfolgte für 4 Tage in einer klimatisierten Kammer (VÖTSCH) unter Weisslicht (WL) -Bedingungen [BURCHARD et al., 2000]. Die durchschnittliche Länge der Primärblätter (Pb) betrug 25 mm bei 4 Tagen, das durchschnittliche Gewicht war 16 mg pro Pb. Es wurden ganze Pb ohne Koleoptile geerntet. Pro 1g Frischgewicht wurden 10 ml eiskalter Puffer [100 mM KPi-Puffer pH 7,0, 10 mM 2-β-Mercaptoethanol, 600 mg Dowex, 180 mg Polyclar AT, 50 µl Proteaseinhibitor-Cocktail (P9599 SIGMA)] verwendet, in dem die frischen Primärblätter in einer Reibschale, pulverisiert und auf dem Eisbad 20 min extrahiert wurden (Abb. 18). Das Homogenat wurde für 15 min bei 650 x g (Hettich) zentrifugiert, das Sediment verworfen. Der Überstand (Ü1) wurde erneut zentrifugiert (11.000 x g für 30 min bei 4°C). Das nach dieser Zentrifugation entstandene Sediment (P1) wurde in Puffer resuspendiert. Der Überstand (Ü2) wurde ein drittes Mal zentrifugiert (170.000 x g, 60 min bei 4°C), wobei ein dritter Überstand (Ü3) und ein zweites Sediment (P2) entstanden (Abb. 19, Zentrifugationsschema). Es wurden jeweils 200 µl von

P1, P2, Ü1, Ü2 und Ü3 für den Aktivitätstest eingesetzt. Der Enzymassay wurde in je 700 µl Gesamtvolumen durchgeführt mit je 85µM Luteolin (Stammlösung 6 mg in 3ml Ethylenglycolmonomethylether), 100 mM KPi-Puffer pH 7.0, 10 mM β-Mercaptoethanol und 500 µM UDP-Glucuronat-Na₂-Salz (Stammlösung: 7 mg in 3 ml 100 mM KPi-Puffer pH 7.0 ohne β-Mercaptoethanol). Die Reaktion wurde durch Zugabe von UDP-Glucuronat gestartet und durch 700 µl Methanol gestoppt. Die Inkubationszeiten bei 37°C betragen 0, 20, 40, 60, 80 und 100 min. Es wurden die absoluten Aktivitäten der einzelnen Fraktionen verglichen. Es wurde davon ausgegangen, dass Überstand Ü1 die gesamte Aktivität (100 %) des Ansatzes birgt.

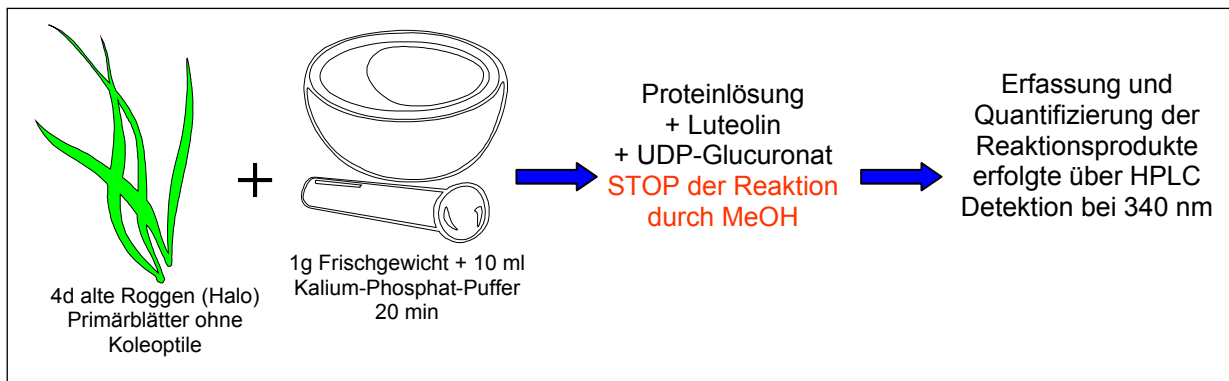


Abb. 18: Schematische Darstellung des UGT-Enzymtests mit Roggenprimärblattproteinen.

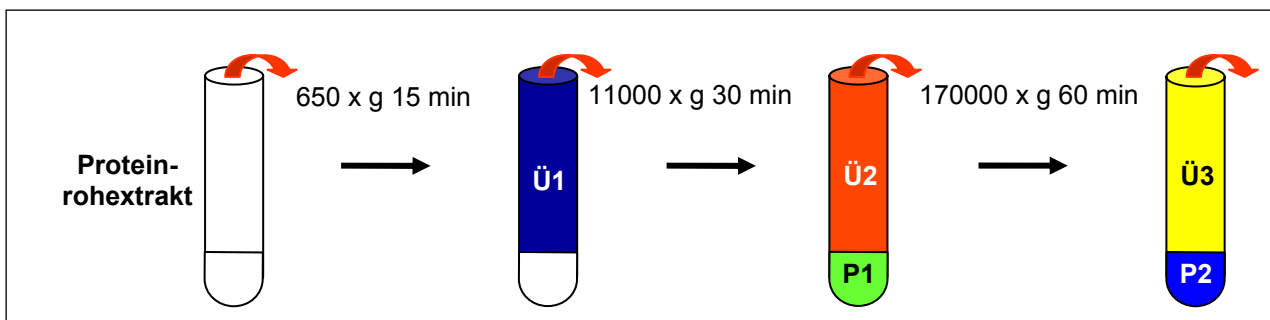
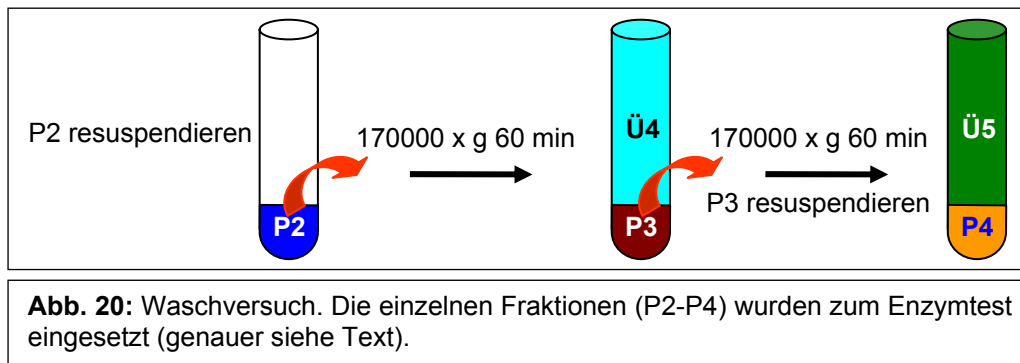


Abb. 19: Differenzialzentrifugationsschema. Die einzelnen Fraktionen (Ü1-P2) wurden zum Enzymtest eingesetzt (genauer siehe Text).

2.5.1. Waschversuch

Um eine mögliche Restaktivität der Sedimente zu erfassen, wurde P2 in diesem Versuch nach dem unten angegebenen Schema gewaschen (Abb. 20).



Rechenbeispiel: Ausführlicher Rechengang des Aktivitätsvergleichs dieser Fraktionierung (im Folgenden wurde analog vorgegangen). Im Überstand 1 zeigten sich nach 20 min *peak*-Flächenmittelwerte für N = 17815.5, für R2 = 52288.5 und R1 = 58973.5 (Produktsumme Ü1 = 129077.5 area, entspr. $2,5 \times 10^{-4}$ μmol). Überstand 1 betrug 8.1 ml, wovon 200 μl zum assay in 700 μl Gesamtvolumen eingesetzt wurden. Nach 20 min wurde die Reaktion mit gleichem Volumen Methanol abgestoppt und hiervon 20 μl der HPLC zugeführt. Da ein 70stel des assayVolumens aufgetragen wurde, müssen die Stoffmengen für die absolute Aktivität zunächst mit 70 multipliziert werden, des weiteren erneut mit 40.5, da aus Überstand 1 (8.1 ml) nur 200 μl für den assay verwendet wurden ($2,5 \times 10^{-4}$ $\mu\text{mol} \times 2835 = 7.15 \times 10^{-1}$ μmol). Ob der erschwerten Messbarkeit des Volumens des Sediments P1 wird dieses als Differenz aus Ü1 und Ü2 angenommen. In diesem Fall ergeben sich $8.1 \text{ ml} - 7.5 \text{ ml} = 0.6 \text{ ml}$. Dieses Sediment wurde in 1 ml Standardextraktionspuffer resuspendiert und davon wie in Ü1 200 μl in 700 μl zum assay eingesetzt. Auch hier erfolgte eine Inhibition mit gleichem Volumen Methanol und hieraus die Messung von 20 μl . Für die Berechnung der Gesamtaktivität muss hier die Stoffmenge (Produktsumme P1 = 52184 area, entspr. 1.02×10^{-4} μmol) erst wie oben mit 70, dann aber noch mit 8 multipliziert werden, denn aus dem verdünnten Sediment, das nach der Verdünnung immer noch die selbe Gesamtaktivität aufweist, wurde nur ein Achtel verwendet (1.02×10^{-4} $\mu\text{mol} \times 560 = 5.71 \times 10^{-2}$ μmol). Das entspricht etwa 8 % der Gesamtaktivität aus Ü1. Auf diese Weise lassen sich auch die Gesamtaktivitäten für Ü2 (99 %), P2 (12 %) und Ü3 (76 %) berechnen. Bezieht man P2 und Ü3 auf Ü2, ergeben sich Werte von 12 % bzw. 77 %.

2.6. Flavonol 3-O-Glucosyltransferase-Aktivitätsmessungen

Die Reaktionsbedingungen wurden der UDP-Glucose: Flavonoid 3-O-Glucosyltransferase aus *Vitis vinifera* angepasst [siehe FORD et al., 1998]. Es wurden für 1g Frischgewicht (Roggen- bzw. Gerste-Primärblätter) 6.25 ml Puffer (0.1 M Tris-HCl pH 8.0, 200 mg Polyclar AT, 200 mg Dowex (100-200 MESH), 12.5 μl 1M DTE, 100 μl Protease Inhibitor Cocktail) zur Extraktion verwendet. Es wurde nach dem oben beschriebenen Zentrifugationsschema vorgegangen. Im assay wurden 5 μl methanolische Cyanidinchloridlösung (entspricht ungefähr ~ 90 μM im assay) bzw. 85 μM Luteolin, Quercetin und 22 μl UDP-Glucose (entspricht 9 mM im assay), 33 μl Puffer (0.1 M Tris-HCl

pH 8.0, 2 mM DTE, 2 mg BSA/5ml) und 40 µl Ü2 bei 30°C für 0 - 12 min inkubiert. Die Reaktion wurde mit 100 µl MeOH / 1 % HCl gestoppt.

2.6.1. Gewinnung von Cyanidin-3-O-Glucosid aus Roggenprimärblättern mittels Dünnschichtchromatographie

5d alte Primärblätter wurden extrahiert und die Cyanidin-Glucoside mittels Dünnschichtchromatographie (*poly gram cel 400*, 0.1 mm mikrokristalline Cellulose, M&N, Düren) von anderen Flavonoid-Glycosiden getrennt [BUSCH et al., 1986]. Die Cyanidin-3-O-Glucosid-Bande wurde von der Platte gekratzt, in MeOH aufgenommen und als Referenzsubstanz zur HPLC eingesetzt (Retentionszeit 17.7 min). Cyanidinchlorid wurde von ROTH bezogen (Retentionszeit 24.7 min).

2.7. Inkubationen von Roggenwurzeln mit Luteolin

2.7.1. Inkubationsbedingungen

4d alte Pflanzen wurden in dafür hergestellte Kunststoff-Ständer eingepasst und in diesen in die passenden Bechergläser gestellt (siehe Abb. 21). Die Wurzeln wurden mit 10 ml 117 µM Luteolin-Inkubationslösung (Inkubationslösung ohne Luteolin als Kontrolle), die durch eine Aquariumpumpe belüftet wurde, benetzt (Stammlösung: 3.35 mg Luteolin (EXTRASYNTHESE) wurden in 2 ml EtOH gelöst und anschließend mit 8 ml H₂O versetzt, die Inkubationslösung setzte sich aus 1 ml Stammlösung und 9 ml 0.1 M KPi-Puffer pH 7 zusammen). Als Verdunstungsschutz diente Klarsichtfolie. Von den so "gefütterten" Wurzeln wurden nach 4 h, 8 h, 24 h MeOH-Extrakte erstellt. Die Exsudate wurden über LH-20-Säulen (Elution mit MeOH in 100 µl-Schritten, Fraktionen K-S "einzeln sammeln") eingeengt und per HPLC analysiert.



Abb. 21: Wurzelfütterungen. **Links:** Anzuchtbedingungen der Roggenpflanzen (Tag 1 - 4). Versuchsaufbau (**rechts**) der Fütterungen (Aquariumpumpe, Bechergläser mit Ständern, siehe Text).

2.7.2. Analyse der Methanolextrakte

Die Methanolextrakte der Wurzeln und Blätter wurden durch die HPLC mit dem Standardgradienten (siehe Punkt 2.4.1.) analysiert.

2.7.3. Analyse der Proteine

Die Proteinextraktion erfolgte nach dem oben beschriebenen Schema. Es wurden allerdings die ersten Schritte übergangen und die Probe direkt bei 170.000 x g zentrifugiert. So erstellte Wurzelproteine (Ü3) (Vergleich: Proteine gefütterter mit Proteinen nichtgefütterter Wurzeln) wurden auf einen SAX2-*chip* aufgetragen und durch den *protein-chip-reader* (siehe SELDI-Kapitel) analysiert.

2.8. SELDI-Analysen ^[CIPHERGEN]

Alle Analysen wurden mittels eines Z400-0010 Proteinchip-Autobiomarker-System der Firma CIPHERGEN (Komponenten siehe *ProteinChip Product & Service Catalog*) durchgeführt (Institut für Zell- und Molekularpathologie der Medizinischen Hochschule Hannover).

Alle Protein-*chips* wurden bei einer *detector sensitivity* von 10 (die *detector sensitivity* bestimmt die Amplifikation des *digitizers*) und einer *laser intensity* des *nitrogen*-Lasers von 300 (die *laser intensity* kontrolliert die Dosis des Laserlichts, welche die Probe ionisiert) gemessen. Das folgende *spot*-Protokoll wurde verwendet: Pro *chip* wurden 8 *spots* durchgemessen, von den 100 Positionen auf einem *spot* wurde jede zweite Position gemessen und der Mittelwert davon gebildet. Die Spektren wurden mit der Protein-*chip-software* Version 3.1 analysiert (CIPHERGEN).

2.8.1. SAX2-*chip* / Vergleiche von Wurzelproteinen

Die 4d alten Pflanzen wurden wie oben beschrieben gefüttert und deren Wurzelproteine (Ü3) mit KPi-Puffer extrahiert (siehe oben). 5µl jeder Probe wurden auf einen SAX2 (CIPHERGEN) aufgetragen und bei RT angetrocknet. Anschließend wurde die Proteinprobe vorsichtig von der *chip*-Oberfläche entfernt und diese 2 x mit KPi-Puffer sowie ein letztes Mal mit H₂O gewaschen. Als Matrix diente Sinapinsäure.

2.8.2. Antibody-capture

NP20-*chip*

Dieser *chip* wurde verwendet, um die Qualität und Konzentration der Antikörper zu testen. Es wurde je 3 x hintereinander (zwischendurch sollte die Probe vollständig trocknen) 5µl Antikörperlösung auf die *chips* aufgetragen. Anschließend wurden diese 3 x mit H₂O gewaschen. Als Matrix

diente Sinapinsäure, die für die Ionisierung großer Proteine gut geeignet ist (Antikörper haben eine Größe von ~ 120 kDa).

PG20-*chip*

Hierfür wurden 3 µl Antikörper auf die *chip*-Oberfläche appliziert (1h bei RT Inkubation in einer feuchten Kammer), 2 x mit PBS (siehe Abschnitt 6. Puffer, Lösungen und Medien, Seite 55) gewaschen, die Proteine immobilisiert und die unspezifischen Bindungen geblockt. Dann wurden 100 µl Ü3 (Blattproteine) im Bioprozessor (CIPHERGEN, der Bioprozessor ermöglicht eine Applikation von Volumen über 5 µl) bei 4°C ÜN langsam geschüttelt. Der *chip* wurde 2 x mit PBS + 0.1 % Tween gewaschen.

PS20-*chip*

Es wurden zuerst entweder 1 µl Protein-A-Lösung (1 µg/µl) mit 3 µl Antikörper vorinkubiert (1h RT, langsam schütteln) und dann an den *chip* gebunden (ÜN 4°C) oder zuerst Protein-A (1h RT, feuchte Kammer) an den *chip* gebunden und dann erst mit dem Antikörper inkubiert (ÜN 4°C). Ab hier wurde, wie schon für den PG20-*chip* beschrieben, vorgegangen.

2.8.3 Lectinbindungsassay

Hierbei wurde ähnlich vorgegangen wie beim PS20-*chip*. Der *chip* wurde entweder mit einem Gemisch aus 1 µl ConA (1 mg/ml in PBS, ROCHE) und 500 µM UDP-Glucuronat (2h RT vorinkubiert) oder zuerst mit ConA (1h RT in feuchter Kammer) und dann mit UDP-Glucuronat (1h RT in feuchter Kammer) beschichtet. Beide *chip*-Oberflächen wurden 2 x mit PBS gewaschen, die Proteine immobilisiert und die unspezifischen Bindungen geblockt. Dann folgte bei beiden Oberflächen eine Inkubation mit den Roggenprimärblatt-Proteinen (100 µl Ü3, Inkubation im Bioprozessor, ÜN bei 4°C). Der *chip* wurde 2 x mit PBS + 0.1 % Tween gewaschen, getrocknet und mit der Matrix (EAM1, CIPHERGEN) inkubiert. Der vollständig getrocknete *chip* stand nun den Messungen im *protein chip reader* zur Verfügung.

3. Pflanzen und Pflanzenanzucht

3.1. Kultivierung von Roggen und Gerste

Die Aussaat erfolgte für alle Anzuchten in Plastik-Töpfen (7 x 7 cm; Höhe 8 cm). Diese wurden mit einem 1:1-Gemisch von Einheitserde (Typ "T") und Torf gefüllt. Nach Andrücken der Erde mittels eines Brettchens wurde weiteres Gemisch darüber gesiebt. Die Karyopsen wurden in einem regelmäßigen räumlichen Abstand voneinander darauf ausgelegt.

An den ersten 3 Tagen jeder Anzucht waren die Keimlinge mit einer Platte aus Fensterglas abgedeckt.

3.2. Herstellung und Analyse transgener *A.thaliana*

Alle Arbeiten wurden mit dem *A. thaliana* Ökotyp Col-0 (Columbia (USA)) durchgeführt. Die Samen wurden vom Nottingham *Arabidopsis* Stock Center bezogen (NASC, N1093, M. Koorneef). Wildtyp und transgene Samen wurden auf Erde ausgesät und auf dieser über 3 Tage bei 4°C inkubiert.

3.2.1. Transformation von *Agrobacterium tumefaciens* ^[CLOUGH & BENT, 1998]

Die Transformation von *Agrobacterium tumefaciens* (Stamm GV3101) erfolgte durch Elektroporation. Herstellung elektrokompenter Agrobakterien:

Bakterien wurden von der Platte in 100 ml YEB-Medium (5 g *beef-extract*, 1 g *yeast-extract*, 5 g *peptone* 140, 5 g Saccharose, pH 7.2, ad 1 l) angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0.5 bei 28 °C unter Schütteln inkubiert, abzentrifugiert und zweimal in 1 mM HEPES-Puffer (siehe Abschnitt 6. Puffer, Lösungen und Medien, Seite 55), 10 % (v/v) Glycerin pH 7.5 gewaschen. Das Bakteriensediment wurde in 800 µl 1 mM HEPES-Puffer, 10 % (v/v) Glycerin pH 7.5 resuspendiert und in 50 µl-Ansätzen bei -80 °C gelagert.

Zu 50 µl elektrokompenten Agrobakterien wurde 1 µg Plasmid-DNA gegeben, vorsichtig gemischt und in eine Elektroporationsküvette überführt. In einem Elektroporationsgerät der Firma BIORAD erfolgte die Transformation (2.5 kV, 25 µF, 400 Ω).

3.2.1. Stabile Transformation von *A. thaliana*

Die stabile Transformation erfolgte mit der *Floral-Dip*-Methode ^[CLOUGH & BENT, 1998]. Die Anzucht der *A. thaliana*-Pflanzen (Ökotyp Col-0, jeweils 5 Pflanzen in einem Topf, 7 cm) erfolgte für drei bis fünf Wochen in Phytokammern unter Langtagbedingungen (UV-haltiges kaltes Weisslicht, 60% rel. Luftfeuchtigkeit, 16 h Licht, 8 h Dunkelheit). Um eine vermehrte Bildung von Sekundärfloreszenzen anzuregen, wurde die Primärfloreszenz abgeschnitten. Die Transformation erfolgte, solange die Mehrzahl der Blüten noch geschlossen war ^[DESFEUX et al., 2000]. Von den transformierten Agrobakterien wurde von der Platte eine Kolonie in 1 l YEB-Medium (Gentamycin: 25 µg/ml, Rifampicin: 100 µg/ml, Kanamycin: 50 µg/ml) angeimpft und über Nacht bei 28 °C unter Schütteln inkubiert. Diese Übernachtskultur wurde abzentrifugiert (20 min, 6000 rpm, 10 °C) und in einer 5 %igen Saccharoselösung resuspendiert. Zu 400 ml dieser Bakterien-Suspension wurden 200 µl Silwet L-77 (Union Carbide) als Detergens hinzugefügt. Die Töpfe mit den *A. thaliana*-Pflanzen wurden in die-

se Suspension getaucht, so dass die Infloreszenzen vollständig eintauchten, kurz geschwenkt und zum Trocknen horizontal auf Tücher gelegt. Bis zur Samenreife wurden die Pflanzen ins Gewächshaus gestellt, wobei in den ersten zwei Tagen nach Transformation die Pflanzen mit einer Haube bedeckt wurden.

Für die BASTA-Behandlung (1.366 ml der BASTA-Lösung (Glufosinat, 183g/l) wurden in 1 Liter destilliertem Wasser mit 0.1 % TWEEN gelöst) wurden jeweils ca. 300 - 500 Samen auf große Schalen Erde übertragen. Die Keimlinge wurden nach 5 - 8 Tagen (bis Primärblätter aller Keimlinge entwickelt waren) mit dem Herbizid BASTA nach Protokoll [TISSIER, *et al.*, 1999] behandelt. Die erfolgreiche Selektion wurde anhand parallel behandelter Col-0 Wildtyppflanzen kontrolliert. Geerntet wurden für den enzymatischen *assay* nur gesunde Blätter, die sofort nach dem Abschneiden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert wurden. Zur Propagierung der Linien wurden reife Samen geerntet.

3.3. Kultivierung von Tabak

Nicotiana tabacum cultivar Petit Havana SR1 wurde im Gewächshaus in Standarderde (DE73) kultiviert, bis die Blätter eine Größe von ungefähr 12 cm Länge erreicht hatten. Diese Blätter wurden für die Vakuuminfiltration eingesetzt.

3.3.1. Transformation von SR1 durch Vakuuminfiltration von Agrobakterien [VAQUERO *et al.*, 1999]

Ein Liter Agrobakteriensuspension (Anzucht siehe oben) wurde zur Infiltration verwendet. Die Bakterien wurden pelletiert (5000 x g, 20 min bei 15°C) und in Infiltrationsmedium (10 mM MES, 10 mM Glutamin, 20 g/l Saccharose, eingestellt auf pH = 5.6, nach dem Autoklavieren wurde Acetosyringon, Endkonzentration 200 μM hinzugefügt) bis zu einer optischen Dichte von $\text{OD}_{600} = 1$ resuspendiert. Die Blätter wurden nun in die Bakteriensuspension getaucht, beschwert, so dass alle komplett bedeckt waren, und so in den Exsiccator gestellt. Nun wurde ein Vakuum von 20 - 60 mbar für ~ 20 min angelegt. Die Blätter wurden nun auf mit H_2O befeuchtetes Whatman-Papier gelegt, mit Klarsichtfolie abgedeckt und bei 23°C (bei 16 h Licht) für 60 h inkubiert. Dann erfolgte die Analyse mit dem Fluoreszenzmikroskop.

3.3.2. Isolierung von Protoplasten aus *Nicotiana tabacum* L. cv. BY2

100 ml einer 3 - 4 Tage alten BY2-Zellsuspension (siehe Abschnitt 6. Puffer, Lösungen und Medien, Seite 55) wurden durch ein 50 μm -Sieb in einen Erlenmeyerkolben gegeben und mit 10 ml MaMg-Lösung (siehe Abschnitt 6. Puffer, Lösungen und Medien, Seite 55) gewaschen. Die Protoplasten wurden anschließend bei 28°C für mindestens 2 h auf einem Rotationsschüttler mit 60 rpm

in 40 ml Enzymlösung (450 mM Mannitol, 1 % [w/v] Cellulase, 0.1 % [w/v] Pectolyase) verdaut. Eine Zentrifugation von 5 min bei 100 x g separierte die flottierenden Protoplasten von den pelletierten Zelltrümmern. Medium und Gewebereste wurden mit einer peristaltischen Pumpe abgesaugt und die Protoplasten mit W5-Lösung (siehe Abschnitt 6. Puffer, Lösungen und Medien, Seite 55) durch eine weitere Zentrifugation bei 100 x g pelletiert. Anschließend wurden die Protoplasten in MaMg-Lösung resuspendiert, gezählt und auf eine Dichte von 3×10^6 Zellen/ml eingestellt.

Transfektion von Tabak-Protoplasten für GFP-Fusionen

330 µl Protoplasten in MaMg-Lösung wurden mit 600 µl 25 % PEG 1500, je 5 µg Plasmid-DNA und 50 µg Lachsspermien-DNA gemischt und anschließend für 20 min bei 28°C im Dunkeln inkubiert. Die Protoplasten wurden mit K3-Lösung (siehe Abschnitt 6. Puffer, Lösungen und Medien, Seite 55) auf 10 ml aufgefüllt und anschließend 20 - 24 Stunden erneut bei 28°C im Dunkeln inkubiert.

3.4. Transiente Transformation von Gerstebblättern durch *particle bombardment*

Das *biolistic-particle-delivery-system* ist eine Transformations-Methode, die Helium-Druck verwendet, um an *microcarrier* (Gold) gebundene DNA in Zellen einzubringen. Es wurde das *particle delivery system biolistic* PDS-1000/He der Firma BIORAD verwendet (Abb. 22). Das System verwendet hohen Helium-Druck, der über eine *rupture disk* freigesetzt wird. Die *microcarrier* werden auf *macrocarrier* appliziert, welche beim Schuss durch einen *stopping screen* aufgehalten werden, so dass nur das Gold auf die Probe trifft (genaueres siehe BIORAD-manual).



Abb. 22: Particle Delivery System Biolistic PDS-1000/He der Firma BIORAD (MPIZ-Köln).

3.4.1. Kultivierung der Gersteprimärblätter

Zehn Tage alte Blätter werden mindestens 4 h vor dem *bombardment* auf eine Benzimidazol enthaltende Wasser-Agar-Platte gelegt (1 % Agar und 85µM Benzimidazol).

3.4.2. Particle bombardment

Macrocarriers: Die *macrocarrier* werden in den *macrocarrier*-Halter eingefügt. *Rupture disks*: Die sterilisierten *rupture disks* (1100 psi) werden, bevor sie in die *retaining cap* eingepasst werden, mit 70 % Isopropanol angefeuchtet. *Stopping screens*: Diese müssen vor Benutzung autoklaviert werden. Waschen der *microcarrier* [SANFORD et al., 1993]: Die folgende Prozedur gilt für 10 *bombardments*, die *microcarrier* sind für ungefähr zwei Wochen bei 4°C haltbar. 30 mg 1µm Gold (BIORAD) werden abgewogen und mit 1 ml 70 % EtOH versetzt, gevortext und 3 bis 5 min kräftig geschüttelt (Platformvortexer). Durch eine 15 min Sedimentierungsphase bei RT und 1 x g mit anschließender sehr kurzer Zentrifugation werden die Partikel vorsichtig sedimentiert. Das Sediment wird 3 x auf die selbe Art gewaschen: 1 ml steriles Wasser hinzufügen, für eine Minute vortexen, 1 min 1 x g, 5 sec *spin*. Beim letzten Mal wird das Sediment in 500 µl sterilisiertem 50 %igem Glycerin resuspendiert. *Coating der microcarrier*: Dies sollte ungefähr 1h vor dem *bombardment* durchgeführt werden. Die *microcarrier* werden für 5 min auf einem Platformvortexer geschüttelt. Während des Schüttelns werden 50 µl entnommen und in ein neues Eppendorftube überführt. Während des Schüttelns werden 5µl (1µg/µl) DNA, 50 µl (2.5 M) CaCl₂ (tropfenweise) und 20 µl (0.1 M) Spermidin hinzugefügt. Das Gemisch wird nun für weitere 2 bis 3 min geschüttelt. Das Sediment (1 min 1 x g, 2 sec *spin*) wird einmal in 140 µl 70 % EtOH, in 140 µl 100 % EtOH und zuletzt in 60 µl 100 % EtOH resuspendiert. Die so erstellten beladenen *microcarrier* werden bis zu ihrer Verwendung auf Eis aufbewahrt.

Vor jedem *bombardment* ist es wichtig, den Helium-Druck zu kontrollieren und die Kammer sehr gründlich mit EtOH zu reinigen, um Kontaminationen zu vermeiden. Die sterile *rupture disk* wird in die sterile *retaining cap* gesetzt und diese gut festgeschraubt. Die *macrocarrier* werden mit je 7 µl *microcarrier* Lösung beladen und zusammen mit dem *stopping screen* in die Vakuumkammer eingeführt. Das Vakuum wird angelegt und am gewünschten Punkt aufrechterhalten. Dann wird der *fire button* gedrückt, bis die *rupture disk* platzt.

4. Rechnergestützte Sequenzanalysen

4.1. DNA-Sequenzierung und Auswertung

DNA-Sequenzierungen wurden von der Servicegruppe ADIS des Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung (MPIZ) Köln mit Hilfe eines automatischen Verfahrens der Firma Applied Biosystems nach der Didesoxymethode [SANGER et al., 1977] durchgeführt. Die erhaltenen Sequenzinformationen wurden mit den Programmen der *unix*-basierenden Software GCG *bestfit*, *gap* und *pileup* (GCG-Softwarepaket *Wisconsin Package Version 10.0*, Genetics Computer Group, Madison, Wisc.,

USA) ausgewertet. Folgende Internet-basierenden Programme und Datenbanken wurden bei den Analysen eingesetzt:

BLAST (<i>Basic Local Alignment Search Tool for comparing gene and protein sequences against others in public databases</i>)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/ http://www.ebi.ac.uk/fblast/
FASTA	http://www.ebi.ac.uk/fasta33/
NCBI (<i>National Center for Biotechnology Information</i>)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov
ClustalW	http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW.html http://www.ebi.ac.uk/clustalw/
Boxshade	http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html
MatInspector V2.2	http://transfac.gbf.de

5. Mikroskopie

Die fluoreszierende Qualle *Aequorea victoria* produziert beim Energietransfer vom Ca^{2+} -aktivierten Photoprotein Aequorin zum grün fluoreszierenden Protein (GFP = *green fluorescent protein*) Licht [SHIMOMURA et al., 1962]. GFP kann, heterolog exprimiert, als Reporter-Gen dienen [CHALFIE et al., 1994] (belichtet mit blauem oder UV-Licht leuchtet es grün). Mutationen im GFP können zu andersfarbigen fluoreszierenden Proteinen führen. In dieser Arbeit wurden neben EGFP (E = *enhanced*) auch EYFP (*enhanced yellow fluorescent protein*) und ECFP (*enhanced cyan fluorescent protein*) verwendet. EYFP / ECFP weisen vier / sechs Aminosäure-Austausche auf, die das Emissionsspektrum vom grünen zum gelb-grünen / cyanen hin verlagern [HEIM & TSIEN, 1996]. ECFP kann als Donor-Molekül bei FRET-Studien (siehe Ergebnisteil 7.2.) dienen [KENWORTHY, 2001].

Das rot fluoreszierende Protein stammt aus *Discosoma genus* (*Discosoma* sp. = Ds).

Protein	<i>excitation maxima</i> (nm)	<i>emission maxima</i> (nm)
EGFP	488	507
EYFP	513	527
ECFP	433 (453)	475 (501)
DsRed	558	583

Die detaillierte Analyse der intrazellulären Fluoreszenz wurde mit einem *confocal laser scanning microscope* (CLSM, MPIZ-Köln) durchgeführt (ZEISS, LSM 510 *microscopy system*, als *excitation source* diente ein Argon-Laser). Die CFP-Fluoreszenz wurde durch einen HFT 458 *dichroic mirror* und einen BP 470-500 *band pass emission filter* detektiert. Die YFP-Fluoreszenz wurde durch HFT 514 *dichroic mirror* und einen BP 535-590 *band pass emission filter* detektiert. Es wurde ein 25 x Plan-Neofluar-Wasserimmersions-Objektiv verwendet. Die Bilder wurden mit der Zeiss LSM510-*software* analysiert.

6. Puffer, Lösungen und Medien

BY2-Kulturmedium	MS plant salt mixture, 3% Sucrose, 200 mg/l KH_2PO_4 , 1 mg/l Thiamin-HCl, 0.2 mg/l 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 100 mg/l Myoinositol
Denaturierungslösung	0.5 M NaOH, 1 M NaCl
Denhardts (100x)	2% [w/v] Ficoll, 2%[w/v] Polyvenylpyrrolidon – 360, 2% [w/v] BSA Fr.V
DEPC-H₂O*	1 ml DEPC auf 1l Wasser, ÜN rühren, dann autoklavieren
DNA-Ladepuffer (10x):	10 x TAE, 50% [v/v] Glycerin, 0,5% [w/v] Bromphenolblau, 0,5% [w/v] Xylencyanol FF
DYT*	10 g Hefeextrakt, 16 g Trypton, 5 g NaCl, (+15 g Agar f. Festmedium) ad 1l
Elektrophoresepuffer für Proteingele (10x)	3,028% [w/v] Tris, 14,4% [w/v] Glycin, 1% [w/v] SDS
Hybridisierungslösung	150 ml 20 x SSPE, 0.1% SDS, 0.2 g Polyvinylpyrrolidon 360, 0.2 g Ficoll 400, ad 1l H ₂ O
IPTG	0.1 M in Wasser, davon 2 ml auf 1 l Medium
K3-Lösung:	4,3 g/l MS, 0,4 M Saccharose, 100 mg/l Inosit, 250 mg/l Xylose, 1 ml/l Vitamine, pH 5.8
MaMg-Lösung:	450 mM Mannitol, 15 mM MgCl_2 , 0,1% [w/v] MES, pH 5.8
MOPS (10x)	0.2 M MOPS pH 7, 50 mM NaOAc, 1 mM EDTA pH 8
Neutralisierungslösung	3 M NaCl, 0.5 M Tris, auf pH 7.5 einstellen
NZCYM*	15 g NZ-Amine, 5 g NaCl, 2 g Casaminoacids, 5 g Hefeextrakt, 25 ml 1 M Tris pH 7.4, 5 ml 1 M MgSO_4 ad 1l
Prähybridisierungslösung	300 ml 20xSSPE, 0,1% SDS 1 g SDS o. 10ml 10%, 0,2 g PVP 360, 0,2 g Ficoll 400
Proteinblot-Puffer	25 mM Tris-HCl pH 8.3, 192 mM Glycin, 20% Methanol
RNA - Probenpuffer	0,324 ml Formaldehyd 37 %, 1,4 ml Formamid, 0,06 ml 0,5 % Bromphenolblau (BPB), 0,2 ml 10xMOPS, 0,08 ml 25 % Ficoll, ad 200 ml Glycerin
RNA Gel	1,2 g Agarose, 88 ml Wasser, 12 ml 10xMOPS, 20 ml Formaldehyd 37 %
RNA-Gel-Laufpuffer	24 ml Formaldehyd 37 %, 60 ml 10xMOPS, auf 600 ml mit Wasser auffüllen
SDS-Protein-Probenpuffer:	62,5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 10% [v/v] Glycerol, 2% [w/v] SDS, 5% [v/v] β -Mercaptoethanol, 0,1% [w/v] Bromphenolblau
SM-Puffer:	50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM NaCl, 8 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01% [w/v] Gelatine*
SOC-Medium	100 μ l 2 M Glukose, 100 μ l $\text{MgCl}_2/\text{MgSO}_4$, auf 10 ml DYT-Medium
SSC (20x):	3 M NaCl, 300 mM Natriumcitrat pH 7.0
SSPE (20x)	20 mM EDTA, 0.2 M NaH_2PO_4 , 3 M NaCl, auf pH 7 einstellen
TAE (10x):	400 mM Tris-Acetat, 200 mM Natriumacetat, 20 mM EDTA, pH 8.2
TBE (10x):	1 M Tris-HCl, pH 8.3, 1 M Natriumborat, 20 mM EDTA
TE (1x):	10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA*
TTBS (1x):	50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5 nach dem Autoklavieren Zugabe von 0,05% Tween 20
W5-Lösung:	154 mM NaCl, 125 mM CaCl_2 , 5 mM KCl, 5 mM Glucose, pH 5.8
X-Gal	0.2 g in 10 ml DMF, davon 2 ml auf 1 l Medium

* Die gekennzeichneten Puffer wurden 30 min bei 121°C und 2 bar autoklaviert.

IV. ERGEBNISSE

Innerhalb dieser Arbeit sollten einerseits die DNA-Sequenzen der für die Biosynthese der Luteolin-glucuronide verantwortlichen Enzyme auf molekularbiologischem Wege aufgeklärt und andererseits die Enzyme im Roggensystem biochemisch charakterisiert werden. Der biochemische Weg sollte nicht die klassische Enzymreinigung beinhalten, da diese schon diverse Male erfolglos versucht wurde. Bisher sind in der Literatur noch keine molekularen Daten über pflanzliche Glucuronosyltransferasen der Gruppe GT-1 (siehe Anmerkung zur Nomenklatur) zugänglich.

Anmerkung zur Nomenklatur: Für die Untergruppe 1 der Glycosyltransferase-Multigenfamilie kursieren in der Literatur verschiedene Bezeichnungen: **UDP-GlycosylTransferasen**, **UGTs**, **GlycosylTransferase Untergruppe-1**, **GT-1**. Dazu zählen Enzyme, die die ProSite-Konsensussequenz PS00375 tragen, wie die humanen Detoxifikations-Glucuronosyltransferasen (humane UDP-Glucuronosyltransferasen = **hUGTs**, z.B. Bilirubin- oder Xenobiotika-Detoxifikation) und die pflanzlichen Flavonol-3-O-Glucosyltransferasen (**F3GT**). In diesen Glycosylierungsreaktionen werden reaktive und zum Teil toxische Aglyca in stabilere, nichtreaktive Konjugate überführt, die als Speicherformen dienen können (genauer siehe Einleitung). Im folgenden werde ich die pflanzlichen Glucuronosyltransferasen als **plantUGTs** (speziell die *Secale cereale* Glucuronosyltransferasen als **scUGT**) bezeichnen, um sie von der putativen Glucuronosyltransferase (**sbUGT** aus *Scutellaria baicalensis* [Korrespondenz mit Nagashima, unveröffentlichte, persönliche Mitteilung (2000), siehe aber auch NAGASHIMA et al., 2000]) und den übrigen pflanzlichen Glycosyltransferasen, den **GTs**, zu unterscheiden.

1. Screening einer genomischen Roggen-DNA-Bank mit heterologen Sonden

Die bisherigen Bemühungen, Glucuronosyltransferasen aus Roggen zu isolieren, waren biochemischer Natur, z.B. durch eine Folge von Ultrogel AcA 44-, Sephadex G-25-, DEAE-Cellulose-Säulenchromatographie und eine Hydroxylapatit-Ultrafiltration [SCHULZ und WEISENBÖCK, 1988].

Dies führte jedoch leider nie zu vollständig reinen, sequenzierbaren Proteinen. Eine weitere Möglichkeit, ein unbekanntes Enzym zu isolieren, besteht darin, sein Gen durch das Durchmustern einer DNA-Bibliothek mit ähnlichen, schon bekannten Genen zu finden. Die sorgfältige Wahl der für das *screening* verwendeten heterologen Sonden ist von großer Bedeutung.

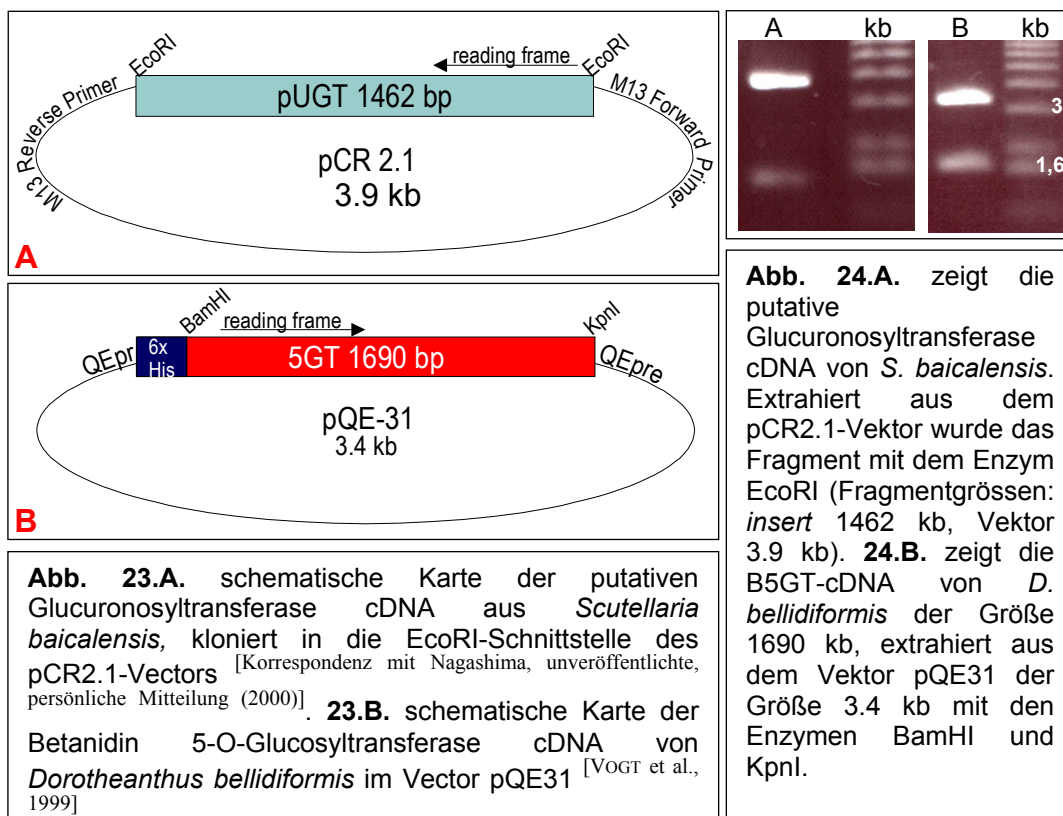
1.1. Wahl der heterologen Sonden

Eine Möglichkeit, die heterologen Sonden zu wählen, besteht darin, die homologen Proteine aus verwandten Organismen zu verwenden. Da bis jetzt jedoch keine plantUGT in ähnlichen Organismen (z.B. in anderen Gräsern) beschrieben wurde, mussten andere Strategien gewählt

werden. Als Sonden wurden (1.) die *UGTs* aus nicht verwandten Organismen, aber auch (2.) andere Glycosyltransferasen mit ähnlichen Substrateigenschaften verwendet.

(1.) Zunächst stand uns die cDNA einer bisher - noch nicht veröffentlichten - putativen Flavonoid-Glucuronosyltransferase aus *Scutellaria baicalensis* zur Verfügung (*sbUGT* = putative UGT). Bei dem biochemisch gereinigten Enzym handelt es sich um die oben beschriebene Baicalein-7-*O*-Glucuronosyltransferase [Korrespondenz mit Nagashima, unveröffentlichte, persönliche Mitteilung (2000), siehe aber auch NAGASHIMA et al., 2000]. Die Überprüfung der entsprechenden DNA-Sequenz mittels heterologer Expression und der nachfolgend notwendige Enzymassay stehen aber bis heute aus (Abb. 23.A, 24.A.). Eine weitere Möglichkeit bestand darin, Entgiftungs-Glucuronosyltransferasen des Menschen auszuwählen. Dazu stand uns ein Pool von humanen UGT1 und -2 zur Verfügung (siehe cDNA-library screen). Das Problem, das bei diesen Enzymen natürlicherweise auftritt, ist die phylogenetische Distanz vom Roggen zum Menschen und die damit verbundenen Unterschiede z.B. in der verwendeten *codon usage*.

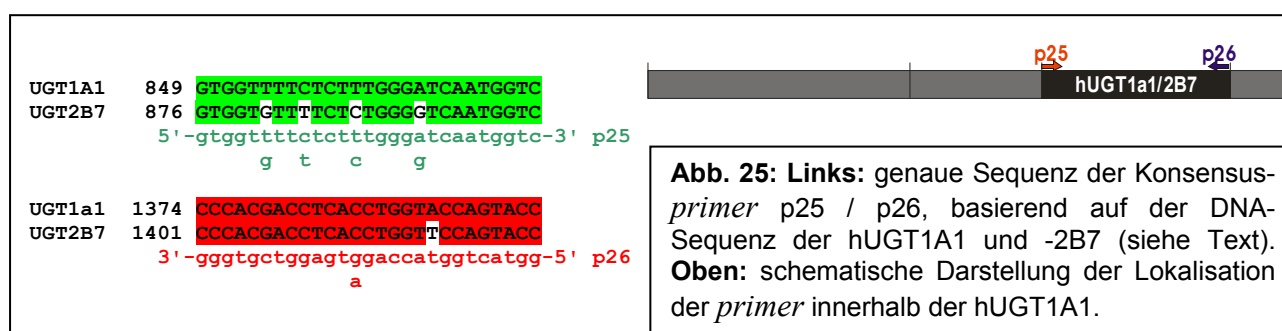
(2.) Des weiteren besteht die Möglichkeit, Enzyme mit ähnlicher Funktion, d.h. andere bekannte Flavonoid-Zuckertransferasen, zu wählen. Allen UDP-Glycosyltransferasen, unabhängig davon, ob sie UDP-Glucose oder UDP-Glucuronsäure als Cosubstrat verwenden, ist die oben beschriebene Zuckerbindungsbox (PSPG-Box) gemeinsam (genauer siehe 1.1.1.). Dies eröffnete uns die Möglichkeit, eine Entgiftungsglycosyltransferase aus einem ähnlichen Organismus (z.B. aus



anderen Gräsern) oder eine, die ein ähnliches (z.B. anderes Flavonoid) oder sogar das gleiche Substrat (Luteolin) verwendet, in unserem *screening* als Sonde einzusetzen. Wichtiger erschien uns jedoch, auf die in vielen Publikationen erwähnte Stereospezifität Wert zu legen (genauer siehe 1.1.2.). Das heißt, es erschien uns wichtig, ein Enzym zu wählen, das zwar ein anderes Substrat und Cosubstrat bevorzugt, jedoch bei dem Substrat den Zucker an eine stereochemisch ähnliche Position addiert (wie z.B. die Betanidin-5-*O*-Glucosyltransferase (B5GT) aus *Dorotheanthus bellidiformis*, siehe unten, Abb. 23.B, 24.B.).

1.1.1. Untersuchungen zur Aminosäure-Homologie

Man unterteilt die Zuckertransferasen in eine konservierte Region (C-terminal) und eine variable Region (N-terminal, siehe Einleitung). In der variablen Region befindet sich die Substratbindungsstelle, die von Pflanze zu Tier sehr stark variiert (*alignment* siehe Anhang 6.1; *accession number* Pflanzen siehe Tabelle 1 Einleitung, *accession number* Tier siehe Tabelle 6.5. Anhang). Innerhalb der konservierten Region der Zuckertransferasen befindet sich die Zuckerbindungsbox (siehe Anhang 6.2. und vergleiche auch <http://www.expasy.org/prosite/>). Diese weist speziesübergreifende, hoch konservierte Aminosäuren auf. Innerhalb der Transmembrandomäne sind kaum Homologien zu erkennen (siehe Anhang 6.3.). Darauf basierend erschien es uns sinnvoll, einerseits nur die Zuckerbindungsbox der humanen UGTs und andererseits die kompletten cDNAs pflanzlicher UGTs zu berücksichtigen. Die Zuckerbindungsbox der humanen UGTs wurde mit degenerierten *primern* (p25 / p26, siehe Abb. 25) in einer Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert. Als *template*-DNA diente ein *pool* aus UGT-1A1 und -2B7 (Vektoren siehe Anhang, 3.3.).



1.1.2. Stereochemie

Eine Glycosylierung an der C5-Position führt zu stabileren Komplexen in der Copigmentierung von Anthocyanen. Dies ergibt eine strahlende radieschenrote Farbe [YAMAZAKI et al., 1999]. Betalaine, rote Betacyanine und gelbe Betaxanthine ersetzen die Anthocyane in Blüten und Früchten der meisten Familien der Caryophyllales. Im Gegensatz zur gut untersuchten Anthocyanbiosynthese ist die

Betalainbiosynthese nur wenig verstanden. So wie Anthocyane werden Betacyane als Glucoside in der Vakuole gespeichert.

Die Biosynthese dieser Glucoside in *Dorotheanthus bellidiformis* wird unter anderem durch eine Betanidin-5-O-Glucosyltransferase katalysiert. Betrachtet man im Enzymassay mit dem heterolog exprimierten Enzym die Substratspezifität der B5GT, so stellt man fest, dass sie - wie zu erwarten war - ihr natürliches Substrat Betanidin (siehe Abb. 26) am besten umsetzt

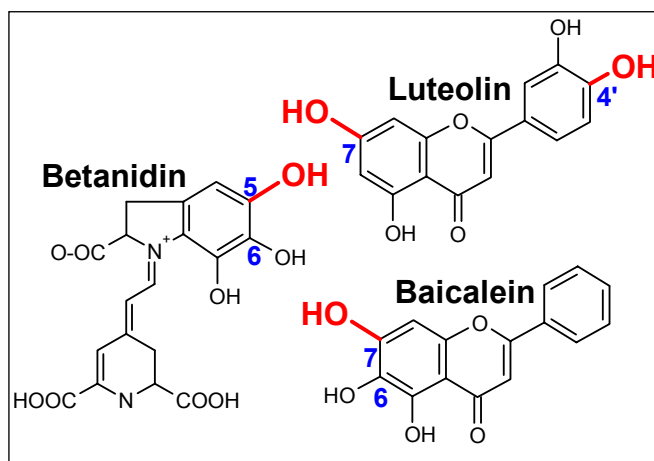


Abb. 26: Darstellung der Strukturformeln von Betanidin, Baicalein und Luteolin. Rot markiert sind die jeweiligen "stereochemisch ähnlichen" (siehe Text) OH-Gruppen.

