

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Genetik

Evolution der Detoxifizierung und Bioaktivierung von
Benzoxazinoid-Sekundärmetaboliten

Regina Dick

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

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:

Univ.-Prof. Dr. K. Schneitz

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. A. Gierl
2. Univ.-Prof. Dr. E. Grill
3. Univ.-Prof. Dr. W. Schwab

Die Dissertation wurde am 07.07.2010 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 09.09.2010 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe.....	1
1.1.1 Funktion von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen	1
1.1.2 Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe als Abwehrsubstanzen	1
1.2 Detoxifizierung und Bioaktivierung von Phytoantizipinen: UGTs und β -Glucosidasen des Sekundärstoffwechsels.....	4
1.2.1 UDP-abhängige Glycosyltransferasen (UGTs) der Familie 1	5
1.2.2 β -Glucosidasen der Familie 1 (GH1).....	8
1.3 Benzoxazinoid-Glucoside als Modellsystem der Phytoantizipin Biosynthese	12
1.3.1 Biosynthese und Bioaktivierung in Gräsern	14
1.3.2 Biosynthese in den dikotylen Pflanzen <i>C. orientalis</i> und <i>L. galeobdolon</i>	15
1.3.3 Untersuchungen zur Evolution der Benzoxazinoid-Biosynthese in monokotylen und dikotylen Pflanzen.....	16
1.4 Ziel der Arbeit	17
2 Material und Methoden	18
2.1 Materialien	18
2.1.1 Chemikalien und Reagenzien	18
2.1.2 Phagenbanken	18
2.1.3 Plasmide.....	19
2.1.4 Bakterienstämme.....	19
2.1.5 Oligonukleotide.....	19
2.1.6 Pflanzenmaterial und Anzucht	23
2.2 Molekularbiologische Methoden.....	24
2.2.1 DNA-Isolierung	24
2.2.2 RNA-Isolierung und cDNA-Synthese	24
2.2.3 Analyse der RNA durch Formaldehyd-Agarosegel-Elektrophorese.....	24

2.2.4	Allgemeine DNA-Klonierungstechniken	24
2.2.5	Design und Klonierung von amiRNA-Konstrukten.....	25
2.2.6	PCR-Verfahren	25
2.2.7	Verfahren zur Isolierung von 5'- und 3'-cDNA-Enden.....	26
2.2.8	Isolierung von UDPG:Glycosyltransferase-Kandidatenteilsequenzen aus <i>L. galeobdolon</i>	27
2.2.9	DNA-Sequenzierung.....	27
2.2.10	Sequenzierung des <i>C. orientalis</i> Transkriptom.....	27
2.2.11	Screening von cDNA-Bibliotheken durch Phagenhybridisierung	28
2.3	Proteinbiochemische Methoden.....	29
2.3.1	Reinigung von CoBX8 und LgBX8 aus <i>C. orientalis</i> bzw. <i>L. galeobdolon</i>	29
2.3.2	Proteinfällung.....	31
2.3.3	SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese (SDS-PAGE)	31
2.3.4	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford.....	31
2.3.5	Heterologe Proteinexpression in <i>E. coli</i> und Reinigung über Nickel- Affinitätschromatographie	31
2.4	Isolierung von Naturstoffen	32
2.4.1	Isolierung von DIBOA aus <i>L. galeobdolon</i> bzw. DIMBOA aus <i>Z. mays</i>	32
2.4.2	Isolierung von GDIBOA aus <i>L. galeobdolon</i>	33
2.4.3	Isolierung von GDIMBOA aus <i>Z. mays</i>	33
2.5	Analyse von Naturstoffen.....	33
2.5.1	Hoch-Durchsatz-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)	33
2.6	Enzymtests	36
2.6.1	Tests auf Glucosyltransferase-Aktivität	36
2.6.2	Tests auf β -Glucosidase-Aktivität	37
2.7	Elektroporation von Agrobakterien.....	39
2.8	Transiente Proteinexpression in <i>N. benthamiana</i>	39
2.8.1	Agroinfiltration.....	40
2.8.2	Proteinextraktion aus <i>N. benthamiana</i>	40
2.9	Erzeugung und Analyse von transgenen <i>A. thaliana</i> -Pflanzen	41

2.9.1	Elektroporation von Agrobakterien und Transformation von <i>A. thaliana</i> mit <i>A. tumefaciens</i>	41
2.9.2	Analyse der transgenen <i>A. thaliana</i> -Pflanzen	41
2.10	Expression von amiRNA-Konstrukten in <i>Z. mays</i>	41
2.10.1	Analyse transgener <i>Z. mays</i> -Pflanzen	42
3	Ergebnisse	43
3.1	Isolierung der UDPG:DIBOA Glucosyltransferasen und Flavonoid Glucosyltransferasen aus <i>C. orientalis</i> und <i>L. galeobdolon</i>	43
3.1.1	Reinigung von CoBX8 und pLgBX8	44
3.1.2	Identifizierung der CoBx8-, pLgBx8-, CoGT- und LgGT- Gensequenzen	47
3.2	Charakterisierung der heterolog exprimierten Proteine CoBX8, CoGT und LgGT ..	53
3.2.1	Expression und Reinigung von CoBX8, pLgBX8, CoGT und LgGT.....	53
3.2.2	Substratspezifität von CoGT und LgGT	53
3.2.3	Kinetische Daten von CoBX8.....	54
3.2.4	Substratspezifität von CoBX8	56
3.2.5	Vergleich der CoBX8 und pLgBX8 Proteinsequenzen mit anderen Glycosyltransferasen	57
3.2.6	Genexpressionsanalyse von CoBx8	58
3.3	Funktion von CoBX8 <i>in planta</i>	59
3.3.1	Enzymatische Aktivität von CoBX8 in <i>Arabidopsis</i> -Pflanzen	59
3.3.2	Resistenztests der transgenen <i>Arabidopsis</i> -Pflanzen	60
3.4	Isolierung der Benzoxazinoid-Glucosid β -Glucosidase aus <i>C. orientalis</i>	61
3.4.1	Identifizierung von Benzoxazinoid-Glucoisd β -Glucosidase Kandidaten Gensequenzen	61
3.4.2	Transgene Expression der Benzoxazinoid-Glucosid β -Glucosidase-Kandidaten in <i>N. benthamiana</i>	62
3.5	Charakterisierung von CoGLU1 und CoGLU2	64
3.5.1	Kinetische Daten von CoGLU1	64
3.5.2	Substratspezifität von CoGLU1 und CoGLU2	65
3.5.3	Vergleich der CoGLU1 und CoGLU2 Proteinsequenzen mit anderen Glycosid Hydrolasen der Familie 1	67

3.5.4	Genexpressionsanalyse von <i>CoGlu1</i>	68
3.5.5	Lokalisationsvorhersage für <i>CoGLU1</i>	68
4	Diskussion	70
4.1	UDPG:Benoxazinoid Glucosyltransferasen von monokotylen und dikotylen Pflanzen	71
4.1.1	Substratspezifität gegenüber Benoxazinoiden und Funktion	71
4.1.2	Evolution von UDPG:Benoxazinoid Glucosyltransferasen	74
4.2	Benoxazinoid-Glucosid β -Glucosidasen von monokotylen und dikotylen Pflanzen	78
4.2.1	Substratspezifität gegenüber Benoxazinoid-Glucosiden	78
4.2.2	Substratspezifität außerhalb der Benoxazinoid-Glucoside	78
4.2.3	Funktion von Benoxazinoid-Glucosid β -Glucosidasen	80
4.2.4	Evolution von β -Glucosidasen	81
4.3	Evolution der DIBOA-Glucosid-Biosynthese in Angiospermen	85
5	Zusammenfassung	87
6	Literaturverzeichnis	89
7	Anhang	101

Abkürzungsverzeichnis

Neben SI-Einheiten, Elementsymbolen und dem Ein- oder Dreibuchstabencode für Aminosäuren wurden folgende Abkürzungen verwendet:

Å	Ångström
<i>A. sativa</i> (As)	<i>Avena sativa</i>
<i>A. squarrosa</i> (As)	<i>Aphelandra squarrosa</i>
<i>A. thaliana</i> (At)	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. tumefaciens</i> (At)	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
ABC-Transporter	ATP-binding cassette-Transporter
AC	Affinitätschromatographie
AE	Anionenaustauscherchromatographie
amiRNA	artifizielle micro RNA
AMP	2-Amino-2-methyl-1-propanol
AS	Aminosäure
AS-Fällung	Ammoniumsulfat-Fällung
ATP	Adenosintriphosphat
<i>B. napus</i> (Bn)	<i>Brassica napus</i>
BASTA	formuliertes Herbizid mit dem Wirkstoff Phosphinotricin, eingetragenes Warenzeichen der Firma Hoechst
BME	β-Mercaptoethanol
BOA	1,3-benzoxazol-2(3H)-one
BOA-6-OH	6-hydroxy-1,3-benzoxazol-2(3H)-one
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
<i>C. orientalis</i> (Co)	<i>Consolida orientalis</i>
ca.	circa
CaMV	Cauliflower Mosaikvirus
CAZY	<i>Carbohydrate-Active enZYmes Database</i>
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie
Col-0	Columbia-0
C-Terminus	Carboxy-Terminus
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DIBOA	2,4-Dihydroxy-2 <i>H</i> -1,4-benzoxazin-3(4 <i>H</i>)-on
DIMBOA	2,4-Dihydroxy-7-methoxy-2 <i>H</i> -1,4-benzoxazin-3(4 <i>H</i>)-on
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleotid
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-N-N-N`-N`-Tetraacetat
ER	Endoplasmatische Retikulum
FG	Frischgewicht
FPLC	<i>Fast protein liquid chromatography</i>
GAPDH	Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
GDIBOA	2-O-glucosyl-1,4(2 <i>H</i>)-benzoxazin-3- one

GDIMBOA	2-O-glucosyl- 7-methoxy-1,4(2H)-benzoxazin-3- one
GF	Gelfiltration
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GH	Glycosid Hydrolase
GT	Glycosyltransferase
<i>H. lechleri (Hl)</i>	<i>Hordeum lechleri</i>
<i>H. vulgare (Hv)</i>	<i>Hordeum vulgare</i>
HBOA	2-Hydroxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-on
HCN	Blausäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)- ethansulfonsäure
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie
HMBOA	2-hydroxy-7-methoxy-2H-1,4,-benzoxazzin-3(4H)-one
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IAA	Indol-3-Essigsäure
IGL	Indol-3-Glycerinphosphatlyase
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
K3G	Kinetin-3- β -Glucosid
kb	Kilobasenpaare
k_{cat}	katalytische Konstante
kDa	Kilo Dalton
K_m	Michaelis-Menten-Konstante
<i>L. galeobdolon (Lg)</i>	<i>Lamium galeobdolon</i>
<i>M. truncatula (Mt)</i>	<i>Medicago truncatula</i>
Mb	Megabasen
MBOA	benzoxazinoid 6- methoxybenzoxazolin-2-one
MES	2-(N-Morpholino)-Ethansulfonsäure
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
MP	<i>Movementprotein</i>
MS	Massenspektroskopie
MS-Medium	Murashige und Skoog-Medium
<i>N. benthamiana (Nb)</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i>
nb	nicht bestimmt
nn	nicht nachweisbar
N-Terminus	Amino-Terminus
<i>O. sativa (Os)</i>	<i>Oryza sativa</i>
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
PEG	Polyetylenglycol
<i>pfu</i>	<i>plaque forming units</i>
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
pNPG	p-Nitrophenyl- β -D-glucopyranosid
PSPG	<i>Plant Secondary Product- Glucosyltransferase</i>
PVP	Poly-Vinyl-Pyrrolidon
RACE	<i>Rapid Amplification of cDNA Ends</i>
RdRp	RNA-abhängige RNA-Polymerase
RNA	Ribonukleinsäure
RP	<i>Reversed Phase</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
RuBisCO	Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase
S	Swedberg-Einheit
<i>S. alba (Sa)</i>	<i>Sinapis alba</i>
<i>S. bicolor (Sb)</i>	<i>Sorghum bicolor</i>

<i>S. cereale</i> (Sc)	<i>Secale cereale</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat Polyacrylamide Gelelektrophorese
SSPE	Standard Saline Phosphate/EDTA-Puffer
<i>T. aestivum</i> (Ta)	<i>Triticum aestivum</i>
<i>T. repens</i> (Tr)	<i>Trifolium repens</i>
Taq-Polymerase	<i>Thermus aquaticus</i> -DNA-Polymerase
TB	<i>Terrific Broth</i>
TCA	Trichloressigsäure
T-DNA	Transfer-DNA
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N-N-Nk-Nk-Tetramethylendiamin
TIM-barrel	Triosephosphat-Isomerase-barrel
TMV	Tabakmosaikvirus
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
TSA	α -Untereinheit der Tryptophansynthase
tZOG	<i>trans</i> -Zeatin-O-Glucosid
UDP	Uracildiphosphat
UDPG	Uracildiphosphatglucose
UGT	UDP-abhängige Glycosyltransferase
UV	ultraviolett
v_{\max}	Maximalgeschwindigkeit
Vol	Volumen
<i>Z. mays</i> (Zm)	<i>Zea mays</i>
ZOGR	Zeatin-O- β -Glucosid-Ribosid
ϵ	Extinktionskoeffizient

1 Einleitung

1.1 Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe

1.1.1 Funktion von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen

Pflanzen produzieren ein riesiges Spektrum an Sekundärmetaboliten. Im Gegensatz zu primären Metaboliten, die von allen Pflanzenspezies gleichermaßen produziert werden, folgt die Biosynthese von sekundären Inhaltsstoffen oft phylogenetischen Beziehungen. Manche Sekundärmetabolite werden in einzelnen Arten, andere wiederum in Gruppen nah verwandter Arten synthetisiert. In der Regel dominiert in einem Taxon ein charakteristischer Sekundärmetabolit. Sekundärmetabolite sind als Signalstoffe für die Reproduktion (Terpene als flüchtige Duftstoffe; Anthocyanidine als Blütenblätter- und Samenfarbstoffe) und als Abwehrsubstanzen für das Überleben von Pflanzen im Ökosystem von großer Bedeutung. Abwehrsubstanzen (z.B. Benzoxazinone, cyanogene Glycoside, Glucosinolate und Saponine) schützen die Pflanze vor Viren, Bakterien, Pilzen, konkurrierenden Pflanzen und vor allem gegen Fraßfeinde. Flavonoide nehmen unter den Sekundärmetaboliten bezüglich ihres Vorkommens eine Sonderstellung ein. Man findet sie nicht auf bestimmte Taxons beschränkt, sondern weit verbreitet im Pflanzenreich. Flavonoide sind Sekundärmetabolite mit vielfältigen Funktionen, sie dienen als Signalstoffe der Reproduktion (Anthocyanidine), als Abwehrstoffe gegen Pilze (Skadhauge *et al.*, 1997) und Insekten (Mallikarjuna *et al.*, 2004), schützen Pflanzen aufgrund ihrer Funktion als Antioxidantien vor UV-Licht (Wink, 2003) und sind für die Pollenfertilität von Bedeutung (Flavonole; Napoli *et al.*, 1990; Taylor und Jorgensen, 1992).

1.1.2 Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe als Abwehrsubstanzen

Abwehrsubstanzen des Sekundärmetabolismus, die infolge einer Verwundung oder Infektion *de novo* synthetisiert werden, bezeichnet man als Phytoalexine (Vanetten *et al.*, 1994). Zu ihnen zählen beispielsweise Phenylpropane, Terpene und Fettsäurederivate (Ebel, 1986). Abwehrsubstanzen, die die gesunde Pflanze konstitutiv synthetisiert, werden als Phytoantizipine bezeichnet (Vanetten *et al.*, 1994). Ihre Freisetzung hängt vom Grad der Gewebeerstörung ab, der durch das Pathogen verursacht wird (Osbourn, 1999). Phytoantizipine können in der Pflanze in ihrer biologisch aktiven Form vorliegen (z.B. Alkaloide, Gerbstoffe) und werden in speziellen Zellen oder in die Zellwand eingelagert, um eine Selbstschädigung der Pflanzen zu vermeiden. In den meisten Fällen werden sie aber zur

Reduktion der Autotoxizität glycosyliert und als aktivierbare Vorläufersubstanzen in der Vakuole akkumuliert (Detoxifizierung; Osbourn, 1996). Im intakten Pflanzengewebe sind spezifische β -Glucosidasen in einem anderen Kompartiment gelagert. Die Zerstörung der Zellintegrität z.B. durch einen Fraßfeind oder ein Pathogen bringt die glycosylierte Abwehrsubstanz mit spezifischen β -Glucosidasen in Kontakt, woraufhin das toxische Aglucon gebildet wird (Bioaktivierung). Solche Zweikomponentensysteme aus glycosylierter Abwehrsubstanz und spezifischer β -Glucosidase sind besonders gut für cyanogene Glycoside, Glucosinolate, Saponine und Benzoxazinoid-Glucoside (Abbildung 1) untersucht.

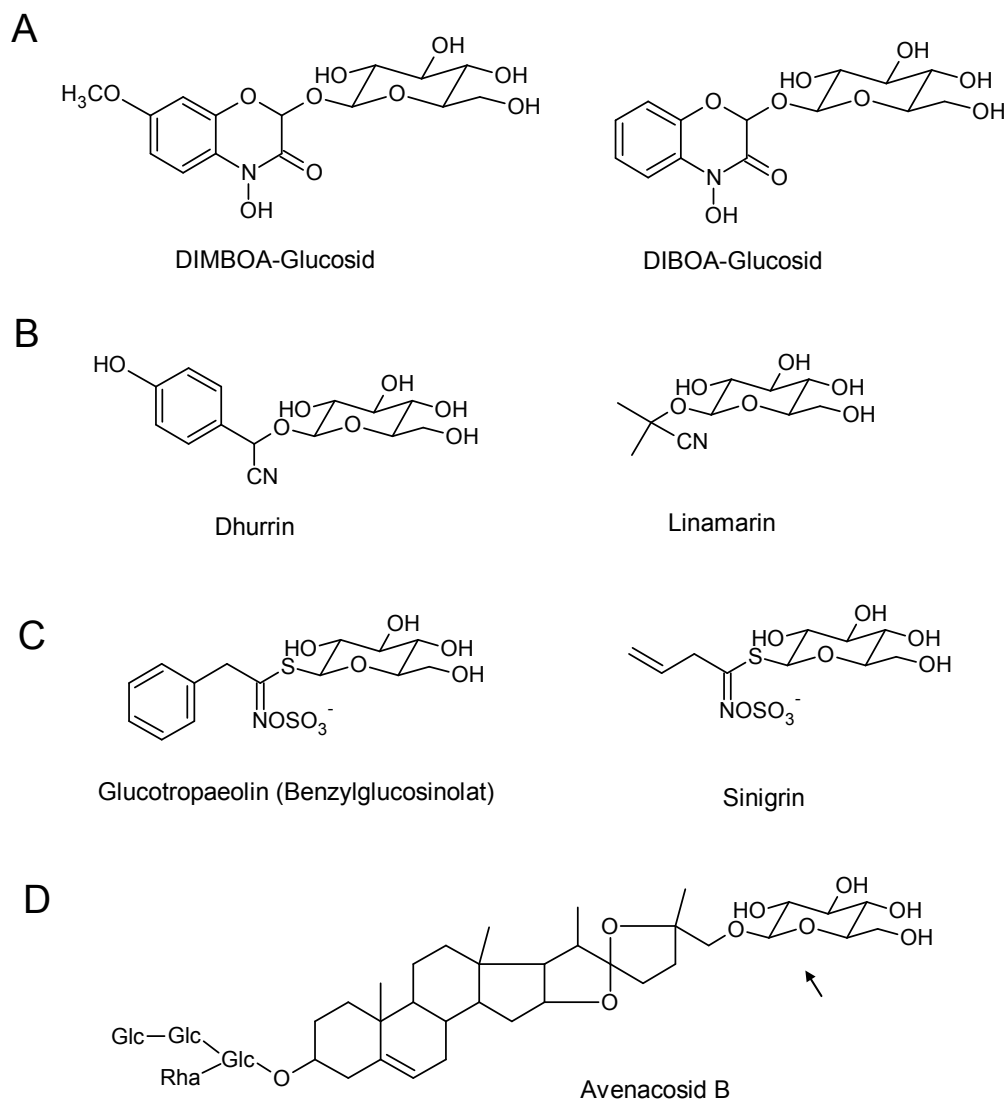


Abbildung 1: Beispielsubstanzen für die Abwehrsysteme Benzoxazinoid-Glucoside, cyanogene Glycoside, Glucosinolate und Saponine. A: die Glucoside der Benzoxazinoide DIBOA (2,4-Dihydroxy-2H-1,4-Benzoxazin-3(4H)-one) und DIMBOA (2,4-Dihydroxy-7-Methoxy-2H-1,4-Benzoxazin-3(4H)-one); B: die cyanogenen Glycoside Dhurrin und Linamarin; C: die Glucosinolate Glucotropaeolin und Sinigrin und D: das Saponin Avenacosid B (der Glucoserest, der zur Bioaktivierung abgespalten wird, ist mit einem Pfeil markiert). Glc: Glucosid; Rha: Rhamnosid.

Cyanogene Glycoside sind Phytoantizipine die aus den Aminosäuren Valin, Isoleucin, Leucin, Phenylalanin, Tyrosin und der nicht proteinogenen Aminosäure 2-Cyclopentenyl-Glycin synthetisiert werden. Sie werden in mehr als 2650 verschiedenen Pflanzenspezies, von Farnen und Gymnospermen bis hin zu monokotylen und dikotylen Angiospermen synthetisiert (Bak *et al.*, 2006). Aus Hirse (*Sorghum bicolor*) wird das cyanogene Glycosid Dhurrin isoliert, das in der Spitze etiolierter Keimlinge bis zu 30% des Trockengewichts ausmacht (Saunders *et al.*, 1977; Halkier und Møller, 1989). Der vollständige Biosyntheseweg eines cyanogenen Glycosids konnte exemplarisch für Dhurrin in *S. bicolor* aufgeklärt werden. Dhurrin wird aus der Aminosäure Tyrosin durch zwei Hydroxylierungen und einer Glucosylierung durch die UDP-abhängige Glucosyltransferase (UGT) *SbHMNGT* gebildet (Halkier und Møller, 1990; Sibbesen *et al.*, 1994; Halkier *et al.*, 1995; Bak *et al.*, 1998a; Jones *et al.*, 1999; Hansen *et al.*, 2003). Bei der Hydrolyse cyanogener Glycoside durch spezifische β -Glucosidasen wird ein instabiles Aglucon freigesetzt, das spontan, oder enzymatisch katalysiert, in ein Keton oder Aldehyd und Blausäure (HCN) zerfällt (Conn, 1980; Morant *et al.*, 2003). Aus monokotylen und dikotylen Spezies konnten β -Glucosidasen isoliert werden, die cyanogene Glycoside hydrolysieren, so z.B. aus *S. bicolor* (Dhurrin, Dhurrinasen *SbDH1* und *SbDH2*; Hosel *et al.*, 1987; Verdoucq *et al.*, 2004), aus dem weißen Klee (*Trifolium repens*; Linamarin, Linamarase *TrCBG*; Oxtoby *et al.*, 1991; Barrett *et al.*, 1995) und Maniok (*Manihot esculenta*; Linamarin, Linamarase *MeLIN*; Hughes *et al.*, 1992).

Glucosinolate konnten unter anderem aus weißem Senf (*Sinapis alba*), Raps (*Brassica napus*), sowie aus der Modellpflanze Acker-Schmalwand (*Arabidopsis thaliana*) isoliert werden. Ihr Vorkommen ist fast ausschließlich auf die Familie der Kreuzblütengewächse (Brassicaceae; Fahey *et al.*, 2001) beschränkt. Die ersten Biosyntheseschritte der Glucosinolate und cyanogenen Glycoside sind analog (Ettlinger und Kjær, 1968; Bak *et al.*, 1998b; Halkier und Gershenzon, 2006). Bei der Glucosinolat-Biosynthese schließen sich verschiedene Modifikationsreaktionen an, die zu deren strukturellen Vielfalt führen. Es wird angenommen, dass Glucosinolate von den cyanogenen Glycosiden evolviert sind (Poulton und Møller, 1993; Bak *et al.*, 1998b; Rask *et al.*, 2000; Halkier und Gershenzon, 2006). Die für Glucosinolate charakteristische S- β -glycosidische Bindung wird durch eine Subgruppe von β -Glucosidasen, den Myrosinasen, hydrolysiert. Durch die Hydrolyse wird ein instabiles Aglucon freigesetzt, dessen Zerfallsprodukte Insekten und Fraßfeinde gegenüber eine starke Toxizität aufweisen (z.B. Isothiocyanate (Senföle); Lambrix *et al.*, 2001; Lazzeri *et al.*, 2004).

Saponine sind wie cyanogene Glycoside weit verbreitete Abwehrsubstanzen in Pflanzen. Das Saponin-Abwehrsystem ist am besten für Hafer (*Avena sativa*) untersucht, der die Saponine Avenacosid A und B synthetisiert. Die Biosynthese der Avenacoside in *A. sativa* ist bisher nur teilweise aufgeklärt (Haralampidis *et al.*, 2001; Qi *et al.*, 2006; Mugford *et al.*,

2009). Avenacoside liegen in Blättern als biologisch inaktive Glycoside vor und werden erst bei Zellverletzung durch die beiden spezifischen β -Glucosidasen AsGLU1 und AsGLU2 aktiviert (Lüning und Schlösser, 1975; Nisius, 1988; Gusmayer *et al.*, 1994; Kim *et al.*, 2000). Bei diesem Vorgang entstehen die biologisch hochaktiven 26-Desgluco-Avenacoside, die aufgrund ihrer Steroid-ähnlichen Grundstruktur mit den Sterolen der Plasmamembranen von Schädlingen interagieren, und so zu Porenbildung und Membranzerstörung führen (Morrissey und Osbourn, 1999).

Die **Benzoxazinoide** DIBOA (2,4-Dihydroxy-2H-1,4-Benzoxazin-3(4H)-one) und DIMBOA (2,4-Dihydroxy-7-Methoxy-2H-1,4-Benzoxazin-3(4H)-one) kommen vor allem in der Familie der Gräser (Poaceae; Sicker *et al.*, 2000) vor. Sie schützen Pflanzen vor einem breiten Spektrum an Insekten, pathogenen Pilzen und Bakterien (zusammengefasst in Niemeyer, 2009). Sie vermitteln Resistenz gegen verschiedene Insekten, wie z.B. gegen den europäischen Maiszünsler (*Ostrinia nubilalis*) und verschiedene Blattläuse (*Rhopalosiphum maydis*, *Metopolophium dirhodum*, *Sitobion avenae*). Des Weiteren verstärken Benzoxazinoide die Widerstandsfähigkeit der Pflanzen gegen bakterielle Erkrankungen (*Erwinia* spp.: Nassfäule) und Pilz-Erkrankungen (*Helminthosporium turcicum*: Blattfleckenkrankheit und *Diplodia maydis*: Stängelfäule). Es wurde beschrieben, dass Benzoxazinoide *Agrobacterium tumefaciens* im Wachstum hemmen (Sahi *et al.*, 1990). Neben der insektiziden und pestiziden Wirkung haben Benzoxazinone auch signifikante allelopathische Effekte, indem sie das Wachstum und Entwicklung innerhalb der Pflanzengesellschaft beeinflussen. DIBOA und dessen Abbauprodukt BOA reduzieren das Wurzel- und Sprosswachstum, sowie die Keimung umgebender Pflanzen (Barnes und Putnam, 1987; Burgos *et al.*, 2004).

Die toxische Wirkung der Benzoxazinoide entsteht durch die Inhibition wichtiger Enzyme der Schädlinge, wie z.B. α -Chymotrypsin (Cuevas *et al.*, 1990), Cholinesterase (Cuevas und Niemeyer, 1993), Papain (Pérez und Niemeyer, 1989a) und der Plasmamembran H^+ -ATPase konkurrierender Pflanzen (Friebe *et al.*, 1997), durch deren Reaktion mit nukleophilen Aminosäure-Resten (NH_2 -Gruppe von Lysin oder SH-Gruppe von Cystein) der jeweiligen Proteine (Pérez und Niemeyer, 1989b).

1.2 Detoxifizierung und Bioaktivierung von Phytoantizipinen: UGTs und β -Glucosidasen des Sekundärstoffwechsels

Die Funktion der Phytoantizipine hängt meist von einem System zweier komplementärer Enzyme ab. Eine spezifische UDP-abhängige Glycosyltransferase (UGT) detoxifiziert das für

die Pflanze autotoxische Phytoantizipin durch die Übertragung eines Zucker-Moleküls. Im Falle der Zerstörung der Zellintegrität durch Pathogene katalysiert die spezifische β -Glucosidase die Bioaktivierung des Aglucons.

1.2.1 UDP-abhängige Glycosyltransferasen (UGTs) der Familie 1

Einteilung

Glycosylierungen sind ubiquitäre Modifikations-Reaktionen. Schätzungen zufolge codieren ca. 1% aller offenen Leserahmen eines jeden Genoms für Glycosyltransferasen (GTs; Coutinho *et al.*, 2003). GTs werden basierend auf deren Aminosäureidentität in aktuell (April 2010) 92 Familien unterteilt (CAZY Datenbank, *Carbohydrate-Active enZymes Database*; <http://www.cazy.org/>; Campbell *et al.*, 1997; Coutinho *et al.*, 2003). Die Familien 1 und 4 der GTs enthalten Glycosyltransferasen, die als Zucker-Donor einen UDP- (Uridindiphosphat) aktivierten Zucker nutzen und daher als UDP-abhängige Glycosyltransferasen oder UGTs bezeichnet werden (Lim und Bowles 2004; Mackenzie *et al.*, 1997). Die meisten UGT-Sequenzen sind der Familie 1 zugeordnet (Coutinho *et al.*, 2003). Die Aminosäuresequenz von UGTs der Familie 1 enthält ein hochkonserviertes Motiv am C-Terminus (*Prosite* UGT-Konsensus-Sequenz, Mackenzie *et al.*, 1997; Abbildung 2). UGTs können schließlich in tierische und pflanzliche Enzyme unterteilt werden. Die pflanzlichen UGTs der Familie 1 sind durch ein 44 Aminosäuren langes hochkonserviertes Motiv am C-Terminus charakterisiert (*Plant Secondary Product Glycosyltransferase motif*, PSPG-Motiv), das eine N-terminale Erweiterung der allgemeinen *Prosite* UGT-Konsensus-Sequenz darstellt (Hughes und Hughes, 1994; Paquette *et al.*, 2003; Gachon *et al.*, 2005). Wie die Bezeichnung des konservierten Motivs bereits andeutet, sind pflanzliche UGTs der Familie 1 in den Metabolismus von Pflanzensekundärmetaboliten eingebunden.

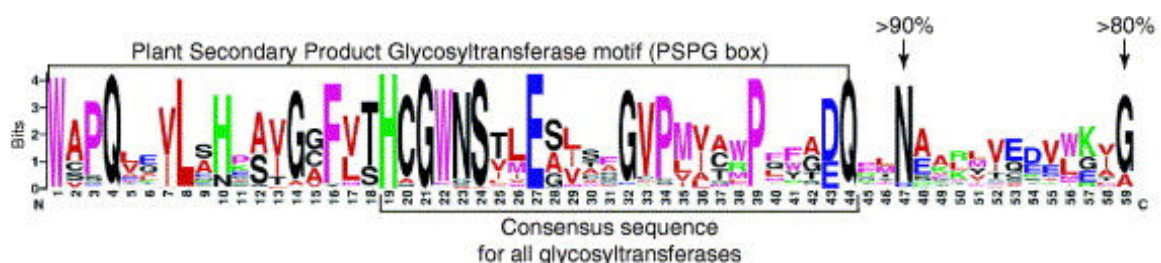


Abbildung 2: Die *Plant Secondary Product Glycosyltransferase box* (PSPG-box) der pflanzlichen UDP-abhängigen Glycosyltransferasen der Familie 1 (Aminosäuren 1-44). Zusätzlich dargestellt ist die allgemeine Konsensus-Sequenz von UDP-abhängigen-Glycosyltransferasen der Familie 1 (Aminosäuren 19-44, Mackenzie *et al.*, 1997). Die Buchstabengröße ist ein Maß, wie stark die jeweilige Aminosäure konserviert ist (Hughes und Hughes, 1994; Paquette *et al.*, 2003; Gachon *et al.*, 2005). Die Abbildung ist aus Gachon *et al.*, 2005 entnommen.

Pflanzliche UGTs der Familie 1 stellen große Genfamilien dar. Die Genome der Modellpflanzen *A. thaliana* und des gestutzten Schneckenklee (*Medicago truncatula*) enthalten 112 (Paquette *et al.*, 2003) bzw. 165 UGT-Gene (Modolo *et al.*, 2007) während in der monokotylen Kulturpflanze Reis (*Oryza sativa*) eine Anzahl von 193 UGT-Genen identifiziert wird (Ko *et al.*, 2006).

Reaktion und Eigenschaften

Pflanzliche UGTs der Familie 1 katalysieren die Übertragung eines aktivierten Zuckers auf verschiedene niedermolekulare Akzeptoren (Aglucon), wie z.B. Pflanzenhormone, Flavonoide, und andere Sekundärmetabolite. Die Ausbildung der glycosidischen Bindung verläuft bei der pflanzlichen UGTs unter Inversion der anomeren Konfiguration des Donors (Coutinho *et al.*, 2003). In der Regel weisen pflanzliche UGTs *in vitro* eine hohe Spezifität für den Zucker-Donor auf. In den meisten Fällen wird UDP-Glucose als Substrat bevorzugt (Vogt und Jones, 2000). Es wurden aber auch Enzyme beschrieben, welche UDP-Galaktose (Miller *et al.*, 1999), UDP-Rhamnose (Jones *et al.*, 2003), UDP-Xylose (Martin *et al.*, 1999a) oder UDP-Glucuronsäure (Sawada *et al.*, 2005) als Substrat akzeptieren. Für das Akzeptor-Substrat von pflanzlichen UGTs wurde eher eine Regiospezifität als eine Substratspezifität vorgeschlagen (Vogt *et al.*, 1997). Viele heterolog exprimierte UGTs zeigen *in vitro* eine breite Akzeptor-Substratspezifität auf (z.B. Hansen *et al.*, 2003; Hefner *et al.*, 2002), doch wurden auch UGTs mit einer engeren Akzeptor-Substratspezifität isoliert (Ford *et al.*, 1998; Miller *et al.*, 1999). Aufgrund der Regulation der Genexpression und der unterschiedlichen Verfügbarkeit von Substraten *in planta* kann eine *in vitro* gezeigte breite Substratspezifität jedoch keinen unmittelbaren Rückschluss auf die Funktion der UGT in der Pflanze geben (Ross *et al.*, 2001).

Pflanzliche UGTs der Familie 1 sind Proteine mit molekularen Massen zwischen 45 kDa und 60 kDa (Vogt und Jones, 2000) und weisen in ihrer Aminosäuresequenz keine Signalpeptide oder Membranbindestellen auf (Li *et al.*, 2001). UGTs liegen als Monomere vor und werden in der Regel in der cytosolischen Fraktion nachgewiesen (Vogt und Jones, 2000). Die Sequenzhomologie von pflanzlichen UGTs der Familie 1 ist außerhalb des konservierten PSPG-Motivs mit ca. 10% gering (Vogt und Jones, 2000). In der PSPG-Box werden Aminosäureidentitäten von 60-80% gemessen. Innerhalb der Box treten mit Aminosäureidentitäten von 95% zwei besonders konservierte Motive auf (WAPQV und HCGWNS; Abbildung 2). Einzelne Aminosäuren dieser Motive sind zu 100% konserviert (unterstrichen; Vogt und Jones, 2000).

Struktur

Seit 2005 konnten die Kristallstrukturen von vier pflanzlichen UGTs der Familie 1 aufgeklärt werden: *MtUGT71G1* (Shao *et al.*, 2005), *VvGT1* (Offen *et al.*, 2006), *MtUGT85H2* (Li *et al.*, 2007) und *AtUGT72B1* (Brazier-Hicks *et al.*, 2007). Trotz der relativ geringen Aminosäureidentität von 25-30% sind die Sekundär- und Tertiärstrukturen der untersuchten UGTs stark konserviert (Brazier-Hicks *et al.*, 2007; Osmani *et al.*, 2009). Die Proteine sind aus einer N-terminalen und einer C-terminalen Domäne aufgebaut, die beide eine sogenannte Rossmann-Faltung (α - β - α -Faltung) zeigen. Die beiden Domänen bilden einen engen Spalt aus, der die Substratbindetasche darstellt. Die Kristallstrukturen belegen die Hypothese, dass sich die Domänen über eine Linkerregion bewegen, um die Aufnahme des Substrats möglich zu machen (Shao *et al.*, 2005; Offen *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2007; Brazier-Hicks *et al.*, 2007). Die Interaktionen mit dem Zuckerdonor finden vorwiegend über Aminosäuren des PSPG-Box des C-Terminus statt, während die Akzeptor-Bindetasche fast ausschließlich von Aminosäureresten der weniger konservierten N-terminalen Domäne ausgebildet wird. Die Aufklärung der Kristallstrukturen von pflanzlichen UGTs ermöglicht eine Strukturvorhersage weiterer pflanzlicher UGTs mittels Homologiemodellierung (*homolgy modelling*). Bisher konnten auf diese Weise die Strukturvoraussetzungen identifiziert werden, die für die Spezifität der Glycosylierung eines bereits glycosylierten Substrats (Zucker-Zucker Glycosylierung), als auch für die Glycosylierung mit UDP-Glucuronsäure als Zuckerdonor ausschlaggebend sind (Masada *et al.*, 2009; Osmani *et al.*, 2008).

Funktionen von UGTs

Die Glycosylierung durch UGTs stabilisiert und detoxifiziert vormals reaktive und oft toxische Moleküle. Durch die Übertragung eines polaren Zuckermoleküls erhöht sich ferner die Wasserlöslichkeit des gebildeten Glycosids (Jones und Vogt, 2001). Die Glycosylierung findet in der Regel im Cytosol statt, und stellt oft die Voraussetzung für den Transport der Glycoside in die Vakuole dar. Bisher wurde sowohl der Transport der Glycoside über Protonen-Antiport Transporter (Flavonoid-Glycoside, Klein *et al.*, 1996) als auch über ABC (*ATP-binding cassette*)-Transporter (Herbizide, Frangne *et al.*, 2002) beschrieben.

Die Hauptfunktion der Glycosylierung von Sekundärmetaboliten der Abwehr liegt in der Solubilisierung und Detoxifizierung (z.B. Grubb *et al.*, 2004, Jones *et al.*, 1999; von Rad *et al.*, 2001). UGTs der Familie 1 glycosylieren neben Phytoantizipinen auch Flavonoide und Phytohormone. Hier ist die Glycosylierung vor allem für die Funktionalisierung und Stabilisierung der Substrate bedeutend:

In der Biosynthese der Flavonoide wird in der Regel zunächst die 3-OH-Position des Flavonoid-Grundgerüsts glucosyliert. Flavonoid-3-O-Glucosyltransferasen sind daher in den Angiospermen ubiquitär vorkommende und gut untersuchte Enzyme und konnten bisher aus einer Vielzahl an monokotylen und dikotylen Pflanzen isoliert werden. Die Glucosylierung ist für die Stabilisierung des aromatischen Rings entscheidend (Gachon *et al.*, 2005). Weitere Glycosylierungen und andere Modifikation des Grundgerüsts führen zu der großen Vielfalt der Flavonoide. So kennt man allein für das Flavonol Quercitin über 300 verschiedene Glycoside (Harborne *et al.*, 1999).

Die Bedeutung der Glycosylierung von Pflanzenhormonen ist in der Regulation der Bioaktivität zu sehen. Mit der Ausnahme von Ethylen konnten *in planta* von allen klassischen Pflanzenhormonen Glycoside nachgewiesen werden. Die Zucker-Konjugation ist abhängig vom Hormon reversibel oder irreversibel. Bei der reversiblen Glycosylierung stellen die Hormon-Glycoside Lagerformen der Hormone dar, die durch β -Glucosidasen wieder mobilisiert werden können. Bei der irreversiblen Glycosylierung werden die Hormon-Glycoside dem Katabolismus zugeführt (Bowles *et al.*, 2006). Gut untersucht ist Zeatin. Dieses kommt in der *cis*- und *trans*-Konfiguration vor und wurde als erstes aus Mais (*Zea mays*) isoliert. Aus mehreren Spezies konnten bisher Zeatin Glycosyltransferasen isoliert werden, eine *trans*-Zeatin-O-Glycosyltransferase aus der Gartenbohne (*Phaseolus vulgaris*; Martin *et al.*, 1999a) und der Limabohne (*Phaseolus lunatus*; Martin *et al.*, 1999b) und zwei *cis*-Zeatin-O-Glycosyltransferasen aus *Z. mays* (Martin *et al.*, 2001; Veach *et al.*, 2003). Ein Screening der UGTs von *A. thaliana* resultierte in der Isolation von Cytokinin-O- und Cytokinin-N-Glycosyltransferasen (Hou *et al.*, 2004).

1.2.2 β -Glucosidasen der Familie 1 (GH1)

Einteilung

Glycosidasen, oder auch Glycosidhydrolasen (GH) sind eine weit verbreitete Enzymklasse, welche die Spaltung von glycosidischen Bindungen katalysiert. Sie werden, wie die Glycosyltransferasen, entsprechend ihrer Aminosäureidentität in Familien unterteilt. Aktuell (April 2010) sind in der CAZY Datenbank, (<http://www.cazy.org/>) 115 Glycosidase-Familien aufgeführt (Henrissat, 1991; Henrissat und Davies, 1997). β -Glucosidasen spalten β -glucosidische Bindungen und kommen ubiquitär in Prokaryoten und Eukaryoten vor. Sie gehören u.a. zu den Glycosidase-Familien 1, 3, 5 und 9 (GH1, GH3, GH5 und GH9). In höheren Pflanzen sind β -Glucosidasen an verschiedenen physiologischen Prozessen, wie der Lignifizierung (Dharmawardhana *et al.*, 1995), der Hydrolyse von Zellwand-Oligosacchariden während der Keimung (Leah *et al.*, 1995), der Regulation der Bioaktivität

von Pflanzenhormonen (Brzobohatý *et al.*, 1993; Falk und Rask, 1995) und der Bioaktivierung von Abwehrstoffen (Niemeyer, 2009) beteiligt.

β -Glucosidasen der Familie 1 (GH1) katalysieren vor allem die Hydrolyse von Abwehrsubstanzen des Sekundärmetabolismus, wie z.B. Benzoxazinoid-Glucoside, cyanogene Glycoside, Glucosinolate und Saponine. Zudem sind in dieser Familie Zeatin β -Glucosidasen, β -Mannosidasen und Monolignol β -Glucosidasen vorzufinden. Mit 40 funktionellen β -Glucosidasen aus *A. thaliana* und 34 funktionellen β -Glucosidasen aus *O. sativa* bilden GH1-Enzyme in höheren Pflanzen eine größere Genfamilie (Xu *et al.*, 2004; Opassiri *et al.*, 2006).

Reaktion und Eigenschaften

β -Glucosidasen der Familie 1 (GH1) katalysieren die Hydrolyse von β -glucosidischen Bindungen zwischen zwei Zuckermolekülen oder zwischen einem Zuckermolekül und einem Agluconrest. Die meisten pflanzlichen GH1 Enzyme sind β -O-Glucosidasen, doch auch β -S-Glucosidasen, die sogenannten Myrosinasen, sind in dieser Familie zu finden. Die Hydrolyse findet in zwei Schritten statt, der Glucosylierung und der Deglucosylierung des Enzyms. Dabei wird die anomere Konfiguration der Glucose beibehalten. Die Spaltung der β -glucosidischen Bindungen wird bei GH1 Enzymen durch zwei Glutaminsäurereste katalysiert, die in stark konservierten Aminosäuremotiven (I/VTENG: Nukleophil und NEP: Säure-Base-Katalyse) eingebettet liegen (Withers *et al.*, 1990, Wang *et al.*, 1995). Der Glutaminsäurerest in dem I/VTENG Motiv führt einen nukleophilen Angriff auf das anomere C-Atom der Glucose aus, wodurch ein Enzym-Zucker Intermediat gebildet wird (Glucosylierung). Der Glutaminsäure-Säure-Basen-Katalysator aktiviert in einem zweiten Schritt ein Wassermolekül, so dass dieses wiederum als Nukleophil für die Hydrolyse der glycosidischen Bindung zwischen Enzym und Zucker dienen kann (Deglucosylierung; Davies und Henrissat 1995). Interessanterweise haben Myrosinasen (β -S-Glucosidasen) im Gegensatz zu anderen GH1-Enzymen kein NEP-Motiv und damit keinen Aminosäurerest, der als Säure-Base-Katalysator fungiert. Sie haben stattdessen ein homologes Motiv, in dem Glutaminsäure durch Glutamin ersetzt ist (NQL). Nach Burmeister *et al.* (1997) benötigen Myrosinasen keinen Säure-Katalysator, da die Glucosinolat-Aglucone eine hervorragende Abgangsgruppe darstellen. Der Basen-Katalysator wird bei Myrosinasen durch den exogenen Cofaktor Ascorbinsäure ersetzt (Burmeister *et al.*, 1997).

Kompartimentierung und Proteinglycosylierung

Die schnelle Reaktion auf Pathogene oder Herbivoren durch Phytoantizipine wird durch spezifische β -Glucosidasen ermöglicht. Diese sind in einem anderen Zellkompartiment gespeichert als das Phytoantizipin (Kelly *et al.*, 1998; Thangstad *et al.*, 1991; Höglund *et al.*, 1992) und werden durch die Zerstörung der Zellintegrität durch das Pathogen oder das Herbivor freigesetzt. Die β -Glucosidase hydrolysiert das glycosylierte Phytoantizipin und setzt damit das toxische Aglucon frei. Die Freisetzung des Benzoxazinoids DIMBOA (2,4-Dihydroxy-7-Methoxy-2H-1,4-Benzoxazin-3(4H)-one) ist in *Z. mays* z.B. nach 30 min abgeschlossen (Sicker *et al.*, 2000).

Die Phytoantizipin-Glycoside der cyanogenen Glycoside (Saunders *et al.*, 1977; Saunders und Conn, 1978, Gruhnert *et al.*, 1994), der Glucosinolate (Kelly *et al.*, 1998) und der Saponine (Kesselmeier und Urban, 1983) sind sowohl in monokotylen als auch in dikotylen Pflanzen in der Vakuole gespeichert. Die subzelluläre Lokalisation der spezifischen β -Glucosidasen unterscheidet sich aber in monokotylen und dikotylen Pflanzen. Monokotyle β -Glucosidasen tragen ein Chloroplast Transitpeptid. Die Lokalisation im Chloroplasten wurde z.B. für die Benzoxazinoid-Glucosid β -Glucosidase aus *Z. mays* (Esen und Stetler, 1993), die Dhurrin β -Glucosidase aus *S. bicolor* (Thayer und Conn, 1981) und die Avenacosid β -Glucosidase aus *A. sativa* (Nisius, 1988; Gusmayer *et al.*, 1994) gezeigt. Dikotyle β -Glucosidasen dagegen weisen ein N-terminales Signalpeptid aus, das den Transport der Enzyme in den apoplastischen Raum (Linamarase aus dem Kautschukbaum (*Hevea brasiliens*); Gruhnert *et al.*, 1994) oder bei den β -Glucosidasen von Glucosinolaten (Myrosinase) in Proteinkörper (*Protein bodies*) von spezialisierten Zelltypen, den sogenannten Myrosin-Zellen, zur Folge hat (Höglund *et al.* 1992, Thangstad *et al.*, 2004).

Mit der unterschiedlichen Lokalisation der monokotylen und dikotylen β -Glucosidasen gehen unterschiedliche Modifikationen der Enzyme einher. Im Gegensatz zu monokotylen β -Glucosidasen werden dikotyle β -Glucosidasen über den sekretorischen Weg zu ihrem Bestimmungsort geführt. Während der Translokation durch das Endoplasmatische Retikulum werden die β -Glucosidasen dabei cotranslational glycosyliert. Dies konnte z.B. für die Linamarase aus *T. repens* durch Polypeptid-Sequenzierung gezeigt werden (Barrett *et al.*, 1995). Bei der Myrosinase aus *S. alba* ist die starke Glycosylierung der β -Glucosidase an 11 Positionen aus der Kristallstruktur zu ersehen (Burmeister *et al.*, 1997). Monokotyle β -Glucosidasen werden dagegen posttranslational in den Chloroplasten transportiert, bisher konnte für diese Enzyme keine Glycosylierung gezeigt werden (Esen und Stetler, 1993). Die Glycosylierung der β -Glucosidasen aus dikotylen Pflanzen ist meist für deren Enzymaktivität erforderlich. Es wird angenommen, dass die Glycosylierung für die Stabilisierung der Enzyme nötig ist (Morant *et al.*, 2008a). Für die funktionelle Expression der Enzyme werden

diese daher stabil in *A. thaliana* (Morant *et al.*, 2008b), in der Hefespezies *Pichia pastoris* (Zhou *et al.*, 2002), transient in der Tabakspezies *Nicotiana benthamiana* (diese Arbeit), oder - nach der Fusion an ein stabilisierendes Protein - in *Escherichia coli* (Keresztessy *et al.*, 1996; Suzuki *et al.*, 2006) exprimiert.

Enzymstruktur

Die Strukturen der Benzoxazinoid-Glucosid hydrolysierenden β -Glucosidasen *ZmGLU1* und *TaGLU1a* aus *Z. mays* und Weizen (*Triticum aestivum*; Czjzek *et al.*, 2000, 2001; Sue *et al.*, 2006), der Dhurrinase *SbDh1* aus *S. bicolor*, (Verdoucq *et al.*, 2004), der Linamarase *TrCBG* aus *T. repens* (Barrett *et al.*, 1995), sowie der Myrosinase aus *S. alba* (Burmeister *et al.*, 1997) sind aufgeklärt. Die zentrale Domäne der GH1 besitzt eine α/β -Barrel-Struktur (TIM-barrel), die nach dem heutigen Kenntnisstand das am weitesten verbreitete Proteinfaltungsmotiv darstellt. Die Sekundärstruktur des linearen Proteinstrangs besteht aus je 8 α -Helices und 8 β -Faltblättern, die in alternierender Reihenfolge vorkommen. Die dreidimensionale Fass-artige Struktur entsteht durch die parallele, kreisförmige Anordnung der β -Faltblätter, welche außen von α -Helices umgeben sind. Aminosäurereste, die für die enzymatische Aktivität und die Substrat-Spezifität verantwortlich sind, sind am C-terminalen Ende der einzelnen α -Helices und β -Faltblättern lokalisiert und bilden eine enge Substratbindetasche aus (Czjzek *et al.*, 2000, 2001; Sue *et al.*, 2006).

Die Quartärstruktur von pflanzlichen β -Glucosidasen der Familie 1 ist im Gegensatz zur konservierten Tertiärstruktur der Enzyme sehr vielfältig. Die quartären Strukturen reichen von aktiven Monomeren (Amygdalin und Prunasin β -Glucosidase; Kuroki und Poulton, 1986; Li *et al.*, 1992) über Dimere und Tetramere bis hin zu Dekameren (Linamarase; Fan und Conn, 1985). Die Oligomerisierung hat nicht immer einen Einfluss auf die Enzymaktivität: Die *S. bicolor* Dhurrinase 1 (*SbDHR1*) existiert *in planta* als Tetramer, doch weisen die *SbDHR1*-Dimere keine veränderten Enzymaktivitäten auf (Hosel *et al.*, 1987). Die Benzoxazinoid β -Glucosidasen *TaGLU1a-TaGLU1b*, sowie die Saponin β -Glucosidasen *AsGLU1* und *AsGLU2* bilden sowohl Homo- als auch Heteromultimere (Sue *et al.*, 2006; Kim und Kim, 1998; Kim *et al.*, 2000). Bisher gibt es keine Erkenntnisse, ob die verschiedenen Kombinationen der Isoenzym-Monomere unterschiedliche Substratspezifitäten oder Enzymaktivitäten zur Folge haben.