($V_{\max}/K_m = 30$). Die Flavonoide Quercetin und Luteolin werden jedoch an der stereochemisch homologen 4'-OH-Position auch noch relativ gut glucosyliert ($V_{\max}/K_m = 12$ und 3.1). Dieses Enzym produziert aber keine Betanidin-6-O-Glucoside oder deren Homologe. Das heißt, die Orthodihydroxystruktur am B-Ring der Flavonoide scheint dem aromatischen Ring des Betanidins homolog zu sein (vergleiche die in Abb. 26 dargestellten Strukturformeln des Betanidins, Luteolins und Baicaleins). Wenn Flavonoide mit monohydroxyliertem B-Ring als Substrate im *assay* eingesetzt wurden, wurden diese nur sehr schlecht oder gar nicht umgesetzt [VOGT et al., 1999].

Bei der heterologen Expression der *Arabidopsis*-UGT71C1 konnte ein ähnliches Ergebnis beobachtet werden. Das natürliche Substrat dieses Enzyms ist die Kaffeesäure, die an der 3-Position glucosyliert wird. Im *assay* wurden unterschiedliche Hydroxyzimtsäuren (o-Cumarsäure, m-Cumarsäure, p-Cumarsäure, Kaffeesäure, Ferulasäure, Isoferulasäure und Sinapinsäure) getestet, wobei jeweils die, die die OH-Gruppe an der C4-Position trägt, als Substrat nicht akzeptiert wurde. Die Flavonoide Quercetin und Luteolin wurden an der 3'- und der 7-Position glucosyliert [KIM et al., 2003].

1.2. Wahl der Roggen DNA-Bank

Es können sowohl genomische als auch cDNA-libraries zum *screening* mit heterologen Sonden verwendet werden. Da das Maximum der Produktakkumulation von R₁ bei etwa 7 Tagen liegt, erschien es uns sinnvoll, eine cDNA-library von Primärblättern dieses Entwicklungsstadiums zu verwenden. Da aber weder eine cDNA-Bank (siehe später: cDNA-Bank von T.Berberich) dieses Stadiums noch eine genomische Bank vorlag und wir auch an den Exon- / Intronstrukturen bzw. an Promotor-sequenzen interessiert waren, wurde eine genomische Roggen-DNA-Phagenbank erstellt.

1.3. Erstellung einer EMBL3-Phagenbank aus partiell geschnittener genomischer Roggen-DNA

Zur Erstellung der genomischen Roggen-Phagenbank wurde zunächst DNA von 7 Tage alten Primärblättern präpariert ^[DOYLE, 1990] (Abb. 27.A) und diese zur Analyse partiell (0 min, 5 min, 10 min bis 65 min, 70 µg DNA) mit der Restriktionsendonuclease NdeII geschnitten. In der Zeitspanne

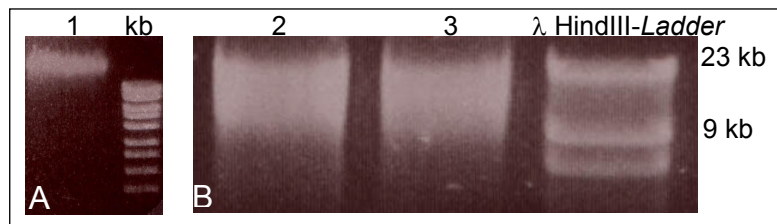


Abb. 27.A.: 1 = Genomische Roggen-DNA, ungeschnitten. Konzentration 100 ng/µl. Aufgetrennt auf einem 0.4 %igen Agarosegel.

Abb. 27.B.: 2 = 45 min mit NdeII geschnittene Roggen DNA. 3 = 55 min mit NdeII geschnittene Roggen-DNA.

von 45 min bis 55 min ergaben sich Fragmente der erwünschten Größe (Abb. 27.B.). Die Fragmente wurden aus dem Gel extrahiert und in einem Reaktions-volumen von 20 µl 200 ng DNA in den EMBL3-Phagen über Nacht bei 12° C ligiert. Aus diesem Ligationsansatz wurden 5 µl in Phagenpartikel verpackt und die fertigen Phagen zur Titration eingesetzt. Der Titer der amplifizierten Phagenbank betrug 2×10^9 pfu's (Originaltiter 8.4×10^6). Die so erstellte Phagenbank wurde für das *screening* mit heterologen Sonden eingesetzt.

1.4. Screening der λ-EMBL3-Phagenbank mit heterologen Sonden

Zur Durchmusterung der genomischen Roggen-Phagenbank wurden 7 ml der amplifizierten *library* (2×10^9 pfu's) zur Infektion von 3 ml (8×10^9 Bakterien pro ml) XL1-blue-MRA-Zellen eingesetzt. Diese wurden zum Anfertigen von Replikafiltern auf 50 Petrischalen (90 mm) ausplattiert. Die Filter wurden mit zwei unterschiedlichen Sonden unter wenig stringenten Bedingungen getrennt inkubiert: (1.) der Betanidin-5-*O*-Glucosyltransferase-cDNA (B5GT) von *Dorotheanthus bellidiformis* und (2.) einer putativen Flavon-(Baicalein ?)-Glucuronosyltransferase-cDNA (*sbUGT*) von *Scutellaria baicalensis*.

Um Kontaminationen auszuschließen, wurden die positiven, "spitz gestochenen" Phagenklone (21 Stück) erneut in geringer Konzentration zur Infektion eingesetzt. Von diesen so vereinzelt Phagen wurden nun jeweils 2-3 extrahiert, sodass 21 Klone aus dem *screening* mit der *B5GT*-Sonde und 34 Klone aus dem mit der *sbUGT*-Sonde hervorgingen. Die Lysate dieser 55 Phagen wurden auf Nitrozellulosefilter aufgetragen (Abb.

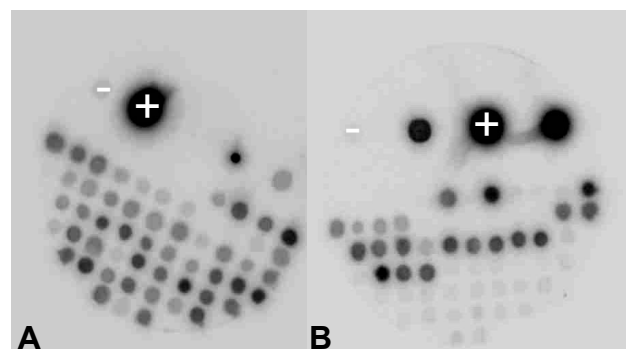


Abb. 28.A.: Phagen-DNA (55 Lambda-Lysate) auf Nitrocellulosefilter aufgetragen und diese mit der *sbUGT*-Sonde inkubiert. **28.B.:** Inkubation der Membran mit der *B5GT*-Sonde.

28) und diese jeweils mit beiden Sonden inkubiert (Kreuzhybridisierung). Aus der Analyse dieser Nitrozellulosefilter ergab sich, dass die *B5GT*-Sonde nur mit solchen Klonen hybridisierte, die auch aus dem *screen* mit der *B5GT*-Sonde stammten, nicht aber mit Klonen aus dem *sbUGT-screen*. Die *sbUGT*-Sonde hingegen hybridisierte mit nahezu allen Klonen. Daraus lässt sich schließen, dass die *sbUGT*-Sonde sehr viel unspezifischer bindet (siehe hierzu Diskussion). Da es sich aber um einen *screen* mit einer heterologen Sonde handelte, war zu diesem Zeitpunkt noch nicht abzusehen, ob das unspezifischere Binden dieser Sonde von Vor- oder Nachteil sein würde.

Um die Klone genauer zu untersuchen, wurde von jeweils einem positiven Repräsentanten der 21 Phagen eine DNA-Präparation vorgenommen. Diese DNA wurde mit dem Enzym Sall, welches das *insert* komplett aus dem Phagen extrahiert, geschnitten. Diese geschnittene DNA wurde mittels SOUTHERN-*blot* auf eine Membran übertragen und konnte so wieder einer Hybridisierung (und einer Kreuzhybridisierung) mit den heterologen Sonden zur Verfügung stehen. Es stellte sich heraus, dass Klone Nummer 5, 8-10, 13,14,18, 20 und 21 trotz des positiven Ergebnisses innerhalb des *screening* negativ waren. Die Tabelle 3 ist eine Zusammenfassung der Hybridisierungsergebnisse der Phagen-DNA. Die Phagen-DNA-Analyse ergab des weiteren, dass einige dieser Klone doppelt auftraten. Die hybridisierenden Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten (siehe Pfeile, Abb. 29) und in einen Sall geschnittenen Vektor (pUC18) ligiert.

DNA Nummer	Hybridisierung mit <i>B5GT</i>	Hybridisierung mit <i>sbUGT</i>	DNA Nummer	Hybridisierung mit <i>B5GT</i>	Hybridisierung mit <i>sbUGT</i>
1	+	+	11	-	+
2	+	+	12	-	+
3	-	+	13	-	-
4	+	+	14	-	-
5	-	-	15	-	+
6	+	+	16	-	+
7	-	+	17	-	+
8	-	-	18	-	-
9	-	-	19	-	+
10	-	-	20	-	-
			21	-	-

Tabelle 3: Zusammenfassung der Hybridisierungsergebnisse der Phagen-DNA. Dunkel unterlegt sind DNAs, die sich bei der Hybridisierung mit beiden heterologen Sonden als negativ herausstellten. Doppelt positiv waren nur DNAs aus dem *B5GT-screen* (DNA 1,2,4 und 6).

1.5. Analyse der Subklone

Die folgende Analyse der Subklone erfolgte auf unterschiedliche Weise. Zuerst wurden die Subklone noch einmal mittels Hybridisierung überprüft; das Ergebnis von Abb. 29 ließ sich bestätigen. Dann wurden sie einer DNA-Sequenzierung mit den das Fragment flankierenden *primern* (unil, revl) unterzogen. Bei Klon K64 und K63 ergab dies bereits erste Sequenzinformationen der *scUGTs* (siehe Anmerkung zur Subklon-Namensgebung). Aufgrund dieser Sequenzinformation wurden roggenspezifische *primer* erstellt. Diese dienten dazu, Klone, die dasselbe Gen tragen, mittels einer spezifischen PCR-Analyse auszuschließen. Es stellte sich heraus, dass das *primer*-Paar p12-p13 (siehe Oligonukleotid-Liste sowie Sequenz- / schematische Darstellung von deren Lage innerhalb der *scUGT*-Gene; Anhang 2.1., 2.2.) sowohl bei K64 als auch bei K63 ein spezifisches Produkt ergab, so dass diese für die folgende Analyse verwendet wurden. Positiv waren alle Subklone von Phagen-DNA 1,2,4 und 6. Keiner der Klone, die aus dem *scUGT-screen* stammten, war mit diesen *primern* positiv, auch nicht bei niedriger *annealing*-Temperatur. Die Subklone wurden auch mit Konsensus-*primern* (C3 und C8r, siehe Ergebnisteil 2.) untersucht, wobei sich das gleiche Ergebnis

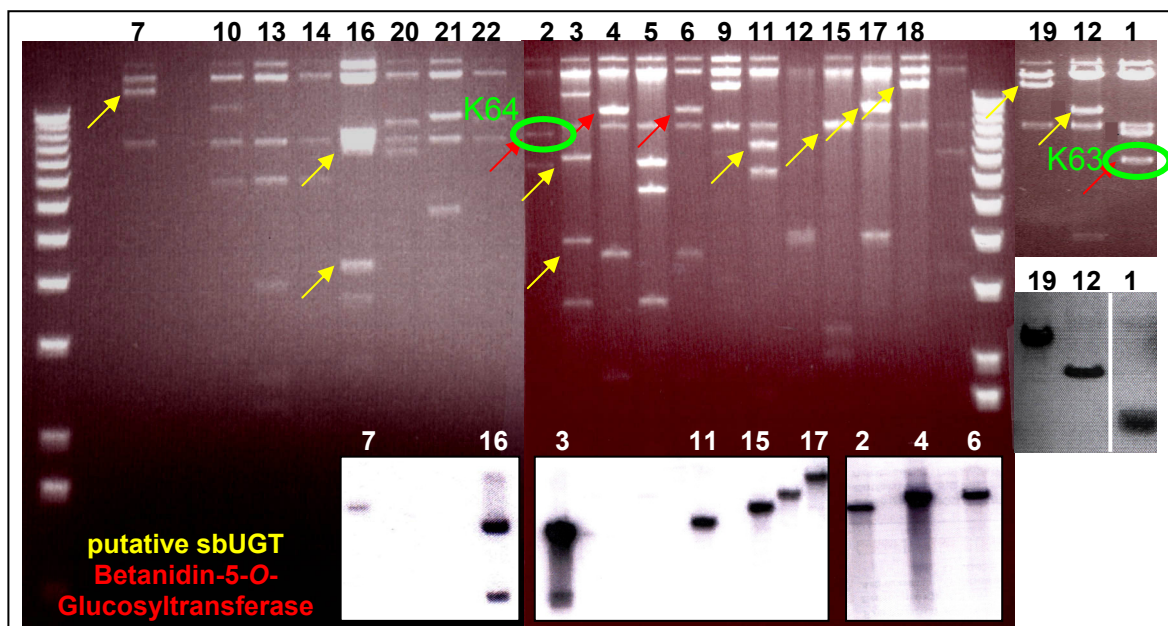
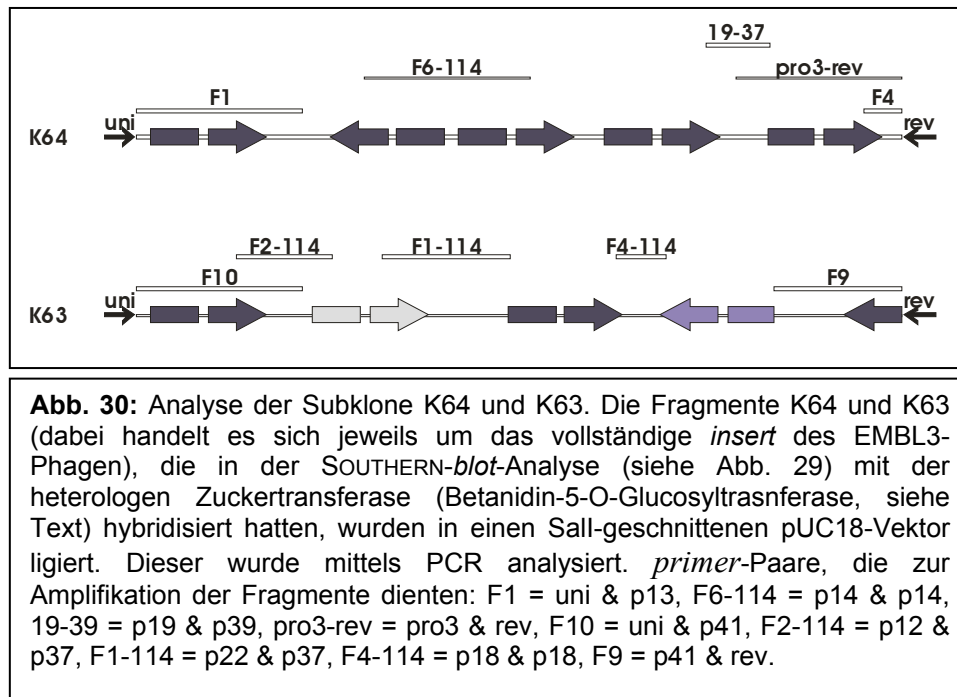


Abb. 29: Gelelektrophoretische Auftrennung und SOUTHERN-*blot*-Analyse der sich aus dem *screening* mit heterologen Zuckertransferasen (siehe Text) ergebenden Phagen-Klone. Die Phagen-DNA wurde durch die Restriktionsendonuclease *Sall* geschnitten (*Sall* trennt das *insert* von den EMBL3-Phagenarmen). Die Hybridisierungen wurden mit den jeweiligen Sonden durchgeführt (siehe Text, bzw. Farbgebung der Pfeile; bei roten Pfeilen handelt es sich um Hybridisierungen mit der Betanidin-5-O-Glucosyltransferase-Sonde und bei gelben um solche mit der putativen *sbUGT*-Sonde). Durch grüne Kreise sind die beiden Fragmente markiert, die, nach Ligation in einen *Sall*-geschnittenen *pUC18*-Vektor (siehe unten), genauer analysiert wurden (siehe hierzu schematische Darstellung 29 B). K64 entspricht im folgenden *scUGTb*; K63 entspricht *scUGTa / -c* (genauer siehe hierzu Anmerkung Subklon-Namensgebung).

wie für die genspezifischen *primer* ergab. Mit diesen *primern* war es möglich, die Zuckerbindungsbox der *B5GT*, der *scUGT*, der *scUGT*, aber auch der *hUGT1A1* und der *hUGT2B7* zu amplifizieren (*annealing* Temperatur: 50°C). Durch Polymerase-Kettenreaktionen mit *scUGT*-spezifischen Oligo-nukleotiden, konnten K63- bzw. K64-Subklone erstellt und somit die Klone analysiert werden (siehe Abb. 30).



Um auch einen in der Hybridisierung positiven Phagen-Klon aus dem *scUGT-screen* zu analysieren, wurden diese Klone Einzelrestriktionen unterzogen. Einer der Klone ließ sich mit der Restriktions-endonuklease EcoRI in mehrere kleine Fragmente schneiden. Diese wurden in einen EcoRI-geschnittenen Vektor (pUC18) ligiert und per Sequenzierung analysiert. Es stellte sich heraus, dass die Fragmente keine codierende Sequenz enthielten. Zusammen mit den aus dem *cDNA-screen* resultierenden Ergebnissen (siehe unten, auch hier ergab sich mit der *scUGT*-Sonde keine UDP-Glycosyltransferase) wurde diese Sonde als zu unspezifisch eingestuft.

Anmerkung zur Subklon-Namensgebung: *scUGT* = *Secale cereale* UDP-Glucuronosyltransferase, K64 = *scUGTb*, K63 = *scUGTa* bzw. c, beide Allele des selben Gens befinden sich auf Subklon K63 (Subklone K64 und K63 siehe Abb. 29)

2. RT-PCR mit Konsensus-primern

2.1. Erstellung der RNA / cDNA

Zur Erstellung der cDNA für die RT-PCR aus mRNA wurde zuerst 40 µg Gesamt-RNA (100 ng/µl) aus 5 Tage alten Roggenprimärblättern präpariert. Die mRNA wurde über eine Affinitätschromatographie (OligodT-Säule) von der restlichen RNA getrennt und durch eine Enzymreaktion mit reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben (Abb. 31 B). Die so erstellte DNA wurde für diverse PCR-Analysen eingesetzt. Die Qualität der cDNA wurde in einer PCR mit *primern* aus einer hoch konservierten Region des Ubiquitins aus Mais getestet (Abb. 31 C).

2.2. Primerdesign

Es wurden *primer* erstellt, die eine Konsensus-Sequenz aus der Betanidin-5-*O*-Glucosyltransferase cDNA (*B5GT*) von *D. bellidiformis*, der *S. baicalensis* UDP-Glucose-Flavonoid-7-*O*-Glucosyltransferase (*7FGT* ^[HIROTANI et al., 1999]), der UDP-Glucose-Flavonol-3-*O*-Glucosyltransferase aus Mais (*3FGT*, *accession number*: P16166) und der humanen Glucuronosyltransferase 1A1 (*hUGT1A1*, *accession number*: AF297093) bilden (Literatur siehe Tab. 1 in der Einleitung, siehe Abb. 32). In den folgenden PCR-Analysen ergaben sich die Zuckerbindungsboxen der zwei oben beschriebenen Klone. Auf diese Weise konnte keine weitere Sequenz isoliert werden.

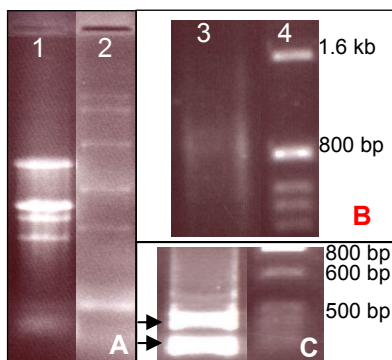


Abb. 31: A 1 zeigt Gesamt-RNA aus 5 Tage alten Roggenprimärblättern, aufgetrennt auf einem 1%igem denaturierenden Agarosegel, angefärbt mit Ethidiumbromid, A 2 zeigt RNA-Ladder, B 3 zeigt cDNA, erstellt aus der in A gezeigten RNA. B 4: Grössen-ladder. C: Qualitätskontrolle der cDNA mit Ubiquitin-primern aus Mais, ergibt charakteristisches Muster.

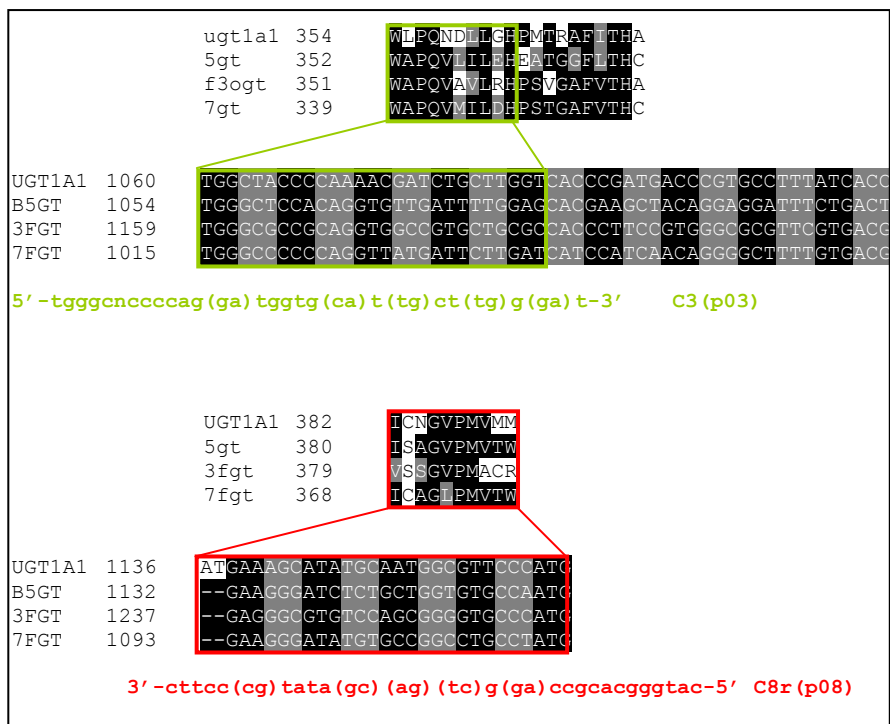
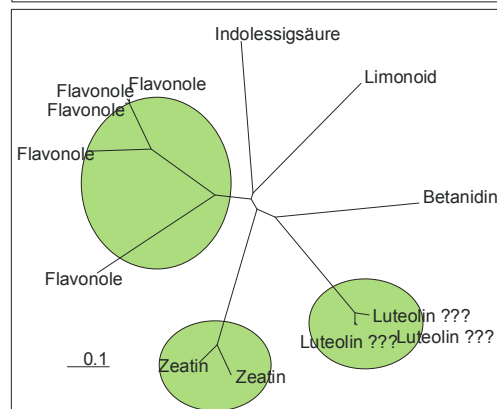
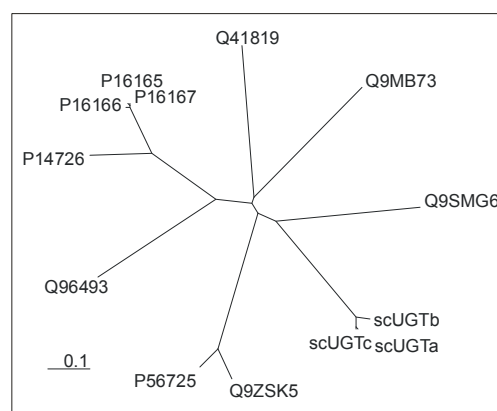


Abb. 32: Erstellung der Konsensus-*primer*. Es wurden sowohl die DNA- als auch die Proteinsequenzen der angegebenen Zuckertransferasen verglichen (*accession numbers* siehe Tabelle 1).

3. Analyse der putativen Zuckertransferasen

3.1. Phylogenetische Untersuchungen

Aus dem *screening* der genomischen Roggen-Phagenbank bzw. der RT-PCR mit Konsensus-*primern* ergaben sich drei unterschiedliche Klone, wobei es sich vermutlich bei zweien um Allele desselben Gens handelt (*scUGTa* und *b*, *alignment* siehe Anhang. 6.4.). Vergleicht man diese mit anderen pflanzlichen Glycosyltransferasen (hierfür wurden alle in der Einleitung beschriebenen Proteine, die heterolog exprimiert und einen Eintrag in der nicht redundanten Proteindatenbank Swiss-Prot haben, verwendet; <http://www.ebi.sc.uk/swissprot>), so kommt man zu folgenden Beobachtungen: Die Gene wurden für die folgende Analyse in drei Teile unterteilt: vor der PSPG-Box, PSPG-Box und nach der PSPG-Box. Alle drei Regionen erschienen in dieser Studie wichtig. Vor der PSPG-Box liegt die Substratbindungsstelle, man könnte also aufgrund phylogenetischer Untersuchungen Schlüsse auf die mögliche Substratspezifität der scUGT ziehen. Die PSPG-Box könnte evt. zeigen, welches Cosubstrat die Enzyme verwenden, und die Region nach der PSPG-Box könnte etwas über eine eventuelle Membranassoziation aussagen.



3.1.1. Substratbindung

Für die Analyse der Substratbindung wurden die scUGTs mit bisher charakterisierten pflanzlichen Glycosyltransferasen verglichen (dabei handelt es sich um alle Proteine der Tab. 1 aus der Einleitung, die in der nicht redundanten Proteindatenbank Swiss-Prot vermerkt sind). Es stellte sich heraus, dass die Roggenenzyme, wie erwartet, der Betanidin-5-*O*-GT sehr nahe sind. Sie gehen aus einem Stamm hervor (siehe Abb. 33), sind jedoch relativ weit von einander getrennt. Es ergibt sich eine mögliche wichtige Schlussfolgerung aus diesem Baum, dass es sich bei den scUGTs offenbar nicht um Verwandte der Flavonol-3-*O*-GTs handelt. Das bedeutet, dass es sich bei den scUGTs nicht um die im Roggen ebenfalls befindlichen 3FGTs handeln dürfte, die zur Synthese von Cyanidin-3-*O*-Glucose dienen. In diesem Baum bestätigt sich auch die

Abb. 33: Phylogenetische Untersuchung ^[PHYLIPI], Substratbindungsstelle. Dem *unrooted tree* liegen neben den Sequenzen der scUGTa-c die Aminosäure-Sequenzen (Substratbindungsstelle = Bereich vor der Zuckerbindungsbox) aller pflanzlichen Zuckertransferasen (aus Tabelle 1), die in der nichtredundanten Proteindatenbank SwissProt aufgelistet werden, zugrunde. **Oben** sind die *accession-numbers* und **unten** die jeweiligen Substrate gezeigt.

die Metabolisierung von Bilirubin verantwortlich, UGT2s für die Metabolisierung endogener Steroide bzw. Xenobiotika (also für eine sehr heterogene Gruppe, siehe Abb. 34 rote Gruppen). Eine ähnliche Gruppierung könnte man auch bei den pflanzlichen Glycosyltransferasen vornehmen, indem man die 3FGTs zu einer Gruppe und die restlichen mit spezies- oder entwicklungsabhängigen Enzymen in einer anderen Gruppe zusammenfasst (siehe Abb. 34 grüne Gruppen). Beim Vergleich der tierischen Glucuronosyltransferasen mit den pflanzlichen (im Bereich vor der PSPG-Box = Substratbindungsstelle) wird deutlich, dass der Ast, der die B5GT und die putativen scUGTs enthält, den Xenobiotika-Detoxifikations-Glucuronosyltransferasen am nächsten ist (Abb.34). Eine Funktion der scUGT in der Konjugation von Luteolin mit Glucuronsäure liegt aufgrund dieses Baums nahe.

3.1.2. Zuckerbindungsbox (PSPG-Box)

Setzt man sich nun mit der Zuckerbindungsbox dieser Enzyme auseinander (Abb. 35), so stellt man fest, dass die putativen scUGTs hier den vertebraten-UGT1s noch näher kommen (*alignment* der Zuckerbindungsbox siehe Anhang 6.2.). Die Entfernung der pflanzlichen Glycosyltransferasen ist in keinem hier gezeigten Fall so gering wie bei den scUGT.

3.1.3. Transmembrandomäne

Am C-Terminus der tierischen Glucuronosyltransferasen liegt eine Transmembrandomäne, die für die Insertion der Proteine in die ER-Membran verantwortlich ist. Die pflanzlichen Detoxifikations-Glycosyltransferasen sind lösliche Enzyme und vermutlich im Cytosol lokalisiert (sie tragen keine Transmembrandomäne) [z.B. NAKAJIMA et al., 2001]. Bei diesem *unrooted tree* (Abb. 36) kann man nur zwei Gruppen zusammenfassen, die membrangebundenen tierischen und die cytosolischen pflanzlichen.

Dies spricht für eine cytosolische Lokalisation der scUGTs, die sich aus Kapitel 6 und 7 des Ergebnisteils ebenfalls ergibt. Aufgrund der oben beschriebenen Beobachtung, dass das Gen scUGTb (= K64) IMMER näher an den tierischen Glucuronosyltransferasen lag, wurde im folgenden mit diesem Gen weitergearbeitet.

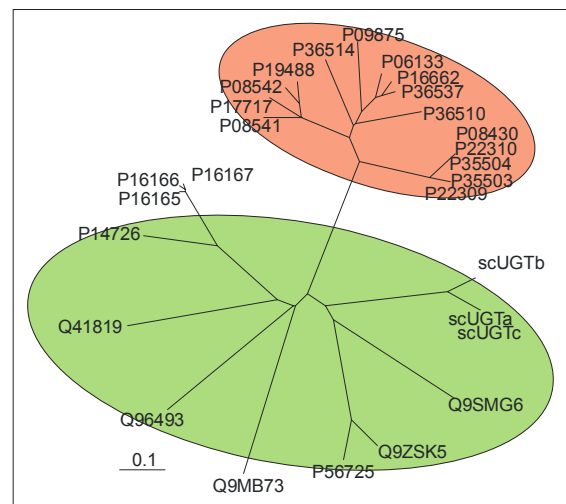


Abb. 36: Phylogenetische Untersuchung, Transmembrandomäne. Dem *unrooted tree* liegen, neben den Sequenzen der scUGTa-c, die Aminosäure-Sequenzen (Transmembrandomäne, Bereich nach der Zuckerbindungsbox) aller pflanzlichen Zuckertransferasen (aus Tabelle 1), die in der nichtredundanten Proteindatenbank SwissProt aufgelistet werden, und repräsentative Vertebraten-UGTs (siehe Tabelle im Anhang 6.5.) zugrunde. Dargestellt sind die *accession*-Nummern in der Proteindatenbank. Die Gruppierungen wurden wie folgt vorgenommen: rot = tierisch, grün = pflanzlich (genauereres siehe Text).

3.2. Transkriptionskontrolle

3.2.1. 5'-3'RACE

Um die Expression der im genomischen *screen* ermittelten Gene zu bestätigen, wurde eine 3'RACE durchgeführt. Es sollte der *polyA-tail* der Transkripte ermittelt werden. Dafür wurde Gesamt-RNA (Trizol) 5d alter Roggenprimärblätter präpariert und die mRNA durch die reverse Transkriptase und mit dem *3'gene racer primer* (3'GRP), der einen OligodT-*primer* darstellt, in cDNA umgeschrieben. Auf diese cDNA wurden dann folgende PCRs durchgeführt:

Zuerst wurde das *primer*-Paar p22-3' *gene racer nested primer* verwandt (3'GRNP, siehe Abb. 37). Hierbei sollte mit einem genspezifischen *primer* und einem *primer*, der den *polyA tail* erkennt, das Gen amplifiziert werden (3'RACE). Dabei entstanden Fragmente von unterschiedlicher Länge. Die Überprüfung der genauen DNA-Sequenz erfolgte durch Sequenzierung (Ligation des Fragments in den pGEMTeasy-Vektor). Hier stellte sich heraus, dass es sich bei den amplifizierten Fragmenten um dasselbe Gen (scUGTb) mit unterschiedlich langen *polyA tails* handelte.

Die Lage des Introns konnte durch Vergleiche der genomischen Sequenz der scUGT mit den kodierenden Sequenzen anderer Zuckertransferasen und aufgrund einer *intron prediction software* vorausgesagt werden (<http://argon.cshl.org/genefinder/ARAB/arab.htm>). Die vorhergesagte Lage des Introns konnte durch eine PCR bestätigt werden- als *template* diente die oben beschriebene cDNA. Dafür wurden zwei genspezifische Oligonukleotide verwendet (p46-p29, einer lag auf der 5'- und einer auf der 3'-Seite des Introns. Als negativ-Kontroll-*template* diente genomische Roggen-DNA, die in der selben PCR ein um ~ 400 Basenpaare größeres Fragment zeigte.

Um die Lage des Transkriptionsstarts zu bestimmen, wurde eine 5'RACE mittels des *gene racer kits* (INVITROGEN) durchgeführt. In der Reaktion wurde ein RNA-Oligonukleotid an die dephosphorylierte, *decapped* mRNA ligiert, was dann als *primer-site* für die folgenden PCRs diente. Dafür wurden drei unterschiedliche *primer*-Paare verwendet. Allen gemein war der 5'GRNP, zudem kamen je drei genspezifische *primer*: einer, p29, der auf der 3'-Seite des Introns lag (er diente dazu, genomische Kontaminationen auszuschließen), einer, p37, der auf der 5'-Seite des Introns lag (dieser konnte zwar nicht die genomische Kontamination ausschließen, da er aber näher am ATG liegt, hielt er die entstehende Fragmentgröße klein), und einer, p27, der innerhalb des Introns lag (dieser sollte kein Produkt zeigen, siehe Abb. 37).

3.2.2. NORTHERN-*blot*-Analysen

In der NORTHERN-*blot*-Analyse ergab sich ein schon erwartetes Bild: die *sbUGT*-Sonde aus *Scutellaria baicalensis* ergab keine Bande (in Abb. 38 nicht gezeigt), während die *B5GT*-Sonde eine Doppelbande ergab (siehe Abb. 38).

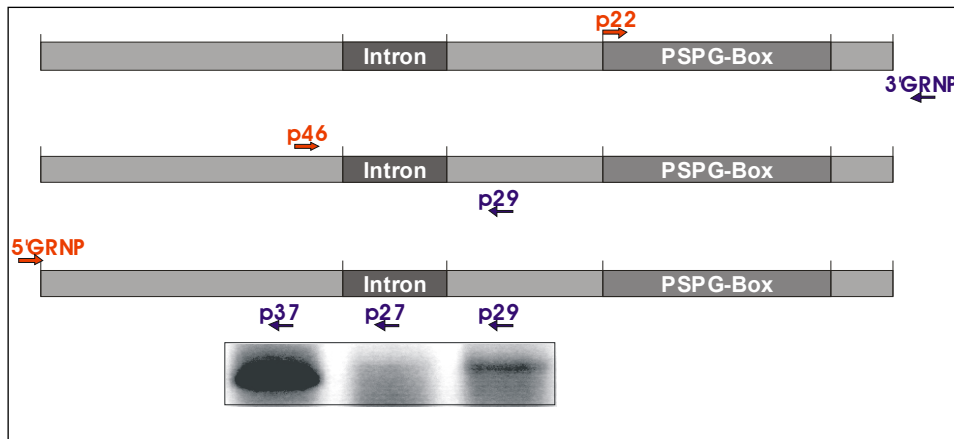


Abb. 37 (von oben nach unten): 1. 3'RACE: durchgeführt mit einem genspezifischen *primer* (p22) und dem 3'-*gene-racer-nested-primer*. 2. PCR zur Ermittlung des Exon-Intron-Überganges (genspezifische *primer* p46 & p29). 3. 5'RACE: durchgeführt mit den genspezifischen *primern* p22, p27, p29 und dem 5'-*gene-racer-nested-primer*. 4. Gelelektrophoretische Auftrennung der bei 3. entstandenen PCR-Fragmente, mit den jeweils über der lane stehenden *primern*.

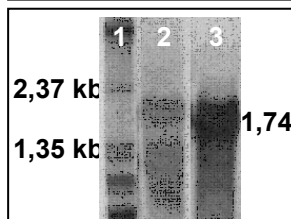


Abb. 38: Northernblot-Analyse: Hybridisierungen wurden durchgeführt mit der heterologen B5GT-Sonde (lane 2) und einer 18sRNA-Sonde aus Mais (als Kontrolle, lane 3).

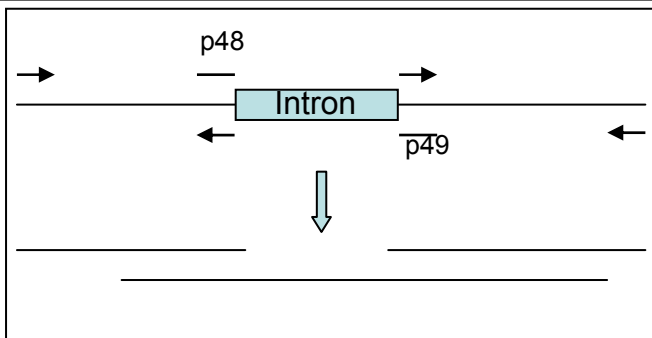


Abb. 39: Schematische Darstellung der durchgeführten *overlap-PCR*. Diese PCR diente dazu, das Intron auszuschneiden. Verwendet wurden hierzu *primer* p48 & p49, als *template-DNA* diente der Klon K64 (siehe Abb. 29)

3.2.3. Roggen-cDNA-Bank

Die meristematische Zone (unterste 5 mm) 5 Tage alter, kältebehandelter Roggenprimärblätter (*S. cereale* L. cv. 'Halo') wurde zur Konstruktion einer cDNA-Bank verwendet [BERBERICH et al., 2000]. Der Titer der amplifizierten *library* betrug 1×10^7 pfu's. Es wurden 4×10^5 rekombinante Lambda-Phagen und 4×10^7 ExAssist-Helferphagen zur Infektion von 4×10^6 Bakterien (XL1-Blue MRF) eingesetzt. Die DNA positiver (weißer) Bakterien wurde auf Nitrozellulosefilter aufgetragen und diese wurden mit unterschiedlichen Sonden inkubiert.

In einem ersten *screen* wurde ein *pool* aus der gesamten cDNA der B5GT und der sbUGT verwendet. In diesem *screen* ergaben sich 82 in der Hybridisierung positive Signale. Die anschließende Sequenzierung konnte jedoch das positive Signal nicht bestätigen. Dasselbe traf für einen zweiten *screen* mit einem *pool* der hUGT-cDNAs zu (Tabelle der Klone siehe Anhang 3.3.).

Bei einem dritten *screen* wurden die Filter nur mit der Zuckerbindungsbox der hUGT1a1 bzw. -2b7 inkubiert, und auch dort stellte sich - trotz einer drastischen Reduktion der Anzahl positiver Klone im Vergleich zum zweiten *screen* - ein negatives Ergebnis ein.

In einem weiteren *screen* wurde nur die Zuckerbindungsbox der mittlerweile im genomischen *screen* ermittelten scUGT verwendet. Mit dieser Sonde konnte ein Klon ermittelt werden (Z144, siehe Tabelle unten), der zwar einen *polyA tail* trägt (es scheint sich also um cDNA und keine genomische Kontamination zu handeln), aber leider kein *full length*-Klon ist. Tabelle 4 fasst die Ergebnisse des cDNA-Bank-*screening* zusammen.

	Anzahl der positiven auf Filter I-III	Name Klonnummer (Z-Nummer)	Analysiert durch DNA-Präparation und erneute Hybridisierung	Analyse durch Sequenzierung	Anzahl wirklich positiver
1. Screen mit pool aus B5GT und sbUGT	82	Z1 - Z81, Z129 es wurden Z1, Z2, Z15 - Z18, Z20 - Z22, Z27, Z28, Z33, Z42, Z48 - Z50, Z52, Z55 - Z60, Z63, Z64, Z70 - Z81, Z129 gepickt	DNA Präparationen von: Z28, Z42, Z49, Z55, Z56, Z58-Z60, Z70 In erneuter Hybridisierung alle positiv	Z1, Z28, Z42, Z49, Z55, Z56, Z58 - Z60, Z70, Z79	
2. Screen hUGTs-pool	67	Z82 - Z128, 20 Klone nicht analysiert		Z82, Z84 - Z88, Z90, Z91	
3. Screen hUGT1A1-PSPG-Box-Sonde	8 (sehr hoher background, deshalb konnten nicht mehr identifiziert werden)	Z130 - Z137		Z130, Z134 - Z137	
4. Screen scUGT-PSPG-Box-Sonde	1		In Hybridisierung positiv	Z144	Z144
5. Screen scUGT-ohne PSPG-Box-Sonde	38	Z152 - Z163, 26 Klone nicht analysiert	In Hybridisierung alle negativ	Z152 - Z160	

Tabelle 4: Zusammenfassung der Ergebnisse des Roggen-Primärblatt-cDNA-Bank-*screenings*; nur Klon Z144 zeigte auch in der DNA-Sequenzierung ein positives Ergebnis (genauerer siehe Text).

3.2.4. Overlap-PCR

Um den gesamten *open reading frame* am Stück für die Proteinexpression zur Verfügung zu haben, wurde eine *overlap*-PCR durchgeführt. Dafür wurden 40bp lange Oligonucleotide erstellt, die eine Homologie zu je 20 Basen auf der 5'- bzw. 3'-Seite des Introns aufwiesen. Des Weiteren wurden zu Start- bzw. Stopcodon komplementäre *primer* verwandt (Abb. 39, genauerer siehe Material & Methoden und *primer*-Liste). Es wurde nun eine PCR mit den vier *primern* angesetzt. Das entstehende Fragment wurde kloniert und sequenziert.

4. Heterologe Expression putativer scUGT

4.1. Heterologe Expression rekombinanter scUGTb in *E.coli*

Zur heterologen Proteinexpression in *E.coli* sollten Konstrukte dienen, die einen 6xHis-tag am N-Terminus der Proteine tragen. Es wurden zwei pDORNR221-*entry*-Klone mittels PCR und anschließender BP-Rekombination erstellt (Abb. 40 A, genauer siehe Material & Methoden).

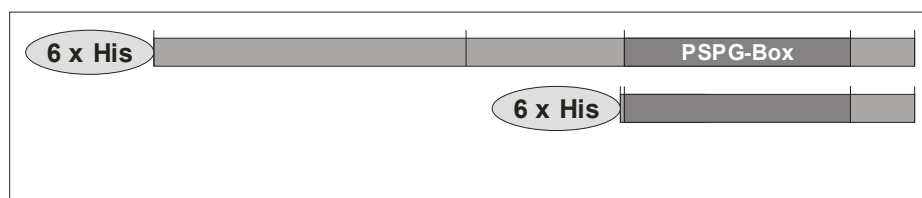


Abb. 40 A: Konstrukte zur heterologen Proteinexpression in *E.coli*. Zur Aufreinigung der Proteine wurde ein His-tag an den N-Terminus des Proteins gehängt (genaueres siehe Material & Methoden, und Text).

Es wurde neben dem *full-length*-Klon auch ein verkürztes Protein erstellt. Dieses sollte für die Synthese spezifischer Antikörper zur Verfügung stehen. Die beiden *entry*-Klone, K64oi-p39p34 und -p32p34, wurden zur LR-Reaktion mit dem pDEST17-Expressionsvektor (siehe Abb. 40 B) eingesetzt. Die so entstandenen Plasmide wurden in elektrokompetente BL21-Zellen transformiert und die Proteinexpression durch Zugabe von IPTG induziert. Beide Proteine konnten sowohl auf dem Coomassie-gefärbten Polyacrylamidgel (Abb. 40 B, Gesamtproteinextrakt) als auch in einer WESTERN-*blot*-Analyse mit dem Anti-His-Antikörper (SIGMA, siehe Antikörper-Liste) detektiert werden. Es stellte sich jedoch heraus, dass sich das *full-length*-Protein bei den vom Hersteller angegebenen

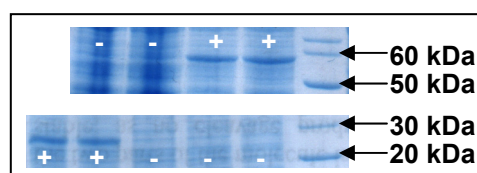


Abb. 40 B: Coomassie-gefärbte *E.coli*-Proteinrohextrakte. (-) zeigt nicht (+) transformierte BL21-DE3-Zellen. **Oben:** lane 3 und 4 zeigen zwei unabhängige, das *full-length*-Protein exprimierende Klone. **Unten:** lane 1 und 2 zeigen die Expression des *truncated* Protein.

Standardbedingungen (INVITROGEN, frische Kultur angeimpft 1:100 Verdünnung, Induktion bei einer $OD_{600} = 0.4$, Inkubation bei 37°C für weiter 4h) in *inclusion bodies* befand.

Bei identischen Kulturbedingungen, jedoch einer Induktion nach bereits 30 min und einer Wachstumsperiode von nur 1h, befanden sich die Proteine in der löslichen Fraktion (Extraktionsprotokoll siehe Material & Methoden).

Mit dieser löslichen Fraktion wurde sowohl der oben beschriebene UGT- als auch der 3FGT-Enzymtest durchgeführt. Im UGT-Enzymtest (Standardtest mit drei verschiedenen Proteinkonzentrationen, siehe Material & Methoden) konnte weder die Abnahme von Luteolin noch die Zunahme eines glycosylierten Produkts beobachtet werden. Die oben beschriebenen Enzymtests wurden auch

mit den Intermediaten N und R₂ als Substrat durchgeführt. Jedoch auch hier war keine Produktakkumulation zu beobachten.

Im 3FGT-Enzymtest konnte ein Abbau des Substrats Cyanidinchlorid (Retentionszeit 24.7 min) und eine Zunahme eines unbekanntes Produkts (Retentionszeit 23.9 min) beobachtet werden. Das Produkt dieser Reaktion ist jedoch (1.) nicht Cyanidin-3-*O*-Glucosid (Retentionszeit von Cyanidin-3-*O*-Glucosid = 17.7 min) und (2.) nicht durch die heterologe Proteinexpression hervorgerufen (der selbe Umsatz ist auch bei nicht transformierten *E.coli* zu beobachten).

4.2. Heterologe Expression rekombinanter scUGT in Eukaryoten

Da bei der heterologen Expression der scUGTb in *E.coli* keine Produktakkumulation zu beobachten, es jedoch nicht ohne weiteres auszuschließen war, dass dies evt. auf der Degradierung der entstehenden Glucuronide durch eine *E.coli*- β -Glucuronidase basiert, wurden pflanzliche Expressionssysteme getestet. Es wurden transiente Transformationen von Tabakblättern (SR1) mittels Agrobakterien-Vakuuminfiltration und stabile Transformationen von *Arabidopsis thaliana* vorgenommen. In beiden Fällen handelt es sich um Pflanzen, die, soweit bekannt, keine Flavonoid-Glucuronosyltransferasen aufweisen, so dass man nicht in Konflikt mit intrinsischer Enzymaktivität kommt. Der Nachteil besteht jedoch eventuell darin, dass dadurch, dass z.B. die für den Transport der synthetisierten Glucuronide in die Vakuole nötigen Transporter nicht vorhanden sind, mit einer Degradierung der heterologen Proteine oder einer Produktion von für die Pflanze toxischen Metaboliten gerechnet werden muss.

4.2.1. Agrobakterien-Vakuuminfiltration von Tabakblättern

Die Agrobakterium-Vakuuminfiltration von *Nicotiana tabacum* L. cv. SR1 erschien uns sinnvoll, da die Infektion wenig zeitaufwändig ist und die Konzentration des produzierten Enzyms den Berichten nach hoch sein soll (VAQUERO et al. (1999) berichten von einer sehr hohen Konzentration heterologen Enzyms drei Tage nach Infektion). Die erfolgreiche Transfektion wurde anhand der Proteinexpression eines scUGT-GFP-Fusionsproteins und des GFP-Proteins fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen (Abb. 41 A, die Etablierung des Enzymassay mit HPLC wäre wesentlich zeitaufwändiger).

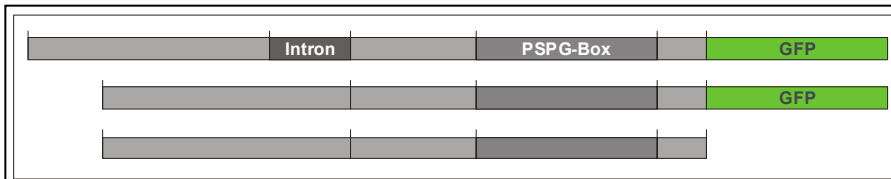
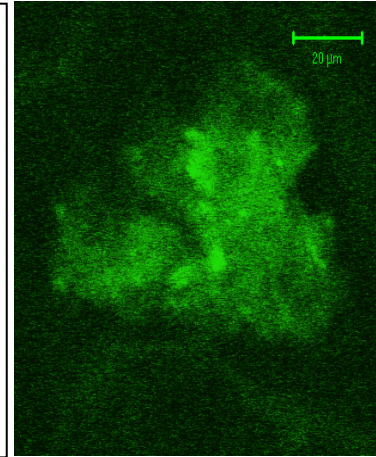


Abb. 41 A: Oben sind die Konstrukte dargestellt, die zur Transformation von Agrobakterien eingesetzt wurden (von oben nach unten: K64mi-p39p36-GFP, K64oi-p39p36-GFP und K64oi-p39p36; Erstellung der Konstrukte siehe Material & Methoden). Mit diesen Bakterien wurden mittels Vakuuminfiltration Tabakblätter infiziert. Die transiente Proteinexpression der GFP-Fusionsproteine konnte im Fluoreszenzmikroskop beobachtet werden (**rechts**). Dargestellt ist eine Tabak-Epidermiszelle, die die grüne Fluoreszenz zeigt.



Die Effizienz der Infiltration stellte sich jedoch für die Etablierung eines Enzymtests als zu gering heraus.

4.2.2. Erstellung transgener *A. thaliana*

Um die Probleme, die bei der heterologen Proteinexpression in *E. coli* (Lokalisation des heterologen Proteins in *inclusion bodies* bzw. mögliche β -Glucuronidase-Aktivität) bzw. Tabak auftraten, zu umgehen, wurde ein stabiles pflanzliches Expressionssystem gewählt. *A. thaliana* wurde bereits 1907 in ersten Experimenten eingesetzt [LAIBACH, 1907], in denen gezeigt werden konnte, dass die Anzahl der Chromosomenpaare in *A. thaliana* im Vergleich zu anderen Pflanzen mit fünf vergleichsweise niedrig ist. Eine ganze Reihe von Eigenschaften machten sie zu einer wichtigen Modellpflanze in der heutigen Wissenschaft. Diese sind der kurze Lebenszyklus der diploiden, selbstbefruchtenden Pflanze, die hohe Menge an Samen, der geringe Platzbedarf und die niedrigen Anforderungen für die Kultivierung. Zu den oben beschriebenen scUGT-GFP-Fusionsproteinkonstrukten (K64mi-p39p36-GFP, K64oi-p39p36-GFP und K64oi-p39p36) wurden in diesem Experiment noch verkürzte Fusionsproteine hinzugefügt (K64oi-p32p36-GFP und K64oi-p32p36, siehe Abb. 41 B), um eine mögliche Änderung der subzellulären Lokalisation des Proteins *in vivo* im Vergleich zum Wildtyp beobachten zu können (vergleiche hierzu die subzelluläre Lokalisation bei der transienten Expression dieses Konstrukts *in vitro* in Gerstebblättern).

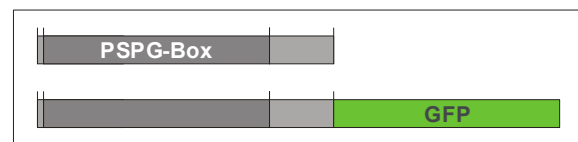


Abb. 41 B: Zusätzlich zu den in Abb. 41 A gezeigten Konstrukten wurden für die Erstellung transgener *A. thaliana* noch folgende generiert (von oben nach unten): K64oi-p32p36-GFP und K64oi-p32p36; Erstellung der Konstrukte siehe Material & Methoden).

Die transgenen Pflanzen wurden mit der *floral dip* Methode erstellt (siehe Material & Methoden). Je Konstrukt wurden ca. 20 Pflanzen transformiert, die Samen geerntet, ausgesät und positive Pflanzen mit BASTA selektioniert. Von je 18 einzelnen Individuen wurde genomische DNA präpa-

riert und die DNA-Integration mittels PCR (dazu diente das *primer*-Paar p22-p24) überprüft. Die Proteinexpression der Fusionsproteine wurde fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen.

Von je 2 unabhängigen Individuen wurden Rosettenblatt-Proteine extrahiert (Standard-UGT- bzw. -3FGT-Extraktionspuffer, siehe Material & Methoden) und diese zum UGT- bzw. 3FGT-Enzymtest eingesetzt.

Beim UGT-Enzymtest bestätigte sich das schon bei *E.coli* beschriebene Ergebnis: (1.) es war kein Abbau des Substrats Luteolin bzw. keine Akkumulation eines Produkts zu beobachten. (2.) Die Proteine transformierter und nicht-transformierter Pflanzen verhalten sich im Enzymassay gleich. Das bedeutet, dass es unter diesen *assay*-Bedingungen auch im Wildtyp keine Glucuronosyltransferase-Aktivität gibt (dieses Ergebnis war zu erwarten, siehe oben). (3.) Auch beim Einsatz der Luteolin-Mono- bzw. -Diglucuronide konnte das *E.coli*-Ergebnis bestätigt werden: N und R₂ wurden nicht zu Gunsten von R₁ abgebaut.

Die Ergebnisse des 3FGT-Enzymtests fielen jedoch etwas anders aus: (1.) Cyanidinchlorid wurde abgebaut und Cyanidin-3-*O*-Glucosid synthetisiert (es weist die selbe Retentionszeit wie das aus Roggen extrahierte Glucosid auf, Cyanidinchlorid 24.7 min und Cyanidin-3-*O*-Glucosid 17.7 min). (2.) Dies ist jedoch nicht auf das heterolog exprimierte Protein zurückzuführen, da der selbe Umsatz auch bei nicht transformierten *A. thaliana* zu beobachten war (siehe Abb. 42, hier ist exemplarisch der 3FGT-Enzymtest mit Rosettenblatt-Proteinen nicht transformierter *A. thaliana* gezeigt).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass nicht entschieden werden kann, ob es sich bei der heterolog exprimierten scUGTb um eine Luteolin-UDP-Glucuronosyl- oder eine Cyanidin-UDP-Glucosyltransferase handelt.

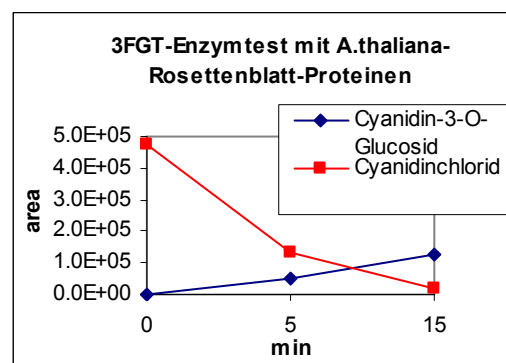


Abb. 42: 3FGT-Enzymtest mit *A. thaliana*-Wildtyp-Rosettenblatt-Proteinen. Als Substrat für diese Reaktion wurde Cyanidin-Chlorid eingesetzt (Retentionszeit von 24.7 min). Bei dem entstehenden Produkt handelt es sich vermutlich um Cyanidin-*O*-Glucosid (identische Retentionszeit wie das aus Roggenblättern mittels Dünnschichtchromatographie extrahierte Glucosid, 17.7 min).

Im folgenden ist diese Abgrenzung wichtig: die *Secale cereale* Luteolin-UDP-Glucuronosyltransferasen werden weiterhin als LGT, LMT und LDT (siehe Abb. 43) bezeichnet; die im *screening* ermittelten Zuckertransferasen werden, obwohl es sich möglicherweise nicht um Glucuronosyltransferasen handelt, weiterhin als scUGTa-c bezeichnet.

5. Biochemische Charakterisierung der Roggen- (Flavonoid-) Glycosyltransferasen

Aufgrund hoher Sequenz-Homologien der pflanzlichen 3FGTs und der tierischen UGTs (Abb. *alignment* siehe Anhang 6.1. - 6.3.) erschien es uns wichtig, diese beiden Roggen-Enzyme biochemisch zu charakterisieren. Es wurden *Enzymassays* (UGT- und 3FGT-Enzymtest) etabliert und *Immunblot*-Analysen mit heterologen Antikörpern (siehe Antikörper-Liste, Anhang 5.) durchgeführt.

5.1. Etablierung der Enzymtests

5.1.1. UGT-Enzymaktivitätstests mit Roggenprimärblattproteinen

Die Enzymtests wurden mit dem Ziel durchgeführt, *assay*-Bedingungen zu schaffen, in denen überwiegend R_1 , das Endprodukt dreier Glucuronidierungsreaktionen und nicht die Intermediate N (Monoglucuronid) und R_2 (Diglucuronid) (siehe Abb. 43) entstehen (siehe "Anmerkung Enzymkomplex", Seite 79).

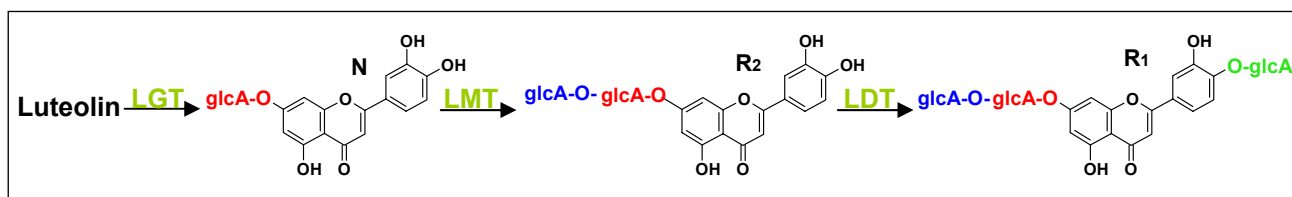


Abb. 43: Sequenzielle Abfolge der Glucuronidierung des Luteolins in Roggenprimärblättern. Flavonoide der Roggenprimärblätter: N = Luteolin-7-O- β -D-glucuronid, R_2 = Luteolin-7-O- $[\beta$ -D-glucuronosyl (1 \rightarrow 2)]- β -D-glucuronid, und R_1 = Luteolin-7-O- $[\beta$ -D-glucuronosyl (1 \rightarrow 2)]- β -D-glucuronid]-4'-O- β -D-glucuronid. Enzyme: **LGT** = UDP-Glucuronat:Luteolin-7-O-Glucuronosyltransferase, **LMT** = UDP-Glucuronat:Luteolin-7-O-glucuronid-Glucuronosyltransferase, **LDT** = UDP-Glucuronat:Luteolin-7-O-diglucuronid-4'-O-Glucuronosyltransferase

Als Grundlage dienten die Ergebnisse, die aus der biochemischen Teilreinigung der Roggen-UGTs in unserem Labor stammten (Enzym-Eigenschaften sind in Tab 5 zusammengefasst).

In einer weiteren Studie konnte auch eine Luteolin-Triglucuronid-spezifische- β -Glucuronidase [SCHULZ & WEISSENBOCK, 1987] charakterisiert werden. Die Eigenschaften dieses Enzyms waren für uns insofern wichtig, als es galt, diese im *assay* zu verhindern. Die Eigenschaften der β -Glucuronidase sind in der Tabelle 6 dargestellt.

Für den Enzymtest wurden Roggenprimärblattproteine (4-6 d) mit Kaliumphosphat-Puffer extrahiert (Schema siehe Material & Methoden). Diese wurden mit dem Substrat Luteolin und dem Co-substrat UDP-Glucuronat zum Aktivitätstest eingesetzt. Um eine geeignete Proteinkonzentration für das eingesetzte Reaktionsvolumen zu ermitteln, wurden 100 und 200 μ l (Konzentrations-

bestimmung siehe Protein-Eichkurve Abb. 17, $\ddot{U}2 = 3.4 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) der selben Proteinlösung der Überstände mit Substratkonzentrationen von $85 \mu\text{M}$ Luteolin und $500 \mu\text{M}$ UDP-Glucuronat benutzt. Da die K_M -Werte des teilgereinigten Eingangsenzyms $8 \mu\text{M}$ für Luteolin und $12 \mu\text{M}$ für UDP-Glucuronat betragen, wurde vorerst eine Substratkonzentration von etwa dem Zehnfachen des K_M -Wertes eingesetzt. Es stellte sich heraus, dass das Einsetzen von $200 \mu\text{l}$ in allen Fällen zu einer höheren Ausbeute des Endprodukts R_1 und zu einer geringeren Akkumulation der Intermediate N und R_2 führte (siehe Abb. 44 A, B für Fraktion $\ddot{U}1$, $\ddot{U}1 = \text{Überstand 1}$, siehe Zentrifugationsschema Material & Methoden). Die anschließenden assays wurden also mit $200 \mu\text{l}$ Enzymlösung durchgeführt. Die Luteolinkonzentrationen wurden anschließend auf 10 bzw. $20 \mu\text{M}$ reduziert, um unter anderem zu überprüfen, wie die Relationen Endprodukt R_1 zu Intermediärprodukt N bzw. R_2 aussehen (Abb. 44 C-E, für Fraktion $\ddot{U}1$).

UGT	pH-Optimum	Puffer	Temperatur-optimum	Molekulargewicht	IEP's	K_m des Substrats (μM)	V_{max} für das Substrat ($\mu\text{Kat}/\text{kg}$)	K_m des Cosubstrats (μM)	V_{max} für das Cosubstrat ($\mu\text{Kat}/\text{kg}$)
LGT	pH 6.5	0.01 M Zitrat Puffer	50°C	34 kDa	pH 4.75	8	1600	12	777
LMT	a) pH 6.5 b) pH 8.5	a) 0.01 M K-Pi Puffer b) 0.01 M Bicin Puffer	50°C	37 kDa	pH 4.75	12	9231	40	7692
LDT	pH 7	0.05 M K-Pi Puffer	40°C	29 kDa	pH 4.8	9	741	90	3000

Tab. 5: Die enzymatischen Eigenschaften der scUGTs (LGT, LDT und LMT) [SCHULZ & WEISSENBOCK, 1988]

	pH-Optimum	Puffer	Temperatur-optimum	Inhibition durch	Molekulargewicht	IEP's	K_m (μM)	V_{max} ($\mu\text{Kat}/\text{kg}$)
β-Glucuronidase	4.3	0.01 M Zitrat Puffer	55°C	Kupfer und Silber	280 kD mit aktiven Untereinheiten von 67 kDa	Die Untereinheiten hatten Isoelektrische Punkte von pH 5.5 und 6.3	7	1093

Tab. 6: Die enzymatischen Eigenschaften der Luteolin-Triglucuronid-spezifischen- β -Glucuronidase [SCHULZ & WEISSENBOCK, 1987]

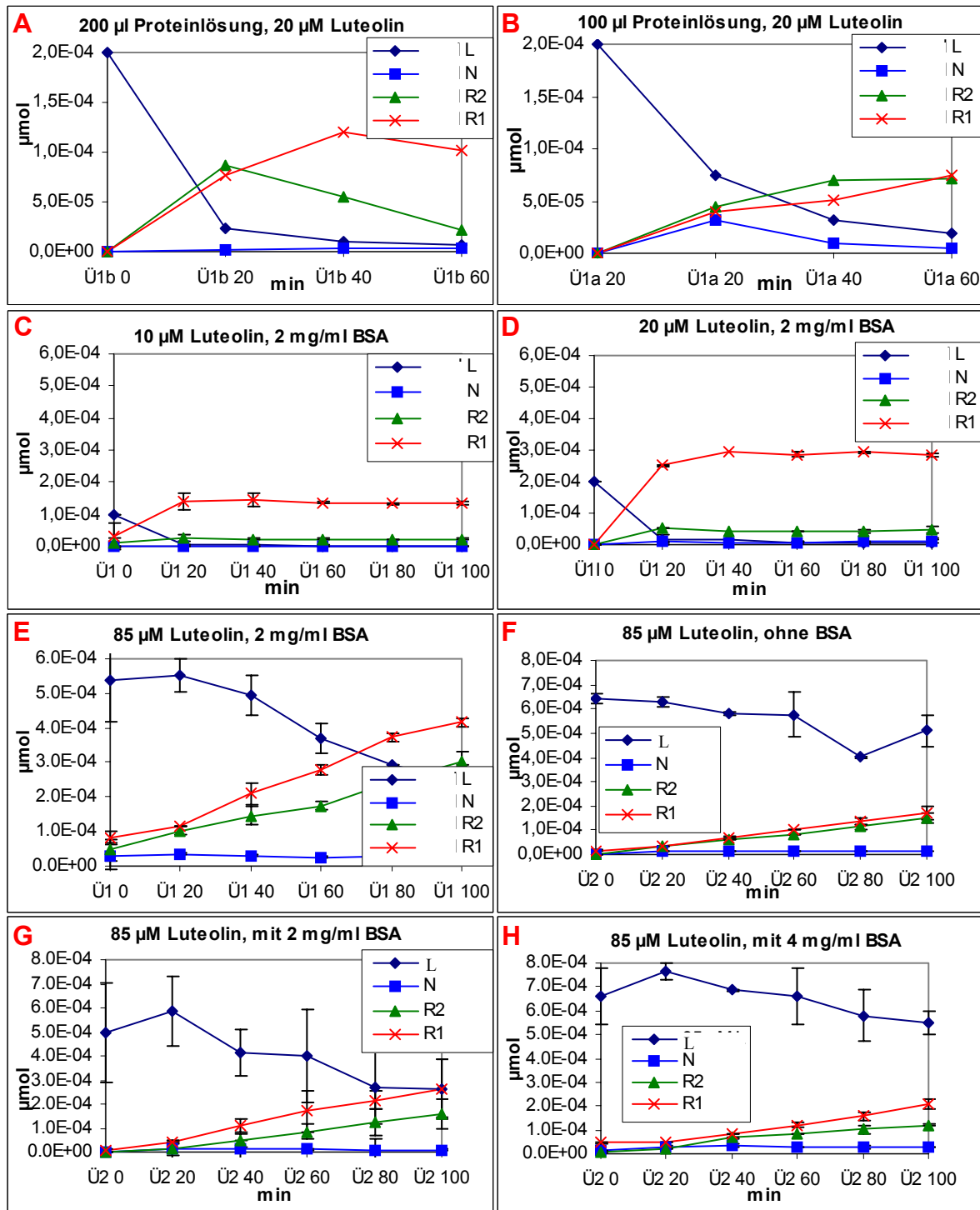


Abb. 44.A,B: Enzymtests mit unterschiedlichen Proteinkonzentrationen. Es wurden je 100 (B) bzw. 200 (A) μl Enzymlösung (Ü1) im Assay mit 20 μM Luteolin und 500 μM UDP-Glucuronat eingesetzt. Bei 100 μl Enzymlösung kann man eine deutliche Anreicherung der Intermediate feststellen. Zum Zeitpunkt 60 min ist das Intermediat R2 noch immer nicht vollständig in R1 umgesetzt und es kommt zu einer Akkumulation von R2.

C-E: Enzymtest mit den Proteinfractionen Ü1. Es wurden 2mg/ml BSA dem Extraktionspuffer und 10, 20 bzw. 85 μM Luteolin dem Assay als Substrat zugesetzt.

F-H: Enzymtest mit der Fraktion Ü2, durchgeführt in Anwesenheit von 85 μM Luteolin und mit 0 mg/ml (A), 2 mg/ml (B) und 4 mg/ml (C) im Extraktionspuffer. Gemessen wurde zu den Zeitpunkten 0, 20, 40, 60, 80 und 100 Minuten (siehe X-Achse).

Es konnte beim Einsatz von geringeren Mengen Luteolin eine deutlich geringere Akkumulation der Intermediate beobachtet werden. Vermutlich destabilisieren hohe Luteolinkonzentrationen den Enzymkomplex.

Zur Überprüfung der Stabilisierung der Enzyme wurden 2 bzw 4 mg/ml BSA dem Extraktionspuffer zugesetzt. Es ergab sich eine vermehrte Akkumulation des Endprodukts bei Zugabe von 2 mg/ml BSA (hier gezeigt am Beispiel von Ü2, Abb. 44 F-H). Bei allen folgenden *assays* wurde also dem Extraktionspuffer 2 mg/ml BSA zugesetzt.

Bei Pflanzenanzucht in andauernder Dunkelheit (DDK) konnte im Vergleich zu Pflanzen, die im Weisslicht (WL) angezogen wurden, eine Reduktion der Enzymaktivität um ungefähr 75-80% bei gleicher Proteinmenge festgestellt werden (Abb. 44 K). Um eine mögliche Glucuronidaseaktivität zu erfassen, wurde das Endprodukt R₁ dem *assay* als Substrat zugesetzt. Die Aktivität eines die Glucuronsäure abspaltenden Enzyms konnte unter diesen Versuchsbedingungen ausgeschlossen werden (Abb. 44 I). Um eine mögliche Hemmung der Produktentstehung durch im Rohextrakt befindliche niedermolekulare Inhibitoren, z.B. Flavonoide und andere Phenole auszuschließen, wurde eine pD10-Säulen-Reinigung des Überstandes Ü2 vorgenommen. Dies führte jedoch zu keinem Anstieg, sondern zu einer starken Abnahme (möglicherweise durch Destabilisierung des UGT-Enzymkomplexes) der Produktbildung (Abb. 44 J).

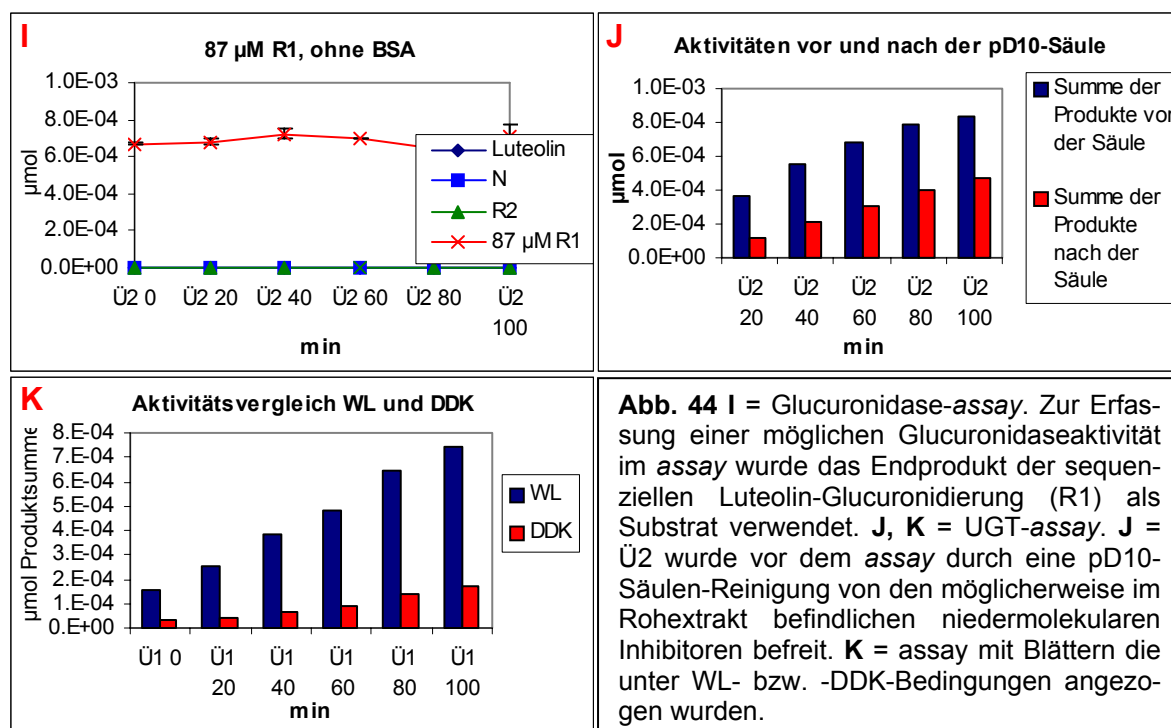


Abb. 44 I = Glucuronidase-assay. Zur Erfassung einer möglichen Glucuronidaseaktivität im *assay* wurde das Endprodukt der sequenziellen Luteolin-Glucuronidierung (R₁) als Substrat verwendet. **J, K** = UGT-assay. **J** = Ü2 wurde vor dem *assay* durch eine pD10-Säulen-Reinigung von den möglicherweise im Rohextrakt befindlichen niedermolekularen Inhibitoren befreit. **K** = *assay* mit Blättern die unter WL- bzw. -DDK-Bedingungen angezogen wurden.

Anmerkung Enzymkomplex: Diversen Berichten zufolge ^[zur Übersicht siehe WINKEL-SHIRLEY, 1999] liegen die Enzyme des Flavonoid-Stoffwechsels in Enzym-Komplexen vor (Modell: *metabolic channeling*). Die Hypothese, dass die Glycosyltransferasen auch in Enzymkomplexen assoziiert bzw. an diesen beteiligt sind, liegt nahe. Sie wird gestützt durch die Beobachtung, dass die Intermediate N und R2 *in vitro* nur in sehr geringen Mengen akkumulieren. Fügt man dem Enzymassay viel Luteolin (85µM) hinzu, fördert dies offensichtlich die Destabilisierung des Komplexes; dies wird sichtbar durch die Akkumulation von R2. Da es jedoch nicht zu einer Akkumulation von N kommt, kann ein Komplex aus 2 Enzymen angenommen werden. Diese Beobachtung wird bestätigt durch die ähnlichen Eigenschaften (pH- bzw. Temperaturoptimum, IEP's) der LGT- / LMT-Enzyme (siehe Tabelle 5).

5.1.2. Aktivitätsmessungen der Flavonol 3-O-Glucosyltransferase

Die *ProSite*-Konsensussequenz für die Zuckerbindungsbox beinhaltet immer sowohl die tierischen Glucuronosyl- als auch die pflanzlichen Flavonol 3-O-Glucosyltransferasen. Daraus folgt, dass in einem *screening* mit einer heterologen Sonde aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeit eine Kontamination nicht auszuschließen ist. Deshalb sollte auch der Enzymtest für die sich im Roggenprimärblatt befindliche 3FGT etabliert werden. Da es sich hierbei um eine pflanzliche Glucosyltransferase handelt, ist eine cytosolische Lokalisation anzunehmen.

Der Enzymtest wurde mit Ü2 (siehe Zentrifugationsschema Material & Methoden) und Roggen- sowie Gerstenproteinen durchgeführt. Als Substrat eingesetzt wurden Cyanidinchlorid (ROTH, siehe Abb. 45, *peak* 17.7, Retentionszeit 17.7 min), Quercetin und Luteolin (nicht gezeigt), als Cosubstrat dienten UDP-Glucose bzw. -Glucuronat. Sowohl bei Gersten- als auch bei Roggenprimärblattproteinen wurden nur Cyanidinchlorid und Quercetin mit UDP-Glucose zum jeweiligen Glucosid umgesetzt (Cyanidin-3-O-Glucosid wurde über Dünnschichtchromatographie aus Roggenprimärblättern isoliert ^[BUSCH et al., 1986] und in der HPLC als Referenzsubstanz eingesetzt (Messung bei 520 nm); die Retentionszeit betrug 17.7 min, *peak* 17.7). Bei den *assays* mit UDP-Glucuronat oder Luteolin kam es zu keiner Produktakkumulation (dies erhärtet den Verdacht, dass es sich bei der scUGT nicht um eine 3FGT handelt; siehe hierzu phylogenetische Untersuchungen, bei denen die Distanz der scUGTs zu den 3FGTs deutlich wird, Abb. 33). Die Akkumulation des Glucosids erfolgte wesentlich schneller als die der Glucuronide beim UGT-*assay* (bereits nach 12 min ist das Produktakkumulationsmaximum erreicht).

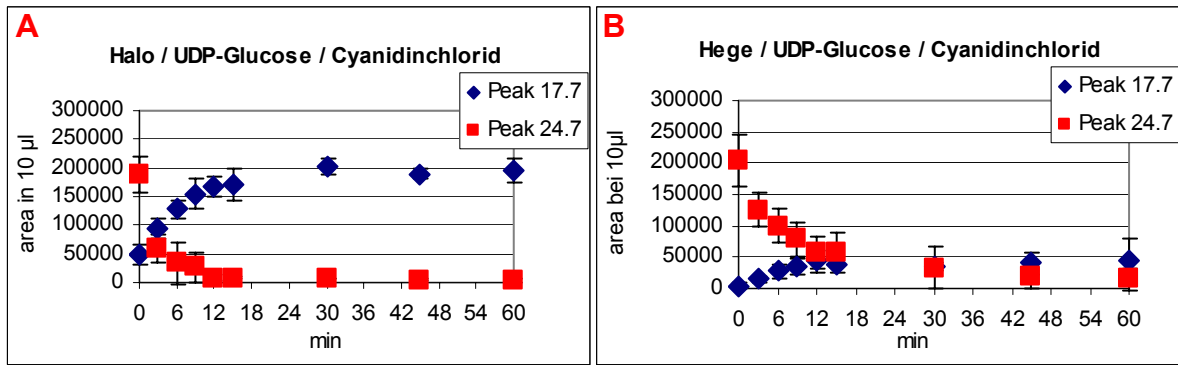


Abb. 45: A, B. Die Messungen wurden bei 520 nm durchgeführt. Peak 17.7 = detektiertes *peak* bei einer Retentionszeit von 17.7 min, Produkt*peak*, Cyanidin-3-O-Glucosid. Peak 24.7 = detektiertes *peak* bei einer Retentionszeit von 24.7 min, Substrat*peak*, Cyanidin-Aglycon. Dargestellt sind Flavonol 3-O-Glucosyltransferase-Enzymtests, etabliert für Roggen- (A) und Gersten- (B) Primärblattproteine (Ü2, siehe Zentrifugationsschema Material & Methoden).

5.2. Immunblotanalysen mit heterologen UGT- und 3FGT-Antikörpern

Basierend auf der oben mehrfach beschriebenen Aminosäurehomologie der 3FGTs und UGT stellte sich die Frage, ob diese beiden Enzyme im Roggen durch spezifische Antikörper erkannt werden können. Zur Verwendung kamen ein *Vitis vinifera* 3FGT- und mehrere humane UGT-Antikörper (genaueres siehe Antikörperliste im Anhang, Abb. 46). Es standen uns Antikörper der hUGT-Gruppe-2 (Detoxifikation von Xenobiotika und endogenen Steroiden) und -1 (Detoxifikation von Bilirubin und Phenolen) zur Verfügung [ALBERT et al., 1999; Barbier et al., 2000]

Antikörper der Gruppe 2 sind: EL-93 und EL95. Der hUGT-Antikörper EL-93 wurde generiert gegen Aminosäure 57-300 (Region vor der Zuckerbindungsbox, Substratbindungsstelle, siehe Kapitel 3) der humanen UGT2B17, er ist in humanem Gewebe spezifisch für alle Proteine der Gruppe 2. Der Antikörper EL-95 ist ein anderer Klon aus der selben Antikörpersynthese, er ist jedoch spezifischer und bindet nur an die hUGT2B17.

Der Antikörper RC-71, generiert gegen Aminosäure 312-531 der hUGT1A9 (beinhaltet die PSPG-Box und die Transmembrandomäne), erkennt im humanen Gewebe ein Enzym der Gruppe 1, die

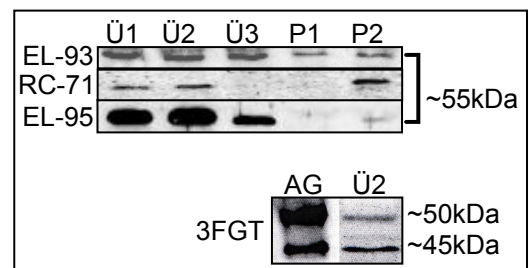


Abb. 46: Immunblot-Analysen mit Roggenprimärblatt-Proteinen und heterologen Antikörpern. Antikörper der hUGT2 sind: **EL-93** (generiert gegen Aminosäuren 57-300 der humanen UGT2B17, er ist im humanen Gewebe spezifisch für Enzyme der Gruppe hUGT2), **EL95** (anderer Klon aus der selben Antikörpersynthese, siehe oben; spezifisch für die hUGT2B17). Der Antikörper **RC-71**, generiert gegen Aminosäuren 312-531 der hUGT1A9, erkennt im humanen Gewebe die hUGT1A9 spezifisch. Der *Vitis vinifera* 3FGT-Antikörper erkennt spezifisch das Antigen (**AG** = das heterolog exprimierte, aufgereinigte Enzym) und das der 3FGT homologe Roggen-Enzym.

hUGT1A9, spezifisch. In den Immunblots ist zu beobachten, dass die Antikörper, die im humanen Gewebe spezifisch an einzelne Enzyme der Gruppe 2 binden, auch im Roggen an ein Enzym binden, das dem selben Verteilungsschema folgt wie die scUGTs (Lokalisation im Überstand, nicht im Sediment). Diese Antikörper können nur an den Teil des Proteins binden, der für die Substratbindung verantwortlich ist. Betrachtet man hierzu die phylogenetischen Untersuchungen, so lässt sich dieses Ergebnis bestätigen: die scUGTs sind den hUGT2s im Bereich der Substratbindungsstelle am nächsten.

Der humane Antikörper, der spezifisch für Enzyme der Gruppe 1 sein soll, bindet an ein membran-gebundenes Protein (Signal in Ü1, Ü2 und P2). Dabei kann es sich also nicht um ein den scUGTs verwandtes Enzym handeln.

Die Bindung des 3FGT-Antikörpers scheint sehr spezifisch für das der *Vitis vinifera* 3FGT homologe Enzym zu sein (siehe Antigen).

5.3. SELDI (Surface-Enhanced Laser Desorption / Ionization) -TOF (Time Of Flight) -MS (Massenspektrometer) -Analysen von Roggenproteinen

In diesem Teil der Arbeit sollte das Proteinchip-System der Firma CIPHERGEN für Roggenproteine etabliert werden (Abb. 47). Es sollte zur Bestimmung der genauen Proteinmasse der im Immunblot detektierten Proteine dienen. Dies sollte mittels einer Immunpräzipitation und eines Lectinbindungssassays auf dem Proteinchip geschehen. Die SELDI-TOF-MS-Technologie setzt sich aus drei Komponenten zusammen: dem Proteinchip-array, dem -reader und der -software. Der Proteinchip-array ist ein 10 mm x 80 mm langer Metallchip, der acht 2 mm spots mit variierender Oberfläche (je nach Applikation) trägt. Man unterscheidet chemische und biochemische Oberflächen. Oberflächen mit hydrophoben

Eigenschaften sowie solche, die Kationen- bzw. Anionenaustauscher darstellen, zählen zu den chemischen Beschichtungen. Oberflächen, die z.B. mit Protein-A, DNA oder anderen Proteinen voraktiviert sind, zählen zu den biochemischen Beschichtungen (spezielle chip-Oberfläche siehe jeweiliges Kapitel, in dem der chip verwendet wurde). Der Proteinchip-

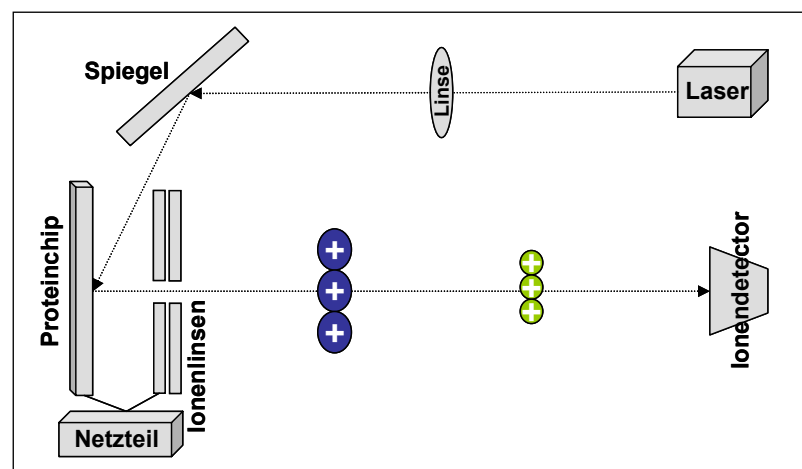


Abb. 47: Schematische Darstellung des Proteinchip-Systems der Firma CIPHERGEN.

reader ist mit einem LDI-TOF-MS ausgestattet (mit einem gepulsten *UV-nitrogen-laser*). Durch den Laser wird die Probe angeregt und geht in ihre ionisierte Gasform über. Diese Ionen gelangen nun in den TOF-MS-Teil des Instruments wodurch die Bestimmung ihrer Größe (von 1000 Da bis 500 kDa), gegeben durch ihre "Flugzeit", möglich wird. Damit die Probe ionisiert werden kann, muss sie mit einer Matrix (*Energy Absorbing Molecule (EAM)*) behandelt werden, mit der sie Co-kristallisieren kann.

5.3.1. Immunpräzipitation auf dem Proteinchip

In diesem Versuch wurden zwei unterschiedliche Proteinchips getestet, einerseits der Protein-G-aktivierte chip (PG20-chip, *preactivated* mit Protein-G, CIPHERGEN) und andererseits ein PS20-chip (*preactivated surface-chip*), der mit Protein-A aktiviert wurde. Die Proteine binden hier an die Epoxidgruppen des *chips*.

Im Folgenden konnte nun der heterologe Antikörper an Protein-A bzw. -G gebunden und der gesamte Komplex immobilisiert werden. Vor Applikation der Roggenproteine wurden die unspezifischen Bindungen geblockt. Es wurde nur die lösliche Fraktion (Ü3, Überstand nach 170.000 x g, siehe Zentrifugationsschema Material & Methoden) zum *antibody capture assay* (siehe Abb. 48 A) eingesetzt, da sich das gesuchte Protein (ermittelt in Differenzialzentrifugation Abb. 19) wahrscheinlich dort befindet.

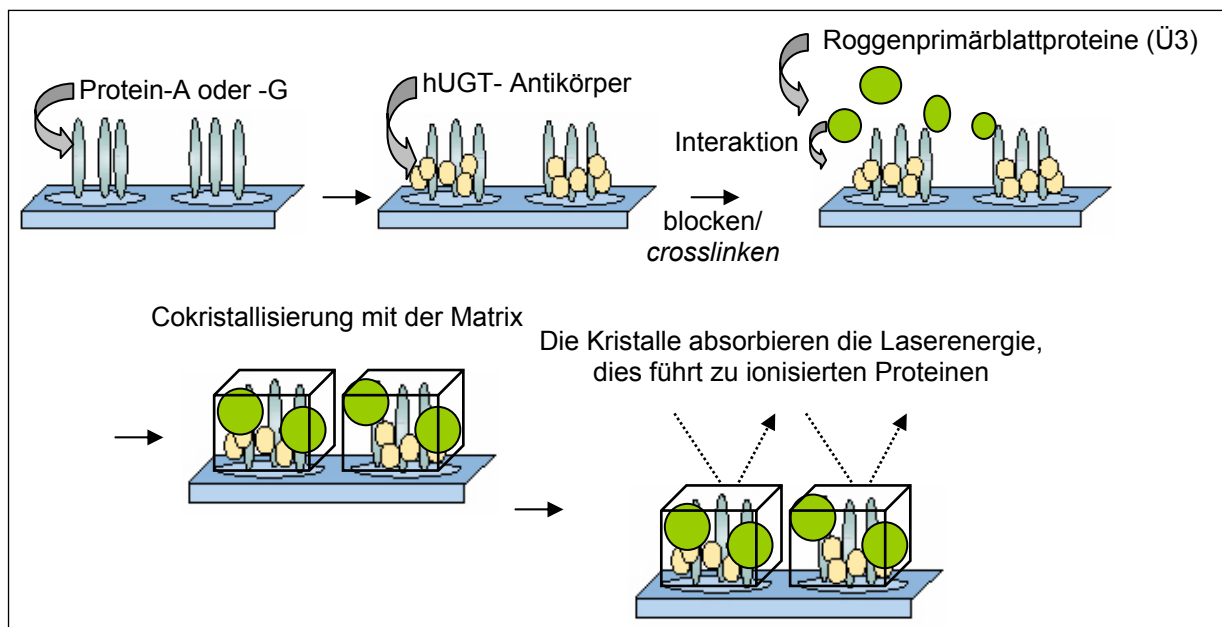


Abb. 48 A: *antibody-capture-assay*, Protein-A oder -G vermittelte Immunpräzipitation auf dem Proteinchip (PS-20 oder PG-20, siehe Text). Als heterologer Antikörper diente EL-95, ein Antikörper der hUGT Gruppe 2. Es wurde Ü3 der Roggenprimärblatt-Protein-Präparation verwendet (siehe hierzu schematische Darstellung Abb. 19).

Auf beiden *antibody capture chips* dienten 200 fmol TNF α in Verbindung mit 0.8 μ g TNF α -Antikörper (CIPHERGEN) als Positiv-Kontrolle. Als interner Standard wurde das im Extraktions-Puffer vorhandene BSA verwendet. Die Reinheit und Konzentration der Antikörper wurde vorerst auf einem NP-20-*chip* (*Normal Phase*, dieser *chip* trägt Siliconoxide, über die die Proteine *via* Serin, Threonin oder Lysin binden können) im Vergleich zu 1 μ g IgG (*bovine*) getestet. Dabei stellte sich heraus, dass nur einer der im *Immunblot* verwendeten Antikörper (Antikörper EL-95, siehe Antikörper-Liste im Anhang) die für den *assay* nötige Konzentration und Reinheit [siehe CIPHERGEN PG-20-*chip-manual*] besitzt. Dieser Antikörper wurde für die folgenden *assays* verwendet (siehe Abb. 48 B).

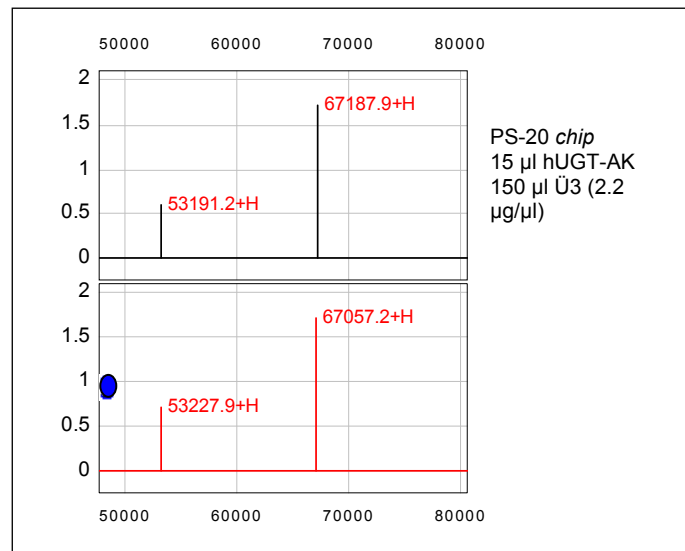


Abb. 48 B: *Antibody-capture*, Protein-G vermittelte Coimmunpräzipitation von Roggenprimärblatt-Proteinen (Ü3) mit einem hUGT-AK auf dem PS-20-*chip* (*preactivated surface*, oben), bzw. dem PG-20-*chip* (*preactivated* mit Protein G unten). Proteinmassen (53 kDa = präzipitiertes Protein und 67 kDa = BSA) wurden mit *protein chip reader* (CIPHERGEN) ermittelt. BSA diente als interner Standard. Die TOF-*area* wurden auf BSA normiert (●).

Dieser Antikörper wurde für die folgenden *assays* verwendet (siehe Abb. 48 B). Im Vergleich zu den Negativ-Kontrollen (PG-20: Antikörper/Ü3 = +/- oder -/+, PS20: Protein-A/Antikörper/Ü3 = -/+/, -/-/, -/-/, +/-/+ usw.) konnte auf beiden *chips* ein dominanter *peak* bei ~53 kDa detektiert werden. Dies entspricht der Masse der putativen scUGT (ermittelt im *Immunblot*).

Bei dem zweiten sichtbaren *peak* (~67 kDa) handelt es sich um den internen Standard BSA. Die Standardisierung erfolgte aufgrund der TOF-*area* des BSA-*peaks*, woraus sich ergibt, dass beide Methoden (Protein-G vermittelte Coimmunpräzipitation von Roggenproteinen mit einem hUGT-Antikörper auf dem PG-20- und PS-20-*chip*) zu einer ähnlich hohen Ausbeute an präzipitiertem Protein führen.

5.3.2. Lectinbindungsassay

Lectine sind Proteine oder Glycoproteine, die reversibel an spezifische Segmente von Kohlenhydraten durch hydrophobe Interaktion binden. Sie binden spezifisch Mono- oder Oligosaccharide. Der Lectinbindungsassay (siehe Abb. 49 A) verläuft nach einem ähnlichen Schema wie der zuvor beschriebene *antibody capture assay* [siehe hierzu HAAB & KELLER, 2002; Beschreibung der Reinigung einer Galactosyltransferase durch Lectinaffinitätschromatographie].

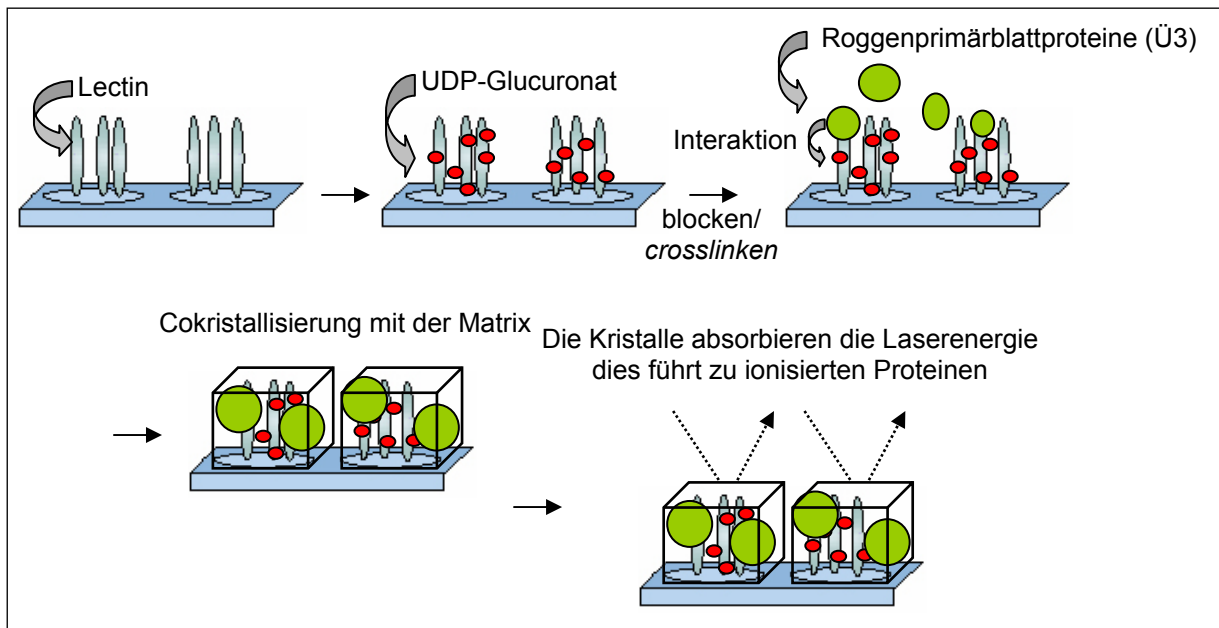


Abb. 49 A: Lectinbindungs-assay, Bindung des Komplexes aus ConA, UDP-Glucuronsäure und Roggenprimärblatt-Proteinen (Ü3) an einen PS20-Proteinchip (genauerer siehe Text).

Anstelle des Protein-G bzw. -A dient nun das Lectin-ConA als Bindung des Komplexes zum Proteinchip (PS20-chip). Lectine binden aktivierte Zucker wie z.B. UDP-Glucose. Grundlage für dieses Experiment war die "Unspezifität" des Lectins-ConA für den Zucker. Der Komplex aus Lectin und UDP-Glucuronat wurde nun, wie zuvor der Komplex aus Protein-G und Antikörper, immobilisiert. Dann wurden wiederum die Roggenprimärblattproteine (Ü3) appliziert in der Hoffnung, dass die UGT ihr Cosubstrat findet und an dieses bindet. Das Lectin wurde vorerst alleine auf einen PS20-chip aufgetragen, um die genauen Eigenschaften im SELDI kennenzulernen - ConA besteht aus zwei Dimeren à 52 kDa - und so mögliche Kontaminationen im späteren assay durch nicht vollständige Immobilisierung auszuschließen (Abb. 49 B). Folgende Kontrollen wurden durchgeführt: Lectin ohne UDP-Glucuronsäure mit Ü3, Lectin mit UDP-Glucuronsäure ohne Ü3, ohne Lectin mit UDP-Glucuronsäure mit Ü3. Dabei stellte sich heraus, dass die Immobilisierung des Lectins ohne und mit UDP-Glucuronsäure erfolgreich war und dass ohne UDP-Glucuronsäure kein Roggenprotein an das Lectin bindet. Nur bei der

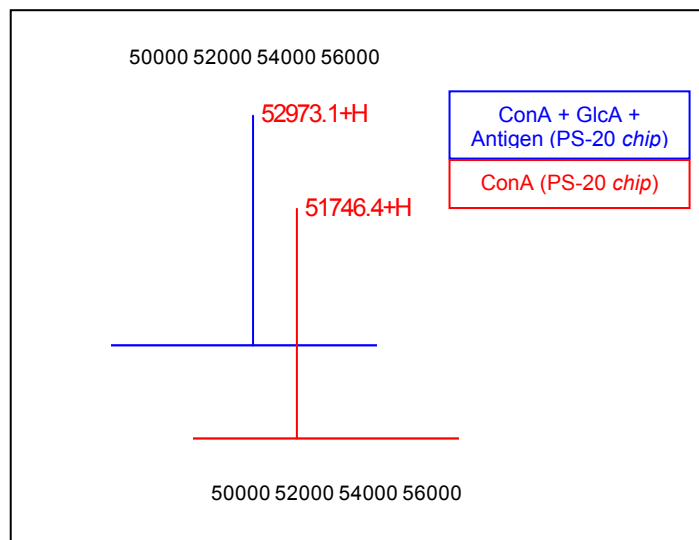


Abb. 49 B: SELDI-Analysen: Produktpeak (**blau**) des Lectinbindungsassay auf einem PS-20-Proteinchip. **Rot:** ein ConA Dimer (siehe Text).

Applikation aller drei Komponenten wurde ein Peak bei ~ 53 kDa sichtbar (Abb. 49 B). Offensichtlich interagieren ConA, UDP-Glucuronsäure und Glucuronosyltransferasen, für eine Proteinsequenzierung jedoch ist (1.) die Ausbeute zu gering und (2.) der *background* auf dem Proteinchip zu hoch (dieser lässt sich evt. durch die Verwendung anderer Lectine reduzieren, siehe Diskussion).

5.4. Induktion der Enzymaktivität durch "Luteolin-fütterungen"

Da in Roggenwurzeln keine UGT-Aktivität zu beobachten war, konnte man dieses System verwenden, um eine mögliche Induktion der Enzymaktivität zu testen. Einerseits sollten die bisher nicht untersuchten Flavonoide der Roggenwurzeln von nicht behandelten im Vergleich zu "Luteolin-gefütterten" untersucht werden und andererseits die Proteine extrahiert und diese in einer SELDI-Analyse und einem Enzymassay verglichen werden. Wenn durch die "Fütterung von Luteolin" die Proteinbiosynthese der UGT angeregt würde, so wäre anzunehmen, dass in induzierten Wurzeln im Vergleich zu nicht-induzierten im UGT-assay Luteolin umgesetzt wird.

5.4.1. MeOH-Extrakte

Zuerst wurden Methanolextrakte der mit Luteolin "gefütterten" Blätter und Wurzeln angefertigt. Die Blätter zeigten keine Änderung ihres Flavonoid-Musters und -Gehalts. In den MeOH-Extrakten der "gefütterten" Wurzeln sah man allerdings im Vergleich zur Negativkontrolle einen prominenten *peak* (Retentionszeit 14.9 min), der ein apolareres Luteolinkonjugat darstellt (siehe hierzu maßgebliche Bereiche des Spektrums und HPLC-Chromatogramm, Abb. 50), bei dem es sich aber nicht um N, R₂ oder R₁ handelt (da abweichende Retentionszeit). Dieser *peak* war auch in den Wurzel-Exsudaten zu finden.