Die Regionen, über die die β -Glucosidase-Monomere oligomerisieren, zeigen kein gemeinsames Muster auf. Czjzek *et al.* konnten bei einem Vergleich dieser Regionen der Benzoxazinoid β -Glucosidase *ZmGLU1*, der cyanogenen β -Glucosidase *TrCBGLU* und der Myrosinase *SaMYR* keine Ähnlichkeiten feststellen (Czjzek *et al.*, 2001). Auch die

Orientierung der Monomere innerhalb eines Dimers unterscheidet sich (Burmeister *et al.*, 1997). Das Auftreten diverser Oligomerisierungsformen der β -Glucosidasen der Familie 1, trotz deren stark konservierten Tertiärstruktur, deutet darauf hin, dass die Quartärstruktur nach der Spezialisierung der Enzyme evolviert ist (Morant *et al.*, 2008a).

1.3 Benzoxazinoid-Glucoside als Modellsystem der Phytoantizipin Biosynthese

Benzoxazinoid-Glucoside sind charakteristische Phytoantizipine der Familie der Gräser (Poaceae, Monocotyledoneae). Hier findet man Benzoxazinoide in den bedeutenden Kulturpflanzen Roggen (*Secale cereale*), *T. aestivum*, und *Z. mays*. Die systematische Analyse verschiedener Gerstearten ergab, dass die Wildgersten *Hordeum brachyantherum*, *Hordeum flexuosum*, *Hordeum lechleri* und *Hordeum roshevitzii* DIBOA synthetisieren, während die Kulturgerste *Hordeum vulgare* kein DIBOA bildet (Grün *et al.*, 2005). Während in *S. cereale* und den Wildgersten das Benzoxazinoid DIBOA vorkommt, ist in *Z. mays* und *T. aestivum* das Haupt-Benzoxazinoid DIMBOA. Außerhalb der Gräser findet man Benzoxazinone in zwei phylogenetisch weit entfernten Ordnungen der dikotylen Pflanzen, in den Ranunculales und den Lamiales.

In der Ordnung Ranunculales produziert ausschließlich eine Spezies der Familie Ranunculaceae (Rittersporn; *Consolida orientalis*) Benzoxazinoide. In der Ordnung Lamiales synthetisiert jeweils eine Spezies der Familien Lamiaceae (Goldnessel; *Lamium galeobdolon*) und Plantaginaceae (süßer Besenginster; *Scoparia dulcis*) Benzoxazinoide (Sicker *et al.*, 2000; Özden *et al.*, 1992; Alipieva *et al.*, 2003), während in der Familie Acanthaceae Benzoxazinoide aus mehreren Spezies (*Acanthus mollis*, *Aphelandra tetragona*, *Aphelandra squarrosa*, *Blepharis edulis*, *Crossandra infundibuliformis*, *Crossandra pungens*) isoliert werden konnten (Sicker *et al.*, 2000; Pratt *et al.*, 1995; Abbildung 3). In dieser Arbeit werden die beiden dikotylen Spezies *C. orientalis* und *L. galeobdolon* untersucht. Beide sind nach bisherigen Untersuchungen die einzige Benzoxazinoid-synthetisierende Spezies der jeweiligen Pflanzenfamilie und beide synthetisieren Benzoxazinoide in ähnlich hohen Konzentrationen wie sie bei *Z. mays* gefunden werden (bis zu 19 mM; Schullehner *et al.*, 2008). *C. orientalis* und *L. galeobdolon* bilden das Benzoxazinoid DIBOA (Sicker *et al.*, 2000).

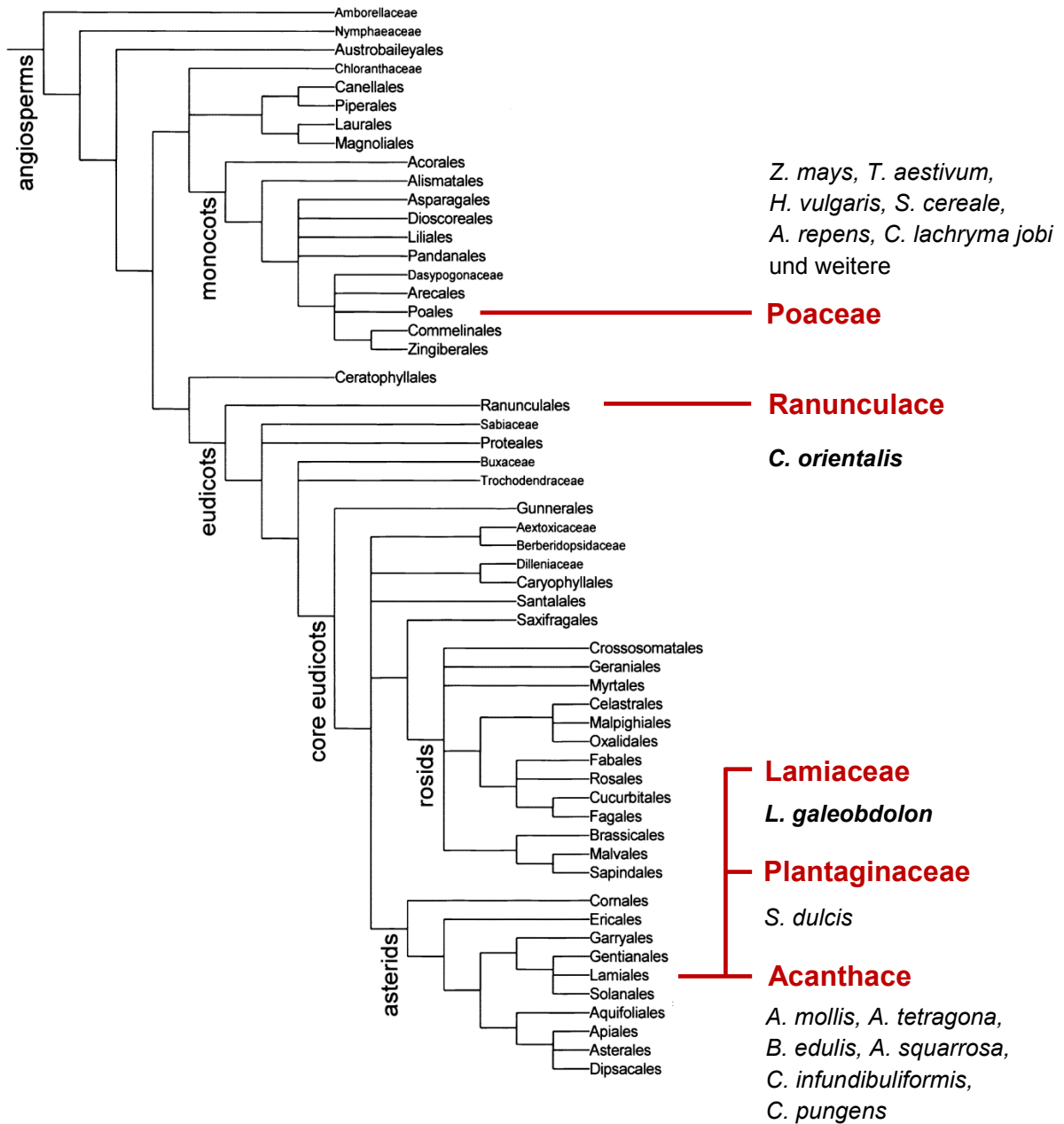


Abbildung 3: Phylogenie der Pflanzenordnungen der Angiospermen (*the Angiosperm Phylogeny group*, 2003). Pflanzenfamilien mit Spezies, die Benzoxazinoide produzieren sind rot dargestellt. Spezies dieser Familien, aus denen Benzoxazinoide isoliert werden konnten, sind aufgelistet; die in dieser Arbeit untersuchten Spezies sind fett gedruckt. Benzoxazinoide produzierende Spezies sind *Zea mays* (*Z. mays*), *Hordeum vulgare* (*H. vulgare*), *Triticum aestivum* (*T. aestivum*), *Secale cereale* (*S. cereale*), *Agropyron repens* (*A. repens*), *Coix lachryma jobi* (*C. lachryma jobi*), *Consolida orientalis* (*C. orientalis*), *Lamium galeobdolon* (*L. galeobdolon*), *Scoparia dulcis* (*S. dulcis*), *Acanthus mollis* (*A. mollis*), *Aphelandra tetragona* (*A. tetragona*), *A. squarrosa* (*A. squarrosa*), *Blepharis edulis* (*B. edulis*), *Crossandra infundibuliformis* (*C. infundibuliformis*) und *Crossandra pungen* (*C. pungen*).

1.3.1 Biosynthese und Bioaktivierung in Gräsern

In *Z. mays* ist eine Serie von fünf Enzymen für die DIBOA-Biosynthese ausreichend (Frey *et al.*, 1997, 2003; Glawischnig *et al.*, 1999; von Rad *et al.*, 2001; Jonczyk *et al.*, 2008; Abbildung 4): Die Abzweigung vom Primärmetabolismus durch die Spaltung von Indol-3-Glycerinphosphat in freies Indol und Glycerinaldehyd-3-Phosphat wird durch *ZmBX1* katalysiert. Vier Cytochrom-P450-abhängige Monooxygenasen (*ZmBX2-ZmBX5*) führen konsekutiv vier Sauerstoffatome in das Indolmolekül ein. Die Reaktionsschritte der DIBOA-Biosynthese sind in den Gräsern *Z. mays*, *T. aestivum*, *H. lechleri* und *S. cereale* identisch. Orthologe BX1-BX5-Enzyme konnten aus *T. aestivum* (Nomura *et al.*, 2002, 2003, 2005), *S. cereale* (Nomura *et al.*, 2003) und *H. lechleri* (Grün *et al.*, 2005) isoliert werden. Die DIBOA-Biosynthese Gene haben in diesen Gräsern einen monophyletischer Ursprung (Grün *et al.*, 2005; Frey *et al.*, 2009).

Die Reaktivität von DIBOA wird durch dessen Glucosylierung reduziert. Die *Z. mays* Glucosyltransferasen *ZmBX8* und *ZmBX9* katalysieren die Bildung eines D-Glucosids aus dem toxischen Aglucon. Aus *T. aestivum* konnte eine homologe Gensequenz zu *ZmBx8* und *ZmBx9* identifiziert werden (*TaBx8*). *TaBx8* wurde in seiner Funktion als Benzoxazinoid Glucosyltransferase bestätigt (Luzak, 2010; Hillenmeyer, 2010). Es kann daher in den Gräsern auch für die Benzoxazinoid Glucosyltransferase von einer monophyletischen Evolution ausgegangen werden.

Über eine Hydroxylierung durch die 2-Oxoglutarat abhängige Dioxygenase *ZmBX6* und eine anschließende Methylierung durch die O-Methyltransferase *ZmBX7* wird DIBOA-Glucosid (GDIBOA) weiter in sein 7-Methoxy-Analog DIMBOA-Glucosid (GDIMBOA) überführt. Dieses wird in der Vakuole gelagert. Für *T. aestivum* sind diese Gene der Biosynthese nicht bekannt, durch Inhibitorexperimente ist lediglich belegt, dass die Hydroxylierung am C7-Atom ebenfalls durch eine 2-Oxoglutarat abhängige Dioxygenase katalysiert wird (Frey *et al.*, 2003).

Bei Zerstörung der Zellintegrität wird das Glucosid durch die zwei im Chloroplasten lokalisierten spezifischen β -Glucosidasen *ZmGLU1* und *ZmGLU2* in das toxische Aglucon überführt (Bioaktivierung; Esen, 1992; Cuevas *et al.*, 1992; Bandaranayake und Esen, 1996; Cicek und Esen, 1999). Es konnten weiterhin eine β -Glucosidase aus *S. cereale* (*ScGLU*; Nikus *et al.*, 2003) und 3 Isoenzyme aus *T. aestivum* (*TaGLU1a-TaGLU1c*; Sue *et al.*, 2006) isoliert werden. Die phylogenetische Analyse von GH1 β -Glucosidasen verschiedener Abwehrsysteme (Bioaktivierungsfunktionen; Morant *et al.*, 2008a) weist auf einen gemeinsamen Vorläufer für β -Glucosidasen der Abwehrsysteme Benzoxazinoid-Glucoside, cyanogene Glycoside (Dhurrin) und Saponine in monokotylen Pflanzen hin.

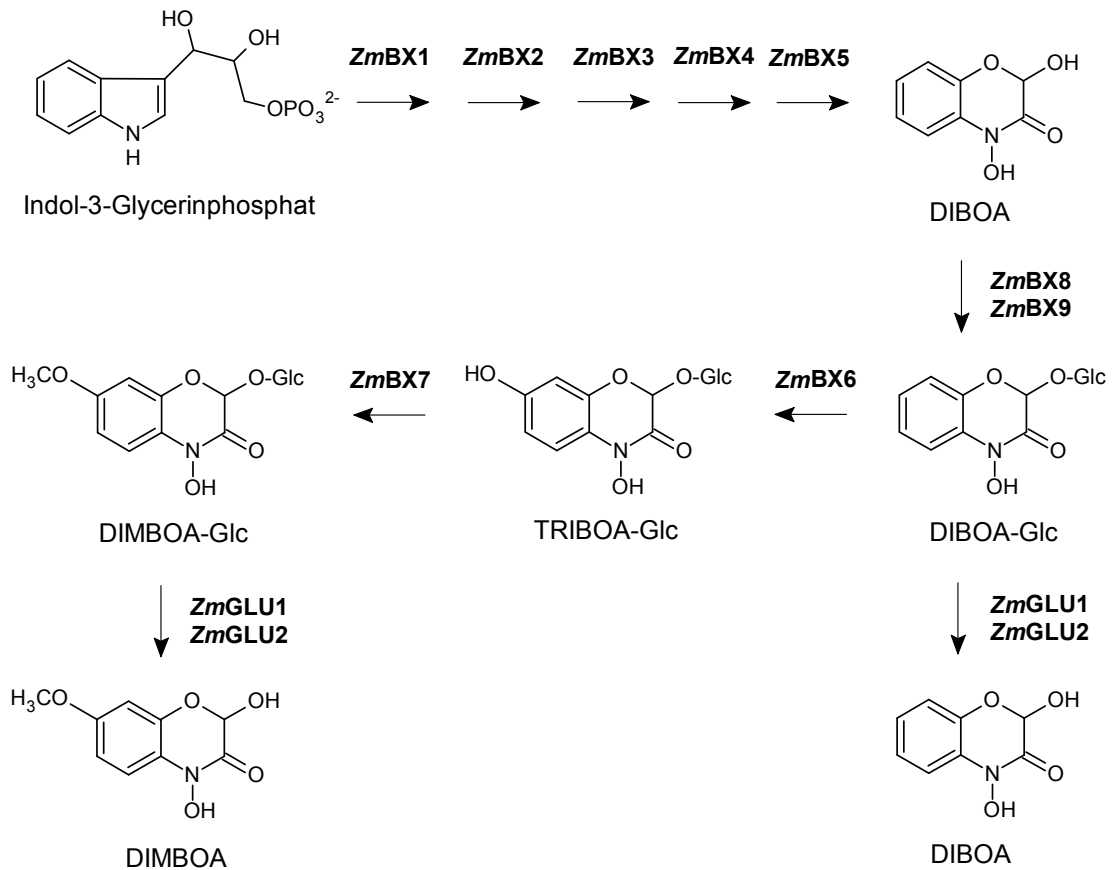


Abbildung 4: Enzyme und Intermediate der Benzoxazinoid-Biosynthese und -Bioaktivierung in *Z. mays*. Ein homologes Enzym der Tryptophan Synthase α (TSA), *ZmBX1* und Cytochrom-P450-abhängige Monooxygenasen, *ZmBX2-ZmBX5* katalysieren die Biosynthese von DIBOA aus Indol-3-Glycerinphosphat. Die Benzoxazinoid Glucosyltransferasen *ZmBX8* und *ZmBX9* glucosylieren DIBOA. DIBOA-Glucosid (GDIBOA), wird durch eine Hydroxylierung (2-Oxoglutarat abhängige Dioxygenase, *ZmBX6*) und Methylierung (O-Methyltransferase, *ZmBX7*) zu DIMBOA-Glucosid (GDIMBOA) umgesetzt. GDIBOA und GDIMBOA werden durch 2 spezifische β -Glucosidasen, *ZmGLU1* und *ZmGLU2* hydrolysiert und bioaktiviert. Glc: Glucosid.

1.3.2 Biosynthese in den dikotylen Pflanzen *C. orientalis* und *L. galeobdolon*

In *C. orientalis* und *L. galeobdolon* wird das Benzoxazinoid DIBOA gebildet. Im Unterschied zu *Z. mays*, in dem die Biosynthese auf den Keimling und junge Pflanzen beschränkt ist, findet man DIBOA in *C. orientalis* und *L. galeobdolon* unabhängig vom Entwicklungsstadium in allen oberirdischen Pflanzenorganen. Die gemessenen Benzoxazinoid-Konzentrationen sind in derselben Größenordnung (*L. galeobdolon*, bis zu 19 mM) oder übersteigen (*C. orientalis*; bis zu 36 mM) sogar die Konzentrationen von bis zu 19 mM, die man in *Z. mays* nachweist (Schullehner *et al.*, 2008). Mit Hilfe von Fütterungsversuchen konnte festgestellt werden, dass auch in *C. orientalis* und *L. galeobdolon* Indol das erste Intermediat der Benzoxazinoid-Biosynthese darstellt. Aus *C. orientalis* und *L. galeobdolon* konnten mehrere Indol-3-Glycerinphosphatlyasen (IGLs) isoliert und charakterisiert werden, die Indol-

3-Glycerinphosphat zu Indol umsetzen. Für jede Spezies wurde dabei ein Enzym gefunden, welches mit einer hohen Effizienz Indol synthetisiert und daher den ersten spezifischen Schritt der Benzoxazinoid-Biosynthese katalysieren könnte. Die isolierte IGL aus *C. orientalis* (CoBX1) weist Enzymeigenschaften auf, die denen der BX1-Enzyme von *Z. mays* und *T. aestivum* entsprechen (Schullehner *et al.*, 2008). Auch korreliert die Genexpression von *CoBx1* mit der DIBOA-Neusyntheserate in unterschiedlichen Pflanzengewebe. CoBX1 stellt daher mit großer Wahrscheinlichkeit das *Branchpoint*-Enzym des DIBOA-Biosynthesewegs dar, welches Indol für die DIBOA-Biosynthese bereitstellt (Schullehner *et al.*, 2008).

1.3.3 Untersuchungen zur Evolution der Benzoxazinoid-Biosynthese in monokotylen und dikotylen Pflanzen

Die vollständige Aufklärung ihrer Biosynthese in *Z. mays* machen Benzoxazinoid-Glucoside zu einem guten Modellsystem für die Untersuchung der Evolution von Phytoantizipinen. Die für die Biosynthese von Phytoantizipinen charakteristische Unterteilung in die vier funktionellen Einheiten, Abzweigung vom Primärmetabolismus, Funktionalisierung, Detoxifizierung und Bioaktivierung trifft auch für die Benzoxazinoid-Biosynthese zu.

Besonders das Vorkommen der Benzoxazinoide in vielen Spezies der monokotylen Gräser einerseits, und in einzelnen Spezies von phylogenetisch weit entfernten Familien der dikotylen Pflanzen wirft die Fragestellung nach der Evolution der Benzoxazinoid-Biosynthese in monokotylen und dikotylen Pflanzen auf. Bisher wurde einzig die Indol-3-Glycerinphosphatlyase aus *C. orientalis* (CoBX1) isoliert (Schullehner *et al.*, 2008). Für das *Branchpoint*-Enzym CoBX1 konnte eine unabhängige Evolution von *Z. mays* ZmBX1 gezeigt werden; beide Enzyme können auf die Duplikation und Funktionalisierung der α -Untereinheit der Tryptophan-Synthase (TSA) des Primärstoffwechsels zurückgeführt werden (Gierl und Frey, 2001; Schullehner *et al.*, 2008). Die Phylogenie der Gene der Funktionalisierung (*Bx2-5*), Detoxifizierung (*Bx8* bzw. *Bx9*) und Bioaktivierung (*Glu*) in monokotylen und dikotylen Pflanzen wurde bisher nicht analysiert.

1.4 Ziel der Arbeit

Das Benzoxazinoid-Abwehrsystem stellt ein gutes Modellsystem für die Untersuchung der Evolution von Phytoantizipinen in Pflanzen dar. Phylogentische Untersuchungen werden in dieser Arbeit aufklären, ob in monokotylen und dikotylen Pflanzen unterschiedliche Vorläufer der UGT- und β -Glucosidase-Genfamilien für die Detoxifizierung und Bioaktivierung von Benzoxazinoiden rekrutiert wurden. Dazu werden die UDP-abhängigen Glucosyltransferasen CoBX8 und LgBX8 aus *C. orientalis* und *L. galeobdolon* isoliert, die das toxische Aglucon DIBOA detoxifizieren. Zudem soll die spezifische GDIBOA β -Glucosidase aus *C. orientalis* isoliert werden, die das GDIBOA bei Schädigung der Pflanze, z.B. durch ein Pathogen, bioaktiviert.

Durch eine phylogenetische Analyse soll die Evolution dieser Enzymfunktionen in monokotylen und dikotylen Pflanzen analysiert werden. Die dikotylen Enzyme sollen bezüglich ihrer kinetischen Parameter, ihrer Substratspezifität und ihres Expressionsmusters mit den Enzymen aus den Gräsern verglichen werden. Die Ergebnisse sollen einen Einblick in die Evolution der Benzoxazinoid-Biosynthese geben.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien (analytischer Reinheitsgrad) wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Bio-Rad® (USA), Boehringer (Mannheim), Fluka (Schweiz), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma-Aldrich (USA) bezogen.

DNA-Restriktionsenzyme und DNA modifizierende Enzyme wurden bei den Firmen Roche (Schweiz), New England Biolabs (USA), Promega (USA) und Qiagen (Hilden) bezogen. Oligonukleotide wurden von biomers (Ulm) und Eurofins MWG Operon (Ebersberg) im Auftrag synthetisiert.

Die Substrate DIBOA und DIMBOA wurden von Prof. Dr. Sicker, Universität Leipzig freundlicherweise zu Verfügung gestellt. DIBOA wurde außerdem aus *L. galeobdolon* isoliert, DIMBOA aus *Z. mays*-Keimlingen. GDIBOA und GDIMBOA wurden aus *L. galeobdolon* bzw. *Z. mays*-Keimlingen isoliert (siehe 2.4.2 und 2.4.3). Die Flavonoide Kaempferol, Quercetin, Myricetin, Pelargonidin und Delphinidin wurden von Prof. Dr. Schwab, TUM freundlicherweise zu Verfügung gestellt. Die Cytokinine *trans*-Zeatin und Zeatin-Ribosid wurden von Duchefa Biochemie B.V (Haarlem, Niederlande) und das Cytokinin *trans*-Zeatin-O-Glucosid (tZOG) wurde von OIChemIm Ltd. (Olomouc, Tschechien) erworben. Dhurrin wurde von Roth (Karlsruhe) bezogen.

Der Proteinstandard peqGOLD Protein Marker wurde von PEQLAB (Erlangen) erworben. Als DNA- bzw. RNA-Längenstandard wurden der 1 kb Plus DNA Marker bzw. der 0,5-10 kb RNA Marker von Invitrogen eingesetzt.

2.1.2 Phagenbanken

Es wurden Phagenbanken von *C. orientalis* (zwei Wochen alte Keimlinge) und *L. galeobdolon* (junge Blätter) im Vektor λ -ZAP (Stratagene, USA) verwendet (Schullehner *et al.*, 2008).

2.1.3 Plasmide

Tabelle 1: eingesetzte Plasmide.

Plasmid	Resistenzmarker	Hersteller/Literaturnachweis
pBluescript II KS	Ampicillin	Stratagene
pBluescript SK	Ampicillin	Stratagene
pGEM ®-T Easy	Ampicillin	Promega
pET28a-His	Kanamycin	Novagen
pET3a	Ampicillin	Novagen
pET-32a Trx	Ampicillin	Novagen
pICH31070	Kanamycin	Icon Genetics
pICH7410	Carbenicillin	Icon Genetics
pICH20111	Carbenicillin	Icon Genetics
pICH20115	Carbenicillin	Icon Genetics
pICH14011	Carbenicillin	Icon Genetics
pGPTV-BarB	Kanamycin, BASTA	Becker <i>et al.</i> , 1992
pUbicasC2Intron/-Sal	Ampicillin	Reinhold Brettschneider, Biozentrum Klein Flottbek
TF 101.1	Spectinomycin	Kan Wang, Iowa State University

2.1.4 Bakterienstämme

Tabelle 2: eingesetzte Bakterienstämme von *E. coli* und *A. tumefaciens*.

Bakterienstamm	Resistenzmarker	Hersteller/Literaturnachweis
<i>E. coli</i>		
XL1-Blue		Bullock, <i>et al.</i> , 1978
XL1-Blue MRF'	Tetracyclin	Stratagene, USA
SOLR™	Kanamycin	Stratagene, USA
K803		Wood, 1966
BL21 (DE3)		Sudier und Mofat, 1986
Origami™ (DE3)	Kanamycin	Novagen
Lemo21 (DE3)	Chloramphenicol	New England Biolabs
<i>A. tumefaciens</i>		
GV3101	Rifampicin	van Larebeke <i>et al.</i> , 1974
GV3101 pMP90:RK	Rifampicin, Gentamycin, Kanamycin	Koncz und Schell, 1986

2.1.5 Oligonukleotide

Tabelle 3: PCR-Primer für die Amplifikation von Sonden für das Phagenscreening.

Name	Sequenz	Gen
fwd44993	ATA GTT CTT CAG ATG TAC CTC C	<i>CoBx8</i>
rev44993	CCC ACT TGT TAC AGA TAT AGA A	<i>CoBx8</i>
LamAnthSfwd	CTT AGA TAA GAA TCC GTC GCC	<i>LgGt</i>
LamAnthSrev	CTT CCT TGT GGT TCA ACT GC	<i>LgGt</i>

Tabelle 4: Oligonukleotide, die für die Amplifikation von UDPG-Glycosyltransferasen-Kandidatenteilsequenzen aus *L. galeobdolon* verwendet wurden.

Name	Sequenz	Gen/Vektor
LamGT3a	GAG ANG ART TCC ANC CRC A	LgUGTs
LamGT3b	GAG ANG ART TCC ANC CRC ART G	LgUGTs
T3	AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG	pBluescript SK
M13rev	GGA AAC AGC TAT GAC CAT GA	pBluescript SK
LamGT1	GAG ACA YTG YGG NTG GAA Y	LgUGTs
LamGT2a	GAG ACA YTG YGG NTG GAA YTC	LgUGTs
T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	pBluescript SK
M1320	GTA AAA CGA CGG CCA GTG	pBluescript SK
Oligo d(T)-anchor primer	GAC CAC GCG TAT CGA TGT CGA CTT TTT TTT	PolyA
PCR anchor primer	TTT TTT TTV GAC CAC GCG TAT CGA TGT CGA C	Oligo d(T)-anchor

Tabelle 5: Primer zur Erstellung von amiRNA-Konstrukten.

Name	Sequenz	Gen
1Bx8-I miR-s	AGT AGT GGG TGA AGA AGC CGC CGC AGG AGA TTC AGT TTG A	<i>ZmBx8</i>
1Bx8-II miR-a	TGC GGC GGC TTC TTC ACC CAC TAC TGC TGC TGC TAC AGCC	<i>ZmBx8</i>
1Bx8-III miR*s	CTC GGC GCC TTG TTC ACC CAC TAT TCC TGC TGC TAG GCT G	<i>ZmBx8</i>
1Bx8-IV miR*a	AAT AGT GGG TGA ACA AGG CGC CGA GAG AGG CAA AAG TGA A	<i>ZmBx8</i>
5Bx8-I miR-s	AGT CCT TGT CGA CCA AGG TGC GGC AGG AGA TTC AGT TTG A	<i>ZmBx8</i>
5Bx8-II miR-a	TGC CGC ACC TTG GTC GAC AAG GAC TGC TGC TGC TAC AGC C	<i>ZmBx8</i>
5Bx8-III miR*s	CTC CGC AGC TTC GTC GAC AAG GAT TCC TGC TGC TAG GCT G	<i>ZmBx8</i>
5Bx8-IV miR*a	AAT CCT TGT CGA CGA AGC TGC GGA GAG AGG CAA AAG TGA A	<i>ZmBx8</i>
6Bx9-I miR-s	AGT CCT TGT CGA TCA AGG TGC GGC AGG AGA TTC AGT TTG A	<i>ZmBx9</i>
6Bx9-II miR-a	TGC CGC ACC TTG ATC GAC AAG GAC TGC TGC TGC TAC AGC C	<i>ZmBx9</i>
6Bx9-III miR*s	CTC CGC AGC TTC ATC GAC AAG GAT TCC TGC TGC TAG GCT G	<i>ZmBx9</i>
6Bx9-IV miR*a	AAT CCT TGT CGA TGA AGC TGC GGA GAG AGG CAA AAG TGA A	<i>ZmBx9</i>
20Bx9-I miR-s	AGT AGG AAG ACA AGT CGA GCA CGC AGG AGA TTC AGT TTG A	<i>ZmBx9</i>
20Bx9II miR-a	TGC GTG CTC GAC TTG TCT TCC TAC TGC TGC TGC TAC AGC C	<i>ZmBx9</i>
20Bx9III miR*s	CTC GTG CAC GAG TTG TCT TCC TAT TCC TGC TGC TAG GCT G	<i>ZmBx9</i>
20Bx9IV miR*a	AAT AGG AAG ACA ACT CGT GCA CGA GAG AGG CAA AAG TGA A	<i>ZmBx9</i>
G-4368	CTG CAA GGC GAT TAA GTT GGG TAA C	<i>ZmBx8/ZmBx9</i>
G-4369	GCG GAT AAC AAT TTC ACA CAG GAA ACA G	<i>ZmBx8/ZmBx9</i>
G-11491	TCG GAT CCC AGC AGC AGC CAC AGC AAA	<i>ZmBx8/ZmBx9</i>

Tabelle 6: Primer für die Amplifikation des *Bar*-Gens.

Name	Sequenz	Gen
BarTransf2	ACG GAC GAC CTC GTC CGT CT	<i>Bar</i>
BarTransr2	AGA TCT CGG TGA CGG GCA GGA	<i>Bar</i>

Tabelle 7: PCR-Primer für die Isolierung von fehlenden 5'- und 3'-cDNA-Enden.

Name	Sequenz	Gen/Vektor
530Contig40372	CAA TGG AGA AGG TAC GAG CAG	<i>CoGt</i>
560Contig40372	CAG ATG AGA TCC TTA AGG GAA	<i>CoGt</i>
905Contig40372	TAC CAT TTC TGT GGT CAC TCA AGG A	<i>CoGt</i>
LamAnthfwd1	CCA ATC GCA GAC GAC AAA TC	<i>LgGt</i>
LamAnthfwd2	CTT TCT GTG GTC GCT GAA AG	<i>LgGt</i>
LamAnthrev1	TAG GTC TGG TTT GCT TTC CC	<i>LgGt</i>
LamAnthfwd2	ATC GAA GGT CCG ATG TTG AG	<i>LgGt</i>
LamGTKand11rev1	CCT TCA CAT ACG GTC TTT GC	<i>pLgBx8</i>
LamGTKand11rev2	ATC CCA CTT CCA TCA CCA TC	<i>pLgBx8</i>
LamGTKand11rev1a	CCT TCA ATC TCA TTG CAT TTG C	<i>pLgBx8</i>
LgGTK11rev3	TCT CCT CCG GAT TGG AAG AA	<i>pLgBx8</i>
LgGTK11rev4	CTT TCA ACG ATT CAG GCA T	<i>pLgBx8</i>
LgGTK11rev5	CTT CAA CTT CTT AAA GGG AT	<i>pLgBx8</i>
477Contig39263fwd	GAT GAA CTC GTG TCA AAA GGT	<i>CoGlu2</i>
516Contig39263fwd	CTG TTT CAT TGG GAT GTA CCT	<i>CoGlu2</i>
320Contig39263fwd	GTA TCA GGG TGA TCA AAA TGG	<i>CoGlu2</i>
361Contig39263fwd	GTT TGG ATG GTG CCT TTC TCT G	<i>CoGlu2</i>
T3 lang Primer	CGA AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG	pBluescript SK
SK Primer	CGC TCT AGA ACT AGT GGA TCC C	pBluescript SK
Adaptor Primer	CAG GAA TTC GGC ACG AGG	ZAP-cDNA®
T3	AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG	pBluescript SK
M13rev	GGA AAC AGC TAT GAC CAT GA	pBluescript SK
T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	pBluescript SK
M1320	GTA AAA CGA CGG CCA GTG	pBluescript SK

Tabelle 8: Primer zur Sequenzierung.

Name	Sequenz	Gen/Vektor
T3	AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG	pBluescript KS
M13rev	GGA AAC AGC TAT GAC CAT GA	pBluescript KS
T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	pBluescript KS
M1320	GTA AAA CGA CGG CCA GTG	pBluescript KS
44993seq	GAT AGA GCT TCA GGG ATA GTT	<i>CoBx8</i>
LgGTK11fwd2	AGT GGC AGG CCC AGC TCA A	<i>pLgBx8</i>
LgGTK11rev7	CTC ATC TTT ATC CCA AGC TGG T	<i>pLgBx8</i>
LgGTK11fwd3	TCG ATT CTG GAA GGT TTG AGT A	<i>pLgBx8</i>
LgGTK11rev8	GAC CAT TTG TAC TAT GTT ATC C	<i>pLgBx8</i>
LgGTK11rev9	AGC GTC ACC TTA AGG CCG T	<i>pLgBx8</i>

Tabelle 9: Primer für die quantitative RT-PCR.

Name	Sequenz	Gen
GAPDHdicotfwd	ATC AAG ATC GCA ATC AAC GG	<i>CoGAPDH</i>
GAPDHdicotfwd rev44993	GCA CTT TTC CAA CAG CCT TG CCC ACT TGT TAC AGA TAT AGA A	<i>CoGAPDH</i> <i>CoBx8</i>
44993seq	GAT AGA GCT TCA GGG ATA GTT	<i>CoBx8</i>
GT2_qua2f	TCG TCA CGG CGC TCA ACG CCG C	<i>ZmBx8</i>
GT2_Lc1r	GAC TGC GTC GTC CTT GCG CTC	<i>ZmBx8</i>
GT1LC1RUTA	GGA TCC TCC TTG CGC TCC TCT TTC	<i>ZmBx9</i>
BX9A	TCG TCA CCA CGC TGA ACG CCA G	<i>ZmBx9</i>
GAPCR	TAG CCC CAC TCG TTG TCG TAC CA	<i>ZmGAPDH</i>
GAPCF	GCT AGC TGC ACC ACA AAC TGC CT	<i>ZmGAPDH</i>
CoGludaseQuF	ATG GAG ATG TAG CGA ATG ATC A	<i>CoGlu1</i>
CoGludaseQuRev	GGC AAG AAT TTG GTG GTG AGT A	<i>CoGlu1</i>

Tabelle 10: (*Mismatch*-)Primer für die Klonierung in die Expressionsvektoren pET28a, pET3a und pICH31070. Die jeweiligen Schnittstellen sind unterstrichen.

Name	Sequenz	Gen (Vektor)
44993seqfwd	GAG AGA <u>CAT ATG</u> GCA TCT TCA TCT CCC AAA ACA CCT <u>CAT ATA</u> G	<i>CoBx8</i> (pET28a)
44993seqrev	GGA CCA AGT TCT TCG GAG ACC	<i>CoBx8</i> (pET28a)
905Contig40372	TAC CAT TTC TGT GGT CAC TCA AGG A	<i>CoGt</i> (pET28a)
40372NdeIStart	GAG AGA <u>CAT ATG</u> GGG CAG AGC AAG AGC GAG AGC GAG <u>GCA</u>	<i>CoGt</i> (pET28a)
1105Contig40372	GTA CAC TAT CGG CAC AGC ACC CA	<i>CoGt</i> (pET28a)
40372BamHISop	GAG AGA <u>GGA TCC</u> TTA GTT GCG AGC GGT TAC TAT CTT	<i>CoGt</i> (pET28a)
AnthANdelfwd	GAG AGA <u>CAT ATG</u> GTG TTT GAG TCT CA	<i>LgGt</i> (pET28a)
AnthArev	GAG TGC CTG TAG TAT TTC ATG	<i>LgGt</i> (pET28a)
AnthBfwd	TCT GCT TCC TGC TCT CTC TC	<i>LgGt</i> (pET28a)
AnthBBamHlrev	CTT <u>AAG GAT CCT</u> AAA GCA GCT CAA	<i>LgGt</i> (pET28a)
LgGTK11NdeIStart	GAG <u>ACA TAT GGA</u> GGC AAA AAA TGG CAG AAA AGC	<i>pLgBx8</i> (pET28a)
LgGTK11BamHISop1	GAG <u>AGG ATC CTC</u> ATT TTC TAA GAT AAT CAA TGA ATC TC	<i>pLgBx8</i> (pET28a)
LgGTK11rev6	GGT CTC ACA ACC CAC AGA A	<i>pLgBx8</i> (pET28a)
LgGTK11fwd1	CCG TTG TCT CTC AGC AAC A	<i>pLgBx8</i> (pET28a)
LgGTK11BsaIStart	GAG <u>AGG TCT CGA</u> GGT ATG GAG GCA AAA AAT GGC AGA AAA G	<i>pLgBx8</i> (pICH31070)
LgGTK11rev4	CTT TCA ACG ATT CAG GCA T	<i>pLgBx8</i> (pICH31070)
LgGTK11BsaIStop	GAG <u>AGG TCT CGA</u> AGC TCA TTT TCT AAG ATA ATC AAT <u>GAA TCT</u>	<i>pLgBx8</i> (pICH31070)
LgGTK11fwd1	CCG TTG TCT CTC AGC AAC A	<i>pLgBx8</i> (pICH31070)
LgGTK11BamHISop2	GAG <u>AGG ATC CTC</u> ATT TTC TAA GAT AAT CAA TGA ATC TC	<i>pLgBx8</i> (pET3a)
LgGTK11fwd1	CCG TTG TCT CTC AGC AAC A	<i>pLgBx8</i> (pET3a)
Gludase 1 Bsa FWD	GGT CTC GAG GTA TGG GTG TCC CAT TTC AT	<i>CoGlu1</i> (pICH31070)
Gludase 1 Bsa REV	GGT CTC GAA GCT TAG TGT AAG AGA AAC TTC TTG AA	<i>CoGlu1</i> (pICH31070)
Gludase 2 Bsa FWD	GGT CTC GAG GTA TGA GTG TTG TGA AGA TAG TTC A	<i>CoGlu2</i> (pICH31070)
Gludase 2 Bsa REV	GGT CTC GAA GCT TCA TCA CTG AAC GAG GAA CT	<i>CoGlu2</i> (pICH31070)

2.1.6 Pflanzenmaterial und Anzucht

C. orientalis Saatgut wurde von PD Dr. Margot Schultz freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Samen wurden auf einem 2:1-Gemisch aus Erde (Einheitserde, TypT) und Quarzsand ausgestreut und mit Erde bedeckt. Zur Keimung wurden die Samen zunächst für 3-4 Tage einer Vernalisation bei 4 °C ausgesetzt, woraufhin die Samen für 3-4 Tage in Pflanzenkammern (Heraeus Vötsch, 19 °C, 40% relativer Luftfeuchtigkeit, Tag: 12 h Licht, Nacht: 12 h Dunkelheit) kultiviert wurden. Nach einer erneuten Vernalisation verblieben die Samen in der Pflanzenkammer.

L. galeobdolon wurde vom Staudengarten Weihenstephan, Freising zur Verfügung gestellt. Zur Vermehrung wurden abgeschnittene Triebe in Rhizopon getaucht und ca. eine Woche zur Wurzelbildung in Quarzsand gestellt. Die Pflanzen wurden in Heraeus Vötsch Pflanzenkammern 16 h bei Licht (22 °C) und 8 h bei Dunkelheit (18 °C) gezogen. Nach der Wurzelbildung wurden die Pflanzen auf ein 2:1-Gemisch aus Erde (Einheitserde, TypT) und Quarzsand umgesetzt.

Es wurde **A. thaliana** des Ökotyps Columbia verwendet. Samen wurden entweder auf Erde oder zur Selektion BASTA-resistenter Pflanzen auf ½ MS-Platten (2,2 g/l MS-Medium, 20 g/l Saccharose, 9 g/l Agar, pH 5,8) mit dem Herbizid Phospinotrizin (D+L, 25 µg/µl) ausgestreut. Die Samen wurden für zwei Tage einer Vernalisation bei 4 °C im Dunkeln ausgesetzt und in der Pflanzenkammer (Heraeus Vötsch, 19 °C, Tag: 12 h Licht, Nacht: 12 h Dunkelheit) bis zum Alter von 10-14 Tagen angezogen. Die Pflanzen wurden vereinzelt bzw. auf Erde umgesetzt und bis zur Reife der Samen in der Pflanzenkammer belassen.

Samen von **N. benthamiana** wurden vom Lehrstuhl für Genetik der Ludwig-Maximilian-Universität in München zur Verfügung gestellt. Die Samen wurden auf einem 3:2-Gemisch aus Erde (Einheitserde TypT) und Quarzsand ausgestreut und in Heraeus Vötsch Pflanzenkammern 16 h bei Licht (22 °C) und 8 h bei Dunkelheit (18 °C) angezogen. 7-14 Tage alte Keimlinge wurden vereinzelt, in ein 3:2-Gemisch aus Erde (ED73) und Quarzsand umgetopft und in Heraeus Vötsch Pflanzenkammern bei 19 °C und 12 h Licht und 12 h Dunkelheit angezogen. Für die Infiltration wurden 5-6 Wochen alte Pflanzen verwendet.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 DNA-Isolierung

Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979) präpariert. Plasmid-DNA aus *A. tumefaciens* wurde ebenfalls mittels alkalischer Lyse (Plant Transformation Workshop, 2003) isoliert. Die Isolierung genomischer DNA aus *L. galeobdolon* wurde nach Dellaporta *et al.*, 1983 durchgeführt.

2.2.2 RNA-Isolierung und cDNA-Synthese

Gesamt-RNA wurde mit dem NucleoSpin®RNA Plant-Kit (Machery-Nagel, Düren) nach Angaben des Herstellers aus ca. 100 mg Pflanzenmaterial isoliert. Alle Lösungen wurden mit DEPC-Wasser angesetzt. cDNA wurde aus ca. 500 ng Gesamt-RNA mit dem TaqMan Kit (Roche, Schweiz) nach Angaben des Herstellers synthetisiert.

2.2.3 Analyse der RNA durch Formaldehyd-Agarosegel-Elektrophorese

Zur Analyse der RNA-Qualität wurde die RNA-Lösung (ca. 500 ng) mit 4 Vol. RNA-Probenpuffer (60% deionisiertes Formamid, 8% Formaldehyd, 0,03% Bromphenolblau in 1,2x Northern-Puffer) versetzt und 15 min bei 68 °C denaturiert. Anschließend wurde der Ansatz sofort auf Eis gestellt und die Probe auf ein Formaldehyd-Agarose-Gel aufgetragen (1,2% Agarose in 7% Formaldehyd und 1x Northern-Puffer). Die Elektrophorese erfolgte in 1x Northern Puffer (20 mM MOPS, 5 mM Natrium-Acetat, 2 mM EDTA, pH7) bei ca. 65 V. Das Formaldehyd-Gel wurde für 10 min mit 0,1% Toluidinblau gefärbt und mit 10% Ethanol entfärbt. Die RNA wurde als intakt bewertet, wenn die 18S- und die 28S-ribosomale RNA-Bande klar sichtbar waren und die 28S-RNA-Bande eine höhere Intensität aufwies.

2.2.4 Allgemeine DNA-Klonierungstechniken

Allgemeine Klonierungstechniken, wie Agarosegelelektrophorese, die Modifikation von DNA mit Restriktionsendonukleasen, T4-DNA-Polymerase, alkalischer Phosphatase und T4-DNA-Ligase, sowie die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen und die Hitzeschocktransformation von *E. coli* wurden nach Standardprotokollen (Sambrook *et al.*, 1989) oder nach Angaben der Hersteller durchgeführt.

2.2.5 Design und Klonierung von amiRNA-Konstrukten

amiRNA-Sequenzen für *ZmBx8* und *ZmBx9* wurden mit Hilfe der *WMD3 Platform (Web MicroRNA Designer*; <http://wmd3.weigelworld.org>) basierend auf der *Z. mays* EST ZmGI-18.0 (GeneIndex) Datenbank designt. Es wurden jeweils 2 amiRNA-Sequenzen ausgewählt, welche an je unterschiedlichen Positionen des Zielgens spezifisch binden. Die amiRNA Konstrukte wurden entsprechend den Angaben in den *O. sativa precursor* pNW55 osaMIR528 kloniert. Die verschiedenen amiRNA-Konstrukte wurden anschließend vor den Nos-Terminator und hinter den Ubiquitin-Promotor kloniert, indem das C2Intron des pUbiasC2Intron/-Sal-Vektors durch die verschiedenen pNW55 osaMIR528 *precursor* ersetzt wurde. Die so erzeugten Promotor-amiRNA-Precursor-Terminator Kassetten wurde in den *A. tumefaciens* Transformationsvektor TF 101.1 kloniert.

2.2.6 PCR-Verfahren

Standard-PCR

Für Standard-PCR-Reaktionen wurde die GoTaq-Polymerase (Promega, USA) verwendet. Für die Amplifikation von Genfragmenten für die Proteinexpression wurde die ProofStart-Polymerase (Qiagen, Hilden) genutzt. Restriktionsschnittstellen wurden durch *Mismatch*-Primer eingeführt (Tabelle 10). Es wurde der Thermoblock UNO (Biometra, Göttingen) verwendet.

Quantitative RT-PCR

Die quantitative Bestimmung von Transkriptmengen wurde am Light Cycler®480 (Roche) durchgeführt. Zur Normierung wurde parallel die Transkriptmenge des *house-keeping*-Gens Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) bestimmt. Für *CoBx8*, *CoGlu1* und *CoGAPDH* wurde der Light Cycler®480 SYBR Green I Mastermix (Roche) und für *ZmBx8*, *ZmBx9* und *ZmGAPDH* wurde der Mesa Green qPCR™ Mastermix Plus (Eurogentech) verwendet. Die Spezifität der PCR wurde durch eine Schmelzkurvenanalyse und durch Agarosegelelektrophorese bestätigt. Die PCR-Bedingungen für die durchgeführten quantitativen PCR-Reaktionen sind in Tabelle 11 aufgezeigt, die Primer in Tabelle 9.

Tabelle 11: Bedingungen der quantitativen RT-PCR. *: die MgCl₂-Konzentration des Light Cycler®480 SYBR Green I Mastermix (Roche) ist nicht angegeben, für die RT-PCRs wurde kein zusätzliches MgCl₂ eingesetzt.

Gen	MgCl ₂ [mM]	Annealingtemperatur [°C]	DMSO [%]	Extensionszeit [s]	Messung bei [°C]
<i>CoGAPDH</i>	*	50	-	26	82
<i>CoBx8</i>	*	58	-	12	72
<i>CoGlu1</i>	*	63	-	23	72
<i>ZmGAPDH</i>	4	65	-	27	72
<i>ZmBx8</i>	4	63	5	17	72
<i>ZmBx9</i>	4	68	-	30	72

2.2.7 Verfahren zur Isolierung von 5'- und 3'-cDNA-Enden

5'-RACE

5'-cDNA-Enden wurden durch das 5'-RACE-Verfahren mit dem 5'/3'-RACE Kit, 2nd Generation, (Roche) nach Angaben des Herstellers isoliert.

Nested-PCR

5'- und 3'-cDNA-Enden wurden weiterhin aus Phagenbanken (ZAP-cDNA) mittels einem Nested-PCR-Ansatz isoliert. Die cDNA-Sequenzen sind in diesen Banken über einen Adaptor in den pBluescript SK Vektor kloniert. Es wurden in den verschiedenen Ansätzen (Tabelle 12) 2-3 Nested-PCRs mit jeweils einem genspezifischen Primer und einem Vektor- oder adaptorspezifischen Primer durchgeführt.

Tabelle 12: Vektor- bzw. Adaptor-spezifische Primer für die Nested-PCR-Reaktionen.

Verlängerungsrichtung	Vektor bzw. Adaptor-spezifischen Primer
3'-Richtung	M13-20 (PCR1) und T7 (PCR2)
5'-Richtung	M13-rev (PCR1) und T3 (PCR2) oder: T3 lang-Primer (PCR1), SK-Primer (PCR2) und Adaptor-Primer (PCR3)

AIMS

Zur Verlängerung von fehlenden 3'-cDNA-Enden wurde darüber hinaus eine modifizierte Form der AIMS-Methode (*Amplification of insertion mutagenised sites*; Frey et al., 1998) durchgeführt. 1 µg genomische DNA wurde mit dem Restriktionsenzym Bfal geschnitten. Nach Adaptorligation (5'-gaccacgcgtatcgtatcgtcgcgagatgagtcctgag-3'; 5'-tactcaggatccactcat-

3') wurden eine PCR- und *Nested*-PCR-Reaktion mit Adaptor- (5'-gaccacgcgtatcgatgtcgac-3'; 5'-gaccacgcgtatcgatgtcgacgag-3') und genspezifischen Primern durchgeführt.

2.2.8 Isolierung von UDPG:Glycosyltransferase-Kandidatenteilsequenzen aus *L. galeobdolon*

UDPG:Glycosyltransferase-Kandidatenteilsequenzen aus *L. galeobdolon* wurden in zwei verschiedenen Verfahren isoliert:

In einem ersten Verfahren wurde eine *Nested*-PCR auf einer *L. galeobdolon* ZAP-cDNA Phagenbank durchgeführt. Als spezifischer Primer für UDPG-Glycosyltransferase wurden degenerierte Primer für das Aminosäuremotiv HCGWNS des konservierten PSPG-Motivs verwendet. Diese wurden kombiniert mit den vektorspezifischen Primern M13-rev (PCR1) und T3 (PCR2; 5'-Teilsequenz) bzw. M13-20 (PCR1) und T7 (PCR2; 3'-Teilsequenz). Die erhaltenen PCR-Fragmente wurden kloniert und sequenziert. Bei der Isolierung von Glycosyltransferasen-Teilsequenzen in 3'-Richtung des konservierten Motivs war bei den sequenzierten Kandidatensequenzen ein Kandidat (Kandidat 1) stark überrepräsentiert. Diese Kandidatenteilsequenz enthält eine DdeI-Restriktionsschnittstelle. Um diese Teilsequenz in weiteren Analysen auszuschließen wurden die PCR-Fragmente mit DdeI geschnitten. Die Kandidat 1 Sequenz kann danach nicht in den Vektor ligiert werden.

In dem zweiten eingesetzten Verfahren wurde aus *L. galeobdolon* RNA Oligo-d(T)-Anchor (5'/3'-RACE Kit, 2nd Generation, Roche) *geprimte* cDNA hergestellt. Diese wurde verwendet, um in einer *Nested*-PCR UDPG:Glycosyltransferase-Kandidatenteilsequenzen aus *L. galeobdolon* zu isolieren. Dazu wurden degenerierte Primer für das Aminosäuremotiv HCGWNS des konservierten PSPG-Motivs, sowie der PCR-Anchor-Primer eingesetzt.

2.2.9 DNA-Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen wurden von Eurofins MWG Operon (Ebersberg) im Auftrag durchgeführt. Plasmid-DNA wurde zuvor durch Fällung mit Polyethylenglykol (PEG, Sambrook *et al.*, 1989) gereinigt. PCR-Produkte wurden mit dem GFX™ *DNA and Gel Band Purification Kit* (GE-Healthcare) aufgereinigt.