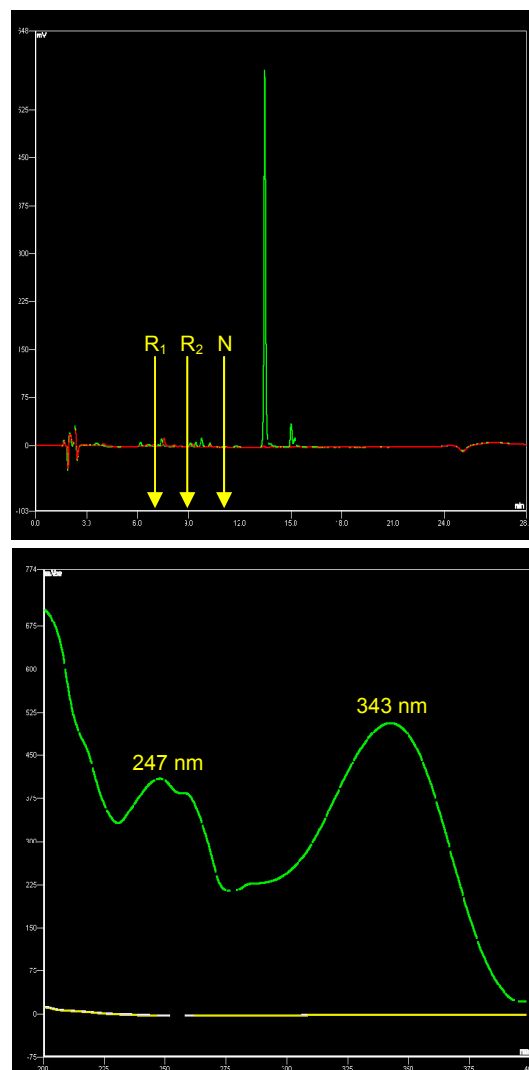


Abb. 50: HPLC-Chromatogramm gemessen bei 340 nm (**oben**), Vergleich von Methanolextrakten gefütterter / nicht gefütterter Wurzeln (grün = gefüttert, rot = nicht gefüttert, Fütterungsbedingungen siehe Material & Methoden). X-Achse = min, Y-Achse = mV. Die Retentionszeiten der Roggenflavonoide in diesem Gradienten betragen: R₁ = 7.5 min, R₂ = 8.9 min, N = 10.6 min, L = 13.5, *peak x* = 14.9. Gradient siehe S. 41 (UGTb). **Unten:** Maßgeblicher Teil des Spektrums (von 200 bis 400 nm). X-Achse = nm. grün = gefüttert, gelb = nicht gefüttert.

5.4.2. Analyse der Proteinextrakte "gefütterter" Wurzeln / UGT-Enzymtest

Aufgrund der oben beschriebenen Ergebnisse konnte davon ausgegangen werden, dass es sich bei dem induzierten Enzym nicht um eine der oben beschriebenen scUGTs handelte. Um diese Vermutung zu bestätigen, wurden UGT-*assays* mit Wurzelproteinen gefütterter und nichtgefütterter Pflanzen durchgeführt (Abb. 51). Dabei stellte sich folgendes heraus: (1.) bei dem induzierten Protein handelt es sich nicht um eine der oben beschriebenen scUGT (da beim *in vitro* Enzymtest kein N, R₁ oder R₂ entsteht), (2.) es scheint aber Proteine zu geben, die in der Wurzel einerseits ein Luteolinglycosid aufbauen (siehe Spektrum Abb. 50), andererseits aber Luteolin abbauen.

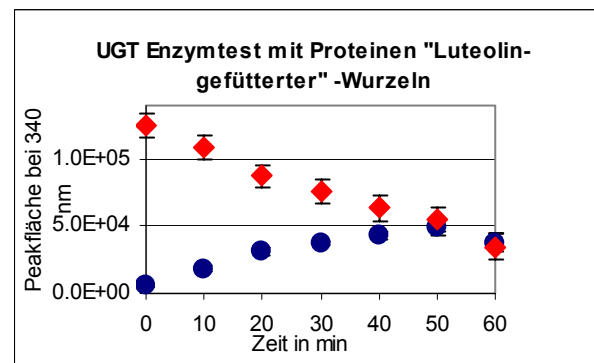


Abb. 51: UGT-Enzymtest mit Proteinen luteolingefütterter Wurzeln. Rot = Luteolin (Retentionszeit von 30.2 min), Blau = "neuer" peak (Retentionszeit von 28.8 min). Gradient siehe S. 41 (UGTa).

5.4.3. SELDI-Analyse

Proteinextrakte gefütterter und nichtgefütterter Wurzeln (117 μ M Luteolininkubationslösung, siehe Material & Methoden) sollten außerdem durch eine SELDI-Analyse (siehe unten) verglichen werden. Dafür wurde ein SAX2-*chip* verwendet. Bei dem SAX2-*chip* handelt es sich um einen starken Anionen-Austauscher-*array*, dessen aktive *spots* kationische quarternäre Ammoniumgruppen enthalten, die mit der negativ geladenen Protein-Oberfläche interagieren (z.B. über Asparagin- oder Glutaminsäure). Bei der Wurzelfütterung mit einer Inkubationsdauer von 10 min, 30 min und 3 h

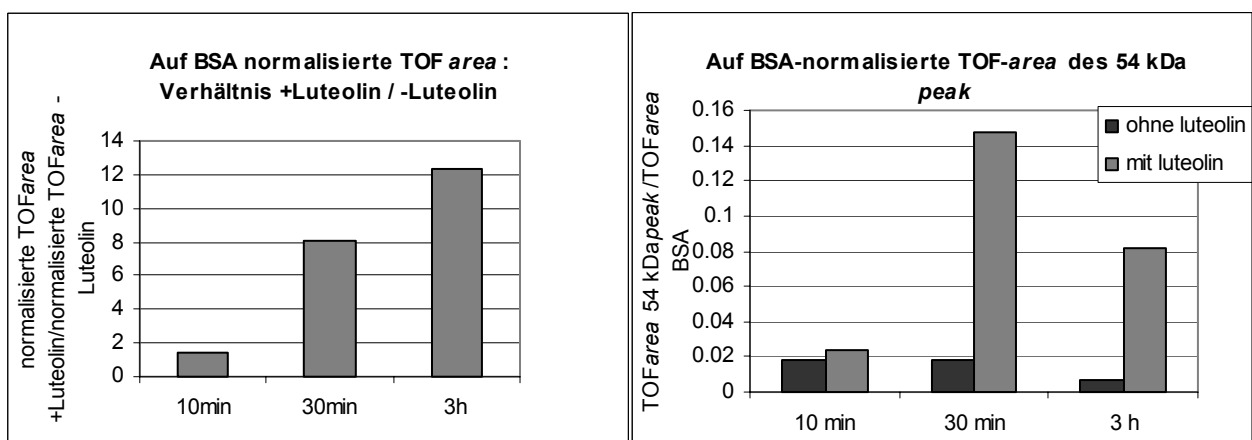


Abb. 52: Links: Anstieg des 54 kDa peaks bei einer Inkubation der Wurzeln mit Luteolin von 10 min, 30 min und 3h (dargestellt sind die TOF-*area*, normalisiert auf das im Proteinextraktionspuffer befindliche BSA). Rechts: Vergleich der normalisierten TOF-*area* des 54 kDa peaks der Proteine gefütterter und nicht gefütterter Wurzeln.

sieht man deutlich, dass es zu einem Konzentrations-Anstieg eines ~54 kDa Proteins kommt (siehe Abb. 52). Bei diesem Protein könnte es sich um eine Zuckertransferase handeln, deren Expression durch Luteolin angeregt wird.

6. Subzelluläre Lokalisation

Da viele Autoren auf eine Lokalisation der Flavonoidbiosynthese-Enzyme in einem Enzymkomplex "metabolic channeling" in teilweiser Assoziation mit dem endoplasmatischen Retikulum hinweisen [WINKEL-SHIRLEY, 1999], die glycosylierten Metabolite aber in die Vakuole transportiert werden, stellte sich die wichtige Frage, in welchem subzellulären Kompartiment sich die scUGTs befinden (dieses Modell wurde zuerst 1974 von STAFFORD beschrieben, siehe aber auch WINKEL-SHIRLEY, 2001).

Die Vermutung, dass die Enzyme in einem Multienzymkomplex angeordnet sind, basiert auf folgenden Beobachtungen bzw. Erfordernissen: (1.) da die Intermediate toxisch sein können, müssen sie direkt metabolisiert werden. (2.) Auch an vielen Kreuzungspunkten der Biosynthese gibt es eine Konkurrenz um Substrate, sodass (nahezu) kein Intermediat akkumuliert und (3.) müssen die einzelnen Schritte schnell auf interne und externe Signale reagieren können, so dass schon deshalb eine räumliche Nähe der Enzyme von Vorteil wäre. Es konnte gezeigt werden, dass sich die PAL und die CHS *loosely associated* mit der cytoplasmatischen Seite des rauhen ER befinden [HRAZDINA & WAGNER, 1985; HRAZDINA et al., 1987]. Dies konnte für die CHS, CHI und DFR durch Coimmunpräzipitation, Affinitätschromatographie und *two-hybrid*-Analysen, am Beispiel von *Arabidopsis thaliana*, bestätigt werden. Die Interaktion konnte jedoch nur bei den jeweils richtigen Paaren in der richtigen Orientierung festgestellt und für CHS, CHI und DFR gezeigt werden [BURBULIS & WINKEL-SHIRLEY, 1999; SASLOWSKY & WINKEL-SHIRLEY, 2001]. Die Sekundärstoff-Glycosyltransferasen dürften sich also als "letzter Schritt der Flavonoid-Biosynthese" ebenfalls mit in diesem Komplex befinden. Da die Flavonoide aber nicht im Cytoplasma akkumulieren, wird ein Vesikeltransport von Flavonoiden angenommen [SNYDER & NICHOLSON, 1990]. Die Biogenese der Vakuole erfolgt über einen Fluss von Vesikeln, die durch sequenzielles Abschnüren und Verschmelzen vom ER als Syntheseort der Membranlipide über den Golgi-Apparat, das Trans-Golgi-*network* und ein vermutetes prävakuoläres Kompartiment letztlich mit dem Tonoplasten fusionieren [MARTY, 1997]. Es stellte sich daher die Frage, ob die scUGTs auch an dem Enzymkomplex des ER beteiligt sind, oder ob sie mit der Vakuole bzw. den Vesikeln assoziiert sind (und evt. eine Interaktion mit den Transportern eingehen). Über die Lokalisation innerhalb des Cytoplasmas gibt es kontroverse Berichte: einerseits konnte durch Immunlokalisation eine diffuse cytoplasmatische Lokalisation und andererseits eine *vesicle-like* Membranlokalisation [LATCHINIAN-SADEK & IBRAHIM, 1991] der GTs gezeigt werden. Ibrahim [IBRAHIM, 1990; IBRAHIM et al., 1987] interpretiert letzteres mit einer sehr schwachen Assoziation der GTs mit dem ER. Die beiden Luteolin-

Glucuronide R_1 und R_2 werden durch einen direkt energetisierten Mechanismus (ATP-abhängig) in die Vakuole geschleust. Dieses Transportsystem ist während der ganzen Roggenprimärblattentwicklung konstitutiv exprimiert (MRP-like Transporter) [KLEIN et al., 1998; KLEIN et al., 2000].

Um Erkenntnisse über die subzelluläre Lokalisation der scUGTs zu gewinnen, wurden zunächst Differenzialzentrifugationen, ausgehend von Protein-Rohextrakten ganzer Roggenprimärblätter, durchgeführt (siehe Zentrifugationsschema Material & Methoden).

6.1. Differenzialzentrifugation

Enzymaktivitätsmessungen der scUGTs sollten an löslichen und partikulären Zellfraktionen - mittels Differenzialzentrifugation (siehe Schema 53, genaueres siehe Material & Methoden) hergestellt - durchgeführt werden. Dazu wurde 1 g Frischgewicht der Primärblätter mit 10 ml KPi-Puffer extrahiert.

Die absoluten Aktivitäten (d.h. die Produktsynthese pro Zeitintervall, siehe Rechenbeispiel S. 42) der einzelnen

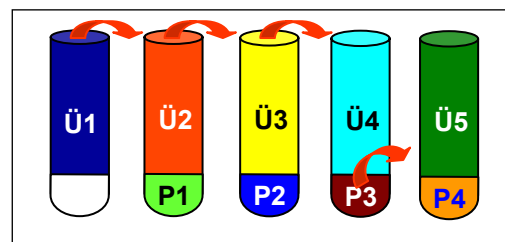


Abb. 53: Schematische Darstellung der vorgenommenen Differenzialzentrifugation (Detail: siehe Material & Methoden).

Fraktionen wurden verglichen und in relativen Einheiten dargestellt (Abb. 54). Es zeigte sich eine deutliche Anreicherung der Glucuronosyltransferase in der löslichen Fraktion (Abb. 54, siehe auch Abb. 73 Diskussion).

In den verschiedenen Fraktionen lagen folgende Proteinkonzentrationen vor: Ü1, Ü2, Ü3, P1 und P2 = 4.6, 3.4, 2.2, 3.2 bzw. 6.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (Extinktion: Ü1 = 0.87225, Ü2 = 0.64375, Ü3 = 0.42775, P1 = 0.60575, P2 = 1.156, siehe Material & Methoden).

Um eine bessere Extraktion der Membranproteine zu gewährleisten, wurden dem Extraktionspuffer 0.05 % Triton-X 100 bzw. zur Stabilisierung der Proteine 10 % Glycerin zugesetzt. Beides führte jedoch im Vergleich zum oben beschriebenen Standardassay mit 2 mg BSA nicht zu einer gesteigerten Glucuronosyltransferaseaktivität in der Membranfraktion P2 ("Mikrosomenfraktion"). Da eine Assoziation nur eines der drei Enzyme mit der Membranfraktion vermutet wurde, sollten optimale assay-Bedingungen für die einzelnen Enzyme geschaffen werden. Dafür wurde der Standard-Kaliumphosphat-Extraktions-Puffer durch einen Citratpuffer ersetzt (siehe hierzu Dissertation M. SCHULZ, 1986, sie nennt Citratpuffer als optimalen assay-Puffer für die LGT.). Dies führte jedoch auch nicht zu einer Steigerung der LGT-Aktivität der Membranfraktion.

Um zu ermitteln, ob selbst die ohnehin geringe Aktivität in P1 und P2 auf eventuelle Reste an Überständen d.h., lösliche Kontaminationen von P1 und P2, zurückzuführen ist, wurde das Sediment P2 dreimal gewaschen (Waschüberstände Ü4, Ü5 und Membranfraktionen P3 und P4 (siehe Material

& Methoden). Hier wurde sichtbar, dass die Aktivität des Sediments P2 bei zunehmender Waschung von P2-P4 stark abnahm.

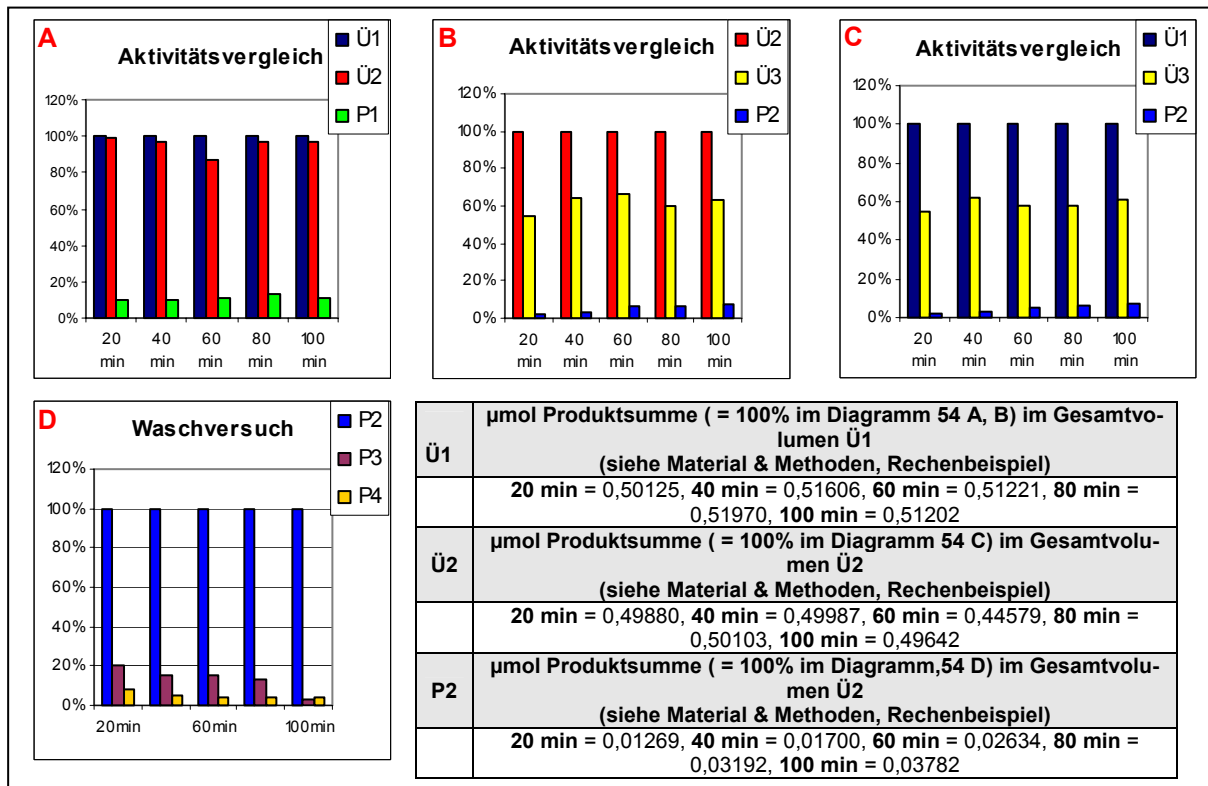
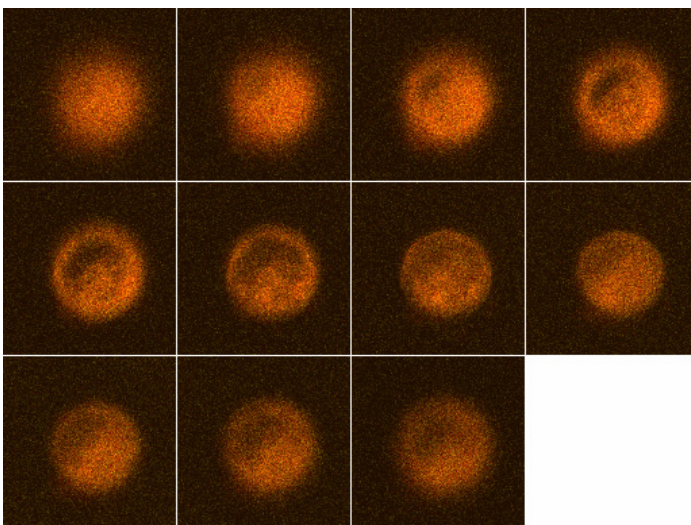


Abb. 54: Aktivitätsvergleich der einzelnen Proteinfractionen im assay mit 85 μM Luteolin und 2 mg/ml BSA, berechnet über die Summen der Produkte (siehe Material & Methoden). Zentrifugationsschema siehe oben. **A:** Ü1 wurde als Ausgangsaktivität (100 %) angenommen und dazu die Aktivitäten von Ü2 und P1 ins Verhältnis gesetzt. **B:** Ü2 wurde als Ausgangsaktivität (100 %) angenommen und dazu die Aktivitäten von Ü3 und P2 ins Verhältnis gesetzt. **C:** Ü1 wurde als Ausgangsaktivität (100 %) angenommen und dazu die Aktivitäten von Ü3 und P2 ins Verhältnis gesetzt. **D:** Waschungen des Sediments P2. P2 wurde als Ausgangsaktivität (100 %) angenommen und dazu die Aktivitäten von P3 und P4 ins Verhältnis gesetzt.

6.2. fluoreszierende UGT-Fusionsproteine

Die in der Differenzialzentrifugation ermittelten "löslichen" Aktivitäten sprechen für eine cytoplasmatische Lokalisation der scUGTs; dies sollte durch fluoreszierende Fusionsproteine überprüft werden. Dafür wurden die folgenden Konstrukte erstellt (siehe Material & Methoden): scUGT-mit Intron-YFP / -CFP bzw. scUGT-YFP / -CFP (siehe Abb. 56). Diese Fusionsproteine wurden unter der Kontrolle des Ubiquitin-Promotors aus Mais heterolog in Epidermiszellen von Gerstenprimärblättern exprimiert (*particle bombardment*, siehe Material & Methoden).

Es stellte sich jedoch heraus, dass keine "diffuse" Lokalisation der fluoreszierenden Proteine im Cytoplasma der Gerstenzellen zu beobachten war (siehe unten, Anmerkung BY2-Protoplasten). Anstatt dessen fluoreszierte in allen Zellen ein feines Netzwerk, das sich um die Zentralvakuole spannte (siehe Abb. 56 C, D). Zur Visualisierung des feinen Netzwerks mussten jedoch überbelichtete Aufnahmen gemacht werden, sodass bei diesen Bildern fälschlicherweise auch Lokalisation der Proteine im Kern sichtbar wird (siehe hierzu im Vergleich ER-Lokalisation Abb. 56 A). Des Weiteren konnte man um den Nucleus herum eine zirkuläre Formation, die wahrscheinlich das ER darstellt (Abb. 56 A), beobachten, an deren retikulären Fortsätzen sich vesikuläre Strukturen befinden (Abb. 56 B). Diese Beobachtungen sollten nun mit Markerproteinen bestätigt werden. Bei beiden Konstrukten (mit Intron und ohne Intron, siehe schematische Darstellung der Konstrukte auf der nächsten Seite) war das gleiche Ergebnis zu beobachten (siehe den Vergleich Abb. 56 C und D). Da sich im Intron ein Stop-Codon befindet, konnte hiermit auch das richtige *splicing* gezeigt werden. Die Ergebnisse waren - wie zu erwarten - für YFP und CFP gleich (da die YFP- im Vergleich zur CFP-Fluoreszenz intensiver ist, wurde hier auf die demnach redundanten Darstellungen der CFP-Fusionsproteine verzichtet).



Anmerkung BY2-Protoplasten: bei den im Vergleich zu Gerstenprimärblättern "primitiveren" BY2-Protoplasten ist eine "klare" cytoplasmatische Lokalisation zu beobachten (Abb. 55, rechts) zeigt Schnittsequenz durch einen Protoplasten). Für die Transformation der Protoplasten wurde eine Cotransfektion von CaM-RFP und scUGTb-YFP, beide unter der Kontrolle des Ubiquitin-Promotors aus Mais, verwendet (Überlagerung beider Fluoreszenzen führt zu der in der Abb. sichtbaren orangefarbenen Darstellung, Konstrukte siehe Abb. 56 und 67). Die Zentralvakuole wird durch das Fehlen der Fluoreszenz (schwarz) deutlich sichtbar.

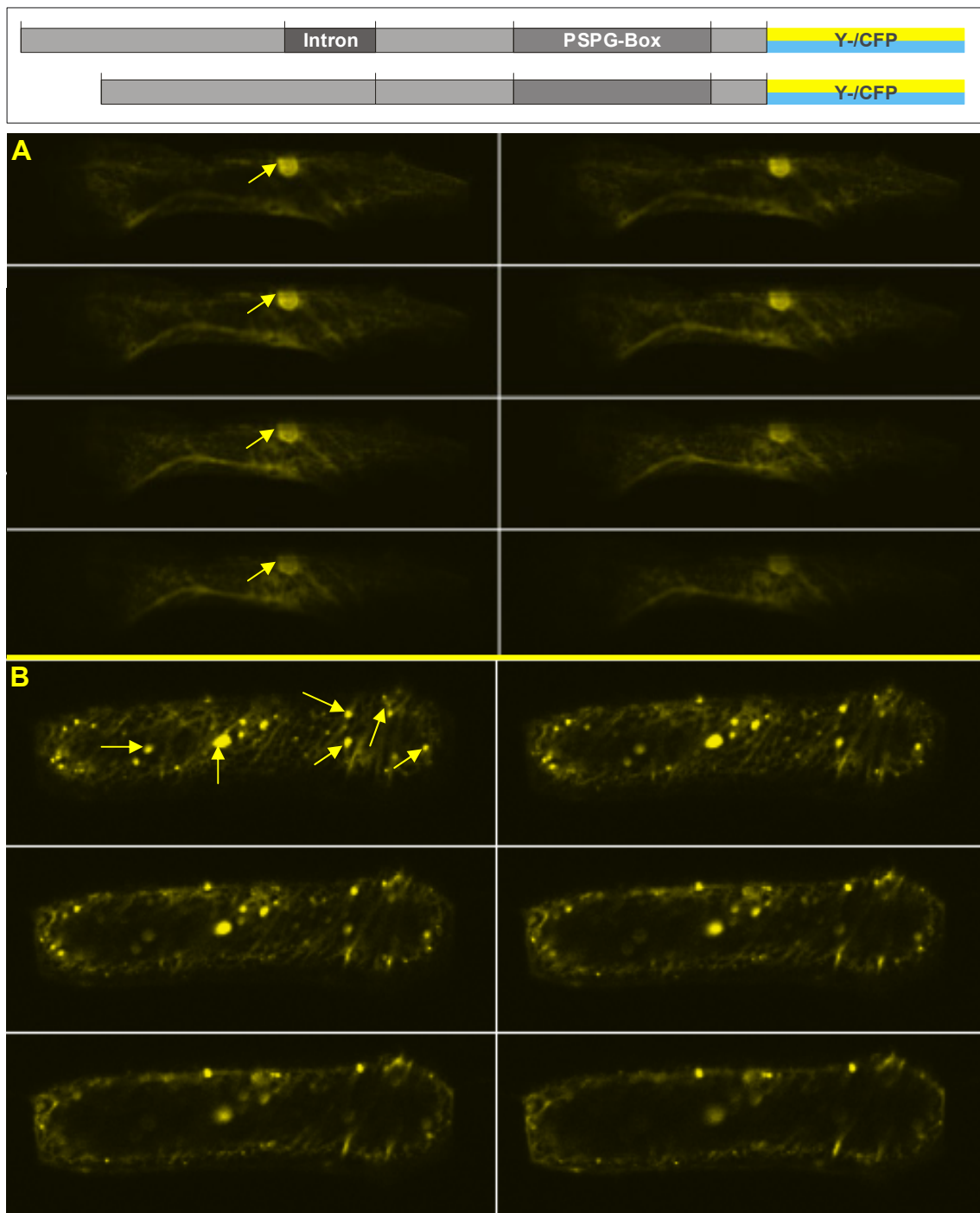


Abb. 56 A-D: Fluoreszenzaufnahmen der Konstrukte K64mi-3936-YFP und K64oi-3936-YFP (schematisch dargestellt siehe **oben**), exprimiert in Gerstebältern unter der Kontrolle des Ubiquitin-Promotors aus Mais. K64mi-3936-YFP / CFP und K64oi-3936-YFP / CFP zeigten ein identisches Bild. **A** = ER-Lokalisation der scUGTb; der Nucleus wurde bei einigen optischen Schnitten durch gelbe Pfeile markiert. **B** = Vesikel-Lokalisation der scUGTb; an einem Schnitt wurden einige prominente Vesikel mit gelben Pfeilen markiert. **C und D** (nächste Seite) = Anfärbung der retikulären Fortsätze. Zur Visualisierung dieser Fortsätze mussten die Bilder jedoch überbelichtet werden, sodass fälschlicherweise der Eindruck der Lokalisation der Proteine im Kern entstand (C = Konstrukt mit Intron, D = Konstrukt ohne Intron).

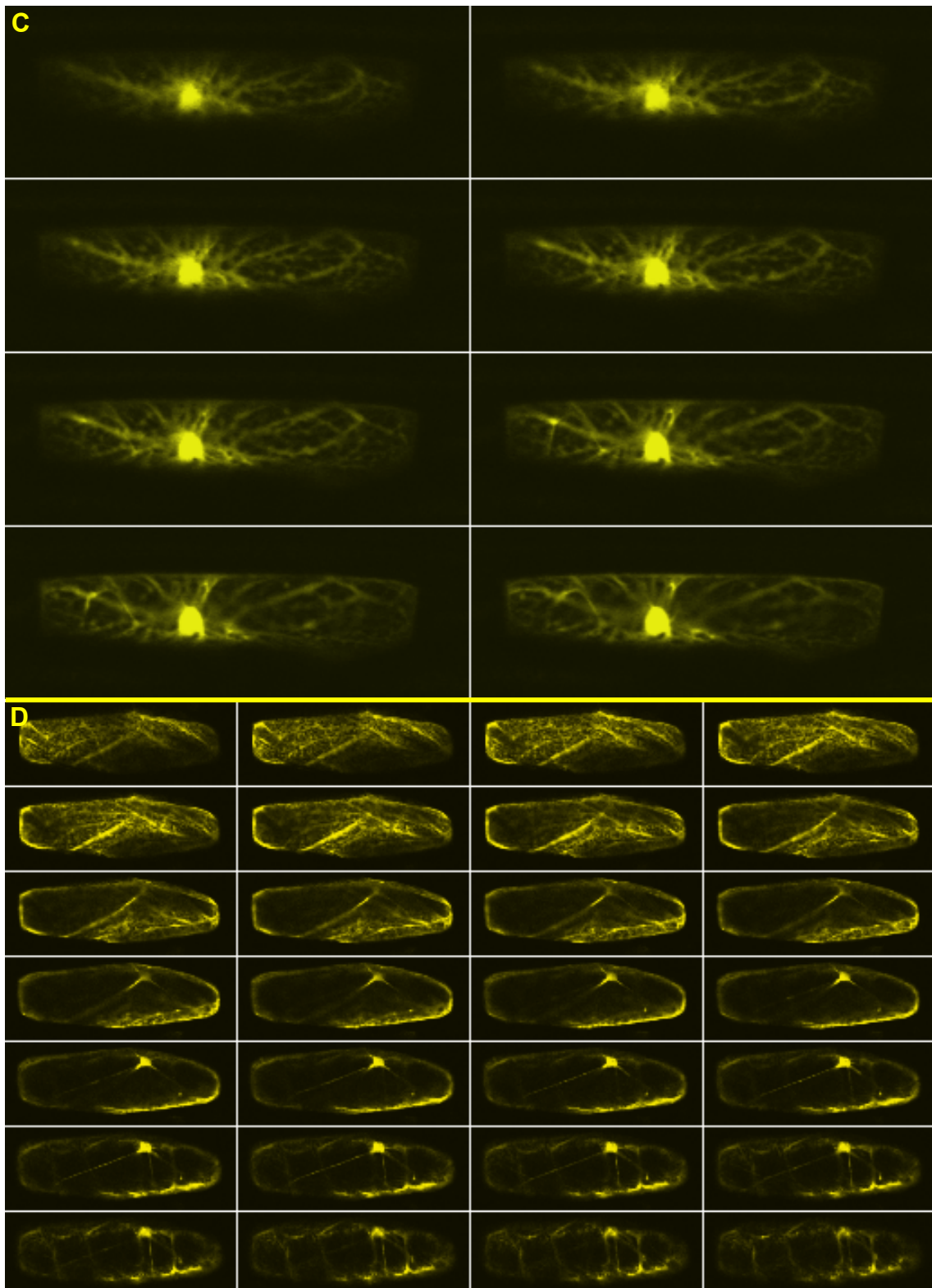


Abb. 56 C, D: Legende siehe vorherige Abbildung.

6.2.1. Kontrollen / Colokalisation

Um die mögliche Colokalisation der scUGT mit dem endoplasmatischen Retikulum, dem vermuteten Ort der Flavonoidbiosynthese bzw. der abschließenden Glucuronidierung, überprüfen zu können, diente die humane UGT1a1, ebenfalls fusioniert mit YFP bzw. CFP (die humanen UGTs besitzen eine Transmembrandomäne und eine ER-Signalsequenz), als ER-Marker (schematische Darstellung des Konstrukts Abb. 57, Fluoreszenzbild Abb. 59). Da es nicht klar war, ob das humane Protein unter der Kontrolle des Ubiquitin-Promotors aus Mais in Gerstenblättern exprimiert wird, wurde auch noch die Gerste-ER-Signalsequenz, unter der Kontrolle des 35S-Promotors, fusioniert an GFP, verwendet (dieser Promotor ist in Monocotyledonen jedoch schwächer als der Ubiquitin-Promotor, schematische Darstellung des Konstrukts Abb. 57, Fluoreszenzbild Abb. 60). Um eine Colokalisation mit Tonoplasten-Vesikeln im Cytoplasma bzw. der Vakuolenmembran zu überprüfen, wurde ein *tonoplast intrinsic protein* (TIP), fusioniert mit YFP bzw. CFP, unter der Kontrolle des Mais-Ubiquitin-Promotors verwendet (schematische Darstellung des Konstrukts Abb. 57, Fluoreszenzbild Abb. 61). Als Cytoplasma-Marker diente Calmodulin-RFP unter der Kontrolle des Mais-Ubiquitin-Promotors (schematische Darstellung des Konstrukts Abb. 57, Fluoreszenzbild Abb. 58).

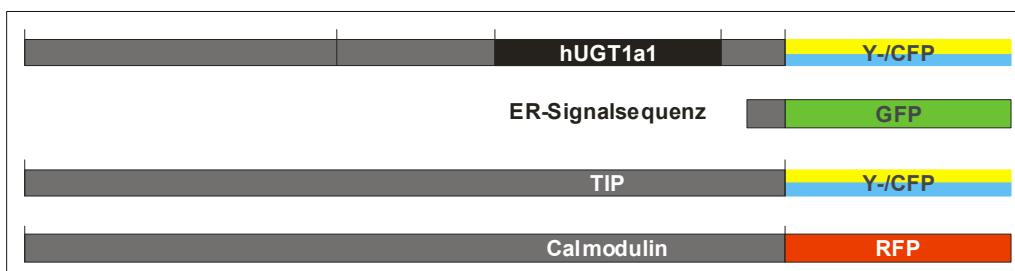


Abb. 57: Schematische Darstellung der zur Ermittlung der subzellulären Lokalisation der scUGTb verwendeten Konstrukte. Von oben nach unten: **hUGT1a1** fusioniert mit YFP / CFP unter der Kontrolle des Ubiquitin-Promotors aus Mais. Das Protein besitzt eine ER-Signalsequenz und eine Transmembrandomäne, die der Integration in die ER-Membran dient. **ER-Signalsequenz-GFP** unter der Kontrolle des 35S-Promotors. **TIP-YFP** (*tonoplast intrinsic protein*): dieses Protein sollte eine mögliche Colokalisation der scUGT mit der Tonoplasten-Membran sichtbar machen. Das cytoplasmatische Protein **Calmodulin**, fusioniert mit RFP, diente als Cytoplasma-Marker.

In erster Linie galt es, die in der Differenzialzentrifugation ermittelte cytoplasmatische Lokalisation zu überprüfen bzw. nachzuweisen. Bei der Colokalisationsstudie mit dem Calmodulin aus Mais stellte sich jedoch heraus, dass keine klare Lokalisation der scUGT im Cytoplasma zu beobachten ist (hier gezeigt durch ein *cobombardment* von scUGT-YFP und Calmodulin-RFP, Abb. 58).

Beide für die ER-Colokalisation verwendeten Marker waren leider sehr schwach ausgeprägt (Abb. 59), dennoch war in einigen Zellen eine klare Colokalisation mit diesen Markern um den Kern

herum sichtbar (siehe hierzu auch Heterodimerisierungsstudie). Die scUGT ist also offensichtlich mit dem ER assoziiert, daher scheint eine Integrierung der scUGT in den Flavonoidbiosynthese-Multienzymkomplex naheliegend. Da die Ergebnisse der Differenzialzentrifugation jedoch für eine Lokalisation in der löslichen Fraktion sprechen, handelt es sich offensichtlich nicht um eine Membranintegration (dies wird auch durch die Aminosäure-Sequenz nicht suggeriert), sondern um ein "loosely attachment" z.B. durch Protein-Protein-Interaktion mit einem oder mehreren Enzymen des Komplexes.

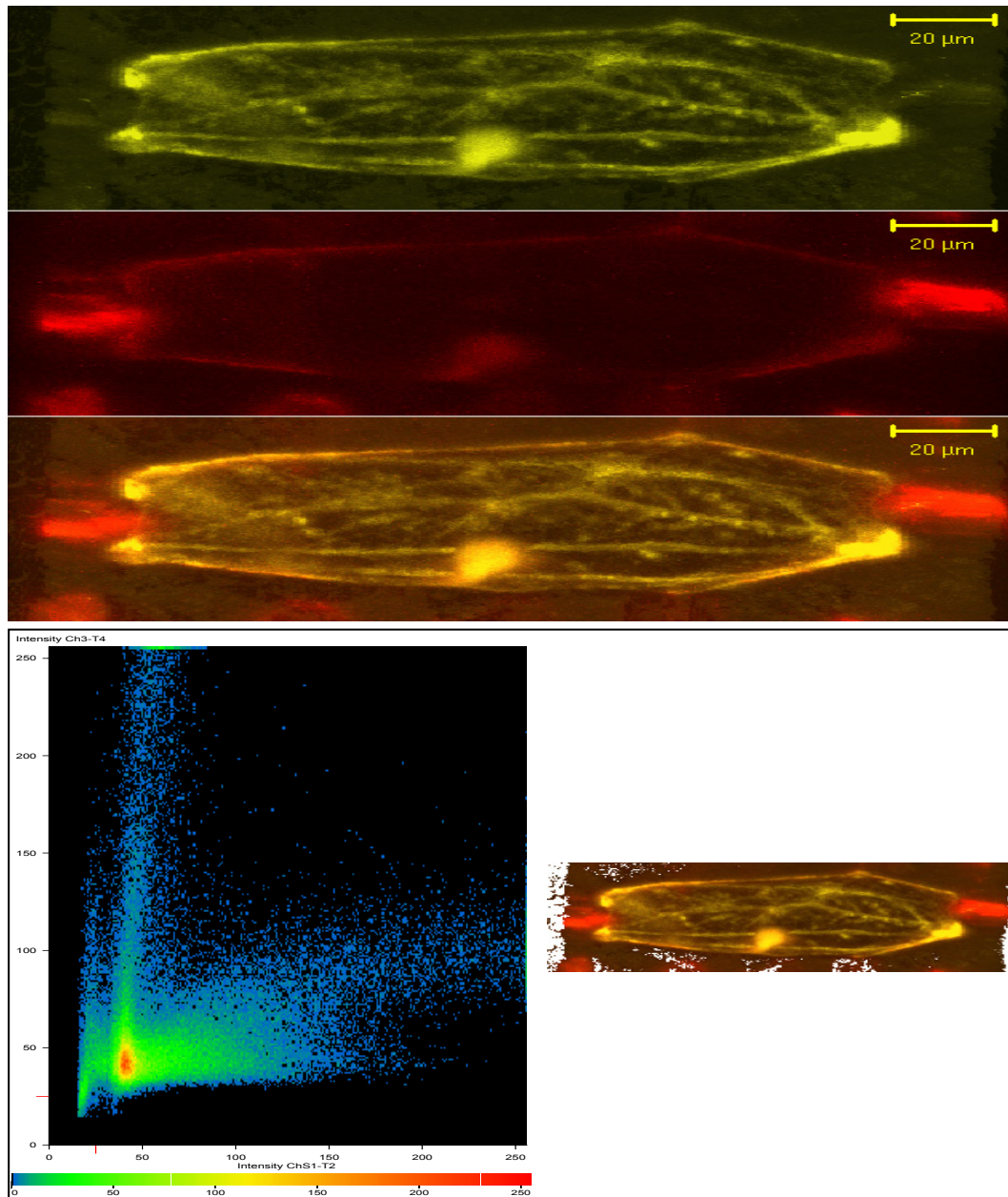


Abb. 58: Gerstenepidermiszelle *cobombarded* mit Calmodulin-RFP bzw. scUGTb-YFP. **Oben:** Bilder der einzelnen Fluorophore (von oben nach unten: YFP / RFP / *overlay*). Dort ist deutlich zu sehen, dass keine Colokalisation vorliegt. **Unten** sind die Intensitäten der einzelnen Kanäle getrennt aufgetragen (X-Achse = Intensität YFP, Y-Achse = Intensität RFP). Auch bei dieser Darstellung wird sichtbar, dass keine Lokalisation der beiden Fluorophore vorliegt.

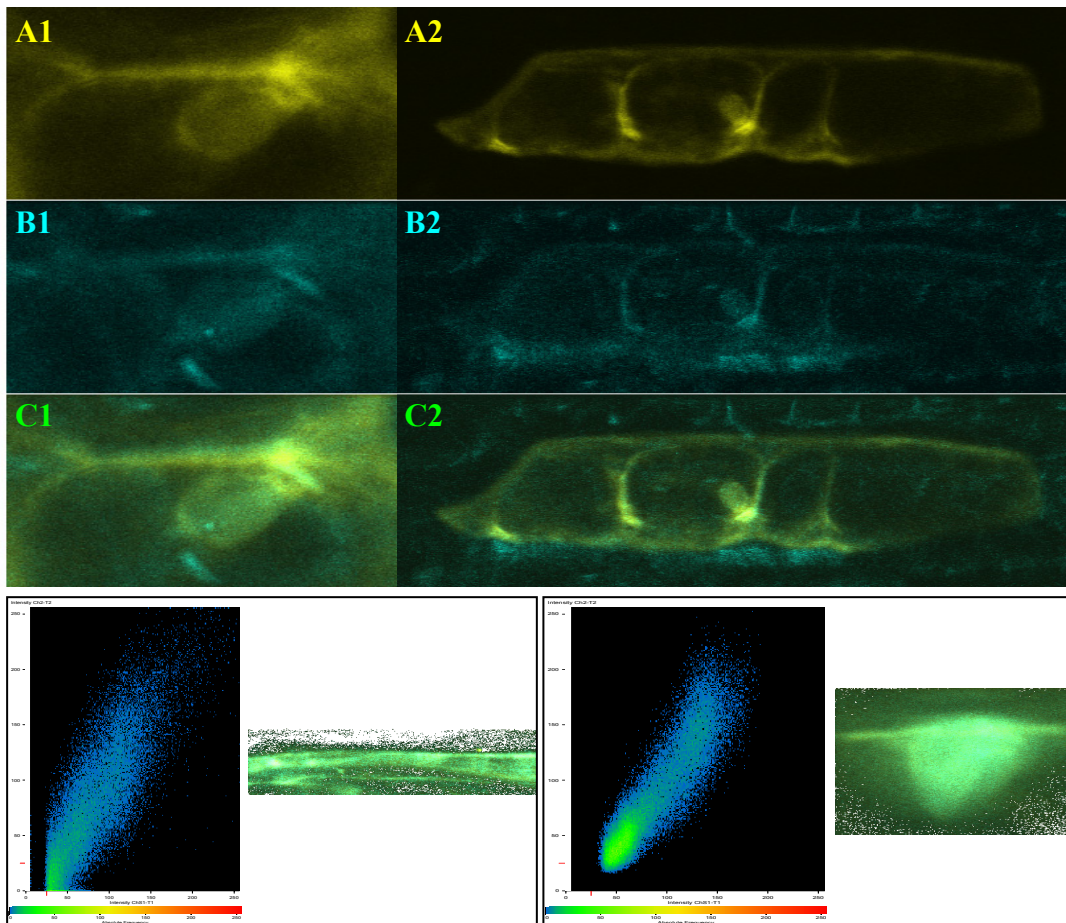


Abb. 59: Fluoreszenzaufnahmen der Konstrukte K64mi-3936-CFP und hUGT1A1-YFP (durch die schwache Fluoreszenz des humanen Proteins unter der Kontrolle eines pflanzlichen Promotors ist bei diesen Bildern die vorliegende ER-Lokalisation schwer darzustellen, schematische Darstellung der Konstrukte siehe Abb. 57). **Oben:** Expression der Konstrukte (K64mi-3936-CFP und hUGT1A1-YFP) in Gerstebältern unter der Kontrolle des Ubiquitin-Promotors aus Mais. **A2, B2, C2** = Bilder einer Ganzen Zelle, **A1, B1, C1** = Ausschnitte aus dieser Zelle (diese zeigen eine Vergrößerung des Zellkerns). **A** = hUGT1A1-YFP, **B** = K64mi-3936-CFP, **C** = *overlay* beider Fluoreszenzen. **Unten links:** Colokalisations-Analyse der beiden Fluorophore an den retikulären Fortsätzen, bzw. (**unten rechts**) am (überbelichteten !!) Kern bzw. ER (X-Achse = Intensität YFP, Y-Achse = Intensität RFP).

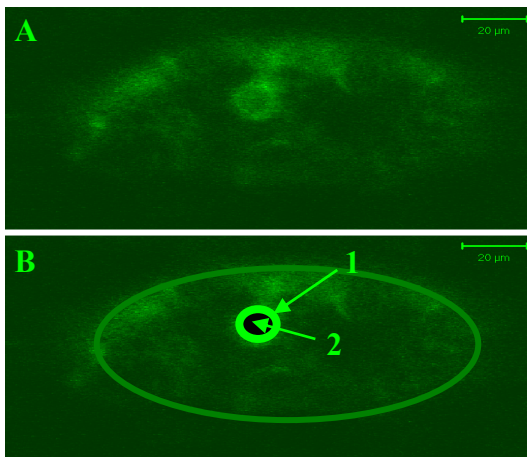


Abb. 60: Fluoreszenzaufnahme zeigt eine typische ER-Lokalisation (ER-Signalsequenz fusioniert mit GFP unter der Kontrolle des 35S-Promotors, das Signal ist jedoch durch die Verwendung dieses Promotor sehr schwach). **A:** Fluoreszenzbild, **B:** schematische Darstellung des Fluoreszenzbilds A. Gezeigt wird hier das ER (**Pfeil 1**) bzw. das Kerninnere (**Pfeil 2**).

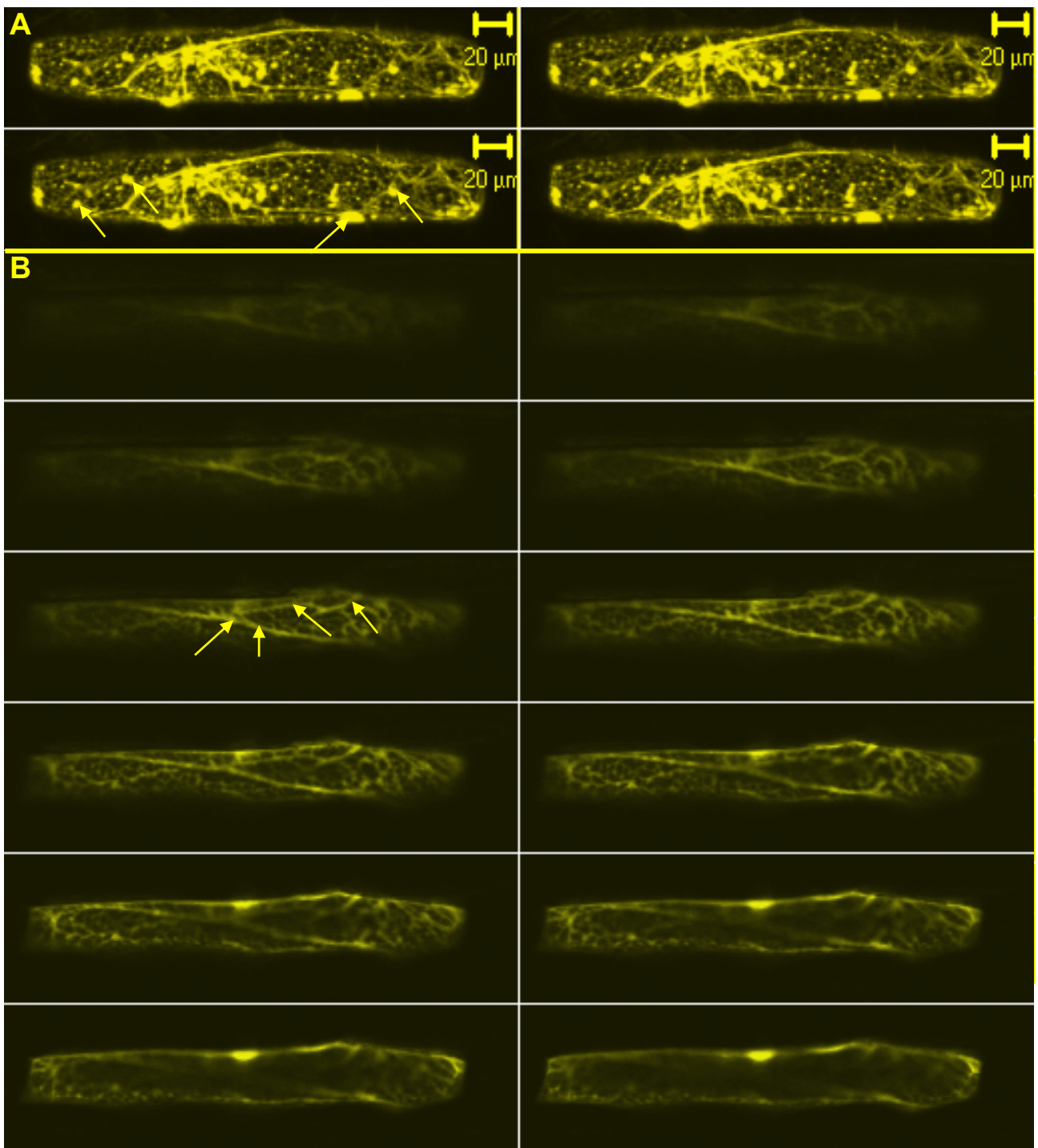
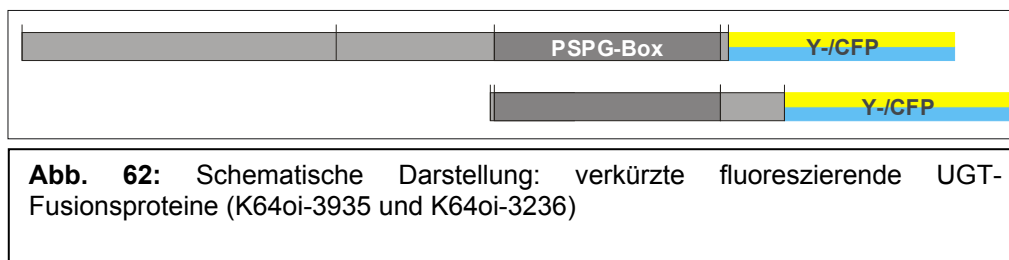


Abb. 61: A / B: Fluoreszenzaufnahmen des Konstrukts TIP-YFP (schematisch dargestellt siehe Abb. 57). Expression in Gerstebältern unter der Kontrolle des Ubiquitin-Promotors aus Mais. TIP-YFP / CFP zeigten ein identisches Bild. **A** = Vesikel-Lokalisation des TIP-YFP, an einem optischen Schnitt wurden einige prominente Vesikel mit gelben Pfeilen markiert. **B** = Anfärbung der retikulären Fortsätze (exemplarisch wurden einige Fortsätze mit Pfeilen versehen). Zur Visualisierung dieser Fortsätze mussten die Bilder jedoch überbelichtet werden, sodass der irreführende Eindruck einer Kernlokalisierung (in den unteren Schnitten) entstand.

Um die vermutete Lokalisation der scUGT an Vesikeln bzw. der Zentralvakuolemembran zu ermitteln, wurde ein *Cobombardment* mit einem *tonoplast intrinsic protein* TIP durchgeführt. Es zeigte sich eine klare Lokalisation dieses Proteins entlang derselben retikulären Formationen, an denen sich die Vesikel zu sammeln scheinen. Bei der TIP-Fluoreszenz fehlt aber, im Vergleich zur scUGT, die ER-Lokalisation vollständig (siehe Abb. 61).

6.2.2. Verkürzte fluoreszierende UGT-Fusionsproteine

Um ein spezifisches *targeting* zu bestätigen, wurden verkürzte Fusionsproteine erstellt. Die humanen Proteine tragen ihre Signalsequenz im N-Terminus des Proteins und ihre Transmembrandomäne innerhalb ihres C-Terminus. Es wurden daher Konstrukte erstellt, denen jeweils der eine oder der andere Terminus fehlt (Abb. 62).



Es stellte sich heraus, dass das Fusionsprotein, dem der C-Terminus fehlt, genau die selbe Lokalisation aufweist wie die vollständige cDNA (nicht gezeigt). In diesem Bereich liegt bei den hUGTs die Transmembrandomäne, die zur Integration der Proteine in die ER-Membran dient. Da jedoch bei den pflanzlichen Flavonoid-Glycosyltransferasen eine Lokalisation im löslichen Kompartiment der Zelle angenommen wird (dies konnte oben bestätigt werden, siehe Differenzialzentrifugation, Kapitel 6), ist die "richtige" Lokalisation (im Vergleich zum *full length* Klon) dieses *truncated* Protein nicht verwunderlich.

Das Konstrukt hingegen, dem der N-Terminus fehlt, ist vollständig "diffus-cytosolisch" aufzufinden (nicht gezeigt, siehe in Analogie hierzu die Lokalisation des CaM-RFP, Abb. 58). Das heißt, so wie bei den humanen Glucuronosyltransferasen (bei den hUGTs befindet sich ER-Signalsequenz am N-Terminus des Proteins), befindet sich offensichtlich bei der scUGT die Sequenz, die für die spezifische Lokalisation verantwortlich ist, auch im N-terminalen Bereich des Proteins. Jedoch befindet sich in dem deletierten Bereich nicht nur die ER-Signalsequenz (bei den hUGTs), sondern auch die gesamte Substratbindungsstelle, die zur spezifischen Lokalisation beitragen könnte (die Substrate werden vermutlich am ER-Flavonoidbiosynthese-Multienzymkomplex synthetisiert, sodass eine Lokalisation der UGTs hier sinnvoll erscheint).

7. UGT-Enzymkomplex

Das im Enzymassay das Intermediat N nicht oder nur in Spuren akkumulierte, verstärkte die Vermutung, dass es sich bei den drei katalytischen Aktivitäten evt. um weniger als drei Enzyme handelt. Betrachtet man z.B. die Glucuronidierung des humanen Substrats Bilirubin, so stellt man fest, dass dieses an zwei verschiedenen Positionen von einem einzigen Enzym glucuronidiert wird. Es könnte sich bei der sequenziellen Glucuronidierung des Luteolin also z.B. um einen Enzymkomplex aus zwei Proteinen handeln (siehe zwei Proteine, die sich aus dem *screening* ergeben, scUGTa-c und scUGTb, siehe Kapitel 1) eines, das das Luteolin an der 7-OH-Position zweifach glucuronidiert und eines, das das Luteolin-7-O-diglucuronid an der 4'-OH-Position glucuronidiert. Die Frage, ob es sich um drei oder weniger Proteine handelte, sollte durch die Auftrennung der Roggenprimärblattproteine mittels einer 2D-Gelelektrophorese mit nachfolgendem Immunblot geklärt werden. Zusätzlich wurde die Interaktion der scUGTb mittels eines Homo- bzw. Heterodimerisierungsexperiments (scUGTb mit hUGT1A1) überprüft.

7.1. Immunblotanalysen von 2D-Gelen

Eine Auftrennung der Proteine von 5 d alten Roggenprimärblättern erfolgte über zweidimensionale Gelelektrophorese (siehe Abb. 63). Die erste Dimension trennt die Proteine aufgrund ihrer elektrischen Ladung (pH-Wert abhängig), wobei die Migration des Proteins an seinem isoelektrischen Punkt stoppt. Die zweite Dimension trennt die Proteine aufgrund ihres Molekulargewichts auf. Mehr als 90% der Proteine besitzen einen pH-Wert zwischen 3.5 und 9, weshalb eine Auftrennung im pH-Bereich zwischen 3 und 10 gewählt wurde ^{[Literatur siehe Material &}

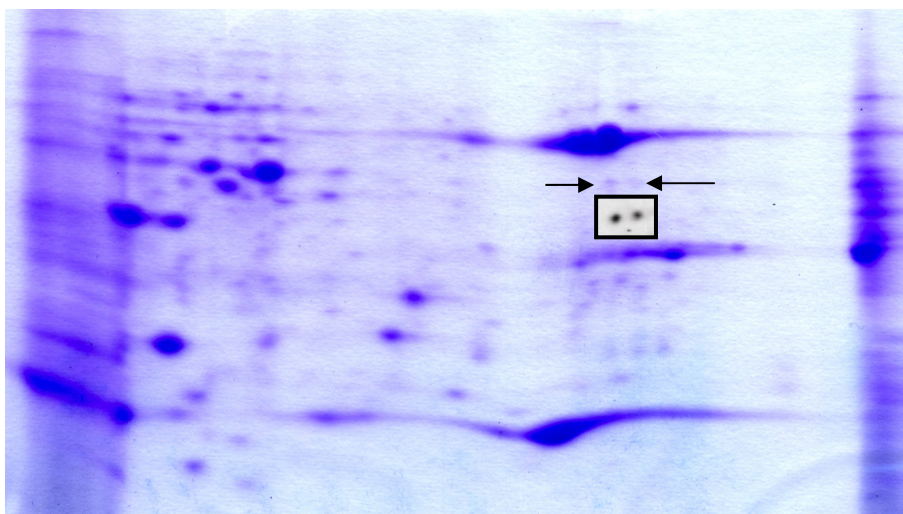


Abb. 63: 2D- Gelelektrophorese 5d alter Roggenprimärblattproteine. Coomassie-gefärbtes Polyacrylamid-Gel bzw. Immunblot-Analyse (siehe Pfeile: zeigen zwei ~ 55 kDa grosse Proteine) mit dem humanen Antikörper EL-95 (siehe Anhang).

Methoden]. Es wurde dabei nur der heterologe Antikörper (EL-95, Antikörper gegen die Substratbindungsstelle der humanen UGT2B17) verwendet, der in der eindimensionalen Gelelektrophorese ein Signal bei 55 kDa und bei der "richtigen" Verteilung innerhalb der subzellulären Fraktionen ergab (hauptsächlich in Ü2, siehe Kapitel 6). Im Immunblot wurden zwei spots sichtbar. Dies und die Tatsache, dass das screening mit der heterologen B5GT-Sonde und die PCR mit Konsensusprimern für die Zuckerbindungsbox immer nur zwei unterschiedliche Zuckertransferasen ergaben, sind Indizien dafür, dass es sich um nur zwei Enzyme, assoziiert in einem engen funktionalen Komplex, handeln dürfte.

7.2. Homodimerisierung / Heterodimerisierung

Aus Berichten über die humanen Glucuronosyltransferasen ist bekannt, dass diese Enzyme homodimerisieren, um vollständig aktiv zu sein [MEECH & MACKENZIE, 1997; GHOSH et al., 2001; OUZZINE et al., 2000].

Auch die biochemische Teilreinigung der Glucuronosyltransferase aus *Scutellaria* ergab in der Gelfiltration ein Molekulargewicht von 110 kDa [NAGASHIMA et al., 2000] (was auf zwei gleiche Untereinheiten zurückzuführen ist).

Es liegt also nahe, dass auch die scUGTs homodimerisieren. Wenn es sich um zwei verschiedene Enzyme handelt, könnte es auch sein, dass diese miteinander interagieren (Heterodimerisierung).

Protein-Protein-Interaktionen kann man mittels FRET nachweisen. Den strahlungslosen Energietransfer von einem angeregten Chromophor, dem Donor D, zu einem anderen, dem Akzeptor A, bezeichnet man als FRET. Dies geschieht durch eine Dipol-Dipol-Kopplung der sich auf eine Distanz von 10 bis 100 Å nahe kommenden Moleküle. Um eine Interaktion nachzuweisen müssen folgende Bedingungen erfüllt sein: sowohl ein Überlappen des Fluoreszenzspektrums des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors als auch die richtige Höhe der Quantenausbeute von D (ϕ_D) und die des Absorptionskoeffizienten von A (ϵ_A).

Die Rate des Förster Dipol-Dipol-Energie-Transfers wird durch folgende Formel beschrieben:

$$k = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{r} \right)^6, \quad R_0^6 = 8,785 \times 10^{-5} \frac{\kappa^2 \phi_D J}{n^4}$$

Eine indirekte Möglichkeit, den strahlungslosen Energietransfer zu messen, besteht in der Bleichung des Akzeptors (YFP, durch die 514-nm *laser line*), wodurch die Intensität des Donors (CFP) steigt.

Diesen Prozess nennt man *acceptor-photo-bleaching* (APB), der durch das confokale Mikroskop detektiert ($FRET_c$) und wie folgt berechnet wird: $FRET_c = \frac{D}{D_a}$, wobei D die Intensität des Donors

vor dem Bleichen und D_a die des Donors nach dem Bleichen ist. Ist $D/D_a > 1$, liegt eine Interaktion der Chromophore nahe [SHARMA et al., 2001; HE et al., 2003]. Die Energietransfereffizienz kann durch die

Formel $E = \left[\frac{(I_{post} - I_{pre})}{I_{post}} \right] \times a$ quantifiziert werden (I_{post} = die Intensität des Akzeptors vor dem

Bleichen, I_{pre} = die Intensität nach dem Bleichen, a ist der Skalierungsfaktor) [KARPOVA et al., 2003; KENWORTHY, 2001]

Die Homo- bzw. Heterodimerisierung sollte durch *acceptor-photo-bleaching* (siehe Abb. 64) nachgewiesen werden [SHAH et al., 2002; PATEL et al., 2002]. Dafür wurde das oben beschriebene Konstrukt, welches die komplette cDNA - fusioniert mit YFP oder CFP unter der Kontrolle des Mais-Ubiquitin-Promotors - trägt, verwendet.

τ_D = ist die Lebensdauer des Donors in Abwesenheit des Akzeptors, r = ist die Donor-Akzeptor-Distanz, R_0 = ist die Förster- oder kritische Distanz, bei der die Energietransferrate gleich der Verfallsrate ist. Die Förster-Distanz ist verknüpft mit dem Orientierungsfaktor κ^2 zwischen Donor und Akzeptor und den spektroskopischen Eigenschaften des Donors bzw. des Akzeptors. ϕ_D ist die Quantenausbeute des Donors in Abwesenheit des Akzeptors und n der Index der Refraktion. J ist das überlappende Integral zwischen Donor und Akzeptor beschrieben durch: $J = \int F_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda$, wobei F_D das *peak-normalisierte* Fluoreszenzspektrum des donors und ε_A der molare Extinktionskoeffizient des Akzeptors ist [Wu & Brand, 1994; CLEGG, 1995; SCHOLE, 2003]

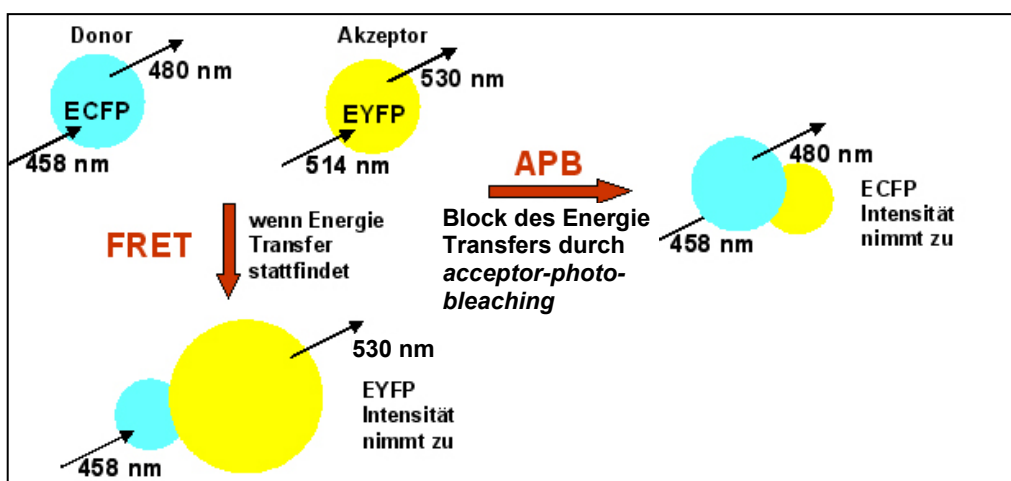


Abb. 64: Schematische Darstellung der Wechselwirkung zweier Fluorophore und dem damit einhergehenden Energietransfer (*fluorescence resonance energy transfer*), gezeigt durch *acceptor-photo-bleaching* (genauerer siehe Text).

7.2.1. Homodimerisierung / FRET

Dafür wurden Gerstenprimärblätter mit gleichen Konzentrationen an K64-YFP und K64-CFP *cobombarded*. Bleicht man YFP, so führt dies zu einem Anstieg der CFP-Fluoreszenz (Abb. 65). Dies ist aber nur an den oben beschriebenen Orten (ER, Netzwerk, Vesikel) zu beobachten. An allen übrigen Stellen kommt es zu keiner Interaktion (siehe hierzu Abb. 67, dabei handelt es sich nicht um das Homo- sondern um das Heterodimerisierungsexperiment, die Beobachtungen waren jedoch die selben).

Die FRET-Effizienz für 70 unabhängige Gersten-Epidermis-Zellen betrug für die Homodimerisierung der scUGTs 16,6 % (siehe Abb. 66). Das heißt, eine Homodimerisierung der scUGTb liegt aufgrund der durch APB gezeigten Protein-Protein-Interaktion nahe. Handelt es sich bei den Enzymen der Flavonoidbiosynthese um einen Multienzymkomplex so könnte die scUGT mit diesem assoziiert sein (siehe: Homo- bzw. Heterodimerisierung nur in Assoziation der scUGT mit dem ER bzw. den Vesikeln). Die scUGTs liegen offensichtlich selber auch in einem Komplex vor [gezeigt durch Colokalisation (Homodimerisierung), siehe oben]. Durch die ausschließlichen Interaktion der Proteine am ER bzw. den Vesikeln, jedoch z.B. nicht im Nucleus, lässt sich die oben beschriebene Vermutung, dass es sich bei der Kernlokalisierung in den überbelichteten Bildern um ein Artefakt handelt, erhärten.

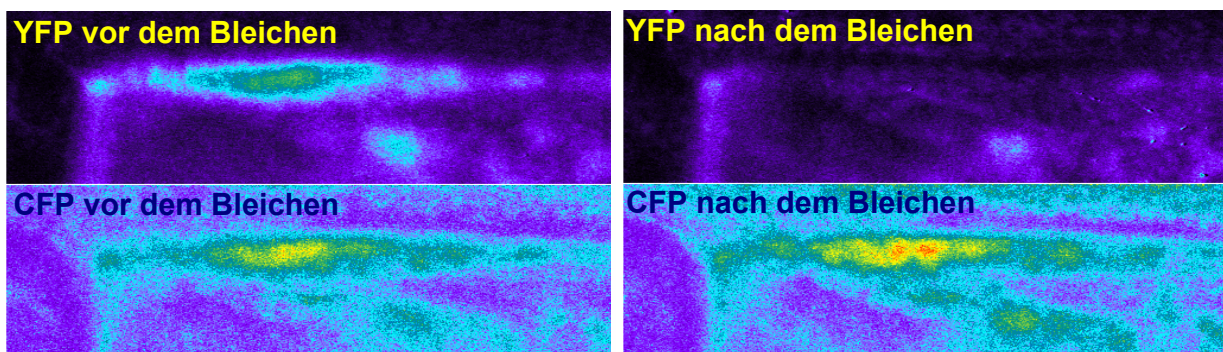
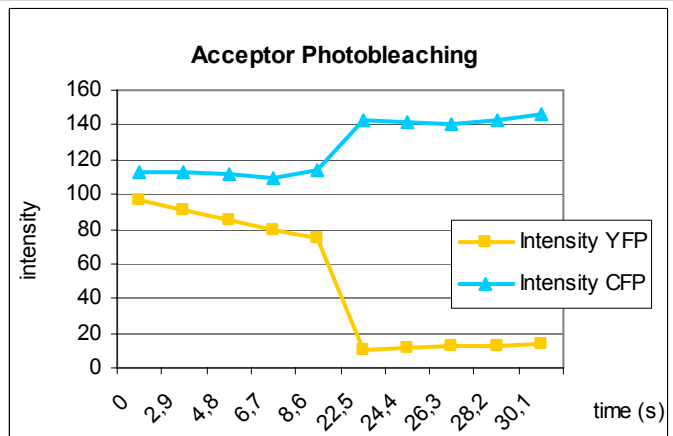


Abb. 65: Zellen wurden mit einem 514 nm Argonlaser mit einer Intensität von 100% gebleicht. Gezeigt wird ein Ausschnitt einer Gerstenprimärblatt-Epidermiszelle. **Oben rechts:** Bereich der Zelle nach dem Bleichen; **oben links:** Bereich der Zelle vor dem Bleichen. **Rechts:** Abnahme bzw. Zunahme der YFP- bzw. CFP-Intensitäten nach *acceptor-photo-bleaching*.



7.3.1. Heterodimerisierung / FRET

Die Heterodimerisierung wurde anhand der Protein-Protein-Interaktion zwischen hUGT1A1 und scUGTb getestet. Es stellte sich heraus, dass die Interaktion zwischen den ungleichen Glycosyltransferase-Enzymen stärker ist als die Interaktion der scUGTbs untereinander (siehe Abb. 66, 25.1% im Vergleich zu 16.6%, Berechnung der FRET-Effizienz siehe oben). Dies muss jedoch noch durch die Untersuchung von ähnlich vielen Zellen (70 unabhängige Zellen bei Homodimerisierung) und durch die Interaktion mit der zweiten scUGTa / -c bestätigt werden. Eine mögliche Erklärung dafür, dass die Heterodimerisierung stärker ist als die Homodimerisierung, wäre, dass es z.B. bei der sequenziellen Glucuronidierung von Luteolin um mehrere Enzyme handelt (LGT, LMT, LDT), die (um das Endprodukt der Reaktion R_1 zu produzieren) miteinander interagieren müssen. Eine Homodimerisierung würde hier nur die Intermediate hervorbringen, oder sogar kein Produkt, da dem Enzymkomplex das Substrat fehlt.

Wiederum ist die Interaktion stark von der subzellulären Lokalisation der Proteine abhängig. So ist hier eine Interaktion z.B. klar um den Kern herum, jedoch nicht im Kern zu detektieren (siehe Abbildung 67).

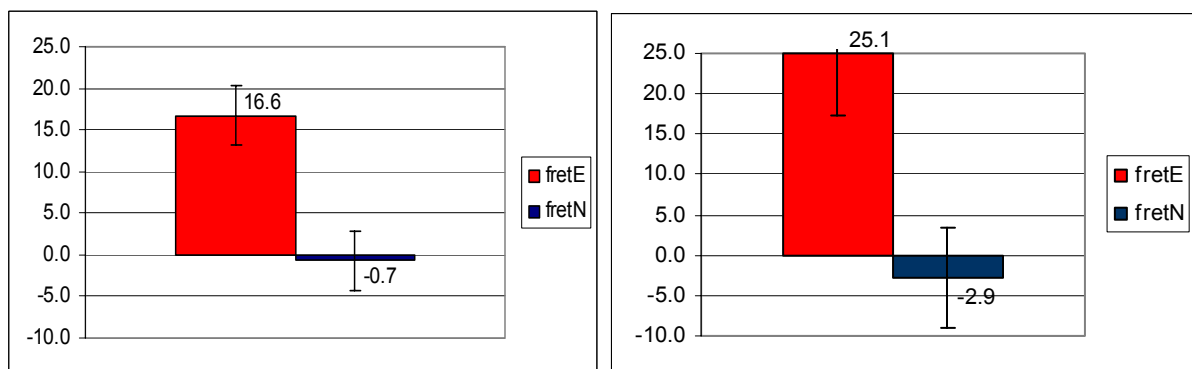


Abb. 66: Homo- (**links**) bzw. Heterodimerisierung (**rechts**) wurde anhand der Protein-Protein-Interaktion zwischen hUGT1A1 und scUGTb getestet. Dargestellt sind die Berechnungen der FRET-Effizienzen (siehe Text).

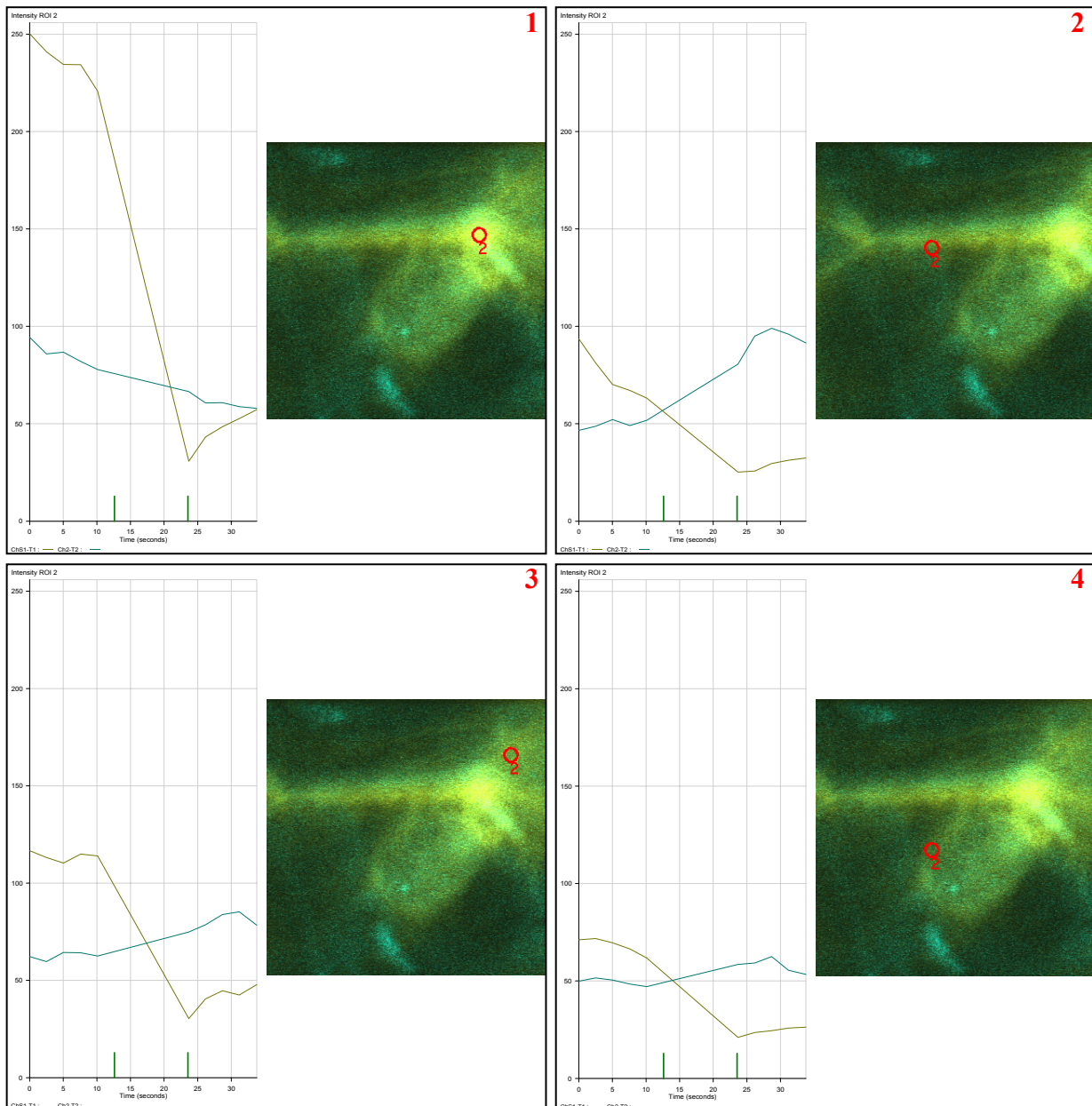


Abb. 67: Heterodimerisierungs-Analyse: Exemplarisch an einem Zellkern (ER) gezeigte Lokalisation der Interaktion. Roter Kreis: Ort, von dem das jeweilige Spektrum (links daneben) angezeigt wird (gelbe Linie = YFP-Intensität, blaue Linie = CFP-Intensität).

1: Im Kern findet keine Protein-Protein-Interaktion statt [die YFP-Intensität (gelbe Linie) nimmt durch das Bleichen stark ab, die CFP-Intensität (blaue Linie) steigt aber nicht]. **2 und 3:** Interaktion an den retikulären Fortsätzen. **4:** Interaktion am ER.

V. DISKUSSION

1. Screening einer genomischen Roggen-DNA-Bank mit heterologen Sonden

Weil bisher der Versuch einer Reinigung der Luteolin-Glucuronosyltransferasen erfolglos geblieben ist [SCHULZ & WEISSENBOCK, 1988], war Ziel der Arbeit, einen molekularbiologischen Weg zur Isolierung zu wählen. Hierfür sollte eine genomische Roggen-DNA-Phagenbank erstellt (Kapitel 1.3. Ergebnisteil, Abb. 27) und mit heterologen Sonden durchmustert werden (Kapitel 1.1. Ergebnisteil, Abb. 23 bzw. 24). Als heterologe Sonden standen nur solche Zuckertransferasen zur Verfügung, die aus anderen Organismen stammen (*Scutellaria baicalensis*, *Dorotheanthus bellidiformis*, *Homo sapiens*) und zudem allenfalls funktionelle Ähnlichkeiten im Substrat (vergleiche Stereochemie des Betanidins, Abb. 26) und nur teilweise die gleiche Cosubstrat-Spezifität aufweisen (putative UDP-Glucuronosyltransferase aus *Scutellaria baicalensis* bzw. *Homo sapiens*-Glucuronosyltransferase-*pool* = UDP-Glucuronsäure, *Dorotheanthus bellidiformis* Betanidin 5-O-Glucosyltransferase = UDP-Glucose). Dies beruht darauf, dass bisher noch keine pflanzliche Sekundärstoff-Entgiftungs-Glucuronosyltransferase (plantUGT, siehe Anmerkung zur Nomenklatur im Ergebnisteil) isoliert werden konnte. Daraus folgte, dass der Wahl der heterologen Sonde eine besondere Bedeutung zugemessen werden musste. Es wurden drei Strategien verfolgt: (1.) einerseits wurden Proteine gewählt, die das selbe Cosubstrat verwenden (UDP-Glucuronsäure bei humanen Glucuronosyltransferasen); andererseits wurden (2.) solche gewählt, die eine ähnliche Substratbindung (Stereospezifität, siehe hierzu Ergebnisteil, B5GT) aufweisen. (3.) Des weiteren stand uns eine noch nicht veröffentlichte putative Flavonoid-Glucuronosyltransferase aus *Scutellaria baicalensis* zur Verfügung (sbUGT = Baicalein-7-O-Glucuronosyltransferase).

Vergleichende Analysen der verwendeten Sonden

(1.) Verwendung der Zuckerbindungsbox humaner Glucuronosyltransferasen als heterologe Sonde (verwendeter *pool* an UGT-1- bzw. -2-cDNAs, siehe Tabelle Anhang):

Dieser *pool* wurde im *screening* der cDNA-Bank verwendet und ergab in der Sequenzierung nur falsch positive Signale.

Exemplarisch wird hier ein Filterpaar gezeigt (Abb.68): der linke Filter wurde mit dem hUGT-*pool* inkubiert, der rechte mit einer roggen-spezifischen UGT-Sonde (scUGTb, siehe Kapitel 1

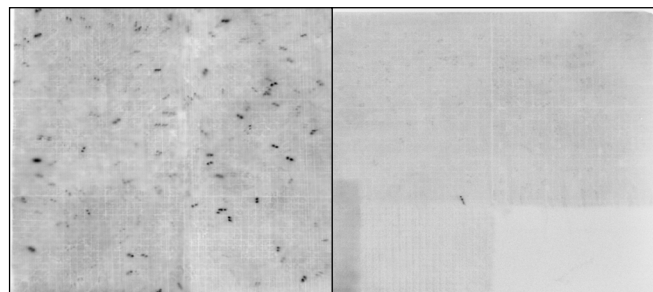


Abb. 68: Exemplarisch dargestellt ist ein Filter des cDNA-Bank-*screenings*. Hybridisierungen wurden durchgeführt mit heterologer Zuckertransferase-Sonde (**links**) und homologer Sonde (**rechts**). Genaueres siehe Kapitel 1 Ergebnisteil.

des Ergebnisteils). Es ist natürlich zu erwarten, dass sich im *screen* mit heterologen Sonden viele falsch positive Signale ergeben, dennoch ist hier der Unterschied von heterologer zu homologer Sonde frappierend. Dies hängt unter anderem mit der phylogenetischen Distanz von Mensch zum Roggen, aber auch mit den erforderlichen wenig stringenten Hybridisierungs- und Waschbedingungen zusammen (siehe Material & Methoden). Es wurden zwar eine große Anzahl von Klonen analysiert (DNA-Sequenzierung bzw. PCR mit genspezifischen *primern*, Zusammenfassung dieser Ergebnisse siehe Tabelle 4), die jedoch leider alle negativ waren.

(2.) Verwendung der Betanidin-5-O-Glucosyltransferase (B5GT) aus *Dorotheanthus bellidiformis* [VOGT et al., 1999]. Da in vielen Publikationen zu Recht Wert auf die Stereospezifität der Substrate gelegt wird, erschien es uns wichtig, ein Enzym zu wählen, das zwar ein anderes Substrat bevorzugt, jedoch bei diesem den Zucker an eine stereochemisch ähnliche Position addiert (die Betanidin-5-O-Glucosyltransferase (B5GT) aus *Dorotheanthus bellidiformis*, vergleiche die Substrate Luteolin, Betanidin, Baicalein, Ergebnisteil Abb. 26). Dieser *screen* führte zur Isolierung zweier putativer Roggen-Zuckertransferasen, die im folgenden analysiert wurden (scUGTa / c-b, siehe hierzu Anmerkungen zur Nomenklatur unter Kapitel 1.5. Ergebnisteil).

(3.) Verwendung der putativen Baicalein-7-O-Glucuronosyltransferase (sbUGT-Sonde, die vorliegende Sequenz ist noch nicht als Baicalein-7-O-Glucuronosyltransferase durch Aktivitätsbestimmungen bestätigt worden) [NAGASHIMA persönliche Mitteilung 2000]. bei dieser heterologen Sonde kam es auch nur zu falsch positiven Klonen. Dies kann daran liegen, dass es sich bei dem Enzym nicht um eine Flavonoid-Detoxifikations-Glucuronosyltransferase, sondern z.B. eine Glucuronosyltransferase, die an der Pektinbiosynthese beteiligt ist [wie die von RIDLEY et al., 2001 beschrieben], handelt (bisher ist die Sequenz noch nicht verifiziert worden, deshalb wurde auch in den phylogenetischen Untersuchungen auf die Einbeziehung dieser

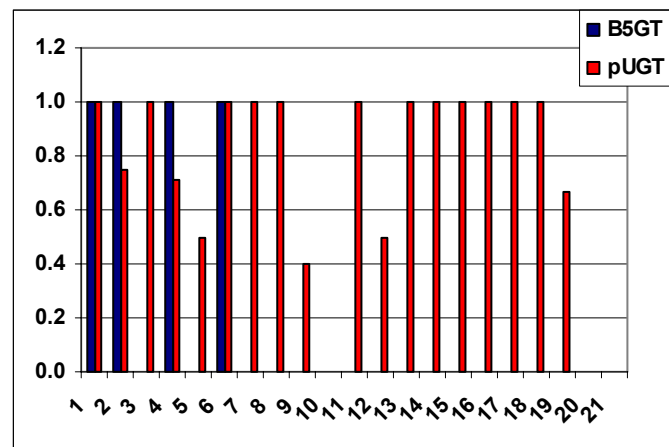


Abb. 69: Dargestellt sind Phagen-DNAs 1-21. Diese wurden durch unabhängige Hybridisierungen überprüft (als Sonden dienten die B5GT bzw. die sbUGT-cDNA, Lysatfilter siehe Ergebnisteil, Abb.28). In jedem *screen* wurde der DNA entweder eine 1 (Signal) oder eine 0 (kein Signal) zugeordnet. Die Mittelwerte wurden in der oben gezeigten Abbildung dargestellt. So kann man deutlich sehen, dass es bei der sbUGT-Sonde nicht nur 1 oder 0, gibt wie man es von einer "guten" Sonde erwarten würde, sondern auch Werte zwischen 0 und 1 vorkommen. Bei der B5GT-Sonde hingegen waren nur positive bzw. negative Ergebnisse zu beobachten.

Sequenz verzichtet, siehe Abb. 33-36).

Vergleicht man z.B. die Filter von Abb. 28 A (55 Klone, Kreuzhybridisierung mit B5GT und 7GT, Ergebnisteil), so stellt man fest, dass alle Klone, die aus dem B5GT-*screen* stammen, von der sbUGT-Sonde erkannt werden. Die unspezifische Bindung wird in Abb. 69 deutlich. Die roten Balken stellen die positiven Signale mit der sbUGT-Sonde, die blauen Balken die mit der B5GT-Sonde dar. In den folgenden Sequenzierungen stellte sich heraus, dass nur die blauen Klone wirklich Zuckertransferasen enthielten. Aus der Graphik wird auch klar, dass bei unterschiedlichen unabhängigen Hybridisierungen bei der sbUGT mal ein positives, mal ein negatives Ergebnis zu beobachten war (blau ist immer 0 oder 100%, rot bisweilen kleiner als 100%). Diese unspezifischen Ergebnisse führten dazu, dass die sbUGT-Sonde nicht mehr verwendet wurde.

Die Analysen zur Wahl der heterologen Zuckertransferase-Sonde ergaben folgendes: die funktionellen Übereinstimmungen in der Stereospezifität (aus dem *screening* mit der B5GT-Sonde ergaben sich Zuckertransferasen, scUGTa-c) führen bei heterologen Hybridisierungen zu einem spezifischeren Ergebnis als die Sequenzübereinstimmung in der für die Bindung des Cosubstrats zuständigen Domäne (Bindung des gleichen Cosubstrats, UDP-Glucuronsäure, alle Hybridisierungen sowohl mit der sbUGT als auch mit den hUGTs führten zu keinem positiven Ergebnis).

2. RT-PCR mit Konsensus-primern

Neben dem *screening* mit heterologen Sonden dienten RT-PCRs mit Konsensus-*primern* (siehe 2.2. Ergebnisteil) und cDNA von 5d alten Roggenprimärblättern zur Isolierung von Zuckertransferase-Genen.

Als Grundlage für die Erstellung der *primer* dienten vier verschiedene Zuckertransferase-Gene: die (Betanidin-5-*O*-Glucosyltransferase cDNA (B5GT) von *D. bellidiformis*, die *S. baicalensis* UDP-Glucose-Flavonoid-7-*O*-Glucosyltransferase (7FGT), die UDP-Glucose-Flavonol-3-*O*-Glucosyltransferase aus Mais (3FGT) und die humane Glucuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1), (Literatur siehe Tab. 1 in der Einleitung, siehe auch Abb. 32). Die *primer* befinden sich am Anfang (C3) und Ende (C8r) der Zuckerbindungsbox. Dadurch war es möglich, beide Gene (scUGTa-c, siehe hierzu Anmerkungen zur Nomenklatur unter Kapitel 1.5. Ergebnisteil), die bereits im *screening* ermittelt wurden, zu isolieren. Die PCRs führten jedoch nicht zur Isolierung von weiteren Genen.

3. Analyse der putativen Zuckertransferasen

Phylogenetische Untersuchungen

Aus dem *screening* der genomischen Roggen-Phagenbank und aus der RT-PCR mit Konsensus-primern (C3-C8r, siehe oben) ergaben sich drei unterschiedliche Klone, wobei es sich bei zweien um Allele des selben Gens handeln dürfte (scUGTa und c, siehe hierzu Anmerkungen zur Nomenklatur unter Kapitel 1.5. Ergebnisteil).

Es wurden phylogenetische Untersuchungen durchgeführt, in der Hoffnung, diese würden evt. Aufschlüsse über Substrat- oder Cosubstratspezifität der scUGTs geben. Innerhalb der phylogenetischen Untersuchungen wurde für die UGTs folgende Unterteilung vorgenommen: vor der PSPG-Box, PSPG-Box und nach der PSPG-Box (vergleiche Ergebnisteil 3.1.).

(1.) Vor der PSPG-Box = Substratbindungsstelle:
Betrachtet man den *unrooted tree*, so stellt man eine enorme Distanz der unterschiedlichen Enzyme aufgrund der speziesspezifischen unterschiedlichen Substrate fest. Die einzige klare Gruppenbildung, ist die der Flavonole, die an ihrer 3OH-Gruppe glucosyliert werden (Abb. 70). Eine wichtige Schlussfolgerung, die sich aus diesem Baum ergibt, ist, dass es sich bei den scUGTs wahrscheinlich nicht um Verwandte der 3FGTs handelt. Das heißt, dass es sich, nach diesem Baum zu urteilen, offenbar nicht um die im Roggen befindliche 3FGT handelt. Obwohl die putativen Luteolin-UGTs dem selben Ast wie die B5GT entspringen (siehe Abb. 70), sind die Proteine dennoch weit voneinander entfernt. Die Ähnlichkeit dieser beiden Sequenzen

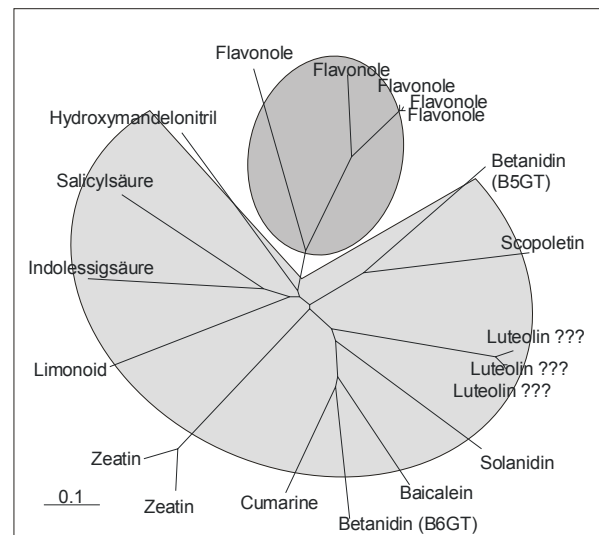
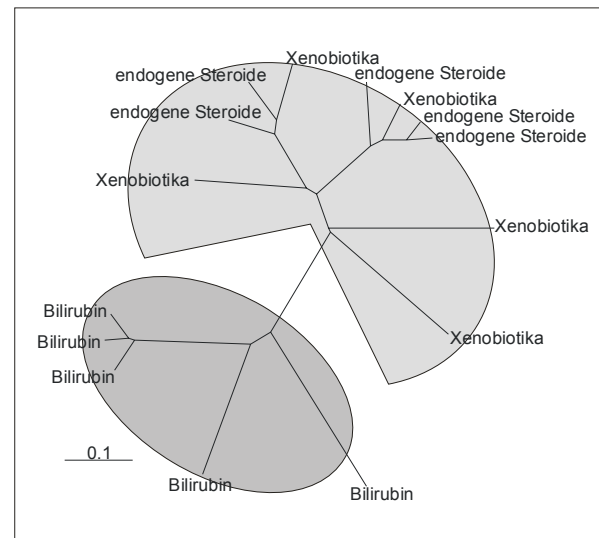


Abb. 70: Phylogenetische Untersuchung, Substratbindungsstelle. **Oben:** Dem *unrooted tree* liegen die Vertebraten-UGTs (siehe Tabelle im Anhang) der Gruppe 1 (dunkel umrandet) und 2 (hell unrandet) zugrunde. Berücksichtigt wurde die Aminosäure-Sequenz, die für die Substratbindung verantwortlich ist (Bereich vor der Zuckerbindungsbox). **Unten:** Dem *unrooted tree* liegen, neben den scUGTa-c auch Sequenzen bereits charakterisierter pflanzlicher Zuckertransferasen (siehe Tabelle 1) zugrunde (Baicalein: dabei handelt es sich nicht um das Substrat der im *screening* verwendete sbUGT, sondern um das der in Tabelle 1 erwähnten Glucosyltransferase). *Accession numbers* siehe Tabelle 1, bzw. vergleiche *unrooted trees* Abb. 33-36 im Ergebnisteil.

könnte einerseits auf die oben beschriebene Substratspezifität und andererseits darauf zurückzuführen sein, dass die scUGTs aus dem B5GT-screen stammen. Die Stereospezifität am Substrat wird bei den Betanidin-glucosylierenden-Enzymen besonders gut deutlich: die B5GT liegt in großer Distanz zur B6GT (siehe Abb. 70, innerhalb des Baums befindet sich die Sequenz der B5GT rechts, die der B6GT unten, *accession numbers* siehe Tab. 1)

Eine ähnliche Unterteilung in zwei Gruppen stellt man bei den Substraten der tierischen UGTs fest (Abb. 70 oben, 71 oben). Die Gruppe 2 weist eine hohe Diversität auf, die Enzyme dienen zur Detoxifikation der unterschiedlichsten toxischen Substanzen (Xenobiotika und endogene Steroide). Die Gruppe 1 der Vertebraten-UGTs entgiftet nur ein Substrat, das Bilirubin.

Man könnte also den pflanzlichen Enzymen eine ähnliche Gruppierung zuweisen (Abb. 71 oben, bzw. unten, Zusammenfassung beider Gruppen 1 und I, bzw. 2 und II): einerseits die Enzyme, die für die Bildung von Flavonol- bzw. Anthocyan-3-*O*-Glycosiden verantwortlich sind (Gruppe I) und andererseits die heterogene Gruppe der die Synthese von spezies- und / oder entwicklungsabhängigen Glycosiden katalysierenden Proteine (Gruppe II, Substrate: Limonoide, die für den bitteren Geschmack von Citrusfrüchten verantwortlich sind, das Betanidin, das Farbpigment in Caryophyllales, Zeatin, ein Cytokinin, das an Zellteilung und Differenzierung beteiligt ist, oder Indolessigsäure, als Phytohormon, Literatur siehe Tabelle 1 in Einleitung).

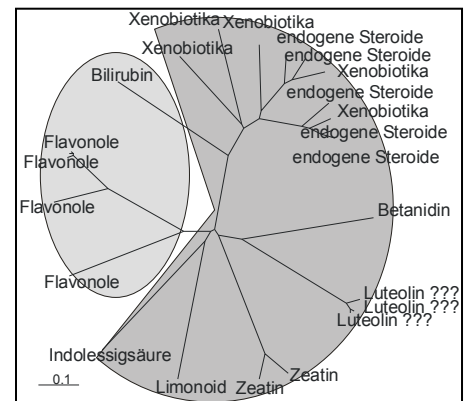
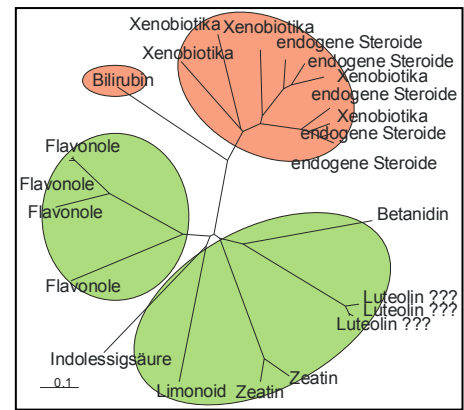


Abb. 71: Phylogenetische Untersuchung, Substratbindungsstelle. Vergleiche Bildbeschriftung Abb. 34. Beiden Bäumen liegen, neben den Sequenzen der scUGTa-c, die Aminosäure-Sequenzen (Substratbindungsstelle = Bereich vor der Zuckerbindungsbox) aller pflanzlicher Zuckertransferasen (aus Tabelle 1), die in der nichtredundanten Proteindatenbank Swiss-Prot aufgelistet werden, und repräsentative Vertebraten-UGTs (siehe Tabelle 6.5. im Anhang) zugrunde. **Oben:** Dargestellt ist die jeweilige Gruppe 1 / bzw. I / II der pflanzlichen und tierischen UGTs (siehe Text); **unten** wurden die jeweils homologen Gruppen zusammengefasst.

(2.) Die PSPG-Box = Zuckerbindungsstelle:

Betrachtet man den *unrooted tree* (Abb. 35), der die Sequenzvergleiche der Zuckerbindungsbox veranschaulicht, so fällt auf, dass sich die Anordnung der tierischen UGTs im Vergleich zu den pflanzlichen ändert (Vergleiche Abb. 34 mit 35, oder Zusammenfassung Abb. 72 Seite 113). Hier sind die 3FGTs den hUGT2s näher (Abb. 35). Dafür sind die scUGTs sehr nah an den Bilirubin-

Glucuronosyltransferasen (hUGT1) eingeordnet. Dies könnte auf die Anzahl der transferierten Glucuronsäuren zurückzuführen sein. Bilirubin wird zweifach glucuronidiert, die Enzyme der Gruppe 2 glucuronidieren dagegen nur einfach.

(3.) Nach der PSPG Box = Transmembrandomäne

In diesem phylogenetischen Baum (Abb. 36) wurde die unterschiedliche Lokalisation der pflanzlichen und tierischen Enzyme gut deutlich. Die humanen UGTs besitzen eine Transmembrandomäne, die pflanzlichen hingegen weisen keine auf, sodass eine cytosolische Lokalisation nahe liegt (die Lokalisation in der löslichen Fraktion konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, siehe Kapitel 6, Zusammenfassung der phylogenetischen Untersuchungen siehe Abb. 72).

Transkriptionskontrolle

Die Transkription der scUGT konnte im 5d alten Roggenprimärblatt mittels 3' bzw. 5' RACE und NORTHERN-*blot* nachgewiesen werden (siehe Kapitel 3, Abb. 37-39).

Beim *screening* einer Roggenprimärblatt-cDNA-Bank mit den oben beschriebenen heterologen Sonden traten die selben bereits oben diskutierten Probleme auf (siehe oben, *screening* einer genomischen Phagenbank mit heterologen Sonden). Aus dem *screening* mit der Zuckerbindungsbox der scUGT ergab sich jedoch ein positiver Klon. Da es sich bei diesem Klon leider nicht um eine *full length*-cDNA handelte, wurde diese mittels *overlap*-PCR hergestellt.

Die Tatsache, dass auch mit der homologen Sonde nur ein Klon gefunden wurde, kann unterschiedliche Gründe haben: z.B. könnte dieses Gen nur in sehr geringer Kopienzahl exprimiert sein, die Anzahl der auf die Filter aufgetragenen Klone könnte evt. nicht ausgereicht haben, um das gesamte Roggen genom zu repräsentieren, oder die Kälteinduktion ^[BERBERICH et al., 2000] könnte zu einer Repression der scUGT-Expression geführt haben.

4. Heterologe Expression putativer scUGT

Heterologe Expression in *E.coli* rekombinanter scUGTb

Zur heterologen Expression rekombinanter scUGT in *E.coli* wurde die *full-length*-scUGTb mit einem N-terminalen His-*tag* eingesetzt (siehe Abb. 40 A, B).

Nach den im Standard-Expressionsprotokoll (INVITROGEN) angegebenen Inkubations- und Induktionsbedingungen befand sich der Großteil des gesuchten Proteins in *inclusion bodies* (Coomassiegefärbtes Polyacrylamidgel bzw. WESTERN-blot mit Anti-His Antikörper, Trennung der Fraktionen, siehe Material & Methoden). Deshalb wurde vorerst ein UGT- bzw. 3FGT-Enzymtest für den Gesamt-Proteinextrakt vorgenommen. Dies führte nicht zur Akkumulation der erhofften Produkte N,

R₂, R₁ oder Cyanidin-O-3-Glucosid (da die entstandenen Produkte im *E.coli*-Enzymtest hier und weiter unten die selben Retentionszeiten aufwiesen, wird hier auf eine genaue Darstellung verzichtet).

Die Reduktion der Inkubationstemperatur auf bis zu 16°C [FORD et al., 1998] führte nicht zu einer Änderung der subzellulären Lokalisation des rekombinanten Proteins.

Erst eine drastische Reduktion der Inkubationszeit (auf 30 min vor Induktion, 1 h nach Induktion) führte zu einer Lokalisation der scUGTb in der löslichen Fraktion. Diese Fraktion wurde für die Etablierung des enzymatischen *assay* verwendet.

Handelt es sich bei der sequenziellen Glucuronidierung des Luteolins um einen Enzymkomplex aus zwei oder drei Enzymen und nicht um ein Enzym mit drei enzymatischen Aktivitäten, so besteht die Möglichkeit, dass es sich bei der scUGTb um eines der letzteren Enzyme handelt (um die LMT oder LDT, siehe Abb. 43). Zur Klärung dieser Fragestellung wurde der Standard-UGT-Enzymtest nicht nur mit dem Aglycon Luteolin, sondern auch mit den Mono- bzw. Diglucuroniden (N und R₂) durchgeführt.

Beim Enzymtest unter UGT-Standardbedingungen (siehe Punkt 5.1.) war weder die Abnahme der Luteolinkonzentration noch die Zunahme eines glycosylierten Produkts zu beobachten. Die mögliche Anwesenheit einer *E.coli*- β -Glucuronidase und die damit verbundene Degradierung der neusynthetisierten Produkte konnte ausgeschlossen werden (siehe unten, kein Abbau der Glucuronide N und R₂).