2.2.10 Sequenzierung des *C. orientalis* Transkriptoms

Für die Sequenzierung des *C. orientalis* Transkriptoms wurde zunächst Gesamt-RNA aus dem oberirdischen Teil von 7-10 Tage alten *C. orientalis* Keimlingen isoliert. Die Präparation

von zufallsgeprimter und normalisierter cDNA-Synthese wurde von der Vertis Biotechnologie AG (Freising) durchgeführt: Die Erststrangsynthese erfolgte mit einem N6-Zufallsprimer und die Zweitstrangsynthese wurde nach Gubler und Hoffman (1983) synthetisiert. An die doppelsträngige cDNA wurden schließlich Adaptoren für die 454-Sequenzierung ligiert. Für die Normalisierung der cDNA wurde diese einem Denaturierungs- und Rehybridisierungszyklus unterzogen. Die hybridisierte doppelsträngige cDNA wurde über eine Hydroxyapatit-Chromatographie abgetrennt. Die einzelsträngigen cDNAs wurden amplifiziert und cDNAs zwischen 30-600 bp wurden präparativ gereinigt. Die so generierten cDNAs wurden von Eurofins MWG Operon (Ebersberg) mit einem 454 GS FLX *Sequencer* mit einem adaptorspezifischen Primer sequenziert.

2.2.11 Screening von cDNA-Bibliotheken durch Phagenhybridisierung

Die vollständige cDNA Sequenz von *CoBx8* und *LgGt* wurde durch das Screening von cDNA-Bibliotheken durch Phagenhybridisierung isoliert. Die Analyse der cDNA-Bibliotheken von *C. orientalis* und *L. galeobdolon* wurde nach den Vorschriften von Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt. Als Sonden für *CoBx8* und *LgGt* wurden PCR-Produkte (Tabelle 3) eingesetzt, die in einer Klenow-Reaktion mit ^{32}P α -dCTP, (BioTrend) radioaktiv markiert wurden. Die Auswertung erfolgte am *Phospho-Imager* (Molecular Dynamics Storm 860 Phosphoimager, GE-Healthcare) mittels ImageQuantTM (Molecular Dynamics, Krefeld).

Isolierung von DNA aus Bakteriophagen

Die Bakterienzellen in den Phagenkulturen (5 ml) wurden durch Zugabe von 500 μl Chloroform lysiert. Bakterienzellbruchstücke von 1,5 ml Phagenkultur wurden durch Zentrifugation bei 17500 g entfernt. 1 ml des Überstands wurde mit DNase I und RNase A (je 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; 30 min 37 °C) behandelt. Es wurden 25 mM EDTA, pH 8 und 20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Proteinase K zugegeben und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Der Ansatz wurde mit Phenol/Chloroform ausgeschüttelt. Die Bakteriophagen-DNA wurde gefällt und in TE (10 mM Tris/HCl, 0,5 mM EDTA, pH 8) aufgenommen.

Southern Transfer (Southern, 1975)

Restriktionsensverdaute DNA wurde auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend über Nacht auf eine positiv geladene Nylonmembran (Biodyne B Transfer Membran, Pall) transferiert (Sambrook *et al.*, 1989).

***In vivo-Excision* von Plasmid-DNA**

pBluescript SK-Phagemide mit den cDNA-Fragmenten wurden aus den Phagen entsprechend dem Protokoll des Herstellers isoliert (ZAP-cDNA@Synthesekit, Stratagene).

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 Reinigung von CoBX8 und LgBX8 aus *C. orientalis* bzw. *L. galeobdolon*

CoBX8 und LgBX8 wurden aus Proteinrohextrakten durch eine Ammoniumsulfatfällung und vier aufeinanderfolgende Säulenchromatographien gereinigt.

Herstellung eines Proteinrohextrakts aus *C. orientalis* bzw. *L. galeobdolon*

Zur Herstellung eines Proteinrohextrakts aus *C. orientalis* bzw. *L. galeobdolon* wurde das jeweilige Pflanzenmaterial (*C. orientalis*: oberirdischer Teil von 7-10 Tagen alten Keimlingen bzw. *L. galeobdolon*: junge Blätter) auf Eis geerntet und mit Seesand, Extraktionspuffer (50 mM HEPES, 14 mM BME, 0,5 mM EDTA, 20% Glycerin, pH 7,5) und 0,3 g Polyclar pro g Pflanzenmaterial in einer gekühlten Reibeschale fein zermörsert. Die Suspension wurde 30 min bei 30000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 1 mM Phenylmethansulfonylfluoride (PMSF) versetzt und für die Ammoniumsulfatfällung eingesetzt.

Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung

Das Proteinrohextrakt wurde durch langsames Zugeben von fein gemörsertem Ammoniumsulfat auf 45%ige Sättigung mit Ammoniumsulfat gebracht. Nach 1 h Rühren bei 4 °C erfolgte eine Zentrifugation bei 4 °C und 30000 g für 30 min. Der Überstand wurde auf 65%ige Sättigung mit Ammoniumsulfat gebracht und die Lösung wurde erneut 1 h bei 4 °C gerührt und bei 4 °C und 30000 g für 30 min zentrifugiert. Das Proteinpellet wurde in Reinigungspuffer (20 mM HEPES, 14 mM BME, 0,5 mM EDTA, 20% Glycerin, pH 7,5) resuspendiert.

Chromatographische Aufreinigung der UDPG:DIBOA Glucosyltransferase aus *C. orientalis* bzw. *L. galeobdolon*

Die weiteren Reinigungsschritte beruhten auf chromatographischen Techniken, die an einer FPLC (*Fast protein liquid chromatography*; Äkta Explorer 10S, GE-Healthcare) durchgeführt wurden. Die Auswertung erfolgte mit der Software Unicorn 4.12. Der Verlauf der

Chromatographie wurde anhand der UV-Absorption bei 280 nm und der Leitfähigkeit verfolgt. Die Fraktionen wurden auf ihre UDPG:DIBOA Glucosyltransferase-Aktivität getestet (siehe 2.6.1) und die Proteinzusammensetzung wurde mittels denaturierender Gelelektrophorese festgestellt (siehe 2.3.3). Soweit nicht anders angegeben wurden die Chromatographien bei 4 °C durchgeführt. Proteinlösungen wurden mit Ultrafiltrationssäulen (Vivaspin, Vivascience) konzentriert und mit NAP-Säulen (GE-Healthcare) nach Angaben des Herstellers umgepuffert.

Die Fraktion mit 45-65%iger Ammoniumsulfatsättigung wurde für die Hydrophobe Interaktionschromatographie in Puffer A (20 mM HEPES, 14 mM BME, 0,5 mM EDTA, 20% Glycerin, 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 7,5) überführt und auf zwei gekoppelte, mit Puffer A äquilibrierte, HiTrap™ Butyl FF-Säulen (2,5 cm x 1,6 cm, 5 ml, GE-Healthcare) aufgetragen. Die Säulen wurden mit 8 Säulenvolumen Puffer A gewaschen (0,5 ml/min). Die Elution erfolgte mit Reinigungspuffer mit einem linearen Gradienten von 25 Säulenvolumen (0,5 ml/min). Fraktionen mit hoher UDPG:DIBOA Glucosyltransferase-Aktivität wurden vereinigt, konzentriert und in Puffer B (20 mM HEPES, 14 mM BME, 0,5 mM EDTA, 20% Glycerin, 0,1 M KCl, pH 7,5) überführt.

Die Gelfiltration wurde bei 20 °C mit Puffer B bei einer Flussrate von 0,5 ml/min durchgeführt. Die Proteinprobe wurde auf die mit zwei Säulenvolumen äquilibrierte Säule (HiLoad™ 16/60 Superdex™ 200 prep grade, 60 cm x 1,6 cm, 120 ml, GE-Healthcare) aufgetragen, und mit einem Säulenvolumen eluiert. Fraktionen mit hohen UDPG:DIBOA Glucosyltransferase-Aktivitäten wurden vereinigt, konzentriert und in Puffer C (50 mM MES, 14 mM BME, 0,5 mM EDTA, 20% Glycerin, pH 6,0) umgepuffert.

Die Proteinprobe wurde für die Affinitätschromatographie auf die mit Puffer C äquilibrierte HiTrap™ Blue HP-Säule (2,5 cm x 0,7 cm, 1 ml, GE-Healthcare, 0,3 ml/min) aufgetragen. Die Säule wurde mit 6 Säulenvolumen Puffer C gewaschen und gebundene Proteine wurden mit einem linearen Gradienten von 15 Säulenvolumen Puffer D (50 mM MES, 14 mM BME, 0,5 mM EDTA, 20% Glycerin, 1 M KCl, pH 6,0) eluiert. Die Fraktionen wurden unmittelbar nach der Chromatographie mit 2 M HEPES, pH 8,0 neutralisiert. Der UDPG:DIBOA Glucosyltransferase-Aktivitäts-Peak wurde konzentriert und in Reinigungspuffer übergeführt.

Die weitere Reinigung verlief über eine Anionenaustauscherchromatographie, die mit der in Reinigungspuffer äquilibrierten Chromatographiesäule Mono Q, (5,0 cm x 0,5 cm, 1 ml, GE-Healthcare) durchgeführt wurde. Nach Waschen der Säule mit 12 Säulenvolumen Reinigungspuffer erfolgte die Elution mit Puffer E (20 mM HEPES, 14 mM BME, 0,5 mM EDTA, 20% Glycerin, 1 M KCl, pH 7,5) über einen zweistufigen Gradienten (1.Stufe: 45% Puffer E in 26 Säulenvolumen, 2.Stufe: 100% Puffer E in 5 Säulenvolumen) bei einer

Flussrate von 0,5 ml/min. Fraktionen mit UDPG:DIBOA Glucosyltransferase-Aktivität wurden mittels SDS-PAGE auf ihre Proteinzusammensetzung untersucht. Fraktionen, die die gereinigte UDPG:DIBOA Glucosyltransferase enthielten, wurden vereinigt, in Aufbewahrungspuffer (20 mM HEPES, 10 mM BME, pH 7,5) umgepuffert und konzentriert. Die Proteinlösung wurde entweder direkt für die Sequenzierung durch Massenspektroskopie (MS) eingesetzt oder die Proteinlösung wurde mit 1D-SDS-PAGE aufgetrennt und die ausgeschnittene Glucosyltransferase-Bande sequenziert (Prof. Küster bzw. Dr. Haslbeck).

2.3.2 Proteinfällung

Proteine wurden mit Trichloressigsäure (TCA) gefällt. Ein Vol. TCA wurden mit 9 Vol. der Proteinprobe gemischt und über Nacht auf Eis inkubiert. Die Lösung wurde bei 4 °C und 17500 g für 30 min zentrifugiert. Das Proteinpellet wurde zweimal mit eiskaltem Aceton gewaschen, getrocknet, und in 1x Lämmli-Puffer (50 mM Tris/HCl, pH 6.8, 5% BME, 2% (w/v) SDS, 0,001% (w/v) Bromphenolblau, 10% (w/v) Glycerin) resuspendiert.

2.3.3 SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung denaturierter Proteine nach ihrem Molekulargewicht wurde eine Tris-Glycin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Lämmli, 1970) durchgeführt. Die Proteine wurden mit Coomassieblau (1 g/l Coomassie Brilliant Blue R-250, 50% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Eisessig) gefärbt und mit Entfärbelösung (10% (v/v) Essigsäure, 30% (v/v) Methanol) entfärbt. Für eine sensitivere Färbung wurde die Bio-Safe™ Coomassie G-250 Färbelösung (Bio-Rad) nach Angaben des Herstellers eingesetzt.

2.3.4 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde der Bio-Rad® Protein Assay nach Bradford (1976) angewandt.

2.3.5 Heterologe Proteinexpression in *E. coli* und Reinigung über Nickel-Affinitätschromatographie

Die Proteine CoBX8, LgGT und CoGT wurden in *E. coli* heterolog exprimiert: Die amplifizierten cDNAs wurden zunächst *blunt-end* in pBluescript KS+ subkloniert und sequenziert. Die cDNAs wurden anschließend *in frame* mit der aminoterminalen 6xHisTag in den Expressionsvektor pET28a (Novagen) umkloniert. Ausgehend von einer Einzelkolonie

wurden die Bakterien in *Terrific Broth* (TB)-Medium (Tartoff und Hobbs, 1987) mit 1% Glucose und 50 µg/ml Kanamycin bis zu einer OD_{600nm} von 0,3-0,5 angezogen, auf Eis abgekühlt und die Expression mit 1 mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) für 2-3 Tage bei 18 °C induziert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (3900 g, 4 °C, 20 min) geerntet und das Zellpellet bei -70 °C eingefroren.

Das Zellpellet wurde auf Eis aufgetaut und in 3 ml Lysepuffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 10 mM BME, pH 8,0) pro g Zellpellet resuspendiert. Es wurden 1 mg/ml Lysozym zu den Zellen gegeben und die Zellen für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Ultraschallbehandlung (5 min, 10 s Puls, 20 s Pause, Amplitude 60%) aufgebrochen. Das Lysat wurde mit 10 µg/ml RNase und 10 µg/ml DNase versetzt und für 15 min auf Eis inkubiert. Das Lysat wurde zur Abtrennung unlöslicher Bestandteile für 10 min bei 10000 g und 4 °C für 10 min zentrifugiert.

Zu dem Bakterien-Rohextrakt wurde die 50%ige Ni-Agarose-Suspension (Qiagen) im Verhältnis 1:4 zugegeben. Die Suspension wurde 1 h bei 4 °C geschüttelt und in eine Säule gepackt. Die Säule wurde mit Waschpuffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 10 mM BME, pH 8,0) gewaschen und die His-Tag Proteine wurden mit Elutionspuffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 150 mM Imidazol, 10 mM BME, pH 8,0) eluiert. Die Reinheit der Elutionsfraktionen wurde mittels SDS-PAGE (siehe 2.3.3) analysiert und ihre Proteinkonzentration (siehe 2.3.4) bestimmt. Fraktionen mit dem höchsten Reinheit und Gehalt wurden vereinigt und mit NAP-Säulen (GE-Healthcare) in Reinigungspuffer (20 mM HEPES, 14 mM BME, 0,5 mM EDTA, 20% Glycerin, pH 7,5) umgepuffert. Die Proteinlösung wurde anschließend in Aliquots bei -70 °C gelagert.

2.4 Isolierung von Naturstoffen

2.4.1 Isolierung von DIBOA aus *L. galeobdolon* bzw. DIMBOA aus *Z. mays*

Für die Gewinnung von DIBOA bzw. DIMBOA wurde das jeweilige Pflanzenmaterial (junge Blätter von *L. galeobdolon* bzw. 4 Tage alte etiolierte *Z. mays*-Sprossen) mit destilliertem Wasser (ca. 10x Frischgewicht) im Polytron PT 3000 (Kinematic AG) zerkleinert und 1 h bei RT inkubiert. Die Suspension wurde über einen Faltenfilter filtriert und mit 1 M HCl auf einen pH-Wert von 2-3 angesäuert. Die Suspension wurde dreimal mit Ethylacetat extrahiert und die vereinigten organischen Phasen erneut über einen Faltenfilter filtriert. Die organische Phase wurde durch Zugabe von Natriumsulfat getrocknet und im Rotationsverdampfer vollständig eingedampft. Der Rückstand wurde in Methanol aufgenommen und über

präparative HPLC aufgereinigt. Die Quantifizierung von DIBOA und DIMBOA erfolgte photometrisch nach Bailey und Larson (1989) (ϵ_{254} (DIMBOA)= 8500 cm⁻¹ M⁻¹, ϵ_{262} (DIBOA)= 10000 cm⁻¹ M⁻¹).

2.4.2 Isolierung von GDIBOA aus *L. galeobdolon*

GDIBOA wurde aus jungen *L. galeobdolon* Blättern extrahiert. Dazu wurde das Pflanzenmaterial mit flüssigem Stickstoff gefroren, grob zerkleinert und in destilliertem Wasser (ca. 10-fach Frischgewicht) aufgeköcht. Das Pflanzenmaterial wurde anschließend im Polytron PT 3000 (Kinematic AG) zerkleinert und bei 10000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde über einen Faltenfilter filtriert und dreimal mit n-Butanol ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde erneut filtriert und bis zur Trockenheit eingedampft. Der Rückstand wurde in Methanol aufgenommen und über präparative HPLC gereinigt. Die Quantifizierung des gereinigten GDIBOAs wurde mit Hilfe des DIBOA-Extinktionskoeffizienten (ϵ_{262} (DIBOA)= 10000 cm⁻¹ M⁻¹, Bailey und Larson (1989)) durchgeführt.

2.4.3 Isolierung von GDIMBOA aus *Z. mays*

GDIMBOA wurde aus 4 Tage alten etiolierten *Z. mays*-Sprossen isoliert. Das Pflanzenmaterial wurde mit flüssigem Stickstoff gemörsert und in Aceton suspendiert. Die Suspension wurde zweimal bei 26000 g für 20 min zentrifugiert und der Überstand einrotiert bis eine gelbe Suspension in Wasser zurückgeblieben war. Diese wurde mit Wasser verdünnt und mit 1 M HCl auf einen pH-Wert von 3 angesäuert. Es folgte eine dreimalige Extraktion mit 1 Vol. Ethylacetat. Die Phasentrennung wurde jeweils durch eine 5-minütige Zentrifugation bei 12000 g erreicht. Die wässrige Phase wurde eingedampft, der Rückstand in Methanol resuspendiert und präparativ über HPLC aufgereinigt. Gereinigtes GDIMBOA wurde über den Extinktionskoeffizienten von DIMBOA (ϵ_{262} (DIMBOA)= 8500 cm⁻¹ M⁻¹, Bailey und Larson (1989)) quantifiziert.

2.5 Analyse von Naturstoffen

2.5.1 Hoch-Durchsatz-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

Für HPLC-Trennungen wurde die HPLC Ultimate 3000 (Dionex), mit dem Diodendetektor PDA-100 (Dionex), und der Bedienungs- und Auswertungssoftware Chromeleon verwendet. Die Trennungen wurden nach dem *reversed phase*-Prinzip mit LiChrospher® 100 RP-18-bzw.

LiChrospher® 100 RP-18e-Säulen (analytisch: Ø = 5 µm, Fluss = 1 ml/min, präparativ: Ø = 10 µm, Fluss = 5 ml/min) durchgeführt.

Analytische Trennungen

Für die analytische Trennung enzymatischer Umsetzungen von DIBOA, DIMBOA, GDIBOA und GDIMBOA wurde ein 18-minütiger Gradient von 35-50% Methanol in 0,3%iger Ameisensäure gefahren (Tabelle 13).

Tabelle 13: Spektrum und Retentionszeiten der Benzoxazinoide DIBOA, DIMBOA und ihrer Glucoside bei einem 18-minütigen Gradienten von 35-50% Methanol in 0,3%iger Ameisensäure mit der LiChrospher® 100 RP-18e-Säule.

	Maximum [nm]	Schulter [nm]	Retentionszeit [min]	Quantifizierung [nm]
DIBOA	255	281	7,4	254
GDIBOA	255	280	6,3	254
DIMBOA	264	295	8,7	263
GDIMBOA	266	295	6,0	263

Für die Analyse der Substratspezifität von CoBX8 wurden die getesteten Benzoxazinoide DIBOA, DIMBOA, HBOA, HMBOA, BOA, BOA-6-OH und OH-Indolinon und ihre Glucoside mittels einem 15-minütigen Gradienten von 10-40% Acetonitril in 0,3%iger Ameisensäure analytisch aufgetrennt (Tabelle 14).

Tabelle 14: Spektrum und Retentionszeiten der Benzoxazinoide DIBOA, DIMBOA, HBOA, HMBOA, BOA und BOA-6-OH und ihrer Glucoside bei einem 15-minütigen Gradienten von 10-40% Acetonitril in 0,3%iger Ameisensäure mit der LiChrospher® 100 RP-18-Säule.

	Maximum [nm]	Schulter [nm]	Retentionszeit [min]	Quantifizierung [nm]
DIBOA	255	281	6,5	254
GDIBOA	255	280	4,7	254
DIMBOA	264	295	7,9	263
GDIMBOA	266	295	6,5	263
HBOA	251	278	6,6	254
GHBOA	252	280	3,8	254
HMBOA	261	290	7,8	263
GHMBOA	263	290	6,3	263
OH-Indolinon	255	290	5,5	254
BOA	272	-	9,7	272
BOA-6-OH	289	-	3,1	280

Die Umsetzung von Zeatin-Ribosid wurde mit einem 15-minütigen Gradienten von 10-65% Methanol in 0,3%iger Ameisensäure mit der RP-18e-Säule analysiert. Zeatin-Glucosid weist dann eine Retentionszeit von 8,6 min auf, das Aglucon Zeatin eluiert bei einer Retentionszeit von 6,0 min. Die Hydrolyse von *trans*-Zeatin-O-Glucosid (tZOG) bzw. die Glucosylierung von Zeatin wurde mit einem 15-minütigen Gradienten von 10-45% Methanol in 0,3%iger Ameisensäure mit der RP-18e-Säule verfolgt. Zeatin weist bei diesen Analysenbedingungen eine Retentionszeit von 7,8 min auf, tZOG von 6,5 min. Beide Substanzen weisen ein Maximum bei 274 nm auf und wurden bei einer Wellenlänge von 280 nm quantifiziert.

Für die Analyse der Glucosylierung von IAA wurde ein 25-minütiger Gradient von 0-55% Methanol gefahren (Lösungsmittel A = 0,3% Ameisensäure in Wasser, Lösungsmittel B = Methanol). IAA eluiert unter diesen Bedingungen mit einer Retentionszeit von 21 min. Die Detektion von IAA erfolgte bei 230 nm.

Präparative Trennungen

Bei der Isolierung der Benzoxazinoide DIBOA, DIMBOA, GDIBOA und GDIMBOA (siehe 2.4.1, 2.4.2 und 2.4.3) wurden die jeweiligen Substanzgemische (siehe 2.5.1) präparativ (RP-18e-Säule) aufgetrennt. Als Lösungsmittel A wird 0,3%ige Ameisensäure eingesetzt. Nach den präparativen Trennungen (Tabelle 15) wurden, die das Produkt enthaltenen Fraktionen, vereinigt und einrotiert. Der Rückstand wurde in Methanol aufgenommen und über analytische HPLC quantifiziert.

Tabelle 15: HPLC-Programme und Retentionszeiten für präparative Trennungen bei der Isolierung der Benzoxazinoide DIBOA, DIMBOA, GDIBOA und GDIMBOA.

	Lösungs- mittel B	von	Gradient bis	in	Retentionszeit [min]
DIBOA	Acetonitril	10% B	50% B	9 min	8,5
DIMBOA	Acetonitril	10% B	50% B	9 min	4,0
GDIBOA	Methanol	23% B	37% B	12 min	0,7
GDIMBOA	Methanol	22% B	22,5% B	109 min	2,9

2.6 Enzymtests

2.6.1 Tests auf Glucosyltransferase-Aktivität

Benzoxazinoid-Enzymtests

Der Enzymaktivitätstest für die Reinigung der UDPG:DIBOA Glucosyltransferasen aus *C. orientalis* und *L. galeobdolon* erfolgte in abgewandelter Form nach Bailey und Larson (1998): Zu den zu testenden Proteinen in 190 µl Assaypuffer (20 mM HEPES, 14 mM BME, 0,5 mM EDTA, 1 mM UDPG, pH 8,2) wurden 10 µl DIBOA bzw. DIMBOA (15 mM in Ethanol) gegeben. Der Ansatz wurde 30 min bei 37 °C inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 800 µl Folchlösung (Chloroform:Methanol (2:1, v/v), 1% HCl) gestoppt. Der Reaktionsansatz wurde 5 min bei 17500 g zentrifugiert und 100 µl der oberen Phase über HPLC analysiert. Die gebildete GDIBOA bzw. GDIMBOA-Stoffmenge wurde über eine DIBOA- bzw. DIMBOA-Eichkurve ermittelt. Als Kontrolle wurde hitzeinaktiviertes Enzym (5 min, 100 °C) eingesetzt.

Für die Bestimmung der Enzymkinetik von CoBX8 wurde zunächst eine Kombination aus Enzymmenge und Inkubationsdauer bestimmt, bei dem der Umsatz des eingesetzten Substrats im linearen Bereich liegt: 1,5 µg CoBX8 wurde mit den jeweiligen Substraten 4 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe des Akzeptor-Substrats gestartet. UDPG wurde als Glucose-Donor eingesetzt, und DIBOA oder DIMBOA als Akzeptor-Substrate. Für die Bestimmung der Enzymkinetik für die Substrate DIBOA und DIMBOA wurde 2 mM UDPG eingesetzt, und die Akzeptorsubstratkonzentration von 0,175 mM bis 21 mM (DIBOA) bzw. 0,175 mM bis 10,5 mM (DIMBOA) variiert. Zur Bestimmung der Enzymkinetik für den Glucose-Donor UDPG wurde 5,25 mM DIBOA eingesetzt und die UDPG-Konzentration von 0,175 mM bis 21 mM variiert. Für jede Substratkonzentration wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt. Die Enzymparameter K_M und v_{max} wurden durch das Programm *Graph Pad Prism* Version 4.03 über nichtlineare Regression berechnet.

Für die Bestimmung des pH-Optimums von CoBX8 für die Glucosylierung von DIBOA wurden 1,5 µg CoBX8 mit 2,5 mM DIBOA und 4 mM UDPG 4 min in unterschiedlichen Puffersystemen bei 37 °C inkubiert. Für die pH-Werte 4,0 bis 7,5 enthielt der Enzymassaypuffer (14 mM BME, 0,5 mM EDTA) zusätzlich McIlvaine-Puffer, für die pH-Werte 7,0, bis 8,0 HEPES-Puffer, für die pH-Werte 7,5, bis 9,0 Bicin-Puffer und für die pH-Werte 9,0 und 10,5 AMP-HCl-Puffer (jeweils 100 mM). Für jeden untersuchten pH-Wert wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Für die Analyse der Substratspezifität von CoBX8 wurden die Benzoxazinoid-Aglucone DIBOA, DIMBOA, HBOA, HMBOA, BOA, BOA-6-OH und OH-Indolin-2-on in einer Konzentration von 500 µM eingesetzt: 1,5 µg

CoBX8 wurde mit 4 mM UDPG und dem entsprechenden Akzeptor-Substrat in Dreifachbestimmungen 4 min bei 37 °C inkubiert.

Flavonoid-Enzymtests

Die Glucosylierung der Flavonole Kaempferol, Quercetin und Myricetin, sowie der Anthocyanidine Pelargonidin und Delphinidin durch CoBX8, CoGT und LgGT wurde in einem Reaktionsvolumen von 250 µl gemessen: 5 µl des zu testenden Substrates (10 mM in Ethanol) wurden zu 1 µg gereinigtem Protein in 245 µl Assaypuffer (20 mM HEPES, 14 mM BME, 0,5 mM EDTA, 5 mM UDPG, pH 8,2) gegeben und für 30 min bei 30 °C inkubiert. Die Glucosylierung der Flavonole wurde durch Zugabe von 200 µl 5% HCl gestoppt, zu den Reaktionsansätzen mit den Anthocyanidin-Substraten wurden 50 µl Essigsäure gegeben. Die Ansätze wurden 5 min bei 17500 g zentrifugiert und der Überstand für eine LC-MS-Analyse (Prof. Schwab, TUM) eingesetzt.

IAA-Enzymtests

Die Glucosylierung von Indol-3-Essigsäure (IAA) wurde nach der Vorschrift von Jackson *et al.*, 2001 untersucht. 0,4 bzw. 4 µg CoBX8 wurde in Assaypuffer (20 mM HEPES, 14 mM BME, 0,5 mM EDTA, 4 mM UDPG, pH 8,2) mit 1 mM IAA versetzt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 µl TCA gestoppt. Der Reaktionsansatz wurde 5 min bei 17500 g zentrifugiert und 100 µl der oberen Phase über HPLC analysiert.

Zeatin-Enzymtests

Die Analyse der Glucosylierung des Cytokinins *trans*-Zeatin erfolgte nach Hou *et al.*, 2004. 1,5 bzw. 15 µg CoBX8, ZmBx8 und ZmBX9 wurden mit 500 µM *trans*-Zeatin, 2,5 mM UDPG und 0,5 mM ATP in 200 µl in Assaypuffer (100 mM MES, 50 mM MgSO₄, pH 7) 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,1 Vol. TCA abgestoppt und 10 min bei 17500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde für die HPLC-Analyse eingesetzt.

2.6.2 Tests auf β-Glucosidase-Aktivität

pNPG-Enzymtests

Die Umsetzung des allgemeinen Substrats p-Nitrophenyl-β-D-glucopyranosid (pNPG) durch CoGLU1 und CoGLU2 wurde in einem Reaktionsvolumen von 400 µl spektrometrisch gemessen. 0,15 µg CoGLU1 und 0,17 µg CoGLU2 wurden mit 66400 µM pNPG für 2 min in

Citratpuffer (0,1 M Natrium-Phosphat/Citrat, pH 5,5) bei 37 °C inkubiert. Es wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 ml 2% Natriumcarbonat gestoppt und die Stoffmenge des gebildeten p-Nitrophenols photometrisch gemessen. Der molare Extinktionskoeffizient für p-Nitrophenol bei 405 nm beträgt 18300 l/mol cm. Für den Vergleich der pNPG Umsetzung durch CoGLU1 mit anderen Substraten wurden 72 µg CoGLU1 mit 500 µM pNPG bei 30 °C inkubiert.

Benzoxazinoid-Glucosid-Enzymtests

Die Deglucosylierung der Benzoxazinoid-Glucoside GDIBOA und GDIMBOA durch CoGLU1 wurde in einem Reaktionsvolumen von 200 µl in Citratpuffer gemessen. 0,45 µg CoGLU1 (GDIBOA) bzw. 4,5 µg CoGLU1 (GDIMBOA) wurden mit 500 µM des Glucosids 4 min bei 30 °C inkubiert. Für die Analyse der GDIBOA-Hydrolyse durch CoGLU2 wurden 4,2 µg Protein 15 min mit 500 µM des Glucosids bei 30 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe des Substrats in 10 µl Ethanol gestartet. Der Substratumsatz wurde über die Bildung des Aglucons (HPLC-Analyse) als auch über die Bildung von Glucose (Glucose Oxidase-Assay) bestimmt. Für die Quantifizierung des Aglucons über HPLC wurde die Reaktion durch Ausschütteln mit 800 µl Folchlösung (Chloroform:Methanol (2:1, v/v), 1% HCl) abgestoppt. Die obere wässrige Phase wurde über die HPLC analysiert. Die Quantifizierung der gebildeten Glucose erfolgte ohne ein Abstoppen der Reaktion im unmittelbaren Anschluss an den Enzymtest mit dem Glucose Oxidase-Assay Kit (Sigma) nach Angaben des Herstellers.

Die Bestimmung der enzymatischen Parameter für CoGLU1 für die Substrate GDIBOA und GDIMBOA erfolgte mit einer Enzymmenge und Inkubationsdauer, bei der die Produktbildung im linearen Bereich liegt. Für das Substrat GDIBOA wurden 1,8 µg CoGLU1 mit Substratkonzentrationen von 0,175 mM bis 10,5 mM 4 min bei 30 °C inkubiert. Für das Substrat GDIMBOA wurden 14,4 µg CoGLU1 eingesetzt und die Substratkonzentration von 0,175 mM bis 17,5 mM variiert. Für jede Substratkonzentration wurden drei Bestimmungen durchgeführt. Die Enzymparameter K_M und v_{max} wurden durch das Programm Graph Pad Prism Version 4.03 über nichtlineare Regression berechnet.

Die Inhibitionskonstanten K_{i1} und K_{i2} für die Inhibition der GDIBOA-Umsetzung durch Dhurrin wurden über *Lineweaver-Burk-Plots* bestimmt. Für verschiedene Inhibitorkonzentrationen (0 mM, 0,02 mM, 0,05 mM, 0,2 mM und 0,5 mM Dhurrin) wurden Enzymtests mit GDIBOA-Konzentration von 0,35 mM bis 21 mM durchgeführt. 1,8 µg CoGLU1 in Citratpuffer wurden dazu zunächst für 5 min bei 30 °C mit dem Inhibitor inkubiert, anschließend wurde die Enzymreaktion (4 min, 37 °C) durch Zugabe des Substrats gestartet. Die Reaktion wurde mit 800 µl Folchlösung abgestoppt und die GDIBOA-Umsetzung über HPLC analysiert.

Dhurrin-Enzymtests

Für die Bestimmung der Umsetzung des cyanogenen Glycosids Dhurrin durch CoGLU1 und CoGLU2 wurden 0,45 µg CoGLU1 bzw. 0,35 µg CoGLU2 mit 500 µM Dhurrin in 200 µl Citratpuffer 4 min bei 30 °C inkubiert. Die Umsetzung wurde unmittelbar nach dem Enzymtest mit dem Glucose (GO) Assay Kit (Sigma) nach Angaben des Herstellers gemessen.

Zeatin-Ribosid-Enzymtest

Für die Untersuchung der Umsetzung von Zeatin-Ribosid wurden 4,5 und 45 µg CoGLU1 bzw. 3,5 und 35 µg CoGLU2 mit 500 µM Zeatin-Ribosid in 200 µl Citratpuffer 30 min bei 30 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 Vol. Methanol abgestoppt und 10 min bei 17500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde eingedampft und das Pellet in 200 µl Wasser resuspendiert. 100 µl wurden für die Analyse der Umsetzung über HPLC eingesetzt.

***trans*-Zeatin-O-Glucosid (tZOG)-Enzymtest**

Für die Untersuchung der Umsetzung von *trans*-Zeatin-O-Glucosid (tZOG) wurden 4,5 und 45 µg CoGLU1 bzw. 3,5 und 35 µg COGLU2 mit 500 µM tZOG in 200 µl Citratpuffer 60 min bei 30 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 Vol. Methanol abgestoppt und 10 min bei 17500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde für die HPLC-Analyse eingesetzt.

2.7 Elektroporation von Agrobakterien

Elektrokompetente *A. tumefaciens*-Zellen wurden nach der Methode von Walkerpeach und Velten, 1994 hergestellt. Die Elektroporation der kompetenten Agrobakterien mit dem jeweiligen Vektor erfolgte mit dem *Gene-Transfection-Pulser* (BioRad, USA) in 2 mm Küvetten (Thermo Scientific) bei 2,5 kV, 400 Ω und 25 µF mit 50-100 ng DNA. Die Selektion erfolgte auf YEP-Platten (5g/l Hefeextrakt, 10g/l Pepton, 5 g/l NaCl, 15 g/l Agar, pH 6,8) mit einem Resistenzmarker des eingesetzten *A. tumefaciens* Stamms (Tabelle 2) und dem Selektionsmarker des eingesetzten Plasmids.

2.8 Transiente Proteinexpression in *N. benthamiana*

Die CoGLUKandidaten 1 und 2 wurden mit Hilfe einer Agroinfiltration mit TMV (Tabak-Mosaik-Virus)-basierenden viralen Vektoren (Marillonnet *et al.*, 2005) transient in *N. benthamiana* exprimiert: Dabei wird eine Kombination aus drei verschiedenen

Provektoren in die Pflanze eingebracht. Die 5'-Provektoren (pICH20111 und pICH20115) beinhalten virale Komponenten, wie z.B. die RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRp) und das *Movementprotein* (MP), das eine Ausbreitung des Systems von Zelle zu Zelle vermittelt. Zudem vermitteln diese Vektoren die zelluläre Lokalisation des exprimierten Proteins (pICH20111: Cytoplasma; pICH20115: Apoplast). Der 3'-Provektor (pICH31070) enthält das zu exprimierende Gen. Der dritte Provektor (pICH140111) enthält eine spezifische Integrase, welche die 5'- und 3'-Provektoren in der Pflanze rekombiniert. Als Positivkontrolle wurde der 3'-Provektor pICH7410 eingesetzt, der die GFP (*Green fluorescent protein*)-Gensequenz enthält. Für die transiente Expression in *N. benthamiana* wurde die CoGLUKandidaten-cDNAs daher zunächst mit der Golden Gate-Klonierungstechnik (Engler *et al.*, 2008) in den 3'-Provektor pICH31070 kloniert und sequenziert. *A. tumefaciens* des Stammes GV3101 wurde mit den Provektoren transformiert (siehe 2.7).

2.8.1 Agroinfiltration

Es wurden Übernacht-Kulturen der transformierten Agrobakterien verwendet. Die Kulturen wurden bei 4 °C und 3900 g 20 min zentrifugiert und die Pellets in 10 ml Infiltrationspuffer (10 mM MES-NaOH, 10 mM MgSO₄, pH 5,5) resuspendiert. Die mit den verschiedenen Vektoren transformierten Agrobakterien wurden in verschiedenen Kombinationen (Tabelle 16) gemischt und 1:40 bzw. 1:200 mit Infiltrationspuffer auf ein Gesamtvolumen von 400 ml verdünnt. Die zu infiltrierende Pflanze wurde in die Lösung getaucht und anschließend wurde zweimal für 1-2 min ein Vakuum angelegt.

Tabelle 16: eingesetzte Kombinationen unterschiedlicher Provektoren für die transiente Expression der CoGLUKandidaten 1 und 2, sowie von GFP in *N. benthamiana*. *: Die Lokalisation in den Apoplast resultiert aus dem Apoplast-Signal der *CoGlu*-Kandidaten-Gene.

Provektoren-Kombination	exprimiertes Protein	Lokalisation
pICH31070 mit <i>CoGluKandidat 1</i> ; pICH14011; pICH20111	CoGLUKandidat 1	Apoplast*
pICH31070 mit <i>CoGluKandidat 2</i> ; pICH14011; pICH20111	CoGLUKandidat 2	Apoplast*
pICH7410; pICH14011; pICH20111	GFP	Cytoplasma
pICH7410; pICH14011; pICH20155	GFP	Apoplast

2.8.2 Proteinextraktion aus *N. benthamiana*

4-10 Tage nach der Agroinfiltration wurde aus einzelnen Blättern von infiltrierten *N. benthamiana* Pflanzen ein Proteinextrakt hergestellt. Das Blatt wurde dazu mit Seesand, 0,3 g Polyclar und 3 ml Extraktionspuffer (50 mM Na-Phosphatpuffer, 5 mM BME, 10 mM EDTA, 0,1% Triton, pH 7,0) pro g Pflanzenmaterial in einer gekühlten Reibeschaale auf Eis

fein zerrieben. Die Suspension wurde anschließend bei 4 °C und 17500 g für 5-10 min zentrifugiert. Das Proteinextrakt wurde mit 20% Glycerin versetzt und in Aliquots bei -80 °C eingefroren.

2.9 Erzeugung und Analyse von transgenen *A. thaliana*-Pflanzen

2.9.1 Elektroporation von Agrobakterien und Transformation von *A. thaliana* mit *A. tumefaciens*

Es wurde eine Fusion der *CoBx8*-cDNA mit dem CaMV 35S Promoter/Terminator hergestellt und in den binären Vektor pGPTV-BarB kloniert. *A. tumefaciens* des Stammes GV3101 wurde wie in 2.7 aufgeführt mit dem Vektor transformiert. Die Transformation von *A. thaliana* mit *A. tumefaciens* erfolgte mit der *floral-dip*-Methode (Clough und Bent, 1998). Transgene T0-Pflanzen wurden über die BASTA-Resistenz selektioniert.

2.9.2 Analyse der transgenen *A. thaliana*-Pflanzen

Homozygote *A. thaliana*-Samen der T2-Generation wurden sterilisiert und für drei Tage einer Vernalisation bei 4 °C unterzogen. Die Pflanzen wurden für neun Tage bei 18 °C und 24 h Licht in Heraeus Vötsch Pflanzenkammern auf ½-MS-Medium angezogen. Einzelne Pflanzen wurden in Mikrotiterplattenkavitäten transferiert, welche flüssiges ½-MS-Medium mit DIBOA bzw. DIMBOA-Konzentrationen von 0-2 mM enthielten. Das Medium wurde täglich gewechselt, da DIBOA und DIMBOA in wässriger Lösung instabil sind und die Benzoxazinone benzoxazolin-2(3H)-one (BOA) und 6-methoxybenzoxazolin-2(3H)-one (MBOA) entstehen. Nach vier Tagen Inkubation in den Mikrotiterplatten wurden die Pflanzen bonitiert.

2.10 Expression von amiRNA-Konstrukten in *Z. mays*

Für die Expression von amiRNA-Konstrukten für die *Z. mays*-Gene *ZmBx8* und *ZmBx9* wurde die Promotor-amiRNA-Precursor-Terminator Kasette in den *A. tumefaciens* Transformationsvektor TF 101.1 kloniert. *A. tumefaciens* des Stammes GV3101 pMP90:RK wurde mit diesem Vektor transformiert (siehe 2.7). Mittels Gewebekultur (Peter Dobos) wurden transgene *Z. mays* Pflanzen erzeugt.

2.10.1 Analyse transgener *Z. mays*-Pflanzen

10-15 transformierte T1 *Z. mays*-Pflanzen einer Linie wurden zunächst einem BASTA-Test unterzogen. Linien, die die erwartete Aufspaltung von resistenten und nicht resistenten Pflanzen zeigten wurden analysiert. Von 10-15 transformierten T1-Pflanzen dieser Linien wurde RNA isoliert und cDNA synthetisiert. Für BX8-amiRNA-Konstrukte wurde die RNA aus 4 Tage alten etiolierten Keimlingen isoliert, für die BX9-amiRNA-Konstrukte wurde von 8-12 Tagen alten Pflanzen derjenige Stängelbereich verwendet, welcher die Nodien für Kronwurzeln und Blattnodien enthält (ca. 6-7 cm des Stengels, die äußeren Schaftblätter wurden entfernt). Mittels einer Standard-PCR für das *bar*-Gen wurde untersucht, welche Nachkommen die T-DNA-Insertion tragen. Die *ZmBx8*- und *ZmBx9*-Transkriptmengen wurden über quantitative PCR bestimmt. Als Kontrolle dienten Wildtyp T1-Pflanzen.

3 Ergebnisse

In dieser Arbeit soll die Evolution der Entgiftungsfunktion (Glucosyltransferase) und der Bioaktivierungsfunktion (β -Glucosidase) der Benzoxazinoid-Biosynthese in monokotylen und dikotylen Pflanzen vergleichend untersucht werden. Dazu werden die UDPG:DIBOA Glucosyltransferasen und Flavonoid-Glucosyltransferasen aus *C. orientalis* und *L. galeobdolon*, sowie die GDIBOA β -Glucosidase aus *C. orientalis* isoliert und deren Phylogenie analysiert.

3.1 Isolierung der UDPG:DIBOA Glucosyltransferasen und Flavonoid Glucosyltransferasen aus *C. orientalis* und *L. galeobdolon*

Aus der monokotylen Pflanze *Z. mays* wurden bereits die UDPG:DIBOA Glucosyltransferasen *ZmBX8* und *ZmBX9* isoliert (von Rad *et al.*, 2001). Für einen Vergleich der codierenden Sequenzen von UDPG:DIBOA Glucosyltransferasen von monokotylen und dikotylen Pflanzen, sowie für eine vergleichende Charakterisierung der codierten Enzyme sollen die entsprechenden Gensequenzen aus den dikotylen Pflanzen *C. orientalis* und *L. galeobdolon* isoliert werden. Die Isolierung der Glucosyltransferasen mit Hilfe einer, auf Sequenzhomologien zu *ZmBX8* und *ZmBX9* basierenden PCR-Strategie kam nicht in Frage, weil dieser gerichtete Ansatz eine relativ enge Verwandtschaft vorausgesetzt hätte. Deshalb wurde für die Isolation der Glucosyltransferase aus *C. orientalis* und *L. galeobdolon* der klassische Weg über eine Enzymreinigung gewählt.

Für Vergleichszwecke sollten aus *C. orientalis* und *L. galeobdolon* Flavonoid Glucosyltransferasen isoliert werden, weil für diese Enzyme bereits ein klarer monophyletischer Ursprung in monokotylen und dikotylen Pflanzen gezeigt wurde. In diesem Fall wurden für die Isolierung Sequenzhomologien zu bereits isolierten und funktionell charakterisierten Flavonoid-3-O-Glucosyltransferasen als Kriterium herangezogen. Die Flavonoid-3-O-Glucosyltransferase aus *Z. mays* Bz1 (bronze1) wurde bereits 1977 isoliert (Dooner und Nelson, 1977). Des Weiteren sind Flavonoid-3-O-Glucosyltransferasen aus einer weiteren monokotylen Pflanze (*Iris hollandica* (Yoshihara, *et al.*, 2005) und aus einer Vielzahl von dikotylen Pflanzen veröffentlicht (z.B. *Gentiana triflora* (Tanaka *et al.*, 1996), *Fragaria ananassa* (Griesser *et al.*, 2008), *Vitis vinifera* (Offen *et al.*, 2006), *A. thaliana* (Tohge *et al.*, 2005)). Das resultierende Sequenzdatenset kann in die phylogenetische Analyse der Evolution der UDPG:DIBOA Glucosyltransferase mit einbezogen werden. Die

parallele Betrachtung einer anderen UGT-Funktion kann helfen, die Evolution von Benzoxazinoid UGTs einzuschätzen.

3.1.1 Reinigung von CoBX8 und pLgBX8

Die UDPG:DIBOA Glucosyltransferasen aus *C. orientalis* (CoBX8) und *L. galeobdolon* (LgBX8) wurden über deren Funktion gereinigt. Nach jedem Reinigungsschritt wurden die erhaltenen Fraktionen auf ihre UDPG:DIBOA Glucosyltransferase-Aktivität getestet. Fraktionen mit der höchsten Aktivität wurden vereinigt und für den folgenden Reinigungsschritt eingesetzt.

Als Pflanzenmaterial für die Proteinreinigung wurde bei *C. orientalis* von 125 g des oberirdischen Teils von 7-10 Tage alten Keimlingen ausgegangen. Dieses Entwicklungsstadiums wurde ausgewählt, da die oberirdischen Pflanzenorgane von *C. orientalis* hohe DIBOA-Gehalte aufweisen und die höchste DIBOA-Neusynthese von ca. 1,4 µg/g Frischgewicht in 14 Tage alten Keimlingen gemessen wurde (Schullehner *et al.*, 2008). Für die Reinigung von LgBX8 wurden 312 g junge Blätter eingesetzt. Bei *L. galeobdolon* konnte der höchste DIBOA-Gehalt für junge und alte Blätter gemessen werden. Die DIBOA-Neusyntheserate ist für die untersuchten oberirdischen Gewebe Knospe, Blüte, sowie junge und alte Blätter in etwa gleich hoch (ca. 0,2 – 0,4 µg/g Frischgewicht; Schullehner *et al.*, 2008).

CoBX8 und LgBX8 wurden mit dem gleichen Verfahren aufgereinigt. Die Herstellung des Proteinrohextrakts und die Ammoniumsulfat-Fällung (AS-Fällung) wurden nach Bailey und Larson (1989) durchgeführt. Jedoch wurde der Enzymaktivitätspeak enger auf die Fraktion zwischen 45 und 65%iger Sättigung mit Ammoniumsulfat eingegrenzt. Analog zu der Reinigung von ZmBX8 und ZmBX9 (von Rad *et al.*, 2001) wurde zunächst eine Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) durchgeführt. Die UDPG:DIBOA Glucosyltransferase-Aktivitäten aus dem *C. orientalis* und *L. galeobdolon* Proteinrohextrakt wiesen dabei ein unterschiedliches Elutionsverhalten auf. CoBX8 eluierte zwischen 550 und 850 mM Ammoniumsulfat, wohingegen LgBX8 bereits mit 250-450 mM Ammoniumsulfat von der Säule eluiert werden konnte. Mit diesem Reinigungsschritt konnte die große Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase (RuBisCO, ca. 55 kDa) – dem mengenmäßig häufigsten Protein in Pflanzen - aus den Proteinrohextrakten entfernt werden.

Die Proteinproben wurden anschließend über eine Gelfiltrationssäule nach ihrer Größe aufgetrennt. Sowohl CoBX8 als auch LgBX8 konnten bei einem Elutionsvolumen von 77-82 ml detektiert werden. Anhand einer Protein-Kalibrierkurve kann die Größe beider Proteine auf 40-58 kDa eingegrenzt werden. Da für Glycosyltransferasen des Pflanzen-Sekundärmetabolismus molekularen Massen von 45-60 kDa gefunden werden, (Vogt und Jones, 2000) konnte gezeigt werden, dass CoBX8 als auch LgBX8 als Monomer vorliegen.

Für die weitere Aufreinigung wurde eine Affinitätschromatographie (AC) mit der HiTrap™ Blue HP-Säule durchgeführt. CoBX8 eluierte mit 390 – 590 mM KCl von der Affinitätssäule, für die Elution von LgBX8 waren höhere KCl-Konzentrationen (590 mM bis 740 mM) notwendig. Beide Enzymaktivitäten banden nur unter sauren Bedingungen (pH 6) an die Affinitätssäule. Im Unterschied zu der Reinigung von ZmBX8 und ZmBX9 (von Rad *et al.*, 2001) konnte bei neutralem pH-Wert (pH 7,5) keine Bindung der Enzymaktivität an die Affinitätssäule festgestellt werden. Unter neutralen Bedingungen war ebenfalls keine Bindung der Enzymaktivitäten an die *Reactive Yellow 3*-Agarose-Säule und die UDP-Glucuronsäure-Agarose-Säule zu beobachten, zwei typischerweise für die Reinigung von Glucosyltransferasen des Pflanzen-Sekundärmetabolismus verwendete Affinitätssäulen (z.B. Jones *et al.*, 1999; Wetzel und Sandermann, 1994). Die UDPG:DIBOA Glycosyltransferase-Aktivität aus *C. orientalis* und *L. galeobdolon* wurde mit einem KCl-Gradienten eluiert. Eine Elution mit den Substraten DIBOA oder UDPG war nicht möglich. Im Unterschied dazu konnten ZmBX8 und ZmBX9 durch Zugabe des Substrats UDPG von der Säule eluiert werden, wohingegen eine Elution der aktiven Enzyme durch einen Salzgradienten nicht gelang (von Rad *et al.*, 2001).

Als *Polishing*-Schritt wurde schließlich eine Anionenaustauscherchromatographie (AE) durchgeführt. Die CoBX8- und LgBX8-Enzymaktivitätspeaks eluierten jeweils bei einer Salzkonzentration von ca. 200 mM KCl von der Chromatographiesäule. Im Anschluss waren sowohl CoBX8 als auch LgBX8 nahezu zur Homogenität gereinigt (Abbildung 5). Werden die aktiven Fraktionen der Anionenaustauscherchromatographie einzeln über SDS-PAGE analysiert, so korreliert die Intensität der Hauptbande mit der gemessenen relativen Enzymaktivität (Abbildung 6).