Die Verwendung der Glucuronide N und R₂ als Substrate führte zu einem vergleichbaren Ergebnis (keine Reduktion der Substratkonzentration, kein Anstieg eines glycosylierten Produkts).

Folgende Schlussfolgerung aus diesen beiden *assays* sind möglich:

- 1.) bei der scUGTb handelt es sich nicht um eine Glucuronosyltransferase.
- 2.) Berücksichtigt man jedoch z.B. die Ergebnisse der Protein-Protein-Interaktion (Abschnitt 7.2. Ergebnisteil) so könnte man postulieren, dass es sich bei der scUGTb nur um EINE der UGTs des UGT-Enzymkomplexes handelt, diese aber das andere Enzym benötigt (FRET-Effizienz der Heterodimerisierung ist höher als die der Homodimerisierung, 25.1% zu 16.6%), um ihre Aktivität zu entfalten. Die Vermutung, dass ein Enzymkomplex für die Enzymaktivität von Bedeutung sein könnte, konnte anhand der Expression eines artifiziellen Clusters dreier Flavonidbiosynthese-Enzyme, PAL, 4CL und CHS, in *E.coli* gezeigt werden [HWANG et al., 2003].

Im 3FGT-Enzymtest jedoch konnte ein Abbau des Substrates Cyanidinchlorid und eine Konzentrationszunahme eines unbekanntes Produktes beobachtet werden. Bei dieser Substanz handelte es sich jedoch nicht um das erwartete Produkt (Cyanidin-3-O-Glucosid, siehe andere Retentionszeit, Abschnitt 5.1. Ergebnisteil). Außerdem beruht diese Produktakkumulation nicht auf der Aktivität

des heterolog exprimierten Proteins (Akkumulation ist auch bei der Negativ-Kontrolle zu beobachten).

Heterologe Expression rekombinanter scUGT in Eukaryoten

Des Weiteren wurden Expressionssysteme ausgewählt (Tabak, Ackerschmalwand), in denen im Gegensatz zu *E.coli* der oben beschriebene Flavonoidbiosynthese-Multienzymkomplex, in der Wildtyp-Pflanze vorliegt. Beide Organismen entgiften ihre Flavonoide (so weit bekannt) jedoch nicht durch die Addition einer Glucuronsäure.

Die wenig zeitintensive, von VAQUERO et al. 1999 beschriebene transiente Expression heterologer Proteine in Tabakblättern, führte jedoch nicht zu der von den Autoren beschriebenen hohen Akkumulation rekombinanten Proteins (gezeigt durch fluoreszierende Fusionsproteine).

Dies könnte auf die invasiven, für die Pflanzen sichtbar pathogenen Versuchsbedingungen zurückzuführen sein (Vakuuminfiltration). Auch die für die Tabakpflanzen schonendere Methode der Infektion von verletzten Blättern (Impfpistole), führte nicht zu einer höheren Ausbeute rekombinanten Proteins.

Da die Transformation einer so geringen Anzahl von Zellen jedoch für die zeitaufwändige Etablierung des Enzymtests für dieses System voraussichtlich nicht ausreichen würde, wurde auf die weitere Verwendung dieses Expressionssystems verzichtet.

Um die oben beschriebenen Probleme der Vakuuminfiltration der Tabakblätter zu umgehen, wurde zur Expression rekombinanter scUGTb (Konstrukte siehe Abb. 41) *A. thaliana* (*floral dip*, siehe Material & Methoden) stabil transformiert.

Rosettenblattproteine positiver Individuen wurden zum Standard-UGT- bzw. -3FGT-Enzymtest eingesetzt.

Beim UGT-Enzymtest bestätigte sich das schon bei *E.coli* beschriebene Ergebnis: es war weder ein Abbau der Substrate Luteolin, N bzw. R₂, noch eine Akkumulation eines Produkts N, R₂ oder R₁ zu beobachten.

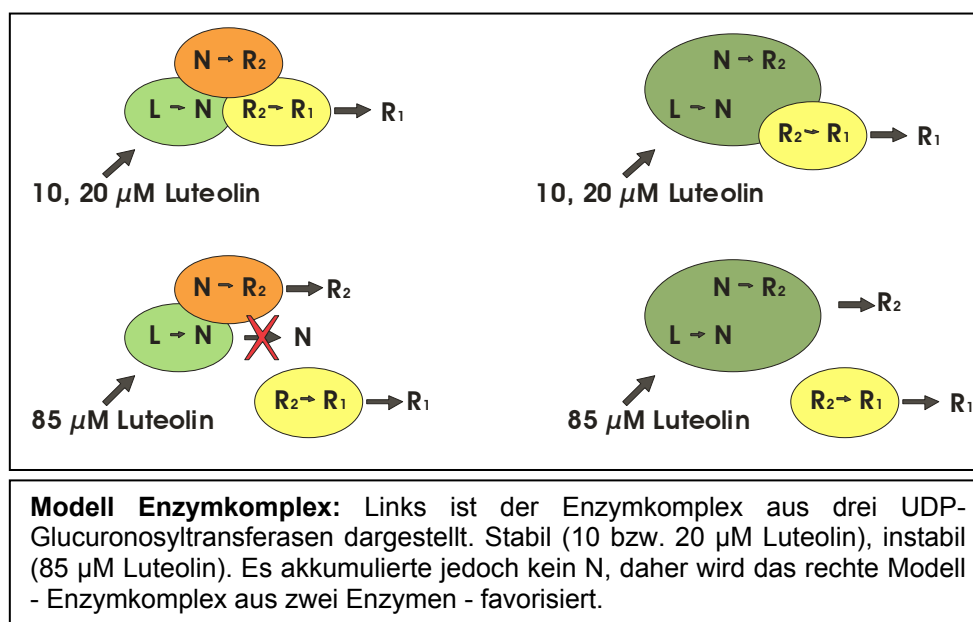
Im 3FGT-Enzymtests wurde jedoch Cyanidinchlorid abgebaut und Cyanidin-3-O-Glucosid synthetisiert (es weist die selbe Retentionszeit wie das aus Roggen extrahierte Glucosid auf: Cyanidinchlorid 24.7 min und Cyanidin-3-O-Glucosid 17.7 min, siehe Abb. 42). Dabei handelt es sich jedoch um ein *A. thaliana*- (Flavonol-3-O-Glucosyltransferase-Aktivität ist auch in der Negativ-Kontrolle zu beobachten) und nicht um ein Roggen-Enzym.

5. Biochemische Charakterisierung der Roggen-Zuckertransferasen

Etablierung der Enzymtests

In diesem Teil der Arbeit sollten im Vergleich zu den molekularen Daten die Flavonid-Zuckertransferasen aus Roggenprimärblättern - die 3FGT und die Luteolin-Glucuronosyltransferasen - biochemisch charakterisiert werden. Dies bestand in erster Linie darin, die Enzymtests zu etablieren und entsprechende Aktivitätsmessungen (Ergebnisteil 5.1.) sowie Immunblot-Analysen (Ergebnisteil 5.2.) durchzuführen. Charakteristika des UGT-*assays*: Das Endprodukt der dreifachen sequenziellen Glucuronidierungs-Reaktion des Luteolins R_1 akkumulierte als Hauptprodukt (siehe Abb. 43), wohingegen die Intermediate N und R_2 nicht oder nur in Spuren akkumulierten (siehe Abb. 44). Der Enzymkomplex (siehe hierzu auch Abschnitt 7 der Diskussion, Anmerkung Enzymkomplex im Ergebnisteil) war über mehrere Stunden (ohne signifikanten Aktivitätsverlust, siehe Abb. 44 bis zu 100 min, nicht gezeigt wurde der 2h-Wert) hinweg stabil. Eine β -Glucuronidase war im *assay* nicht aktiv. Die Substratkonzentration von $85 \mu\text{M}$ Luteolin, die in etwa dem zehnfachen K_M -Wert entspricht, war die, bei der die größte Produktakkumulation zu beobachten war, jedoch ist hier auch eine hohe R_2 -, hingegen keine N-Akkumulation zu beobachten (Abb. 44, viel Luteolin scheint offensichtlich den Enzymkomplex zu destabilisieren, Modell Enzymkomplex). Es könnte sich also um einen Enzymkomplex aus zwei Enzymen handeln (1. = LGT / LMT-Aktivität, 2. = LDT-Aktivität, siehe hierzu Abb. 43). Die Vermutung wird z.B. dadurch bestätigt, dass die humane UGT1a1 das Bilirubin auch doppelt glucuronodiert. Eine weitere Erklärung für die fehlende N-Akkumulation könnte sein, dass es sich bei dem ersten Syntheseschritt um den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der R_1 -Synthese handelt.

Der Zusatz von 2 mg/ml BSA zum Extraktion- und *assay*-Puffer führte zu einer Stabilisierung des



Enzymassays. Die Pflanzenanzucht in andauernder Dunkelheit (DDK) führte zu einer Reduktion der Enzymaktivität um ungefähr 75-80% bei gleicher Proteinmenge.

Charakteristika des 3FGT-assays: Für den *assay* wurden Cyanidinchlorid, UDP-Glucose und Ü2 von Roggen- bzw. Gerstenproteinen eingesetzt (siehe Abb. 45), UDP-Glucuronsäure bzw. Luteolin wurden von diesem Enzym nicht als Cosubstrat bzw. Substrat verwendet. Es gelang also im *in vitro* Enzymtest mit Roggenprimärblatt-Proteinen die UDP-Glucuronosyltransferase- von der Glucosyltransferase-Aktivität zu trennen.

Immunblotanalysen mit heterologen 3FGT- und UGT-Antikörpern

In den Immunblotanalysen mit heterologen Antikörpern (Abb. 46) stellte sich heraus, dass die Antikörper der hUGT-Gruppe 2 ein Protein detektieren, das mit dem subzellulären Verteilungsmuster der scUGTs übereinstimmt. Generiert wurden diese Antikörper gegen die Substratbindungsstelle des humanen Enzyms (Aminosäure 57-300). Fasst man die phylogenetischen Überlegungen aus Kapitel 3 zusammen (Zusammenfassung dessen: Abb. 72), so stellt man fest, dass die Enzyme der Gruppe hUGT2 in ihrer Substratbindungsstelle den scUGTs nahe sind. Aufgrund dieses Baums verwundert es nicht, dass der Antikörper gegen ein Enzym der Gruppe hUGT1 ein anderes unbekanntes Protein im Roggen erkennt (die Roggen-Glucuronosyltransferasen befinden sich in der löslichen Fraktion Ü1-Ü3, das unbekannte Protein in Fraktionen Ü1 / Ü2 / P2, siehe Abb. 46). Eine weitere Erklärung dafür, wieso der Antikörper gegen hUGT1 im Roggen nicht die scUGT erkennt, besteht darin, dass er gegen Aminosäure 312-531 des humanen Proteins generiert wurde. In diesem Bereich liegt die Zuckerbindungsbox und die Transmembrandomäne. Es besteht also die Möglichkeit, dass dieser Antikörper an ein Roggenmembranprotein bindet (daher die Verteilung, Ü1, Ü2, und P2). Fasst man die Ergebnisse der phylogenetischen Untersuchungen und der Immunblot-Analysen zusammen, so verstärkt sich die Vermutung, dass es sich bei den scUGTa-c nicht um

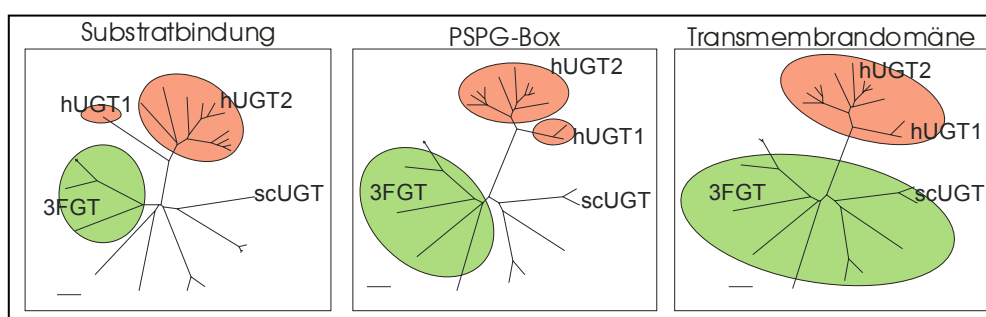


Abb. 72: Phylogenetische Untersuchung, Zusammenfassung der Abb. 34-36. Den Bäumen liegen, neben den Sequenzen der scUGTa-c, die Aminosäure-Sequenzen aller pflanzlichen Zuckertransferasen (aus Tabelle 1) und repräsentative Vertebraten-UGTs (siehe Tabelle 6.5. im Anhang) zugrunde.

3FGTs handelt und dass sie eine Gruppe mit der Gruppe 2 der Vertebraten-UGTs bilden (Gruppenbildung siehe Abb. 71 unten).

SELDI-Analysen von Roggenproteinen

Immunpräzipitation: Da die Antikörper der humanen UGT der Gruppe 2 spezifisch ein Protein im *WESTERN-blot* detektieren (Abb. 46), das die selbe subzelluläre Verteilung aufweist wie die Luteolin-Glucuronosyltransferasen, bestand die Möglichkeit, diesen Komplex aus Antikörper und Protein durch Coimmunpräzipitation mit Protein G zu reinigen (Abb. 48). Eine Grundvoraussetzung für die *Proteinchip*-Analyse ist jedoch die Reinheit und hinreichende Konzentration des spezifischen Antikörpers. Dies musste zuvor auf einem NP-20-*chip* getestet werden. Dabei stellte sich heraus, dass nur der Antikörper 6910 für die Immunpräzipitation auf dem *Proteinchip* verwendet werden konnte. Mit diesem Antikörper wurden zwei unterschiedliche *chips* "beladen": einerseits ein PS-20 *chip*, an den vorerst Protein G gekoppelt werden musste, und andererseits ein bereits mit Protein G voraktivierter PG-20-*chip*. Beide Komplexe aus Antikörper und Protein G sollten nun nach Immobilisierung mit dem im *WESTERN-blot* detektierten Protein aus dem Überstand (Ü3) interagieren.

Bei beiden *chips* konnte im SELDI ein Protein von 53 kDa gemessen werden, das bei allen Negativkontrollen nicht vorhanden ist. In der Quantifizierung (gemessene TOF-area, interner Standard war BSA) des *Proteinpeaks* stellte sich jedoch heraus, dass dieser für eine Proteinsequenzierung nicht ausreicht. Die Applikation der doppelten Menge Antikörperlösung konnte die präzipitierte Proteinkonzentration nur geringfügig steigern. Um auf diese Weise eine Immunpräzipitation durchzuführen, müsste man eine Antikörperlösung mit höherer Konzentration an spezifischem Antikörper zur Verfügung haben. Das heißt, eine Affinitätschromatographie des Antikörpers oder die Verwendung monoklonaler Antikörper wäre anzuraten.

Lectinbindungsassay: Ein vom Prinzip her ähnlicher Versuch wurde mit dem Lectin ConA durchgeführt. Dabei geht man davon aus, dass das Lectin die UDP-Glucuronsäure und das Roggenprotein sein Cosubstrat, das UDP-Glucuronat, bindet. Dieser *assay* wurde auf einem PS-20-*chip* durchgeführt. Auch hier stellte sich ein ~53 kDa *peak* ein, der in allen Negativkontrollen nicht sichtbar wurde. Ein Problem, welches hier auftrat, war das Molekulargewicht des verwendeten Lectins. Es liegt bei 104 kDa, da es aber aus zwei Untereinheiten besteht, sieht man im SELDI einen weiteren *peak* bei ~52 kDa. Trotz Immobilisierung kann man Kontaminationen also nie zu 100 % ausschließen. Es erscheint sinnvoll, diesen *assay* mit einem anderen Lectin zu wiederholen. Dafür wäre es von Vorteil, ein Lectin zu finden, das spezifisch Glucuronsäure bindet. Man könnte auch eine UDP-Glucose-spezifische Säule vor diesen *assay* schalten, um sicher zu stellen, dass man auf diese Weise keine Glucosyltransferasen reinigt.

D.h. das SELDI-*chip*-System eignet sich zur schnellen Aufreinigung pflanzlicher Enzyme aus dem Rohextrakt sowohl durch eine Protein-G vermittelte Coimmunpräzipitation als auch durch einen Lectinbindungsassay. Beide Verfahren müssen jedoch optimiert werden, um eine Proteinsequenzierung des in zu geringer Konzentration vorliegenden Proteins (ein 53 kDa *peak* bei beiden Methoden siehe Abb. 48 B, 49 B) durchführen zu können.

Induktion der Enzymaktivität durch "Luteolinfütterungen"

In den Wurzeln konnte keine Luteolin-Glucuronosylaktivität detektiert werden. Daher stellte sich die Frage, ob, wenn die Wurzeln mit Luteolin gefüttert werden, sie evt. das Luteolin in die Blätter transportieren und die Blätter es dann durch UGTs entgiften. Alternativ könnte das Luteolin in den Wurzeln selber entgiftet werden. Dafür müsste dort die Proteinbiosynthese der scUGT oder einer weiteren Zuckertransferase angeregt werden.

Es wurden zuerst Methanolextrakte der gefütterten Blätter und Wurzeln hergestellt und diese *via* HPLC analysiert. Dabei stellte sich heraus, dass es in den Blättern zu keiner Änderung im Flavonoidmuster gekommen war. In den gefütterten Wurzeln hingegen entstand ein zusätzlicher Flavonoid-*peak* (Abb. 50), ein polares Luteolinderivat. Es handelte sich dabei aber nicht um N, R₂ oder R₁. Ein weiterer Befund ergab sich aus dem UGT-Enzymassay: das in Wurzeln induzierte Enzym katalysierte *in vitro* nicht die Glucuronidierung des Luteolins zu N, R₂ oder R₁. Es könnte sich aber um eine weitere Glycosyltransferase handeln.

Des Weiteren wurden vergleichende SELDI-Analysen von Proteinen der so gefütterten Wurzeln durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass ein Protein-*peak* von etwa 54 kDa in den gefütterten Wurzeln induziert wurde.

6. Subzelluläre Lokalisation

Differenzialzentrifugation

Da sich die Enzyme der Flavonoidbiosynthese als Enzymkomplex teilweise am ER befinden (Cytochrom P450-Enzyme) [Winkel-Shirley, 1999], liegt die Vermutung nahe, dass auch die scUGTs damit assoziiert sind und auch eine cytoplasmatische Lokalisation aufweisen (wie von anderen Autoren für Flavonid-Zuckertransferasen vermutet bzw. belegt wurde). Um dies zu überprüfen, wurde eine Differenzialzentrifugation von Roggenprimärblatt-

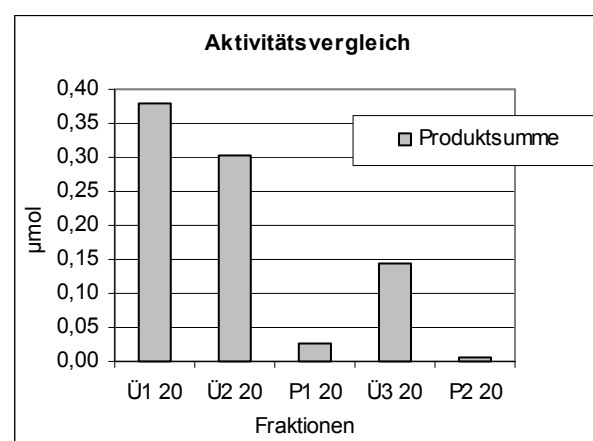


Abb. 73: Vergleich der absoluten Aktivitäten) der einzelnen Proteinfractionen im assay mit 85 µM Luteolin und 2 mg/ml BSA, berechnet über die Summen der Produkte (siehe Material & Methoden Seite 44-46).

Proteinen vorgenommen (siehe Abb. 73). Es stellte sich heraus, dass die Aktivität des Glucuronosyltransferase-Komplexes "löslich" und innerhalb des Cytoplasma lokalisiert ist. Da die Flavonoide aber nicht im Cytoplasma akkumulieren, ist von einer Assoziation der UGTs mit den übrigen Biosynthese-Enzymen bzw. mit dem ER (als Syntheseort der Flavonoid-Aglyca) und evt. mit dem Tonoplasten (die Glucuronide akkumulieren in der Vakuole) auszugehen.

Fluoreszierende scUGTs

Die genaue Lokalisation der UGTs sollte mittels fluoreszierender Fusionsproteine aufgeklärt werden. Dafür wurden ER-, Cytoplasma- und Tonoplasten-Marker verwendet (Abb. 57). Dabei stellte sich heraus, dass sich die scUGT-Fusionsproteine am ER (siehe Abb. 56 A), an dessen fraglichen retikulären Fortsätzen (siehe Abb. 56 C, D) und in Vesikeln befinden (Abb. 56 B, schematische Darstellung der scUGTb-Lokalisation siehe Abb. 74).

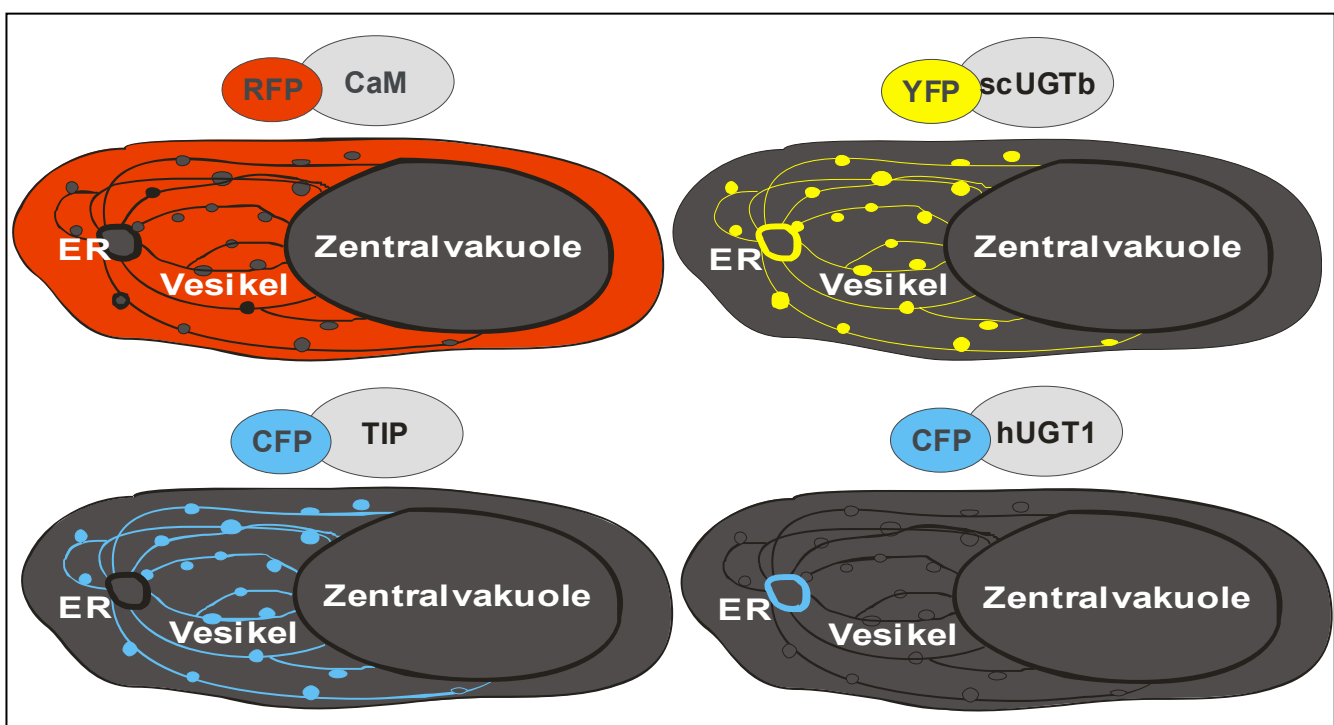


Abb. 74: Schematische Darstellung der Lokalisationen der fluoreszierenden Fusionsproteine. **Oben links:** Calmodulin (CaM)-RFP (Cytosol), **oben rechts:** scUGTb-YFP (ER, dessen Fortsätze und Vesikel), **unten links:** tonoplast intrinsic protein (TIP)-CFP, **unten rechts:** hUGT1-CFP.

Nach den Colokalisationsstudien lässt sich somit folgendes hypothetisches Schema erstellen (siehe Abb. 75): Die scUGTs sind als Komplex in den Multienzymkomplex - am ER "assoziiert" - mit eingebunden (ohne Membrananker) und empfangen dort ihr Substrat Luteolin (daher die ER-Lokalisation der fluoreszierenden Proteine). Die glucuronidierten Produkte werden nachfolgend in

der Vakuole gelagert. Ausgehend von der Beobachtung, dass sich die fluoreszierenden Proteine nicht ausschließlich am ER, sondern auch in / an Vesikeln befinden, kann von einem Transport der Proteine (evt. zusammen mit ihren Substraten bzw. Intermediaten und Produkten) vom ER zur Vakuole ausgegangen werden. Ein möglicher "Transportweg" der scUGTb vom ER zur Vakuole wäre über eine Interaktion mit den sich in den Vesikeln bzw. der Tonoplastenmembran befindlichen Transportern. Ist der Komplex aus scUGTs, Luteolin und Vesikeln vollständig, so kann er an "Verbindungssträngen" zwischen ER und Vakuole "entlanghangeln". Zum Schluss fusionieren die Vesikel mit der Zentralvakuole und entlassen somit die Flavonoide ins innere der Vakuole (schematische Darstellung dieses Transportwegs siehe Abb. 75).

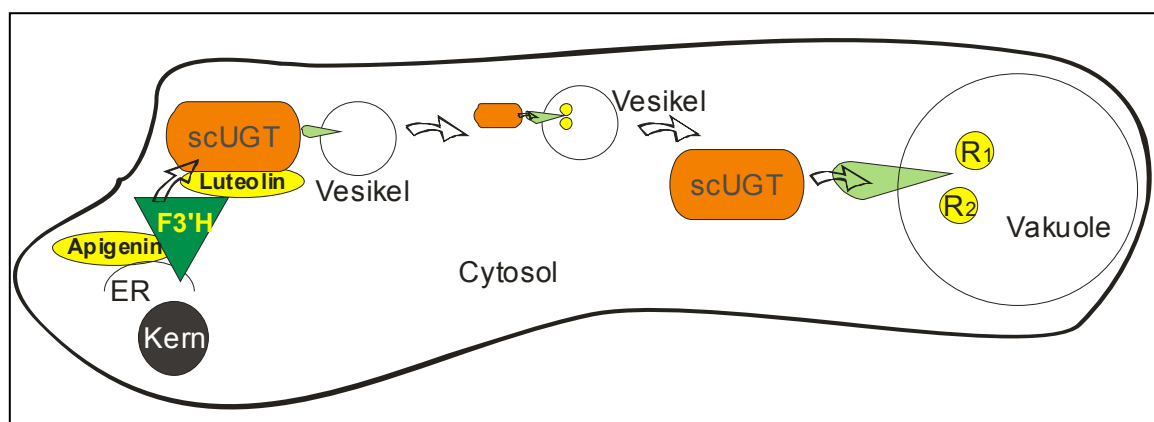


Abb. 75: Möglicher Transportweg der scUGTs und der Flavonoide vom ER, durch eine Assoziation der UGT mit den Transportern (in der Tonoplastenmembran), zur Vakuole (genauer siehe Text).

Die Erstellung von verkürzten fluoreszierenden Fusionsproteinen sollte Aufschluss darüber geben, welche Domäne der scUGTs für die oben beschriebene Lokalisation verantwortlich ist. Nach der humanen Sequenz zu urteilen, müsste sich diese Sequenz entweder am C- (Transmembrandomäne) oder N-Terminus (ER-Signalsequenz) befinden. Es gibt allerdings Berichte darüber, dass die humane UGT1A1, ein membrangebundenes Glycoprotein des endoplasmatischen Retikulums, das normalerweise als *precursor* mit einer N-terminalen abspaltbaren Signalsequenz synthetisiert wird, *in vitro* trotzdem, auch ohne ER-Signalsequenz, zum ER findet ^[OUZZINE et al., 1999-a]. Ähnliche Berichte gibt es von der UGT1A6 ^[OUZZINE et al., 1999-b]. Auch hier hat die Deletion des Signalpeptids keine Änderung der Lokalisation zur Folge. Es stellte sich heraus, dass ein Fusionsprotein, dem der C-Terminus fehlt (alles nach der Zuckerbindungsbox, siehe Ergebnisteil), die selbe Lokalisation aufweist wie das *full length*-Protein, jedoch ein Protein, dem der N-Terminus fehlt, jegliche spezifische Lokalisation verliert. Man sollte allerdings berücksichtigen, dass es sich bei diesem Teil um die komplette Substratbindungsstelle handelt.

7. UGT-Komplex

2D-Gelelektrophorese

Die Beobachtungen, dass das Intermediat N weder im *Enzymassay* akkumuliert (Abb. 44) noch im Roggenprimärblatt nachzuweisen ist, und der isolierte Enzymkomplex (bestehend aus drei Aktivitäten) im *assay* recht stabil und über mindestens 100 min hinweg aktiv ist, gab Grund zu der Annahme, dass es sich bei den Luteolin-Glucuronosyltransferasen um zwei Enzyme handelt (siehe auch Abschnitt 5 und Modell Enzymkomplex, oben).

Des weiteren ergab sowohl das *screening* mit diversen heterologen Sonden (Kapitel 1 Ergebnisteil) als auch die RT-PCR mit Zuckertransferase-Konsensusprimern (Kapitel 2 Ergebnisteil) zwei unterschiedliche scUGTs (scUGTa-c). Es gibt eine Anzahl von Berichten über Zuckertransferasen, bei denen ein einziges Enzym die Glycosylierung an zwei unterschiedlichen Stellen des Substrats katalysiert. Es existiert z.B. eine *Arabidopsis*-UGT (71C1), die Luteolin an der 3'- und 7-Position glucosyliert [LIM et al., 2003]. Um die Anzahl der scUGTs, die für die Glucuronidierung des Luteolins verantwortlich sind, zu ermitteln, wurde eine 2D-Gelelektrophorese durchgeführt (Abb. 63). In den Immunblotanalysen bestätigte sich das oben vermutete: durch den hUGT2-Antikörper wurden zwei, nicht drei Proteine detektiert. Dennoch muss man berücksichtigen, dass es sich um heterologe Antikörper handelt. Es besteht also noch eine grundsätzliche Möglichkeit, dass durch diesen Antikörper andere Proteine detektiert werden.

Homodimerisierung / Heterodimerisierung

Aus Berichten über die humanen Glucuronosyltransferasen weiß man, dass diese Enzyme homodimerisieren, um vollständig aktiv zu sein [Literatur siehe Ergebnisteil]. Eine Homodimerisierung konnte im Falle der scUGTb nachgewiesen werden. Auch eine Heterodimerisierung der scUGTb mit der humanen UGT1A1 konnte gezeigt werden. Es stellte sich heraus, dass die Interaktion zwischen den ungleichen Proteinen stärker zu sein scheint als zwischen den gleichen. Dies könnte das oben beschriebene "*metabolic channeling model*" bestätigen. Die zwei ungleichen Roggen-UGTs (LGT / LMT mit LDT, siehe Abb. 76 und Modell Enzymkomplex oben) müssen miteinander interagieren, um das Endprodukt R₁ der sequenziellen Luteolin-Glucuronidierung zu produzieren. Würden nur gleiche scUGTs (z.B. LGT / LMT mit LGT / LMT) mit einander interagieren, würde im Falle des ersten Proteins immer nur R₂ und im Falle des zweiten gar nichts akkumulieren. Man sollte also das oben beschriebene Modell wie folgt spezifizieren: Es dürfte sich um zwei UGT-Proteine handeln (LGT / LMT und LDT, siehe Abb. 76), die, um vollständig aktiv zu sein, miteinander interagieren.

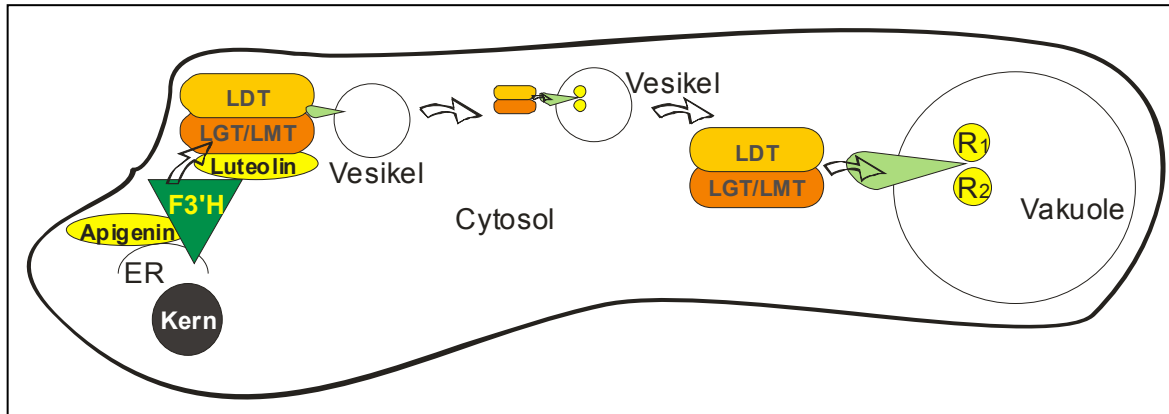


Abb. 76: Spezifikation von Abb. 75, möglicher Transportweg der Flavonoide vom ER durch eine Assoziation der UGT (hier dargestellt als Komplex aus zwei Enzymen mit drei Aktivitäten) mit den Transportern (in der Tonoplastenmembran), zur Vakuole (genauer siehe Text und auch Legende Abb. 75).

VI. AUSBLICK

Im Rahmen dieser Arbeit war es nicht möglich, die Frage nach der Enzymaktivität der scUGTb zu klären, sodass dies in Zukunft intensiver untersucht werden sollte. Es könnten z.B. Enzymtests mit unterschiedlichen Substraten und Cosubstraten durchgeführt werden. Des Weiteren könnte ein artifizielles Cluster der Flavonoidbiosynthese-Enzyme in *E.coli* exprimiert werden, um der scUGT mögliche Interaktionspartner bereitzustellen [HWANG et al., 2003]. Evt. entfaltet die scUGT ihre enzymatische Aktivität erst in einem Multienzymkomplex (siehe hypothetisches Modell Abb. 76). Dieses Experiment könnte z.B. durch eine FRET-Analyse (Interaktion der Proteine des Multienzymkomplexes) ergänzt werden. Es wäre demnach sinnvoll, beide scUGTs (a / c und b) gleichzeitig in *E.coli* zu exprimieren, um auch diese Komplexbildung zu ermöglichen (Heterodimerisierung). Des Weiteren sollte die heterologe Expression (mit nachfolgendem Enzymassay) der zweiten scUGT sowohl im *E.coli* als auch im *A.thaliana*-Expressionssystem durchgeführt werden.

Da nur die Verwendung der Betanidin-5-O-Glucosyltransferase (B5GT) aus *Dorotheanthus bellidiformis* [VOGT et al., 1999] zur Isolierung von Zuckertransferasen führte, sollte bei evt. folgenden screens noch mehr Wert auf die Stereospezifität der Substrate gelegt werden. Mittlerweile wurden - z.B. bei der *At*-UGT71C1 beschrieben - Enzyme charakterisiert, die im Enzymassay Luteolin an dessen 3'- und 7-OH-Position glucosylieren [LIM et al., 2003]. Diese Enzyme konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr berücksichtigt werden.

Neben dem screening mit heterologen Sonden dienten RT-PCRs mit Konsensus-primern dazu Zuckertransferase-Gene zu isolieren. Eine Möglichkeit, weitere Genen zu ermitteln, bestünde darin, neue evt. spezifischere Oligonukleotide zu entwickeln.

Des Weiteren sollte das im Rahmen dieser Arbeit etablierte Modell des Enzymkomplexes der aus zwei und nicht aus drei Enzymen besteht, bestätigt werden. Dafür könnten z.B. Enzymtests mit mehr als dem zehnfachen K_M -Wert durchgeführt werden, dies könnte entweder zu einer weiteren Destabilisierung des Enzymkomplexes und schließlich zu einer Akkumulation von N (drei Enzyme) oder trotz weiterer Destabilisierung des Komplexes zu keiner N-Akkumulation führen (zwei Enzyme, siehe Modell Enzymkomplex Seite 112).

Die SELDI-Analysen der Roggenprimärblattproteine sollten wiederholt und verbessert werden, um eine Proteinsequenzierung des 53 kDa peaks auf dem Proteinchip zu ermöglichen (Immunpräzipitation mit hinreichender Menge an monoklonalem Antikörper / Lectinbindungsassay mit geeigneterem Lectin). Auch die SELDI-Analysen induzierter Wurzelproteine sollten mit dem Ziel der Anreicherung des 54 kDa peaks wiederholt werden. Die Reinigung und Identifizierung des sich im Methanolextrakt gefütterter Wurzeln befindlichen Luteolinderivats war bis jetzt erfolglos und steht deshalb noch aus.

Die mit den fluoreszierenden scUGTs ermittelte subzelluläre Lokalisation (ER- und Tonoplasten-assoziiert), sollte noch auf andere Weise bestätigt werden, z.B. durch das spezifische Anfärben des

ERs oder der Vakuole (Colokalisation) oder durch die Protein-Protein-Interaktion (FRET) der scUGT mit anderen Enzymen der Flavonoidbiosynthese (z.B. der F3'H, siehe oben).

Zur endgültigen Klärung der Fragestellung, welche Enzyme durch die heterologen Antikörper erkannt werden, wäre eine Proteinsequenzierung beider *spots* der 2-D-Gelelektrophorese notwendig.

VII. ZUSAMMENFASSUNG

Pflanzen sind in der Lage, sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe (z.B. Flavonoide) sowie pflanzenfremde Substanzen (z.B. Xenobiotika) zu "entgiften". Dies geschieht über eine Reaktionsabfolge, in der die toxische Substanz aktiviert (Phase I, Cytochrom-P450-Oxidasen), dann z.B. durch die Konjugation mit einem Zucker (Phase II, Glycosyltransferasen) in eine hydrophilere Verbindung überführt und schließlich - um das Cytosol vor toxischen Effekten zu schützen - in der Vakuole gespeichert wird (Phase III, Kompartimentierung). Die bisher beschriebenen pflanzlichen Detoxifikations- bzw. Sekundärstoff-Zuckertransferasen verwenden zumeist UDP-Glucose als Cosubstrat. Im Gegensatz hierzu sind an Vertebraten-Entgiftungsprozessen Enzyme beteiligt, die UDP-Glucuronsäure verwenden (siehe Abb. 5).

In den Vakuolen photosynthetisch aktiver Mesophyllzellen von Roggenprimärblättern akkumulieren Flavonid-Glucuronide (Luteolinderivate, R₂ = Diglucuronid, R₁ = Triglucuronid, siehe Abb. 4), die dem Blatt dort vermutlich zur Phytopathogenabwehr dienen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Enzyme, die die sequenzielle Synthese dieser Luteolin-Glucuronide katalysieren (drei UDP-Glucuronosyltransferase-Aktivitäten: LGT, LMT, LDT, siehe Abb. 43), molekularbiologisch und biochemisch charakterisiert werden.

Die Durchmusterung einer genomischen Roggenphagenbank mit heterologen Zuckertransferase-Sonden (siehe Teil 1.1. Ergebnisse) und die Etablierung von RT-PCR-Analysen mit Konsensus-*primern* (Teil 2 Ergebnisse) führten zur Isolierung zweier putativer Transferase-Gene (*Secale cereale* UGTs, scUGTa-c), die phylogenetisch zwischen den pflanzlichen Flavonol-3-*O*-Glucosyl- (3FGTs) und den tierischen Glucuronosyltransferasen (UGTs) liegen (siehe Abb. 34-36). Trotz der unterschiedlichen Co-substrate beider Enzymgruppen (UDP-Glucose bzw. UDP-Glucuronat) tragen beide, eine für sie spezifische Domäne gleicher Aminosäuren, die Zuckerbindungsbox (prosite PS00375, Abb. 8). Die Sequenzen differieren in ihrer Substratbindungsstelle (N-Terminus), der Anwesenheit einer Transmembrandomäne bzw. eines ER-Lokalisationssignals (beides bei Vertebraten, siehe Abb. 11). Aufgrund der engeren Verwandtschaft eines der scUGT-Gene (scUGTb) zu Vertebraten-Glucuronosyltransferasen, wurde sich für eine genauere Analyse dieses Gens entschieden.

Die Transkription (siehe Kapitel 3.2.) dieses Gens im 5 Tage alten Roggenprimärblatt wurde mittels NORTHERN-*blot*-Analyse bzw. Durchmusterung einer cDNA-Bank mit homologen Sonden nachgewiesen. Die Lokalisation des Transkriptionsstarts und des *polyA-tails* wurde durch eine 5'- bzw. 3'-RACE ermittelt.

Die biochemische Charakterisierung der Roggen-Flavonoid-Zuckertransferasen beinhaltete die Etablierung des *in vitro* Enzymtests für die sequenzielle Glucuronidierung von Luteolin bzw. für die Glucosylierung (3-Flavonol-Glucosyltransferase-Enzymtests) von Cyanidinen und Flavonolen (Kapitel 5). Die Reaktionsprodukte wurden mittels HPLC analysiert. Es gelang R₁ als Hauptreaktionsprodukt der drei Glucuronidierungsreaktionen nachzuweisen (Abb. 44).

Eine heterologe Proteinexpression in *E.coli* bzw. *N.tabacum* / *A.thaliana* (Kapitel 4) sollte Aufschluss über die Enzymaktivität der im *screening* isolierten Gene geben. Mit Proteinen transformierter Organismen wurde sowohl der 3FGT- als auch der UGT-Enzymtest durchgeführt. Es stellte sich jedoch heraus, dass weder ein Umsatz von Cyanidinchlorid zu Cyanidin-3-O-Glucosid (3FGT-Reaktion), noch einer von Luteolin zu Luteolin-Mono- / -Di- bzw. -Tri-Glucuronid zu beobachten war (dies kann jedoch auch diverse andere Gründe wie z.B. Inaktivierung, Abbau, Enzymkomplex etc. haben, siehe Diskussion). Daraus kann man jedoch keinen letzt gültigen Schluß ziehen ob es sich bei der scUGTb um die gesuchte UDP-Glucuronosyltransferase, die die sequenzielle Glucuronidierung des Luteolins katalysiert, handelt oder nicht.

Das Molekulargewicht der Roggen-Glucuronosyltransferasen von 53 kDa wurde durch eine Immunblotanalyse und eine Protein-G-vermittelte Coimmunpräzipitation auf dem Proteinchip mit heterologen hUGT-Antikörpern ermittelt (Abb. 48). Dies konnte durch einen Lectinbindungsassay bestätigt werden (Abb. 49). Die Konzentration und Reinheit des 53 kDa-peaks reichte jedoch für eine Proteinsequenzierung auf dem Proteinchip nicht aus.

Durch "Fütterungen" von Wurzeln (Kapitel 5.4. Ergebnisse) mit Luteolin konnte die Synthese eines weiteren Luteolinderivates induziert werden (Analyse der Methanolextrakte via HPLC). In der SELDI-Analyse von gefütterten Wurzelproteinen konnte ein prominenter *peak* (54 kDa) detektiert werden. Dabei könnte es sich um eine weitere Zuckertransferase handeln.

Die subzelluläre Lokalisation der Luteolin-Glucuronosyltransferasen wurde durch eine Differenzialzentrifugation ermittelt (Lokalisation zu ~95% in den Überständen im Vergleich zu ~5% in den Sedimenten, siehe Abb. 54). Durch die transiente Expression fluoreszierenden scUGTb-Fusionsproteine in Gersteprimärblättern (*particle bombardment*) konnte die "cytosolische Lokalisation" eingegrenzt werden: Die scUGTb befindet sich nicht "diffus" im Cytoplasma gelöst, sondern scheint sowohl mit dem ER (gezeigt durch Coexpressions-Studien mit ER-Markern, Abb. 57, vermutlich über einen Komplex mit anderen Flavonoid-Biosynthese-Enzymen, "*metabolic channeling*"), als auch mit vesikulären Strukturen assoziiert zu sein (gezeigt durch Coexpression mit einem Tonoplasten-Marker, Abb.57).

Um die Anzahl der für die Biosynthese des Luteolin-Triglucuronids verantwortlichen Enzyme zu ermitteln, wurde eine 2D-Gelelektrophorese durchgeführt (Abb.63). Dabei stellte sich heraus, dass nur zwei Proteine mittels Immunblot detektiert werden konnten. Aufgrund dessen und weil im Enzymassay das Luteolin-Monoglucuronid N nicht oder nur geringfügig akkumuliert, sondern unmittelbar weiter glucuronidiert wird, kann von zwei anstatt bisher angenommen drei Glucuronosyltransferasen im Roggen ausgegangen werden (siehe Modell Enzymkomplex in Diskussion).

Die bei tierischen Enzymen beschriebene Homodimerisierung der UGTs konnte anhand einer FRET-Analyse durch *acceptor-photo-bleaching* bei den Roggen-UGTs bestätigt werden. Auch eine Protein-Protein-Interaktion zwischen der pflanzlichen und einer humanen UGT konnte gezeigt werden (Heterodimerisierung).

1. Abkürzungen

3FGT	Flavonol-3-O-Glucosyltransferase
A	Ampere
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
APS	Amoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Bidest	H ₂ O zweifach destilliertes Wasser
bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovineserumalbumin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CFP	cyane fluorescent protein
CHI	Chalconisomerase
CHS	Chalconsynthase
Ci	Curie
d	Tag
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DDK	dauer dunkel
DEAE	Diethylaminoethyl
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DFR	Dihydroflavonol 4-Reduktase
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuraciltriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
g	Gramm
GFP	grünes fluoreszierendes Protein
GFP	green fluorescent protein
Glc	Glucose
Glc-A	Glucuronsäure
h	Stunde(n)
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonsäure
IEF	isoelectric focussing
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasenpaar(e)
kDa	Kilodalton
KPi-Puffer	Kalium-Phosphat-Puffer
k	Kilo
l	Liter
LiOAc	Lithiumacetat
M	Molar
m	Milli
MeOH	Methanol
μ	Mikro
min	Minute(n)
mol	mol
MOPS	N-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	messenger Ribonukleinsäure

NaOAc	Natriumacetat
n	Nano
ODx	Optische Dichte bei der Wellenlänge x
P	Pellet
p	pico
PAGE	Polyacrylamidgel – Elektrophorese
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
Q-ToF	Quadrupole time of flight
RFP	red fluorescent protein
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat- Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sec	Sekunde(n)
SPA	Sinapinsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamine
TNFα	Tumor Necrose Faktor α
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X-100	Octylphenylpoly(ethylenglycoether) _n
U	Unit (Einheit der enzymatischen Aktivität)
ÜN	Über Nacht
ÜS	Überstand
V	Volt
WL	Weisslicht
x g	Gravitationskonstante (980 cm/s)
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid
YFP	yellow fluorescent protein

2. Oligonukleotide

2.1. Oligonukleotid-Liste

Name	Bemerkung	Sequenz
p 03	C3 neu Konsensussequenz von hUGT1a1 (NM_000463), B5GT (Y18871), sbUGT, sb7FGT (AB031274)	5'-TGG GCN CCC CAG (GA)TG GTG (CA)T(TG) CT(TG) G(GA)T-3'
p 08	C8R neu (Konsensussequenz siehe p 03)	3'-CTT CC(CG) TAT A(GC) (AG) (TC)G(GA) CCG CAC GGG TAC-5'
p 028	OligodT	
p 7	basiert auf K64 (liegt aber im Intron), reverse primer	3'-GAC GTC CAG TTG CCT AGT ATT CCC-5'
p 8	basiert auf K64, reverse primer	3'-CGC GGT GTT CAC TAC TAG GAC ACC-5'
p 9	basiert auf K64, reverse primer	3'-TTA TCT CCC GTA GAC ACG TCC ACA CGG-5'
p 10	rechter Arm EMBL3	5'-TTA CTG AAC ACT CGT CCG AG-3'
p 11	linker Arm EMBL3	5'-GTG TCC GAC TTA TGC CCG AG-3'
p 12	basiert auf K64, forward primer	5'-GTT GGA GGA TTT GTG ACG CAC TGT GGG T-3'
p 13	basiert auf K64, reverse primer, liegt 3' wärts vom STOP	5'-GAC TGT GTA GTT GTT ATG TGG ACT GCC-3'
p 14	basiert auf K64, reverse primer	3'-CGA CCT CTG TAA CAT GTA ACT TAG GAA-5'
p 15	basiert auf K64, reverse primer	3'-CTC CTT TGT TCC GCA GTT ACC TAC TCC-5'
p 16	basiert auf K64, reverse primer	3'-TGT TGA ACA ACT CGA CCC TGA-5'
p 17	basiert auf K64, forward primer	5'-GGT TCG AGG AGC GTG TCA AAG ACA GAG-3'
p 18	basiert auf K64, forward primer	5'-GGT TAT GGT TAC CAG AGA TGC TGT GGA-3'
p 19	basiert auf K64, forward primer, liegt 3' wärts vom STOP	5'-GAG ATT ACA GAT GAT CCA AAT GAA GGC-3'

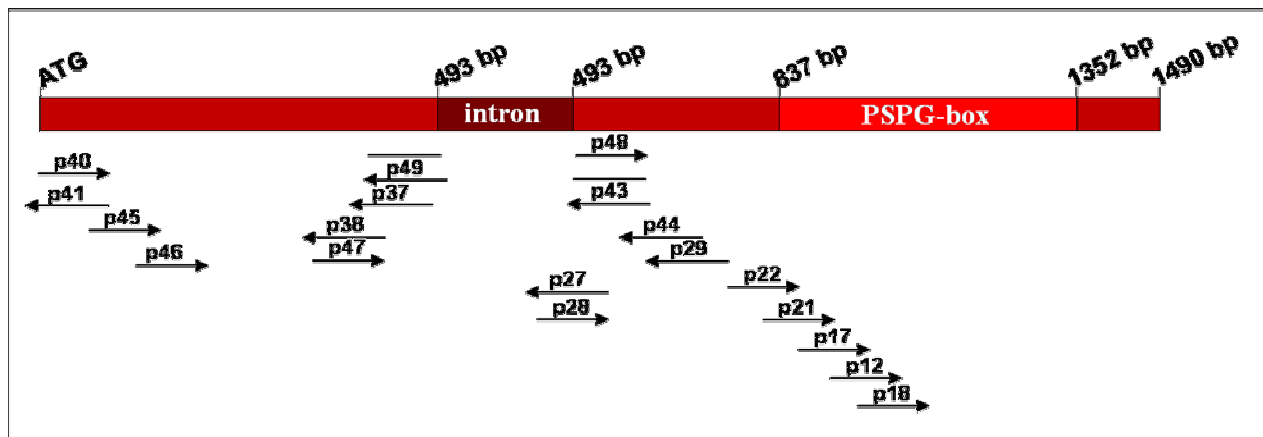
p 20	basiert auf K64, forward primer, liegt 3' wärts vom STOP	5'-GTT CGT GGA GGC GTA GGA CCA ATG ACT-3'
p 21	basiert auf K64, forward primer	5'-ACA ACT TGT TGA GCT GGA CT-3'
p 22	basiert auf K64, forward primer, zur Amplifikation der PSPG-Box	5'-GAG GAA ACA AGG CGT CAA TGG ATG AGG-3'
p 23	basiert auf K64, reverse primer, zur Amplifikation der PSPG-Box	3'-CTC TGT CGT CAC TTG TGG GAG TAC CCA-5'
p 24	basiert auf K64, reverse primer, zur Amplifikation der PSPG-Box, liegt 3' wärts von p23	3'-GAG TAC CCA CTT CCC CTC CGA TGT CTC-5'
p 25	basiert auf hUGT1a1 / -2b7 Konsensussequenz	5'-GTG GTT TTC TCT TTG GGA TCA ATG GTC-3'
p 26	basiert auf hUGT1a1 / -2b7 Konsensussequenz	3'-GGG TGC TGG AGT GGA CCA TGG TCA TGG-5'
p 27	basiert auf K64, reverse primer	3'-GAT GCT GGT AGA ACG TCC ATG TAG T-5'
p 28	basiert auf K64, forward primer	5'-CTA CGA CCA TCT TGC AGG TAC ATC A-3'
p 29	basiert auf K64, reverse primer	3'-GGG ACC TTG GGA AAG GTA AGG ACC ATA-5'
p 30	basiert auf K64, forward primer	5'-CCCTGGAACCCTTTCCATTCTGGTAT-3'
p 31	ein Teil des Primers liegt noch innerhalb des Introns, mit ATG	5'-gggg-aca-agt-ttg-tac-aaa-aaa-gca-ggc-tcc-atg CTA CGA CCA TCT TGC AGG TAC ATC-3'
p 32	direkt vor PSPG-Box, mit ATG	5'-gggg-aca-agt-ttg-tac-aaa-aaa-gca-ggc-tcc-atg GCA AGA GGA AAC AAG GCG TCA ATG-3'
p 33	der selbe Primer wie p 35 aber mit STOP	3'-TTG TGG GAG TAC CCA CTT CCC CTC act-ctg-ggt-cga-aag-aac-atg-ttt-cac-ca-gggg-5'
p 34	der selbe Primer wie p 36 aber mit STOP	3'-TTC TGC TTC CGT ACA CCA ACT ATC-ggt-cga-aag-aac-atg-ttt-cac-ca-gggg-5'
p 35	direkt hinter PSPG-Box, ohne STOP	3'-TTG TGG GAG TAC CCA CTT CCC CTC-ctg-ggt-cga-aag-aac-atg-ttt-cac-ca-gggg-5'
p 36	3' Ende von scUGT-cDNA, ohne STOP	3'-TCT TTG TTC TGC TTC CGT ACA CCA-ctg-ggt-cga-aag-aac-atg-ttt-cac-ca-gggg-5'
p 37	siehe Sequenz 2.2.1.	5'-GTG AAC CAG GTC AGA TAT GAT GCA GCT C-3'
p 38	siehe Sequenz 2.2.1.	5'-TGC TGC TCA CGG AGG TAT GCC TTG AGC-3'
p 39	Gateway-Primer mit natürlichem ATG	5'-gggg-aca-agt-ttg-tac-aaa-aaa-gca-ggc-tcc-atg CTA CGA CCA TCT TGC AGG TAC ATC-3'
p 40	geht über ATG in 3' Richtung, entspricht p39 aber ohne gateway sequenz	5'-ATG ACC TTC ACC GGC AGT GGC GAC GGC-3'
p 41	geht über ATG in 5' Richtung	5'-GCC GTC GCC ACT GCC GGT GAA GGT CAT-3'
p 42	~ 150 bp upstream vom ATG, in 5' Richtung	5'-CTA TAG TGT ATA CAT ATA GCA CCT GG-3'
p 43	siehe Sequenz 2.2.1.	5'-GAC ATG TTC CAA TAC ATT GTT GTG-3'
p 44	siehe Sequenz 2.2.1.	5'-GCC TTC GTG AGC TCT ATT GGC GTA-3'
p 45	siehe Sequenz 2.2.1.	5'-CCG ACA TGG CGC GTC TGC TGG CAG-3'
p 46	siehe Sequenz 2.2.1.	5'-GCG CGC AGG TCA GCT TCA TCA CCA-3'
p 47	siehe Sequenz 2.2.1.	5'-GCT CAA GGC ATA CCT CCG TGA GCA-3'
p 48	forward primer für overlap PCR	5'-GTG GCT TCT CAT CCC TCG TCA GGT ACA TCA CTT TTC ACA ACA ATG-3'
p49	reverse primer für overlap PCR	5'-CAT TGT TGT GAA AAG TGA TGT ACC TGA CGA GGG ATG AGA AGC CAC-3'
1a1-atg	siehe Sequenz 2.2.1.	5'-gggg-aca-agt-ttg-tac-aaa-aaa-gca-ggc-tcc-atg GCT GTG GAG TCC CAG GGC GGA CGC CCA-3'
1a1-fusion	siehe Sequenz 2.2.1.	3'-CAA TTC TTT CGG GTG TTT AGG TTC TGG GTA -ctg-ggt-cga-aag-aac-atg-ttt-cac-ca-gggg-5'
2b7-atg	siehe Sequenz 2.2.1.	5'-gggg-aca-agt-ttg-tac-aaa-aaa-gca-ggc-tcc-atg ATG TCT GTG AAA TGG ACT TCA GTA ATT TTG-3'
2b7-fusion	siehe Sequenz 2.2.1.	3'-TTT GCT AGA AAA GCA AAG AAG GGA AAA AAT -ctg-ggt-cga-aag-aac-atg-ttt-cac-ca-gggg-5'
pro1	Sequenzierung des Promotors	5'-AAC AAG GAG CCT TGG TCA TAC CTC-3'
pro2	Sequenzierung des Promotors	5'-GAG GTA TGA CCA AGG CTC CTT GTT-3'
pro3	Sequenzierung des Promotors	5'-ACA GGC GGT AGC GGT GGT TAA TCT-3'
pro4	Sequenzierung des Promotors	5'-AGA TTA ACC ACC GCT ACC GCC TGT-3'

2.2. Oligonukleotide der Sequenz scUGTb

2.2.1. Sequenz

1 CCAGGTGCTA TATGTATACA CTATAGTTGC CATTGCGACC ATCATCAGAT p42
 51 TGTGCCAGC CCCAACACAT CGTGCTATCT TGCCGGTGTC ACTGTCTTCC
 101 CAGTTTACT GACGCCGCCA CCAGTACTTT TGCTACAACA GCCGATCAGC
 151 **CATG**ACCTTC ACCGGCAGTG GCGACGGCCA GAGCGGCTCC ATGAGGGCGC p39 (gw) / p40 / p41
 201 ACTTTGTGCT GGTACCGATG TTGGCTCAGG GGCACACCAT CCCCATGACC
 251 GACATGGCGC GTCTGCTGGC AGAGCACGGC GCGCAGGTCA GCTTCATCAC p45
 301 CACGCCAGTG AACGCCTCCA GGTGGCAGG CTTTGCAGCC GATGTGGATG p46
 351 CGCGGGCCT GGCAGTTCAG CTCGTGGAGC TCCATTTCCT GAGCGCCGAG
 401 TTCGGCTAC CAGACGGGTG CGAGAACCTA GACATGATCC AATCCACGGA
 451 TCTGCTCTCC AACTTCATAT ATGCCATCGC TGCGCTTCAG GAGCCGCTCA p38
 501 AGGCATACCT CCGTGAGCAG CAGCGCTCGC CTCCGAGCTG CATCATATCT p37 / p47
 551 GACCTGGTTC ACTGGTGGAC TGGTGACATT GCAAGGGAGC TCGGTATCCC
 601 AAGGCTCACT TTTAGTGGCT TTTGTGGCTT CTCATCCCTC GTCAGGTACA p48/p49
 651 ACCATAAGAG GCAAATCTTG TGAATAATTA ATTTTGTACT GGACATATTA
 701 TTGCTGCTAC AATTAAGTGC TTTACTTAAG GAGTGGAGGG AAAATTAGTG
 751 TAGATTGCTT CCAGAGAGAA GAAAGCATGA ACATATAAAA GGCTACACCC Intron
 801 GAAAGGGGGA AATTTAATCT GAATAGTACT TCAAGCAACG AACATGTAA
 851 TTTACATTAC ATAAAGAACT ACAGACATGA AAGTTTTTCG TGGGCAAGTT
 901 TTTAGCCAGC TCCCTCTTAT TTGTGGAAGA AGTCTGCACT TATACGTATT
 951 TtAAACA**CT** ACGACCATCT TGCAGGTACA TCAcTTTTCA CAACAATGTA p27/p28/p31 (gw)
 1001 TTgGAACATG TCaAAGATGA AAATGAGCTC ATCACAATcc caGGGTTCcC p43
 1051 TACGCCAaTA GAGCTcACGA AGGCTAAATg CCCTGGAACC CTTTCCATTC p44/p29
 1101 CTGGTATGGA GCAAATCCGT AAGAAGTTCc TTGAAGAgGA GCTGAgAAGT p30
 1151 GATGGTGAGG TCATTAACAC CTTcCAAGAG CTGGAGACAT TGTACATTGA p14
 1201 ATCCTTTGAG CAGACCACAA AGAAGAAGGT CTGGGCGaTC GGACCAATGT
 1251 GCCTCTGCCA CCGgGACAAC AACACAATGG TCGCAAGAGG AAACAAGGCG p15
 1301 TCAATGGATG AGGCgCAGTG CTTGCAATGG CTTGATTCAA GGAAGCCAgG p32 (gw) / p22
 1351 CTCAGTgATc TTTGTaAGcT TTGGCAGCCT CGCTTGCACt ACACCTCAAC p16
 1401 AACTTgTTGA GCTGGGACTG GGACTTGAAG CCTCCAAGAA ACCGTTTATT p21 pfam
 1451 TGGGTGATCA AAGCAGGAcC TAAGTTTCCA GAAGTCGAGG AATGGCTCGC 00201.5
 1501 AGATGGGTTc GAGGAGCGTG TCAAAGACAG AGGCATGATC ATAAGGGGCT p17
 1551 GGGCGCCACA AGTgATGATC CTGTGGCACC AAGCCGTTGG AGGATTTGTG p8
 1601 ACGCACTGTG GGTGGAAct AACAATAGAG GGCATCTGTG CAGGTGTGCC p12/p9
 1651 CATGATCACA TGGCCACACT TTGCAGAGCA GTTTTTGAAT GAGAAGCTGG
 1701 TGGTGGATGT GCTGAAACTT GGGGTAGAGG TTGGAGTGCA AGGAGTTACA
 1751 CAGTGGGAA GTGAACAGCA AGAGGTTATG GTTACCAGAG ATGCTGTG**EA** p18/p23
 1801 **SACAGCAGTG AACACCCTCA TGGGT GAAGG GGAG**GCTACA GAG**E**AGTTGA 33 u 35 (gw) / p24
 1851 GAATGAGAGC AGAAGAGTGT GCCATTAAGG CAAAGAGAGC TTTCGACGAG
 1901 GAAGTTCTT CTTACAACAA TGTAAGGCTG TTAATTCAAG AAAT**AGAAA** p36 (gw)
 1951 **GAAGACGAAG GCATGTGGT T GATAG**AGATT ACCTAAGCTC GCTTTTTCGG p34
 2001 TGTAACATG AAGTGAAAGA TCCTAGAATA CATATATCAT CATATAGAAT
 2051 TTTGTACCAG GCTCACAGGT GATTATTTAG AGATTACAGA TGATCCAAAT
 2101 GAAGGCAATA TCAATTATCC TCTCTATTAT GTACGCTCTT TCAT**GGCAGT** p19/p13
 2151 CCACATAACA ACTACACAGT CTGCTCTTCT AGATGGTTAC GCTTTCCCTT
 2201 GCATTTTGCT ACCGCCTGCA CGACTAGCCA CGGTTCGTGG AGGCGTAGGA
 2251 CCAATGACTC CGTGGGANCA ACTANGGANG GGCGCCGCCG TGCACCGGAC p20

2.2.2. Schematische Darstellung



3. Vektoren

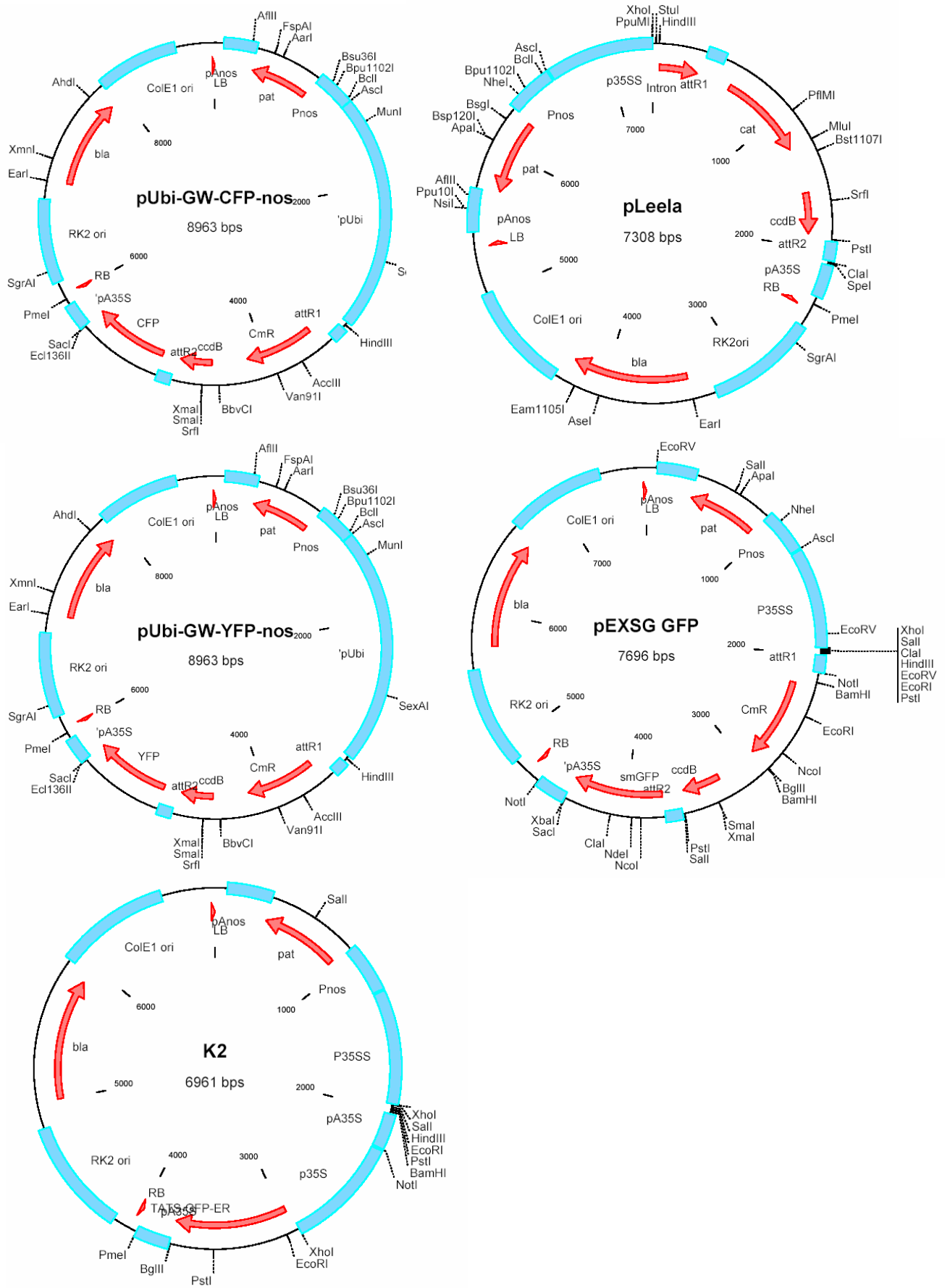
3.1. Vektoren allgemein

Vektoren	Referenz
pBluescript® SK(+/-)	Stratagene [Alting-Mees <i>et al.</i> , 1992]
pGEMTEasy	Promega

3.3. hUGT-Vektoren

UGT Nummer	Plasmid	Klonierung	Resistenz	Größe
1A1	pcDNA3.1.-)	BamHI / HindIII	Ampicillin	7025 bp
1A4	pcDNA3.1.-)	BamHI / HindIII	Ampicillin	7025 bp
1A6	pcDNA3.1.-)	BamHI / HindIII	Ampicillin	7025 bp
1A7	pcDNA3.1.-)	BamHI / HindIII	Ampicillin	7025 bp
1A9	pcDNA3.1.-)	BamHI / HindIII	Ampicillin	7025 bp
1A10	pcDNA3.1.-)	XbaI / HindIII	Ampicillin	7025 bp
2B7	pcDNA3.1.-)	XbaI / HindIII	Ampicillin	7025 bp

3.2. Gateway-Expressionsvektoren (Karten)



4. Bakterienstämme

E.coli-Stämme	
XL1-Blue MRF'	(mcrA)183, .(mcrCB-hsdSMR-mrr)173, endA1, supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, lac [F' proAB, lac1qZ.M15Tn10(Tetr)] (Stratagene)
DH 10 B	F', mcrA, .(mvr-hsd RMS-mcrBC), 80dlacZ..M15,.lacX74,deoRrecA1,endA1,eraD139, (ara,leu)7697galU,galkA-rpsL,nupG (GIBCO-BRL)
BL 21 (DE 3)	<i>E.coli</i> B F- dcm omp T hsdS (̄ mB̄) gal λ (DE3)(Stratagene)
XL0LR	(mcrA)183, .(mcrCB-hsdSMR-mrr)173, endA1, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, lac [F' proAB, lac1qZ.M15Tn10(Tetr)] Su-
Agrobacterium-Stamm	
GV3101 mit pMP90-virulenz Plasmid	C59C1, RifR

5. Antikörper

Name	Beschreibung	Konzentration im WESTERN-blot	Literatur
EL-93	generiert gegen Aminosäure 57-300 von der humanen UGT2B17 (denaturiert, 29 kDa-Fragment), spezifisch für alle Proteine der Gruppe hUGT2	1:2000	BARBIER et al. 2000
EL-95	generiert gegen Aminosäure 57-300 von der humanen UGT2B17 (denaturiert, 29 kDa-Fragment), spezifisch für UGT2B17	1:2000	BARBIER et al. 2000
RC-71	generiert gegen Aminosäure 312-531 von humaner UGT1A9 (denaturiert, 24 kDa-Fragment), spezifisch für UGT1A9	1:2000	ALBERT et al. 1999
Anti-His	<i>Monoclonal anti-polyhistidine clone his-1 peroxidase conjugate</i> , SIGMA-ALDRICH, Produktnummer: A7058	1:4000	
Anti-IgG	<i>Goat anti-mouse IgG (H+L) HRP conjugated secondary antibody</i> , CHEMICON, Produktnummer: AP308P	1:3000	
Anti-GFP	<i>Mixture of two mouse monoclonal antibodies (Clones 7.1 and 13.1)</i> , ROCHE, Produktnummer: 1814460		

6. Alignments

6.1. Alignment Substratbindestelle (siehe nächste Seite)

P22309 1 MAVESQGRPLVGLLLCVLPVSVHAG-KILLIFVDGSG-HWISLGAQQOQRC---HEVTVLAPDASLYIRDGFYTI-KT--YFVFPQREDVKE-
P36510 1 ----MLKNIILWSLQSLSLG---MSLGGNVILWPEMGS-HWISLGAQQOQRC---HEVTVLAPDASLYIRDGFYTI-KT--YFVFPQREDVKE-
P09875 1 ----AAAMDFTS-HWISLGAQQOQRC---HEVTVLAPDASLYIRDGFYTI-KT--YFVFPQREDVKE-
P08541 1 MSMK-QTSVFLIQLICYFRP---GACG-KVLVWPEFYS-HWISLGAQQOQRC---HEVTVLAPDASLYIRDGFYTI-KT--YFVFPQREDVKE-
P08542 1 MPKQ-WISALFLLQISYCFKS---GHCG-KVLVWPEFYS-HWISLGAQQOQRC---HEVTVLAPDASLYIRDGFYTI-KT--YFVFPQREDVKE-
P06133 1 MPKQ-WISALFLLQISYCFKS---GHCG-KVLVWPEFYS-HWISLGAQQOQRC---HEVTVLAPDASLYIRDGFYTI-KT--YFVFPQREDVKE-
P17717 1 MSMK-WTSALLLQLSCYFSS---GSCG-KVLVWPEFYS-HWISLGAQQOQRC---HEVTVLAPDASLYIRDGFYTI-KT--YFVFPQREDVKE-
P19488 1 MPKQ-WISALFLLQISYCFKS---GHCG-KVLVWPEFYS-HWISLGAQQOQRC---HEVTVLAPDASLYIRDGFYTI-KT--YFVFPQREDVKE-
P16662 1 MSVK-WTSVILLQLSFCYFSS---GSCG-KVLVWPEFYS-HWISLGAQQOQRC---HEVTVLAPDASLYIRDGFYTI-KT--YFVFPQREDVKE-
P36537 1 MALK-WT-TVLLIQLSFCYFSS---GSCG-KVLVWPEFYS-HWISLGAQQOQRC---HEVTVLAPDASLYIRDGFYTI-KT--YFVFPQREDVKE-
scUGTa 1 ----MTFTGSDGQS---GSMRAHFLVLPMLAAGHTIPMTDVAALLAEHG---AQSFTITPVNASRLAGFAADV-EAAGLAVRLVELHFPFA
P16G7b 1 ----MTFTGSDGQS---GSMRAHFLVLPMLAAGHTIPMTDVAALLAEHG---AQSFTITPVNASRLAGFAADV-EAAGLAVRLVELHFPFA
scUGTc 1 ----MTFTGSDGQS---GSMRAHFLVLPMLAAGHTIPMTDVAALLAEHG---AQSFTITPVNASRLAGFAADV-EAAGLAVRLVELHFPFA
Q9MB73 1 ----MTFTGSDGQS---GSMRAHFLVLPMLAAGHTIPMTDVAALLAEHG---AQSFTITPVNASRLAGFAADV-EAAGLAVRLVELHFPFA
Q9SMG6 1 ----MTFTGSDGQS---GSMRAHFLVLPMLAAGHTIPMTDVAALLAEHG---AQSFTITPVNASRLAGFAADV-EAAGLAVRLVELHFPFA
Q96493 1 ----MTFTGSDGQS---GSMRAHFLVLPMLAAGHTIPMTDVAALLAEHG---AQSFTITPVNASRLAGFAADV-EAAGLAVRLVELHFPFA
P14726 1 ----MTFTGSDGQS---GSMRAHFLVLPMLAAGHTIPMTDVAALLAEHG---AQSFTITPVNASRLAGFAADV-EAAGLAVRLVELHFPFA
Q9ZSK5 1 ----MTFTGSDGQS---GSMRAHFLVLPMLAAGHTIPMTDVAALLAEHG---AQSFTITPVNASRLAGFAADV-EAAGLAVRLVELHFPFA
P16165 1 ----MTFTGSDGQS---GSMRAHFLVLPMLAAGHTIPMTDVAALLAEHG---AQSFTITPVNASRLAGFAADV-EAAGLAVRLVELHFPFA
P16166 1 ----MTFTGSDGQS---GSMRAHFLVLPMLAAGHTIPMTDVAALLAEHG---AQSFTITPVNASRLAGFAADV-EAAGLAVRLVELHFPFA
P16167 1 ----MTFTGSDGQS---GSMRAHFLVLPMLAAGHTIPMTDVAALLAEHG---AQSFTITPVNASRLAGFAADV-EAAGLAVRLVELHFPFA
Q41819 1 ----MTFTGSDGQS---GSMRAHFLVLPMLAAGHTIPMTDVAALLAEHG---AQSFTITPVNASRLAGFAADV-EAAGLAVRLVELHFPFA
P56725 1 ----MTFTGSDGQS---GSMRAHFLVLPMLAAGHTIPMTDVAALLAEHG---AQSFTITPVNASRLAGFAADV-EAAGLAVRLVELHFPFA

P22309 91 SVSLIGHN-VFINDS---FLQR-IKTYKKKKDSAMLSGCSHLLHKKEL-MASTAESSFDVMTLDPFLPCSPVIAQYLSLPTVFFHALP-CSSEFEAT
P36510 86 VIKDFVLTWLENRPPSTIWTYKEMAKVHEEFHLVSRGICDGVLRNKL-MKKLQKQKFEVLSDFVPCGDIIVALKLGIPEFYSRFSFASTVEKHS
P36514 61 ELNLTVMYSSFLPT-LSNWVKVGMKVMGQKFSKLRVCDVAKNKL-LDRKAAKFDICLADPLAFGCGDIAVLIPIFYSRFSFSGIINTIERSCA
P09875 89 SAKWIDEWTRFET-LSIWTYYSKMKQVFNESYLVENLCKALINWKS-LKKLQSQDFVILADAVGPGCELLAEILKTPVLYSIRFCPGYRCEKFSG
P08541 89 HIKLLDWWYDTPR-DTCLSYSPILQNMVEFYSYFSLICKDAVSNKQL-MKKLQKQKFEVLSDFVPCGDIIVALKLGIPEFYSRFSFASTVEKHS
P08542 89 YIKLVVWYDTPR-DTCLSYSPILQNMVEFYSYFSLICKDAVSNKQL-MKKLQKQKFEVLSDFVPCGDIIVALKLGIPEFYSRFSFASTVEKHS
P06133 89 IIKLVVWYDTPR-DTCLSYSPILQNMVEFYSYFSLICKDAVSNKQL-MKKLQKQKFEVLSDFVPCGDIIVALKLGIPEFYSRFSFASTVEKHS
P17717 89 YIKLVVWYDTPR-DTCLSYSPILQNMVEFYSYFSLICKDAVSNKQL-MKKLQKQKFEVLSDFVPCGDIIVALKLGIPEFYSRFSFASTVEKHS
P19488 89 YIKLVVWYDTPR-DTCLSYSPILQNMVEFYSYFSLICKDAVSNKQL-MKKLQKQKFEVLSDFVPCGDIIVALKLGIPEFYSRFSFASTVEKHS
P16662 89 FIMQQLKRW-DEPK-DTFWLYFSQVEIISIFGDIRKFKDIVSNKKL-MKKLQKQKFEVLSDFVPCGDIIVALKLGIPEFYSRFSFASTVEKHS
P36537 88 IIMQLVKRLS-ETQK-DTFWLYFSQVEIISIFGDIRKFKDIVSNKKL-MKKLQKQKFEVLSDFVPCGDIIVALKLGIPEFYSRFSFASTVEKHS
scUGTa 83 EIGLPGDCENLMIQ---STDLIPNEMDAIAALQEPKAYLR---EQORSP-PCITISDLIHWWTGDIARELGIPLRTFS--GFCGFSLLIRYITFHNNV
scUGTb 83 EIGLPGDCENLMIQ---STDLIPNEMDAIAALQEPKAYLR---EQORSP-PCITISDLIHWWTGDIARELGIPLRTFS--GFCGFSLLIRYITFHNNV
scUGTc 83 EIGLPGDCENLMIQ---STDLIPNEMDAIAALQEPKAYLR---EQORSP-PCITISDLIHWWTGDIARELGIPLRTFS--GFCGFSLLIRYITFHNNV
Q9MB73 69 YIKLVVWYDTPR-RELDQMAQLELIGKVIPIKIKSAEYRVPSCILINNPPIPVVSDVAESLGLPAAVWQSACFAAYHYFHLVFPFP
Q9SMG6 78 EAGLPGDCENLMIQ---AIGANNEFNAANLKEQENFLV---KTR-PNCLVADMFETWADSTAKFNIPVTVFVH--GSSFAQCAECVMWRYKPY
Q96493 70 --GSPEGFVSGNPP---EPTEYLNAAPDNFKAMKAV---EDTGVN-ISCCLTDAFLWFAADSEKIGVWPVWTAASCSLCLHVYTDERSRFA
P14726 68 --DGVPFGTSCSPP---RRDLMAAAEAGGVVLEAAASAGGAR-VICVVGDAFVWPAADAAASAGAPVWVWTAASCALLAHIRTDALREDVG
Q9ZSK5 76 PIVSPPNPEDFEP---SHLIPSE-ASAHLR-PIVGLKLSLSSAKR-VVINDSLMASACDAANISNVENYTFH--SFAFNISG-----DFW
P16165 81 --DGAPAAEETVVP---ROMQLMEAAEAGGVKAWLEAARAAGGAR-VICVVGDAFVWPAADAAASAGAPVWVWTAASCALLAHIRTDALREDVG
P16166 81 --DGAPAAEETVVP---ROMQLMEAAEAGGVKAWLEAARAAGGAR-VICVVGDAFVWPAADAAASAGAPVWVWTAASCALLAHIRTDALREDVG
P16167 81 --DGAPAAEETVVP---ROMQLMEAAEAGGVKAWLEAARAAGGAR-VICVVGDAFVWPAADAAASAGAPVWVWTAASCALLAHIRTDALREDVG
Q41819 61 --HDEGFASAAQ---VAELKQAAASASLASLVEARSSADAFVICVVGDAFVWPAADAAASAGAPVWVWTAASCALLAHIRTDALREDVG
P56725 71 PIVSPPNPEDFEP---SHLIPSE-ASAHLR-PIVGLKLSLSSAKR-VVINDSLMASACDAANISNVENYTFH--SFAFNISG-----DFW

P22309 185 Q-CPNFFS-----YVPRPLSSHSHTMFLQR--VKN---MIIFSQNFLCDVV-YSPYATLASELQREVTQDILSSASWLFPSDVKDYBPTIME
P36510 185 K-VPEFSS-----YVPAIILSELTDMQSFADR--VRN---FISYRQDYMBETL-WKQDSYYSKALGRPTTICEMGKAELWLMRTYDFEFPRPYLP
P36514 159 G-LPPESS-----YVPGSTSGLTDMQSFADR--LKN---WLLYLMNDMMFHFMLSEDEYYSKVLGRPTTICEMGKAELWLMRTYDFEFPRPYLP
P09875 187 G-LPPESS-----YVPPVLSGLAGKMTFIDR--VKN---MICYLYDFDFWFMFNKAKNDPYSSEILGRPTTICEMGKAELWLMRTYDFEFPRPYLP
P08541 187 K-FLEFSS-----YVPPVLSGLAGKMTFIDR--VKN---MICYLYDFDFWFMFNKAKNDPYSSEILGRPTTICEMGKAELWLMRTYDFEFPRPYLP
P08542 187 R-FLEFSS-----YVPPVLSGLAGKMTFIDR--VKN---MICYLYDFDFWFMFNKAKNDPYSSEILGRPTTICEMGKAELWLMRTYDFEFPRPYLP
P06133 186 G-LLEFSS-----YVPPVLSGLAGKMTFIDR--VKN---MICYLYDFDFWFMFNKAKNDPYSSEILGRPTTICEMGKAELWLMRTYDFEFPRPYLP
P17717 187 R-FLEFSS-----YVPPVLSGLAGKMTFIDR--VKN---MICYLYDFDFWFMFNKAKNDPYSSEILGRPTTICEMGKAELWLMRTYDFEFPRPYLP
P19488 187 R-FLEFSS-----YVPPVLSGLAGKMTFIDR--VKN---MICYLYDFDFWFMFNKAKNDPYSSEILGRPTTICEMGKAELWLMRTYDFEFPRPYLP
P16662 186 G-FLEFSS-----YVPPVLSGLAGKMTFIDR--VKN---MICYLYDFDFWFMFNKAKNDPYSSEILGRPTTICEMGKAELWLMRTYDFEFPRPYLP
P36537 185 G-FLEFSS-----YVPPVLSGLAGKMTFIDR--VKN---MICYLYDFDFWFMFNKAKNDPYSSEILGRPTTICEMGKAELWLMRTYDFEFPRPYLP
scUGTa 175 E-HVKDENEL-----ITITGFPPTPLETKAKCPGSL--PGMEQIRKKELEELRSDEVINRFOLETLYESFEQTTK--KVVWALG-PMCLCH
scUGTb 175 E-HVKDENEL-----ITITGFPPTPLETKAKCPGSL--PGMEQIRKKELEELRSDEVINRFOLETLYESFEQTTK--KVVWALG-PMCLCH
scUGTc 175 E-HVKDENEL-----ITITGFPPTPLETKAKCPGSL--PGMEQIRKKELEELRSDEVINRFOLETLYESFEQTTK--KVVWALG-PMCLCH
Q9MB73 164 S-EKHEID-----VQLPQPLKLDMPFSLHP--STP---YFPLRRALIGQVENLQKPCILLDIYELKEKELIYAKRITCP-----IKFVG-PLPKFN
Q9SMG6 167 K-AVSSD-----EVFSPFLPEHVKMTRLQVPEMSKGEETHRTKREIRLEBKSQVIVNSBYELEPPYALPGRKELG--BRMHG-PLVSLCN
Q96493 160 EFDIAEKKEKTI-DFIPGSAISFSLPEELIMEDSOS---TFAITLHNMGLKHLK-ATAVAVNSBEEDPIITNHRSTNQ---LNLILNIG-P-----
P14726 160 D-QAASRADELL-VAHAGGGYRVRDLPDGVSGDFN---YVLSLHVHRMQQLPRSAALVALNIFPGDPPDVTAAALAEI---PNCVFFG-PYHLL
Q9ZSK5 160 E-EMGKP-----EVDGDFHFPFPLEGCI-IAAC---FKGFTLQVQYERKFN--GDTYNSRVLEGGYVLELKFVNGG--KVVWALG-P-----
P16165 173 D-QAANRVDEPL-ISHPGASRYRVRDLPDGVSGDFN---YVLSLHVHRMQQLPRSAALVALNIFPGDPPDVTAAALAEI---PNCVFFG-PYHLL
P16166 173 D-QAANRVDEPL-ISHPGASRYRVRDLPDGVSGDFN---YVLSLHVHRMQQLPRSAALVALNIFPGDPPDVTAAALAEI---PNCVFFG-PYHLL
P16167 173 D-QAANRVDEPL-ISHPGASRYRVRDLPDGVSGDFN---YVLSLHVHRMQQLPRSAALVALNIFPGDPPDVTAAALAEI---PNCVFFG-PYHLL
Q41819 150 PGAADGSDGAGAAA-SEAFGLPBMERSELPSPFTHGYPYTPAQAIKQFAHAGKDDVLENSBELETEWLAGTKYVKAR-AIGPCVPLPTAGRT
P56725 155 E-EMGKP-----P-ADHFFP-IP-LSQGC-ISAQ---FTDF-ITAQNEFRKFN--GDTYNSRVLEGGYVLELKFVNGG--KVVWALG-P-----

P22309 271 NMVFGGLINCLHONPLSQEFAAYINASGEHGVVVSLSGSMVSEIPEKKAMATADALGKIPQTVLWRYT-----GTRFNSLNANTILVYK-----
P36510 271 NFEYVGLLCKPCKPKPKMEEFVQSGEHEGVVVSLSGSMVKNLTKBKANIASALAQIPQKVLWRYT-----GKIPATLGNTRLYK-----
P36514 246 NFEYVGLLCKPCKPKPKMEEFVQSGEHEGVVVSLSGSMVKNLTKBKANIASALAQIPQKVLWRYT-----GKIPATLGNTRLYK-----
P09875 274 NFDVFGGLLCKPCKPKPKMEEFVQSGEHEGVVVSLSGSMVKNLTKBKANIASALAQIPQKVLWRYT-----GKIPATLGNTRLYK-----
P08541 274 NVDYVGLLCKPCKPKPKMEEFVQSGEHEGVVVSLSGSMVKNLTKBKANIASALAQIPQKVLWRYT-----GKIPATLGNTRLYK-----
P08542 274 NVDYVGLLCKPCKPKPKMEEFVQSGEHEGVVVSLSGSMVKNLTKBKANIASALAQIPQKVLWRYT-----GKIPATLGNTRLYK-----
P06133 273 NVDYVGLLCKPCKPKPKMEEFVQSGEHEGVVVSLSGSMVKNLTKBKANIASALAQIPQKVLWRYT-----GKIPATLGNTRLYK-----
P17717 274 NVDYVGLLCKPCKPKPKMEEFVQSGEHEGVVVSLSGSMVKNLTKBKANIASALAQIPQKVLWRYT-----GKIPATLGNTRLYK-----
P19488 274 NVDYVGLLCKPCKPKPKMEEFVQSGEHEGVVVSLSGSMVKNLTKBKANIASALAQIPQKVLWRYT-----GKIPATLGNTRLYK-----
P16662 273 NVDYVGLLCKPCKPKPKMEEFVQSGEHEGVVVSLSGSMVKNLTKBKANIASALAQIPQKVLWRYT-----GKIPATLGNTRLYK-----
P36537 274 NVDYVGLLCKPCKPKPKMEEFVQSGEHEGVVVSLSGSMVKNLTKBKANIASALAQIPQKVLWRYT-----GKIPATLGNTRLYK-----
scUGTa 261 RDNNTMVARGNKASMDAEOCLQWLDNRKPGSVIFVSPGSLACTTPOQ--LVELGQLEASKPPFVWIKAGAK-----LPEVEWLDGEEERKDR--GLIIRG
scUGTb 261 RDNNTMVARGNKASMDAEOCLQWLDNRKPGSVIFVSPGSLACTTPOQ--LVELGQLEASKPPFVWIKAGAK-----LPEVEWLDGEEERKDR--GLIIRG
scUGTc 261 RDNNTMVARGNKASMDAEOCLQWLDNRKPGSVIFVSPGSLACTTPOQ--LVELGQLEASKPPFVWIKAGAK-----LPEVEWLDGEEERKDR--GLIIRG
Q9MB73 248 ---KAPLTVRDCMKRDECDLWLDKPPSSVYISFGTVVYLKQEQ--VEEIGYALNSGSLFVWVMPPPED--SGVKIVDLPDGLKYGDK--GKVVQ-
Q9SMG6 256 RSIEDRQGLGQTSIDEDCLKWLNSKPKDSVLYICPGSPGHLIAPQ--LHEIAPALBASGDFVWVAVRGDHG-----QGNSEWLPPEYBHRLOGK--GLIIRG
Q96493 245 ---LQTLSS-SIPFEDNCKLWLOKQSSVWVLSFGTINPPNE--MAALASTLESRKIPFLWSLR--D-----DKRKHLPENEDRTSTF--GKIVS-
P14726 250 G---AEPITADTNEAPDFHGLANLDRRPAAPADVLSFGTINATARPDE--LRELAAGLEASGAPFLWSLR-----GVVAAAPRGLEERAP--GLVVP-
Q9ZSK5 234 ---FNPLAVEKQKDSIGFRPCEMWDKQEPSSVYISFGTITLALRDE--IQCIATGLQSKQKFWLWLRADKGDIFAGSEAKRYLPGKEEREGM--GLVVP-
P16165 263 ---AEDDADT-AAPADPHGLANLGRQPARGVAVSFGTIVACRPDE--LRELAAGLEASGAPFLWSLR-----DSWTLPPGLDRAAGTGSGLVVP-
P16166 263 ---AEDDADT-AAPADPHGLANLGRQPARGVAVSFGTIVACRPDE--LRELAAGLEASGAPFLWSLR-----DSWTLPPGLDRAAGTGSGLVVP-
P16167 263 ---AEDDADT-AAPADPHGLANLGRQPARGVAVSFGTIVACRPDE--LRELAAGLEASGAPFLWSLR-----DSWTLPPGLDRAAGTGSGLVVP-
Q41819 249 AGANGRITYGANLVKPEDAKTKLNDKPDRSVAVYVSPGSLASLNAQ--KEELARGLLAAGKPFVWVVR-----ASDEHQVRYLLAEATGAMVVP-
P56725 229 --FTPLAVEKQKDSIGFRPCEMWDKQEPSSVYISFGTITLALRDE--IQCIATGLQSKQKFWLWLRADKGDIFAGSEAKRYLPGKEEREGM--GLVVP-

6.4. Alignment: scUGT a-c

scUGTa	1	MTFTGSGDGQSGSMRAHFVLPMLAQGHTIPMTDMARLLAEHGAQVSFITTPVNASRLAGFAADVEAAGLAVRLVELHFPSAEFGLPDGCENLDMIQSTD
scUGTc	1	MTFTGSGDGQSGSMRAHFVLPMLAQGHTIPMTDMARLLAEHGAQVSFITTPVNASRLAGFAADVEAAGLAVRLVELHFPSAEFGLPDGCENLDMIQSTD
scUGTa	101	LLPNFMDATAALQEPKAYLREQQRSPPTCIIISDLIHWWTGDIARELGIPRLTFSGFCGFSSLI RYITYHNNVFEHVKDENELITITGFPPTPELTKAKC
scUGTc	101	LLPNFMDATAALQEPKAYLREQQRSPPTCIIISDLIHWWTGDIARELGIPRLTFSGFCGFSSLI RYITYHNNVFEHVKDENELITITGFPPTPELTKAKC
scUGTa	201	PGSHSIPGMEQIRKKFLEEEELRSDGEVINSFQLELETLYIESFEQTTKKKVAIGPMCLCHRDNNTMVARGNKASMDQAQCLQWLDSRKPGSVIFVSPGSL
scUGTc	201	PGSHSIPGMEQIRKKFLEEEELRSDGEVINSFQLELETLYIESFEQTTKKKVAIGPMCLCHRDNNTMVARGNKASMDQAQCLQWLDSRKPGSVIFVSPGSL
scUGTa	301	ACTTPQQLVELGQGLEASKKPFVWVIKAGAKLPEVEEWLADGFEERVKDRGLIIRGWAPQVMILWHQAVGGFVTHCGWNSTIEGICAGVPMITWPHFAEQ
scUGTc	301	ACTTPQQLVELGQGLEASKKPFVWVIKAGAKLPEVEEWLADGFEERVKDRGLIIRGWAPQVMILWHQAVGGFVTHCGWNSTIEGICAGVPMITWPHFAEQ
scUGTa	401	FLNEKLVVDVCLKGVEVGVQGVTVQWGSEQQEVMVTRDAVETA VNTLMGEGEATEELRMRAEECAIKAKRAFDEEGSSYNNVRLLIQEMRNKTKACC
scUGTc	401	FLNEKLVVDVCLKGVEVGVQGVTVQWGSEQQEVMVTRDAVETA VNTLMGEGEATEELRMRAEECAIKAKRAFDEEGSSYNNVRLLIQEMRNKTKACC

scUGTa	1	MTFTGSGDGQSGSMRAHFVLPMLAQGHTIPMTDMARLLAEHGAQVSFITTPVNASRLAGFAADVEAAGLAVRLVELHFPSAEFGLPDGCENLDMIQSTD
scUGTb	1	MTFTGSGDGQSGSMRAHFVLPMLAQGHTIPMTDMARLLAEHGAQVSFITTPVNASRLAGFAADVAAGLAVQLVELHFPSAEFGLPDGCENLDMIQSTD
scUGTc	1	MTFTGSGDGQSGSMRAHFVLPMLAQGHTIPMTDMARLLAEHGAQVSFITTPVNASRLAGFAADVEAAGLAVRLVELHFPSAEFGLPDGCENLDMIQSTD
scUGTa	101	LLPNFMDATAALQEPKAYLREQQRSPPTCIIISDLIHWWTGDIARELGIPRLTFSGFCGFSSLI RYITYHNNVFEHVKDENELITITGFPPTPELTKAKC
scUGTb	101	LLPNFMDATAALQEPKAYLREQQRSPPTCIIISDLIHWWTGDIARELGIPRLTFSGFCGFSSLI RYITYHNNVFEHVKDENELITITGFPPTPELTKAKC
scUGTc	101	LLPNFMDATAALQEPKAYLREQQRSPPTCIIISDLIHWWTGDIARELGIPRLTFSGFCGFSSLI RYITYHNNVFEHVKDENELITITGFPPTPELTKAKC
scUGTa	201	PGSHSIPGMEQIRKKFLEEEELRSDGEVINSFQLELETLYIESFEQTTKKKVAIGPMCLCHRDNNTMVARGNKASMDQAQCLQWLDSRKPGSVIFVSPGSL
scUGTb	201	PGSHSIPGMEQIRKKFLEEEELRSDGEVINSFQLELETLYIESFEQTTKKKVAIGPMCLCHRDNNTMVARGNKASMDQAQCLQWLDSRKPGSVIFVSPGSL
scUGTc	201	PGSHSIPGMEQIRKKFLEEEELRSDGEVINSFQLELETLYIESFEQTTKKKVAIGPMCLCHRDNNTMVARGNKASMDQAQCLQWLDSRKPGSVIFVSPGSL
scUGTa	301	ACTTPQQLVELGQGLEASKKPFVWVIKAGAKLPEVEEWLADGFEERVKDRGLIIRGWAPQVMILWHQAVGGFVTHCGWNSTIEGICAGVPMITWPHFAEQ
scUGTb	301	ACTTPQQLVELGQGLEASKKPFVWVIKAGAKLPEVEEWLADGFEERVKDRGLIIRGWAPQVMILWHQAVGGFVTHCGWNSTIEGICAGVPMITWPHFAEQ
scUGTc	301	ACTTPQQLVELGQGLEASKKPFVWVIKAGAKLPEVEEWLADGFEERVKDRGLIIRGWAPQVMILWHQAVGGFVTHCGWNSTIEGICAGVPMITWPHFAEQ
scUGTa	401	FLNEKLVVDVCLKGVEVGVQGVTVQWGSEQQEVMVTRDAVETA VNTLMGEGEATEELRMRAEECAIKAKRAFDEEGSSYNNVRLLIQEMRNKTKACC
scUGTb	401	FLNEKLVVDVCLKGVEVGVQGVTVQWGSEQQEVMVTRDAVETA VNTLMGEGEATEELRMRAEECAIKAKRAFDEEGSSYNNVRLLIQEMRNKTKACC
scUGTc	401	FLNEKLVVDVCLKGVEVGVQGVTVQWGSEQQEVMVTRDAVETA VNTLMGEGEATEELRMRAEECAIKAKRAFDEEGSSYNNVRLLIQEMRNKTKACC

6.5. Tabelle der verwendeten Vertebraten-UGTs

Name	Substrat	Organismus	Swiss-Prot accession number
UGT1A1	Bilirubin	Mensch	P22309
UGT1A3	Bilirubin	Mensch	P35503
UGT1A4	Bilirubin	Mensch	P22310
UGT1A5	Bilirubin	Mensch	P35504
UGT1A6	Bilirubin	Ratte	P08430
UGT2A1	Xenobiotika	Ratte	P36510
UGT2A2	Xenobiotika	Kaninchen	P36514
UGT2B1	Xenobiotika	Ratte	P09875
UGT2B2	endogene Steroide (Cetiocholanolone und Androsterone)	Ratte	P08541
UGT2B3	Testosteron, Dihydrotestosteron und Beta-Estradiol	Ratte	P08542
UGT2B4	polyhydroxylierte Östrogene und Xenobiotika	Mensch	P06133
UGT2B5	Xenobiotika	Maus	P17717
UGT2B6	Testosteron, Dihydrotestosteron.	Ratte	P19488
UGT2B7	3,4-Catechol Östrogene	Mensch	P16662
UGT2B10	Xenobiotika	Mensch	P36537

IX. Literaturverzeichnis

- Albert C, Vallee M, Beaudry G, Belanger A, Hum DW** (1999) The monkey and human uridine diphosphate-glucuronosyltransferase UGT1A9, expressed in steroid target tissues, are estrogen-conjugating enzymes. *Endocrinology* **140**: 3292-3302
- Alting-Mees MA, Sorge JA, Short JM** (1992) pBluescriptII: multifunctional cloning and mapping vectors. *Methods Enzymol* **216**: 483-495
- Antonio L, Xu J, Little JM, Burchell B, Magdalou J, Radomska-Pandya A** (2003) Glucuronidation of catechols by human hepatic, gastric, and intestinal microsomal UDP-glucuronosyltransferases (UGT) and recombinant UGT1A6, UGT1A9, and UGT2B7. *Arch Biochem Biophys* **411**: 251-261
- Auyeung DJ, Kessler FK, Ritter JK** (2003) Differential regulation of alternate UDP-glucuronosyltransferase 1A6 gene promoters by hepatic nuclear factor-1. *Toxicol Appl Pharmacol* **191**: 156-166
- Baker ME** (1998) Flavonoids as hormones. A perspective from an analysis of molecular fossils. *Adv Exp Med Biol* **439**: 249-267
- Barbier O, Belanger A, Hum DW** (1999) Cloning and characterization of a simian UDP-glucuronosyltransferase enzyme UGT2B20, a novel C19 steroid-conjugating protein. *Biochem J* **337** (Pt 3): 567-574
- Barbier O, Lapointe H, El Alfy M, Hum DW, Belanger A** (2000) Cellular localization of uridine diphosphoglucuronosyltransferase 2B enzymes in the human prostate by in situ hybridization and immunohistochemistry. *J Clin Endocrinol Metab* **85**: 4819-4826
- Bartholomew DM, Van Dyk DE, Lau SM, O'Keefe DP, Rea PA, Viitanen PV** (2002) Alternate energy-dependent pathways for the vacuolar uptake of glucose and glutathione conjugates. *Plant Physiol* **130**: 1562-1572
- Beaulieu M, Levesque E, Hum DW, Belanger A** (1998) Isolation and characterization of a human orphan UDP-glucuronosyltransferase, UGT2B11. *Biochem Biophys Res Commun* **248**: 44-50
- Begum AA, Leibovitch S, Migner P, Zhang F** (2001) Specific flavonoids induced nod gene expression and pre-activated nod genes of *Rhizobium leguminosarum* increased pea (*Pisum sativum* L.) and lentil (*Lens culinaris* L.) nodulation in controlled growth chamber environments. *J Exp Bot* **52**: 1537-1543
- Berberich T, Uebeler M, Feierabend J** (2000) cDNA cloning of cytoplasmic ribosomal protein S7 of winter rye (*Secale cereale*) and its expression in low-temperature-treated leaves. *Biochim Biophys Acta* **1492**: 276-279
- Bergman M, Perelman A, Dubinsky Z, Grossman S** (2003) Scavenging of reactive oxygen species by a novel glucurinated flavonoid antioxidant isolated and purified from spinach. *Phytochemistry* **62**: 753-762