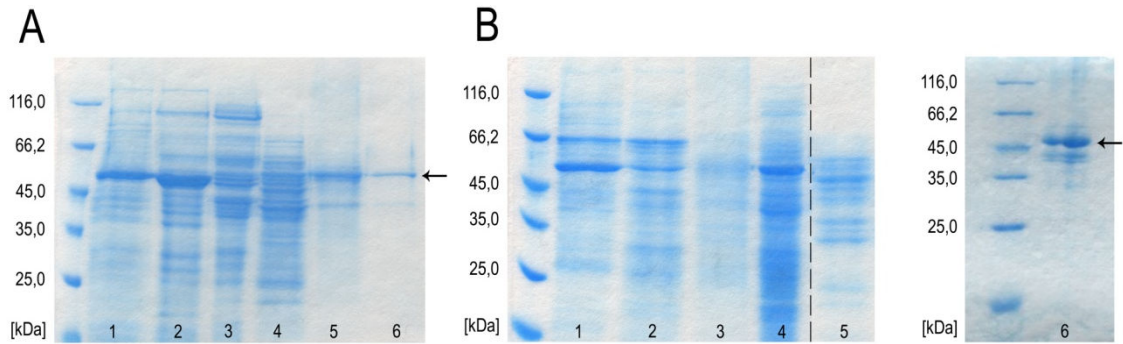


Abbildung 5: SDS-PAGE-Analyse der verschiedenen Schritte der Reinigung der UDPG:DIBOA Glucosyltransferase aus *C. orientalis* (A) und *L. galeobdolon* (B). 1: Proteinrohextrakt, 2: Ammoniumsulfatfällung, 3: Hydrophobe Interaktionschromatographie, 4: Gelfiltration, 5: Affinitätschromatographie, 6: Anionenaustauscherchromatographie. Das gereinigte Protein ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

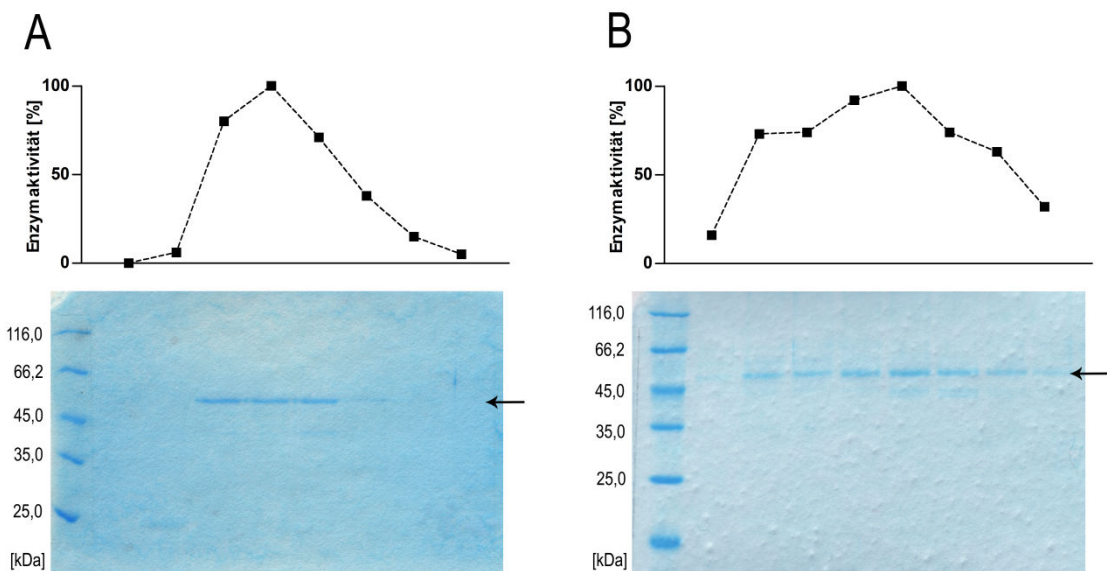


Abbildung 6: Korrelation der Intensität der Proteinbande und der relativen Enzymaktivität einzelner Fraktionen der Anionenaustauscherchromatographie bei der Reinigung der UDPG:DIBOA Glucosyltransferase aus *C. orientalis* (A) und *L. galeobdolon* (B). Oben: Die relative Enzymaktivität einzelner Fraktionen der Anionenaustauscherchromatographie, unten: die zugehörige SDS-PAGE-Analyse der Fraktion. Die gereinigte Glucosyltransferase ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

Bei einer typischen Reinigung der UDPG:DIBOA Glucosyltransferase aus *C. orientalis* konnten aus 125 g Pflanzenmaterial ca. 2 µg CoBX8 gereinigt werden. Das entspricht einer 29000-fachen Reinigung (Tabelle 17). Die UDPG:DIBOA Glucosyltransferase aus *L. galeobdolon* wurde ca. 23000-fach angereinigt. Aus 312 g Pflanzenmaterial konnten ca. 24 µg des Proteins gereinigt werden (Tabelle 18).

Tabelle 17: Reinigung der UDPG:DIBOA Glucosyltransferase *CoBX8* aus *C. orientalis*. AS-Fällung: Ammoniumsulfatfällung; HIC: Hydrophobe Interaktionschromatographie; GF: Gelfiltration; AC: Affinitätschromatographie; AE: Anionenaustauscherchromatographie. Als Pflanzenmaterial wurden 125 g des oberirdischen Teils von 7-10 Tage alten Keimlingen eingesetzt.

Reinigungs-schritt	Protein-menge [mg]	Gesamt-aktivität [nkat]	Spezifische Aktivität [nkat/mg]	Reinigungs-faktor [x-fach]	Ausbeute [%]
Proteinrohextrakt	949	59,87	0,06		100
AS-Fällung	237	35,87	0,15	2,40	60,0
HIC	36,0	16,29	0,45	7,17	27,2
GF	1,65	6,59	4,00	63,32	11,0
AC	0,19	8,45	44,48	704,93	14,1
AE	0,002	3,71	1852,32	29354,77	6,2

Tabelle 18: Reinigung der UDPG:DIBOA Glucosyltransferase *LgBX8* aus *L. galeobdolon*. AS-Fällung: Ammoniumsulfatfällung; HIC: Hydrophobe Interaktionschromatographie; GF: Gelfiltration; AC: Affinitätschromatographie; AE: Anionenaustauscherchromatographie. Als Ausgangsmaterial für die Reinigung wurden 312 g junge *L. galebdolon* Blätter verwendet.

Reinigungs-schritt	Protein-menge [mg]	Gesamt-aktivität [nkat]	Spezifische Aktivität [nkat/mg]	Reinigungs-faktor [x-fach]	Ausbeute [%]
Proteinrohextrakt	1976	19,14	0,01		66,3
AS-Fällung	1406	28,87	0,021	2,12	100
HIC	72,6	25,18	0,35	35,8	87,2
GF	3,20	5,31	1,66	171,3	18,4
AC	0,44	4,86	11,04	1139,88	16,8
AE	0,024	5,45	227,1	23443,0	18,9

Die gereinigten Proteine *CoBX8* und *LgBX8* wurden von Dr. Haslbeck (TU München) und Prof. Dr. Küster (TU München) mit Trypsin verdaut und die Spaltpeptide mittels Massenspektroskopie sequenziert.

3.1.2 Identifizierung der *CoBx8*-, *pLgBx8*-, *CoGT*- und *LgGT*- Gensequenzen

Die Gensequenzen von *CoBx8* und *pLgBx8* sollten zunächst über die Peptidsequenzen der gereinigten Proteine isoliert werden. Basierend auf den Peptidsequenzen wurden Primer ausgesucht und zur PCR eingesetzt. Dieser Ansatz war nicht erfolgreich. Daraufhin wurden UGT-Kandidatensequenzen aus *C. orientalis*, und *L. galeobdolon* mit zwei verschiedenen Strategien isoliert. Für die Isolierung von UGT-Kandidatengen aus *C. orientalis* wurde das Transkriptom sequenziert (siehe 2.2.10). UGT-Kandidatenteilsequenzen von *L. galeobdolon* wurden durch verschiedene PCR-Verfahren isoliert (siehe 2.2.8). Für die Identifizierung der

CoBx8- und *pLgBx8*-Gene wurden die Peptidsequenzen schließlich mit den Kandidatensequenzen verglichen.

Die Gensequenzen der Flavonoid-Glucosyltransferasen *CoGT* und *LgGT* wurden über Homologievergleiche erhalten. Die UGT-Kandidatenteilsequenzen aus *C. orientalis* und *L. galeobdolon* wurden dafür mit einem Sequenzdatenset von Flavonoid-3-O-Glucosyltransferasen dikotyler Pflanzen verglichen.

Isolierung von UGT-Kandidatenteilsequenzen

Das Transkriptom von *C. orientalis* Keimlingen (oberirdischen Teil, 7-10 Tage alt) wurde mit der 454-Technologie mit einem adaptorspezifischen Primer sequenziert. Vor der Sequenzierung wurden die cDNAs normalisiert, um die Repräsentation einzelner Gene anzugleichen. Die Sequenzierung lieferte ca. 250000 Sequenzen mit einer durchschnittlichen Länge von 253 bp, einschließlich des Adaptors mit 24 bp. Damit beträgt die Rohsequenz Datenmenge 62,6 Megabasen (Mb). Die Adaptorsequenz wurde ausgeklammert und die einzelnen Sequenzen mit Hilfe der Phred Software assembliert (Prof. Dr. Rattei, Universität Wien). Durch die Assemblierung konnte die durchschnittliche Sequenz-Länge auf 338 bp erhöht werden. Es blieben 6,8 Mb Sequenzen als Einzelsequenzen (Singlets), die assemblierten Sequenzen (Contigs) machen 15,5 Mb aus.

Für die Isolierung von UGT-Kandidatenteilsequenzen aus *C. orientalis* wurden die Contigs und Singlets des *C. orientalis* Transkriptoms nach Sequenzen durchsucht, welche die UGT-Domäne enthalten (Prof. Dr. Rattei, Universität Wien). Dazu wurde die Pfam (*protein families*) Datenbank verwendet, die eine Sammlung von Sequenz-Alignments verschiedener Proteinfamilien darstellt. 25 Singlets und 37 Contigs aus dem *C. orientalis* Transkriptom weisen die UGT-Domäne auf (Tabelle 19).

Da für *L. galeobdolon* keine Transkriptomdaten vorliegen, wurden hier UGT-Kandidatenteilsequenzen über zwei verschiedene PCR-Strategien isoliert, die das konservierte Aminosäuremotiv HCGWNS des PSPG-Motivs von UGTs als Bindestelle für degenerierte Primer ausnutzen. In der ersten Strategie wurde eine *Nested-PCR* auf einer *L. galeobdolon* ZAP-cDNA Phagenbank durchgeführt (Ansatz 1). Es wurden bei dieser Strategie sowohl Teilsequenzen 3' als auch 5' des konservierten Motivs isoliert. In der zweiten Strategie wurde Oligo-d(T)-Anchor (5'/3'-RACE Kit, 2nd Generation, Roche) gepimte cDNA als DNA-Template für die *Nested PCR* eingesetzt (Ansatz 2). Mit beiden Strategien wurden insgesamt 11 Kandidatenteilsequenzen für UGTs aus *L. galeobdolon* isoliert (Tabelle 20). Die Sequenzierung weiterer Klone ergab keine neuen Kandidaten. Zudem wurden manche Kandidaten

bei beiden Ansätzen isoliert (Tabelle 20). Es wird daher angenommen, dass Teilsequenzen für die in *L. galeobdolon* am stärksten exprimierten UGTs isoliert werden konnten.

Tabelle 19: Singlets und Contigs des *C. orientalis* Transkriptoms mit dem UGT-Pfam (*Protein families*) Motiv. Es sind die jeweiligen Sequenzlängen, sowie die Anzahl der Sequenzen aus denen der Contig assembliert wurde, angegeben. Contig 3 wurde nachfolgend als *CoBx8*-Teilsequenz identifiziert.

Contig/ Singlet	Sequenzlänge [bp]	Anzahl der assemblierten Sequenzen
Singlets 1-25	237-276	1
Contigs 27-37	203-409	2
Contigs 19-26	274-462	3
Contig 18	425	4
Contigs 16-17	415-428	5
Contigs 11-15	252-617	7
Contigs 9-10	449-731	8
Contigs 6-8	457-845	9
Contig 5	756	10
Contig 4	687	14
Contig 3	1174	20
Contig 2	796	29
Contig 1	1570	38

Tabelle 20: Isolierte UGT-Teilsequenzen aus *L. galeobdolon*. Angegeben ist die Position der Teilsequenz bezüglich des konservierten Aminosäuremotivs, die Länge der Teilsequenz und mit welchem Ansatz diese isoliert wurde. *LgGTKandidat5* wurde nachfolgend als *LgGT* identifiziert und *LgGTKandidat11* als *pLgBx8*.

Kandidat	Position bzgl. des konservierten Motivs	Länge [AS]	Ansatz 1	Ansatz 2
<i>LgGTKandidat1</i>	3'	110	x	x
<i>LgGTKandidat2</i>	3'	83	x	
<i>LgGTKandidat3</i>	3'	75	x	x
<i>LgGTKandidat4</i>	5'	129	x	
<i>LgGTKandidat5</i>	5'	140	x	
<i>LgGTKandidat6</i>	5'	139	x	
<i>LgGTKandidat7</i>	3'	112		x
<i>LgGTKandidat8</i>	3'	107		x
<i>LgGTKandidat9</i>	3'	106		x
<i>LgGTKandidat10</i>	3'	103		x
<i>LgGTKandidat11</i>	3'	103		x

Isolierung der *CoBx8* und *pLgBx8* cDNA-Klone

Um die cDNA-Klone *CoBx8* und *pLgBx8* zu isolieren, wurden die Peptidsequenzen der gereinigten Proteine mit den Kandidatensequenzen verglichen.

Peptide der gereinigten CoBX8 konnten in der Aminosäuresequenz des Contigs 3 der UGT-Sequenzen des *C. orientalis* Transkriptom gefunden werden (Tabelle 19). Dieser Contig hat eine Länge von 1174 bp und wurde aus 20 Einzelsequenzen aus der 454-Transkriptomsequenzierung assembliert. Damit gehört dieser Contig zu den am stärksten exprimierten UGTs in dem analysierten *C. orientalis* Transkriptom. Eine Teilsequenz des Contigs wurde radioaktiv markiert und als Sonde benutzt, um eine *C. orientalis* cDNA-Bibliothek durch Plaquehybridisierung zu screenen. Die vollständige CoBx8 cDNA-Sequenz ist 1428 bp lang (Abbildung 7).

```

1  MASSPKTPHI  VCVPAPAQGH  INPMFKLAKL  FHSRGFYITF  VHSEFSYQRL  LQASALDHLK
61  GLNNFRFETI  PDGLPPENKR  GVSDVPELCK  SMRNTCADPF  RSLILKLNSS  SDVPPVTCIV
121 ADVAMDFTLQ  VSEELGPPVV  LFFTLSGCGV  LGYMHYGELL  ERGYFPLREE  SFLSNGYLDT
181 EIDWIPAMKG  IRLKDLPSFL  RTTDPDDIMF  NCKIIEVNSA  FKAKGVILNT  FDDLEQEVLD
241 AIKSKIPQLY  TIGPLSMLCD  HMLQPDSKLC  EASLWEEDTS  CLEWLQEKDP  KSVLYVNIGS
301 LATMTSQQLG  EFAWGLANSM  CPFLWVIRPD  ILDRASGIVS  EDYKKEIGGR  GLLVSWCQQE
361 KVLKHPSIGG  FLTHCGWNST  LESLCEGVPM  ICWPFFAEQQ  TNCFYICNKW  GIGMEIDFDV
421 KRVEIGMMVK  ELMKGEKGLE  MRNKVEDLMS  KAIKATTPGG  SSHTNFEMLM  EDVAKW

```

Abbildung 7: Aminosäuresequenz von CoBX8. Die Peptidsequenzen der gereinigten CoBX8 sind grau hinterlegt. In roter Farbe ist die Kandidatenteilsequenz dargestellt.

Peptidsequenzen der gereinigten LgBX8 stimmen mit der Aminosäuresequenz des LgGTKandidaten11 überein. Die LgGTKandidat11-Sequenz hat eine Länge von 206 bp und ist 3' des konservierten Aminosäuremotivs HCGWNS lokalisiert (Tabelle 20). Die Teilsequenz wurde zunächst über eine *Nested*-PCR (siehe 2.2.7) in 5'-Richtung verlängert. Damit konnte jedoch nur ein Teil des gesuchten 5'-Endes amplifiziert werden. Deshalb wurde das 5'-Ende der pLgBx8-Sequenz mit Hilfe der AIMS-Methode (siehe 2.2.7) mit neuen genspezifischen Primern isoliert. Aus den erhaltenen Sequenzen wurde die Vollängensequenz des pLgBx8 zusammengesetzt. Die mit Hilfe der AIMS-Methode erhaltene genomische Sequenz verlängert den Leserahmen um 100 Codons. Sie umfasst weitere 11 Nukleotide in denen sich kein weiteres Startcodon befindet. Die aus den erhaltenen Sequenzen gebildete cDNA codiert ein Protein, das in der Blast-Analyse starke Homologie um das Startcodon aufweist (Abbildung 27; Anhang). 5'-RACE-PCR hat das in der AIMS-Analyse gefundene Startcodon bestätigt. Mittels PCR konnte der gesamte, durch Teilsequenzen bekannte, Leserahmen in einem Molekül amplifiziert werden. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass es sich nicht um eine artifizielle Sequenz handelt. In der 5'-verlängerten Aminosäuresequenz konnten zudem weitere Peptidsequenzen der gereinigten LgBX8 gefunden werden (Abbildung 8). Auf cDNA-Ebene ergeben sich für pLgBx8 8 Allelunterschiede, die an 6 Positionen zu einer Aminosäure-Veränderung führen (Abbildung 8). Diese Unterschiede können auf 2 verschiedene Allele zurückgeführt werden.

Es sind Peptidsequenzen vorhanden, die nur für die Allelvariante 1 oder nur für die Allelvariante 2 passen. Dies zeigt, dass beide Allele in der isolierten Proteinbande vertreten sind.

```

1  MEAKNGRKAH VLAVAGPAQG HVKPLMKLCR QIAKHGLKVT LVNLQSVHDK LVGEEDNIVQ
61 MVSIPDVPIE EDKDDPFKKM KNLRKTMPEP LKDLIQGINS SSNPEEKIGF VIADVMVEWL
121 MDTAAEMGAE PILFSPTSAA FRAMMSRIPA LLEDGMLDLN GNIEKCEKIT LSDDIPAWDK
181 DEFSWSFPHD PKTQKSFFDL INPDRGKIIQ PKLHLINTCY ELES_PACDLR PNLLPVGP LL
241 EMNNSCNFYF EDESCLSWLD TKLPESVIYV SFGSIAVVSQ QQLDELALGL ELSGRAFLWV
301 VRPDLVNGLR AVYPDGFLEP VSGIGMIVEW APQERVL FHP SVACFLTHCG WNSILEGLSK
361 GVSFLCWPF F MDQFHNQNYI CDKWEAGLRV DGDGSGIRTR NEIKEKIGMM FCNGDLKANA
421 MRLKEIFAKT VCEGGSSYNN FERFIDYLRK

```

Abbildung 8: Aminosäuresequenz des Allels 1 von pLgBX8. Die Peptidsequenzen der gereinigten LgBX8 sind grau hinterlegt. In roter Farbe ist die Kandidatenteilsequenz dargestellt. Positionen, an denen Allelvarianten vorkommen, die zu einem Aminosäureaustausch führen, sind unterstrichen.

Isolierung der CoGT und LgGT cDNA-Klone

Aus den *C. orientalis* Transkriptomsequenzen konnte eine 633 bp lange Contigsequenz identifiziert werden, welche eine hohe Homologie zu Flavonoid-3-O-Glucosyltransferasen dikotyler Spezies aufweist (Abbildung 9). Diese Sequenz wurde durch die Suche nach Sequenzen mit der UGT-Domäne in der *Pfam*-Datenbank nicht erfasst und ist daher nicht in den UGT-Kandidatensequenzen enthalten. Der Grund hierfür ist möglicherweise die Lokalisation der UGT-Domäne im 3'-Bereich von UGT-Proteinsequenzen, wohingegen die erhaltene Contigsequenz mit dem Startcodon beginnt. Unter den UGT-Kandidatensequenzen von *L. galeobdolon* konnte eine Sequenz identifiziert werden, welche eine hohe Homologie zu Flavonoid-3-O-Glucosyltransferasen zeigt (Abbildung 10). Diese LgGTKandidat5-Sequenz codiert 140 AS und liegt im 5'-Bereich des konservierten Aminosäuremotivs von UGTs (Abbildung 2).

Die Vollängensequenz des Flavonoid Glucosyltransferase-Kandidaten aus *C. orientalis* wurde durch einen *Nested-PCR*-Ansatz isoliert. Die Flavonoid Glucosyltransferase-Kandidatensequenz aus *L. galeobdolon* konnte durch eine *Nested-PCR* in 3'-Richtung vervollständigt werden und in 5'-Richtung erweitert werden. Für die Isolierung des fehlenden 5'-Endes wurde schließlich eine *L. galeobdolon* Phagenbank durchsucht. Der vollständige offene Leserahmen des Flavonoid Glucosyltransferase-Kandidaten aus *L. galeobdolon* wurde aus den erhaltenen Sequenzen zusammengesetzt (Bechtel, 2009).

<i>F. ananassa</i>	-MAPVSNQVGGHVAVLAFPFSTHAAPLLNIVCRLAAAAPSTLFSFFNTKQSNSSILAGNT	59
<i>V. vinifera</i>	-----TTNPHVAVLAFPFSTHAAPLLAVVRRLAAAAPHAVFSFFSTSQSNASIFHDSM	53
<i>A. thaliana</i>	MTKPSDPTRDSHVAVLAFPFSTHAAPLLTVTRRLASASPSTVFSFFNTAQSNSSLFSSGD	60
<i>G. triflora</i>	-----MSPVSHVAVLAFPFSTHAAPLLTLVNRLAASAPDIIFFSFFSTSSSITTIIFSTPN	54
<i>C. orientalis</i>	-MGQSKSESEAHVAVIAFPFGSHAAQILNLTRRLAASAPEVTFSSFFSTAKSNKAVSGSTG	59
	****:****.:*** :* :. ****::* ****.* .* ::	
<i>F. ananassa</i>	SVLRYSNVSVCEVADGVPEGYVFGVGPQEDIELFMKAAPDNFRRCLEASVAESGREVSCL	119
<i>V. vinifera</i>	HTMQCN-IKSYDISDGVPEGYVFAGRPQEDIELFTRAAPESFRQGMVMAVAETGRPVSCL	112
<i>A. thaliana</i>	EADRPANIRVYDIADGVPEGYVFSGRPQEAIELFLQAAPENFRREIAKAETEVGTEVKCL	120
<i>G. triflora</i>	LISIGSNIKPYAVWDGSPGPFVFSGNPREPIEYFLNAAPDNFDKAMKKAVEDTGVNISCL	114
<i>C. orientalis</i>	---GAENIKFYDVHGVPEHNSHFSGNPLEEIDLFIKATPGNFIEAIIHKAVEESDRKITCL	116
	: : .* **.. *.* ** *: * .*: * .* . : : : . : .**	
<i>F. ananassa</i>	VTDAFFWFGVHMADDMGGVPWPVFWTAGPASLSAHVHTDLIRSTT--SGGCHDEKETITV	177
<i>V. vinifera</i>	VADAFIWFADMAAEMG-VAWLPFWTAGPNSLSTHVYIDEIREKIGVSGIQGREDELLNF	171
<i>A. thaliana</i>	MTDAFFWFAADMATEIN-ASWIAFWTAGANSLSAHLYTDLIRETIGVKEVGERMEETIGV	179
<i>G. triflora</i>	LTDAFLWFAADFSEKIG-VPWIPVWTAASCCLHLYTDEIRSRFAEFDIAEKAECTIDF	173
<i>C. orientalis</i>	TNDSFMWGVVIAQTLQ-VPCVSVWAPGASSLCAHLYTDILRQNIQ-VGANAKYDEYLTF	174
	*:***:.....: : .. :..*:... **.*: * :*. . : : .	
<i>F. ananassa</i>	IAGMSKVRPQDLPEGIIFGNLESLSRMLHQMGMPPLATAVFINSFEELDPVITNDLKS	237
<i>V. vinifera</i>	IPGMSKVRFRDLQEGIVFGNLSLSRMLHRMGQVLPKATAVFINSFEELDDSLTNDLKS	231
<i>A. thaliana</i>	ISGMEKIRVKDTPGCVVFGNLDVFSKMLHQMGLALPRATAVFINSFEDLDPTLTNNLRS	239
<i>G. triflora</i>	IPGLSAISFSDLPEELIMEDSQSIFALTLHNMGLKHLKATAVAVNSFEEIDPIITNHLRS	233
<i>C. orientalis</i>	IPAMEKVRAGDLPDEILKGNLDSLFARLLHKAQVMP-----	211
	*...: : * : : : :*: * : **..	

Abbildung 9: Alignment von Proteinteilsequenzen der Flavonoid-3-O-Glucosyltransferasen aus *Fragaria ananassa* (*F. ananassa*; Q2V6K0), *Vitis vinifera* (*V. vinifera*; P51094), *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*; Q9LFJ8) und *Gentiana triflora* (*G. triflora*; Q96493) mit der Flavonoid Glucosyltransferase-Kandidatenteilsequenz aus *C. orientalis*. *, identische Aminosäure; :, ähnliche Aminosäure.

<i>F. ananassa</i>	MLHQMGMPPLATAVFINSFEELDPVITNDLKSFKR-FLNVGPLDLEPPASAATTPQ	59
<i>V. vinifera</i>	----MGQVLPKATAVFINSFEELDDSLTNDLKSCLKT-YLNIGPFNLITP--PPVVPNTT	53
<i>A. thaliana</i>	----MGLALPRATAVFINSFEDLDPTLTNNLRSRFRK-YLNIGPLGLSSTLQQLVQDPH	55
<i>G. triflora</i>	----MGLKHLKATAVAVNSFEEIDPIITNHLRSTNQLNILNIGPLQLTSSSIPPEDN---	53
<i>L. galeobdolon</i>	-----HEAHAVILNSFEEIDPIIAKDLKSKFRH-FLNIGPSILPSPIADDKS----	46
	* ** :****.:* :...*: * : **:** .	
<i>F. ananassa</i>	TAAEAVAGDGLSWLDEQK-VASVVYVSFGSVTRPSPEELMALAEALEASRVPFVLSLRD	118
<i>V. vinifera</i>	-----GCLQWLKEREK-PTSVVYISFGTVTPPPAEVVALSEALEASRVFFIWSLRD	103
<i>A. thaliana</i>	-----GCLAWMEKRS-SGSVAYISFGTVMTPPPGEALAAIEGLESSKVPFVWSLKE	105
<i>G. triflora</i>	-----ECLKWLQTK-ESSVVYLSFGTVINPPNEMAALASTLESRKIPFVLSLRD	103
<i>L. galeobdolon</i>	-----GCLSWLQKQTRPKSVVYISFSTVATPPEKELVALAEALEACQFPFVLSLKE	97
	** * : . **.*:***:* * . * : * : . ** : :***:***: :	
<i>F. ananassa</i>	NLKNRQLDEFLSKGLNGMVVWAPQPQVLAHGSVGAFFVTHCGWNSVLESVAGGVPLICR	178
<i>V. vinifera</i>	KARVHLPEGFLEKTRGYGMVWAPQAEVLAHEAVGAFVTHCGWNSLWESVAGGVPLICR	163
<i>A. thaliana</i>	KSLVQLPKGFLLDRTRQGIWVWAPQVELLKHATGTVFVTHCGWNSVLESVSGGVPMICR	165
<i>G. triflora</i>	EARKHLPENFIDRTSTFGKIVSWAPQLHVLENPAIGVTVTHCGWNSTLESIFCRVPVIGR	163
<i>L. galeobdolon</i>	QARESPLDGFLERTSTFGKIVSWAPQLQVLAHDSVGVFVSHCG-----	140
	: . * : : * :*.**** .* : : * .*:***	

Abbildung 10: Alignment von Proteinteilsequenzen der Flavonoid-3-O-Glucosyltransferasen aus *Fragaria ananassa* (*F. ananassa*; Q2V6K0), *Vitis vinifera* (*V. vinifera*; P51094), *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*; Q9LFJ8) und *Gentiana triflora* (*G. triflora*; Q96493) mit der Flavonoid Glucosyltransferase-Kandidatenteilsequenz aus *L. galeobdolon*. *, identische Aminosäure; :, ähnliche Aminosäure.

3.2 Charakterisierung der heterolog exprimierten Proteine CoBX8, CoGT und LgGT

Für die Bestimmung der Enzymfunktion wurden die Proteine CoBX8, pLgBX8, CoGT und LgGT rekombinant in *E. coli* mit einem N-terminalen His-Tag exprimiert. pLgBX8 konnte nicht funktionell exprimiert werden. CoBX8, CoGT und LgGT wurden bezüglich ihrer Substratspezifität charakterisiert. Für CoBX8 wurden außerdem enzymatische Parameter, das pH-Optimum und die Genexpression analysiert.

3.2.1 Expression und Reinigung von CoBX8, pLgBX8, CoGT und LgGT

Zur biochemischen Charakterisierung wurden die vollständigen offenen Leserahmen der Proteine CoBX8, pLgBX8, CoGT und LgGT amplifiziert, sequenziert und in den Expressionsvektor pET28a kloniert. Mit diesem Vektor werden die Proteine mit einem aminoterminalen 6xHisTag exprimiert. Die Expression bei 37 °C für 3-5 Stunden führte bei allen vier Proteinen zu einer starken Überexpression und unlöslichem Protein. Die native Expression der Enzyme CoBX8, CoGT und LgGT wurde mit Zugabe von IPTG induziert und für 2-3 Tage bei 18 °C durchgeführt. Die Proteine wurden schließlich über Ni-Agarose-Säulen gereinigt. Die Lagerung bei 4 °C für eine Woche und bei -70 °C für mehrere Monate hatte keinen Einfluss auf die Enzymaktivität der Proteine.

Das Allel 1 von pLgBX8 konnte bisher nicht in aktiver Form exprimiert werden. Die Induktion bei geringerer Zelldichte (OD=0,3), weniger starke (0,01-0,1M) bis gar keine Induktion mit IPTG und auch der für unlösliche Proteine optimierte Expressionsstamm Lemo21 (DE3; New England Biolabs) bewirkten keine Expression als lösliches, aktives Protein. Die Expression als carboxyterminales 6xHisTag-Protein mit dem Expressionsvektor pET3a war ebenfalls nicht erfolgreich. Auch konnte das Allel 1 von pLgBX8 bisher nicht transient in Blättern von *N. benthamiana* exprimiert werden. Es konnten für beide Allele von pLgBX8 Peptidsequenzen identifiziert werden, was bedeutet dass beide Allele aus dem Pflanzenproteinextrakt gereinigt wurden. Es besteht also die Möglichkeit, dass Allel 1 exprimiert wird, aber ein Nullallel darstellt, während Allel 2 ein aktives Allel ist. Weitere Experimente betreffen daher die Expression des Allels 2.

3.2.2 Substratspezifität von CoGT und LgGT

Die Gensequenz der putativen Flavonoid-3-O-Glucosyltransferasen CoGT und LgGT wurde über Homologievergleiche mit Flavonoid-3-O-Glucosyltransferasen isoliert. Die Funktion von

CoGT und LgGT in der Glucosylierung von Flavonoiden konnte *in vitro* bestätigt werden (Prof. Schwab, TU München). Beide Enzyme glucosylieren die Flavonole Kaempferol, Quercetin und Myricetin (Abbildung 26, Anhang). Für die Anthocyanidine Pelargonidin und Delphinidin konnte keine Umsetzung festgestellt werden. Beide Enzyme stellen daher Flavonoid Glucosyltransferasen dar. DIBOA wurde durch beide Enzyme nicht glucosyliert (Daten nicht gezeigt).

3.2.3 Kinetische Daten von CoBX8

Die kinetischen Daten von CoBX8 wurden für die Substrate DIBOA, DIMBOA und UDPG bestimmt. Die Abhängigkeit der Umsatzgeschwindigkeiten von der Substratkonzentration zeigt jeweils eine Michaelis-Menten-Kinetik (Abbildung 11-Abbildung 13). Für das Akzeptor-Substrat DIBOA, das in *C. orientalis* vorkommende Benzoxazinoid, wurde ein K_m -Wert von 441 μM gemessen, der k_{cat} -Wert liegt bei $9,5 \text{ s}^{-1}$. Auch für das Akzeptor-Substrat DIMBOA, das hauptsächlich vorkommende Benzoxazinoid in *Z. mays*, kann eine Glucosylierung durch CoBX8 festgestellt werden. Der K_m -Wert für DIMBOA ist mit 3168 μM etwa 10-fach höher als für das Substrat DIBOA. Der k_{cat} -Wert wurde mit $17,6 \text{ s}^{-1}$ bestimmt, und liegt damit geringfügig über dem für DIBOA gemessenen Wert. Die kinetischen Daten für das Donor-Substrat UDPG liegen in derselben Größenordnung wie für das Substrat DIBOA: Der K_m -Wert beträgt 743 μM , der k_{cat} -Wert beträgt $8,5 \text{ s}^{-1}$ (Tabelle 21).

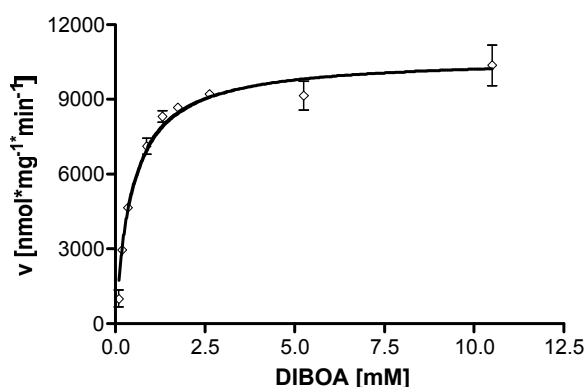


Abbildung 11: Michaelis-Menten Enzymkinetik von heterolog exprimiertem CoBX8 für das Substrat DIBOA.

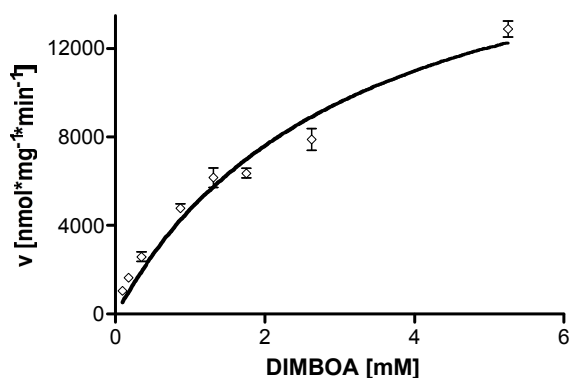


Abbildung 12: Michaelis-Menten Enzymkinetik von heterolog exprimiertem CoBX8 für das Substrat DIMBOA.

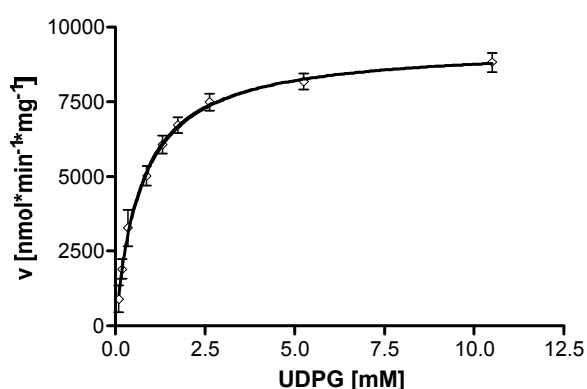


Abbildung 13: Michaelis-Menten Enzymkinetik von heterolog exprimiertem CoBX8 für das Substrat UDPG.

Tabelle 21: Vergleich der Enzymparameter für die Substrate UDPG, DIBOA, DIMBOA der UDPG: DIBOA Glucosyltransferase CoBX8 mit den Enzymen ZmBX8 und ZmBX9. ¹Von Rad *et al.*, 2001.

Enzym	UDPG			DIBOA			DIMBOA		
	K_m (μM)	k_{cat} (sec^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{mM}^{-1} \text{sec}^{-1}$)	K_m (μM)	k_{cat} (sec^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{mM}^{-1} \text{sec}^{-1}$)	K_m (μM)	k_{cat} (sec^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{mM}^{-1} \text{sec}^{-1}$)
CoBX8	743 ± 77	$8,5 \pm 0,2$	11,4	441 ± 47	$9,5 \pm 0,2$	21,5	3168 ± 549	$17,6 \pm 1,6$	5,6
ZmBX8 ¹	81	22,6	280	61	12,5	205	81	22,7	280
ZmBX9 ¹	96	22,6	117	1300	12,5	6	71	11,6	163

Der K_m -Wert der Glucosyltransferase-Aktivität aus *C. orientalis* für das Substrat DIBOA wurde zusätzlich mit dem über Ammoniumsulfatfällung und Gelfiltration partiell gereinigten Pflanzenextrakt bestimmt. Dieser liegt bei dem gereinigten Enzym mit $178 \mu\text{M}$ unter dem mit dem heterolog exprimierten Protein bestimmten Wert von $441 \mu\text{M}$. Dieser Unterschied kann auf Modifikationen der Benzoxazinoid Glucosyltransferase *in planta* zurückgeführt werden. Der Vergleich mit den publizierten Enzymparametern von ZmBX8 und ZmBX9 (von Rad *et al.*, 2001; Tabelle 21) zeigt, dass heterolog exprimiertes CoBX8 für das Substrat DIBOA sowohl in Bezug auf Affinität als auch bezüglich der katalytischen Effizienz k_{cat}/K_m eine

Mittelstellung zwischen *ZmBX8* und *ZmBX9* einnimmt. Beide *Z. mays*-Enzyme haben signifikant niedrigere K_m -Werte für DIMBOA bei ähnlichen k_{cat} -Werten.

Für die über Ammoniumsulfatfällung und Gelfiltration partiell gereinigte DIBOA:UDPG-Enzymaktivität aus *L. galeobdolon* wurde ein K_m -Wert von 119 μM bestimmt. Dieser liegt damit in der Größenordnung des K_m -Werts der partiell gereinigten CoBX8 (178 μM).

Die höchste Enzymaktivität von heterolog exprimiertem CoBX8 wurde für einen pH-Wert von 7,5-8,0 bestimmt (Abbildung 14). Die relative Enzymaktivität des partiell gereinigten Enzyms ist zwischen einem pH-Wert von 7,0 und 7,5 am höchsten.

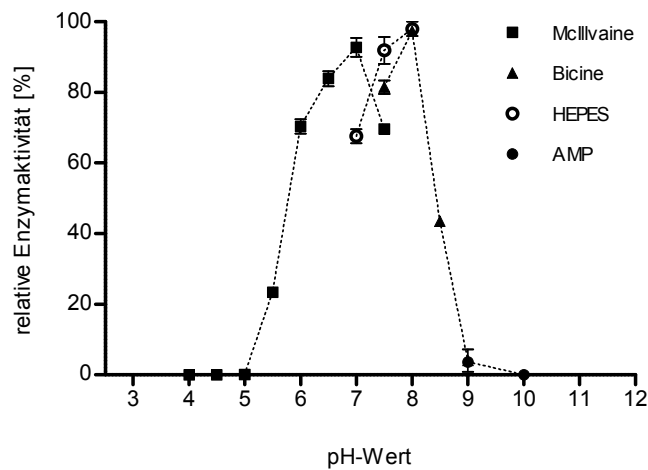


Abbildung 14: Relative Enzymaktivität von heterolog exprimiertem CoBX8 bei verschiedenen pH-Werten und unterschiedlichen Puffern: Das pH-Optimum liegt bei ca. 7,5-8,0.

3.2.4 Substratspezifität von CoBX8

Es wurden verschiedene Akzeptor-Substrate auf Glucosylierung durch CoBX8 getestet (Abbildung 15). Für die vier Substrate DIBOA, DIMBOA, HBOA und HMBOA konnte die Umsetzung zum Glucosid gemessen werden (Tabelle 22). Die Umsatzgeschwindigkeit ist für das Substrat DIBOA am höchsten, jedoch konnten ähnliche Umsatzgeschwindigkeiten für DIMBOA, HBOA und HMBOA gemessen werden. Im Unterschied dazu wird DIMBOA durch *ZmBX8* und *ZmBX9* deutlich schneller umgesetzt als DIBOA, HBOA und HMBOA (von Rad *et al.*, 2001). Für die Benzoxazinoide BOA, BOA-6-OH und 3-Hydroxy-Indolin-2-on konnte kein Umsatz durch CoBX8 festgestellt werden. Es scheint, dass Substrate von CoBX8 zwei kondensierte Sechseringe aufweisen müssen. Substitutionen am C7-Atom bzw. am N1-Atom scheinen bei CoBX8 im Gegensatz zu *ZmBX8* und *ZmBX9* (von Rad *et al.*, 2001) nur geringfügige Auswirkungen auf die Umsatzgeschwindigkeit zu haben. Die Phytohormone

Indol-3-Essigsäure und *trans*-Zeatin, sowie alle getesteten Flavonoide wurden von CoBX8 nicht glucosyliert (Tabelle 22). Des Weiteren konnte auch für ZmBX8 und ZmBX9 keine Glucosylierung des Cytokinins *trans*-Zeatin festgestellt werden.

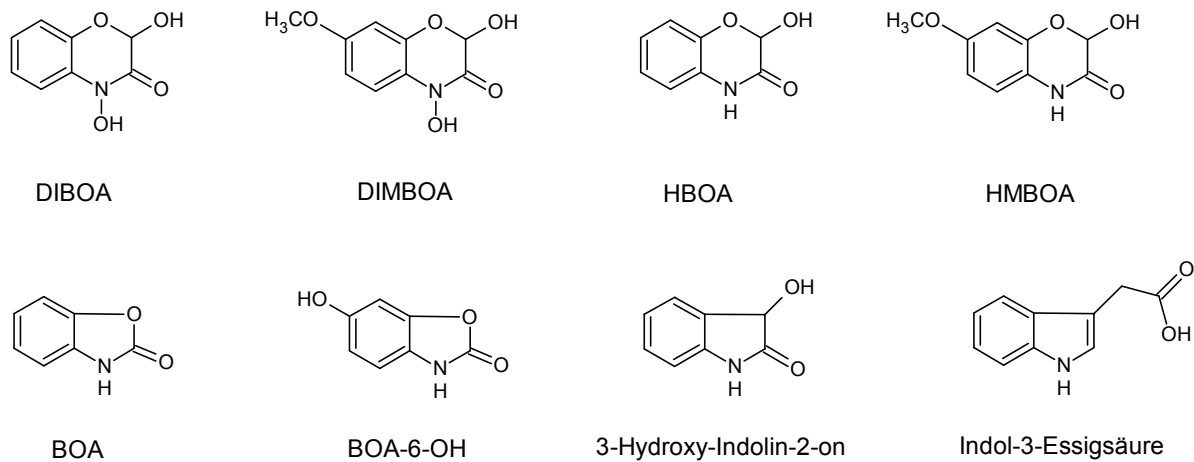


Abbildung 15: Strukturformeln verschiedener Benzoxazinoide und Indol-3-Essigsäure, die auf Glucosylierung durch CoBX8 getestet wurden.

Tabelle 22: Substratspezifität von heterolog exprimierter CoBX8: Umsatzgeschwindigkeiten für verschiedene Benzoxazinoide, Indol-3-Essigsäure, verschiedene Flavonoide und Zeatin. nn: nicht nachweisbar.

Substrat	Umsatzgeschwindigkeit [$\mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$]	Substrat	Umsatzgeschwindigkeit [$\mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$]
DIBOA	$8,8 \pm 0,1$	Indol-3-Essigsäure	nn
DIMBOA	$8,1 \pm 0,4$	<i>trans</i> -Zeatin	nn
HBOA	$7,3 \pm 0,1$	Kaempferol	nn
HMBOA	$6,8 \pm 0,1$	Quercitin	nn
BOA	nn	Myricetin	nn
BOA-6-OH	nn	Delphinidin	nn
3-Hydroxy-Indolin-2-on	nn	Pelargonidin	nn

3.2.5 Vergleich der CoBX8 und pLgBX8 Proteinsequenzen mit anderen Glycosyltransferasen

CoBx8 kodiert für ein Protein mit 476 AS, und pLgbx8 für ein Protein mit 450 AS. Sie sind zu 33,5% identisch und haben eine Ähnlichkeit von 53,2%. Ein Alignment ihrer Aminosäuresequenzen mit verschiedenen pflanzlichen UGTs der Familie 1 zeigt, dass beide Proteine das hochkonservierte PSPG-Motiv aufweisen (Abbildung 27, Anhang). Da zudem beide Proteine die höchste Homologie zu UGTs der Familie 1 haben, können sowohl CoBX8 und pLgBX8 dieser UGT-Familie zugeordnet werden. Die höchste Aminosäureidentität zu einem

Protein bekannter Funktion zeigt CoBX8 gegenüber der Cytokinin-O-Glucosyltransferase 2 aus *A. thaliana* (AtCOGT2; 49,3%), und der UDPG-p-Hydroxymandelonitril Glucosyltransferase aus *S. bicolor* (SbHMNGT; 42,9%). Während AtCOGT2 in der Homöostasis von Cytokinin involviert ist, katalysiert SbHMNGT, wie CoBX8, die Glucosylierung einer Abwehrsubstanz, des cyanogenen Glycosids Dhurrin. Die Homologie von CoBX8 zu ZmBX8 und ZmBX9, die die gleiche Funktion ausüben wie CoBX8, ist wesentlich geringer (Tabelle 23).

Tabelle 23: AS-Identitäten von CoBX8 und pLgBX8 zu funktionell charakterisierten UGTs der Familie 1. ZmBX8: Benzoxazinoid Glucosyltransferase aus *Z. mays* (Q8W2B7), ZmBX9: Benzoxazinoid Glucosyltransferase aus *Z. mays* (Q8W2B6), CoBX8: Benzoxazinoid Glucosyltransferase aus *C. orientalis*, AtCOGT2: Cytokinin-O-Glucosyltransferase 2 aus *A. thaliana* (Q9SK82), SbHMNGT: UDPG-p-Hydroxymandelonitril Glucosyltransferase aus *S. bicolor* (Q9SBL1), pLgBX8-1: Allel 1 der putativen Benzoxazinoid Glucosyltransferase aus *L. galeobdolon*. Die Berechnung erfolgte mit dem MetGAT-Matrix *Alignment Tool* und der BLOSUM50 *Scoring Matrix*.

Enzym	Funktion	AS-Identität von CoBX8 in [%]	AS-Identität von pLgBX8-1 in [%]
AtCOGT2	Cytokinin-O-Glucosyltransferase 2	49,3	34,2
SbHMNGT	UDPG-p-Hydroxymandelonitril Glucosyltransferase	42,9	30,4
ZmBX8	Benzoxazinoid Glucosyltransferase	33,9	29,2
ZmBX9	Benzoxazinoid Glucosyltransferase	32,1	27,8

Die putative DIBOA Glucosyltransferase aus *L. galeobdolon* pLgBX8 weist im Vergleich zu CoBX8 geringere Homologien zu UGTs bekannter Funktion auf. Die höchste Homologie wird ebenfalls für die Cytokinin-O-Glucosyltransferase 2 aus *A. thaliana* (AtCOGT2) berechnet (Tabelle 23).

3.2.6 Genexpressionsanalyse von CoBx8

Die Genexpression von CoBx8 in unterschiedlichen Pflanzenorganen relativ zur Expression von GAPDH wurde durch quantitative RT-PCR bestimmt. CoBx8 ist am stärksten im Keimling exprimiert, die Genexpression liegt hier im Bereich der GAPDH. Die Expressionsstärke nimmt von der Blüte zur Wurzel weiter ab, bleibt aber in allen untersuchten Pflanzenorganen in derselben Größenordnung wie die Genexpression des *house-keeping*-Gens GAPDH (Abbildung 16). Die Expressionsstärke von CoBx8 liegt in derselben Größenordnung wie diejenige von ZmBx8 und ZmBx9. Die höchste Expression von 0,4 pg/pg GAPDH konnte für ZmBx8 im Spross zwei Tage nach der Keimung gemessen werden (von Rad *et al.*, 2001).

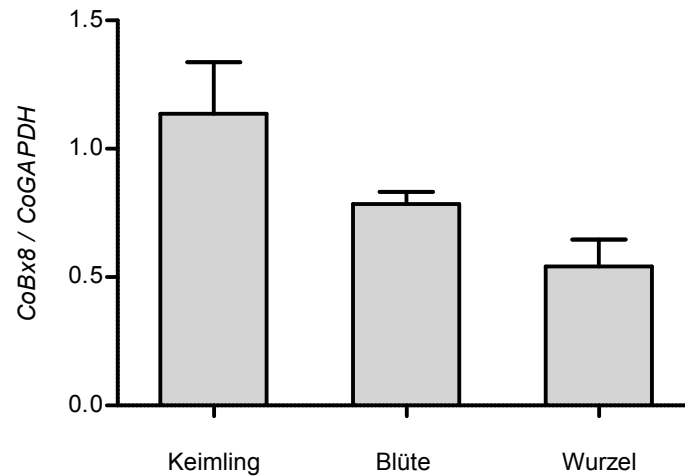


Abbildung 16: *CoBx8* Genexpression in den Pflanzenorganen Keimling, Blüte und Wurzel. Die Messung der Transkriptkonzentration wurde in Duplikaten mit drei biologischen Replikaten durchgeführt.

3.3 Funktion von *CoBX8* in planta

Die Benzoxazinoide DIBOA und DIMBOA sind stark toxisch für Pflanzen (Barnes und Putnam, 1987, Sahi *et al.*, 1990, Sicker *et al.*, 2000). Ihre Glucosylierung reduziert deren Phytotoxizität (Sicker *et al.*, 2000). Für die Untersuchung des Entgiftungspotentials von Benzoxazinoid Glucosyltransferasen eignet sich die Expression in *A. thaliana*. Diese synthetisiert natürlicherweise keine Benzoxazinoide und weist keine spezifische Glucosyltransferase auf. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von *ZmBX8* und *ZmBX9* in *A. thaliana* die Phytotoxizität der Benzoxazinoide DIBOA und DIMBOA für die Pflanze reduziert (von Rad *et al.*, 2001). Durch die heterologe Expression von *CoBX8* in *A. thaliana*, kann die *in vitro* gezeigte UDPG:DIBOA Glucosyltransferase-Aktivität von *CoBX8* bestätigt werden und die Entgiftung der Benzoxazinoide durch *CoBX8* nachgewiesen werden.

3.3.1 Enzymatische Aktivität von *CoBX8* in *Arabidopsis*-Pflanzen

Die *CoBx8*-cDNA wurde unter Kontrolle des 35S Promotors ins *A. thaliana* Genom integriert. 11 Primärtransformanten wurden isoliert, geselbstet und die Nachkommen (T1-Generation) auf BASTA-Resistenz selektiert. Pflanzen der T1-Generation von 10 unabhängigen Linien wurden verwendet um die UDPG:DIBOA Glucosyltransferase-Aktivität zu messen. Dazu wurde für jede Pflanze aus drei Blättern ein Proteinrohextrakt hergestellt, der direkt für die Enzymaktivitätstests eingesetzt wurde. In neun der zehn getesteten Extrakte konnte

Enzymaktivität festgestellt werden (Tabelle 24), während im Extrakt des Columbia (Col-0) Wildtyps, wie erwartet, keine DIBOA Glucosylierungsaktivität nachgewiesen werden konnte. In den 9 Linien waren allerdings große Aktivitäts-Unterschiede zu erkennen. Diese Variation kann durch unterschiedliche Integrationsorte der T-DNA im *Arabidopsis*-Genom erklärt werden. Auch der unterschiedliche Genotyp der T1-Pflanzen bezüglich des *CoBx8*-Gens kann diese Unterschiede verursachen, denn die Pflanzen sind nach der BASTA-Selektion zu 1/3 homozygot und zu 2/3 heterozygot. Für die anschließenden Resistenztests wurden homozygote Pflanzen der T2-Generation zweier Linien mit hoher Glucosylierungsaktivität (*CoBx8-7* und *CoBx8-9*) verwendet.

Tabelle 24: Relative UDPG:DIBOA Glucosyltransferase-Aktivität in Proteinrohextrakten verschiedener Linien von *CoBX8* exprimierenden *A. thaliana* Pflanzen (T1-Generation). nn: nicht nachweisbar.

Linie	relative Enzymaktivität [%]	Linie	relative Enzymaktivität [%]
<i>CoBx8-1</i>	nn	<i>CoBx8-12</i>	7,6
<i>CoBx8-2</i>	9,8	<i>CoBx8-15</i>	19,5
<i>CoBx8-7</i>	100,0	<i>CoBx8-16</i>	15,0
<i>CoBx8-8</i>	37,0	<i>CoBx8-17</i>	3,8
<i>CoBx8-9</i>	31,7	<i>CoBx8-20</i>	6,6
<i>CoBx8-10</i>	nn	Col-0-Wildtyp	nn

3.3.2 Resistenztests der transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen

Homozygote *CoBx8*-Transformanten der T2 Generation wurden auf ihre Toleranz gegenüber DIBOA und DIMBOA getestet. Die Pflanzen wurden für neun Tage auf ½ MS-Medium angezogen und anschließend in ½ MS-Medium mit DIBOA bzw. DIMBOA-Konzentrationen von 0-2 mM inkubiert, das täglich gewechselt wurde. Zur Kontrolle wurden *ZmBx8*- und *ZmBx9*-Transformanten (von Rad *et al.*, 2001), sowie Col-0-Wildtyp-Pflanzen eingesetzt. Nach vier Tagen Inkubation wurde bonitiert. Wildtyp-Kontroll-Pflanzen, die auf Medium mit DIBOA und DIMBOA wuchsen, waren mit steigender Benzoxazinoid-Konzentration zunehmend geschädigt (Abbildung 17, A und B). Die Keimlinge waren ausgebleicht und im Wachstum gehemmt. Die *CoBx8*-, *ZmBx8*-, und *ZmBx9*-Transformanten zeigten dagegen eine starke Toleranz gegenüber dem phytotoxischen DIBOA auf. Die Keimlinge blieben grün und waren im Vergleich zu den Kontrollpflanzen kaum im Wachstum gehemmt (Abbildung 17, A). Die *CoBx8*-Transformanten haben auch eine erhöhte Toleranz gegenüber DIMBOA. Im Vergleich zu den Wildtyp-Pflanzen sind die Keimlinge weniger stark geschädigt. Jedoch scheint das Entgiftungspotential der *CoBx8*-Transformanten gegenüber DIMBOA weniger stark ausgeprägt zu sein, als das der *ZmBx8*-, und *ZmBx9*-Transformanten (Abbildung 17, B).

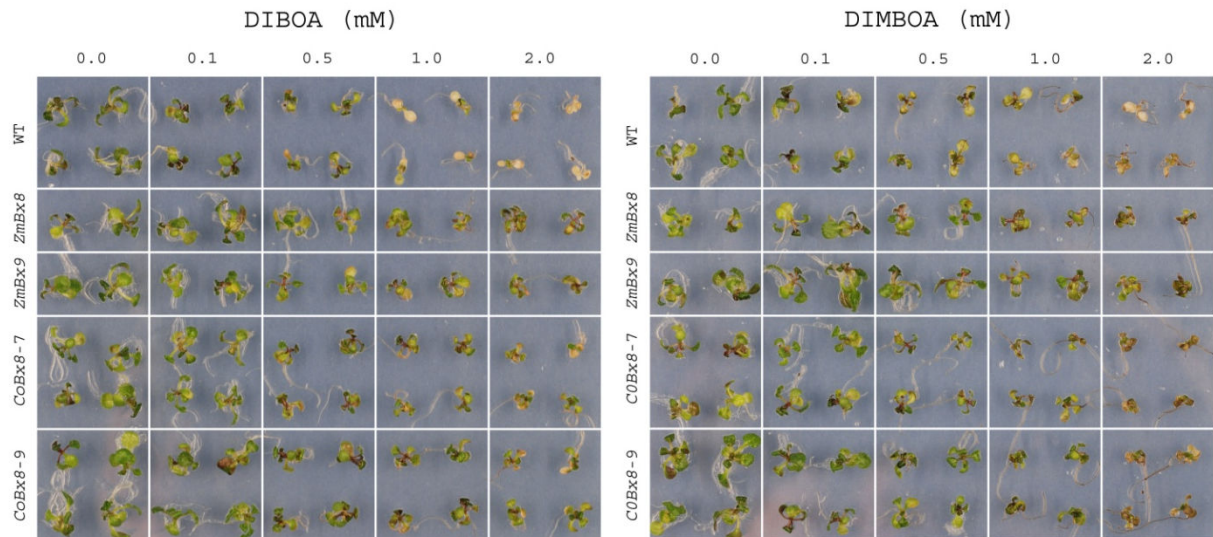


Abbildung 17: Entgiftung der Benzoxazinoide DIBOA und DIMBOA durch heterologe Expression von *CoBx8*, *ZmBx8* und *ZmBx9* in *A. thaliana*. Homozygote T2-Transformanten wurden 4 Tage in $\frac{1}{2}$ MS-Medium inkubiert, welches 0-2 mM DIBOA oder DIMBOA enthielt. *CoBx8*-, *ZmBx8*- und *ZmBx9*-Transformanten waren nach 4 Tagen grün und kaum im Wachstum gehemmt, wohingegen Wildtyp *A. thaliana*-Pflanzen mit zunehmender Benzoxazinoid-Konzentration stark geschädigt waren.

3.4 Isolierung der Benzoxazinoid-Glucosid β -Glucosidase aus *C. orientalis*

Um die Benzoxazinoid-Glucosid β -Glucosidase aus *C. orientalis* (*CoGLU1*) zu isolieren, wurde das *C. orientalis* Transkriptom nach Sequenzen durchsucht, die Homologie zu β -Glucosidasen des Sekundärmetabolismus aufweisen. Kandidaten wurden transient in *N. benthamiana* exprimiert und auf die Hydrolyse von GDIBOA analysiert.

3.4.1 Identifizierung von Benzoxazinoid-Glucosid β -Glucosidase Kandidatengensequenzen

Für die Isolierung der *CoGlu1*-Gensequenz wurden zunächst die *C. orientalis*-Transkriptom-Sequenzen mit einer Blast-Suche (Prof. Dr. Rattei, Universität Wien) nach Homologien zu zwei β -Glucosidasen des Sekundärmetabolismus durchsucht. Zum einen wurde mit der Benzoxazinoid-Glucosid β -Glucosidase *ZmGLU1* aus *Z. mays* (Esen, 1992; Bandaranayake und Esen, 1996; Cicek und Esen, 1999) die gesuchte Enzymfunktion in der Abfrage eingesetzt. Um auch eine β -Glucosidase Sequenz aus einer dikotylen Pflanze zu berücksichtigen, wurde als zweite Suchsequenz die β -Glucosidase *AfTGG1* (Thiogluco-side Glucohydrolase 1 bzw. Myrosinase 1; Barth und Jander, 2006) aus *A. thaliana* ausgesucht. Die erhaltenen Kandidatensequenzen sind entsprechend den *Bit-Score*-Werten der Protein-Alignments aufgelistet (Tabelle 25). Das Alignment des Kandidaten 1 mit *ZmGLU1* erzielt

den höchsten *Bit-Score*-Wert von 444. Die Bewertung der Alignments (der *Bit-Score* der Blast-Suche) hängt jedoch nicht nur von der Homologie der Sequenzen selbst, sondern auch von der Sequenzlänge der Kandidatensequenzen ab. Längere β -Glucosidase Teilsequenzen, die aus einer höheren Anzahl aus Transkriptom-Einzelsequenzen des *C. orientalis* Transkriptoms assembliert wurden, erhalten einen höheren *Bit-Score*. Damit wurde eine Rangliste der Kandidaten nach Homologie und indirekt auch nach der Expressionsstärke in 7-10 Tage alten *C. orientalis* Keimlingen erstellt. So weist Kandidat 2 z.B. eine wesentlich höhere Homologie zu *ZmGLU1* auf, erhält jedoch geringere *Bit-Scores* aufgrund der geringeren Sequenzlänge.

Für die Auswahl von Kandidaten wurde davon ausgegangen, dass *CoGLU1* eine hohe Expressionsrate aufweist, wie sie für Benzoxazinoid-Biosynthesegene aus *Z. mays* (von Rad *et al.*, 2001; Jonczyk *et al.*, 2008) und *C. orientalis* (Schullehner *et al.*, 2008; diese Arbeit) gefunden wurden.

Tabelle 25: Blastx-Suchergebnisse mit den *ZmGLU1* und *AtTGG1* Sequenzen in den *C. orientalis* Transkriptomdaten: Die Protein-Alignments mit den *CoGLU*Kandidaten 1-4 erhielten die besten *Bit-Score*-Werte.

Contig	Sequenzlänge [bp]	AS-Identität <i>ZmGLU1</i> [%]	<i>Bit-Score</i> <i>ZmGLU1</i>	AS-Identität <i>AtTGG1</i> [%]	<i>Bit-Score</i> <i>AtTGG1</i>
CoGluKandidat 1	1638	45,3	444	44,9	376
CoGluKandidat 2	534	62,8	196	52,5	155
CoGluKandidat 3	519	53,0	155	44,8	130
CoGluKandidat 4	657	39,8	96	51,2	131

Für die funktionelle Analyse wurden die Kandidaten 1 und 2 ausgewählt. Für den *CoGlu*Kandidaten 1 war der vollständige offene Leserahmen (1638 bp) vorhanden. Die vollständige Gensequenz des Kandidaten 2 (1541 bp) wurde durch *Nested-PCRs* auf einem *C. orientalis* cDNA-Phagenlysats isoliert (Pham Vu, 2009).

3.4.2 Transgene Expression der Benzoxazinoid-Glucosid β -Glucosidase-Kandidaten in *N. benthamiana*

Im Gegensatz zu β -Glucosidasen aus monokotylen Pflanzen werden β -Glucosidasen dikotyler Pflanzen glycosyliert (Morant *et al.*, 2008a). Die Glykosylierung ist für die Stabilität der β -Glucosidasen von essentieller Bedeutung (Zhou *et al.*, 2002, Wei *et al.*, 2004), weshalb

die rekombinante Expression in *E. coli* oft zu unlöslichem und inaktiven Proteinen führte (Zhou *et al.*, 2002).

Als Alternative wurden die CoGluKandidaten 1 und 2 mit einer neuen Expressionsstrategie, der sogenannten *magniffection* (Marillonnet *et al.*, 2005 und Gleba *et al.*, 2005), transient in *N. benthamiana* exprimiert. Mit diesem System werden durch Infiltration mit Agrobakterien auf TMV (Tabak-Mosaik-Virus)-basierende virale Provektoren in die Pflanzen eingebracht. *In planta* findet die Prozessierung zu aktiven Replikons statt, die innerhalb der Zelle amplifiziert werden und sich von Zelle zu Zelle fortbewegen. Beide CoGLUKandidaten, sowie als Kontrolle das *green fluorescent protein* (GFP), konnten mit diesem System exprimiert werden (Göpfrich, 2010). Die Expressionsstärke war in allen Fällen vergleichbar mit der Expressionsstärke der großen Untereinheit der RuBisCO (ca. 55 kDa), dem mengenmäßig am Häufigsten vorkommenden Protein in Pflanzen (Abbildung 18).

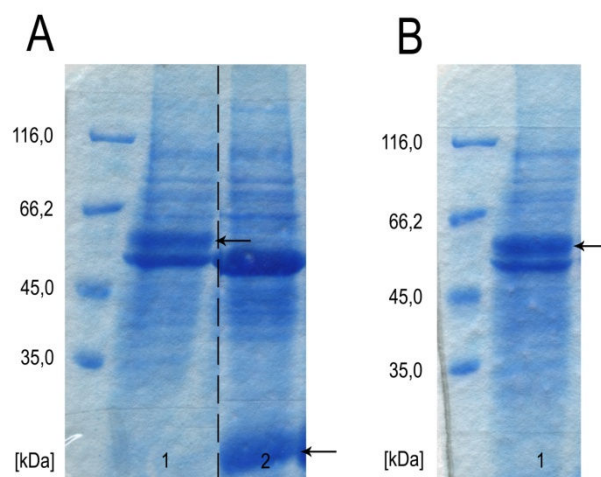


Abbildung 18: Expression des CoGluKandidaten 1 (B), des CoGluKandidaten 2 (A, Spur 1) sowie des *green fluorescent proteins* (GFP; A, Spur 2) durch *magniffection*. Die Pfeile kennzeichnen das exprimierte Zielprotein (CoGluKandidat 1: 58,7 kDa; CoGluKandidat 2: 58,1 kDa; GFP: 26,9 kDa).

Die funktionelle Expression der beiden heterolog exprimierten CoGLUKandidaten wurde durch Enzymaktivitätstests mit dem artifiziellen Substrat 4-Nitrophenyl-b-D-glucopyranosid (pNPG) untersucht. Dieses wird von einem Großteil der pflanzlichen β -Glucosidasen des Sekundärmetabolismus als Substrat akzeptiert. Für den CoGLUKandidaten 1 wurde bei einer Substratkonzentration von 66400 μM und Inkubation bei 37 °C eine Umsatzgeschwindigkeit von 6780 $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ gemessen. Kandidat 2 zeigt eine etwa um die Hälfte geringere Umsatzgeschwindigkeit als Kandidat 1 (2820 $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$). Die CoGLUKandidaten konnten beide funktionell exprimiert werden.

Der CoGLUKandidat 1 setzt GDIBOA zu dem Aglucon DIBOA um, und wird im Folgenden als CoGLU1 bezeichnet. Für den Kandidaten 2 konnte keine Aktivität gegenüber GDIBOA gezeigt werden. Das Enzym wird künftig als CoGLU2 bezeichnet.

3.5 Charakterisierung von CoGLU1 und CoGLU2

Für die enzymatische Charakterisierung von CoGLU1 und CoGLU2 wurde der Proteinrohextrakt aus *N. benthamiana* eingesetzt. Die Menge an exprimierter β -Glucosidase relativ zum Gesamtprotein wurde mittels SDS-PAGE bestimmt. Als Kontrolle wurden Proteinextrakte von untransformierten *N. benthamiana* Pflanzen eingesetzt.

3.5.1 Kinetische Daten von CoGLU1

Die Umsatzgeschwindigkeit von CoGLU1 in Abhängigkeit der Substratkonzentration von GDIBOA und GDIMBOA zeigt eine Michaelis-Menten-Kinetik (Abbildung 19 und Abbildung 20). Für die Umsetzung von GDIBOA, das in *C. orientalis* vorkommende Benzoxazinoid-Glucosid, wurde ein K_m -Wert von 4,6 mM gemessen, der k_{cat} -Wert liegt bei $32,0 \text{ s}^{-1}$. CoGLU1 hydrolysiert aber auch GDIMBOA, das 7-Methoxy-Derivat von GDIBOA, welches in *C. orientalis* nicht synthetisiert wird (Schullehner *et al.*, 2008). Für dieses Substrat zeigt CoGLU1 jedoch eine etwa 8-fach niedrigere Affinität auf, der K_m -Wert für GDIMBOA liegt bei 28,4 mM. Der k_{cat} -Wert wurde mit $4,2 \text{ s}^{-1}$ bestimmt und ist damit etwa 8-fach niedriger als für das Substrat GDIBOA (Tabelle 26).

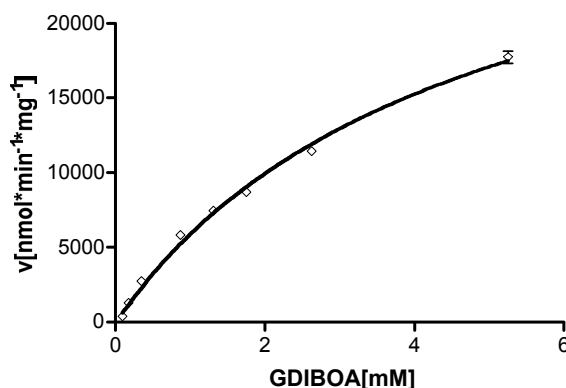


Abbildung 19: Michaelis-Menten Enzymkinetik von CoGLU1 für das Substrat GDIBOA.

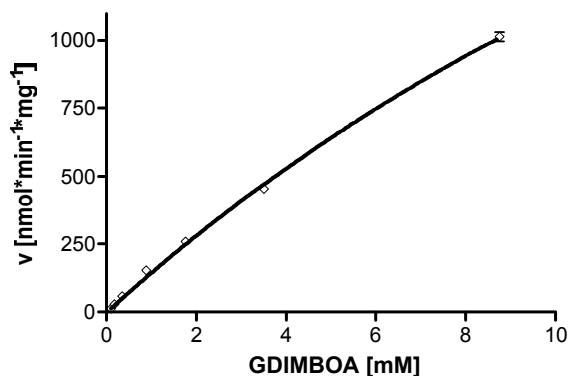


Abbildung 20: Michaelis-Menten Enzymkinetik von CoGLU1 für das Substrat GDIMBOA.

Tabelle 26: Enzymparameter für heterolog exprimiertes CoGLU1 für die Substrate GDIBOA und GDIMBOA.

Enzym	GDIBOA			GDIMBOA		
	K_m (mM)	k_{cat} (sec ⁻¹)	k_{cat}/K_m (sec ⁻¹ /mM ⁻¹)	K_m (mM)	k_{cat} (sec ⁻¹)	k_{cat}/K_m (sec ⁻¹ /mM ⁻¹)
CoGLU1	4,6 ± 0,4	32,0 ± 1,55	7,0	28,4 ± 4,4	4,2 ± 0,5	0,15

3.6 Substratspezifität von CoGLU1 und CoGLU2

Die Umsatzgeschwindigkeit von CoGLU1 und CoGLU2 für verschiedene Substrate (Abbildung 21) wurde getestet und verglichen (Tabelle 27). Alle Tests wurden bei 30 °C und mit Substratkonzentrationen von 500 µM durchgeführt. Die spezifische Aktivität von CoGLU1 für das Substrat pNPG wurde photometrisch gemessen und beträgt 555 nmol min⁻¹ mg⁻¹. Die Messung der Umsetzung von GDIBOA, GDIMBOA und Dhurrin erfolgte über die Messung der freigesetzten Glucose ebenfalls photometrisch. Die Umsatzgeschwindigkeit der Deglucosylierung von GDIBOA und GDIMBOA wurde zusätzlich durch die Quantifizierung des freigesetzten Aglucons über HPLC-Analyse bestimmt, dabei wurden Umsatzgeschwindigkeiten derselben Größenordnung bestimmt (GDIBOA: 5803 ± 44 nmol min⁻¹ mg⁻¹; GDIMBOA: 153 ± 12 nmol min⁻¹ mg⁻¹).

Das Substrat GDIBOA wird von CoGLU1 mit der höchsten Umsatzgeschwindigkeit deglucosyliert. Das 7-Methoxy-Derivat von GDIBOA, GDIMBOA wird zwar ebenfalls als Substrat akzeptiert, doch wird es mit einer ca. 40-fach reduzierten Umsatzgeschwindigkeit umgesetzt. Interessanterweise wird das cyanogene Glycosid Dhurrin von CoGLU1 fast ebenso schnell hydrolysiert wie GDIBOA. Zusätzlich wirkt Dhurrin als gemischter oder nichtkompetitiver Hemmstoff für die GDIBOA-Hydrolyse durch CoGLU1. Bei der sogenannten gemischten Hemmung kann der Inhibitor mit dem Substrat um dessen

Bindungsplatz im aktiven Zentrum des Enzyms konkurrieren (kompetitive Hemmung) und an den Enzym-Substrat-Komplex binden und dadurch die Umsetzung des Substrats hemmen (unkompetitive Hemmung). Für die beiden Komponenten der gemischten Hemmung wurden Inhibitionskonstanten von 0,213 mM (K_{i1} ; kompetitiv) und 0,278 mM (K_{i2} ; unkompetitiv) bestimmt. Das Cytokinin-Glucosid *trans*-Zeatin-O-Glucosid (tZOG) wird ebenfalls von CoGLU1 umgesetzt, die Umsatzgeschwindigkeit ist etwa 60-fach geringer als die Umsatzgeschwindigkeit des Substrats GDIBOA. Das Ribosid von Zeatin wird von CoGLU1 nicht hydrolysiert.

Für CoGLU2 konnte keine Umsetzung von GDIBOA, Zeatin-Ribose und *trans*-Zeatin-O-Glucosid (tZOG) gezeigt werden. Von den getesteten Substraten wird das artifizielle Substrat pNPG und Dhurrin hydrolysiert ($963 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$).

Tabelle 27: Substratspezifität von CoGLU1. Die Substrate wurden in einer Konzentration von 500 μM eingesetzt. nn: nicht nachweisbar.

Substrat	spezifische Aktivität ($\text{nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$)
GDIBOA	6030 ± 359
GDIMBOA	131 ± 20
Dhurrin	5684 ± 116
pNPG	555 ± 14
<i>trans</i> -Zeatin-O-Glucosid (tZOG)	$60,8 \pm 1,8$
Zeatin-Ribosid	nn

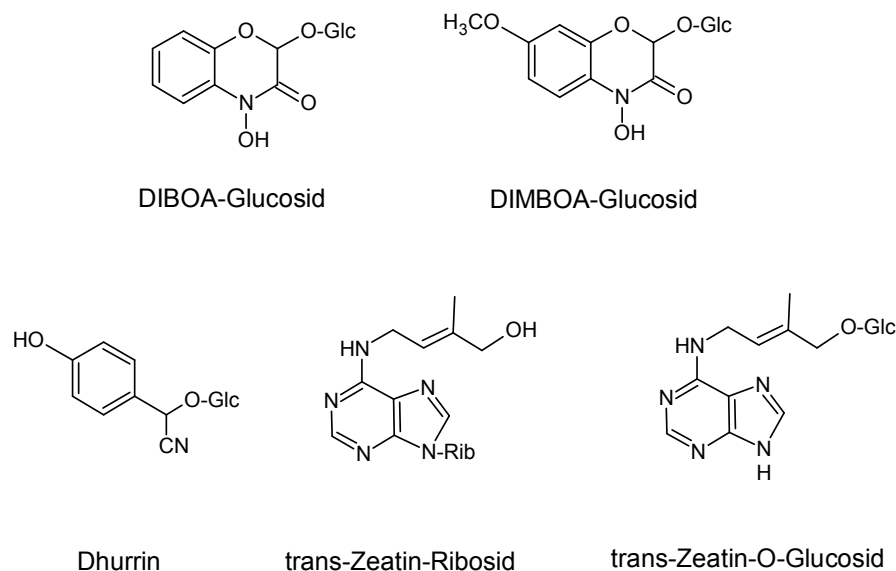


Abbildung 21: Strukturformeln der auf Umsetzung durch CoGLU1 und CoGLU2 untersuchten Substrate. Glc: Glucosid; Rib: Ribosid.

3.6.1 Vergleich der CoGLU1 und CoGLU2 Proteinsequenzen mit anderen Glycosid Hydrolasen der Familie 1

Die Aminosäuresequenz von CoGLU1 und CoGLU2 wurde mit Aminosäuresequenzen von β -Glucosidasen der Abwehrsysteme Benzoxazinoide (*ZmGLU1*, *ScGLU* und *TaGLU1a*) und cyanogener Glucoside (*SbDHR1*) verglichen (Abbildung 28, Anhang). Für diese β -Glucosidasen ist entweder die Kristallstruktur (*ZmGLU1a*, *TaGLU1a* und *SbDHR1*) oder eine durch Homologiemodellierung ermittelte Struktur (*ScGLU*) veröffentlicht. Für die Sequenzvergleiche wurden die experimentell gezeigten oder durch Vorhersageprogramme ermittelten (*TaGLU1a*, *CoGLU1* und *CoGLU2*, siehe 3.6.3) prozessierten Aminosäuresequenzen ohne Transitpeptide herangezogen. Die Aminosäuresequenz von *CoGLU1* und *CoGLU2* enthalten die für GH1-Enzyme charakteristischen konservierten Motive ITENG und TFNEP und sind damit der Familie 1 der Glycosid Hydrolasen zuzuordnen.

CoGLU1 und *CoGLU2* weisen eine Aminosäureidentität von 64,0% auf. Die Aminosäureidentität von *CoGLU1* zu einem Protein bekannter Funktion ist gegenüber der Exoglucanase aus *O. sativa* (*Os4bglu12*; 59,9%), und den Hydroxynitril-Glucosid spaltenden β -Glucosidasen D2 und D4 aus *L. japonicus* (*LjBGD2* und *LjBGD4*; 58,4%) am höchsten (Tabelle 28). Den Benzoxazinoid-Glucosid hydrolysierenden β -Glucosidasen aus *Z. mays*, *S. cereale* und *T. aestivum*, (*ZmGLU1*, *ScGLU* und *TaGLU1b*), sowie der Dhurrinase aus *S. bicolor* (*SbDHUR1*) gegenüber weist *CoGLU1* geringere Aminosäureidentitäten auf. *CoGLU2* zeigt ähnliche Verwandtschaftsbeziehungen auf (Tabelle 28).

Tabelle 28: AS-Identitäten und AS-Ähnlichkeiten von *CoGLU1* und *CoGLU2* zu funktionell charakterisierten GH1 β -Glucosidasen. *Os4bglu12*: Exoglucanase aus *O. sativa* (Q7XKV4), *LjBGD2*: Hydroxynitril-Glucoside β -Glucosidase aus *L. japonicus* (B2ZUU1), *LjBGD4*: Hydroxynitril-Glucoside β -Glucosidase aus *L. japonicus* (B2ZUU0), *SbDHR1*: Dhurrin β -Glucosidase aus *S. bicolor* (Q41290), *TaGLU1b*: Benzoxazinoid-Glucosid β -Glucosidase aus *T. aestivum* (Q1XH05) *ScGLU*: Benzoxazinoid-Glucosid β -Glucosidase aus *S. cereale* (Q9FYS3), *ZmGLU1*: Benzoxazinoid-Glucosid β -Glucosidase aus *Z. mays* (P49235). Die Berechnung erfolgte mit dem MetGAT-Matrix *Alignment Tool* und der BLOSUM50 *Scoring Matrix*. Für die Sequenzvergleiche wurden die prozessierten Aminosäuresequenzen herangezogen. Glc: Glucosid.

Enzym	Funktion	AS-Identität in [%]		AS-Ähnlichkeit in [%]	
		CoGLU1	CoGLU2	CoGLU1	CoGLU2
<i>Os4bglu12</i>	Exoglucanase	59,9	61,3	77,5	77,5
<i>LjBGD2</i>	Hydroxynitril-Glc β -Glucosidase	58,4	61,6	75,9	76,4
<i>LjBGD4</i>	Hydroxynitril-Glc β -Glucosidase	58,4	60,1	75,7	75,2
<i>TrBGLU</i>	Linamarase	48,3	49,9	61,5	62,8
<i>SbDHUR1</i>	Dhurrinase	45,1	42,8	64,8	62,3
<i>TaGLU1b</i>	Benzoxazinoid-Glc β -Glucosidase	43,2	43,1	62,5	61,5
<i>ScGLU</i>	Benzoxazinoid-Glc β -Glucosidase	43,1	43,5	62,7	61,8
<i>ZmGLU1</i>	Benzoxazinoid-Glc β -Glucosidase	42,5	45,1	62,1	61,3

Für *ZmGLU1*, *ScGLU*, *TaGLU1a* und *SbDHR1* sind die Aminosäurereste bekannt, die die Agluconbindetasche ausbilden und an der Substratbindung beteiligt sind (Czjzek *et al.*, 2000; Nikus *et al.*, 2003; Sue *et al.*, 2006; Verdoucq *et al.*, 2004). Die entsprechenden *CoGLU1* und *CoGLU2* Reste entsprechen weder den Resten, die die Benzoxazinoid-Bindetasche in *ZmGLU1*, *ScGLU* oder *TaGLU1a* ausbilden, noch den Resten, die die Dhurrinbindetasche in *SbDHR1* ausbilden (Abbildung 28, Anhang).

3.6.2 Genexpressionsanalyse von *CoGlu1*

Mit quantitativer RT-PCR wurde die Genexpression von *CoGlu1* in verschiedenen *C. orientalis* Pflanzenorganen bestimmt (Abbildung 22). Zur Normierung wurde parallel die Expression des *house-keeping* Gens GAPDH gemessen. *CoGlu1* ist am stärksten in der Blüte exprimiert. Dort ist *CoGlu1* in etwa so stark exprimiert wie GAPDH. Die Expression im Keimling ist ca. 0,5-fach reduziert, und in der Wurzel können nur sehr geringe *CoGlu1*-Transkriptmengen detektiert werden ($0,0058 \pm 0,0047$ pg/pg GAPDH).

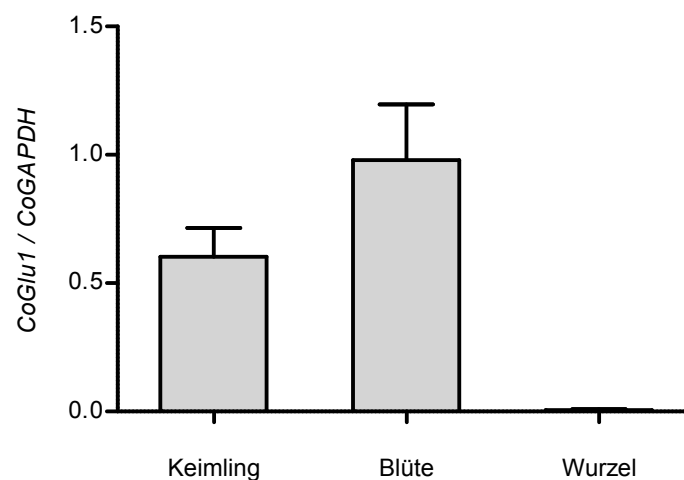


Abbildung 22: *CoGlu1* Genexpression in unterschiedlichen Pflanzenorganen. Die Messung der Transkriptkonzentration wurde in Duplikaten mit drei biologischen Replikaten durchgeführt.

3.6.3 Lokalisationsvorhersage für *CoGLU1*

Die *CoGLU1* Aminosäuresequenz wurde mit dem Programm TargetP 1.1 (Emanuelsson *et al.*, 2000; Nielsen *et al.*, 1997) analysiert, welches Signalpeptide und den Bestimmungsort von Proteinen vorhersagt. Demzufolge weist *CoGLU1* mit hoher Wahrscheinlichkeit ein 18 AS langes Signalpeptid auf, und wird über den sekretorischen Weg transportiert. Die Analyse mit Predotar v. 1.03 bestätigt den Transport über den sekretorischen Weg und sagt einen Transport in das Endoplasmatische Reticulum (ER) vorher (Small *et al.*, 2004). Umgekehrt

schließen die Chlorplast-Signalpeptid- und Mitochondrium-Signalpeptid-Vorhersageprogramme chlorop v1.1 (Emanuelsson *et al.*, 1999) und MitoProt II-v1.101 (Claros *et al.*, 1996) den Transport von CoGLU1 in den Chloroplasten oder das Mitochondrium aus. Das bekannteste Aminosäuremotiv (Austin *et al.*, 2007), das die Retention von Proteinen im ER vermittelt und am C-Terminus der Proteine zu finden ist, KDEL, ist in der CoGLU1 Sequenz nicht vorzufinden. Jedoch existieren Variationen dieses Motivs, und in selteneren Fällen wird die Retention im ER auch durch andere Motive vermittelt. Der Zielort der CoGLU1 ausgehend vom ER kann mit aktuellen Vorhersageprogramm nicht vorhergesagt werden und muss, z.B. durch eine immunocytochemische Analyse, experimentell bestimmt werden. Für die Abwehrsysteme cyanogene Glycoside und Glucosinolate wurde eine unterschiedliche Lokalisation der bioaktivierenden β -Glucosidase von monokotylen und dikotylen Pflanzen beschrieben. Die Lokalisation der Benzoxazinoid-Glucosid β -Glucosidase *ZmGLU1* im Chloroplasten wurde experimentell gezeigt (Esen und Stetler, 1993; Nikus *et al.*, 2001) und die Lokalisationsvorhersage für CoGLU1 gibt einen Transport über den sekretorischen Weg an. Dieses Muster trifft daher mit hoher Wahrscheinlichkeit auch für das Abwehrsystem der Benzoxazinoid-Glucoside zu.

4 Diskussion

Phytoantizipine sind eine wichtige Komponente der chemischen Grundabwehr der Pflanze. Da diese intrazellulär gebildeten Verbindungen cytotoxisch sind, werden sie in der Regel als weniger reaktive Glycoside in der Vakuole gespeichert. Wird die Zellintegrität zerstört, werden Phytoantizipine durch β -Glucosidasen bioaktiviert. β -Glucosidasen und Phytoantizipinglycoside werden in verschiedenen zellulären Kompartimenten gelagert. Dies erlaubt der Pflanzenzelle ein Toxin als Schutzmechanismus zu benutzen, ohne selbst davon beeinträchtigt zu werden. Das Paar UGT und β -Glucosidase ist daher essentiell mit der Biosynthese von Phytoantizipinen in der Grundabwehr verbunden.

Würden für dasselbe Phytoantizipin in verschiedenen Taxa unterschiedliche Enzyme für die Detoxifizierung und Bioaktivierung gefunden werden, dann wäre dies ein Hinweis auf einen polyphyletischen Ursprung der Detoxifizierungs- und Bioaktivierungsenzyme und möglicherweise des gesamten Biosynthesewegs.

Im Folgenden soll anhand eines Vergleichs der Detoxifizierungs- und Bioaktivierungsenzyme der Benzoxazinoidbiosynthese in monokotylen und dikotylen Pflanzen diese Fragestellung diskutiert werden. Im Benzoxazinoid-Abwehrsystem entgiftet eine spezifische UGT Benzoxazinoide in der Biosynthese und eine β -Glucosidase aktiviert die Glucoside durch deren Hydrolyse. In dieser Arbeit wurde die Benzoxazinoid Glucosyltransferase aus *C. orientalis* CoBX8 isoliert. Damit sind Benzoxazinoid Glucosyltransferasen aus dikotylen (CoBX8; diese Arbeit) und monokotylen (*ZmBX8* und *ZmBX9*; von Rad *et al.*, 2001) Pflanzen beschrieben. Mit CoGLU1 konnte des Weiteren eine Benzoxazinoid-Glucosid β -Glucosidase aus *C. orientalis* isoliert werden. Diese erweitert den bekannten Datensatz an Benzoxazinoid-Glucosid β -Glucosidasen der monokotylen Pflanzen *Z. mays*, *S. cereale* und *T. aestivum* um die entsprechende β -Glucosidase einer dikotylen Pflanze. Mit diesem Enzymset (UGT; β -Glucosidase) aus *C. orientalis* sind UGTs und β -Glucosidasen für ein spezifisches Phytoantizipin-Substratset (DIBOA und GDIBOA/GDIMBOA) aus monokotylen und dikotylen Pflanzen bekannt.

4.1 UDPG: Benzoxazinoid Glucosyltransferasen von monokotylen und dikotylen Pflanzen

4.1.1 Substratspezifität gegenüber Benzoxazinoiden und Funktion

ZmBX8, *ZmBX9* und *CoBX8* akzeptieren nur Benzoxazinoide als Substrate. DIBOA ist das erste toxische Produkt des Benzoxazinoid-Biosynthesewegs. In Pflanzen, die GDIBOA bilden, wie z.B. *C. orientalis*; *H. lechleri*, wird DIBOA durch Glucosylierung detoxifiziert. Auch in *Z. mays*, welches GDIMBOA synthetisiert, wurde DIBOA, das erste toxische Intermediat der Biosynthese, als Substrat für die Glucosyltransferase identifiziert (Abbildung 4; Jonczyk *et al.*, 2008). Es kann angenommen werden, dass auch in der GDIMBOA-Biosynthese in *T. aestivum* DIBOA glucosyliert wird.

Weder für Benzoxazinoid UGTs aus den monokotylen Spezies *Z. mays* (*ZmBX8* und *ZmBX9*), *T. aestivum* und *H. lechleri* (von Rad *et al.*, 2001; Leighton *et al.*, 1994), noch aus dikotylen Spezies (diese Arbeit) wurde eine strikte Substratspezifität für DIBOA gezeigt. Die Glucosyltransferase-Aktivitäten der DIMBOA synthetisierenden Spezies *Z. mays* und *T. aestivum* katalysieren sowohl die Glucosylierung von DIBOA als auch von DIMBOA (von Rad *et al.*, 2001; Leighton *et al.*, 1994). *ZmBX8* hat ähnliche katalytische Effizienzen k_{cat}/K_m für DIBOA und DIMBOA und *ZmBX9* hat eine höhere katalytische Effizienz für DIMBOA. Die gereinigte Glucosyltransferase-Aktivität von *T. aestivum* weist DIMBOA gegenüber eine höhere Affinität auf, als gegenüber DIBOA (Leighton *et al.*, 1994). Es wird angenommen, dass die Glucosyltransferasen, zusätzlich zu der Funktion in der Biosynthese, eine Funktion in der Entgiftung von Benzoxazinoiden als Allelochemikalien einnehmen. Die Akzeptanz des Substrats DIMBOA in *Z. mays* und *T. aestivum* ist wahrscheinlich durch die Notwendigkeit der Entgiftung von endogenem und exogen exsudiertem DIMBOA entstanden. Benzoxazinoide werden aktiv über die Wurzel in die Rhizosphäre abgegeben oder gelangen über abgefallene Pflanzenteile in den Boden. Dort können sie die Keimung umliegender Samen hemmen und das Wachstum von Keimlingen inhibieren (Sicker *et al.*, 2000). Die Exsudation von Benzoxazinoiden wurde für die Gräser *Z. mays*, *T. aestivum* und *S. cereale* (Pérez und Ormenoññez, 1991; Wu *et al.*, 2000, 2001; Park *et al.*, 2004) gezeigt. Das allelopathische Potential von Benzoxazinoiden und ihrer Abbauprodukte zwischen Individuen verschiedener Pflanzenspezies oder derselben Pflanzenspezies ist besonders gut für *S. cereale* untersucht (Barnes und Putnam, 1987). Hier konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass die getesteten Dikotyledoneae 30% sensitiver gegenüber DIBOA sind, als die getesteten monokotylen Pflanzenspezies. Durch die Glucosylierung der exsudierten Benzoxazinoide und ihrer Abbauprodukte können sich Pflanzen vor den allelopathischen

Effekten schützen. Das Potential von *ZmBX8* und *ZmBX9* exogene Benzoxazinoide zu entgiften, wurde durch die transgene Expression in *A. thaliana* gezeigt (von Rad *et al.*, 2001).

Die Analyse von Mutanten kann Aufschluss über die Funktion der Benzoxazinoid UGTs *ZmBX8* und *ZmBX9* *in planta* geben. Das Vorhandensein von zwei Benzoxazinoid Glucosyltransferasen mit unterschiedlicher Substratspezifität und Genexpression, legt die Vermutung nahe, dass die UGTs *in planta* unterschiedliche Funktionen ausüben. *ZmBX9* zeigt, im Gegensatz zu *ZmBX8*, DIMBOA gegenüber eine wesentlich höhere katalytische Effizienz auf als gegenüber DIBOA (Tabelle 21). *ZmBX9* könnte daher eine Neo-Funktionalisierung durchlaufen haben und zusätzlich zu der Funktion in der Biosynthese (der Entgiftung von endogen synthetisiertem DIBOA), eine wesentliche Rolle in der Entgiftung von exsudiertem DIMBOA in der Rhizosphäre haben. Mittlerweile liegt für *ZmBX8* eine Transposon-Insertionsmutante (*loss-of-function*) vor (B. Meeley, Pioneer Hi-Bred). Für *ZmBX9* wurden in dieser Arbeit amiRNA (*artificial micro-RNA*) *knockdown*-Mutanten generiert. Erste Untersuchungen zeigen für zwei unabhängige T1-Linien eine ca. 10-fache Reduktion der *ZmBx9*-Genexpression bei unveränderter *ZmBx8*-Genexpression (Daten nicht gezeigt). Die Analyse des Phänotyps der *ZmBx8*- und *ZmBx9*-Mutanten wird Aufschluss über die eventuell unterschiedlichen Funktionen der *Z. mays* Benzoxazinoid Glucosyltransferasen *in planta* geben.

H. lechleri synthetisiert ausschließlich DIBOA. Die partiell gereinigte Benzoxazinoid Glucosyltransferase-Aktivität aus *H. lechleri* akzeptiert sowohl DIBOA als auch das Methoxyderivat DIMBOA als Substrat. Für DIMBOA (87 µM) wird sogar eine ca. 3-fach höhere Affinität bestimmt als für das endogene Substrat DIBOA (264 µM; Leighton *et al.*, 1994). Die Benzoxazinoid UGTs von *Z. mays* und *T. aestivum* weisen einen gemeinsamen Vorläufer auf. Man kann deshalb auch einen gemeinsamen Vorläufer der UGTs von *Z. mays*, *T. aestivum* und *H. lechleri* postulieren. Für die beiden Enzyme, die in *Z. mays* zur Biosynthese von GDIMBOA eingesetzt werden, die 2-Oxoglutarat abhängige Dioxygenase *ZmBX6* und die O-Methyltransferase *ZmBX7* finden sich in den Datenbanken der Triticeae zurzeit keine homologen Proteine. Es kann daher spekuliert werden, dass dieser Teil der Biosynthese, im Gegensatz zur *Core*-Biosynthese von GDIBOA, unabhängig in den Gräsern entstanden ist. Die Funktion des Benzoxazinoid UGT-Vorläufers der Gräser wäre dann zunächst die Detoxifizierung von DIBOA gewesen. Mit einer geringeren Aktivität hätte die Vorläufer-UGT wahrscheinlich auch das Methoxyderivat DIMBOA glucosyliert, was zu diesem Zeitpunkt aber noch keine biologische Funktion gehabt hätte. Mit der Ausbildung der DIMBOA-Biosynthese in *Z. mays* und *T. aestivum* hätte sich die Notwendigkeit der Detoxifizierung des Endprodukts ergeben, so dass die UGTs aus *Z. mays* und *T. aestivum* zunehmend auch DIMBOA mit hohen Effizienzen glucosylierten. Da in *H. lechleri* keine DIMBOA-Biosynthese evolviert hat, könnte die DIMBOA-Glucosylierungsaktivität auf die

Enzymeigenschaften der Vorläufer-UGT der Gräser zurückgeführt werden. Da *H. lechleri* zur Gräserkommunität gehört und vergesellschaftet mit anderen GDIMBOA synthetisieren Spezies, wie z.B. der Quecke (*Agropyron repens*) wächst, ergibt sich eine andere Erklärungsmöglichkeit für die starke DIMBOA Glucosylierungsaktivität. Der Selektionsvorteil, deren exsudierte Benzoxazinoide zu entgiften, kann zu der Ausprägung der DIMBOA Glucosylierungsaktivität geführt haben.

Auch *C. orientalis* synthetisiert nur GDIBOA. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass CoBX8 das endogene Substrat DIBOA mit einer höheren Effizienz glucosyliert als dessen Derivat DIMBOA. Sowohl die Affinität als auch die katalytische Effizienz k_{cat}/K_m von CoBX8 ist für DIBOA höher als für DIMBOA (ca. 7-fach bzw. ca. 4-fach). Die Enzymspezifität von CoBX8 ist, anders als die Benzoxazinoid Glucosyltransferase-Aktivität aus *H. lechleri*, auf das endogene Biosyntheseprodukt ausgerichtet. Dieser Unterschied könnte auf eine unabhängige Evolution der UGTs aus monokotylen und dikotylen Pflanzen zurückzuführen sein.

Durch die transgene Expression von CoBX8 in *A. thaliana* konnte gezeigt werden, dass CoBX8 exogenes DIBOA und DIMBOA durch Glucosylierung entgiften kann. Allerdings ist die Fähigkeit der Keimlinge DIMBOA zu detoxifizieren weniger stark ausgeprägt als die Fähigkeit DIBOA zu detoxifizieren (Abbildung 17). Diese Beobachtung stimmt mit der niedrigeren katalytischen Effizienz, mit der CoBX8 DIMBOA *in vitro* glucosyliert, überein.

Die Genexpression von *CoBx8* deutet auf eine Funktion von CoBX8 in der Biosynthese und in der Entgiftung von Benzoxazinoiden hin. Weder das Expressionsmuster von CoBX8 noch von *ZmBx8/Bx9* stimmen mit der Expression der jeweiligen Biosynthesegene überein. *CoBx8* ist am stärksten im Keimling exprimiert und nimmt von der Blüte zur Wurzel weiter ab (Abbildung 23). Das Verhältnis der *CoBx8* Genexpression im Keimling und der Blüte entspricht dem Verhältnis der DIBOA-Neusyntheserate von Keimling (ca. 1,4 µg/g FG) und Blüte (ca. 0,5 µg/g FG; Schullehner *et al.*, 2008). Die Neusyntheserate in der Wurzel wurde nicht untersucht, jedoch konnte aus der Wurzel kein DIBOA isoliert werden. Auch *CoBx1*, das *Branchpoint*-Enzym des DIBOA-Biosynthesewegs, ist in diesem Gewebe nur schwach exprimiert (Schullehner *et al.*, 2008). Es kann daher davon ausgegangen werden, dass in der Wurzel keine GDIBOA-Biosynthese stattfindet. Die Rolle von CoBX8 in der Wurzel liegt daher wahrscheinlich nicht in der Biosynthese, sondern vor allem in der Entgiftung von Benzoxazinoiden in der Rhizosphäre.

Die Expressionsstärke von *CoBx8* liegt in derselben Größenordnung wie diejenige von *ZmBx8* und *ZmBx9* aus *Z. mays*. Auch in *Z. mays* findet man eine ausgeprägte Glucosyltransferase-Aktivität in der Wurzel. *ZmBx8* und *ZmBx9* sind im Keimling im Spross und in der Wurzel exprimiert, während die Expression der *Bx*-Gene *ZmBx1-Bx5* dagegen bevorzugt im

Spross nachweisbar ist (Frey *et al.*, 1995; von Rad *et al.*, 2001). Auch für die zusätzlich Glucosyltransferase-Aktivität von *ZmBX8* und *ZmBX9* in der Wurzel wurde eine Funktion in der Entgiftung angenommen (von Rad *et al.*, 2001)

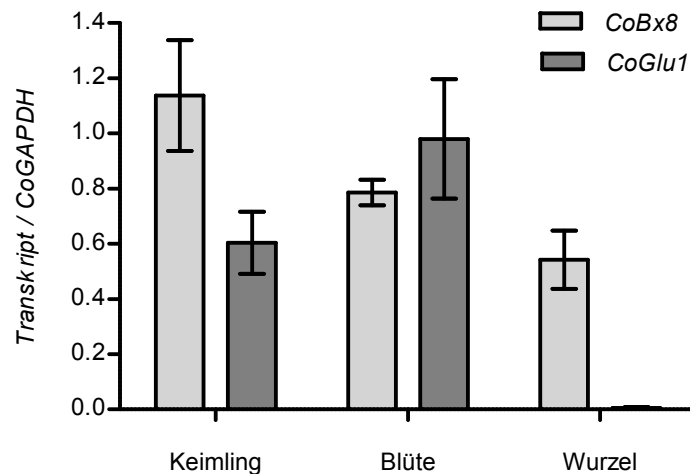


Abbildung 23: *CoGlu1* und *CoBx8* Genexpression in unterschiedlichen Pflanzenorganen von *C. orientalis*. Die Messung der Transkriptkonzentration wurde in Duplikaten mit drei biologischen Replikaten durchgeführt.

Die UDPG:Benzoazinoid Glucosyltransferasen aus monokotylen und dikotylen Pflanzen unterscheiden sich also in ihrer Substratspezifität, haben aber eine duale Funktion gemeinsam: Sie katalysieren einen essentieller Biosyntheseschritt in der Benzoazinoid-Biosynthese und detoxifizieren exogene Benzoazinoide, mit denen sie als Allelochemikalien in Berührung kommen.

4.1.2 Evolution von UDPG:Benzoazinoid Glucosyltransferasen

UGTs stellen Genfamilien mit mehr als 100 Mitgliedern in *A. thaliana*, *M. truncatula* und *O. sativa* dar. Zur Analyse der phylogenetischen Stellung von *ZmBX8*, *ZmBX9*, *TaBX8*, *CoBX8* und *pLgBX8* wurden pflanzliche UGTs mit experimentell nachgewiesener Funktion und ihnen nah verwandte Enzyme aus anderen Spezies herangezogen. Weiterhin wurden UGTs aus dem Primärstoffwechsel als *outgroup* miteinbezogen. Die Analyse ergibt 4 große Hauptäste (Abbildung 24). Drei der Hauptäste enthalten ausschließlich UGTs des Primärstoffwechsels, nämlich die Sucrosephosphat Synthasen (Hauptast 1), die Sucrose Synthasen (Hauptast 2) und die UDPG:Protein-Transglucosylasen (Hauptast 3). Der vierte Hauptast enthält UGT-Sequenzen verschiedener Funktionen des Primär- und Sekundärstoffwechsels. Die UGTs verzweigen sich zunächst in die Hauptäste 1 und 2, die

Transglucosidasen (Zucker-Zucker-Glycosylierung) sowie in die Hauptäste 3 und 4, die Transferasen (Zucker-Protein, oder Zucker-Aglucon-Glycosylierung).

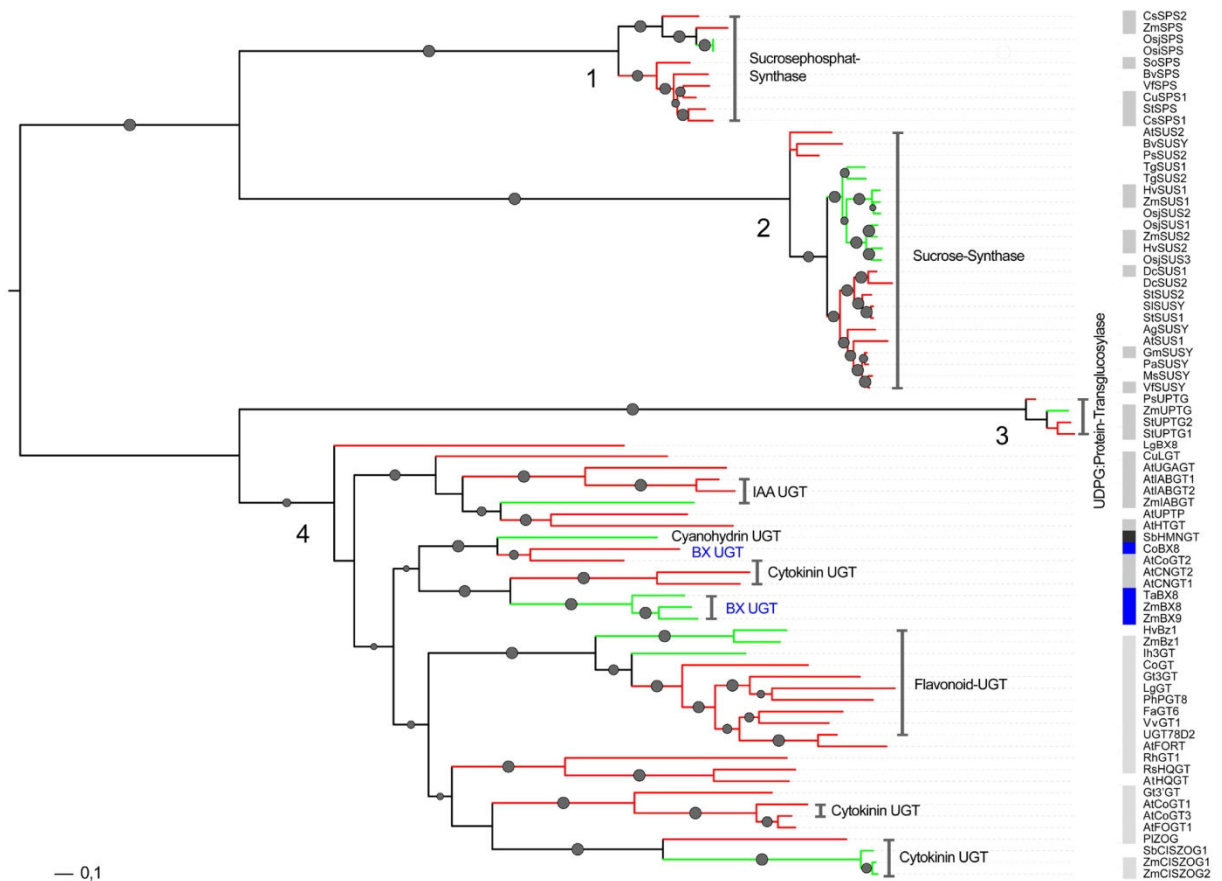


Abbildung 24: Phylogenetischer Stammbaum von UGTs. Die *Maximum-Likelihood* Bäume wurden nach dem Alignment der Aminosäuresequenzen mit MUSCLE (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15034147>) mit dem Programm RAXML (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16928733>) erstellt. Die gefüllten Kreise an den Verzweigungspunkten geben an, bei wie viel Prozent der durchgeführten 1000 Replikate eine Verzweigung existiert (*bootstrap*-Wert). Werte unter 50% sind nicht gezeigt. Der Abstandsbalken unter dem Baum gibt die Anzahl der Aminosäuresubstitutionen pro Position an. Monokotyle Sequenzen sind durch grüne Äste gekennzeichnet, dikotyle Sequenzen durch rote Äste und Sequenzen aus Gymnospermen durch graue Äste. Die Zuordnung mutmaßlicher Funktionen zu einzelnen Ästen erfolgt basierend auf der experimentell gezeigten Funktion von Ast-Mitgliedern. Quadrate bei den Enzymnamen kennzeichnen biochemisch charakterisierte Enzyme. UGTs, die an der Biosynthese von cyanogenen Glycosiden (CG) beteiligt sind, sind schwarz markiert, UGTs, die Benzoxazinoide (BX) glucosylieren, sind in blauer Farbe dargestellt. Für die phylogenetische Analyse der UGTs wurden vor allem UGTs der Familie 1 mit definierter biochemischer Funktion und nahe Verwandte aus anderen Spezies verwendet. Zusätzlich wurden Mitglieder der UGT-Familie 4 mit einbezogen, die dem Primärstoffwechsel zuzuordnen sind (Sucrosephosphat Synthase, Sucrose Synthase und UDPG-Protein Transglucosylase). Die Sequenzen sind mit den empfohlenen Abkürzungen bezeichnet (Abbildung 29; Anhang).

In allen Hauptästen sind Sequenzen von monokotylen und dikotylen Pflanzen enthalten, was bedeutet, dass die Trennung der UGTs in die 4 Hauptäste vor der Trennung der Angiospermen in monokotyle und dikotyle Pflanzen stattgefunden hat. Für die Hauptäste ist jeweils ein gemeinsamer Vorläufer zu postulieren. Die Vorläufer der Hauptäste 1-3 durchliefen eine lange Spezialisierung, an die sich nur noch wenige speziesspezifische Modifikationen angeschlossen haben (kurze Astlängen). Die UGTs dieser Familien sind daher stark konserviert.

Der Hauptast 4 enthält viele UGTs, die in der Homöostase der Hormonklassen Auxine und Cytokinine involviert sind. Diese finden sich eingestreut in Äste mit UGTs, die Flavonoide, Hydrochinone, Terpene, cyanogene Glycoside und Benzoxazinoide glycosylieren. Der UGT-Vorläufer dieses Asts muss ursprünglich ein breites Substrat-Spektrum aufgewiesen haben. Duplikationen und anschließende Spezialisierung resultieren in der großen UGT-Genfamilie. Die ursprüngliche Flexibilität der UGTs wird z.B. dadurch deutlich, dass für die Cytokinin Glucosylierung in verschiedenen Spezies, und für unterschiedliche Regiospezifitäten (O- bzw. N-Glucosylierung) jeweils unterschiedliche UGT-Vorläufer rekrutiert wurden. Ein anderes Beispiel für die Flexibilität der UGTs ist die Spezialisierung der *A. thaliana* Flavonol-3-O-Glucosid L-Rhamnosyltransferase (*AtFORT*) aus der *A. thaliana* Flavonoid-3-O-Glucosyltransferase nach der Duplikation des UGT-Vorläufers. Der Datensatz von Flavonoid-3-O-Glucosyltransferasen wurde durch die Flavonoid Glucosyltransferasen *CoGT* und *LgGT* aus *C. orientalis* und *L. galeobdolon* erweitert. *CoGT* und *LgGT* finden sich zusammen mit Flavonoid-3-O-Glucosyltransferasen und der Flavonol-Glucosid-Rhamnosyltransferase aus *A. thaliana* in einem getrennten Ast wieder. Die Regiospezifität von *CoGT* und *LgGT* für die Flavonoid Glucosylierung wurde nicht untersucht, jedoch kann aufgrund der Gruppierung mit Flavonoid-3-O-Glucosyltransferasen eine Spezifität für die 3-OH-Gruppe angenommen werden. Die Anordnung der Flavonoid Glucosyltransferase-Äste der verschiedenen Spezies folgt der Phylogenie der Angiospermen. Der Ast unterteilt sich zunächst – analog zu der Trennung monokotyler und dikotyler Pflanzen – in UGTs dikotyler und monokotyler Pflanzen. Bei den dikotylen UGTs clustern z.B. die UGTs von *L. galeobdolon*, *P. hybrida* und *G. triflora* miteinander. Diese Spezies sind in der Phylogenie der Angiospermen den Ordnungen Lamiales, Solanales und Gentianales zugeordnet, die die Gruppe der Euasteriden I innerhalb den Asteriden bilden (Abbildung 3). Die Flavonoid Glucosyltransferasen weisen daher eine monophyletische Evolution mit einem gemeinsamen UGT-Vorläufer von monokotylen und dikotylen Pflanzen auf. Im Vergleich zu den UGTs des Primärstoffwechsels in den Hauptästen 1-3 sind die Flavonoid Glucosyltransferasen weniger stark konserviert.

Im Gegensatz dazu finden sich *CoBX8*, sowie *ZmBX8* und *ZmBX9*, je in Ästen mit UGTs von monokotylen und dikotylen Pflanzen. Die beiden jeweiligen Vorläufer UGTs müssen also vor

der Aufspaltung von dikotylen und monokotylen Pflanzen existiert haben. In den Gräsern und in *C. orientalis* wurde auf distinkte Vorläufer UGTs zurückgegriffen. Die Position von *TaBX8* zeigt dagegen, dass die Benzoxazinoid-UGT der Gräser einen monophyletischen Ursprung aufweist.

In beiden BX8-Ästen befinden sich Cytokinin UGTs von *A. thaliana*. Im *CoBX8*-Ast ist zusätzlich zur Cytokinin UGT *AtCOGT2* aus *A. thaliana* die Cyanohydrin UGT *SbHMNGT* aus *S. bicolor* lokalisiert. Auch für die Vorläufer der Benzoxazinoid UGTs aus *C. orientalis* *CoBX8* und der Benzoxazinoid UGTs aus den Gräsern *ZmBX8*, *ZmBX9* und *TaBX8* muss eine große Flexibilität bezüglich des Substratspektrums angenommen werden. Der UGT-Vorläufer von *CoBX8* wurde für die Glucosylierung von Benzoxazinoiden (*CoBX8*), die O-Glucosylierung von Cytokinin (*AtCOGT2*), und für die Glucosylierung von Cyanohydrin in der Dhurrin-Biosynthese (*SbHMNGT*) rekrutiert. Der Vorläufer von *ZmBX8*, *ZmBX9* und *TaBX8* evolvierte in die Glucosylierungsfunktion von Benzoxazinoiden (*ZmBX8*, *ZmBX9* und *TaBX8*) und die N-Glucosylierungsfunktion von Cytokinin (*AtCNGT2* und *AtCNGT2*). Die Benzoxazinoid UGTs haben jedoch keine Enzymaktivität für das Cytokinin Zeatin (diese Arbeit). Aufgrund der Verbindung der Benzoxazinoid-Biosynthese und der Tryptophan/Auxinbiosynthese kann spekuliert werden, dass die Benzoxazinoid UGTs in die Auxinhomeostase involviert sind. Indol-3-Essigsäure wird jedoch nicht von den Glucosyltransferasen umgesetzt (*CoBX8*: diese Arbeit; *ZmBX8* und *ZmBX9*: von Rad *et al.*, 2001). Auch Flavonoide, als weit verbreitete Substrate von UGTs, werden von *CoBX8*, *ZmBX8* und *ZmBX9* nicht glucosyliert (diese Arbeit; von Rad *et al.*, 2001). Die Benzoxazinoid UGTs weisen nach bisherigen Untersuchungen eine strikte Substratspezifität für Benzoxazinoide auf. Sie haben wahrscheinlich im Laufe der Spezialisierung die breitere Substratspezifität des Vorläufers verloren. Die Unterschiede von *CoBX8*, *ZmBX8* und *ZmBX9* bezüglich der Substratspezifität gegenüber Benzoxazinoiden können Unterschiede der Ausgangssequenz widerspiegeln.

Über die ursprüngliche Hauptfunktion des UGT-Vorläufers kann nur gemutmaßt werden. Da sich Benzoxazinoid UGTs aus *C. orientalis* und den Gräsern jeweils in einem Ast mit Cytokinin UGTs befinden, kann eine der Funktionen der Vorläufer-UGT die Glycosylierung von Phytohormonen gewesen sein. Weitere Phytohormon UGTs finden sich verstreut in verschiedenen Ästen des Stammbaums wieder. Möglicherweise war auch der weiter zurückliegende UGT-Vorläufer in die Phytohormon-Homöostase involviert.

Die putative Benzoxazinoid UGT aus *L. galeobdolon* *pLgBX8* befindet sich ebenfalls in dem Hauptast 4, doch ist *pLgBX8* auf einen anderen UGT-Vorläufer zurückzuführen als die Benzoxazinoid UGTs *CoBX8*, *ZmBX8*, *ZmBX9* und *TaBX8*. Der *pLgBX8*-Vorläufer hat sich sehr früh von den anderen UGTs des Hauptasts 4 getrennt. Die Bestätigung der Funktion

von pLgBX8 in der Benzoxazinoid-Biosynthese kann die unabhängige Evolution der Detoxifizierungsfunktion in monokotylen und dikotylen Pflanzen weiter belegen.

4.2 Benzoxazinoid-Glucosid β -Glucosidasen von monokotylen und dikotylen Pflanzen

4.2.1 Substratspezifität gegenüber Benzoxazinoid-Glucosiden

In *C. orientalis* und *S. cereale* bildet GDIBOA das Hauptbenzoxazinoid-Substrat der β -Glucosidasen CoGLU1 und ScGLU. Beide Enzyme haben hohe K_m -Werte (4,6 mM bzw. 0,8 – 2,8 mM; Nikus *et al.*, 2003). In Anbetracht der hohen GDIBOA-Konzentrationen in *C. orientalis* (z.B. 24 mmol/kg FG in jungen Blättern und 36 mmol/kg FG in der Blüte; Schullehner *et al.*, 2008) und *S. cereale* (0,5 bis 6 mmol/kg FG im Keimling und in der Wurzel; Zúñiga *et al.*, 1983; Pérez und Ormenoñuñez, 1991; Leighton *et al.*, 1994; Sue *et al.*, 2000) stehen die relativ hohen K_m -Werte jedoch nicht mit der Funktion der Enzyme in der Bioaktivierung der Benzoxazinoid-Glucoside in Widerspruch.

Von allen Pflanzen, für die Benzoxazinoid-Glucosid β -Glucosidasen charakterisiert wurden, ist *C. orientalis* die einzige, die ausschließlich GDIBOA bildet. Der Affinität von CoGLU1 ist gegenüber GDIBOA ca. 10-fach höher als für GDIMBOA. GDIBOA ist also das von CoGLU1 am effektivsten umgesetzte Substrat. Der k_{cat} -Wert für GDIBOA liegt im Bereich von ZmGLU1, die hohen Werte von TaGLU1a-c werden nicht erreicht. Die effizientere Umsetzung des hauptsächlich vorkommenden Benzoxazinoid-Glucosids wurde auch für die β -Glucosidasen aus *T. aestivum* TaGLU1a-c gezeigt (Sue *et al.*, 2006). Die gereinigte β -Glucosidase ZmGLU1 aus *Z. mays* weist GDIMBOA gegenüber eine höhere Affinität auf als GDIBOA gegenüber (Oikawa *et al.*, 1999). Im Gegensatz dazu wurden für ScGLU etwa gleich hohe Affinitäten für die Substrate GDIBOA und GDIMBOA beschrieben (Nikus *et al.*, 2003; Sue *et al.*, 2006). Damit in Einklang werden aus *S. cereale* beide Benzoxazinoid-Glucoside isoliert. Während in den Blättern ausschließlich GDIBOA vorkommt, werden in der Wurzel beide Benzoxazinoid-Glucoside gefunden (Copaja *et al.*, 2006). Die katalytischen Parameter der β -Glucosidasen aus *C. orientalis*, *Z. mays*, *T. aestivum* und *S. cereale* spiegeln damit das jeweilige Benzoxazinoid-Muster wieder.

4.2.2 Substratspezifität außerhalb der Benzoxazinoid-Glucoside

In Bezug auf Substrate außerhalb der Benzoxazinoid-Biosynthese ist ZmGLU1 am besten untersucht. ZmGLU1 wurde zeitgleich als Zm-p60.1 (Campos *et al.*, 1992; Brzobohatý *et al.*,

1993) isoliert. *Zm-p60.1* hydrolysiert Hormon-Glycoside und spielt damit auch eine Rolle in der Pflanzenhormon-Homöostase (Brzobohatý *et al.*, 1993).

ZmGLU1 und *CoGLU1* hydrolysieren weitere Substrate, unterschieden sich aber in der Substratspezifität und den kinetischen Parametern (Tabelle 29). *ZmGLU1* hydrolysiert, zusätzlich zu Benzoxazinoid-Glucosiden, die Cytokinin-Glycoside *trans*-Zeatin-O-Glucosid (tZOG), Zeatin-O- β -Glucosid-Ribosid (ZOGR) und Kinetin-3- β -Glucosid (K3G; Brzobohatý *et al.*, 1993). Die K_m -Werte von *ZmGLU1* für tZOG (Kiran *et al.*, 2006; Mazura *et al.*, 2006) liegen in derselben Größenordnung wie der K_m -Wert für GDIMBOA ($0,098 \pm 0,01$ mM; Cicek *et al.*, 2000). Auch *CoGLU1* hydrolysiert das Phytohormon-Glucosid tZOG. Dieses wird jedoch mit einer ca. 100-fach geringeren Umsatzgeschwindigkeit hydrolysiert als GDIBOA.

Tabelle 29: Zusammenfassung der veröffentlichten und in dieser Arbeit gemessenen kinetischen Daten und Umsatzgeschwindigkeiten von *ZmGLU1* und *CoGLU1* für verschiedene Substrate. Für die Bestimmung der Umsatzgeschwindigkeit von GDIBOA, Dhurrin und *trans*-Zeatin-O-Glucosid wurden die Substrate in einer Konzentration von 500 μ M eingesetzt.

Substratklasse / Enzym	<i>ZmGLU1</i>	<i>CoGLU1</i>
Benzoxazinoide	GDIMBOA: $K_m = 0,098 \pm 0,01$ mM (Cicek <i>et al.</i> , 2000)	GDIBOA: $K_m = 4,6 \pm 0,4$ mM $v = 6030 \pm 359$ nmol min ⁻¹ mg ⁻¹ (diese Arbeit)
Cytokinin-Glycoside	<i>trans</i> -Zeatin-O-Glucosid: $K_m = 0,063$ mM (Kiran <i>et al.</i> , 2006) $K_m = 0,697 \pm 0,0413$ mM (Mazura <i>et al.</i> , 2006)	<i>trans</i> -Zeatin-O-Glucosid: $v = 60,8 \pm 1,8$ nmol min ⁻¹ mg ⁻¹ (diese Arbeit)
Cyanogene Glycoside	Dhurrin: kein Umsatz kompetitive Hemmung (Babcock und Esen, 1994)	Dhurrin: $v = 5684 \pm 116$ nmol min ⁻¹ mg ⁻¹ gemischte Hemmung (diese Arbeit)

ZmGLU1 ist nahe verwandt zu der *S. bicolor* Glucosidase *SbGLU1*, die das cyanogene Glycosid Dhurrin hydrolysiert. *ZmGLU1* weist gegenüber dem cyanogenen Glycosid Dhurrin von *S. bicolor* und den cyanogenen Glycosiden Linamarin und Prunasin keine Hydrolyseaktivität auf (Babcock und Esen, 1994). Im Gegensatz dazu wurde für *CoGLU1* zusätzlich zu der GDIBOA-Umsetzung die Hydrolyse von Dhurrin gemessen. Dieses wird mit einer ähnlichen Umsatzgeschwindigkeit hydrolysiert wie GDIBOA. Auch *CoGLU2* hydrolysiert

Dhurrin. Die Umsatzgeschwindigkeit ist ca. 6-fach geringer als für CoGLU1. Möglicherweise wird Dhurrin häufig von β -Glucosidasen als Nebenreaktion hydrolysiert.

Obwohl *ZmGLU1* Dhurrin nicht umsetzt, wird die GDIMBOA-Hydrolyse durch Dhurrin kompetitiv gehemmt ($0,054 \pm 0,005$ mM; Babcock und Esen, 1994). Von CoGLU1 wird Dhurrin umgesetzt; dieses wirkt zusätzlich als Hemmstoff für die GDIBOA-Hydrolyse. Für die Hemmung der CoGLU1 wird im Unterschied zu *ZmGLU1* eine gemischte Hemmung gezeigt ($0,213$ mM (K_{i1} ; kompetitiv) und $0,278$ mM (K_{i2} ; unkompetitiv). Die Hemmung der Benzoxazinoid-Hydrolyse von CoGLU1 durch Dhurrin ist damit ca. 5-fach geringer ausgeprägt als bei *ZmGLU1* und weist einen unterschiedlichen Hemmtypus auf. Die unkompetitive Komponente der gemischten Hemmung der CoGLU1 kann durch den Reaktionsmechanismus von GH1 β -Glucosidasen erklärt werden (McCartera und Withersa, 1994; Sinnott, 1990). Der Mechanismus ist durch zwei verschiedene Enzym-Substrat-Komplexe gekennzeichnet: Zunächst bildet sich ein Enzym-Glucosid-Enzymkomplex aus, in dem Enzym und Glucosid nicht-kovalent aneinander gebunden vorliegen. Nach der Katalyse und der Freisetzung des Aglucons (Glucosylierung) bleibt zunächst ein kovalenter Enzym-Glucosyl-Komplex, in dem die Bindestelle des Aglucons nun frei für die Bindung eines Hemmstoffes ist. Dieser Komplex wird anschließend in einem zweiten Schritt durch den Angriff eines Wasser-Moleküls hydrolysiert (Deglucosylierung).

4.2.3 Funktion von Benzoxazinoid-Glucosid β -Glucosidasen

ZmGLU1 katalysiert *in vitro* die Hydrolyse von Benzoxazinoid-Glucosiden und Cytokinin-Glycosiden. Die Isolation als Benzoxazinoid-Glucosid β -Glucosidase erfolgte durch die Reinigung des Enzyms aus Blättern (Cuevas *et al.*, 1992) und die Isolation als Cytokinin-Glycosid-Hydrolase erfolgte durch Photoaffinitätsmarkierung mit einem lichtaktivierbaren IAA-Analog (Campos *et al.*, 1992). *ZmGLU1* weist eine starke Homologie zu *TaGLU1a-c* und *ScGLU* auf, die über ihre Funktion, Benzoxazinoid-Glucoside *in vitro* mit hohen Effizienzen zu hydrolysieren, isoliert wurden (Nikus *et al.*, 2003; Sue *et al.*, 2006). *ZmGLU1* stellt daher wahrscheinlich eine β -Glucosidase mit dualer Funktion dar.

CoGLU1 hydrolysiert *in vitro* Benzoxazinoid-Glucoside, das Cytokinin-Glycosid tZOG und das cyanogene Glycosid Dhurrin. CoGLU1 wurde durch das Screening von β -Glucosidase Kandidaten isoliert. *C. orientalis* synthetisiert große Mengen an Benzoxazinoiden (Schul-lehner *et al.*, 2008). Dhurrin wird von *C. orientalis* nach bisherigen Kenntnissen nicht gebildet und stellt daher kein potentiell Substrat für CoGLU1 dar. Da tZOG mit einer 100-fach geringeren Umsatzgeschwindigkeit hydrolysiert wird als GDIBOA, ist die tZOG-Hydrolyse als eine Nebenaktivität anzusehen. Die Funktion von CoGLU1 *in planta* besteht aus diesem

Grund aller Wahrscheinlichkeit nach in der Bioaktivierung von GDIBOA. Die Genexpression von *CoGlu1* in Pflanzenorganen mit hohen GDIBOA-Gehalten belegt diese Annahme. *CoGlu1* ist stark im Keimling (0,6 pg/pg GAPDH) und in der Blüte (0,9 pg/pg GAPDH) exprimiert (Abbildung 23). Damit in Einklang wird der höchste GDIBOA-Gehalt in *C. orientalis* in der Blüte gemessen (34 mmol/kg FG in der Blüte; Schullehner *et al.*, 2008). In der Wurzel, aus der kein DIBOA isoliert wird, ist *CoGlu1* nur sehr schwach exprimiert.

Eine Funktion von CoGLU1 außerhalb der Benzoxazinoid-Biosynthese ist nicht stringent auszuschließen, dazu ist die Analyse von Mutanten notwendig. *C. orientalis* konnte bisher nicht erfolgreich transformiert werden (Schullehner *et al.*, 2008). Auch andere *in vitro* gezeigten Hydrolaseaktivitäten konnten bisher nur in Einzelfällen durch *in vivo*-Experimente bestätigt werden. Die Funktion einer β -Glucosidase des Abwehrsystems cyanogene Glucoside konnte *in planta* nachgewiesen werden. Die Dhurrinase-Aktivität von *SbDHR1* aus *S. cereale* konnte durch die Expression in *H. vulgare* verifiziert werden. *H. vulgare* Keimlinge synthetisieren das cyanogene Glycosid Epiheterodendrin (Ibenthal *et al.* 1993; Nielsen *et al.* 2002), enthalten aber keine detektierbare cyanogene Glycosid- β -Glucosidase Aktivität (Nielsen *et al.* 2002). Die Expression der *S. bicolor* Dhurrinase 1 in *H. vulgare* stellt die Cyanogenese in *H. vulgare* wieder her, und führte in der Folge zu einer Reduktion der Kolonisationsrate von *Blumeria graminis*, dem Erreger des echten Mehltaus, um 35-60% (Nielsen *et al.*, 2006).

4.2.4 Evolution von β -Glucosidasen

Für die Analyse der Evolution der Benzoxazinoid-Glucosid β -Glucosidasen wurde CoGLU1 in einen Datensatz von veröffentlichten β -Glucosidase-Sequenzen aus den Abwehrsystemen Benzoxazinoid-Glucoside, cyanogenen Glycosiden, Glucosinolaten und Saponinen aufgenommen. Zusätzlich wurden manuell reannotierte β -Glucosidasen aus *A. thaliana* (Xu *et al.*, 2004) und *O. sativa* (Opassiri *et al.*, 2006), sowie weitere β -Glucosidase-Sequenzen aus der Uniprot-Datenbank mit einbezogen.

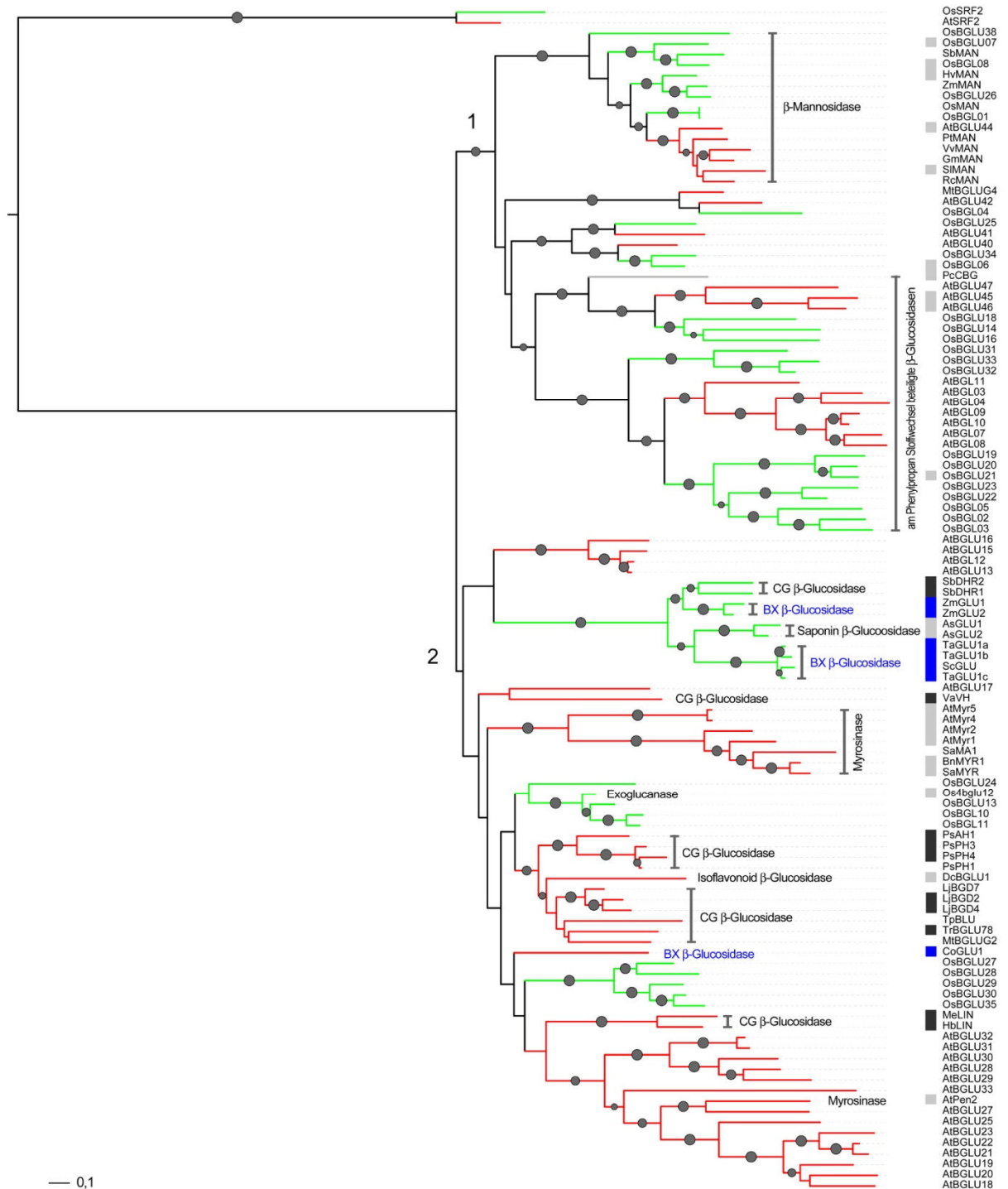


Abbildung 25: Phylogenetischer Stammbaum von β -Glucosidasen. Die Berechnung und Darstellung des Stammbaums ist analog dem UGT Stammbaum (Abbildung 24). Monokotyle und dikotyle β -Glucosidasen weisen unterschiedliche Signalpeptide auf, weswegen diese vor der Analyse entfernt wurden. Quadrate bei den Enzymnamen kennzeichnen biochemisch charakterisierte Enzyme. Enzyme, die cyanogenen Glycosiden (CG) bioaktivieren sind schwarz markiert, Enzyme die Benzoxazinoid-Glucosiden (BX) bioaktivieren sind in blauer Farbe dargestellt. Für die phylogenetische Analyse der β -Glucosidasen wurden Sequenzen von Enzymen mit veröffentlichter Funktion, und in Uniprot (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19843607>) annotierte Enzyme eingesetzt. Die Sequenzen sind mit den empfohlenen Abkürzungen bezeichnet (Abbildung 30; Anhang).

Die phylogenetische Analyse ergibt zunächst eine Aufspaltung der zwei β -Glucosidasen *AtSRF2* und *OsSRF2* aus *A. thaliana* und *O. sativa* und der restlichen untersuchten β -Glucosidasen (Abbildung 25). Es wurde gezeigt, dass die *sensitive to freezing 2-1* (*sfr2-1*) Mutation in *A. thaliana* eine Sensitivität gegenüber Frost verursacht (Thorlby *et al.*, 2004). *AtSRF2* und *OsSRF2* zeigen höhere Homologie gegenüber β -Glucosidasen aus thermophilen Archäen und Bakterien auf, als gegenüber pflanzlichen β -Glucosidasen (Thorlby, *et al.*, 2004). Der Vorläufer der restlichen β -Glucosidasen spaltet - *bootstrap* unterstützt - weiter in zwei große Hauptäste auf. Der erste Hauptast (Hauptast 1) enthält nach bisherigem Kenntnisstand β -Glucosidasen des Primärmetabolismus, während der zweite Hauptast (Hauptast 2) bis auf eine Ausnahme – einer als Exoglucanase beschriebenen β -Glucosidase (Opassiri *et al.*, 2006) – ausschließlich β -Glucosidasen des Sekundärmetabolismus enthält.

Der Hauptast 1 spaltet sich in einen Ast, der β -Mannosidasen enthält und einen Ast in dem sich β -Glucosidasen des Phenylpropan-Metabolismus finden. Zu letzterem gehören z.B. die Coniferin β -Glucosidase *PsCBG* aus *Pinus contorta* (Küsten-Kiefer), die Monolignol-Glucosid β -Glucosidasen *AtBGLU45* und *AtBGLU46* und die Scopolin β -Glucosidase *OsBGLU21*. Die Evolution beider Äste ist durch eine Vielzahl an Duplikationen und Diversifikationen ausgezeichnet. In beiden Ästen sind β -Glucosidase Sequenzen aus monokotylen und dikotylen Pflanzen vorzufinden. Die Lignifizierung ist ein sehr alter Prozess in der Pflanzen-evolution, der nach der Landnahme der Pflanzen entstanden ist. Da in den Ast der β -Glucosidasen des Phenylpropan-Metabolismus auch eine β -Glucosidase aus *Pinus contorta*, einer Gymnosperme gruppiert, hat die Spaltung der β -Glucosidasen in Vorläufer des Sekundär- und Primärmetabolismus zwischen der Landnahme der Pflanzen und der Aufspaltung der Pflanzen in Gymnospermen und Angiospermen stattgefunden. Aus den phylogenetischen Bäumen kann geschlossen werden, dass die β -Glucosidase-Vorläufer ursprünglich ein sehr breites Substrat-Spektrum akzeptierten. Wenige β -Glucosidasen waren wahrscheinlich in verschiedenste biologische Prozesse, wie die Phytohormon-Homöostase, der Bioaktivierung von Phytoantizipinen und der Lignifizierung involviert. Durch eine Reihe von Duplikationen entstanden in den einzelnen Spezies β -Glucosidase-Familien von ca. 40 Mitgliedern. Für verschiedene biologische Prozesse des Sekundär- und Primärmetabolismus wurden unterschiedliche Vertreter rekrutiert, und im Laufe der Evolution fand eine Spezialisierung der Enzyme für das jeweilige Substrat statt.

Die Spezialisierung von β -Glucosidase-Vorläufern mit breiter Substratspezifität zu β -Glucosidasen mit spezifischen Funktionen wird z.B. bei der Betrachtung von *H. lechleri* deutlich. Diese Art synthetisiert das cyanogene Glycosid Epiheterodendrin (s.o.; Ibenthal *et al.* 1993; Nielsen *et al.* 2002), kann dieses aber nicht bioaktivieren, da im *H. lechleri* Proteom keine

entsprechende β -Glucosidase vorliegt (Nielsen *et al.*, 2006) und andere β -Glucosidasen der GH1-Familie in *H. lechleri* keine ausreichend breite Substratspezifität für diese Reaktion aufweisen.

Der Hauptast 2 mündet in β -Glucosidase-Sequenzen verschiedenster Funktionen des Sekundärmetabolismus. Glucosinolat bioaktivierende β -Glucosidasen (Myrosinasen) bilden einen getrennten Ast, der ausschließlich Sequenzen der Brassicaceae *A. thaliana*, *S. alba* und *B. napus* enthält. Diese β -Glucosidasen scheinen in den Brassicaceae monophyletisch durch eine Reihe von Duplikationen aus einem Myrosinase-Vorläufer-Gen entstanden zu sein. Die Lokalisation einer weiteren Myrosinase AtPEN2 in einem anderen Unterast des Hauptasts 2 macht die ursprüngliche Flexibilität der β -Glucosidasen deutlich, da in *A. thaliana* unterschiedliche Vorläufer-Enzyme für die gleiche Substratspezifität rekrutiert werden konnten. In einem zweiten Ast finden sich ebenfalls nur β -Glucosidasen einer Pflanzenfamilie, nämlich der Poaceae. Hier sind jedoch β -Glucosidasen verschiedener Funktionen, nämlich der Bioaktivierung von Benzoxazinoiden, cyanogenen Glycosiden und Avenacosiden vertreten. Die Phylogenie der β -Glucosidasen in diesem Ast folgt nicht ihrer Funktion, sondern der Phylogenie der Poaceae. So weisen z.B. die Benzoxazinoid-Glucosid β -Glucosidasen *ZmGLU1* und *ZmGLU2* aus *Z. mays* eine engere phylogentische Verwandtschaft zu den Dhurrinasen *SbDHR1* und *SbDHR2* aus dem näher verwandten *S. bicolor* auf als zu den Benzoxazinoid-Glucosid β -Glucosidasen *TaGLU1a-c* aus dem weiter entfernt verwandten *T. aestivum*.

Cyanogene Glycoside bioaktivierende β -Glucosidasen sind in dem Hauptasts 2 sehr stark vertreten. Cyanogene Glycoside sind eine Substanzklasse von Sekundärmetaboliten, die in monokotylen und dikotylen Pflanzen vorkommen. Die Substanzklasse zeichnet sich durch ein Kohlenstoffatom aus, das mit einem Zucker verestert ist, und die charakteristische Nitrilgruppe trägt. Die weiteren funktionellen Gruppen des Kohlenstoffatoms sind familienspezifisch (z.B. Phenol und Wasserstoff-Atom bei Dhurrin, zwei Methylgruppen bei Linamarin; Abbildung 1). Die cyanogene Glycoside bioaktivierenden β -Glucosidasen in den 4 Ästen gehören entweder zu dikotylen oder zu monokotylen Pflanzen, und könnten daher nach der Trennung der monokotylen und dikotylen Pflanzen evolviert sein.

Benzoxazinoid-Glucosid bioaktivierende Enzyme sind die einzigen β -Glucosidasen, für die mehrere Vertreter aus monokotylen Pflanzen (*ZmGLU1*, *ZmGLU2*, *ScGLU* und *TaGLU1a-c*) und mit dieser Arbeit nun ein Vertreter aus einer dikotylen Pflanzen (*CoGLU1*) bekannt sind. Während sich die Benzoxazinoid-Glucosid β -Glucosidasen der Gräser alle in einem klar definierten Ast finden, kann für *CoGLU1* aus *C. orientalis* keine Subfamilie bestimmt werden. Für die Benzoxazinoid-Glucosid β -Glucosidasen aus Gräsern und *C. orientalis* wurden unter-

schiedliche Vorläuferenzyme rekrutiert, denn die jeweiligen Vorläufer-Enzyme sind bereits vor der Trennung von monokotylen und dikotylen Pflanzen zu finden. Über die ursprüngliche Hauptfunktion der jeweiligen Vorläufer kann nur spekuliert werden. Da *ZmGLU1* und *CoGLU1* beide Cytokinin-Glycoside hydrolysieren kann auch für den Vorläufer der Benzoxazinoid-Glucosid β -Glucosidasen eine Rolle in der Phytohormon-Homöostase angenommen werden.

4.3 Evolution der DIBOA-Glucosid-Biosynthese in Angiospermen

Die DIBOA-Glucosid-Biosynthese kann in drei Module unterteilt werden, die *Branchpoint*-Reaktion, die Modifikation hin zu dem toxischen DIBOA und die Detoxifizierung von DIBOA durch Glucosylierung. Für die Funktion der Benzoxazinoide in der Pflanzenabwehr ist weiterhin die Bioaktivierung der Glucoside notwendig.

Das *Branchpoint*-Enzym der Benzoxazinoid-Biosynthese, BX1 stellt eine Indol-3-Glycerinphosphatlyase (IGLs) dar, welche die Spaltung von Indol-3-Glycerinphosphat in freies Indol und Glycerinaldehyd-3-Phosphat katalysiert. Indol ist das erste Intermediat der DIBOA-Glucosid-Biosynthese. Es wird in der Tryptophanbiosynthese durch die α -Untereinheit der Tryptophan-Synthase (TSA) gebildet und im Tryptophan-Synthase-Komplex sofort in Tryptophan umgesetzt, ohne dass freies Indol entsteht. In Pflanzen finden sich meist mehrere TSA-Homologe. In *A. thaliana*, *C. orientalis*, *L. galeobdolon*, *Z. mays*, *T. aestivum* und *H. lechleri* weisen die TSA-Homologen katalytische Eigenschaften auf, die die Bildung von freiem Indol erlauben (Schullehner *et al.*, 2008; Frey *et al.*, 2000). Die Indolbiosynthese kann daher als erweiterte Grundausstattung der Pflanzen angesehen werden. Der Vergleich der DIBOA-Biosynthese von *C. orientalis*, *L. galeobdolon* und der Gräser zeigt, dass jeweils auf andere *Igl*-Gene für die *Branchpoint*-Reaktion zurückgegriffen wurde, das anschließend eine Neofunktionalisierung im Sekundärmetabolismus erfahren hat (Gierl und Frey, 2001). In der Biosynthese von Pyrrolizidinalkaloide findet man ein weiteres Beispiel für die polyphyletische Evolution des *Branchpoint*-Enzyms. Die Homospermidinsynthasen (HSS) sind in verschiedenen Familien der Angiospermen unabhängig voneinander durch Genduplikationen der Deoxyhyposinsynthase (DHS) aus dem Primärmetabolismus entstanden (Reimann *et al.*, 2004).

Indol wird anschließend in vier Hydroxylierungsreaktionen in DIBOA umgesetzt. Hydroxylierungen können prinzipiell durch verschiedene Enzymklassen katalysiert werden, wie z.B. den Cytochrom-P450-Enzymen und den Dioxygenasen. Die Modifikationsreaktionen in *Z. mays* werden durch die Cytochrom-P450-Enzyme *ZmBx2* bis *ZmBX5* katalysiert. Die erste Hydroxylierungsreaktion ist in dikotylen und monokotylen Pflanzen identisch und wird

gleichermaßen von Cytochrom-P450-Enzymen katalysiert. Die weiteren drei chemischen Reaktionen in dikotylen Pflanzen sind unbekannt. Es gibt Hinweise, dass in *L. galeobdolon* eine Dioxygenase involviert ist (Schullehner *et al.*, 2008). Dioxygenasen und Cytochrom-P450-Enzyme bilden in Pflanzen große Genfamilien. Die Cytochrom-P450-Enzyme bilden sogar eine der größten Genfamilien in Pflanzen; es gibt z.B. 273 Mitglieder der Genfamilie in *A. thaliana* (Xu *et al.*, 2001). Es wird angenommen, dass die Explosion der Cytochrom-P450-Enzyme infolge der Landnahme der Pflanzen stattgefunden hat. (Werck-Reichhart *et al.*, 2002). Dioxygenasen und Cytochrom-P450-Enzyme katalysieren ein breites Spektrum an Reaktionen, sie sind vor allem für die Sekundärstoffbiosynthese bedeutend. Die Evolution der Modifikationsreaktionen in monokotylen und dikotylen Pflanzen ausgehend von diesem Reservoir kann erst nach Isolierung und Charakterisierung der entsprechenden Gene aus dikotylen Spezies untersucht werden.

Die Detoxifizierung und Bioaktivierung in monokotylen und dikotylen Pflanzen ist polyphyletisch evolviert. Die gezeigten unterschiedlichen Enzymeigenschaften der entsprechenden Proteine aus den Gräsern und *C. orientalis* könnten auf unterschiedliche Vorläufer zurückgeführt werden. Die polyphyletische Evolution lässt darauf schließen, dass die "Substratflexibilität" und das Angebot von UGT- und β -Glucosidase-Vorläufern groß genug war, um eine unabhängige Evolution der gleichen Funktion in unterschiedlichen Taxa zu ermöglichen. Möglicherweise ist die Existenz einer Detoxifizierungs- und Bioaktivierungsfunktion eine notwendige Voraussetzung für die Evolution eines Biosynthesewegs, der in einem toxischen Endprodukt resultiert.

5 Zusammenfassung

Die Benzoxazinoide DIBOA und DIMBOA sind Phytoantizipine, die in den Gräsern (Poaceae) weit verbreitet sind. Ihre Biosynthese ist für *Z. mays* vollständig aufgeklärt. Das erste toxische Produkt des Biosynthesewegs, DIBOA, wird von einer UDP-abhängigen Glucosyltransferase (UGT) detoxifiziert und in der Vakuole gespeichert. Spezifische Benzoxazinoid-Glucosid β -Glucosidasen sind in einem anderen zellulären Kompartimenten gelagert. Bei einem Angriff eines Herbivors oder Pathogens wird die Zellintegrität zerstört, wodurch das Benzoxazinoid-Glucosid und die β -Glucosidase in Kontakt kommen, und das toxische Aglucon gebildet wird (Bioaktivierung). Außerhalb der Gräser wurden Benzoxazinoide sporadisch aus wenigen Vertretern der dikotylen Pflanzen isoliert. In dieser Arbeit wurde die Detoxifizierungs- und Bioaktivierungsfunktion der dikotylen Spezies *Consolida orientalis* und *Lamium galeobdolon* untersucht.

Die Benzoxazinoid Glucosyltransferasen aus *C. orientalis* und *L. galeobdolon* wurden über ihre Funktion gereinigt. Über Massenspektroskopie wurden Peptidsequenzen bestimmt. Ein Vergleich der Peptidsequenzen mit UGT-Kandidatensequenzen ermöglichte die Identifizierung putativer Gensequenzen. Die aus *C. orientalis* isolierte UGT CoBX8 wurde in ihrer Funktion bestätigt und charakterisiert. CoBX8 glucosyliert spezifisch die Benzoxazinoide DIBOA, DIMBOA, HBOA und HMBOA. Andere Benzoxazinoide, Flavonoide und Phytohormone werden nicht glucosyliert. CoBX8 glucosyliert das in *C. orientalis* vorkommende Benzoxazinoid DIBOA mit einer höheren katalytischen Effizienz als dessen Derivat DIMBOA. Die heterologe Expression von CoBX8 in *A. thaliana* vermittelt den Pflanzen erhöhte Toleranz gegenüber den phytotoxischen Benzoxazinoiden DIBOA und DIMBOA.

Durch das Screening von β -Glucosidase Kandidaten aus *C. orientalis* konnte die Benzoxazinoid-Glucosid β -Glucosidase CoGLU1 isoliert werden. Für CoGLU1 konnte ebenfalls eine höhere katalytische Effizienz der Hydrolyse des endogenen Substrats DIBOA-Glucosid als für DIMBOA-Glucosid gezeigt werden. CoGLU1 hydrolysiert auch Vertreter anderer Substanzklassen, wie z.B. das Phytohormon-Glucosid *trans*-Zeatin-O-Glucosid oder das cyanogene Glycosid Dhurrin.

Die phylogenetische Analyse von UGTs und β -Glucosidasen des Primär- und Sekundärmetabolismus zeigt, dass die Aufspaltung der UGTs und β -Glucosidasen vor der Trennung der Angiospermen in monokotyle und dikotyle Pflanzen stattgefunden hat. Aus den phylogenetischen Bäumen kann geschlossen werden, dass die UGT- und β -Glucosidase-Vorläufer ursprünglich ein breites Substrat-Spektrum akzeptierten. Für die Detoxifizierung von Benzoxazinoiden und die Bioaktivierung ihrer Glucoside haben monokotyle und dikotyle

Pflanzen auf unterschiedliche Vorläufer zurückgegriffen. Der Zusammenhang zwischen der Substratspezifität von CoBX8 und CoGLU1 und ihrer Evolution wird diskutiert.

Summary

The benzoxazinoids DIBOA and DIMBOA are phytoanticipines widely distributed in the grasses (Poaceae). The benzoxazinoid biosynthesis is fully elucidated in *Z. mays*. The first toxic product of the biosynthetic pathway, DIBOA, is detoxified by a UDP-dependent glucosyltransferase (UGT) and stored in the vacuole. Specific benzoxazinoid-glucoside β -glucosidases are located in a different cellular compartment. Upon pathogen or herbivore attack, the cell integrity is destroyed, and the glucosides come into contact with the degrading β -glucosidases, resulting in an immediate release of the toxic aglucone (bioactivation). Outside the grasses, benzoxazinoids are isolated sporadically from a few members of the dicotyledonous plants. In this work the detoxification and bioactivation function of the dicots *C. orientalis* and *L. galeobdolon* are analyzed.

The benzoxazinoid glucosyltransferases of *C. orientalis* and *L. galeobdolon* were purified based upon their function and subsequently peptide sequences were determined by mass spectroscopy. Putative genes were identified by comparing peptide sequences with UGT candidates. The UGT from *C. orientalis* CoBX8 was confirmed to glucosylate benzoxazinoids and characterized. CoBX8 specifically glucosylates the benzoxazinoids DIBOA, DIMBOA, HBOA and HMBOA, whereas other benzoxazinoids, flavonoids and phytohormones are not accepted as substrates. DIBOA, the main benzoxazinoid in *C. orientalis*, is glucosylated with a higher catalytic efficiency than its derivate DIMBOA. CoBX8 expression in *A. thaliana* was shown to reduce the phytotoxicity of DIBOA and DIMBOA.

The benzoxazinoid-glucoside β -glucosidase CoGLU1 from *C. orientalis* was isolated by screening β -glucosidase candidates. CoGLU1 catalyzes the hydrolysis of the endogenous substrate DIBOA-glucoside with a higher efficiency than the conversion of DIMBOA-glucoside. It also hydrolyzes members of different substance classes, like the phytohormone-glucoside *trans*-zeatin-O-glucoside or the cyanogenic glycoside Dhurrin.

Phylogenetic analysis of UGTs and β -glucosidases of primary and secondary metabolism shows that separation of UGTs and β -glucosidases occurred before separation of angiosperms in monocotyledonous and dicotyledonous plants. The trees indicate a broad substrate spectrum of the ancestors of UGTs and β -glucosidases. Monocotyledonous and dicotyledonous plants recruited different ancestors for detoxification of benzoxazinoids and bioactivation of benzoxazinoid-glucosides. The relationship between evolution and substrate specificity of CoBX8 and CoGLU1 is discussed.

6 Literaturverzeichnis

Alipieva, K. I., Taskova, R. M., Evstatieva, L. N., Handjieva N. V. und Popov, S. S. (2003) Benzoxazinoids and iridoid glucosides from four *Lamium* species. *Phytochemistry* 64: 1413-1417.

Angiosperm Phylogeny group (2003) An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. 399-436.

Austin, R. S., Provar, N. J. und Cutler, S. R. (2007) C-terminal motif prediction in eukaryotic proteomes using comparative genomics and statistical over-representation across protein families. *BMC Genomics* 8: 191.

Babcock, G. D. und Esen, A. (1994) Substrate specificity of maize β -glucosidase. *Plant Science* Volume 101: 31-39.

Bailey, B. A. und Larson, R. L. (1989) Hydroxamic Acid Glycosyltransferases from Maize Seedlings. *Plant Physiol.* 90: 1071-1076.

Bak, S., Kahn, R. A., Nielsen, H. L., Møller, B. L. und Halkier B. A. (1998a) Cloning of three A-type cytochromes P450, CYP71E1, CYP98, and CYP99 from *Sorghum bicolor* (L.) Moench by a PCR approach and identification by expression in *Escherichia coli* of CYP71E1 as a multifunctional cytochrome P450 in the biosynthesis of the cyanogenic glucoside dhurrin. *Plant Mol. Biol.* 36, 393–405.

Bak, S., Nielsen, H. L. und Halkier, B. A. (1998b) The presence of CYP79 homologues in glucosinolate-producing plants shows evolutionary conservation of the enzymes in the conversion of amino acid to aldoxime in the biosynthesis of cyanogenic glucosides and glucosinolates. *Plant Mol. Biol.* 38: 725–734.

Bak, S., Paquette, S. M., Morant, M., Rasmussen, A. V., Saito, S., Bjarnholt, N., Zagrobelny, M., Jørgensen, K., Hamann, T., Osmani, S., Simonsen, H. T., Pérez, R. S., van Hesswijck, T. B., Jørgensen, B. und Møller, B. L., (2006) Cyanogenic glycosides: a case study for evolution and application of cytochromes P450. *Phytochem. Rev.* 5, 309–329.

Bandaranayake, H. und Esen, A. (1996) Nucleotide sequence of a β -glucosidase (*glu2*) cDNA from maize (accession no. U44087). EMBL Data Library.

Barnes, J. P. und Putnam, A. R. (1987) Role of benzoxazinones in allelopathy by rye (*Secale cereale* L.). *J. Chem. Ecol.* 13: 889-906.

Barrett, T., Suresh, C. G., Tolley, S. P., Dodson, E. J. und Hughes M. A. (1995) The crystal structure of a cyanogenic beta-glucosidase from white clover, a family 1 glycosyl hydrolase. *Structure* 3: 951-960.

Barth, C. und Jander, G. (2006) Arabidopsis myrosinases TGG1 and TGG2 have redundant function in glucosinolate breakdown and insect defense. *Plant J.* 46: 549–562.

Bechtel, N. (2009) Identifizierung und Isolierung von Glycosyltransferasen in *Lamium galeobdolon*. Bachelorarbeit, Technische Universität München.

Birnboim, H.C., und Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7: 1513-1523.

Bowles, D., Lim, E. K., Poppenberger, B. und Vaistij, F. E. (2006) Glycosyltransferases of lipophilic small molecules. *Annu Rev Plant Biol.* 57: 567-97.

Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 7: 248-254.

- Brazier-Hicks, M., Offen, W. A., Gershater, M. C., Revett, T. J., Lim, E. K., Bowles, D. J., Davies, G. J. und Edwards, R. (2007) Characterization and engineering of the bifunctional N- and O-glucosyltransferase involved in xenobiotic metabolism in plants. *Proc Natl Acad Sci.* 104(51): 20238-43.
- Brzobohatý, B., Moore, I., Kristoffersen, P., Bako, L., Campos, N., Schell, J. und Palme, K. (1993) Release of active cytokinin by a beta-glucosidase localized to the maize root meristem. *Science* 262(5136): 1051-4.
- Burgos, N. R., Talbert, R. E., Kim, K. S. und Kuk, Y. I. (2004) Growth inhibition and root ultrastructure of cucumber seedlings exposed to allelochemicals from rye (*Secale cereale*). *J Chem Ecol.* 30(3): 671-89.
- Burmeister, W. P., Cottaz, S., Driguez, H., Lori R., Palmieri S. und Henrissat B. (1997) The crystal structures of *Sinapis alba* myrosinase and a covalent glycosyl-enzyme intermediate provide insights into the substrate recognition and active-site machinery of an S-glycosidase. *Structure* 5: 663-675.
- Campbell, J. A., Davies, G. J., Bulone, V. und Henrissat, B. (1997) A classification of nucleotide-diphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* 15: 929-939.
- Campos, N., Bako, L., Feldwisch, J., Schell, J. und Palme, K. (1992) A protein from maize labeled with azido-IAA has novel b-glucosidase activity. *Plant J* 2: 675–684.
- Cicek, M. und Esen, A. (1999) Expression of soluble and catalytically active plant (monocot) beta-glucosidases in *E. coli*. *Biotechnol Bioeng.* 63(4): 392-400.
- Cicek, M., Blanchard, D., Bevan, D. R. und Esen, A. (2000) The aglycone specificity-determining sites are different in 2, 4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one (DIMBOA)-glucosidase (Maize beta -glucosidase) and dhurrinase (*Sorghum beta* -glucosidase). *J Biol Chem.* 275(26): 20002-11.
- Claros, M. G. und Vincens, P. (1996) Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *Eur. J. Biochem.* 241: 779-786.
- Clough, S. J. und Bent, A. F. (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium* mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16: 735-743.
- Conn, E. E. (1980) Cyanogenic Compounds. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 31: 433–451.
- Copaja, S. V., Villarroel, E., Bravo, H. R., Pizarro, L. und Aragandona, V. H. (2006) Hydroxamic acids in *Secale cereale* L. and the relationship with their antifeeding and allelopathic properties. *Zeitschrift Fur Naturforsch. C: J. Biosci.* 61: 670–676.
- Coutinho, P. M., Deleury, E., Davies, G. J. und Henrissat, B. (2003) An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases. *J. Mol. Biol.* 328: 307-317.
- Cuevas, L. und Niemeyer, H. M. (1993) Effect of hydroxamic acids from cereals on aphid cholinesterases. *Phytochemistry* 34: 983-985.
- Cuevas, L., Niemeyer, H. M. und Jonsson L. M. V. (1992) Partial purification and characterization of a hydroxamic acid glucoside b-D-glucosidase from maize. *Phytochemistry* 31: 2609-2612.
- Cuevas, L., Niemeyer, H. M. und Perez, F. J. (1990) Reaction of DIMBOA, a resistance factor from cereals, with α -chymotrypsin. *Phytochemistry* 29: 1429-1432.
- Czjzek, M., Cicek, M., Zamboni, V., Bevan, D. R., Henrissat, B. und Esen, A., (2000) The mechanism of substrate (aglycone) specificity in beta-glucosidases is revealed by crystal structures of mutant maize beta-glucosidase-DIMBOA, -DIMBOAGlc, and -dhurrin complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 13555–13560.

- Czjzek, M., Cicek, M., Zamboni, V., Burmeister, W. P., Bevan, D. R., Henrissat, B. und Esen, A. (2001) Crystal structure of a monocotyledon (maize ZMGluc1) beta-glucosidase and a model of its complex with p-nitrophenyl beta-Dthioglucoside. *Biochem. J.* 354: 37–46.
- Davies, G. und Henrissat, B. (1995) Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure* 3: 853-859.
- Dellaporta, S. L., Wood, J. und Hicks, J. B. (1983) A plant DNA miniprep: version II *Plant Mol. Biol. Rep* 1: 19-21.
- Dharmawardhana, D. P., Ellis, B. E. und Carlson, J. E. (1995) A β -glucosidase from lodgepole pine xylem specific for the lignin precursor coniferin. *Plant Physiol.* 107: 331–339.
- Dooner, H. und Nelson, O. (1977) Genetic control of UDPglucose: flavonol 3-O-glucosyltransferase in endosperm of maize. *Biochem. Genet.* 15: 509-519.
- Ebel, J. (1986) Phytoalexin synthesis: the biochemical analysis of the induction process. *Annu Rev Phytopathol* 24:235-204.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H. und von Heijne, G. (1999) ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites *Protein Science*: 8: 978-984.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S. und von Heijne, G. (2000) Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J. Mol. Biol.*, 300: 1005-1016.
- Engler, C., Kandzia, R. und Marillonnet, S. (2008) A One Pot, One Step, Precision Cloning Method with High Troughput Capability; *PLoS ONE*; 3:3647.
- Esen, A. (1992) Purification and Partial Characterization of Maize (*Zea mays* L.) beta-Glucosidase. *Plant Physiol.* 98(1):174-182.
- Esen, A. und Stetler, D. A. (1993) Subcellular localization of maize β -glucosidase. *Maize Genetics Cooperation Newsletter* 67: 19–20.
- Ettlinger, M. G. und Kjær, A. (1968) Sulfur compounds in plants. In: Mabry, T. J., Alston, R. E. und Runeckles, V. C. (Eds.), *Recent Advances in Phytochemistry*. Century Crofts, Appleton: 59–144.
- Fahey, J. W., Zalcmann, A. T. und Talalay, P. (2001) The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry* 56: 5-51.
- Falk, A. und Rask, L. (1995) Expression of a zeatin-O-glucoside-degrading β -glucohydrolase in *Brassica napus*. *Plant Physiol.* 108: 1369–1377.
- Fan, T. W. M. und Conn, E. E. (1985) Isolation and characterization of two cyanogenic beta-glucosidases from flax seeds. *Arch. Biochem. Biophys.* 243: 361–373.
- Ford, C. M., Boss, P. K. und Hoj, P. B. (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.
- Frangne, N., Eggmann, T., Koblischke, C., Weissenböck, G., Martinoia, E. und Klein, M. (2002) Flavone glucoside uptake into barley mesophyll and Arabidopsis cell culture vacuoles. Energization occurs by H(+)-antiport and ATP-binding cassette-type mechanisms. *Plant Physiol.* 128(2): 726-33.
- Frey, M., Chomet, P., Glawischnig, E., Stettner, C., Grün, S., Winklmaier, A., Eisenreich, W., Bacher, A., Meeley, R. B., Briggs, S. P., Simcox, K. und Gierl, A. (1997) Analysis of a chemical plant defense mechanism in grasses. *Science* 277: 696-699.

- Frey, M., Huber K., Park, W. J., Sicker, D., Lindberg, P., Meeley, R. B., Simmons, C. R., Yalpani, N. und Gierl, A. (2003) A 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase is integrated in DIMBOA-biosynthesis. *Phytochemistry* 62: 371-376.
- Frey, M., Kliem, R., Saedler, H. und Gierl, A. (1995) Expression of a cytochrome P450 gene family in maize. *Mol Gen Genet.* 246(1): 100-9.
- Frey, M., Schullehner, K., Dick, R., Fiesselmann, A. und Gierl, A. (2009) Benzoxazinoid biosynthesis, a model for evolution of secondary metabolic pathways in plants. *Phytochemistry* 70: 1645–1651.
- Frey, M., Stettner, C. und Gierl, A. (1998) A general method for gene isolation in tagging approaches: amplification of insertion mutagenised sites (AIMS). *Plant J.* 13: 717-721.
- Frey, M., Stettner, C., Pare, P.W., Schmelz, E. A., Tumlinson, J. H. und Gierl, A. (2000) An herbivore elicitor activates the gene for indole emission in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 14801–14806.
- Friebe, A., Roth, U., Kück, P., Schnabl, H. und Schulz, M. (1997) Effects of 2,4-dihydroxy-1,4-benzoxazin-3-ones on the activity of plasma membrane H⁺-ATPase. *Phytochemistry* 44: 979-983.
- Gachon, C. M. M., Langlois-Meurinne, M., und Saindrenan P. (2005) Plant secondary metabolism glycosyltransferases: the emerging functional analysis. *TRENDS in Plant Science* 10: 542-549.
- Gierl, A. und Frey, M. (2001) Evolution of benzoxazinone biosynthesis and indole production in maize. *Planta* 213(4): 493-8.
- Glawischnig, E., Grün, S., Frey, M. und Gierl, A. (1999) Cytochrome P450 monooxygenases of DIBOA biosynthesis: specificity and conservation among grasses. *Phytochemistry.* 50(6): 925-30.
- Gleba, Y., Klimyuk, V. und Marillonnet, S. (2005) Magniffection--a new platform for expressing recombinant vaccines in plants. *Vaccine.* 23(17-18): 2042-8
- Göpfrich, I. (2010) Expression von β -Glucosidasen aus dikotylen Pflanzen in heterologen Systemen, Bachelorarbeit, Technische Universität München.
- Griesser, M., Vitzthum, F., Fink, B., Bellido, M. L., Raasch, C., Munoz-Blanco, J. und Schwab, W. (2008) Multi-substrate flavonol O-glucosyltransferases from strawberry (*Fragaria x ananassa*) achene and receptacle. *J. Exp. Bot.* 59: 2611-2625.
- Grubb, C. D., Zipp, B. J., Ludwig-Müller, J., Masuno M. N., Molinski T. F. und Abel, S. (2004) Arabidopsis glucosyltransferase UGT74B1 functions in glucosinolate biosynthesis and auxin homeostasis. *Plant J.* 46: 893-908.
- Gruhnert, C., Biehl, B. und Selmar, D. (1994) Compartmentation of cyanogenic glucosides and their degrading enzymes. *Planta* 195: 36-42.
- Grün, S., Frey, M. und Gierl, A. (2005) Evolution of the indole alkaloid biosynthesis in the genus *Hordeum*: distribution of gramine and DIBOA and isolation of the benzoxazinoid biosynthesis genes from *Hordeum lechleri*. *Phytochemistry* 66(11): 1264-72.
- Gubler, U. und Hoffman, B. J. (1983) A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. *Gene:* 25:263-9.
- Gusmayer, S., Brunner, H., Schneiderpoetsch, H. A. W. und Rudiger, W. (1994) Avenacosidase from oat – purification, sequence analysis and biochemical characterization of a new member of the bga family of beta-glucosidasen. *Plant Mol. Biol.* 26: 909–921.
- Halkier, B. A. und Gershenzon, J. (2006) Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57, 303–333.

- Halkier, B. A. und Møller, B. L. (1989) Biosynthesis of the Cyanogenic Glucoside Dhurrin in Seedlings of *Sorghum bicolor* (L.) Moench and Partial Purification of the Enzyme System Involved. *Plant Physiol* 90: 1552-1559.
- Halkier, B. A. und Møller, B. L. (1990) The biosynthesis of cyanogenic glucosides in higher plants – identification of 3 hydroxylation steps in the biosynthesis of dhurrin in *Sorghum bicolor* (L.) Moench and the involvement of 1-aci-nitro-2-(phydroxyphenyl) ethane as an intermediate. *J. Biol. Chem.* 265: 21114–21121.
- Halkier, B. A., Nielsen, H. L., Koch, B. und Møller, B. L. (1995) Purification and characterization of recombinant cytochrome P450(Tyr) expressed at high levels in *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.* 322: 369–377.
- Hansen, K. S., Kristensen, C., Tattersall, D. B., Jones, P. R., Olsen, C. E., Bak, S. und Møller, B. L. (2003) The in vitro substrate regiospecificity of recombinant UGT85B1, the cyanohydrin glucosyltransferase from *Sorghum bicolor*. *Phytochemistry* 64: 143–151.
- Haralampidis, K., Bryan, G., Qi, X., Papadopoulou, K., Bakht, S., Melton, R. und Osbourn, A. (2001) A new class of oxidosqualene cyclases directs synthesis of antimicrobial phytoprotectants in monocots. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 13431–13436.
- Harborne, J. B. (1999) Recent advances in chemical ecology. *Nat Prod Rep.* 16(4): 509-23.
- Hefner, T., Arend, J., Warzecha, H., Siems, K. und Stöckigt, J. (2002) Arbutin synthase, a novel member of the NRD1beta glycosyltransferase family, is a unique multifunctional enzyme converting various natural products and xenobiotics. *Bioorg Med Chem.* 6: 1731-41.
- Henrissat, B. (1991) A classification of glycosyl hydrolases based on amino-acid sequence similarities. *Biochem. J.* 280: 309-316.
- Henrissat, B. und Davies, G. (1997) Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Curr Opin Struct Biol.* 7(5): 637-44.
- Hillenmeyer, M. (2010) Charakterisierung der UDPG: Benzoxazinoid Glucosyltransferasen von Weizen und Mais. *Forschungspraktikum, Technische Universität München.*
- Höglund, A. S., Lenman, M. und Rask, L. (1992) Myrosinase is localized to the interior of myrosin grains and is not associated to the surrounding tonoplast membrane. *Plant Sci.* 85: 165–170.
- Hosel, W., Tober, I., Eklund, S. H. und Conn, E. E. (1987) Characterization of betaglucosidases with high specificity for the cyanogenic glucoside dhurrin in *Sorghum bicolor* (L.) Moench seedlings. *Arch. Biochem. Biophys.* 252: 152–162.
- Hou, B., Lim, E. K., Higgins, G. S. und Bowles, D. J. (2004) N-glycosylation of cytokinins by glycosyltransferases of *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 279(46): 47822-32.
- Hughes, J. und Hughes, M. A. (1994) Multiple secondary plant product UDP-glucose glucosyltransferase genes expressed in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) cotyledons. *DNA Seq.* 5: 41-49.
- Hughes, M. A., Brown, K., Pancoro, A., Murray, B. S., Oxtoby, E. und Hughes, J. (1992) A molecular and biochemical analysis of the structure of the cyanogenic bglucosidase (Linamarase) from cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Arch. Biochem. Biophys.* 295: 273–279.
- Ibenthal, W-D., Pourmohseni, H., Grosskopf, S., Oldenburg, H. und Shafiei-Azad, S. (1993) New approaches towards biochemical mechanisms of resistance/susceptibility of Gramineae to powdery mildew (*Erysiphe graminis*). *Angew Bot* 67: 97–106.
- Jackson, R. G., Lim, E. K., Li, Y., Kowalczyk, M., Sandberg, G., Hoggett, J., Ashford, D. A., und Bowles, D. J. (2001) Identification and biochemical characterization of an *Arabidopsis* indole-3-acetic acid glucosyltransferase. *J Biol Chem.* 276(6): 4350-6

- Jonczyk, R., Schmidt, H., Osterrieder, A., Fiesselmann, A., Schullehner, K., Haslbeck, M., Sicker, D., Hofmann, D., Yalpani, N., Simmons, C., Frey, M. und Gierl, A. (2008) Elucidation of the final reactions of DIMBOA-glucoside biosynthesis in maize: characterization of Bx6 and Bx7. *Plant Physiol.* 146: 1053–1063.
- Jones, P. R., Møller, B. L., und Høj, P. B. (1999) The UDP-glucose:p-Hydroxymandelonitrile-O-Glucosyltransferase that catalyzes the last step in synthesis of the cyanogenic glucoside dhurrin in *Sorghum bicolor*. *The Journal of Biological Chemistry* 274: 35483-35491.
- Jones, P. und Vogt, T. (2001) Glycosyltransferases in secondary plant metabolism: tranquilizers and stimulant controllers. *Planta* 213: 164-174.
- Jones, P., Messner, B., Nakajima, J., Schäffner, A. R. und Saito K. (2003) UGT73C6 and UGT78D1, glycosyltransferases involved in flavonol glycoside biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 278: 43910-43918.
- Kelly, P. J., Bones, A. und Rossiter, J. T. (1998) Sub-cellular immunolocalization of the glucosinolate sinigrin in seedlings of *Brassica juncea*. *Planta* 206: 370-377.
- Keresztessy, Z., Hughes, J., Kiss, L. und Hughes, M. A. (1996) Co-purification from *Escherichia coli* of a plant beta-glucosidase-glutathione S-transferase fusion protein and the bacterial chaperonin GroEL. *Biochem. J.* 314: 41–47.
- Kesselmeier, J. und Urban, B., (1983) Subcellular localization of saponins in green and etiolated leaves and green protoplasts of oat (*Avena sativa* L.). *Protoplasma* 114: 133–140.
- Kim, Y. W. und Kim, I. S. (1998) Subunit composition and oligomer stability of oat beta-glucosidase isozymes. *Biochim. Biophys. Acta* 1388: 457–464.
- Kim, Y. W., Kang, K. S., Kim, S. Y. und Kim, I. S. (2000) Formation of fibrillar multimers of oat beta-glucosidase isoenzymes is mediated by the As-Glu1 monomer. *J Mol Biol.* 303(5): 831-42.
- Kiran, N. S., Polanská, L., Fohlerová, R., Mazura, P., Válková, M., Smeral, M., Zouhar, J., Malbeck, J., Dobrev, P. I., Machácková, I. und Brzobohatý, B. (2006) Ectopic over-expression of the maize beta-glucosidase Zm-p60.1 perturbs cytokinin homeostasis in transgenic tobacco. *J Exp Bot.* 57(4): 985-96.
- Klein, M., Weissenböck, G., Dufaud, A., Gaillard, C., Kreuz, K. und Martinoia, E. (1996) Different energization mechanisms drive the vacuolar uptake of a flavonoid glucoside and a herbicide glucoside. *J Biol Chem.* 271(47): 29666-71.
- Ko, J. H., Kim, B. G., Hur, H. G., Lim, Y. und Ahn, J. H. (2006) Molecular cloning, expression and characterization of a glycosyltransferase from rice. *Plant Cell Rep.* 25: 741-746.
- Koncz, C. und Schell, J. (1986) The promoter of T L-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Molecular Genetics and Genomics* 204: 383–396.
- Kuroki, G. W. und Poulton, J. E. (1986) Comparison of kinetic and molecular properties of two forms of amygdalin hydrolase from black cherry (*Prunus serotina* Ehrh.) seeds. *Arch. Biochem. Biophys.* 247: 433–439.
- Lambrix, V., Reichelt, M., Mitchell-Olds, T., Kliebenstein, D. J. und Gershenzon, J. (2001) The *Arabidopsis* epithiospecifier protein promotes the hydrolysis of glucosinolates to nitriles and influences *Trichoplusia ni* herbivory. *Plant Cell* 13: 2793–2807.
- Lämmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the heads of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

- Lazzeri, L., Curto, G., Leoni, O. und Dallavalle, E. (2004) Effects of glucosinolates and their enzymatic hydrolysis products via myrosinase on the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* (Kofoid et White) Chitw. *J. Agric. Food Chem.* 52: 6703–6707.
- Leah, R., Kigel, J., Svendsen, I. und Mundy, J. (1995) Biochemical and molecular characterization of a barley seed beta-glucosidase. *J Biol Chem.* 270(26): 15789-97.
- Leighton, V., Niemeyer, H. M. und Jonsson, L. M. V. (1994) Substrate specificity of a glycosyltransferase and an N-Hydroxylase involved in the biosyntheses of cyclic hydroxamic acids in gramineae. *Phytochemistry* 36: 887-892.
- Li, C. P., Swain, E. und Poulton, J. E. (1992) *Prunus serotina* amygdalin hydrolase and prunasin hydrolase - purification, N-terminal sequencing, and antibody production. *Plant Physiol.* 100: 282–290.
- Li, L., Modolo, L. V., Escamilla-Trevino, L. L., Achnine, L., Dixon, R.A. und Wang, X. (2007) Crystal structure of *Medicago truncatula* UGT85H2--insights into the structural basis of a multifunctional (iso)flavonoid glycosyltransferase. *J Mol Biol.* 370(5): 951-63.
- Li, Y., Baldauf, S., Lim, E. K. und Bowles, D. J. (2001) Phylogenetic analysis of the UDP-glycosyltransferase multigene family of *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 276: 4338-4343.
- Lim, E. K. und Bowles, D.J. (2004) A class of plant glycosyltransferases involved in cellular homeostasis. *EMBO J* 23: 2915–2922.
- Lüning, H. U. und Schlosser, E. (1975) Role of saponins in antifungal resistance. V. Enzymatic activation of avenacosides. 2. *Pflanzenkr. Pflanzenschutz.* 82, 699-703.
- Luzak, A. (2010) Isolierung und Charakterisierung der *Triticum aestivum* DIBOA-Glycosyltransferase BX8. Bachelorarbeit, Technische Universität München.
- Mackenzie, P. I., Owens, I. S., Burchell, B., Bock, K. W., Bairoch, A., Belanger, A., Fournel-Gigleux, S., Green, M., Hum, D. W., Iyanagi, T., Lancet, D., Louisot, P., Magdalou, J., Chowdhury, J. R., Ritter, J. K., Shachter, H., Tephly, T. R., Tipton, K.F. und Nebert, D. W. (1997) The UDP glycosyltransferase gene superfamily: recommended nomenclature update based on evolutionary divergence. *Pharmacogenetics* 7: 255-269.
- Mallikarjuna N., Kranthi K. R., Jadhav D. R., Kranthi S. und Chandra S. (2004) Influence of foliar chemical compounds on the development of *Spodoptera litura* (Fab.) in interspecific derivatives of groundnut. *J Appl Entomol* 128:321–328.
- Marillonnet, S., Thoeringer, C., Kandzia, R., Klimyuk, V. und Gleba Y. (2005) Systemic *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants. *Nat Biotechnol.*23(6): 718-23.
- Martin, R. C., Mok, M. C. und Mok, D. W. (1999b) Isolation of a cytokinin gene, ZOG1, encoding zeatin O-glycosyltransferase from *Phaseolus lunatus*. *Proc Natl Acad Sci* 96(1): 284-9.
- Martin, R. C., Mok, M. C. und Mok, D. W. S. (1999a) A gene encoding the cytokinin enzyme zeatin O-xylosyltransferase of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol.* 120: 553-557.
- Martin, R. C., Mok, M. C., Habben, J. E. und Mok, D. W. (2001) A maize cytokinin gene encoding an O-glycosyltransferase specific to cis-zeatin. *Proc Natl Acad Sci* 98(10): 5922-6.
- Masada, S., Terasaka, K., Oguchi, Y., Okazaki, S., Mizushima, T. und Mizukami, H. (2009) Functional and structural characterization of a flavonoid glucoside 1,6-glycosyltransferase from *Catharanthus roseus*. *Plant Cell Physiol.* 50(8): 1401-15.
- Mazura, P., Fohlerová, R., Brzobohatý, B., Kiran, N. S. und Janda, L. (2006) A new, sensitive method for enzyme kinetic studies of scarce glucosides. *J Biochem Biophys Methods.* 68(1): 55-63.

- McCartera, J. D. und Withersa, G. S. (1994) Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. *Current Opinion in Structural Biology* 4: 885-892.
- Miller, K. D., Guyon, V., Evans, J.N., Shuttleworth, W.A. und Taylor, L.P. (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.* 26: 34011-34019.
- Modolo, L. V., Blount, J. W., Achnine, L., Naoumkina, M. A., Wang, X. und Dixon, R. A. (2007) A functional genomics approach to (iso)flavonoid glycosylation in the model legume *Medicago truncatula*. *Plant Mol Biol.* 64(5): 499-518.
- Morant, A. V., Bjarnholt, N., Kragh, M. E., Kjaergaard, C.H., Jørgensen, K., Paquette, S. M., Piotrowski, M., Imberty, A., Olsen, C. E., Møller, B. L. und Bak, S. (2008b) The beta-glucosidases responsible for bioactivation of hydroxynitrile glucosides in *Lotus japonicus*. *Plant Physiol* 147(3): 1072-91.
- Morant, A. V., Jørgensen, K., Jørgensen, C., Paquette, S. M., Sánchez-Pérez, R., Møller, B. L. und Bak, S. (2008a) beta-Glucosidases as detonators of plant chemical defense. *Phytochemistry* 69(9): 1795-813.
- Morant, M., Bak, S., Møller, B. L. und Werck-Reichhart, D. (2003) Plant cytochromes P450: tools for pharmacology, plant protection and phytoremediation. *Curr. Opin. Biotechnol.* 14: 151-162.
- Morrissey, J. P. und Osbourn, A. E. (1999) Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis. *Microbiol. Mol. Biol. Revs.*, 63: 708-724.
- Mugford, S. T., Qi, X., Bakht, S., Hill, L., Wegel, E., Hughes, R. K., Papadopoulou, K., Melton, R., Philo, M., Sainsbury, F., Lomonossoff, G. P., Roy, A. D., Goss, R. J. und Osbourn, A. (2009) A serine carboxypeptidase-like acyltransferase is required for synthesis of antimicrobial compounds and disease resistance in oats. *Plant Cell* 21(8): 2473-84.
- Napoli, C., Lemieux, C. und Jorgensen R. (1990) Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes *in trans*. *Plant Cell* 4: 279-289.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S. und von Heijne, G. (1997) Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Engineering*, 10: 1-6.
- Nielsen, K. A., Hrmova, M., Nielsen, J. N., Forslund, K., Ebert, S., Olsen, C. E., Fincher, G. B. und Møller, B. L. (2006) Reconstitution of cyanogenesis in barley (*Hordeum vulgare* L.) and its implications for resistance against the barley powdery mildew fungus. *Planta* 223: 1010-1023.
- Nielsen, K. A., Olsen, C. E., Pontoppidan, K. und Møller, B. L. (2002) Leucinederived cyano glucosides in barley. *Plant Physiol* 129: 1066-1075.
- Niemeyer, H. M. (2009) Hydroxamic Acids Derived from 2-Hydroxy-2H-1,4-Benzoxazin-3(4H)-one: Key Defense Chemicals of Cereals. *J. Agric. Food Chem.* 57: 1677-1696.
- Nikus, J., Daniel, G. und Jonsson, L. M. (2001) Subcellular localization of beta-glucosidase in rye, maize and wheat seedlings. *Physiol Plant.* 111(4): 466-472.
- Nikus, J., Esen, A. und Jonsson, L. M. V. (2003) Cloning of a plastidic rye (*Secale cereale*) β -glucosidase cDNA and its expression in *Escherichia coli* *Physiologia Plantarum* 118: 337 - 345.
- Nisius, H. (1988) The stromacentre *in Avena* plastids: an aggregation of β -glucosidase responsible for the activation of oat-leaf saponins, *Planta* 173: 474-481.
- Nomura, T., Ishihara, A., Imaishi, H., Endo, T.R., Ohkawa, H., Iwamura, H., (2002) Molecular characterization and chromosomal localization of cytochrome P450 genes involved in the biosynthesis of cyclic hydroxamic acids in hexaploid wheat. *Mol. Genet. Genomics* 267: 210-217.

- Nomura, T., Ishihara, A., Imaishi, H., Ohkawa, H., Endo, T.R. und Iwamura, H., (2003) Rearrangement of the genes for the biosynthesis of benzoxazinones in the evolution of Triticeae species. *Planta* 217: 776–782.
- Nomura, T., Ishihara, A., Yanagita, R.C., Endo, T.R. und Iwamura, H., (2005) Three genomes differentially contribute to the biosynthesis of benzoxazinones in hexaploid wheat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 16490–16495.
- Offen, W., Martinez-Fleites, C., Yang, M., Kiat-Lim, E., Davis, B. G., Tarlin, C. A., Ford, C. M., Bowles, D. J. und Davies, G. J. (2006). Structure of a flavonoid glucosyltransferase reveals the basis for plant natural product modification. *EMBO J.* 25: 1396-1405.
- Oikawa, A., Ebisui, K., Sue, M., Ishihara, A. und Iwamura, H. (1999) Purification and Characterization of a β -Glucosidase specific for 2,4-Dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one (DIMBOA) Glucoside in Maize. *Z. Naturforsch.* 54c: 181-185.
- Opassiri, R., Pomthong, B., Onkoksoong, T., Akiyama, T., Esen, A. und Ketudat Cairns, J. R. (2006) Analysis of rice glycosyl hydrolase family 1 and expression of Os4bglu12 β -glucosidase *BMC Plant Biochem.* 6: 33.
- Osbourn, A. E. (1996) Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *Plant Cell* 8: 1821-1831.
- Osbourn, A. E. (1999) Antimicrobial phytoprotectants and fungal pathogens; A commentary. *Fung. Genet. Biol* 26: 163-168.
- Osmani, S. A., Bak, S. und Møller, B. L. (2009) Substrate specificity of plant UDP-dependent glycosyltransferases predicted from crystal structures and homology modeling. *Phytochemistry* 70(3): 325-47.
- Osmani, S. A., Bak, S., Imberty, A., Olsen, C. E. und Møller, B. L. (2008) Catalytic key amino acids and UDP-sugar donor specificity of a plant glucuronosyltransferase, UGT94B1: molecular modeling substantiated by site-specific mutagenesis and biochemical analyses. *Plant Physiol.* 148(3): 1295-308.
- Oxtoby, E., Dunn, M. A., Pancoro, A. und Hughes, M. A. (1991) Nucleotide and derived amino acid sequence of the cyanogenic beta-glucosidase (linamarase) from white clover (*Trifolium repens* L.). *Plant Mol. Biol.* 17: 209-219.
- Özden, S., Özden, T., Attila, J., Küçükislamoglu, M. und Okatan, A. (1992) Isolation and identification via high performance liquid chromatography and thin layer chromatography of benzoxazolinone precursors from *Consolida orientalis* flowers. *J. Chromatogr.* 609: 402-406.
- Paquette, S., Moller, B. J. und Bak, S. (2003) On the origin of family 1 plant glycosyltransferases. *Phytochemistry* 62: 399-413.
- Park, W. J.; Hochholdinger, F. und Gierl, M. (2004) Release of the benzoxazinoids defense molecules during lateral-and crown root emergence in *Zea mays*. *J. Plant Physiol.* 161: 981–985.
- Pérez, F. J. und Niemeyer, H. M. (1989a) Reaction of DIMBOA, a resistance factor from cereals, with papain. *Phytochemistry* 28: 1579-1600.
- Pérez, F. J. und Niemeyer, H. M. (1989b) Reaction of DIMBOA with amines. *Phytochemistry* 28: 1831-1834.
- Pérez, F. J. und Ormenoñuñez, J. (2001) Difference in hydroxamic acid content in roots and root exudates of wheat (*Triticum aestivum* L.) and rye (*Secale cereale* L.): possible role in allelopathy. *J. Chem. Ecol.* 17: 1037–1043.
- Pham Vu, T. T. (2009) Isolierung der DIBOA-Glucosid- β -Glucosidase aus *Consolida orientalis*, Bachelorarbeit, Technische Universität München.

Plant Transformation Workshop (2003)

Poulton, J. E. und Møller, B. L., (1993) Glucosinolates. *Meth. Plant Biochem.* 9: 209–237.

Pratt, K., Kumar, P. und Chilton, W. S. (1995) Cyclic hydroxamic acids in dicotyledonous plants. *Biochemical Systematics and Ecology* 23: 781-785.

Qi, X., Bakht, S., Qin, B., Leggett, M., Hemmings, A., Mellon, F., Eagles, J., Werck-Reichhart, D., Schaller, H., Lesot, A., Melton, R. und Osbourn, A. (2006) A different function for a member of an ancient and highly conserved cytochrome P450 family: from essential sterols to plant defense. *Proc Natl Acad Sci* 103:18848-53.

Rask, L., Andreasson, E., Ekblom, B., Eriksson, S., Pontoppidan, B. und Meijer, J., (2000) Myrosinase: gene family evolution and herbivore defense in Brassicaceae. *Plant Mol. Biol.* 42: 93–113.

Reimann, A., Nurhayati, N., Backenköhler, A. und Ober, D. (2004) Repeated evolution of the pyrrolizidine alkaloid-mediated defense system in separated angiosperm lineages. *Plant Cell* 16: 2772-2784.

Ross, J., Li, Y., Lim, E. und Bowles, D. J. (2001) Higher plant glycosyltransferases. *Genome Biol.* 2001: 2(2).

Sahi, S. V., Chilton, M. D. und Chilton, W. S. (1990) Corn metabolites affect growth and virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(10): 3879-83.

Sambrook, J. Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York, USA.

Saunders, J. A. und Conn, E. E. (1978) Presence of Cyanogenic Glucoside Dhurrin in Isolated Vacuoles from Sorghum. *Plant Physiol* 61: 154-157.

Saunders, J. A., Conn, E. E., Lin, C. H. und Stocking, C. R. (1977) Subcellular Localization of Cyanogenic Glucoside of Sorghum by Autoradiography. *Plant Physiol* 59: 647-652.

Sawada, S., Suzuki, H., Ichimaida, F., Yamaguchi, M. A., Iwashita, T., Fukui, Y., Hemmi, H., Nishino, T. und Nakayama, T. (2005) UDP-glucuronic acid:anthocyanin glucuronosyltransferase from red daisy (*Bellis perennis*) flowers. Enzymology and phylogenetics of a novel glucuronosyltransferase involved in flower pigment biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 280: 899-906.

Schullehner, K., Dick, R., Vitzthum, F., Schwab, W., Brandt, W., Frey M. und Gierl, A., (2008) Benzoxazinoid biosynthesis in dicot plants. *Phytochemistry* 69: 2668–2677.

Shao, H., He, X., Achnine, L., Blount, J. W., Dixon, R. A. und Wang, X. (2005) Crystal Structures of a Multifunctional Triterpen/Flavonoid Glycosyltransferase from *Medicago truncatula*. *The Plant Cell* 17: 3141-3154.

Sibbesen, O., Koch, B., Halkier, B. A. und Møller, B. L. (1994) Isolation of the heme-thiolate enzyme cytochrome P-450(Tyr), which catalyzes the committed step in the biosynthesis of the cyanogenic glucoside dhurrin in *Sorghum-bicolor* (L) Moench. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 9740–9744.

Sicker, D., Frey, M., Schulz, M. und Gierl, A. (2000) Role of natural benzoxazinones in the survival strategy of plants. *Int. Rev. Cytol.* 198: 319-346.

Sinnott, M. L. (1990) Catalytic mechanism of enzymic glycosyl transfer *Chem. Rev.* 90: 1171–1202.

Skadhauge B., Thomsen K. K. und von Wettstein D. (1997) The role of the barley testa layer and its flavonoid content in resistance to *Fusarium* infections. *Hereditas* 126: 147-160.

Small, I., Peeters, N., Legeai, F., und Lurin, C. (2004) Predotar: A tool for rapidly screening proteomes for N-terminal targeting sequences. *Proteomics.* 4(6): 1581-90.

- Southern, E. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel-electrophoresis. *J Mol Biol* 98: 503.
- Sue, M., Ishihara, A. und Iwamura, H. (2000) Purification and characterization of a betaglucosidase from rye (*Secale cereale* L.) seedlings. *Plant Sci.* 155: 67–74.
- Sue, M., Yamazaki, K., Yajima, S., Nomura, T., Matsukawa, T., Iwamura, H. und Miyamoto, T. (2006) Molecular and structural characterization of hexameric beta-D-glucosidases in wheat and rye. *Plant Physiol.* 141: 1237–1247.
- Suzuki, H., Takahashi, S., Watanabe, R., Fukushima, Y., Fujita, N., Noguchi, A., Yokoyama, R., Nishitani, K., Nishino, T. und Nakayama, T. (2006) An isoflavone conjugate-hydrolyzing beta-glucosidase from the roots of soybean (*Glycine max*) seedlings – purification, gene cloning, phylogenetics, and cellular localization. *J. Biol. Chem.* 281: 30251–30259.
- Tanaka, Y., Yonekura, K., Fukuchi-Mizutani, M., Fukui, Y., Fujiwara, H., Ashikari, T. und Kusumi, T. (1996) Molecular and biochemical characterization of three anthocyanin synthetic enzymes from *Gentiana triflora*. *Plant Cell Physiol.* 37: 711-716.
- Tartoff, K. und Hobbs, T. (1987) Improved media for growing plasmid and cosmid clones. *BRL Focus* 9: 12.
- Taylor, L. P. und Jorgensen R. (1992) Conditional male fertility in chalcone synthase-deficient petunia. *J Hered* 83: 11–17.
- Thangstad, O. P., Evjen, K. und Bones, A. (1991) Immunogold-EM localization of myrosinase in brassicaceae. *Protoplasma* 161: 85–93.
- Thangstad, O. P., Gilde, B., Chadchawan, S., Seem, M., Husebye, H., Bradley, D. und Bones, A. M. (2004) Cell specific, cross-species expression of myrosinases in *Brassica napus*, *Arabidopsis thaliana* and *Nicotiana tabacum*. *Plant Mol Biol.* 54(4): 597-611.
- Thayer, S. S. und Conn, E. E. (1981) Subcellular localization of dhurrin beta-glucosidase and hydroxynitrile lyase in the mesophyll cells of sorghum leaf blades. *Plant Physiol.* 67: 617–622.
- Thorby, G., Fourrier, N. und Warren, G. (2004) The SENSITIVE TO FREEZING2 gene, required for freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*, encodes a beta-glucosidase. *Plant Cell* 16(8): 2192-203.
- Tohge, T., Nishiyama, Y., Hirai, M. Y., Yano, M., Nakajima, J., Awazuhara, M., Inoue, E., Takahashi, H., Goodenowe, D. B., Kitayama, M., Noji, M., Yamazaki, M. und Saito, K. (2005) Functional genomics by integrated analysis of metabolome and transcriptome of *Arabidopsis* plants over-expressing an MYB transcription factor. *Plant J.* 42: 218-235.
- van Larebeke, N., Engler, G., Holsters, M., van den Elsacker, S., Zaenen, J., Schilperoort, R. A. und Schell, J. (1974) Large plasmid in *Agrobacterium fumefaciens* essential for crown gall-inducing ability. *Nature* 252: 169-170.
- Vanetten, H., Mansfield, J. W., Bailey, J. A. und Farmer, E. E. (1994) Two classes of plant antibiotics: Phytoalexins versus phytoanticipins. *Plant Cell* 6:1191-1192.
- Veach, Y. K., Martin, R. C., Mok, D. W., Malbeck, J., Vankova, R. und Mok, M. C. (2003) O-glucosylation of cis-zeatin in maize. Characterization of genes, enzymes, and endogenous cytokinins. *Plant Physiol.* 131(3): 1374-80.
- Verdoucq, L., Moriniere, J., Bevan, D. R., Esen, A., Vasella, A., Henrissat, B. und Czjzek, M. (2004) Structural determinants of substrate specificity in family 1 betaglucosidases – novel insights from the crystal structure of sorghum dhurrinase-1, a plant beta-glucosidase with strict specificity, in complex with its natural substrate. *J. Biol. Chem.* 279: 31796–31803.

- Vogt, T. und Jones, P. (2000) Glycosyltransferases in plant natural product synthesis: characterization of a supergene family. *TRENDS in Plant Science* 5: 380-386.
- Vogt, T., Zimmermann, E., Grimm, R., Meyer, M. und Stack, D. (1997) Are the characteristics of betanidin glucosyltransferases from cell-suspension cultures of *Dorotheanthus bellidiformis* indicative of their phylogenetic relationship with Flavonoid glucosyltransferases? *Planta* 203: 349-361.
- von Rad, U., Hüttl, R., Lottspeich, F., Gierl, A. und Frey, M. (2001) Two glycosyltransferases are involved in detoxification of benzoxazinoids in maize. *The Plant Journal* 28: 633-642.
- Walkerpeach, C. R. und Velten, J. (1994) *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plant cells: cointegrate and binary vector systems. In: Gelvin SB, Schilperoort RA (eds) *Plant molecular biology manual*, 2nd edn. Kluwer, Dordrecht, B1:1-19.
- Wang, Q., Trimbur, D., Graham, R., Warren, R. A. und Withers, S. G. (1995) Identification of the acid/base catalyst in *Agrobacterium faecalis* beta-glucosidase by kinetic analysis of mutants. *Biochemistry* 34(44): 14554-62.
- Wei, S., Marton, I., Dekel, M., Shalitin, D., Lewinsohn, E., Bravdo, B.A. und Shoseyov, O. (2004) Manipulating volatile emission in tobacco leaves by expressing *Aspergillus niger* beta-glucosidase in different subcellular compartments. *Plant Biotechnol. J.* 2: 341-350.
- Werck-Reichhart, D., Bak, S. und Paquette, S. (2002) Cytochromes P450. In *The Arabidopsis Book*, C.R. Somerville and E.M. Meyerowitz, eds (Rockville, MD: American Society of Plant Biologists), doi/10.1199/tab.0009.
- Wink, M. (2003) Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry* 64: 3-19.
- Withers, S. G., Warren, R. A. J., Street, I. P., Rupitz, K., Kempton, J. B. und Aebersold, R. (1990) Unequivocal demonstration of the involvement of a glutamate residue as a nucleophile in the mechanism of a retaining glycosidase. *Journal of the American Chemical Society* 112: 5887-5889.
- Wu, H. W.; Haig, T.; Pratley, J.; Lemerle, D.; An, M. (2000) Distribution and exudation of allelochemicals in wheat *Triticum aestivum*. *J. Chem. Ecol.* 26: 2141-2154.
- Wu, H. W.; Haig, T.; Pratley, J.; Lemerle, D.; An, M. (2001) Allelochemicals in wheat (*Triticum aestivum* L.): Production and exudation of 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one. *J. Chem. Ecol.* 27: 1691-1700.
- Xu, W., Bak, S., Decker, A., Paquette, S. M., Feyereisen, R. und Galbraith, D. W. (2001) Microarray-based analysis of gene expression in very large gene families: the cytochrome P450 gene superfamily of *Arabidopsis thaliana*. *Gene* 272: 61-74.
- Xu, Z., Escamilla-Trevino, L. L., Zeng L., Lalgondar, M., Bevan, D. R., Winkel, B. S. J., Mohamed, A., Cheng, C.-L., Shih, M.-C., Poulton, J. E. und Esen, A. (2004) Functional genomic analysis of *Arabidopsis thaliana* glycoside hydrolase family 1. *Plant Mol. Biol.* 55: 343-367.
- Yoshihara, N., Imayama, T., Fukuchi-Mizutani, M., Okuhara, H., Tanaka, Y., Ino, I. und Yabuya, T. (2005) cDNA cloning and characterization of UDP-glucose: Anthocyanidin 3-O-glucosyltransferase in *Iris hollandica*. *Plant Sci.* 169:496-501
- Zhou, J. M., Hartmann, S., Shepherd, B. K. und Poulton, J. E. (2002) Investigation of the microheterogeneity and aglycone specificity-conferring residues of black cherry prunasin hydrolases. *Plant Physiol.* 129: 1252-1264.
- Zúñiga, G. E., Argandoña V. H., Niemeyer H. M. und Corcuera, L. J. (1983) Hydroxamic acid content in wild and cultivated Gramineae. *Phytochemistry* 22: 2665-2668.

7 Anhang

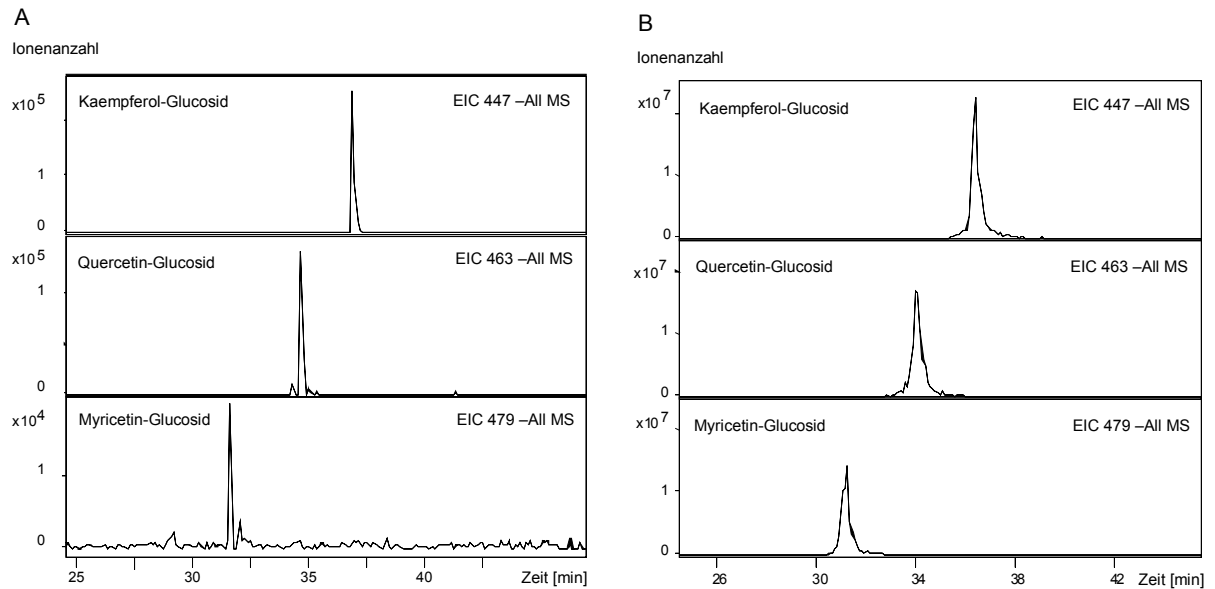


Abbildung 26: LC-MS-Analyse der Glucosylierung der Flavonole Kaempferol, Quercetin und Myricetin durch CoGT (A) und LgGT (B).

```

ZmBX8      MAAS-----CGGRVVVFPFPFQGHFNPVMRLARALHARGVGITVFHTAG-----AR 46
ZmBX9      MASSRTGAGAGAGGRVVVFPFPFQGHFNPVMRLARALHARGLAITVFHSG----- 50
CoBX8      -----MASSPKTPHIVCVPAQAQHINPMFKLAKLFHSGFYITVFHSEFSYQRLQAS 54
AtCOGT2    --MGSQI IHNSQKPHVVCVPPAQAQHINPMRVAKLLHARGFYVTFVNTVYNHNRFLRSR 58
SbHMNGT    --MG-SNAPPPPTPHVVLVPPGQGHVAPLMQLARLLHARGARVTFVYTQYNYRLLRAK 57
pLgBX8-1   -----MEAKNGRKAHVLAAGPAQGHVKPLMKLCRQIAKHGLKVTLVNLQS----- 46
           ::: .. * ** . *::: : : * * ..

ZmBX8      APDPADYPAD----YRFVVPVVEVAPELMAS-EDIAAIVTALNAACEAPFRDRLSALLSA 101
ZmBX9      ALDPADYPAD----YRFVPVTVEADPKLLAS-EDIAAIVTTLNASCDAFFRARLSALLAA 105
CoBX8      ALDHLKGLNN----FRFETIPDGLPENKRGVSDVPELCKSMRNTCADPFRSLILKLN-- 108
AtCOGT2    GSNALDGLPS----FRFESIADGLPETDMDATQDITALCESTMKNCLAPFRELLQRIN-- 112
SbHMNGT    GEAAVRPPATSSARFRIEVIDDGLSLVSPQ--NDVGLVDLSLRKNCLHPPFRALLRRLGQE 115
pLgBX8-1   VHDKLVGEED----NIVQMVSIPDVPIEEDKDDPFKKMKNLRKTMPESLKDLIQGINSS 101
           . : : . * : : :

ZmBX8      ADGEAGEAGGRVRCVLTDVSWDAVLSAARGLGVPALGVMTASAATFRVYMAVRTLVDKGY 161
ZmBX9      EGRDS-----VRCVFTDVSWNAVLTASSDLGVPALGMMTASAASLRDYMAVRTLIDKGY 159
CoBX8      -SSSDVPP---VTCIVADVAMDFTLQVSEELGPPVVLFFTTLSGCGVLGYMHYGELLERGY 164
AtCOGT2    -AGDNVPP---VSCIVSDGCMSTFLDVAEELGVPEVLFWTTSGCAFLAYLHFYLFIEKGL 168
SbHMNGT    VEGQDAPP---VTCVVGDVVMTFAAAAAREAGIPEVQFFFTASACGLLGYLHYGELVERGL 172
pLgBX8-1   SNPEEKIG-----FVIADVMEVWLMDTAAEMGAEPILFSPTSAAFRAMMSRIPALLEDGM 156
           . : * : * : . * .. : : *

```

<i>ZmBX8</i>	LPVREE-----RKDDVAELPPYRVKDL--LRHETCDLEEFADLLGRVIAAARLS	209
<i>ZmBX9</i>	LPVKEE-----RKEDVPPELPPYRVKDL--LRVDTSDLEEFALLARTVTAARRA	207
<i>CoBX8</i>	FPLREESFLSNGYLD-TEIDWI PAMKGI RLKDLPSFLRTTDPDDIMFNCKIIEVNSAFKA	223
<i>AtCOGT2</i>	CPLKDESYLTKEYLEDTVIDFIPTMKNVKLKDIPSFIRTTNPDDVMISFALRETERAKRA	228
<i>SbHMNGT</i>	VPF RDASLLADDDYLDTPLEWVPGMSHMRLRDMPTFCRTTDPDDVMVSATLQQMESAAGS	232
<i>pLgBX8-1</i>	LDLNGN---IEKCEKITLSDDIPAWDKDEFWS--FPHDPKTQKSFFDLINPDRGKI IQP	211
	.. : : . . :	
<i>ZmBX8</i>	SGLIFHTFPFIEAGTLGEIRDDMSVPVYAVAPLNKLVPAATASLHG-----EVQADRG	262
<i>ZmBX9</i>	SGLIFNTFPLIETDTLAEIHKALSVPVFAVAPLNKLVPTATASLHG-----VVQADRG	260
<i>CoBX8</i>	KGVLNFTDLDLEQEVLDIAKSKIP-QLYTI GPLSMLCDHMLQPDSKLCES--LWEEDTS	280
<i>AtCOGT2</i>	SAIILNFTDLDLEHDVHAMQSILP-PVYSVGPLHLLANREIEEGSEIGMSSNLWKEEME	287
<i>SbHMNGT</i>	KALILNTLYELEKDVVDALAAFFP-PIYTVGPLAEVIASSDSASAGLAAMDISIWQEDTR	291
<i>pLgBX8-1</i>	KLHLINTCYELES PACDLRPNLLP-----VGPLLEMNNSCN-----FYPEDES	254
	. : : * : * . : . : * * :	
<i>ZmBX8</i>	CLRWLDAQRARSVLYVSFGSMAAMPHEFVELAWGLADAGRPFVWVVRPNLIRGFESGAL	322
<i>ZmBX9</i>	CLQWLDTQQPGSVLYVSFGSMAAMPHEFVELAWGLADSKRPFVWVVRPNLIRGFESGAL	320
<i>CoBX8</i>	CLEWLQEKDKPSVLYVNI GSLATMTSQQLGEFAWGLANS MCPFLWVIRPDILDRASGIVS	340
<i>AtCOGT2</i>	CLDWLDTKTQNSVIYINFGSITVLSVKQLVEFAWGLAGSGKEFLWVIRPDLVAGEEAMVP	347
<i>SbHMNGT</i>	CLSWLDGKPPAGSVVYVNFSGMAVMTAAQAREFALGLASCSPFLWVKRPDVVEGEEVLLP	351
<i>pLgBX8-1</i>	CLSWLDTKLPESVIYVSFGSIAVVSQQQLDELALGLELSGRAFLWVVRPDLVNGLRVYP	314
	** * : : * : * : : * : : : : : * : * * * . * : * * * : : :	
<i>ZmBX8</i>	PDGVEDRVRGRGVVVS WAPQEEVLAHPAVGGFFTHCGWNSTVEAVSEGVPMICHPRHGDQ	382
<i>ZmBX9</i>	PDGVEDEVRRGIVVT WAPQEEVLAHPAVGGFLTHNGWNSTVEAISEGVPMVCCPRHGDQ	380
<i>CoBX8</i>	EDYKKEIG-GRLLVSWCQQEKVLKHP SIGGFLTHCGWNSTLESLSCEGVPMICWPFFAEQ	399
<i>AtCOGT2</i>	PDFLMETK-DRSMLASWCPQEKVLSHPAIGGFLTHCGWNSILELSCEGVPMVCPFFADQ	406
<i>SbHMNGT</i>	EALLDEVARGRGLVVP WCPQAAVLKHAAVGLFVSHCGWNSLLEATAAGQPVLAWPCHGEQ	411
<i>pLgBX8-1</i>	DGFLERVS-GIGMIVE WAPQERVL FHPVACFLTHCGWNSILEGLSKGVSFLCWPFFMDQ	373
	. . . : . * . * * * * : : . * : * * * * : * . . * * : *	
<i>ZmBX8</i>	YGNARYVCHVWVKVTEVAGDQLERGEIKAAIDRLMGGSSEEGEGIRKRMNELKIAADKGI-	441
<i>ZmBX9</i>	FGNMRVYCDVWVKVTELVEQLERGVKAAIDRLFG-TKEGEEIKERMKEFKIAAAKGIG	439
<i>CoBX8</i>	QTNCFYICNKWGI GMEID-FDVKRVEIGMMVKELMK-GEKGLEMRNKVEDLMSKAIKATT	457
<i>AtCOGT2</i>	QMNCKFCDEWDVGI EIG-GDVKREEVEAVVRELM-DGKGGKMKREKAVEWQRLAEKATE	464
<i>SbHMNGT</i>	TTNCRQLCEVWNGAQLP-REVESGAVARLVREMMV-GDLGKEKRAKAAEWKAAAEAAAR	469
<i>pLgBX8-1</i>	FHNQNYICDKWEAGLRVD-GDGS GIRTRNEIKEKIGMMFCNGDLKANAMRLKEIFAKTVC	432
	* * . * * : : . : . :	
<i>ZmBX8</i>	-----DESAG--SDLTNLVHLINSY-	459
<i>ZmBX9</i>	IGVDVDETTSPRTDLTDLVDLIKSF-	464
<i>CoBX8</i>	PG--GSSHTNFEMLMEDVAKW-----	476
<i>AtCOGT2</i>	HKL-GSSVMNFETVVSKFLLGQKSQD	489
<i>SbHMNGT</i>	KG--GASWRNVERVVNDLLL VG GKQ-	492
<i>pLgBX8-1</i>	EG--GSSYNNFERFIDYLRK-----	450
	. . : .	

Abbildung 27: Alignment von *CoBX8* und *pLgBX8* (Allel 1) mit verschiedenen UGTs der Familie 1. *ZmBX8*: Benzoxazinoid Glucosyltransferase aus *Z. mays* (Q8W2B7), *ZmBX9*: Benzoxazinoid Glucosyltransferase aus *Z. mays* (Q8W2B6), *CoBX8*: Benzoxazinoid Glucosyltransferase aus *C. orientalis*, *AtCOGT2*: Cytokinin-O-Glucosyltransferase 2 aus *A. thaliana* (Q9SK82), *SbHMNGT*: UDPG-p-Hydroxymandelonitril Glucosyltransferase aus *S. bicolor* (Q9SBL1), *pLgBX8-1*: Allel 1 der putativen Benzoxazinoid Glucosyltransferase aus *L. galeobdolon*. *, identische Aminosäure; :, ähnliche Aminosäure. Das konservierte PSPG-Motiv von pflanzlichen UGTs der Familie 1 ist grau hervorgehoben, zwei weitere hoch konservierte Aminosäuren (N: >90%; G: >80%) sind ebenfalls grau hervorgehoben (Hughes und Hughes, 1994; Paquette *et al.*, 2003; Gachon *et al.*, 2005).

ZmGLU1	KETPLPMEALNDYKRLDYIQRHIATLKESIDLGSNVQGYFAWSLLDNFEW	FAGFTE	RG	474
SbDHUR1	GD--LPKPVALEDHTRLDYIQRHLSVLKQSIDLGADVVRGYFAWSLLDNFEW	SSGYTE	RF	470
ScGLU	DP---EMPDPDLDWKRLDYLRHISAVKDAIDQGADVVRGHFTWGLIDNFEW	SSGYSS	RF	471
TaGLU1b	DE---SMPDPLDDWKRLDYLRHISAVKDAIDQGADVVRGHFTWGLIDNFEW	SLGYSS	RF	472
CoGLU1	DT--LSLKEKLNDRVVDYHDKHLKSVLRRAIKEGVDRGYFAWSFLDNFEW	ADGYTV	RF	468
CoGLU2	ST--LSLEEALTDPMRIDYHRRHLSFALRAIKEGVNIKGYFAWSFLDNFEW	VDGYTV	RF	455
	* * *:* ** :*	:*	* :*:**:*:*****	*: *:*
ZmGLU1	IVYVDRNNNCTRYMKESAKWLKEFN-TAKKP-----SKKILTPA----			512
SbDHUR1	IVYVDRENGCERTMKRSARWLQEFNGAAKKVE----NNKILTPAGQLN			514
ScGLU	LVIYDKEDGNKRKLKKSAAKWFNFNSVVPKTLKTTNNNATVTAS-VSV			518
TaGLU1b	LVIYDKNDGNKRKLKKSAAKWFNSKFNVPKPLKTTNNNATMTAASVSV			520
CoGLU1	LNIVGFKT-MRRYPKRSANWFKKFLH-----			494
CoGLU2	LNIVDFKT-MKRYPKHASIWFKKFLVQ-----			481
	: *:. : * *:.: *:			

Abbildung 28: Alignment von CoGLU1 und CoGLU2 mit verschiedenen β -Glucosidasen der Familie 1. ZmGLU1: Benzoxazinoid-Glucosid β -Glucosidase aus *Z. mays* (P49235), SbDHR1: Dhurrin β -Glucosidase aus *S. bicolor* (Q41290), ScGLU: Benzoxazinoid-Glucosid β -Glucosidase aus *S. cereale* (Q9FYS3), TaGLU1b: Benzoxazinoid-Glucosid β -Glucosidase aus *T. aestivum* (Q1XH05), CoGLU1: Benzoxazinoid-Glucosid β -Glucosidase 1 aus *C. orientalis*. CoGLU2: Benzoxazinoid-Glucosid β -Glucosidase 2 aus *C. orientalis**, identische Aminosäure; :, ähnliche Aminosäure. Die in GH1-Enzymen konservierten Motive TFNEP und ITENG sind grau hervorgehoben, die darin enthalten Glutaminsäurerest, die die katalytischen Reste darstellen sind dunkelgrau hervorgehoben. Aminosäurereste der Enzyme ZmGLU1, SbDHR1, ScGLU und TaGLU1a, die die Aglucon-Bindetasche ausbilden sind blau hervorgehoben (Czjzek *et al.*, 2000; Nikus *et al.*, 2003; Sue *et al.*, 2006; Verdoucq *et al.*, 2004).

AgSUSY: *Alnus glutinosa* putative Sucrose Synthase (P49034); **AtCNGT1**: *A. thaliana* Cytokinin-N-Glucosyltransferase 1 (Q9FI99); **AtCNGT2**: *A. thaliana* Cytokinin-N-Glucosyltransferase 2 (Q9FIA0); **AtCoGT1**: *A. thaliana* Cytokinin-O-Glucosyltransferase 1 (Q9ZQ99); **AtCoGT2**: *A. thaliana* Cytokinin-O-Glucosyltransferase 2 (Q9SK82); **AtCoGT3**: *A. thaliana* Cytokinin-O-Glucosyltransferase 3 (Q9ZQ94); **AtFOGT1**: *A. thaliana* Flavonol-3-O-Glycosid-7-O-Glucosyltransferase 1 (Q9ZQ95); **AtFORT**: *A. thaliana* Flavonol-3-O-Glucosid L-Rhamnosyltransferase (Q9S9P6); **AtHQGT**: *A. thaliana* putative Hydroquinon Glucosyltransferase (Q9M156); **AtHTGT**: *A. thaliana* N-hydroxythioamide S- β -Glucosyltransferase (O48676); **AtIABGT1**: *A. thaliana* Indol-3-Essigsäure β -Glucosyltransferase 1 (Q9LR44); **AtIABGT2**: *A. thaliana* Indol-3-Essigsäure β -Glucosyltransferase 2 (Q9ZVY5); **AtSUS1**: *A. thaliana* putative Sucrose Synthase 1 (P49040); **AtSUS2**: *A. thaliana* putative Sucrose Synthase 2 (Q00917); **AtUGAGT**: *A. thaliana* Anthocyanin 5-O-Glucosyltransferase (Q0WW21); **AtUPTP**: *A. thaliana* UDP-Glucosyltransferase At1g05670 (P0C7P7); **BvSPS**: *Beta vulgaris* putative Sucrosephosphat Synthase (P49031); **BvSUSY**: *B. vulgaris* putative Sucrose Synthase (Q42652); **CoGT**: *Consolida* Flavonoid-Glucosyltransferase (HM559224); **CoBX8**: *C. orientalis* DIBOA Glucosyltransferase (HM559229); **CsSPS1**: *Craterostigma plantagineum* Sucrosephosphat Synthase 1 (O04932); **CsSPS2**: *C. plantagineum* Sucrosephosphat Synthase 2 (O04933); **CuLGT**: *Citrus unshiu* Limonoid UDP-Glucosyltransferase (Q9MB73); **CuSPS1**: *C. unshiu* Sucrosephosphat Synthase 1 (O22060); **DcSUS1**: *Daucus carota* Sucrose Synthase Isoform 1 (P49035); **DcSUS2**: *D. carota* putative Sucrose Synthase Isoform 2 (O49845); **FaGT6**: *Fragaria ananassa* Flavonoid 3-O-Glucosyltransferase (Q2V6K0); **GmSUSY**: *Glycine max* Sucrose Synthase (P13708); **Gt3GT**: *Gentiana triflora* Anthocyanidin 3-O-Glucosyltransferase (Q96493); **Gt3'GT**: *G. triflora* Anthocyanin 3'-O- β -Glucosyltransferase (Q8H0F2); **HvBz1**: *H. vulgare* putative Anthocyanidin 3-O-Glucosyltransferase (P14726); **HvSUS1**: *H. vulgare* Sucrose Synthase 1 (P31922); **HvSUS2**: *H. vulgare* Sucrose Synthase 2 (P31923); **Ih3GT**: *Iris hollandica* Anthocyanidin 3-O-Glucosyltransferase (Q5KTF3); **LgGT**: *L. galebodolon* Flavonoid-Glucosyltransferase (HM559227); **LgBX8**: *L. galebodolon* putative DIBOA Glucosyltransferase (HM559228); **MsSUSY**: *Medicago sativa* putative Sucrose Synthase (O65026); **OsiSPS**: *O. sativa* subsp. indica putative Sucrosephosphat Synthase (A2WYE9); **OsjSPS**: *O. sativa* subsp. japonica putative Sucrosephosphate Synthase (Q0JGK4); **OsjSUS1**: *O. sativa* subsp. japonica putative Sucrose Synthase 1: (P31924); **OsjSUS2**: *O. sativa* subsp. japonica putative

Sucrose Synthase 2 (P30298); **OsjsSUS3**: *O. sativa* subsp. *japonica* putative Sucrose Synthase 3 (Q43009); **PaSUSY**: *Phaseolus aureus* putative Sucrose Synthase (Q01390); **PhPGT8**: *Petunia hybrida* Anthocyanidin 3-O-Glucosyltransferase (Q9SBQ3); **PIZOG**: *Phaseolus lunatus* Zeatin O-Glucosyltransferase (Q9ZSK5); **PsSUS2**: *Pisum sativum* putative Sucrose Synthase 2 (O24301); **PsUPTG**: *P. sativum* putative α -1,4-Glucan-Protein Synthase (O04300); **RhGT1**: *Rosa hybrid* cultivar Anthocyanidin 5,3-O-Glucosyltransferase (Q4R1I9); **RshHQT**: *Rauvolfia serpentina* Hydroquinone Glucosyltransferase (Q9AR73); **SbcCISZOG1**: *Sorghum bicolor* putative cis-Zeatin O-Glucosyltransferase (Q6JAH0); **SbHMNGT**: *S. bicolor* Cyanohydrin β -Glucosyltransferase (Q9SBL1); **SISUSY**: *Solanum lycopersicum* putative Sucrose Synthase (P49037); **SoSPS**: *Spinacia oleracea* Sucrosephosphate Synthase (P31928); **StSPS**: *Solanum tuberosum* Sucrosephosphat Synthase (Q43845); **StSUS1**: *S. tuberosum* putative Sucrose Synthase (P10691); **StSUS2**: *S. tuberosum* putative Sucrose Synthase (P49039); **StUPTG1**: *S. tuberosum* α -1,4-glucan-protein Synthase 1 (Q9SC19); **StUPTG2**: *S. tuberosum* α -1,4-glucan-protein Synthase 2 (Q8RU27); **TaBX8**: *Triticum aestivum* Benzoxazinoid-Glucosyltransferase (HM559230); **TgSUS1**: *Tulipa gesneriana* putative Sucrose Synthase 1 (Q41608); **TgSUS2**: *T. gesneriana* putative Sucrose Synthase 2 (Q41607); **UGT78D2**: *A. thaliana* Flavonoid 3-O-Glucosyltransferase (Q9LFJ8); **VfSPS**: *Vicia faba* putative Sucrose-phosphate Synthase (Q43876); **VfSUSY**: *V. faba* Sucrose Synthase (P31926); **VvGT1**: *Vitis vinifera* Anthocyanidin 3-O-Glucosyltransferase 2 (P51094); **ZmBX8**: *Z. mays* Benzoxazinoid Glucosyltransferase (Q8W2B7); **ZmBX9**: *Z. mays* Benzoxazinoid Glucosyltransferase (Q8W2B6); **ZmBz1**: *Z. mays* Anthocyanidin 3-O-Glucosyltransferase (P16166); **ZmCISZOG1**: *Z. mays* Cis-Zeatin O-Glucosyltransferase 1 (Q93XP7); **ZmCISZOG2**: *Z. mays* Cis-Zeatin O-Glucosyltransferase 2 (Q8RXA5); **ZmlABGT**: *Z. mays* Indol-3-Essigsäure β -Glucosyltransferase (Q41819); **ZmSPS**: *Z. mays* Sucrosephosphat Synthase (P31927); **ZmSUS1**: *Z. mays* Sucrose Synthase 1 (P04712); **ZmSUS2**: *Z. mays* Sucrose Synthase 2 (P49036); **ZmUPTG**: *Z. mays* α -1,4-Glucan-Protein Synthase (P80607).

Abbildung 29: Eingesetzte Sequenzen für den UGT-Stammbaum: Abkürzung, Herkunft und Funktion der UGTs.

AsGLU1 und **AsGLU2**: *Avena sativa* Avenacosid β -Glucosidase 1 und 2 (Q38786 und Q9ZP27); **AtBGL03**: *A. thaliana* β -Glucosidase 3 (O65458); **AtBGL04**: *A. thaliana* β -Glucosidase 4 (Q9ZUI3); **AtBGL07**: *A. thaliana* β -Glucosidase 7 (Q9LZJ1); **AtBGL08**: *A. thaliana* β -Glucosidase 8 (Q67XN2); **AtBGL09**: *A. thaliana* β -Glucosidase 9 (Q9STP4); **AtBGL10**: *A. thaliana* β -Glucosidase 10 (Q93ZI4); **AtBGL11**: *A. thaliana* β -Glucosidase 11 (B3H5Q1); **AtBGL12**: *A. thaliana* β -Glucosidase 12 (Q9FH03); **AtBGLU13**: *A. thaliana* β -Glucosidase 13 (Q9LU02); **AtBGLU15**: *A. thaliana* β -Glucosidase 15 (O64879); **AtBGLU16**: *A. thaliana* β -Glucosidase 16 (Q9M1D0); **AtBGLU17**: *A. thaliana* β -Glucosidase 17 (O64882); **AtBGLU18**: *A. thaliana* β -Glucosidase 18 (Q9SE50); **AtBGLU19**: *A. thaliana* β -Glucosidase 19 (Q9LIF9); **AtBGLU20**: *A. thaliana* β -Glucosidase 20 (Q84WV2); **AtBGLU21**: *A. thaliana* β -Glucosidase 21 (Q9C525); **AtBGLU22**: *A. thaliana* β -Glucosidase 22 (Q9C8Y9); **AtBGLU23**: *A. thaliana* β -Glucosidase 23 (Q9LKR7); **AtBGLU25**: *A. thaliana* β -Glucosidase 25 (O82772); **AtBGLU27**: *A. thaliana* β -Glucosidase 27 (Q9M1D1); **AtBGLU28**: *A. thaliana* β -Glucosidase 28 (Q4V3B3); **AtBGLU29**: *A. thaliana* β -Glucosidase 29 (Q8GXT2); **AtBGLU30**: *A. thaliana* β -Glucosidase 30 (Q9M1C9); **AtBGLU31**: *A. thaliana* β -Glucosidase 31 (Q9FLU9); **AtBGLU32**: *A. thaliana* β -Glucosidase 32 (Q9FLU8); **AtBGLU33**: *A. thaliana* β -Glucosidase 33 (O48779); **AtBGLU40**: *A. thaliana* β -Glucosidase 40 (Q9FZE0); **AtBGLU41**: *A. thaliana* β -Glucosidase 41 (Q9FIU7); **AtBGLU42**: *A. thaliana* β -Glucosidase 42 (Q9FIW4); **AtBGLU44**: *A. thaliana* β -Mannosidase (Q9LV33); **AtBGLU45** und **AtBGLU46**: Monolignol-Glucosid- β -Glucosidasen (O80689 und O80690); **AtBGLU47**: *A. thaliana* β -Glucosidase 47 (Q9SVS1); **AtMyr1**: *A. thaliana* Myrosinase 1 (TGG1; P37702); **AtMyr2**: *A. thaliana* Myrosinase 2 (TGG2; Q9C5C2); **AtMyr4**: *A. thaliana* Myrosinase 4 (TGG4; Q8GRX1); **AtMyr5**: *A. thaliana* Myrosinase 5 (TGG5; Q3ECS3); **AtPen2**: *A. thaliana* β -Glucosidase 26 (O64883); **AtSRF2**: *A. thaliana* β -Glucosidase-like SFR2 (Q93Y07); **BnMYR1**: *Brassica napus* Myrosinase (Q00326); **CoGLU1**: *C. orientalis* DIBOA-Glucosid β -Glucosidase (HM559225); **DcBGLU1**: *Dalbergia cochinchinensis* Dalcochinin β -Glucosidase/ β -Fucosidase (Q9SPK3); **GmMAN**: *Glycine max* putative β -Mannosidase (CAW48598); **HbLIN**: *Hevea brasiliensis* linamarase (Q7Y073); **HvMAN**: *H. vulgare* β -Mannosidase (B5A496); **LjBGD2** und **LjBGD4**: *Lotus japonicus* Hydroxynitrile β -Glucosidase D2 und D4 (B2ZUU1 und B2ZUU0); **LjBGD7**: *L. japonicus* β -Glucosidase D7 (B2ZUU2); **MeLIN**: *Manihot esculenta* Linamarase (Q41172); **MtBGLUG2** und **MtBGLUG4**: *Medicago truncatula* β -Glucosidase G2 und G4 (A8TVQ5 und A8TVR1); **OsBGL01**: *O. sativa* β -Glucosidase 1 (Q5QMT0); **OsBGL02**: *O. sativa* β -Glucosidase 2 (B7F8N7); **OsBGL03**: *O. sativa* β -Glucosidase 3 (Q8RZL1); **OsBGL04**: *O. sativa* β -Glucosidase 4

(Q5N863); **OsBGL05**: *O. sativa* β -Glucosidase 5 (Q5JK35); **OsBGL06**: *O. sativa* β -Glucosidase 6 (Q8L7J2); **OsBGLU07**: *O. sativa* β -Glucosidase 7 (Q42975); **OsBGL08**: *O. sativa* β -Glucosidase und β -D-Mannosidase (Q75I94); **OsBGL10**: *O. sativa* β -Glucosidase 10 (Q7F9K4); **OsBGL11**: *O. sativa* β -Glucosidase 11 (Q7XKV5); **Os4bglu12**: *O. sativa* Exoglucanase (Q7XKV4); **OsBGLU13**: *O. sativa* β -Glucosidase 13 (Q7XKV2); **OsBGLU14**: *O. sativa* β -Glucosidase 14 (Q7XPY7); **OsBGLU16**: *O. sativa* β -Glucosidase 16 (Q7XSK2); **OsBGLU18**: *O. sativa* β -Glucosidase 18 (Q7XSK0); **OsBGLU19**: *O. sativa* β -Glucosidase 19 (Q0DIT2); **OsBGLU20**: *O. sativa* β -Glucosidase 20 (B9FHH2); **OsBGLU21**: *O. sativa* Scopolin β -Glucosidase (Q60DY1); **OsBGLU22**: *O. sativa* β -Glucosidase 22 (Q60DX8); **OsBGLU23**: *O. sativa* β -Glucosidase 23 (Q6L597); **OsBGLU24**: *O. sativa* β -Glucosidase 24 (Q5Z9Z0); **OsBGLU25**: *O. sativa* β -Glucosidase 25 (Q0DA21); **OsBGLU26**: *O. sativa* β -Glucosidase 26 (A3BMZ5); **OsBGLU27**: *O. sativa* β -Glucosidase 27 (Q84YK7); **OsBGLU28**: *O. sativa* β -Glucosidase 28 (Q7EXZ4); **OsBGLU29**: *O. sativa* β -Glucosidase 29 (A3C053); **OsBGLU30**: *O. sativa* β -Glucosidase 30 (Q0J0N4); **OsBGLU31**: *O. sativa* β -Glucosidase 31 (B7F7K7); **OsBGLU32**: *O. sativa* β -Glucosidase 32 (Q0J0G2); **OsBGLU33**: *O. sativa* β -Glucosidase 33 (Q0J0G1); **OsBGLU34**: *O. sativa* β -Glucosidase 34 (Q339X2); **OsBGLU35**: *O. sativa* β -Glucosidase 35 (Q53NF0); **OsBGLU38**: *O. sativa* β -Glucosidase 38 (Q2QSR8); **OsMAN**: *O. sativa* putative β -Mannosidase (EAY74244); **OsSRF2**: *O. sativa* β -Glucosidase-like SFR2 (Q8L6H7); **PcCBG**: *Pinus contorta* Coniferin β -Glucosidase (Q9ZT64); **PsAH1**: *Prunus serotina* Amygdalin β -Glucosidase 1 (Q945G7); **PsPH1**: *P. serotina* putative Prunasin Hydrolase (Q9M5X4); **PsPH3**: *P. serotina* Prunasin Hydrolase (Q945N9); **PsPH4**: *P. serotina* Prunasin Hydrolase (Q945I4); **PtMAN**: *Populus trichocarpa* putative β -Mannosidase (A9PFR8); **RcMAN**: *Ricinus communis* putative β -Mannosidase (B9T4F7); **SaMA1**: *Sinapis alba* Myrosinase MA1 (P29736); **SaMYR**: *S. alba* Myrosinase MB3 (P29092); **SbDHR1** und **SbDHR2**: *Sorghum bicolor* Dhurrinase 1 und 2 (Q41290 und Q93XR2); **SbMAN**: *S. bicolor* putative β -Mannosidase (SORBI-DRAFT_06g030270); **ScGLU**: *Secale cereale* Benzoxazinoid-Glucosid β -Glucosidase (Q9FYS3); **SiMAN**: *Solanum lycopersicum* β -Mannosidase (Q8VWL8); **TaGLU1a-c**: *Triticum aestivum* DIMBOA-Glucosid β -Glucosidase 1a-c (Q1XIR9, Q1XH05 und Q1XH04); **TpBLU**: *Trifolium repens* nicht-cyanogene β -Glucosidase (P26204); **TrBGLU78**: *T. repens* Linamarase (P26205); **VaVH**: *Vicia angustifolia* Vicianin Hydrolase (A2SY66); **VvMAN**: *Vitis vinifera* putative β -Mannosidase (A5C932); **ZmGLU1**: *Z. mays* DIMBOA-Glucosid β -Glucosidase 1; Cytokinin-Glucosid- β -Glucosidase (P49235); **ZmGLU2**: *Z. mays* DIMBOA-Glucosid β -Glucosidase 2 (Q41761); **ZmMAN**: *Z. mays* putative β -Mannosidase (B7ZXH6).

Abbildung 30: Eingesetzten Sequenzen für den β -Glucosidase Stammbaum: Abkürzung, Herkunft und Funktion der β -Glucosidasen.

Sequenzen

CoBX8

```
1  M A S S S P K T P H I V C V P A P A Q G
1  ATGGCATCTTCATCTCCCAAAACACCTCATATAGTTTGC GTTCCAGCACCAGCCCAAGGT

21  H I N P M F K L A K L F H S R G F Y I T
61  CACATAAAACCCCATGTTCAAAC TAGCAAAC TTTTCCACTCTAGAGGGTTTTACATAACC

41  F V H S E F S Y Q R L L Q A S A L D H L
121 TTTGTCCACAGTGAGTTCAGCTATCAACGTCTTCTACAGGCTAGTGCTCTTGATCATCTT

61  K G L N N F R F E T I P D G L P P E N K
181 AAGGGTCTGAACAATTTTCGATTTGAAACCATCCCTGATGGGTACCACCAGAAAATAAG

81  R G V S D V P E L C K S M R N T C A D P
241 CGAGGAGTATCCGATGTTCCAGAGTTATGTAAATCGATGAGAAACACTTGCGCCGATCCC

101 F R S L I L K L N S S S D V P P V T C I
301 TTTCGGAGTCTTATATTTAAAGCTTAATAGTTCCTTCAGATGTACCTCCCGTAACTTGTATA

121 V A D V A M D F T L Q V S E E L G P P V
361 GTGGCAGATGTCGCCATGGACTTCAC TTTACAGGTCTCCGAAGAACTTGGTCCGCCTGTA

141 V L F F T L S G C G V L G Y M H Y G E L
421 GTTCTCTTCTTTTACTCAGTGGATGTGGAGTCTTAGGGTATATGCACTATGGGGAGCTT

161 L E R G Y F P L R E E S F L S N G Y L D
481 CTTGAAAGGGGCTACTTTCCGTTACGAGAAGAAAGCTTCTTGAGTAACGGATATCTTGAT

181 T E I D W I P A M K G I R L K D L P S F
541 ACCGAAATCGATTGGATACCTGCAATGAAAGGAATTCGATTGAAGGATCTGCCAAGTTTC

201 L R T T D P D D I M F N C K I I E V N S
601 TTGAGAACAACCGATCCGGATGATATCATGTTCAATTGCAAAATTATTGAAGTAAACAGC

221 A F K A K G V I L N T F D D L E Q E V L
661 GCTTCAAAGCTAAAGGTGTCATCCTCAACACTTTTGATGATTTGGAACAAGAGGTCTTA

241 D A I K S K I P Q L Y T I G P L S M L C
721 GATGCTATAAAATCTAAGATTCACAGCTTTATACCATTGGTCCATTATCAATGCTTTGT

261 D H M L Q P D S K L C E A S L W E E D T
781 GATCATATGCTGCAGCCAGACTCGAAGTTATGTGAAGCAAGTTTATGGGAAGAAGATACG

281 S C L E W L Q E K D P K S V L Y V N I G
841 AGTTGTCTAGAATGGCTACAAGAAAAAGATCCCAAGTCAGTTTTGTATGTAAATATTGGT

301 S L A T M T S Q Q L G E F A W G L A N S
901 AGTCTTGCGACGATGACATCCCAACAGCTGGGTGAATTTGCATGGGGACTTGCTAACAGC

321 M C P F L W V I R P D I L D R A S G I V
961 ATGTGTCTTTTTTATGGGTATTCGACCTGATATCTTGGATAGAGCTTCAGGGATAGTT

341 S E D Y K K E I G G R G L L V S W C Q Q
1021 TCAGAAGACTACAAGAAAGAGATTGGTGGAAAGAGGTCTTCTAGTAAGTTGGTGCCAACAA

361 E K V L K H P S I G G F L T H C G W N S
```

1081 GAAAAAGTTCTAAAACATCCTTCGATTGGAGGGTCTTGACACATTGTGGGTGGAATTCT
 381 T L E S L C E G V P M I C W P F F A E Q
 1141 ACGTTAGAAAAGCTTATGCGAGGGGGTGCCTATGATATGTTGGCCTTTCTTTGCAGAGCAA
 401 Q T N C F Y I C N K W G I G M E I D F D
 1201 CAAACAAATTGTTTCTATATCTGTAACAAGTGGGGGATCGGAATGGAAATTGATTTTGAT
 421 V K R V E I G M M V K E L M K G E K G L
 1261 GTTAAGAGAGTGAAAATAGGGATGATGGTAAAGAGTTGATGAAAGGAGAGAAAGGATTG
 441 E M R N K V E D L M S K A I K A T T P G
 1321 GAAATGAGGAAACAAAGTTGAGGATTTGATGAGTAAAGCAATTAAAGCTACAACGCCGGGA
 461 G S S H T N F E M L M E D V A K W -
 1381 GGGTCTTCTCATACTAATTTTAAAATGTTAATGGAGGATGTAGCAAATGGTAG

pLgBX8-Allel1

1 M E A K N G R K A H V L A V A G P A Q G
 1 ATGGAGGCCAAAAATGGCAGAAAAGCTCATGTTTTGGCAGTGGCAGGCCAGCTCAAGGC
 21 H V K P L M K L C R Q I A K H G L K V T
 61 CACGTTAAGCCGTTGATGAAACTGTGTAGGCAAATAGCCAAACACGGCCTTAAGGTGACG
 41 L V N L Q S V H D K L V G E E D N I V Q
 121 CTTGTAACTTACAGAGTGTCCATGATAAATTAGTGGGAGAAGAGGATAACATAGTACAA
 61 M V S I P D V P I E E D K D D P F K K M
 181 ATGGTCTCAATCCCAGATGTGCCAATCGAGGAAGATAAAGATGATCCCTTAAAGAAGATG
 81 K N L R K T M P E S L K D L I Q G I N S
 241 AAGAATCTGCGTAAACTATGCCTGAATCGTTGAAAGATTTGATTCAGGGGATTAATAGT
 101 S S N P E E K I G F V I A D V M V E W L
 301 TCTTCCAATCCGGAGGAGAAAAATTGGATTTGTGATTGCTGATGTTATGGTTGAGTGGTTA
 121 M D T A A E M G A E P I L F S P T S A A
 361 ATGGATACTGCGGCGGAGATGGGAGCGGAGCCGATACTTTTCTCGCCGACGTCCGCCGCC
 141 F R A M M S R I P A L L E D G M L D L N
 421 TTCCGCGCATGATGTCTCGGATTCGCGCGCTTCTAGAAGATGGGATGCTTGATCTAAAT
 161 G N I E K C E K I T L S D D I P A W D K
 481 GGAAATATCGAGAAATGTGAAAAGATTACGTTGTCTGGATGATATACCAGCTTGGGATAAA
 181 D E F S W S F P H D P K T Q K S F F D L
 541 GATGAGTTTTCTGGAGCTTTCCTCATGACCCAAAACTCAGAAGTCTTCTTCGACTTG
 201 I N P D R G K I I Q P K L H L I N T C Y
 601 ATTAATCCTGACCGAGGAAAAATAATCCAACCAAGTTGCATCTAATTAACACTTGTTAT
 221 E L E S P A C D L R P N L L P V G P L L
 661 GAACTTGAATCCCCGGCTTGTGATTTGAGGCCGAATTTACTGCCCGTTGGGCCATTACTT
 241 E M N N S C N F Y P E D E S C L S W L D
 721 GAGATGAATAATTTCTGCAATTTCTATCCAGAAGATGAATCTTGTTTAAGCTGGTTGGAC
 261 T K L P E S V I Y V S F G S I A V V S Q
 781 ACTAAACTACCAGAATCTGTGATTTATGTTTCTTTTGGTAGCATAGCAGTTGTCTCTCAG

281 Q Q L D E L A L G L E L S G R A F L W V
 841 CAACAACCTGGATGAGTTGGCACTCGGGCTCGAGCTCTCGGGCCGGGCTTTTCTGTGGGTC

 301 V R P D L V N G L R A V Y P D G F L E R
 901 GTGAGACCGGATCTTGTGAACGGGTTGCGGGCCGTGTACCCGGATGGATTCTGGAGAGG

 321 V S G I G M I V E W A P Q E R V L F H P
 961 GTGAGTGGGATTGGAATGATCGTCGAATGGGCGCCTCAAGAAAGAGTACTTTTTTCATCCG

 341 S V A C F L T H C G W N S I L E G L S K
 1021 TCTGTGGCGTGTTTTTTAACGCACTGCGGGTGGAACTCGATTCTGGAAGGTTTGTAGTAAA

 361 G V S F L C W P F F M D Q F H N Q N Y I
 1081 GGTGTATCGTTTCTTTGTTGGCCTTTTTTCATGGATCAATCCATAACCAAAATTACATT

 381 C D K W E A G L R V D G D G S G I R T R
 1141 TGTGATAAGTGGGAGGCTGGATTAAGGTTGATGGTGATGGAAGTGGGATTAGAACGAGG

 401 N E I K E K I G M M F C N G D L K A N A
 1201 AATGAAATTAAGGAAAAAATGGGATGATGTTTTGTAATGGCGATTTGAAGGCAAATGCA

 421 M R L K E I F A K T V C E G G S S Y N N
 1261 ATGAGATTGAAGGAAATATTTGCAAAGACCGTATGTGAAGGGGGCTCTTCTTATAATAAT

 441 F E R F I D Y L R K -
 1321 TTTGAGAGATTCATTGATTATCTTAGAAAATGA

CoGT

1 M G Q S K S E S E A H V A V I A F P F G
 1 ATGGGGCAGAGCAAGAGCGAGAGCGAGGCACACGTAGCTGTTATAGCATTCCCCTTCGGC

 21 S H A A Q I L N L T R R L A A S A P E V
 61 TCACACGCAGCTCAGATCCTCAACCTGACTCGCAGATTGGCTGCTTCTGCCCGGAAGTG

 41 T F S F F S T A K S N K A V S G S T G G
 121 ACCTTCTCATTTCTCAGCACTGCCAAGTCCAACAAGGCTGTCTCTGGTTCGACTGGTGGC

 61 A E N I K F Y D V H H G V P E N H S F S
 181 GCTGAGAATATCAAGTTCTACGACGTCCATCATGGGGTGCCTGAGAATCACTCGTTCTCG

 81 G N P L E E I D L F I K A T P G N F I E
 241 GGAATCCCTTGAAGAGATCGATCTTTTCATCAAAGCCACGCCTGGGAATTTTCATCGAG

 101 A I H K A V E E S D R K I T C L T N D S
 301 GCGATACACAAGGCGGTGGAGGAGAGCGATAGAAAGATTACTTGTTTGACCAATGACTCT

 121 F M W M G V D I A Q T L Q V P C V S V W
 361 TTTATGTGGATGGGTGTGGATATAGCTCAGACGCTCCAGGTTCCATGTGTTTCTGTTTGG

 141 A P G A S S L C A H L Y T D I L R Q N I
 421 GCACCAGGTGCTTCTTCACTCTGTGCTCACTTGTATACAGACATTCTCAGACAAAATATT

 161 G V G A N A K Y D E Y L T F I P A M E K
 481 GGCGTTGGAGCAAATGCAAAGTACGACGAATACCTGACCTTCATTCCGGCAATGGAGAAG

 181 V R A G D L P D E I L K G N L D S L F A
 541 GTACGAGCAGGTGACTTGCCAGATGAGATCCTTAAGGGAACTTGGATTCCCTCTTCGCG

201 R L L H K A A Q V M P Q A D V V V I N S
 601 CGCCTGCTACACAAGGCAGCTCAAGTGATGCCCAAGCTGATGTGGTTGTCATCAACTCT

 221 F E E L E Q D I V D H L K T K F Q T C L
 661 TTCGAAGAAGTAGAGCAAGACATAGTCGACCACTTGAAGACCAAGTTCCAAACATGTCTA

 241 T V G P F T I V A P S I S D Q H D P H G
 721 ACAGTCGGGCCCTTACCATCGTGGCACCATCAATATCAGATCAGCACGATCCCCACGGT

 261 C L P W L D A Q P K P S S V A Y I S F G
 781 TGCCTCCCTTGGCTAGACGCACAGCCCAAACCTCATCTGTGGCATATATTAGCTTTGGC

 281 T M A T P P P Q E L K A L A E G I E A S
 841 ACAATGGCTACGCCGCCCCCTCAGGAACCTTAAGGCTCTGGCGGAGGGGATCGAAGCAAGT

 301 G V P F L W S L K D S V K L H L P H G F
 901 GGAGTACCATTCTGTGGTCACTCAAGGACAGTGTAAGCTACATCTACCACATGGGTTT

 321 L E R T S E R G K V V P W T P Q S R L L
 961 TTGGAAGAAGTAGTGAGAGAGGCAAGGTGGTGGCATGGACTCCACAGTCCAGGCTGCTG

 341 R H P A V G V I V T H C G W N S I M E S
 1021 CGACACCCGGCGGTTGGAGTAATTGTGACACACTGTGGGTGGAATTCAATAATGGAGAGC

 361 I M G A V P I V Y R P F F G D H M L I S
 1081 ATAATGGGTGCTGTGCCGATAGTGTACCGCCGTTCTTTGGTGATCATATGTTGATCAGT

 381 R F V S D I W K I G V S A G D V V F T K
 1141 AGGTTTTGTTTTCTGATATATGGAAGATTGGTGTCAAGTGTGGGGATGTAGTGTTCACCAA

 401 D G V V N A L D T I L H K E E G K R I R
 1201 GATGGTGTGTGAATGCTCTGGATAACAATTTTGCACAAAGAGGAAGGGAAGAGGATTAGA

 421 E S V G M W K L K A T Q V V G D S G S T
 1261 GAGAGTGTGGAATGTGAAACTCAAGGCAACACAAGTTGTGGGGGATTTCAGGTAGTACT

 441 T H N L D K L L K I V T A R N -
 1321 ACTCACAACCTTGGACAAGCTACTCAAGATAGTAACCGCTCGCAACTAA

LgGT

1 M V F E S H I G V V A F P F G T H A A P
 1 ATGGTGTGTTGAGTCTCACATAGGTGTTGTAGCATTCCCATTCGGCACACACGCTGCGCCC

 21 L L D V V Q R I A A S A P G T L F S F F
 61 CTACTGGACGTGGTGCAGAGGATCGCAGCCTCGGCGCCCGAACCCTGTTTTTATTCTTC

 41 N T A D S N R K L F N T C A N I R I H E
 121 AACACCGCTGATTCAAACAGAAAGCTTTTCAACACGTGCGCCAATATACGGATACACGAG

 61 V W D G T P R D Q V F T G S H F E A L G
 181 GTGTGGGACGGGACGCCACGTGACCAGGTTTTTACCAGGAGTCATTTTCGAGGCCCTCGGT

 81 L F L K A C P H N L E K A I G E A E E D
 241 TTATTCCCTCAAAGCATGTCCCTCACAATTTGGAGAAGGCCATCGGAGAAGCGGAAGAGGAC

 101 T G L T I C S L I S D A F L W F S C D L
 301 ACCGGTTTGACAATCTGCTCCTTGATAAGTGATGCCTTTTTTGTGGTTTTTCTGTGATTTA

121 A E K R G V P W V A L W T S A S C S L S
 361 GCTGAGAAAAGAGGGGTACCATGGGTAGCTCTCTGGACCTCTGCTTCCTGCTCTCTCTCT

141 A H M Y T H E I L Q A L E S G V A E R D
 421 GCCCATATGTATACTCATGAAATACTACAGGCACTCGAATCTGGTGTGCGGAAAGGGAT

161 E H D K I Q P L I P G L E M A T F R D L
 481 GAACACGACAAGATCCAGCCGTTGATTCAGGGTTGGAAATGGCGACCTTCCGAGATCTA

181 P P E V F L D K N P S P L A V T I N K A
 541 CCGCCGGAAGTTTTCTTAGATAAGAATCCGTCGCCGTTAGCGGTAACGATCAATAAGGCG

201 V E K L P R S H A V I L N S F E E I D P
 601 GTGGAAGAGCTACCGAGATCGCACGCGTAATTCCTCAATTCCTCGAAGAAATCGATCCG

221 I I A K D L K S K F R H F L N I G P S I
 661 ATTATCGCCAAGGATCTGAAATCGAAATTCGCCATTTTCTCAACATCGGACCTTCGATT

241 L P S P I A D D K S G C L S W L G K Q T
 721 CTTCCCTCCCAATCGCAGACGACAAATCAGGGTGCCTATCGTGGCTGGGAAAGCAAACC

261 R P K S V V Y I S F S T V A T P P E K E
 781 AGACCTAAATCGGTTGTCTACATCAGCTTCAGCACGGTGGCTACGCCCGCGGAGAAGGAG

281 L V A L A E A L E A C Q F P F L W S L K
 841 CTGGTGGCGTTGGCTGAAGCCCTGGAAGCGTGCCAATTCCTTTCTGTGGTTCGCTGAAA

301 E Q A R E S L P D G F L E R T T S F G K
 901 GAGCAGGCGAGGGAATCTCTGCCGGATGGGTTTTCTGGAACGGACGACGTCGTTCCGGAAG

321 I V S W A P Q L Q V L A H D S V G V F V
 961 ATCGTGTCTGGGCCCCACAATTGCAGGTTCTGGCGCATGATAGCGTGGGAGTGTTCGTC

341 S H C G W N S I I E S I S S G V P M I C
 1021 TCTCACTGTGGATGGAACCTCGATCATTGAGAGCATTTCAGCGGCGTTCCGATGATTTGT

361 R P F F G D Q K L N S R M I Q D S W K I
 1081 CGCCCATTTTTTGGGGATCAGAAGCTGAACAGCAGAATGATTCAGGATTCATGGAAGATT

381 G L R I E G G V F S K S G A M E A L N R
 1141 GGGTTGAGAATTGAAGGAGGGGTGTTTAGTAAAAGTGGAGCAATGGAGGCGTTGAATCGG

401 I M T G D E G K I I R E N V N V L K E K
 1201 ATAATGACTGGCGATGAAGGAAAGATAATAAGGGAAAATGTTAATGTGCTCAAGGAAAAA

421 A T T A V E P Q G S S S K N F Q K L L Q
 1261 GCTACGACTGCAGTTGAACCACAAGGAAGTTCATCTAAAAATTTCCAGAAATTGCTACAA

441 I I C I -
 1321 ATAATTTGTATTTGA

CoGLU1

1 M G V P F H L V L G L L L L P I L A H S
 1 ATGGGTGTCCCATTTTCATCTGGTTTTAGGCCTTCTTCTGCTTCCTATTCTTGCTCATTCC

21 I A T E S I A I E G A D Y D F A N F N R
 61 ATTGCCACTGAATCCATTGCCATTGAAGGAGCAGATTATGATTTTGCTAACTTCAATCGA

41 S S F P H G F I F G S A G A S Y Q Y E G
121 AGTAGCTTTCCCATGGTTTTATATTTGGATCCGCGGGTGCCTCGTACCAGTATGAAGGT

61 A Y N I D G K G P S M W D T W T H Q R P
181 GCATACAATATAGATGGTAAAGGTCCAAGTATGTGGGATACTTGGACACACCAGCGTCCA

81 E K I A D H S N G D V A N D Q Y H H Y K
241 GAGAAAATAGCAGATCATTCAAATGGAGATGTAGCGAATGATCAGTACCATCATTATAAG

101 E D V K L M K D M G M N A Y R F S I S W
301 GAGGATGTAAAACCTGATGAAAGACATGGGTATGAATGCTTATAGGTTCTCCATCTCATGG

121 S R V L P N G K L A G G V N K M G V Q Y
361 TCGAGGGTTTTGCCTAATGGGAAGCTAGCTGGAGGGGTGAACAAAATGGGAGTCCAATAT

141 Y N N F I N E L L A K G L Q P Y A T I F
421 TACAACAATTTTCATCAACGAGCTCCTAGCAAAAGGTCTGCAACCATATGCGACCATTTTC

161 H W D T P Q H L E D E Y G G F L S R R I
481 CACTGGGATACACCTCAGCACCTTGAAGATGAATATGGTGGCTTTCTGAGTCGGCGTATC

181 V S D F Q D F A E L C Y K M F G D R V K
541 GTATCAGATTTTCAAGATTTTGCAGAGCTTTGCTACAAGATGTTTGGAGATCGCGTGAAA

201 H W I T L N E P W S Y T T A G Y S S G M
601 CACTGGATTACGTTAAACGAACCTTGGAGCTACACCCTGCCGTTACAGCTCAGGGATG

221 F P P N H C S K W I G K C K G G N S A T
661 TTCCCAACAAAATCATTTGCTCCAAAATGGATTGGAAAATGCAAAGGGGGGAATTCGCAACA

241 E P Y I I T H H Q I L A H A A A V K V Y
721 GAACCATATATATTACTCACCACAAAATTTCTTGCCCATGCAGCTGCAGTAAAAGTATAC

261 K D K Y Q A S Q K G M I G I T L N G I W
781 AAGGACAAGTACCAGGCTTCACAAAAGGAATGATTGGAATTACATTAATGGTATTTGG

281 M V P Y S Q A R V H R D A A H R A L D F
841 ATGGTACCGTACTCTCAAGCCCGAGTTCACAGAGATGCTGCTCACCGAGCTCTGGATTTTC

301 M V G W Y M E P L T Y G Y Y P K S M Q L
901 ATGGTTGGATGGTATATGGAACCCCTTGACATATGGATACTATCCAAAGAGTATGCAATTA

321 N V G G K R L P K F S Q K E V D M V K G S
961 AATGTTGGAAAAGATTGCCAAAATTTCTCTCAAAGGAAGTTGATATGGTAAAGGGATCA

341 Y D F L G F N Y Y T A N Y A T N V P F S
1021 TACGACTTTCTTGGATTCAATTACTATACTGCAAACCTATGCAACAAATGTTCTTTTCTCA

361 N D I K P S Y D A D A R A S L A T E R N
1081 AATGATATTAACCAAGCTATGACGCTGATGCTCGTGCTAGTCTTGCCACTGAGAGAAAT

381 G V P I G P K S G S S W L F V Y P Q G M
1141 GGAGTCCCAATTGGACCTAAGTCTGGTTCGTGCTGGCTTTTTTGTGTACCCACAGGGGATG

401 H R C L L Y I K K K Y Q N P V I Y I T E
1201 CACCGCTGTTTGGCTCTACATTA AAAAGAAATATCAAATCCTGTCATCTACATAACAGAG

421 N G I G E L N N D T L S L K E K L N D H
1261 AATGGTATAGGTGAGCTCAATAATGATACATTGTCTCTCAAGGAGAAATGGAATGATCAT

441 M R V D Y H D K H L K S V L R A I K E G
1321 ATGAGAGTGGACTACCATGATAAACATCTTAAATCTGTGCTAAGAGCAATCAAGGAAGGT

461 V D V R G Y F A W S F L D N F E W A D G
1381 GTAGACGTGAGAGGATACTTTGCATGGTCCTTTCTCGACAATTTTGAATGGGCTGATGGT
481 Y T V R F G L N Y V G F K T M R R Y P K
1441 TACACCGTTTCGATTCGGTCTCAATTATGTGGGCTTCAAACAATGAGAAGATACCCAAAA
501 R S A N W F K K F L L H -
1501 AGATCGGCCAACTGGTTCAAGAAGTTTCTCTTACACTAA

CoGLU2

1 M S V V K I V H L V L D L L L V F N S F
1 ATGAGTGTGTGAAGATAGTTCATCTGGTTTTAGATCTTCTTCTTGTGTTCAACTCATTT
21 L F N P R A L D Y D D S D L N R K S F P
61 TTGTTCAATCCAAGAGCTCTGGATTACGATGACTCGGATTTAAACCGAAAGAGTTTTCCA
41 D G F V F G T A S S A Y Q Y E G A Y R E
121 GATGGTTTTGTTTTCGGGACGGCTTCATCGGCGTATCAGTATGAAGGTGCATACAGGGAA
61 D G R G L S I W D T Y T H Q H P E R I V
181 GATGGAAGAGGTCTGAGCATTTGGGATACCTACACTCACCAACACCCAGAAAGAATTGTT
81 D G K N G D V A V N H Y H Q Y K E D V A
241 GATGGCAAAAACGGAGATGTAGCTGTTAATCATTATCATCAATACAAGGAAGATGTAGCA
101 L M K D M G M D A Y R F S I S W S R V L
301 CTTATGAAGGATATGGGCATGGATGCTTACCGATTCTCCATCTCATGGTCAAGAGTTTTA
121 P S G K L S G G V N R K G I Q F Y N N L
361 CCATCTGAAAAGTTAAGCGGAGGGTTAATAGAAAAGGCATTCAATTTTACAATAATCTC
141 I D E L V S K G L Q P Y V T L F H W D V
421 ATCGATGAACTCGTGTCAAAAAGGTTTACAACCTTATGTGACCCTGTTTCATTGGGATGTA
161 P Q Q L E D E Y G G F L S S H I V L D F
481 CCTCAACAACCTCGAAGATGAATACGGTGGATTTTTGAGTTCACACATTGTACTGGATTTT
181 Q D Y A E L C Y K E F G D R V K Y W I T
541 CAGGACTATGCCGAACTTTGCTACAAGGAATTTGGCGATCGAGTGAAATATTGGATCACA
201 I N E P L S L S R D A Y D E G K N A P G
601 ATAAATGAGCCACTGAGCTTAAGTCGGGACGCATATGACGAGGGAAAAAATGCTCCGGGT
221 R C S Q P D G N C T A G N S A T E P Y I
661 CGATGCTCTCAACCTGATGGGAACTGCACGGCAGGGAATTCTGCAACAGAACCATATATT
241 T G H N Q L L A H A A A V K V Y K K K Y
721 ACAGGTCACAACCAACTTCTTGCTCATGCAGCTGCAGTGAAAGTGTACAAGAAAAAGTAT
261 Q G D Q N G K I G I T L S A V W M V P F
781 CAGGGTGATCAAAAATGGAAAAATCGGAATAACACTAAGTGCAGTTTGGATGGTGCCTTTC

281 S E A K I D N E A A Q R A I E F S Y G W
841 TCTGAAGCTAAAATTGATAATGAAGCGGCCCAACGTGCCATTGAATTTAGCTACGGGTGG

301 F M D P L T H G E Y P K I M Q S L V G N
901 TTTATGGATCCTTTGACACACGGCGAGTATCCAAAGATAATGCAATCTCTTGTGGAAAT

321 R L P R F T K S Q S D M V K G S Y D F L
961 CGTCTACCAAGATTCACCAAGAGTCAGTCTGACATGGTGAAGGATCATAACGATTTTCCTT

341 G L N Y Y T A N Y A A N R N N S I D V Q
1021 GGATTAAATTATTATACTGCAAACACTATGCAGCAAATCGTAACAACCTCCATCGACGTTCAA

361 K S Y S T D C H C Q L T K E K D G V S I
1081 AAAAGTTATAGTACGGATTGTCATTGTCAACTAACCAAGGAGAAAGATGGTGTGTCGATT

381 G P K T A L S W L R V Y P I G I L N L L
1141 GGCCCAAAGACTGCTTTATCTTGGCTTCGAGTCTATCCTATAGGAATTCTAAATCTTTTG

401 K Y T K E K Y D N P I I Y I T E N G I A
1201 AAATACACCAAGGAAAAATATGATAATCCTATTATTTACATAACCGAGAATGGTATTGCT

421 E A N N S T L S L E E A L T D P M R I D
1261 GAGGCTAATAATAGTACATTGTCACTTGAGGAGGCATTAACAGACCCAATGAGAATAGAC

441 Y H R R H L S F A L R A I K E G V N I K
1321 TACCATCGCCGTCATCTTTCGTTTGTCTGAGAGCTATCAAGGAAGGTGTGAATATAAAA

461 G Y F A W S F L D N F E W V D G Y T V R
1381 GGGTACTTTGCTTGGTCTTTTTTGGATAATTTTGAATGGGTTGATGGTTACACCGTCCGA

481 F G L N Y V D F K T M K R Y P K H A S I
1441 TTTGGTCTTAACATGTAGACTTCAAACAATGAAGAGATACCCAAAACACGCGTCCATT

501 W F K K F L V Q -
1501 TGGTTCAAGAAGTTCCCTCGTTCAGTGA

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Gierl danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit am Lehrstuhl für Genetik anzufertigen, für sein Interesse an meiner Arbeit und seine fachliche Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Monika Frey, die immer ein offenes Ohr für meine Arbeit hatte, und mich jederzeit mit konstruktiven Ratschlägen, Hilfestellungen und ihrer Diskussionsbereitschaft unterstützt hat. Vielen Dank für die kontinuierliche wissenschaftliche Betreuung und das entgegengesetzte Vertrauen.

Dr. habil. Erich Glawischnig, Prof. Dr. Ramon Torres-Ruiz und Dr. Lilla Römisch-Margl für ihre Bereitschaft zur Diskussion und ihr Fachwissen.

Den restlichen Mitarbeitern und Ehemaligen für ihre Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre: Dr. Katrin Schullehner, Dr. Verena Kriechbaumer, Dr. Holger Schmidt, Ruohe Yin, Zheng Yu, Martina Hitzenbichler, Ottilie Peiß, Peter Dobos, Regina Hüttl, Dr. Rafał Jończyk, Manisha Choudhary und Linlin Zheng. Ein besonderer Dank geht hierbei an Miriam Zweigardt, Dr. Thomas Rauhut, Andreas Fießelmann, Dr. Birgit Tremel und Stefan Lenk für die zahlreichen fachfremden Unternehmungen und ihre vielfältige Unterstützung im Laboralltag.

Der Sekretariatsbesetzung Petra Wick und Carolin Ziegler, für die Hilfe bei jeglichen bürokratischen Angelegenheiten.

Den Studenten Pham Trang, Niklas Bechtel, Thomas Briel, Inge Göpfrich, Agnes Luzak und Miriam Hillenmeyer für ihre engagierte Mitarbeit im Rahmen von Bachelorarbeiten und Forschungspraktika.

Herrn Prof. Rattei gilt mein Dank für die bioinformatische Unterstützung des Projekts durch die Assemblierung der *C. orientalis* Transkriptomsequenzen und die Berechnung der phylogenetischen Bäume.

Herrn Prof. Schwab und seinen Mitarbeitern für die Messungen an der LC-MS und die Bereitstellung der Flavonoid-Substrate.

Herrn Prof. Küster und Dr. Haslbeck für die *de novo* Sequenzierung der gereinigten Glucosyltransferasen.

Der DFG für die Finanzierung meiner Arbeit im Rahmen des Schwerpunktprogramms „Evolution metabolischer Diversität“.

Zuletzt danke ich meinen Eltern und meinen Schwestern Elisabeth und Maria, die immer großes Interesse an meiner Arbeit gezeigt haben und auf deren Unterstützung ich immer zählen konnte.

Regina Dick
Finkenstraße 49
Tel: +49 1520 1874196
regina.dick@wzw.tum.de

Lebenslauf

Zur Person

Geburtsdatum/-ort	31.10.1981 in Forchheim
Nationalität	deutsch
Familienstand	ledig

Ausbildung

10/07-06/10	Promotion und Fertigstellung der vorliegenden Dissertation am Lehrstuhl für Genetik, Wissenschaftszentrum Weihenstephan, Technische Universität München
10/02-09/07	Studium der Molekularen Biotechnologie an der TU München 09/07: Abschluss als M. Sc.
08/92-06/01	Justus von Liebig-Gymnasium Neusäß 06/01: Allgemeine Hochschulreife