- Bestel-Corre G, Dumas-Gaudot E, Poinsoot V, Dieu M, Dierick JF, van TD, Remacle J, Gianinazzi-Pearson V, Gianinazzi S** (2002) Proteome analysis and identification of symbiosis-related proteins from *Medicago truncatula* Gaertn. by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. *Electrophoresis* **23**: 122-137
- Birnboim HC** (1983) A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol* **100**: 243-255
- Bock KW** (2003) Vertebrate UDP-glucuronosyltransferases: functional and evolutionary aspects. *Biochem Pharmacol* **66**: 691-696
- Boersma MG, van der Woude H, Bogaards J, Boeren S, Vervoort J, Cnubben NH, van Iersel ML, van Bladeren PJ, Rietjens IM** (2002) Regioselectivity of phase II metabolism of luteolin and quercetin by UDP-glucuronosyl transferases. *Chem Res Toxicol* **15**: 662-670
- Bosma PJ, Chowdhury JR, Bakker C, Gantla S, de Boer A, Oostra BA, Lindhout D, Tytgat GN, Jansen PL, Oude Elferink RP** (1995) The genetic basis of the reduced expression of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 in Gilbert's syndrome. *N Engl J Med* **333**: 1171-1175
- Bourne Y, Henrissat B** (2001) Glycoside hydrolases and glycosyltransferases: families and functional modules. *Curr Opin Struct Biol* **11**: 593-600
- Bowles D** (2002) A multigene family of glycosyltransferases in a model plant, *Arabidopsis thaliana*. *Biochem Soc Trans* **30**: 301-306
- Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254
- Brazier M, Cole DJ, Edwards R** (2002) O-Glucosyltransferase activities toward phenolic natural products and xenobiotics in wheat and herbicide-resistant and herbicide-susceptible black-grass (*Alopecurus myosuroides*). *Phytochemistry* **59**: 149-156
- Burbulis IE, Winkel-Shirley B** (1999) Interactions among enzymes of the *Arabidopsis* flavonoid biosynthetic pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 12929-12934
- Burchard P, Bilger W, Weissenböck G** (2000) Contribution of hydroxycinnamates and flavonoids to epidermal shielding of UV-A and UV-B radiation in developing rye primary leaves as assessed by UV-induced chlorophyll fluorescence measurements. *Plant, Cell and Environment* **23**: 1373-1380
- Burchell B, Nebert DW, Nelson DR, Bock KW, Iyanagi T, Jansen PL, Lancet D, Mulder GJ, Chowdhury JR, Siest G** (1991) The UDP glucuronosyltransferase gene superfamily: suggested nomenclature based on evolutionary divergence. *DNA Cell Biol* **10**: 487-494
- Busch E, Strack D, Weissenböck G** (1986) Cyanidin 3-gentiobioside from primary leaves of rye (*Secale cereale* L.). *Zeitschrift für Naturforschung* **41c**: 485-486

- Campbell JA, Davies GJ, Bulone V, Henrissat B** (1997) A classification of nucleotide-diphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J* **326**: 929-939
- Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC** (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**: 802-805
- Charnock SJ, Henrissat B, Davies GJ** (2001) Three-dimensional structures of UDP-sugar glycosyltransferases illuminate the biosynthesis of plant polysaccharides. *Plant Physiol* **125**: 527-531
- Chong J, Baltz R, Schmitt C, Beffa R, Fritig B, Saindrenan P** (2002) Downregulation of a pathogen-responsive tobacco UDP-Glc:phenylpropanoid glycosyltransferase reduces scopoletin glucoside accumulation, enhances oxidative stress, and weakens virus resistance. *Plant Cell* **14**: 1093-1107
- Clegg RM** (1995) Fluorescence resonance energy transfer. *Curr Opin Biotechnol* **6**: 103-110
- Clough SJ, Bent AF** (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **16**: 735-743
- Coleman JOD, Blake-Klaff MMA, Davies TGE** (1997) Detoxification of Xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation. *Trends Plant Sci* **2**: 144-151
- Debeaujon I, Peeters AJ, Leon-Kloosterziel KM, Koornneef M** (2001) The TRANSPARENT TESTA12 gene of *Arabidopsis* encodes a multidrug secondary transporter-like protein required for flavonoid sequestration in vacuoles of the seed coat endothelium. *Plant Cell* **13**: 853-871
- Desfeux C, Clough SJ, Bent AF** (2000) Female reproductive tissues are the primary target of *Agrobacterium*-mediated transformation by the *Arabidopsis* floral-dip method. *Plant Physiol* **123**: 895-904
- Doyle D** (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* **12**: 13-15
- Edwards K, Johnstone C, Thompson C** (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res* **19**: 1349
- Ford CM, Boss PK, Hoj PB** (1998) Cloning and characterization of *Vitis vinifera* UDP-glucose:flavonoid 3-O-glucosyltransferase, a homologue of the enzyme encoded by the maize Bronze-1 locus that may primarily serve to glucosylate anthocyanidins in vivo. *J Biol Chem* **273**: 9224-9233
- Fraissinet-Tachet L, Baltz R, Chong J, Kauffmann S, Fritig B, Saindrenan P** (1998) Two tobacco genes induced by infection, elicitor and salicylic acid encode glycosyltransferases acting on phenylpropanoids and benzoic acid derivatives, including salicylic acid. *FEBS Lett* **437**: 319-323

- Frohman MA, Dush MK, Martin GR** (1988) Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 8998-9002
- Fukuchi-Mizutani M, Okuhara H, Fukui Y, Nakao M, Katsumoto Y, Yonekura-Sakakibara K, Kusumi T, Hase T, Tanaka Y** (2003) Biochemical and molecular characterization of a novel UDP-glucose:anthocyanin 3'-O-glucosyltransferase, a key enzyme for blue anthocyanin biosynthesis, from gentian. *Plant Physiol* **132**: 1652-1663
- Gastinel LN, Cambillau C, Bourne Y** (1999) Crystal structures of the bovine beta4galactosyltransferase catalytic domain and its complex with uridine diphosphogalactose. *Embo J* **18**: 3546-3557
- Ghosh SS, Sappal BS, Kalpana GV, Lee SW, Chowdhury JR, Chowdhury NR** (2001) Homodimerization of human bilirubin-uridine-diphosphoglucuronate glucuronosyltransferase-1 (UGT1A1) and its functional implications. *J Biol Chem* **276**: 42108-42115
- Glaser L** (1958) The synthesis of cellulose in cell-free extracts of *Acetobacter xylinum*. *J Biol Chem* **232**: 627-636
- Gong QH, Cho JW, Huang T, Potter C, Gholami N, Basu NK, Kubota S, Carvalho S, Pennington MW, Owens IS, Popescu NC** (2001) Thirteen UDPglucuronosyltransferase genes are encoded at the human UGT1 gene complex locus. *Pharmacogenetics* **11**: 357-368
- Gong Z, Yamazaki M, Sugiyama M, Tanaka Y, Saito K** (1997) Cloning and molecular analysis of structural genes involved in anthocyanin biosynthesis and expressed in a forma-specific manner in *Perilla frutescens*. *Plant Mol Biol* **35**: 915-927
- Grancharov K, Naydenova Z, Lozeva S, Golovinsky E** (2001) Natural and synthetic inhibitors of UDP-glucuronosyltransferase. *Pharmacol Ther* **89**: 171-186
- Grayer RJ, Kokubun T** (2001) Plant-fungal interactions: the search for phytoalexins and other antifungal compounds from higher plants. *Phytochemistry* **56**: 253-263
- Gregory PA, Mackenzie PI** (2002) The homeodomain Pbx2-Prep1 complex modulates hepatocyte nuclear factor 1alpha-mediated activation of the UDP-glucuronosyltransferase 2B17 gene. *Mol Pharmacol* **62**: 154-161
- Guillemette C, Levesque E, Beaulieu M, Turgeon D, Hum DW, Belanger A** (1997) Differential regulation of two uridine diphospho-glucuronosyltransferases, UGT2B15 and UGT2B17, in human prostate LNCaP cells. *Endocrinology* **138**: 2998-3005
- Gustav F, Wilson IBH** (2001) Glycosyltransferases in *Drosophila melanogaster*. *Dros. Inf. Serv.* **84**: 122-129
- Ha S, Walker D, Shi Y, Walker S** (2000) The 1.9 A crystal structure of *Escherichia coli* MurG, a membrane-associated glycosyltransferase involved in peptidoglycan biosynthesis. *Protein Sci* **9**: 1045-1052

- Haab CI, Keller F** (2002) Purification and characterization of the raffinose oligosaccharide chain elongation enzyme, galactan : galactan galactosyltransferase (GGT), from *Ajuga reptans* leaves. *Physiol Plant* **114**: 361-371
- Hajduch M, Rakwal R, Agrawal GK, Yonekura M, Pretova A** (2001) High-resolution two-dimensional electrophoresis separation of proteins from metal-stressed rice (*Oryza sativa* L.) leaves: drastic reductions/fragmentation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and induction of stress-related proteins. *Electrophoresis* **22**: 2824-2831
- Haraguchi H, Tanimoto K, Tamura Y, Mizutani K, Kinoshita T** (1998) Mode of antibacterial action of retrochalcones from *Glycyrrhiza inflata*. *Phytochemistry* **48**: 125-129
- Harborne JB, Williams CA** (1988) Flavone and flavonol glycosides. *The Flavonoids*. Edited by Harborne, Chapman und Hall, Kapittel 8
- Harborne JB, Williams CA** (2000) Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* **55**: 481-504
- He L, Bradrick TD, Karpova TS, Wu X, Fox MH, Fischer R, McNally JG, Knutson JR, Grammer AC, Lipsky PE** (2003) Flow cytometric measurement of fluorescence (Forster) resonance energy transfer from cyan fluorescent protein to yellow fluorescent protein using single-laser excitation at 458 nm. *Cytometry* **53A**: 39-54
- Heim R, Tsien RY** (1996) Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. *Curr Biol* **6**: 178-182
- Henrissat B, Coutinho PM, Davies GJ** (2001) A census of carbohydrate-active enzymes in the genome of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* **47**: 55-72
- Hirota M, Kuroda R, Suzuki H, Yoshikawa T** (2000) Cloning and expression of UDP-glucose: flavonoid 7-O-glucosyltransferase from hairy root cultures of *Scutellaria baicalensis*. *Planta* **210**: 1006-1013
- Hock B, Elstner EF** *Schadwirkungen auf Pflanzen. Lehrbuch der Pflanzentoxicologie*, 3. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, 1999
- Hollman PC, Bijlsman MN, van Gameren Y, Cnossen EP, de Vries JH, Katan MB** (1999-a) The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man. *Free Radic Res* **31**: 569-573
- Hollman PC, Feskens EJ, Katan MB** (1999-b) Tea flavonols in cardiovascular disease and cancer epidemiology. *Proc Soc Exp Biol Med* **220**: 198-202
- Hollman PC, Katan MB** (1999-c) Health effects and bioavailability of dietary flavonols. *Free Radic Res* **31 Suppl**: S75-80
- Hollman PC, Katan MB** (1999-d) Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. *Food Chem Toxicol* **37**: 937-942

- Holton TA, Cornish EC** (1995) Genetics and Biochemistry of Anthocyanin Biosynthesis. *Plant Cell* **7**: 1071-1083
- Hrazdina G, Wagner GJ** (1985) Metabolic pathways as enzyme complexes: evidence for the synthesis of phenylpropanoids and flavonoids on membrane associated enzyme complexes. *Arch Biochem Biophys* **237**: 88-100
- Hrazdina G, Zobel AM, Hoch HC** (1987) Biochemical, immunological, and immunocytochemical evidence for the association of chalcone synthase with endoplasmic reticulum membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 8966-8970
- Hu Y, Chen L, Ha S, Gross B, Falcone B, Walker D, Mokhtarzadeh M, Walker S** (2003) Crystal structure of the MurG:UDP-GlcNAc complex reveals common structural principles of a superfamily of glycosyltransferases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 845-849
- Huang YH, Galijatovic A, Nguyen N, Geske D, Beaton D, Green J, Green M, Peters WH, Tukey RH** (2002) Identification and functional characterization of UDP-glucuronosyltransferases UGT1A8*1, UGT1A8*2 and UGT1A8*3. *Pharmacogenetics* **12**: 287-297
- Humphreys JM, Chapple C** (2000) Molecular 'pharming' with plant P450s. *Trends Plant Sci* **5**: 271-272
- Hwang E, Kaneko M, Ohnishi Y, Horinouchi S** (2003) Production of plant-specific flavanones by *Escherichia coli* containing an artificial gene cluster. *Applied and environmental microbiology* **69**: 2699-2706
- Ibrahim RK** (1990) Immunocytochemical localization of plant secondary metabolites and the enzymes involved in their biosynthesis. *Phytochem Anal* **1**: 49-59
- Ibrahim RK, De Luca V, Khouri H, Latchinian L** (1987) Enzymology and compartmentation of polymethylated flavonol glucosides in *C. americanum*. *Phytochemistry* **26**: 1237-1245
- Iwai H, Masaoka N, Ishii T, Satoh S** (2002) A pectin glucuronyltransferase gene is essential for intercellular attachment in the plant meristem. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 16319-16324
- Jackson RG, Kowalczyk M, Li Y, Higgins G, Ross J, Sandberg G, Bowles DJ** (2002) Over-expression of an Arabidopsis gene encoding a glucosyltransferase of indole-3-acetic acid: phenotypic characterisation of transgenic lines. *Plant J* **32**: 573-583
- Jackson RG, Lim EK, Li Y, Kowalczyk M, Sandberg G, Hoggett J, Ashford DA, Bowles DJ** (2001) Identification and biochemical characterization of an Arabidopsis indole-3-acetic acid glucosyltransferase. *J Biol Chem* **276**: 4350-4356
- Jansen PL** (1999) Diagnosis and management of Crigler-Najjar syndrome. *Eur J Pediatr* **158 Suppl 2**: S89-94

- Jarvis P, Dormann P, Peto CA, Lutes J, Benning C, Chory J** (2000) Galactolipid deficiency and abnormal chloroplast development in the Arabidopsis MGD synthase 1 mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 8175-8179
- Jedlitschky G, Cassidy AJ, Sales M, Pratt N, Burchell B** (1999) Cloning and characterization of a novel human olfactory UDP-glucuronosyltransferase. *Biochem J* **340**: 837-843
- Jones P, Vogt T** (2001) Glycosyltransferases in secondary plant metabolism: tranquilizers and stimulant controllers. *Planta* **213**: 164-174
- Jones PR, Moller BL, Hoj PB** (1999) The UDP-glucose:p-hydroxymandelonitrile-O-glucosyltransferase that catalyzes the last step in synthesis of the cyanogenic glucoside dhurrin in *Sorghum bicolor*. Isolation, cloning, heterologous expression, and substrate specificity. *J Biol Chem* **274**: 35483-35491
- Jorasch P, Warnecke DC, Lindner B, Zähringer U, Heinz E** (2000) Novel processive and nonprocessive glycosyltransferases from *Staphylococcus aureus* and *Arabidopsis thaliana* synthesize glycoacylglycerolipids, glycoacylphospholipids, glycosphingolipids and glycosylsterols. *Eur J Biochem* **267**: 3770-3783
- Kahn RA, Bak S, Svendsen I, Halkier BA, Moller BL** (1997) Isolation and reconstitution of cytochrome P450ox and in vitro reconstitution of the entire biosynthetic pathway of the cyanogenic glucoside dhurrin from sorghum. *Plant Physiol* **115**: 1661-1670
- Karpova TS, Baumann CT, He L, Wu X, Grammer A, Lipsky P, Hager GL, McNally JG** (2003) Fluorescence resonance energy transfer from cyan to yellow fluorescent protein detected by acceptor photobleaching using confocal microscopy and a single laser. *J Microsc* **209**: 56-70
- Keegstra K, Raikhel N** (2001) Plant glycosyltransferases. *Curr Opin Plant Biol* **4**: 219-224
- Kenworthy AK** (2001) Imaging protein-protein interactions using fluorescence resonance energy transfer microscopy. *Methods* **24**: 289-296
- Kim BT, Tsuchida K, Lincecum J, Kitagawa H, Bernfield M, Sugahara K** (2003) Identification and characterization of three *Drosophila melanogaster* glucuronosyltransferases responsible for the synthesis of the conserved glycosaminoglycan-protein linkage region of proteoglycans. Two novel homologs exhibit broad specificity toward oligosaccharides from proteoglycans, glycoproteins, and glycosphingolipids. *J Biol Chem* **278**: 9116-9124
- Kim HJ, Woo ER, Shin CG, Park H** (1998) A new flavonol glycoside gallate ester from *Acer okamotoanum* and its inhibitory activity against human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) integrase. *J Nat Prod* **61**: 145-148
- King CD, Rios GR, Green MD, Tephly TR** (2000) UDP-glucuronosyltransferases. *Curr Drug Metab* **1**: 143-161

- Kita M, Hirata Y, Moriguchi T, Endo-Inagaki T, Matsumoto R, Hasegawa S, Suhayda CG, Omura M** (2000) Molecular cloning and characterization of a novel gene encoding limonoid UDP-glucosyltransferase in Citrus. *FEBS Lett* **469**: 173-178
- Klein M, Martinoia E, Hoffmann-Thoma G, Weissenböck G** (2000) A membrane-potential dependent ABC-like transporter mediates the vacuolar uptake of rye flavone glucuronides: regulation of glucuronide uptake by glutathione and its conjugates. *Plant J* **21**: 289-304
- Klein M, Martinoia E, Weissenböck G** (1998) Directly energized uptake of beta-estradiol 17-(beta-D-glucuronide) in plant vacuoles is strongly stimulated by glutathione conjugates. *J Biol Chem* **273**: 262-270
- Klein M, Weissenböck G, Dufaud A, Gaillard C, Kreuz K, Martinoia E** (1996) Different energization mechanisms drive the vacuolar uptake of a flavonoid glucoside and a herbicide glucoside. *J Biol Chem* **271**: 29666-29671
- Koganov MM, Dueva OV, Tsorin BL** (1999) Activities of plant-derived phenols in a fibroblast cell culture model. *J Nat Prod* **62**: 481-483
- Kondoh N, Wakatsuki T, Ryo A, Hada A, Aihara T, Horiuchi S, Goseki N, Matsubara O, Takenaka K, Shichita M, Tanaka K, Shuda M, Yamamoto M** (1999) Identification and characterization of genes associated with human hepatocellular carcinogenesis. *Cancer Res* **59**: 4990-4996
- Kurosawa Y, Takahara H, Shiraiwa M** (2002) UDP-glucuronic acid:soyasapogenol glucuronosyltransferase involved in saponin biosynthesis in germinating soybean seeds. *Planta* **215**: 620-629
- Laemmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Laibach F** (1907) Chromosom number of several plants. *Bot. Centbl. Beihefte I* **22**: 191-210
- Landry LG, Chapple CC, Last RL** (1995) Arabidopsis mutants lacking phenolic sunscreens exhibit enhanced ultraviolet-B injury and oxidative damage. *Plant Physiol* **109**: 1159-1166
- Latchinian-Sadek L, Ibrahim RK** (1991) Flavonol ring B-specific O-glucosyltransferases: purification, production of polyclonal antibodies, and immunolocalization. *Arch Biochem Biophys* **289**: 230-236
- Lee HI, Raskin I** (1999) Purification, cloning, and expression of a pathogen inducible UDP-glucose:Salicylic acid glucosyltransferase from tobacco. *J Biol Chem* **274**: 36637-36642
- Levesque E, Turgeon D, Carrier JS, Montminy V, Beaulieu M, Belanger A** (2001) Isolation and characterization of the UGT2B28 cDNA encoding a novel human steroid conjugating UDP-glucuronosyltransferase. *Biochemistry* **40**: 3869-3881

- Li J, Ou-Lee TM, Raba R, Amundson RG, Last RL** (1993) Arabidopsis flavonoid mutants are hypersensitive to UV-B irradiation. *Plant Cell* **5**: 171-179
- Li Y, Baldauf S, Lim EK, Bowles DJ** (2001) Phylogenetic analysis of the UDP-glycosyltransferase multigene family of Arabidopsis thaliana. *J Biol Chem* **276**: 4338-4343
- Lim EK, Doucet CJ, Li Y, Elias L, Worrall D, Spencer SP, Ross J, Bowles DJ** (2002) The activity of Arabidopsis glycosyltransferases toward salicylic acid, 4-hydroxybenzoic acid, and other benzoates. *J Biol Chem* **277**: 586-592
- Lim EK, Higgins GS, Li Y, Bowles DJ** (2003) Regioselectivity of glucosylation of caffeic acid by a UDP-glucose:glucosyltransferase is maintained in planta. *Biochem J* **373**: 987-992
- Lim EK, Li Y, Parr A, Jackson R, Ashford DA, Bowles DJ** (2001) Identification of glucosyltransferase genes involved in sinapate metabolism and lignin synthesis in Arabidopsis. *J Biol Chem* **276**: 4344-4349
- Loe DW, Almquist KC, Cole SP, Deeley RG** (1996) ATP-dependent 17 beta-estradiol 17-(beta-D-glucuronide) transport by multidrug resistance protein (MRP). Inhibition by cholestatic steroids. *J Biol Chem* **271**: 9683-9689
- Lu Y, Foo LY** (2000) Flavonoid and phenolic glycosides from *Salvia officinalis*. *Phytochemistry* **55**: 263-267
- Mackenzie PI, Owens IS, Burchell B, Bock KW, Bairoch A, Belanger A, Fournel-Gigleux S, Green M, Hum DW, Iyanagi T, Lancet D, Louisot P, Magdalou J, Chowdhury JR, Ritter JK, Schachter H, Tephly TR, Tipton KF, Nebert DW** (1997) The UDP glycosyltransferase gene superfamily: recommended nomenclature update based on evolutionary divergence. *Pharmacogenetics* **7**: 255-269
- Majewska-Sawka A, Nothnagel EA** (2000) The multiple roles of arabinogalactan proteins in plant development. *Plant Physiol* **122**: 3-10
- Martin RC, Mok MC, Mok DW** (1999-a)) A gene encoding the cytokinin enzyme zeatin O-xylosyltransferase of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol* **120**: 553-558
- Martin RC, Mok MC, Mok DW** (1999-b)) Isolation of a cytokinin gene, ZOG1, encoding zeatin O-glucosyltransferase from *Phaseolus lunatus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 284-289
- Martinoia E, Massonneau A, Frangne N** (2000) Transport processes of solutes across the vacuolar membrane of higher plants. *Plant Cell Physiol* **41**: 1175-1186
- Marty F** (1997) *The Biogenesis of Vacuoles: Insights from Microscopy*. *Advances in Botanical Research* 25, Academic Press, London: 1-42

- Mato M, Ozeki Y, Itoh Y, Higeta D, Yoshitama K, Teramoto S, Aida R, Ishikura N, Shibata M** (1998) Isolation and characterization of a cDNA clone of UDP-galactose: flavonoid 3-O-galactosyltransferase (UF3GaT) expressed in *Vigna mungo* seedlings. *Plant Cell Physiol* **39**: 1145-1155
- Meech R, Mackenzie PI** (1997) UDP-glucuronosyltransferase, the role of the amino terminus in dimerization. *J Biol Chem* **272**: 26913-26917
- Messner B, Thulke O, Schaffner AR** (2003) Arabidopsis glucosyltransferases with activities toward both endogenous and xenobiotic substrates. *Planta* **217**: 138-146
- Miller KD, Guyon V, Evans JN, Shuttleworth WA, Taylor LP** (1999) Purification, cloning, and heterologous expression of a catalytically efficient flavonol 3-O-galactosyltransferase expressed in the male gametophyte of *Petunia hybrida*. *J Biol Chem* **274**: 34011-34019
- Mo Y, Nagel C, Taylor LP** (1992) Biochemical complementation of chalcone synthase mutants defines a role for flavonols in functional pollen. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 7213-7217
- Moehs CP, Allen PV, Friedman M, Belknap WR** (1997) Cloning and expression of solanidine UDP-glucose glucosyltransferase from potato. *Plant J* **11**: 227-236
- Morera S, Imberty A, Aschke-Sonnenborn U, Ruger W, Freemont PS** (1999) T4 phage beta-glucosyltransferase: substrate binding and proposed catalytic mechanism. *J Mol Biol* **292**: 717-730
- Mulichak AM, Losey HC, Walsh CT, Garavito RM** (2001) Structure of the UDP-glucosyltransferase GtfB that modifies the heptapeptide aglycone in the biosynthesis of vancomycin group antibiotics. *Structure (Camb)* **9**: 547-557
- Myers AM, Morell MK, James MG, Ball SG** (2000) Recent progress toward understanding biosynthesis of the amylopectin crystal. *Plant Physiol* **122**: 989-997
- Nagano E, Yamada H, Oguri K** (2000) Characteristic glucuronidation pattern of physiologic concentration of morphine in rat brain. *Life Sci* **67**: 2453-2464
- Nagashima S, Hirotani M, Yoshikawa T** (2000) Purification and characterization of UDP-glucuronate: baicalein 7-O-glucuronosyltransferase from *Scutellaria baicalensis* Georgi. cell suspension cultures. *Phytochemistry* **53**: 533-538
- Nakajima J, Tanaka Y, Yamazaki M, Saito K** (2001) Reaction mechanism from leucoanthocyanidin to anthocyanidin 3-glucoside, a key reaction for coloring in anthocyanin biosynthesis. *J Biol Chem* **276**: 25797-25803
- Nawloka P, Kalinowska M, Paczkowski C, Wojciechowski ZA** (2003) Evidence for essential histidine and dicarboxylic amino-acid residues in the active site of UDP-glucose : solasodine glucosyltransferase from eggplant leaves. *Acta Biochim Pol* **50**: 567-572

- Nesi N, Debeaujon I, Jond C, Pelletier G, Caboche M, Lepiniec L** (2000) The TT8 gene encodes a basic helix-loop-helix domain protein required for expression of DFR and BAN genes in *Arabidopsis* siliques. *Plant Cell* **12**: 1863-1878
- Nesi N, Jond C, Debeaujon I, Caboche M, Lepiniec L** (2001) The *Arabidopsis* TT2 gene encodes an R2R3 MYB domain protein that acts as a key determinant for proanthocyanidin accumulation in developing seed. *Plant Cell* **13**: 2099-2114
- Novak K, Chovanec P, Skrdleta V, Kropacova M, Lisa L, Nemcova M** (2002) Effect of exogenous flavonoids on nodulation of pea (*Pisum sativum* L.). *J Exp Bot* **53**: 1735-1745
- O'Donnell PJ, Truesdale MR, Bowles D** (1998) A novel tomato gene that rapidly respond to wound- and pathogen-related signals. *The Plant Journal* **14**: 137-142
- Okamura N, Haraguchi H, Hashimoto K, Yagi A** (1994) Flavonoids in *Rosmarinus officinalis* leaves. *Phytochemistry* **37**: 1463-1466
- Ouerghi Z, Remy R, Ouelhazi L, Ayadi A, Brulfert J** (2000) Two-dimensional electrophoresis of soluble leaf proteins, isolated from two wheat species (*Triticum durum* and *Triticum aestivum*) differing in sensitivity towards NaCl. *Electrophoresis* **21**: 2487-2491
- Ouzzine M, Gulberti S, Levoine N, Netter P, Magdalou J, Fournel-Gigleux S** (2002) The donor substrate specificity of the human beta 1,3-glucuronosyltransferase I toward UDP-glucuronic acid is determined by two crucial histidine and arginine residues. *J Biol Chem* **277**: 25439-25445
- Ouzzine M, Gulberti S, Netter P, Magdalou J, Fournel-Gigleux S** (2000) Structure/function of the human Galbeta1,3-glucuronosyltransferase. Dimerization and functional activity are mediated by two crucial cysteine residues. *J Biol Chem* **275**: 28254-28260
- Ouzzine M, Magdalou J, Burchell B, Fournel-Gigleux S** (1999-a) Expression of a functionally active human hepatic UDP-glucuronosyltransferase (UGT1A6) lacking the N-terminal signal sequence in the endoplasmic reticulum. *FEBS Lett* **454**: 187-191
- Ouzzine M, Magdalou J, Burchell B, Fournel-Gigleux S** (1999-b) An internal signal sequence mediates the targeting and retention of the human UDP-glucuronosyltransferase 1A6 to the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **274**: 31401-31409
- Paquette S, Moller BL, Bak S** (2003) On the origin of family 1 plant glycosyltransferases. *Phytochemistry* **62**: 399-413
- Parquet M, Pessah M, Sacquet E, Salvat C, Raizman A, Infante R** (1985) Glucuronidation of bile acids in human liver, intestine and kidney. An in vitro study on hyodeoxycholic acid. *FEBS Lett* **189**: 183-187

- Patel RC, Lange DC, Patel YC** (2002) Photobleaching fluorescence resonance energy transfer reveals ligand-induced oligomer formation of human somatostatin receptor subtypes. *Methods* **27**: 340-348
- Pedersen LC, Darden TA, Negishi M** (2002) Crystal structure of beta 1,3-glucuronyltransferase I in complex with active donor substrate UDP-GlcUA. *J Biol Chem* **277**: 21869-21873
- Perrin R, Wilkerson C, Keegstra K** (2001) Golgi enzymes that synthesize plant cell wall polysaccharides: finding and evaluating candidates in the genomic era. *Plant Mol Biol* **47**: 115-130
- Radzikowski L, Nestic L, Hansen HB, Jacobsen S, Sondergaard I** (2002) Comparison of ethanol-soluble proteins from different rye (*Secale cereale*) varieties by two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* **23**: 4157-4166
- Ralston EJ, English JJ, Dooner HK** (1988) Sequence of three bronze alleles of maize and correlation with the genetic fine structure. *Genetics* **119**: 185-197
- Ridley BL, O'Neill MA, Mohnen D** (2001) Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry* **57**: 929-967
- Riechers DE, Zhang Q, Xu F, Vaughn KC** (2003) Tissue-specific expression and localization of safener-induced glutathione S-transferase proteins in *Triticum tauschii*. *Planta* **217**: 831-840
- Ross J, Li Y, Lim E, Bowles DJ** (2001) Higher plant glycosyltransferases. *Genome Biol* **2**: REVIEWS3004
- Roy R, Dauvois S, Labrie F, Belanger A** (1992) Estrogen-stimulated glucuronidation of dihydrotestosterone in MCF-7 human breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* **41**: 579-582
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T** (1989) *Molecular cloning*. CHS Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sanchez JC, Chiappe D, Converset V, Hoogland C, Binz PA, Paesano S, Appel RD, Wang S, Sennitt M, Nolan A, Cawthorne MA, Hochstrasser DF** (2001) The mouse SWISS-2D PAGE database: a tool for proteomics study of diabetes and obesity. *Proteomics* **1**: 136-163
- Sander mann H** (1994) Higher plant metabolism of xenobiotics: the 'green liver' concept. *Pharmacogenetics* **4**: 225-241
- Sander mann H** (1999) Plant metabolism of organic xenobiotics. Status and prospects of the 'green liver' concept. In: *Plant Biotechnology and In-vitro Biology in the 21st Century*, Dordrecht: Kluwer: 321-328
- Sanford JC, Smith FD, Russell JA** (1993) Optimizing the biolistic process for different biological applications. *Methods Enzymol* **217**: 483-509

- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 5463-5467
- Saslowsky D, Winkel-Shirley B** (2001) Localization of flavonoid enzymes in Arabidopsis roots. *Plant J* **27**: 37-48
- Schmitz R** (2000) UV-Schutz in Primärblättern von Roggen (*Secale cereale* L.) und Gerste (*Hordeum vulgare* L.): Untersuchungen zur Bedeutung der Flavonoidakkumulation und Photoreaktivierung von DNA-Schäden. Dissertation, Universität zu Köln
- Schmitz-Hoerner R, Weissenböck G** (2003) Contribution of phenolic compounds to the UV-B screening capacity of developing barley primary leaves in relation to DNA damage and repair under elevated UV-B levels. *Phytochemistry* **64**: 243-255
- Scholes GD** (2003) Long-range resonance energy transfer in molecular systems. *Annu Rev Phys Chem* **54**: 57-87
- Schulz M, Friebe A** (1999) Detoxification of Allelochemicals in higher plants and enzymes involved.: 383-400
- Schulz M, Strack D, Weissenböck G, Markham G, Dellamonica G, Chopin J** (1985) Two luteolin O-glucuronides from primary leaves of *Secale cereale*. *Phytochemistry* **24**: 343-345
- Schulz M, Weissenböck G** (1986) Isolation and separation of epidermal and mesophyll protoplasts from rye primary leaves-tissue-specific characteristics of secondary phenolic product accumulation. *Zeitschrift für Naturforschung* **41c**: 22-27
- Schulz M, Weissenböck G** (1987) Partial purification and characterization of a luteolin-trigluconide-specific β -glucuronidase from rye primary leaves (*Secale cereale*). *Phytochemistry* **26**: 933-937
- Schulz M, Weissenböck G** (1988) Three specific UDP-glucuronate: flavone-glucuronosyltransferases from primary leaves of *Secale cereale*. *Phytochemistry* **27**: 1261-1267
- Shah K, Russinova E, Gadella TW, Jr., Willemse J, De Vries SC** (2002) The Arabidopsis kinase-associated protein phosphatase controls internalization of the somatic embryogenesis receptor kinase 1. *Genes Dev* **16**: 1707-1720
- Sharma N, Hewett J, Ozelius LJ, Ramesh V, McLean PJ, Breakefield XO, Hyman BT** (2001) A close association of torsinA and alpha-synuclein in Lewy bodies: a fluorescence resonance energy transfer study. *Am J Pathol* **159**: 339-344
- Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y** (1962) Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol* **59**: 223-239
- Showalter AM** (1993) Structure and function of plant cell wall proteins. *Plant Cell* **5**: 9-23
- Showalter AM** (2001) Introduction: plant cell wall proteins. *Cell Mol Life Sci* **58**: 1361-1362

- Sitte P, Weiler EW, Kadereit JW, Bresinsky A, Körner C** (2002) Strasburger, Lehrbuch der Botanik für Hochschulen. Spektrum Akademischer Verlag
- Snyder BA, Nicholson RL** (1990) Synthesis of phytoalexins in sorghum as a site specific response to fungal ingress. *Science* **248**: 1637-1639
- Solovchenko A, Schmitz-Eiberger M** (2003) Significance of skin flavonoids for UV-B-protection in apple fruits. *J Exp Bot* **54**: 1977-1984
- Southern EM** (1992) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Biotechnology* **24**: 122-139
- Spelt C, Quattrocchio F, Mol JN, Koes R** (2000) anthocyanin1 of petunia encodes a basic helix-loop-helix protein that directly activates transcription of structural anthocyanin genes. *Plant Cell* **12**: 1619-1632
- Stafford HA** (1974) Possible multi-enzyme complexes regulating the formation of C₆-C₃ phenolic compounds and lignins in higher plants. *Rec Adv Phytochem* **8**: 53-79
- Strack D, Meurer B, Weissenböck G** (1982) Tissue-specific kinetics of flavonoid accumulation in primary leaves of rye (*Secale cereale* L.). *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* **108**: 131-141
- Strack D, Keller H, Weissenböck G** (1987) Enzymatic synthesis of hydroxycinnamic acid esters of sugar acids and hydroaromatic acids by protein preparations from rye (*Secale cereale*) primary leaves. *J. Plant Physiol.* **131**: 61-73
- Studier FW, Rosenberg AH, Dunn JJ, Dubendorff JW** (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol* **185**: 60-89
- Szerszen JB, Szczyglowski K, Bandurski RS** (1994) iaglu, a gene from *Zea mays* involved in conjugation of growth hormone indole-3-acetic acid. *Science* **265**: 1699-1701
- Taguchi G, Nakamura M** (2003) Exogenously added naphthols induce three glucosyltransferases, and are accumulated as glucosides in tobacco cells. *Plant Science* **164**: 231-240
- Taguchi G, Yazawa T, Hayashida N, Okazaki M** (2001) Molecular cloning and heterologous expression of novel glucosyltransferases from tobacco cultured cells that have broad substrate specificity and are induced by salicylic acid and auxin. *Eur J Biochem* **268**: 4086-4094
- Tanaka Y, Yonekura K, Fukuchi-Mizutani M, Fukui Y, Fujiwara H, Ashikari T, Kusumi T** (1996) Molecular and biochemical characterization of three anthocyanin synthetic enzymes from *Gentiana triflora*. *Plant Cell Physiol* **37**: 711-716
- Tissier AF, Marillonnet S, Klimyuk V, Patel K, Torres MA, Murphy G, Jones JD** (1999) Multiple independent defective suppressor-mutator transposon insertions in *Arabidopsis*: a tool for functional genomics. *Plant Cell* **11**: 1841-1852

- Tournaire C, Croux S, Maurette MT, Beck I, Hocquaux M, Braun AM, Oliveros E** (1993) Antioxidant activity of flavonoids: efficiency of singlet oxygen ($^1\Delta_g$) quenching. *J Photochem Photobiol B* **19**: 205-215
- Tukey RH, Strassburg CP** (2000) Human UDP-glucuronosyltransferases: metabolism, expression, and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **40**: 581-616
- Tukey RH, Strassburg CP** (2001) Genetic multiplicity of the human UDP-glucuronosyltransferases and regulation in the gastrointestinal tract. *Mol Pharmacol* **59**: 405-414
- Ünlügil UM, Rini JM** (2000) Glycosyltransferase structure and mechanism. *Curr Opin Struct Biol* **10**: 510-517
- Ünlügil UM, Zhou S, Yuwaraj S, Sarkar M, Schachter H, Rini JM** (2000) X-ray crystal structure of rabbit N-acetylglucosaminyltransferase I: catalytic mechanism and a new protein superfamily. *Embo J* **19**: 5269-5280
- van de Staaij J, de Bakker NV, Oosthoek A, Broekman R, van Beem A, Stroetenga M, Aerts R, Rozema J** (2002) Flavonoid concentrations in three grass species and a sedge grown in the field and under controlled environment conditions in response to enhanced UV-B radiation. *J Photochem Photobiol B* **66**: 21-29
- Vaquero C, Sack M, Chandler J, Drossard J, Schuster F, Monecke M, Schillberg S, Fischer R** (1999) Transient expression of a tumor-specific single-chain fragment and a chimeric antibody in tobacco leaves. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 11128-11133
- Veit M, Pauli GF** (1999) Major flavonoids from *Arabidopsis thaliana* leaves. *J Nat Prod* **62**: 1301-1303
- Vogt T** (2002) Substrate specificity and sequence analysis define a polyphyletic origin of betanidin 5- and 6-O-glucosyltransferase from *Dorotheanthus bellidiformis*. *Planta* **214**: 492-495
- Vogt T, Grimm R, Strack D** (1999) Cloning and expression of a cDNA encoding betanidin 5-O-glucosyltransferase, a betanidin- and flavonoid-specific enzyme with high homology to inducible glucosyltransferases from the Solanaceae. *Plant J* **19**: 509-519
- Vogt T, Jones P** (2000) Glycosyltransferases in plant natural product synthesis: characterization of a supergene family. *Trends Plant Sci* **5**: 380-386
- vom Endt D, Kijne JW, Memelink J** (2002) Transcription factors controlling plant secondary metabolism: what regulates the regulators? *Phytochemistry* **61**: 107-114
- von Rad U, Huttli R, Lottspeich F, Gierl A, Frey M** (2001) Two glucosyltransferases are involved in detoxification of benzoxazinoids in maize. *Plant J* **28**: 633-642
- Vontas JG, Small GJ, Nikou DC, Ranson H, Hemingway J** (2002) Purification, molecular cloning and heterologous expression of a glutathione S-transferase involved in insecticide resistance from the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Biochem J* **362**: 329-337

- Wade HK, Sohal AK, Jenkins GI** (2003) Arabidopsis ICX1 is a negative regulator of several pathways regulating flavonoid biosynthesis genes. *Plant Physiol* **131**: 707-715
- Walle UK, Walle T** (2002) Induction of human UDP-glucuronosyltransferase UGT1A1 by flavonoids-structural requirements. *Drug Metab Dispos* **30**: 564-569
- Wang HK** (2000) The therapeutic potential of flavonoids. *Expert Opin Investig Drugs* **9**: 2103-2119
- Warnecke DC, Baltrusch M, Buck F, Wolter FP, Heinz E** (1997) UDP-glucose:sterol glucosyltransferase: cloning and functional expression in *Escherichia coli*. *Plant Mol Biol* **35**: 597-603
- Warren JM, Bassman JH, Mattinson DS, Fellman JK, Edwards GE, Robberecht R** (2002) Alteration of foliar flavonoid chemistry induced by enhanced UV-B radiation in field-grown *Pinus ponderosa*, *Quercus rubra* and *Pseudotsuga menziesii*. *J Photochem Photobiol B* **66**: 125-133
- Weast RC** (1974) *Handbook of Chemistry and Physics* 55th Edition. CRC Press, Cleveland, Ohio.
- Winkel-Shirley B** (1999) Evidence for enzyme complexes in the phenylpropanoid and flavonoid pathways. *Physiologia Plantarum* **107**: 142-149
- Winkel-Shirley B** (2001) Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiol* **126**: 485-493
- Winkel-Shirley B** (2002) Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Curr Opin Plant Biol* **5**: 218-223
- Wise RP, Rohde W, Salamini F** (1990) Nucleotide sequence of the Bronze-1 homologous gene from *Hordeum vulgare*. *Plant Mol Biol* **14**: 277-279
- Wong HC, Fear AL, Calhoon RD, Eichinger GH, Mayer R, Amikam D, Benziman M, Gelfand DH, Meade JH, Emerick AW, et al.** (1990) Genetic organization of the cellulose synthase operon in *Acetobacter xylinum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 8130-8134
- Woo HH, Orbach MJ, Hirsch AM, Hawes MC** (1999) Meristem-localized inducible expression of a UDP-glycosyltransferase gene is essential for growth and development in pea and alfalfa. *Plant Cell* **11**: 2303-2315
- Wu P, Brand L** (1994) Resonance energy transfer: methods and applications. *Anal Biochem* **218**: 1-13
- Yamazaki M, Gong Z, Fukuchi-Mizutani M, Fukui Y, Tanaka Y, Kusumi T, Saito K** (1999) Molecular cloning and biochemical characterization of a novel anthocyanin 5-O-glucosyltransferase by mRNA differential display for plant forms regarding anthocyanin. *J Biol Chem* **274**: 7405-7411

Yamazaki M, Yamagishi E, Gong Z, Fukuchi-Mizutani M, Fukui Y, Tanaka Y, Kusumi T, Yamaguchi M, Saito K (2002) Two flavonoid glucosyltransferases from *Petunia hybrida*: molecular cloning, biochemical properties and developmentally regulated expression. *Plant Mol Biol* **48**: 401-411

Zhang XL, Qu XJ, Vijay IK (2003) STAT5a regulates the GlcNAc-1-phosphate transferase gene transcription and expression. *Cell Physiol Biochem* **13**: 85-92

KURZZUSAMMENFASSUNG

Pflanzen sind in der Lage, sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe (z.B. Flavonoide) sowie pflanzenfremde Substanzen (z.B. Xenobiotika) zu "entgiften". Dies geschieht über eine Reaktionsabfolge, in der die toxische Substanz aktiviert (Phase I), dann z.B. durch die Konjugation mit einem Zucker (Phase II) in eine hydrophilere Verbindung überführt und schließlich - um das Cytosol vor toxischen Effekten zu schützen - in der Vakuole gespeichert wird (Phase III). Die bisher beschriebenen pflanzlichen Sekundärstoff-Zuckertransferasen verwenden zumeist UDP-Glucose als Cosubstrat. Im Gegensatz hierzu sind an Vertebraten-Entgiftungsprozessen vorwiegend UDP-Glucuronosyltransferasen (UGTs) beteiligt. In den Vakuolen photosynthetisch aktiver Mesophyllzellen von Roggenprimärblättern akkumulieren Luteolin-Di- bzw. Tri-Glucuronide. Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Enzyme, die die sequenzielle Synthese der Luteolin-Glucuronide katalysieren molekularbiologisch und biochemisch charakterisiert werden. Durch die Durchmusterung einer genomischen Roggenphagenbank mit heterologen Zuckertransferase-Sonden konnten zwei neue Zuckertransferase-Gene mit hoher Sequenz-Homologie zu Vertebraten-UGTs isoliert werden (scUGTa-c). Die Transkription dieser Gene im 5 Tage alten Roggenprimärblatt wurde mittels NORTHERN-*blot*-Analyse bzw. Durchmusterung einer cDNA-Bank nachgewiesen. Die biochemische Charakterisierung der Roggen-Flavonoid-Zuckertransferasen beinhaltete die Etablierung des *in vitro* Enzymtests für die sequenzielle Glucuronidierung von Luteolin bzw. für die Glucosylierung (3-Flavonol-Glucosyltransferase-Enzymtests) von Cyanidinen und Flavonolen. Die Reaktionsprodukte wurden mittels HPLC analysiert. Das Molekulargewicht von 53 kDa wurde durch eine Immun*blot*analyse und eine Protein-G-vermittelte Coimmunpräzipitation bzw. einen Lectinbindungsassay auf dem Proteinchip mit heterologen UGT-Antikörpern bestimmt. Die Lokalisation der Luteolin-Glucuronosyltransferasen im Cytosol wurde durch eine Differenzialzentrifugation ermittelt. Durch die transiente Expression fluoreszierenden Fusionsproteine in Gersteprimärblättern (*particle bombardment*) konnte die "cytosolische Lokalisation" eingegrenzt werden: die Roggenenzyme befinden sich offensichtlich mit dem ER bzw. dem Tonoplasten assoziiert. Um die Anzahl der für die Biosynthese des Luteolin-Triglucuronids verantwortlichen Enzyme zu ermitteln, wurde eine 2D-Gelelektrophorese durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass nur zwei (nicht wie erwartet drei) Proteine mittels Immun*blot* detektiert werden konnten. Die bei tierischen Enzymen beschriebene Homodimerisierung der UGTs konnte anhand einer FRET-Analyse durch *acceptor-photo-bleaching* bei den Roggen-UGTs bestätigt werden. Der Enzymassay mit heterolog exprimierter scUGT (in *E.coli* bzw. *N.tabacum* / *A.thaliana*) führte jedoch weder zu einer Akkumulation von Cyanidin-3-O-Glucosid (3FGT-Reaktion), noch zu einer von Luteolin-Mono- / -Di- bzw. -Tri-Glucuroniden (UGT-Reaktion).

ABSTRACT

Secondary plant metabolites such as flavonoids and substances of non-plant origin like xenobiotic compounds such as herbicides are detoxified within the plant due to their potential toxicity. In order to increase their water solubility, both groups of substances are conjugated to either glutathione or different sugars / sugar acids. This enables vacuolar storage of the conjugates and protects the cytosol against toxic effects. Rye-primary-leaves appear to be a suitable model system to investigate glucuronate-conjugations. In photosynthetically active mesophyll-cells the luteolin is sequentially glucuronidated by three different UDP-glucuronic acid: flavonoid-glucuronosyltransferases to luteolin-triglucuronide (with minor amounts of the diglucuronide). These products are transferred into the vacuole directly via an ATP-dependent transport mechanism. The function of these glucuronosyltransferases seems to be defence against phytopathogens. The projects core aims are the molecular and biochemical characterisation of glucuronosyltransferases from rye, their subcellular localization and their regulatory role in flavonoid biosynthesis. By the screening of a rye-genomic-phage-library with heterologous sugartransferase-probes two new genes (scUGTa C) with high sequence homology to mammal-UGTs could be isolated. The transcription of these genes was proven by means of Northern-blot-analysis and cDNA library screening in 5 day-old rye-primary-leaves. The biochemical characterization of the-rye-flavonoid-sugartransferases required the establishment of the *in vitro* enzymatic assays (UGT- and 3FGT-assay). The glycosylated products were analyzed by means of HPLC. The molecular weight of 53 kDa was shown by immunoblot analysis with heterologous antibodies as well as by protein-chip analysis (co-immunoprecipitation / lectin-binding-assay). Using differential-centrifugation the luteolin-glucuronosyltransferase localization could be discovered in the cytosol. The cytosolic localization could be specified by the transient expression of fluorescent fusion-proteins in barley-primary-leaves (*particle bombardment*): the rye enzymes are obviously associated with the ER and the tonoplast-membrane. In order to determine the number of proteins responsible for the generation of the luteolin-triglucuronide a 2D-gelelektrophoresis was accomplished. It turned out that only two, not three (as expected beforehand), proteins could be detected by means of immunoblot-analysis. The homodimerisation of UGTs described for mammal enzymes applies to the rye-UGTs likewise (FRET-analysis / acceptor-photo-bleaching). However the enzymatic assay with the heterologous expressed protein (*E.coli* and *N.tabacum* / *A.thaliana*) neither led to the accumulation of Cyanidin-3-O-Glucosid (3FGT-reaction) nor to the accumulation of luteolin-mono- / -di- or -triglucuronid.

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt.

Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. G. Weissenböck betreut worden.

Köln, den 16.12.03



Hans-Joachim Frey

dipl.-biol. konstanze freiesleben
klosterstraße 105
50931 köln
e-mail konstanze.freiesleben@uni-koeln.de

Persönliche Informationen

Alter	• 28 (geb. 01.08.1975)
Familienstand	• verheiratet
Staatsangehörigkeit	• deutsch
Geburtsort	• Köln

Ausbildung

- 1981-1985 Städt. Gemeinschaftsgrundschule Albert-Schweitzer in Köln-Junkersdorf
- 1985-1994 Elisabeth-von-Thüringen Gymnasium Köln-Sülz
- 1994 Abitur an diesem Gymnasium
- 1994-1995 Studium der darstellenden Künste an der Universität Gesamthochschule Essen
- 1995-2000 Biologiestudium an der Universität zu Köln
- 1999 Mündliche Diplomprüfungen in den Fächern Genetik, Biochemie und organische Chemie
- 2000 Beendigung der Diplomarbeit im Fach Genetik mit dem Titel:
"Delta-6-Desaturase der Maus, Klonierung und Expression der cDNA, Reinigung und immunologische Charakterisierung des rekombinanten Proteins, Isolierung und Kartierung des Maus-Gens und Konstruktion eines mutierten *Replacement*-Vektors"
- 2001 Beginn einer Tätigkeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin im Rahmen eines Drittmittel geförderten Projekts (DFG) im Institut für Botanik der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln